



**HAL**  
open science

# Étude expérimentale sur la répulsivité des huiles essentielles sur les tiques

Blandine Martin

► **To cite this version:**

Blandine Martin. Étude expérimentale sur la répulsivité des huiles essentielles sur les tiques. Médecine vétérinaire et santé animale. 2023. dumas-04172054

**HAL Id: dumas-04172054**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04172054>**

Submitted on 27 Jul 2023

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Copyright

Année 2023

# ÉTUDE EXPÉRIMENTALE SUR L'ACTION RÉPULSIVE DES HUILES ESSENTIELLES SUR LES TIQUES

## THÈSE

pour obtenir le diplôme d'État de

### DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

présentée et soutenue publiquement devant

la Faculté de Médecine de Créteil (UPEC)

le 12 juin 2023

par

**Blandine, Michelle, Marie-Hélène MARTIN**

sous la direction de

**Radu BLAGA**

#### JURY

<b>Présidente du jury :</b>	<b>Mme Caroline GILBERT</b>	Professeure à l'EnvA
<b>Directeur de thèse :</b>	<b>M. Radu BLAGA</b>	Professeur à l'EnvA
<b>Examinatrice :</b>	<b>Mme Guillemette CREPEAUX</b>	Maître de conférences à l'EnvA



Liste des enseignants intervenant dans l'encadrement des thèses de Doctorat vétérinaire



version janvier 2023

Liste des Professeurs et Maîtres de conférences titulaires de l'HDR

M	Adjou	Karim	Professeur	DPASP
M	Audigé	Fabrice	Professeur	DEPEC
M	Bellier	Sylvain	Professeur	DSBP
M	Biaga	Radu	Professeur	DSBP
M	Blot	Stéphane	Professeur	DEPEC
M	Boulouis	Henri-Jean	Professeur émérite	DSBP
Mme	Chahory	Sabine	Professeur	DEPEC
M	Chateau	Henry	Professeur	DSBP
Mme	Chetboul	Valerie	Professeur	DEPEC
Mme	Crevier-Denoix	Nathalie	Professeur	DSBP
M	Degueurce	Christophe	Professeur	DSBP
M	Denoix	Jean-Marie	Professeur	DEPEC
M	Desquilbet	Loïc	Professeur	DSBP
Mme	Dufour	Barbara	Professeur émérite	DPASP
M	Eloit	Marc	Professeur	DSBP
M	Fayolle	Pascal	Professeur émérite	DEPEC
M	Federighi	Michel	Professeur	DPASP
M	Fontbonne	Alain	Professeur	DEPEC
Mme	Gilbert	Caroline	Professeur	DSBP
M	Grandjean	Dominique	Professeur	DEPEC
Mme	Grimard-Ballif	Bénédicte	Professeur	DPASP
Mme	Haddad-Hoang Xuan	Nadia	Professeur	DPASP
M	Jouvion	Gregory	Professeur	DSBP
M	Kohlhauer	Matthias	Professeur	DSBP
Mme	Le Poder	Sophie	Professeur	DSBP
M	Manassero	Mathieu	Professeur	DEPEC
Mme	Maurey-Guéneq	Christelle	Professeur	DEPEC
M	Millemann	Yves	Professeur	DPASP
Mme	Pilot-Storck	Fanny	Professeur	DSBP
M	Ponter	Andrew	Professeur	DPASP
Mme	Risco-Castillo	Véronica	Maître de conférences HDR	DSBP
Mme	Rivière	Julie	Maître de conférences HDR	DPASP
Mme	Robert	Céline	Professeur	DSBP
M	Tiret	Laurent	Professeur	DSBP
M	Tissier	Renaud	Professeur	DSBP
M	Verwaerde	Patrick	Professeur	DEPEC
Mme	Viateau	Véronique	Professeur	DEPEC

Liste des Maîtres de conférences et Ingénieurs de recherche DMV

M	Amé	Pascal	Maître de conférences	DPASP
Mme	Barassin	Isabelle	Maître de conférences	DPASP
Mme	Barbarino	Alix	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Benckekroun	Ghita	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Bertoni	Lelia	Maître de conférences	DEPEC
M	Bolnot	Francois	Maître de conférences	DPASP
Mme	Canonne-Guibert	Morgane	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Chevallier	Lucie	Maître de conférences	DSBP
Mme	Cochet-Faivre	Noëlle	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Cordonnier-Lefort	Nathalie	Maître de conférences	DSBP
Mme	Coudry	Virginie	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Crepeaux	Guillemette	Maître de conférences	DSBP
M	Crozet	Guillaume	Maître de conférences	DPASP
Mme	De Paula Reis	Alline	Maître de conférences	DPASP
M	Delsart	Maxime	Maître de conférences associé	DPASP
Mme	Denis	Marine	Ingénieur de recherche (DMV)	DPASP
M	Deshuillers	Pierre	Maître de conférences	DSBP
M	Gauthier	Michel	Maître de conférences associé	DPASP
Mme	Guérin	Virginie	Maître de conférences	DSBP
Mme	Guélin-Poirier	Valentine	Maître de conférences	DPASP
Mme	Jacquet	Sandrine	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
M	Kurtz	Maxime	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Lagrée	Anne-Claire	Maître de conférences	DSBP
Mme	Le Dudal	Marine	Ingénieur de recherche (DMV)	DSBP
Mme	Le Roux	Delphine	Maître de conférences	DSBP
Mme	Legrand	Chantal	Maître de conférences associé	DSBP
M	Mammeri	Mohamed	Maître de conférences	DSBP
Mme	Manguin	Estelle	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Marignac	Genevieve	Maître de conférences	DSBP
Mme	Marotto	Stéphanie	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
M	Mauffré	Vincent	Maître de conférences	DPASP
Mme	Maurice	Emeline	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Mespoules-Rivière	Céline	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Mtimit	Narjès	Maître de conférences	DPASP
M	Mortier	Jérémy	Maître de conférences associé	DEPEC
M	Nudelmann	Nicolas	Maître de conférences	DEPEC
M	Pignon	Charly	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
M	Polack	Bruno	Maître de conférences	DSBP
Mme	Quéré	Émilie	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Ravary-Plumioën	Bérandère	Ingénieur de recherche (DMV)	DPASP
M	Reyes-Gomez	Edouard	Maître de conférences	DSBP
Mme	Rose	Hélène	Maître de conférences associé	DSBP
M	Tanquerel	Ludovic	Maître de conférences	DEPEC



# Remerciements

**Au Président du Jury de cette thèse, Mme. Caroline Gilbert Professeur à l'EnvA,**

Merci d'avoir accepté de prendre la présidence du jury de cette thèse et de votre accompagnement tout au long de ma scolarité à l'EnvA pendant les cours d'éthologie et au sein de l'UE Libre, « Éducation du chien ».

**À M. Radu Blaga, Professeur à l'EnvA, Directeur de cette thèse,**

Merci d'avoir accepté d'encadrer ce projet, d'avoir participé aux études expérimentales, et de m'avoir soutenue, entre autres, lorsque les tiques préféraient se noyer qu'explorer la plateforme.

**À Mme. Guillemette Crepeaux, Maître de conférences à l'EnvA, Examinatrice de cette thèse,**

Merci d'avoir accepté de participer au Jury de cette thèse en tant qu'examinatrice. Merci de m'avoir donné de votre temps.

**À M. Loïc Desquilbet, Professeur à l'ENVA,**

Merci pour votre gentillesse, votre bienveillance, vos conseils avisés quant à l'analyse statistique des résultats de cette thèse. Merci pour le temps que vous m'avez accordé.

**À Mme. Sara Moutailler, et à M. Ladislav Simo du laboratoire UMR BIPAR,**

Merci d'avoir donné un coup de pouce à ce projet avant le démarrage de la partie expérimentale. Merci de m'avoir adressée à Mme Le Mauff pour l'établissement du protocole de test.

**À Mme. Anaïs Le Mauff,**

Merci d'avoir accepté que nous échangions si longuement sur le protocole expérimental de cette thèse. Merci d'avoir pris le temps de répondre à chacun de mes trop longs mails lorsqu'une difficulté surgissait dans mes expérimentations. Sincèrement, merci.

**À mes parents, ma fratrie, ma famille et mes amis,**

Merci d'avoir été présent à chaque étape de ma vie et de ma scolarité, sans vous je ne serais pas arrivée aussi loin. Merci de votre bienveillance et de votre soutien.

**À Litchie, Massai, Nuts et Moka,**

Sans vous, je ne serais peut-être pas sur cette voie, je ne serais peut-être pas ici. Merci de m'avoir mis le pied à l'étrier, merci d'avoir veillé sur moi, et de le faire encore aujourd'hui.



# Table des matières

---

Liste des figures.....	3
Liste des tableaux .....	5
Liste des abréviations.....	7
Introduction .....	9
<b>Première partie : bibliographie .....</b>	<b>11</b>
1. Les tiques.....	11
A. Morphologique externe des tiques.....	11
B. Cycle de vie des tiques .....	13
C. Méthode de recherche de l'hôte .....	15
D. Pathogénie des tiques.....	16
a. Pathogénie directe des tiques.....	16
b. Pathogénie indirecte des tiques .....	16
E. Lutte contre les tiques.....	19
a. Les différentes méthodes de lutte .....	19
b. Le DEET .....	21
c. Attentes des propriétaires d'animaux domestiques vis-à-vis de la lutte contre les tiques .....	22
F. Choix des tiques utilisées pour la partie expérimentale.....	23
G. Monographie d' <i>Ixodes ricinus</i> .....	23
2. Les huiles essentielles .....	27
A. Définition .....	27
B. Procédé de fabrication .....	27
a. Matière première.....	27
b. Procédés d'extraction.....	27
C. Caractérisation .....	30
a. Paramètres de variabilité .....	30
b. Tests de caractérisation et de contrôle qualité.....	31
c. Toxicité des huiles essentielles chez l'utilisateur .....	32
D. Réglementation autour des huiles essentielles .....	33
a. Réglementation autour de la vente des huiles essentielles.....	33
b. Utilisation des huiles essentielles chez les animaux de production .....	35
E. Études expérimentales de l'effet des huiles essentielles sur les tiques .....	40
a. Études de toxicité sur les tiques.....	41
b. Études de répulsivité sur les tiques.....	41
3. Les méthodes de test de répulsivité .....	47
A. Test d'escalade .....	47
B. Test d'évitement sur boîte de Pétri .....	48
C. Test d'escalade dans un tube de centrifugation .....	49
D. Test d'étude du mouvement sur plan incliné et thermostaté .....	49
E. Test d'exploration .....	50
F. Synthèse sur les tests de répulsivité.....	51
G. Choix du test utilisé pour la partie expérimentale .....	52
<b>Deuxième partie : étude expérimentale .....</b>	<b>53</b>
1. Introduction .....	53
2. Matériels et méthodes .....	55
A. Méthode de sélection des huiles essentielles.....	55
a. Effet répulsif.....	55
b. Toxicité chez l'animal.....	57
B. Les tiques.....	59

C. Les produits à tester.....	59
a. Les huiles essentielles .....	59
b. Le N,N-diéthyl-3-méthylbenzamide (DEET) .....	62
D. Le test d'exploration .....	63
E. Analyse des vidéos .....	65
F. Analyse statistique .....	66
3. Résultats .....	69
A. Vidéos obtenues .....	69
B. Analyse des vidéos .....	69
C. Résultats de l'analyse statistique avec le test du $\chi^2$ .....	71
D. Nombre moyen de passages au-dessus de la barrière chimique .....	72
E. Comparaison des résultats des huiles essentielles avec ceux du DEET quant au nombre de nymphes passant la barrière chimique .....	73
F. Comparaison des résultats des huiles essentielles entre elles .....	75
4. Discussion.....	77
A. Discussion autour du matériel et méthode.....	77
a. Choix des tiques .....	77
b. Choix des huiles essentielles .....	77
c. Choix de la méthode de test .....	77
B. Analyse des résultats du test statistique du $\chi^2$ .....	78
a. <i>Corymbia citriodora</i> (Eucalyptus citronné) .....	78
b. <i>Lavandula angustifolia</i> (Lavande fine).....	79
c. <i>Melaleuca alternifolia</i> (Arbre à thé) .....	81
d. <i>Pelargonium graveolens</i> (Géranium rosat) .....	81
e. <i>Rosmarinus officinalis</i> (Romarin officinal) .....	82
f. DEET .....	83
g. Pour résumer .....	84
C. Réduction du nombre moyen de passages au-dessus de la barrière chimique.....	84
a. Comparaison des résultats des huiles essentielles avec ceux du DEET .....	85
b. Comparaison des résultats des huiles essentielles entre elles .....	86
D. Discussion autour du protocole.....	86
a. Non-indépendance des individus .....	86
b. Biais d'association de l'étude statistique .....	87
c. Affiner l'analyse des vidéos.....	88
d. Restrictions à une espèce et une stase de tique.....	88
E. Pour aller plus loin vers un produit à base d'huile essentielle commercialisable .....	89
<b>Conclusion.....</b>	<b>91</b>
<b>Liste des références bibliographiques .....</b>	<b>93</b>
<b>Annexe 1 : Liste des plantes inscrites au tableau 1 du règlement (UE) 37/2010 .....</b>	<b>99</b>
<b>Annexe 2 : Certificat d'analyse des huiles essentielles .....</b>	<b>107</b>
<b>Annexe 3 : Certificat d'analyse du DEET .....</b>	<b>115</b>
<b>Annexe 4 : Tableaux préalables à la réalisation du test de <math>\chi^2</math>. .....</b>	<b>117</b>

# Liste des figures

---

Figure 1 : Arbre phylogénétique des tiques (Boulanger et McCoy, 2015) .....	11
Figure 2 : Schéma de la morphologie d'une tique Ixodidé (Bonnet <i>et al.</i> , 2017).....	12
Figure 3 : Morphologie des stases (Chabanne et Guillot, 2016) .....	13
Figure 4 : Cycle de vie d' <i>I. ricinus</i> (Chabanne et Guillot, 2016).....	14
Figure 5 : Schéma de "co-feeding" entre une tique infectée et une tique saine (Guillot, 2020) .....	17
Figure 6 : Tableaux récapitulatifs des principaux agents pathogènes transmis par les tiques aux carnivores domestiques, en Europe, et leur mode de transmission (Chabanne et Guillot, 2016)...	18
Figure 7 : Photo du retrait manuel d'une tique grâce à un « tire-tique » (photo personnelle) .....	19
Figure 8 : Photo de <i>Melinis minutiflora</i> (Forest & Kim Starr, 2023).....	20
Figure 9 : Formule du DEET (Leal, 2014).....	22
Figure 10 : Représentation schématique et photographie d' <i>I. ricinus</i> et de ses caractéristiques physiques (Chabanne et Guillot, 2016).....	24
Figure 11 : Aire de répartition de la tique <i>Ixodes ricinus</i> (Chabanne et Guillot, 2016).....	24
Figure 12 : Schéma du procédé d'extraction des huiles essentielles par entraînement à la vapeur sous basse pression (Baudoux <i>et al.</i> , 2011) .....	28
Figure 13 : Exemple d'un montage d'hydrodistillation (Samadi <i>et al.</i> , 2016) .....	29
Figure 14 : Montage de l'extraction au Soxhlet (Poirot, 2007).....	30
Figure 15 : Capture d'écran de la fiche produit du Thym à thymol (Aroma-Zone, 2023) .....	32
Figure 16 : Capture d'écran de la page "Huile essentielle de thym à thymol" mettant en avant les précautions d'usage de l'huile essentielle (Aroma-Zone, 2023) .....	34
Figure 17 : Schéma original du test d'escalade tel que décrit dans l'article (Carroll, 1998) .....	47
Figure 18 : Schéma du test d'évitement sur boîte de Pétri (schéma réalisé par moi-même, inspiré de l'article (Elmhalli <i>et al.</i> , 2019)).....	48
Figure 19 : Photo du dispositif original du test d'étude du mouvement des tiques sur plan incliné et thermostaté (Kröber <i>et al.</i> , 2013).....	50
Figure 20 : Schéma du test d'exploration (Le Mauff, 2021).....	51
Figure 21 : Analyse chromatographique de l'huile essentielle de <i>Corymbia citriodora</i> (Eucalyptus citronné) .....	59

Figure 22 : Analyse chromatographique de l'huile essentielle de <i>Lavandula angustifolia</i> (Lavande fine) .....	60
Figure 23 : Analyse chromatographique de l'huile essentielle de <i>Melaleuca alternifolia</i> (Arbre à thé) .....	60
Figure 24 : Analyse chromatographique de l'huile essentielle de <i>Pelargonium graveolens</i> (Géranium rosat variété Égypte).....	61
Figure 25 : Analyse chromatographique de l'huile essentielle de <i>Rosmarinus officinalis</i> (Romarin officinal).....	61
Figure 26 : Photo des flacons utilisés pour stocker les huiles essentielles une fois diluées .....	62
Figure 27 : Photo de la préparation de la plateforme .....	63
Figure 28 : Photo du dépôt du produit à tester sur le papier filtre.....	63
Figure 29 : Photos du montage expérimental .....	64
Figure 30 : Capture d'écran de la vidéo 3 de test de l'huile essentielle de <i>Corymbia citriodora</i> (Eucalyptus citronné) 2% à 14'25" .....	66
Figure 31 : Capture d'écran de la vidéo 3 de test de l'huile essentielle de <i>Corymbia citriodora</i> (Eucalyptus citronné) 2% à 5'25" .....	66
Figure 32 : Photo du montage utilisé dans l'article de Goode (Goode <i>et al.</i> , 2018).....	80

# Liste des tableaux

---

Tableau 1 : Liste des plantes ayant une LMR sans restriction d'utilisation, d'intérêt pour l'élevage des animaux de production (ANSES, 2022). NB : « H.E. » signifie « Huile essentielle » .....	36
Tableau 2 : Liste des plantes d'intérêt dans l'élevage des animaux de production, ayant une LMR soumise à restriction d'usage (ANSES, 2022) .....	38
Tableau 3 : Liste des plantes d'intérêt dans l'élevage des animaux de production, sans LMR (ANSES, 2022).....	39
Tableau 4 : Tableau récapitulatif des articles sur l'étude de l'effet répulsif des huiles essentielles sur les tiques .....	43
Tableau 5 : Synthèse du pourcentage de répulsivité obtenue pour chaque huile essentielle ou composé testé dans les articles étudiés .....	56
Tableau 6 : Exemple de tableau utilisé pour réaliser un test du Chi <sup>2</sup> pour chaque huile essentielle et dilution.....	67
Tableau 7 : Tableau de l'interprétation des vidéos.....	70
Tableau 8 : Tableau regroupant les résultats du test du Chi <sup>2</sup> , appliqué au nombre de nymphes qui ont passé la barrière chimique, de la correction d'Holm ( $p_{corr}$ ) et du calcul de l'OR associé pour chaque huile essentielle et chaque dilution testée .....	71
Tableau 9 : Tableau regroupant le nombre moyen de passages des nymphes <i>d'I. ricinus</i> parmi les 40 nymphes, pour chaque produit étudié et pour chaque dilution .....	72
Tableau 10 : Tableau du pourcentage de nymphes <i>d'I. ricinus</i> n'ayant pas franchi la barrière chimique, selon le produit testé et la dilution utilisée (NB : 100 % = 40 individus).....	74
Tableau 11 : Tableau montrant les huiles essentielles et leurs dilutions triées en fonction de l'OR (par ordre croissant) obtenu suite à la réalisation du test du Chi <sup>2</sup> sur le nombre de nymphes ayant traversé la barrière chimique .....	75



# Liste des abréviations

---

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

ANSES : Agence Nationale de Sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

ANSM : Agence Nationale de la Sécurité du Médicament et des produits de santé

DEET : N,N-diéthyl-3-méthylbenzamide

DGCCRF : Direction générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des fraudes

HE : Huile essentielle

LMR : Limite Maximale de Résidus

Nbr : Nombre

OMS : Organisation mondiale de la santé

OR : Odds Ratio

$p_{\text{corr}}$  : « *p-value* » corrigée



# Introduction

---

La prévalence des maladies vectorielles dans le monde est en constante augmentation (plus de 17 % des maladies infectieuses et parasitaires d'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) en 2020). Elles provoquent plus d'un million de décès par an. Ces maladies sont particulièrement préoccupantes, car elles touchent à la fois les animaux et les humains, provoquant des symptômes parfois graves, voire mortels (fièvres, encéphalites, etc.). Les tiques sont alors les vecteurs de maladies zoonotiques (maladies transmissibles de l'animal vertébré à l'homme, et vice-versa). Le concept « One Health » (« une seule santé ») vise une approche unifiée de la santé publique (humaine) et de la santé animale afin de réduire les risques de pandémies dues aux zoonoses et l'impact économique indiscutable qu'elles peuvent avoir. En effet, les épidémies zoonotiques occasionnent de forts coûts dus aux soins médicaux occasionnés, mais aussi la perte de productivité et la restriction aux échanges entre les pays afin d'éviter à l'épidémie de se répandre. Parmi l'ensemble des agents pathogènes pour l'homme recensés, plus de la moitié (60 %) sont classées comme zoonotiques. Suivant le concept « One Health », il est donc particulièrement intéressant de se pencher sur la lutte contre les parasites hématophages vecteurs (moustiques, tiques, puces, etc.) afin de protéger les populations des nombreuses maladies qu'ils peuvent transmettre.

Une des méthodes de lutte contre les vecteurs est l'utilisation de produits avec une action répulsive. Parmi les molécules utilisées, le N,N-diéthyl-3-méthylbenzamide (DEET) a longtemps été une molécule particulièrement utilisée pour son action répulsive sur de nombreux vecteurs (moustiques, puces, tiques, etc.). En plus de voir surgir des résistances aux répulsifs dans les populations de vecteurs, des défiances surgissent envers les molécules de synthèse, dites « chimiques » dans le langage courant. La société est à la recherche de multiples alternatives pour se protéger des vecteurs. Ces alternatives, pour les animaux, et majoritairement les animaux de compagnie, passent de l'utilisation d'applications pour smartphone, au port de colliers en céramique dits « anti-tiques », à l'utilisation quelque fois un peu hasardeuse d'huiles essentielles, parfois avec des colliers imprégnés vendus en animalerie.

La prise de conscience du risque de résistances des vecteurs aux molécules répulsives, et la volonté sociétale d'évoluer vers les médecines complémentaires ou alternatives (pensées comme « plus douces », souvent moins onéreuses et plus respectueuses de l'environnement), orientent les recherches vers l'utilisation de nouveaux produits à base de plantes, comme les huiles essentielles (HE), pour servir de répulsif contre les parasites hématophages, vecteurs courants de maladies infectieuses et parasitaires.

Les huiles essentielles sont des extraits de plantes obtenus par divers procédés comme la distillation, l'entraînement à la vapeur, ou le broyage plus distillation. Elles concentrent les principes actifs des plantes utilisées.

Cette thèse a pour but, dans un premier temps, de dresser un tableau des huiles essentielles présentant un effet répulsif sur les tiques. À l'issue de cette première partie, 5 huiles essentielles seront sélectionnées et nous investiguerons leur effet répulsif sur les nymphes d'*I. ricinus*, en utilisant un protocole expérimental d'exploration de l'environnement.

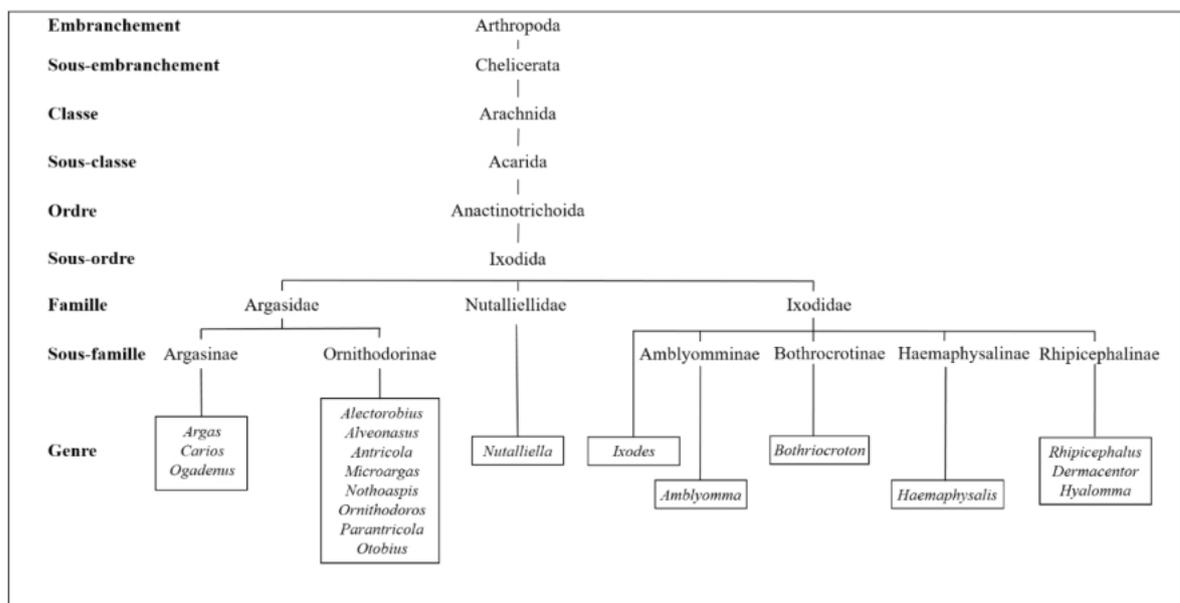
Ainsi, cette thèse se compose d'une première partie, bibliographique, qui rassemble les connaissances générales que l'on possède sur les tiques, les données actuelles des recherches menées sur l'action répulsive des huiles essentielles sur les tiques, et les différents tests et méthodes permettant de prouver l'efficacité des répulsifs. La seconde partie est consacrée à la description de l'étude expérimentale menée au cours de cette thèse. Nous y détaillerons les étapes de la réalisation du protocole d'exploration de l'environnement, les données obtenues en réalisant ce protocole, les résultats que nous pouvons en tirer. Enfin, nous discuterons ces résultats en regard des données bibliographiques de la première partie.

# Première partie : bibliographie

## 1. Les tiques

Les tiques sont des arthropodes de la classe des arachnides, de la sous-classe des acariens. Ce sont des ectoparasites hématophages des vertébrés (à sang chaud et à sang froid). Les tiques sont réparties en deux familles, les tiques dures (les Ixodidés) et les tiques molles (les Argasidés), en fonction de la présence ou l'absence d'un écusson chitineux (le scutum). Au sein des tiques dures, d'autres genres sont différenciés, comme montrés dans la Figure 1.

Figure 1 : Arbre phylogénétique des tiques (Boulanger et McCoy, 2015)



En France, les tiques les plus présentes sont des tiques de la famille des Ixodidés. Les trois espèces les plus représentées sont *Ixodes ricinus*, *Dermacentor reticulatus* et *Rhipicephalus sanguineus* (Chabanne et Guillot, 2016).

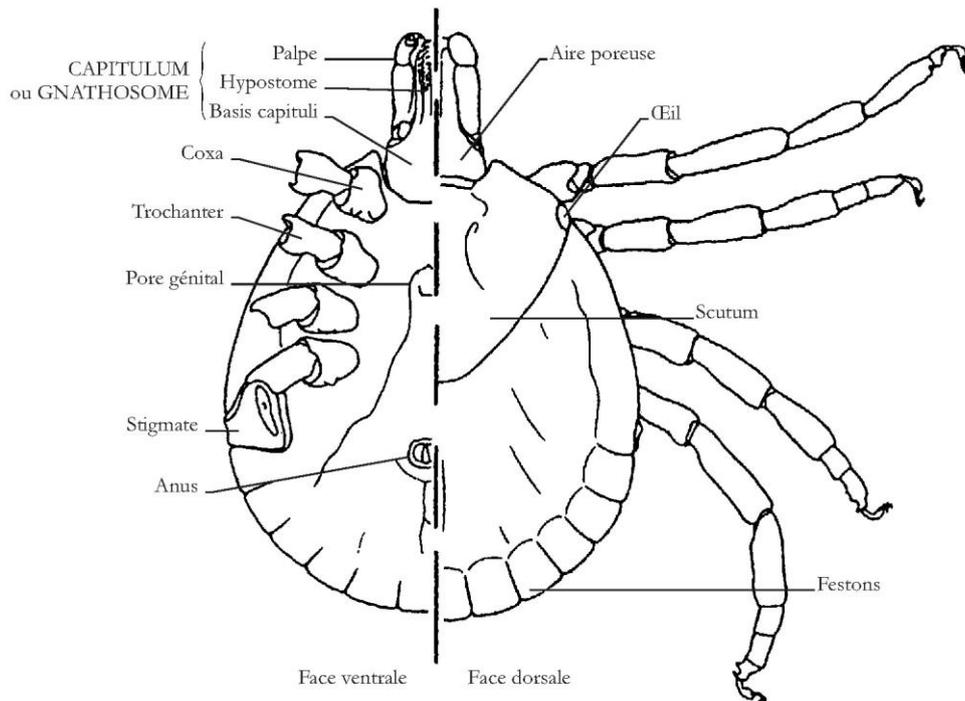
### A. Morphologique externe des tiques

Dans cette partie, nous aborderons majoritairement la morphologie des tiques de la famille Ixodidés, car ce sont les plus répandues en France.

Durant les trois stases qui composent le cycle de vie, le corps d'une tique est d'aspect globuleux. Il est aplati dorso-ventralement lorsqu'elle est à jeun. Le céphalothorax et l'abdomen sont soudés. On distingue une partie antérieure (le gnathosoma), et une partie postérieure (l'idiosoma) (François, 2008).

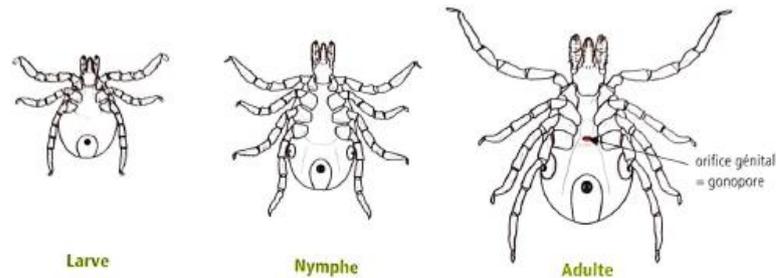
Le gnathosoma comprend la base du rostre, et le rostre lui-même. Le rostre est composé d'un hypostome portant des denticules, de deux chélicères permettant la dilacération des tissus, et de deux pédipalpes qui enserrant les pièces précédemment citées en un étui, au repos (François, 2008). La longueur du rostre par rapport à sa largeur permet de différencier les tiques longirostre (rostre plus long que large) des tiques brévirostre (rostre aussi long que large) (Chabanne et Guillot, 2016). Un schéma de l'anatomie des tiques est présenté Figure 2.

**Figure 2 : Schéma de la morphologie d'une tique Ixodidé (Bonnet *et al.*, 2017)**

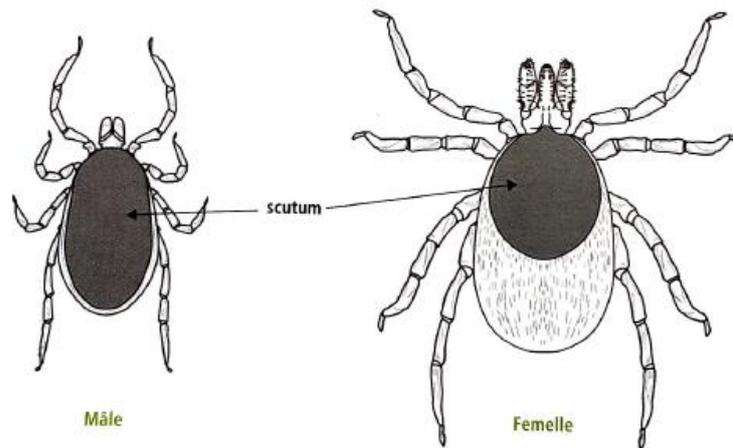


Sur la face ventrale sont attachées 4 paires de pattes (sauf chez la larve qui n'en compte que 3) à 6 articles, se terminant par une ventouse et deux griffes. Elles permettent le déplacement sur des surfaces lisses et verticales. La face dorsale de l'idiosoma comporte un écusson chitinisé : le scutum, présent chez les tiques dures (cf. Figure 3). Cet écusson est réduit chez la femelle adulte et les stases larvaires et nymphales. Cela permet le gorgement des individus (François, 2008).

**Figure 3 : Morphologie des stades (Chabanne et Guillot, 2016)**



Face ventrale des 3 stades évolutifs d'une tique dure.



Face dorsale d'une tique adulte.

## B. Cycle de vie des tiques

Le cycle de vie des tiques se compose de trois « stades évolutifs », appelés stades : les larves, les nymphes, les adultes. Elles surviennent après l'éclosion de l'œuf et sont séparées entre elles par une mue de croissance (François, 2008). Il existe quelques variations entre les tiques du genre Ixodidés et celles du genre Argasidés, notamment quant au nombre de repas sanguins effectués à chaque stade, et au nombre de stades à chaque stade (Perez-Eid et Gilot, 1998). Dans les lignes suivantes, le cycle abordé sera celui des tiques dures (Ixodidés), car ce sont les tiques majoritairement présentes en France. Le cycle d'*I. ricinus* est résumé de façon schématique dans la Figure 4, page suivante.

L'œuf éclot dans une période comprise autour de 20 à 50 jours après la ponte (François, 2008).

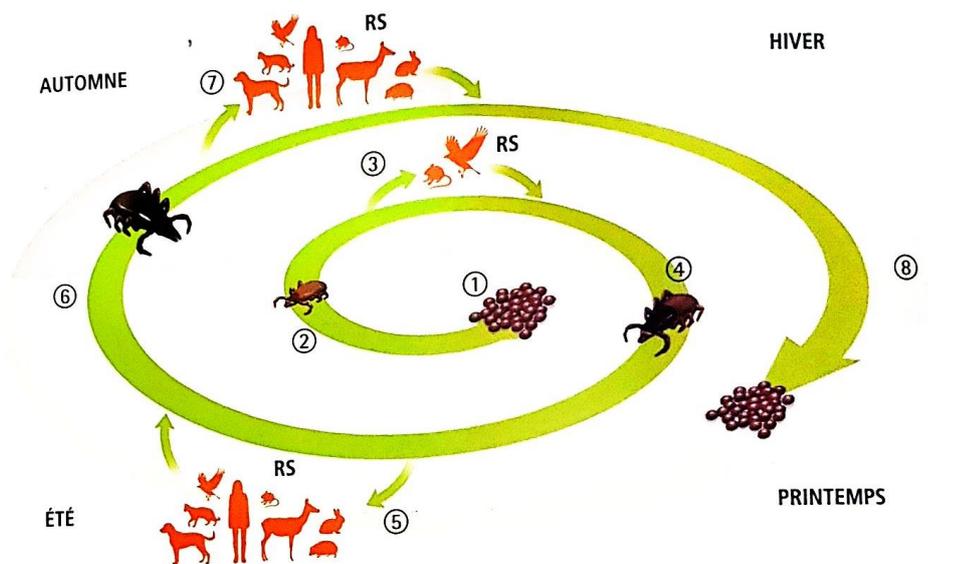
La larve est de très petite taille (1 mm environ) et ne possède que 3 paires de pattes (Chabanne et Guillot, 2016). Dans le cas des tiques dures (Ixodidés), la larve est claire, molle et gonflée d'eau à l'éclosion. En quelques jours, elle s'aplatit, perd son eau et les déchets métaboliques accumulés pendant son développement embryonnaire. Sa cuticule durcit et elle peut alors se mettre en quête de son premier repas sanguin. Celui-ci peut durer 3 à 12 jours. Ensuite, la

larve se laisse tomber au sol et entame sa métamorphose. Celle-ci a une durée allant de 2 à 8 semaines, selon l'espèce et les conditions climatiques (Perez-Eid et Gilot, 1998).

La stase nymphale est la seconde stase du cycle de vie des tiques. La nymphe mesure entre 1 et 4 mm. Elle possède 4 paires de pattes. Elle ne présente pas d'orifice génital (Chabanne et Guillot, 2016). La durée du repas sanguin de la nymphe est similaire à celui présent au stade larvaire. La période de métamorphose vers la stase adulte présente quant à elle des délais différents de la première métamorphose (de la larve vers la nymphe) : elle est plus longue et dure de 20 à 25 semaines selon les conditions climatiques (Perez-Eid et Gilot, 1998).

La stase adulte est nettement plus grande que les précédentes stases. Le mâle mesure entre 2 et 4 mm, contre 4 à 6 mm pour une femelle. Cette dernière peut aller jusqu'à 1 cm lorsqu'elle se gorge de sang. On observe une large variation de taille entre les mâles et les femelles, ces dernières ayant une taille pouvant doubler celle du mâle, une fois gorgée de sang. L'adulte possède 4 paires de pattes et un orifice génital en face ventrale du corps (Chabanne et Guillot, 2016). Seule la femelle prend un véritable repas sanguin avant l'accouplement qui peut avoir lieu sur l'hôte ou au sol. Le mâle meurt rapidement après la fécondation. La femelle, elle, termine son repas sanguin après la fécondation, puis pond un nombre important d'œufs (entre 1 000 et 15 000 selon l'espèce) avant de mourir (Perez-Eid et Gilot, 1998).

**Figure 4 : Cycle de vie d'*I. ricinus* (Chabanne et Guillot, 2016)**



RS : repas sanguin

1. Les œufs sont pondus dans l'environnement.
2. Dans l'environnement, les œufs éclosent en larves hexapodes.
3. Les larves se nourrissent rapidement (2-3 jours) sur un hôte adapté (petit mammifère, rongeur, oiseau dans le cas d'*Ixodes ricinus*).
4. Les larves retournent dans le milieu extérieur et muent en nymphe octopode.
5. Les nymphes se nourrissent durant une courte période (4-6 jours) sur un hôte adapté.
6. Elles retournent ensuite dans le milieu extérieur où elles passent la plus grande partie de leur vie et muent en adulte.
7. Les femelles prennent un unique repas de 5 à 7 jours. Les mâles ne se nourrissent pas (cas des mâles du genre *Ixodes*) ou se nourrissent de manière intermittente sur l'hôte.
8. À l'issue du gorgement, la tique femelle tombe sur le sol, pond ses œufs (500 à 7 000 en une seule fois) et meurt.

Selon l'espèce, le cycle peut s'effectuer soit dans des habitats très divers (couvert végétal fermé, comme une forêt, ou bien couvert végétal ouvert, comme une prairie), on parle alors de tiques exophiles ; soit dans un habitat plus spécialisé et couvert (terriers, nids, etc.), on parle alors de tiques endophiles (Chabanne et Guillot, 2016).

Toujours selon l'espèce, les tiques peuvent être spécifiques d'un type d'hôte particulier, à toutes les stases, ou seulement à certaines. On parle de tiques monotropes si elles sont spécifiques, à toutes les stases, d'un seul type d'hôte. Les tiques ditropes se nourrissent aux stases larvaires et nymphales sur de petits mammifères, et à la stase adulte, sur de grands mammifères. Les tiques télotropes (ou polytropes) se nourrissent indifféremment sur les petits ou les grands mammifères aux stases larvaires et nymphales, exclusivement sur de grands mammifères à la stase adulte. La tique *I. ricinus* est télotrope (Chabanne et Guillot, 2016).

Il est également possible de classer les tiques en fonction du nombre d'hôtes intervenant dans leur cycle de vie. En effet, les métamorphoses peuvent se dérouler sur l'hôte (ainsi l'acarien ne quitte jamais l'hôte de départ), comme au sol (l'acarien doit alors trouver un nouvel hôte pour poursuivre son cycle). Un cycle monoxène se déroule sur un hôte unique, un cycle dixène se déroule sur deux hôtes différents (c'est alors la métamorphose entre la stase larvaire et la stase nymphale qui a lieu sur l'hôte), et un cycle trixène se déroule sur trois hôtes différents (chaque métamorphose a lieu dans l'environnement). La tique *I. ricinus* a un cycle trixène (François, 2008).

La connaissance des différents types de cycles et lieux de réalisation de ceux-ci permet la compréhension de la transmission de pathogènes et ainsi la lutte contre les maladies dites « à tiques » comme la borréliose de Lyme (causée par la bactérie *Borrelia burgdorferi*), la babésiose (due à *Babesia canis* (chez le chien), *B. bovis* (chez la vache)), ou encore l'ehrlichiose (due à *Anaplasma phagocytophilum*) (Perez-Eid et Gilot, 1998).

### **C. Méthode de recherche de l'hôte**

Pour trouver un hôte, les tiques utilisent deux stratégies : la stratégie passive, et la stratégie active. La stratégie passive consiste à attendre le passage d'un hôte à proximité et à se laisser tomber dessus. La stratégie active nécessite de partir à la recherche de l'hôte. La détection de celui-ci se fait par exemple grâce à la captation d'une émission de chaleur ou de CO<sub>2</sub> par l'animal. Les stimuli entrant en jeu sont visuels (changement de luminosité), sonores, olfactifs ou chimiques (François, 2008).

Les deux stratégies mises en œuvre lors de la recherche de l'hôte se basent ainsi sur un comportement d'escalade (du couvert végétal, de l'hôte, etc.) (Kröber *et al.*, 2013), et sur un comportement d'exploration de l'environnement (François, 2008).

## D. Pathogénie des tiques

### a. Pathogénie directe des tiques

La première facette de la pathogénie des tiques est une pathogénie directement liée à la morsure de la tique sur son hôte. Cette pathogénie est due aux enzymes libérées par les glandes salivaires de la tique (quelle que soit sa stase), dans la peau de l'hôte. La salive des tiques contient, entre autres, des anticoagulants, des enzymes hémolysantes, et agglutinantes (Guiguen et Degeilh, 2001). La morsure de tique a une action mécanique et irritative sur la peau de son hôte. Elle crée une inflammation locale à cause de l'effraction vasculaire causée par le rostre, la vasodilatation et l'afflux de neutrophiles (Guillot, 2020). La réaction de l'hôte à la morsure peut être plus importante (œdème, rougeur, douleur) s'il a déjà été mordu par une tique précédemment : la première morsure aura entraîné une stimulation du système immunitaire, et donc la production de lymphocytes réactionnels (Guillot, 2020).

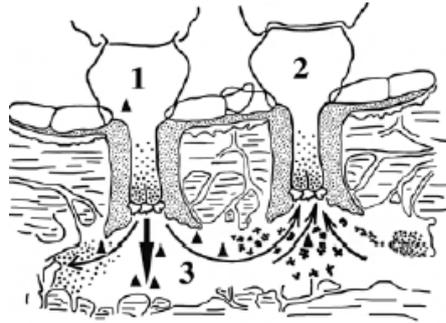
La tique, en faisant un repas sanguin, a également un effet spoliateur sur l'animal. Le sang ingéré au cours du repas sanguin est concentré grâce à l'excrétion de l'eau et des sels minéraux. Ainsi, il faut considérer que la quantité de sang prise à l'hôte est deux à trois fois supérieure au volume indiqué en fin de repas (volume qui peut atteindre plusieurs millilitres). Si de nombreuses tiques sont présentes en même temps sur l'animal, il y a un risque d'anémie. Ce risque est augmenté chez les vertébrés de petite taille (Guiguen et Degeilh, 2001).

### b. Pathogénie indirecte des tiques

La pathogénie indirecte des tiques vient de leur rôle de vecteur de maladies. C'est-à-dire qu'elles transmettent de manière active des agents pathogènes d'un vertébré à un autre, pendant leur repas sanguin. Afin d'assurer la transmission biologique d'un agent pathogène (virus, bactérie, parasite), il faut trois étapes : l'infection du vecteur lors d'un repas sanguin sur un premier vertébré porteur de l'agent pathogène, le développement de l'agent pathogène dans le vecteur, et l'infection d'un deuxième vertébré (Chabanne et Guillot, 2016).

L'infection du vecteur se fait obligatoirement lors d'un repas sanguin, sur un hôte infecté. Il faut que l'hôte soit en période de virémie, bactériémie ou parasitémie pour que l'agent pathogène se trouve circulant dans le sang qu'absorbera la tique (Chabanne et Guillot, 2016). Il existe toutefois certains agents pathogènes qui ont une transmission transovarienne chez la tique, ils peuvent donc infecter directement les œufs, qui donneront alors naissance à des larves déjà infectées par l'agent pathogène. C'est le cas par exemple de parasites du genre *Babesia* (Guillot, 2020). Le « co-feeding » est un mode de transmission d'un agent pathogène directement d'une tique à l'autre (cf. Figure 5). Si deux tiques se nourrissent suffisamment proche sur un hôte sain, et que l'une des deux tiques est infectée (1), elle peut transmettre l'agent pathogène directement à l'autre tique (2), par échange de salive via le sang du vertébré dont elles se nourrissent (3) (Guillot, 2020).

Figure 5 : Schéma de "co-feeding" entre une tique infectée et une tique saine (Guillot, 2020)



(1) : tique infectée

(2) : tique saine

(3) : échange de salive et d'agents pathogènes entre les tiques par le sang de l'hôte

L'agent pathogène récupéré via le repas sanguin de la tique évolue ensuite en son sein. Pour cela, il faut que la tique ait une « compétence vectorielle ». Cela signifie qu'elle doit permettre le développement de l'agent pathogène en elle (Migné, 2022). Pour les virus, la population virale commence par décliner avant que la réplication virale ne se mette en place dans l'ensemble des organes de la tique. Pour les bactéries, la multiplication est moins intense que pour les virus, et touche un grand nombre de tissus (dont la nature est variable selon la bactérie). Pour les protozoaires, la tique est un hôte essentiel dans le cycle parasitaire. Elle est par exemple l'hôte chez lequel la reproduction sexuée des parasites du genre *Babesia* a lieu (Chabanne et Guillot, 2016).

La dernière étape de la transmission biologique de l'agent pathogène par le vecteur est le passage de l'agent pathogène à l'hôte vertébré naïf. Ce passage s'effectue par une injection de salive (à condition que les glandes salivaires de la tique contiennent l'agent pathogène), pendant le repas sanguin (Chabanne et Guillot, 2016).

Les agents pathogènes transmis aux animaux domestiques par les tiques sont nombreux. On peut nommer *Babesia divergens* (bovins), *Babesia canis* (chiens), *Borrelia burgdorferi* (maladie de Lyme chez l'homme, borréliose chez le chien), *Anaplasma phagocytophilum* (bovins, équidés, chiens, homme), *Coxiella burnetii* (bovins, homme) (Migné, 2022).

Une liste des principaux agents pathogènes transmis par les tiques aux carnivores domestiques, en Europe, et leur mode de transmission est présentée Figure 6 (Chabanne and Guillot, 2016).

**Figure 6 : Tableaux récapitulatifs des principaux agents pathogènes transmis par les tiques aux carnivores domestiques, en Europe, et leur mode de transmission (Chabanne et Guillot, 2016).**

*Liste des principaux agents pathogènes transmis par Ixodes ricinus aux carnivores domestiques en Europe*



Agents pathogènes	Mode de transmission	Transmis au chien	Transmis au chat
<i>Borrelia</i> spp.	Trans-stadiale	Oui	Oui
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	Trans-stadiale	Oui	Oui
Virus de l'encéphalite à tique (TBE)	Trans-stadiale	Oui (Europe centrale et Europe de l'Est)	
Virus du Louping ill	Trans-stadiale	Oui (Royaume Uni, Irlande)	

*Liste des principaux agents pathogènes transmis par Dermacentor reticulatus aux carnivores domestiques en Europe*



Agents pathogènes	Mode de transmission	Transmis au chien	Transmis au chat
<i>Babesia canis</i>	Trans-ovarienne	Oui	

*Liste des principaux agents pathogènes transmis par Rhipicephalus sanguineus aux carnivores domestiques en Europe*



Agents pathogènes	Mode de transmission	Transmis au chien	Transmis au chat
Filaires sous-cutanées ou péritonéales	Trans-stadiale	Oui	Oui
<i>Hepatozoon</i> spp	Trans-stadiale	Oui	Oui
<i>Babesia vogeli</i>	Trans-ovarienne	Oui	
<i>Ehrlichia canis</i>	Trans-stadiale	Oui	
<i>Rickettsia conorii</i>	Trans-ovarienne et trans-stadiale	Oui	

## E. Lutte contre les tiques

### a. Les différentes méthodes de lutte

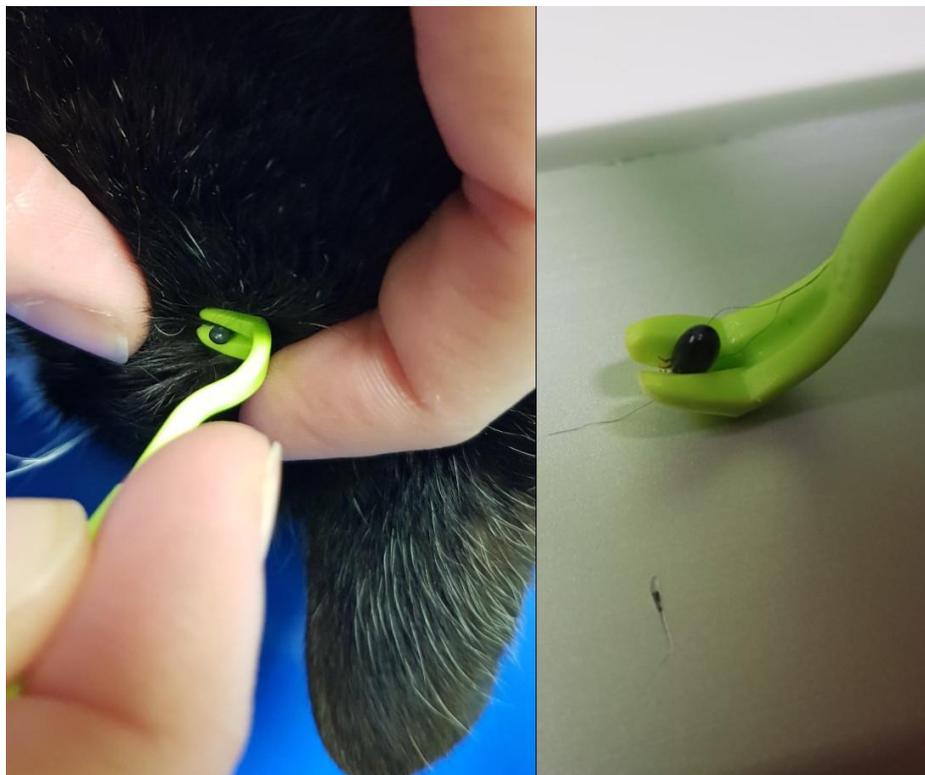
Différentes méthodes de lutttes offensives et défensives sont envisageables contre les tiques, et ainsi permet d'éviter la transmission d'agents pathogènes.

- *Mesures offensives*
  - Elimination des tiques présentes sur l'animal

#### **Etiquage manuel**

La plus simple consiste à retirer manuellement les tiques présentes sur les animaux grâce à un système de pinces ou de crochets (aussi appelés « tire-tique », cf. Figure 7). Cette méthode est très efficace chez les carnivores domestiques proches de l'homme et facilement manipulables. Cela demande toutefois une inspection minutieuse de l'animal après chaque sortie dans un endroit propice aux tiques (forêts, sous-bois, prairie, etc.) afin de retirer les tiques présentes dans les poils et de détecter celles qui se cachent dans les plis (aisselle, aine, etc.) (Guillot, 2020). Pour des raisons de proximité et de manipulabilité (il faut que l'animal reste calme pendant le retrait de la tique), il semble compliqué de ne compter que sur cette méthode pour éliminer les tiques présentes chez les grands animaux.

**Figure 7 : Photo du retrait manuel d'une tique grâce à un « tire-tique » (photo personnelle)**



## Lutte chimique

Il est également possible d'avoir recours à une lutte « chimique » en utilisant des molécules de synthèse. Pour les animaux de compagnie, des produits à visée acaricide peuvent être administrés (en comprimés ou en pipette sur la peau). Les molécules acaricides (comme le fluralaner dans le comprimé Bravecto ND) sont absorbées et se trouvent alors dans le sang. Au cours de son repas sanguin, la tique ingère la molécule acaricide et meurt avant d'avoir pu transmettre les agents pathogènes qu'elle abrite dans ses glandes salivaires (Med'Vet, 2023). Pour les grands animaux (et les animaux de rente), la voie d'administration est majoritairement externe par pulvérisations ou bains de perméthrine, mais ces méthodes restent coûteuses et gourmandes en eau et en produits chimiques (Péter et Brossard, 1998).

- Élimination des tiques présentes dans l'environnement

### Lutte chimique (si tiques domestiques)

Une autre méthode de lutte contre les tiques consiste à les éradiquer, non plus sur les animaux, mais dans l'environnement. Cette lutte peut se faire au moyen de pulvérisation de produits acaricides (Guillot, 2020) si la tique est endophile. Ces méthodes posent toutefois question de l'établissement de résistances aux acaricides dans les populations de tiques ainsi traitées, ainsi que sur les espèces d'acariens mitoyennes des tiques (Péter et Brossard, 1998).

### Lutte écologique (aménagement des pâtures)

Il est également possible de lutter contre les tiques en aménageant les pâtures. Par exemple, en retirant les haies qui abritent les petits mammifères qui leurs servent d'hôte aux premières stases de vie (Guillot, 2020). Cela pose toutefois une question éthique quant au maintien de la biodiversité en milieu rural.

Il est également possible d'utiliser des plantes « anti-tiques » dans les pâtures comme la mélinis à petites fleurs (*Melinis minutiflora*) (cf. Figure 8). Cette plante est originaire d'Afrique (Bissinger et Roe, 2010).

**Figure 8 : Photo de *Melinis minutiflora* (Forest & Kim Starr, 2023)**



Mwangi a montré que les tiques *Rhipicephalus appendiculatus* ne montaient pas sur les tiges vertes de *Melinis minutiflora* car elles dégagent une substance chimique volatile qui est un puissant répulsif pour les tiques. Cette hypothèse d'une substance chimique volatile répulsive a été confirmée par un test d'olfaction sur les tiques dans le même article (Mwangi *et al.*, 1995).

Thompson a écrit que les bovins qui se nourrissaient de *Melinis minutiflora* étaient moins infestés par les tiques que ceux qui pâturaient dans des pâtures dépourvues de cette plante. Les substances chimiques odorantes de la plante semblent donc persister sur l'animal et sont retrouvées dans le lait qui a l'odeur de la plante (Thompson *et al.*, 1978).

### **Lutte biologique**

Il est possible d'utiliser des champignons acaropathogènes (c'est-à-dire qui tuent les acariens) dans la lutte contre les tiques. C'est par exemple le cas en Afrique, avec l'utilisation du champignon *Metarhizium anisopliae* qui est pulvérisé sur les bovins pour lutter contre la tique monophasique *Rhipicephalus microplus* (Ángel-Sahagún *et al.*, 2010).

### **Lutte agro-pastorale**

Afin de lutter contre les tiques et la transmission d'agents pathogènes délétères pour les animaux mis en pâture, certains éleveurs ont recouru à des méthodes de lutte agro-pastorales basées sur la rotation de pâture. Lorsqu'ils savent qu'une pâture est infestée de tiques, ils vont éviter de l'utiliser pendant quelques temps (transformation en champ de culture), ou n'y placer que des animaux déjà immunisés contre les agents pathogènes transmissibles par les tiques présents (pas de jeunes animaux sur ces pâtures par exemple) (Guillot, 2020).

- *Mesures défensives*

- Chimioprévention

Dans la lutte contre les tiques, certaines molécules de synthèse peuvent être utilisées à visée répulsive, comme le DEET, utilisé dans de nombreux produits à pulvériser sur les vêtements chez l'Homme ou directement sur la peau (par exemple le produit « Insect-Ecran »).

- Vaccination

Pour certaines espèces de tiques, comme *Rhipicephalus microplus* il a été développé un vaccin contre des antigènes cachés, libérés par cette tique lors de son repas sanguin. Le corps de l'hôte vacciné, en reconnaissant ces antigènes cachés, produit des anticorps qui seront absorbés par la tique au cours de son repas sanguin. Ces anticorps sont responsables de la mort de la tique et protègent ainsi l'hôte vacciné des effets pathogènes de la tique (Guillot, 2020).

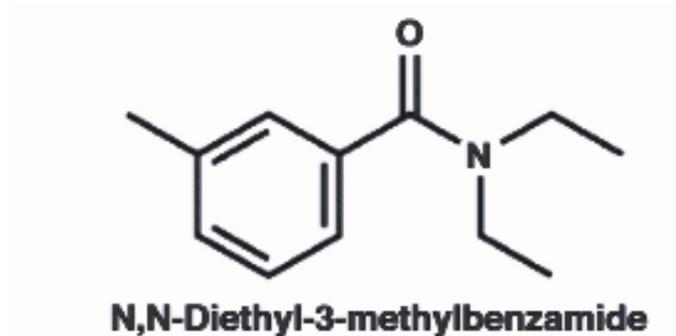
- Evitement des zones infestées

Le plus raisonnable reste parfois d'éviter purement et simplement les zones fortement infestées de tiques pour éviter leur morsure (Guillot, 2020).

### **b. Le DEET**

Dans la lutte chimique, un produit phare s'est imposé depuis 1957 : le DEET. Il s'agit d'un des répulsifs les plus anciens, mis sur le marché en 1957 aux États-Unis. Sa formule est présentée sur la Figure 9. Il est incolore et huileux (Pages *et al.*, 2014).

**Figure 9 : Formule du DEET (Leal, 2014)**



Le mode d'action du DEET a longtemps été méconnu. Aujourd'hui, les protocoles de test de répulsivité confirment que le DEET inhibe l'attraction d'une peau traitée pour les parasites. Le DEET agit alors comme répulsif en masquant l'odeur attractive de l'hôte (DeGennaro, 2015). Ainsi, le DEET a une action à distance, toutefois, il agit également à proximité. En effet, le DEET agit également sur le « goût » de la peau humaine. Des tests, réalisés sur des moustiques mutés (donc insensibilisés à l'effet répulsif à distance du DEET), montrent que, si les moustiques se posent sur une peau traitée, ils ne piqueront pas (Leal, 2014).

Le DEET est une molécule à l'utilisation sécurisée pour l'Homme, mais qui présente toutefois quelques inconvénients. En effet, il faut l'appliquer à des concentrations assez élevées (plus de 10 %), pour qu'il soit efficace. Il est également nécessaire de renouveler l'application régulièrement (toutes les 5 ou 6h, certains produits vont jusqu'à 8h), surtout en zone d'endémie. De plus, le produit à base de DEET doit être appliqué directement sur la peau découverte et/ou sur les vêtements. Il n'est pas possible de n'utiliser qu'un collier ou un bracelet imprégné de DEET pour une protection efficace (DeGennaro, 2015).

Enfin, l'utilisation massive du DEET comme répulsif a laissé le champ libre à la sélection d'individus résistants au DEET (donc non affectés par l'odeur de celui-ci). C'est le cas par exemple pour les moustiques (DeGennaro, 2015). Il est donc à craindre que certaines tiques résistantes au DEET soient également sélectionnées à l'avenir.

### ***c. Attentes des propriétaires d'animaux domestiques vis-à-vis de la lutte contre les tiques***

Les propriétaires d'animaux domestiques (chiens, chats, bétail) choisissent de traiter leurs animaux afin de prévenir les signes cliniques dus à la présence de tiques comme le prurit, les boutons, les surinfections mais aussi afin de protéger leurs animaux de maladies transmissibles par les tiques (Cere, 2021).

Les utilisateurs d'antiparasitaires recherchent une facilité d'utilisation, un produit efficace, et un produit sans danger pour l'animal (Cere, 2021). Ce dernier point semble notamment vrai chez les propriétaires d'animaux de compagnie qui se montrent de plus en plus méfiants envers les

molécules de synthèses qui composent les antiparasitaires, et sont désireux de réduire leur utilisation.

L'intérêt accru des propriétaires (pour eux ou pour leurs animaux domestiques) pour les répulsifs « naturels » est d'autant plus augmenté que le public est de plus en plus méfiant quant à la toxicité des répulsifs de synthèse comme le DEET (Bissinger et Roe, 2010).

## **F. Choix des tiques utilisées pour la partie expérimentale**

Les espèces de tiques majoritairement présentes en France sont les tiques dures des espèces *Ixodes ricinus*, *Dermacentor reticulatus* et *Rhipicephalus sanguineus*.

De plus, *I. ricinus* est une tique télotrope, triphasique et exophile, c'est-à-dire qu'elle est peu spécifique dans ses hôtes, qui changent à chaque stase de son cycle, et qu'elle vit en milieu extérieur. Elle se rencontre donc facilement dans les forêts et les prairies. Elle est largement répandue en France et en Europe (Chabanne et Guillot, 2016).

De par les particularités de son cycle, *I. ricinus* est un excellent vecteur de pathogènes divers (Perez-Eid et Gilot, 1998).

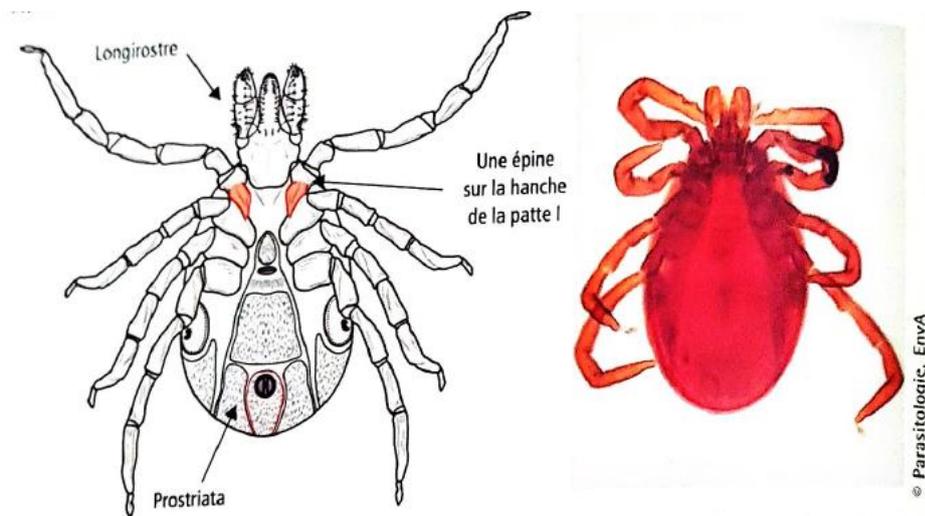
Les nymphes sont petites, donc difficiles à détecter sur l'hôte, nombreuses dans l'environnement, et ont déjà réalisé un repas sanguin sur un hôte. Elles ont donc déjà pu entrer en contact avec un agent pathogène qu'elles pourront transmettre pendant leur repas sanguin à venir (Kröber *et al.*, 2013). Il est donc important de se prémunir de leur morsure afin d'éviter la transmission d'agent pathogène.

Les raisons précédemment énoncées font de la nymphe d'*I. ricinus* un sujet d'expérience de choix.

## **G. Monographie d'*Ixodes ricinus***

*Ixodes ricinus* est une tique prostriata et longirostre. Cela signifie que lorsqu'on observe la face ventrale d'*I. ricinus*, le sillon anal est localisé en avant de l'anus. Si on observe à la loupe le rostre d'une tique de cette espèce, il sera plus long que large (cf. Figure 10) (Chabanne et Guillot, 2016).

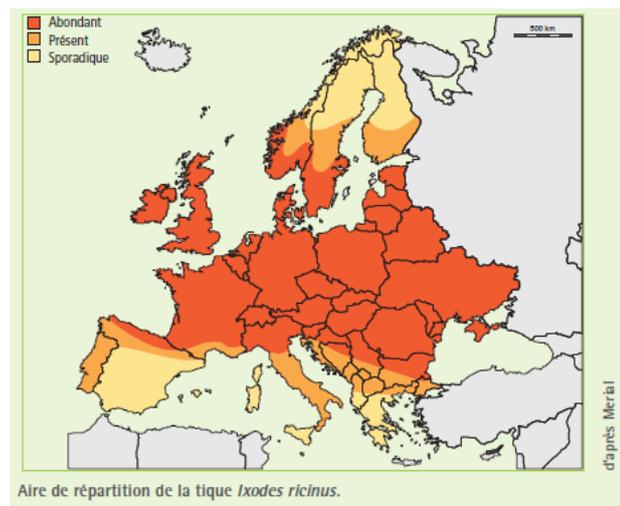
**Figure 10 : Représentation schématique et photographie d'*I. ricinus* et de ses caractéristiques physiques (Chabanne et Guillot, 2016)**



*I. ricinus* est une espèce exophile, qui vit en climat tempéré à froid : c'est-à-dire qui vit en extérieur, sous nos latitudes. Elle est très présente en Europe (cf. Figure 11). Elle affectionne particulièrement les sous-bois, les haies. Les larves se trouvent dans la litière (les feuilles mortes, les mousses). Les nymphes grimpent jusqu'à 10 cm de haut dans la végétation. Les adultes montent entre 50 cm et 1 m de hauteur pour guetter le passage de leur proie (Guillot, 2020).

La copulation des adultes se produit sur l'hôte. Les mâles sont attirés par les phéromones sexuelles de la femelle et ne se nourrissent pas. Une fois fécondée et gorgée, la femelle se laisse tomber au sol et pond entre 500 et 2 000 œufs avant de mourir. La période de ponte se déroule entre mai et juillet (François, 2008).

**Figure 11 : Aire de répartition de la tique *Ixodes ricinus* (Chabanne et Guillot, 2016)**



*I. ricinus* est une tique télotrope triphasique. Elle est donc peu spécifique de son hôte (il existe plus de 300 hôtes potentiels pour cette tique), et ce, quelle que soit la stase étudiée

(Chabanne et Guillot, 2016). Toutefois, les larves se gorgent principalement sur des petits rongeurs (mulots, campagnols). La nymphe se fixe indifféremment sur des oiseaux, ou des mammifères plus gros. Les adultes se fixent plutôt sur des ongulés (cervidés, bovidés), mais aussi sur les carnivores domestiques ou sur l'homme (François, 2008).

*I. ricinus* est le vecteur majoritaire de *Borrelia burgdorferi* (agent de la borréliose de Lyme), mais également de *Coxiella burneti*, *Ehrlichia phagocytophilum*, *Francisella tularensis* (agent de la tularémie), ou encore de *Babesia divergens* (agent de la piroplasmose chez le bovin) (Guiguen et Degeilh, 2001).



## 2. Les huiles essentielles

### A. Définition

Une huile essentielle est « une substance odorante, volatile, produite par certaines plantes et pouvant être extraite sous forme de liquide obtenu par distillation de plantes aromatiques à la vapeur d'eau » (DGCCRF, 2018).

Les huiles essentielles sont considérées comme des préparations à base de plantes (Legifrance, 2023).

Selon leur utilisation et la plante à l'origine de leur production, elles peuvent être soumises à la réglementation des produits cosmétiques, des biocides, ou encore des médicaments à base de plante. La vente des huiles essentielles est réservée aux pharmaciens lorsque celles-ci sont issues de plantes aux propriétés neurotoxiques (comme l'absinthe), irritante (comme la sabine), ou encore cancérigène (comme le saffran). Les huiles essentielles délivrées uniquement en pharmacie doivent être conformes au référentiel qualité décrit dans la pharmacopée européenne, ou dans la pharmacopée française (ANSM, 2017).

### B. Procédé de fabrication

#### a. Matière première

Les huiles essentielles sont obtenues à partir de plantes aromatiques (Socasau, 2017). Les plantes peuvent être utilisées fraîches, flétries, sèches, etc. Elles doivent être exemptes de souillures (terre, poussière, déjections animales, etc.) (Gleizes, 2019).

Les huiles essentielles peuvent se trouver dans tous les organes du végétal (fleurs, feuilles, tiges ou écorces, fruits, rhizomes, etc.). La précision de la partie utilisée pour l'obtention de l'huile essentielle est importante : elle permet de répéter le rendement obtenu lors de la première extraction, ainsi que de répéter (au moins en partie) la composition chimique de l'huile (Kaloustian et Hadji-Minaglou, 2012).

#### b. Procédés d'extraction

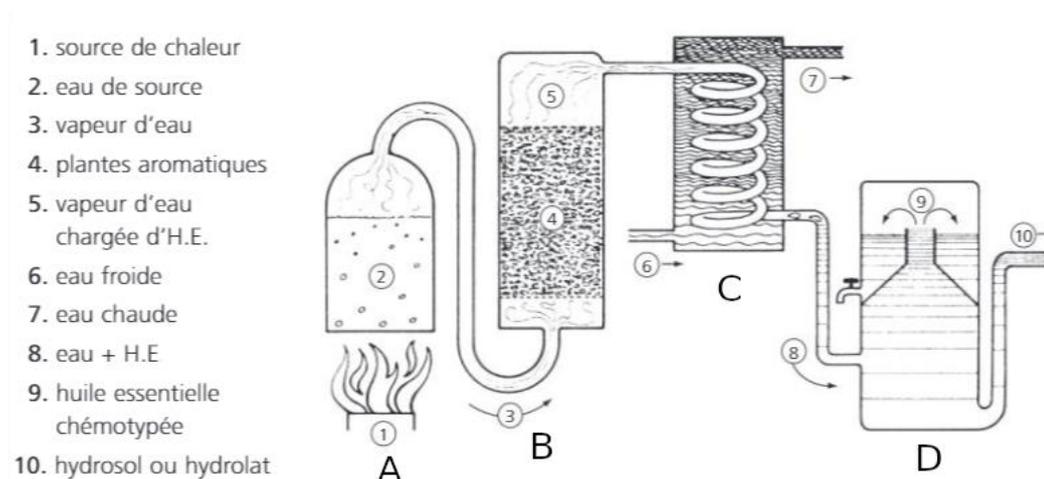
Les huiles essentielles sont des substances difficiles à normaliser d'un point de vue chimique. En effet, le procédé d'extraction utilisé pour son obtention modifie la composition moléculaire de l'huile essentielle obtenue. Il est donc important de spécifier le procédé utilisé, le type de plante, la partie de la plante utilisée ainsi que son lieu de récolte pour pouvoir retrouver une huile essentielle de qualité semblable. Les différents modes d'extractions utilisés sont majoritairement : l'entraînement à la vapeur à basse pression, mais également la distillation sèche, l'extraction par solvant organique et l'expression à froid. Cette dernière méthode est majoritairement utilisée pour l'obtention d'huiles essentielles dérivant d'agrumes (Gleizes, 2019).

- *Entrainement à la vapeur à basse pression*

Il s'agit de la méthode d'extraction la plus largement utilisée. L'eau, de préférence de source peu ou pas calcaire, est mise à bouillir dans un alambic en acier inoxydable (ou en cuivre) afin d'éviter la formation d'oxydes (cf. Figure 12, lettre A). La distillation s'effectue à basse pression (0,05 à 0,10 bar) pour éviter les suroxydations (Socasau, 2017).

La vapeur d'eau circule ensuite dans une cuve contenant la matière première végétale (cf. Figure 12, lettre B). Une fois chargée d'huile essentielle, la vapeur d'eau est condensée dans un réfrigérant alimenté en eau froide circulante (cf. Figure 12, lettre C). Le mélange eau-huile essentielle est récupéré dans un essencier (ou vase florentin) (cf. Figure 12, lettre D). La séparation entre la phase aqueuse et la phase huileuse s'effectue par trop-plein. On obtient ainsi d'un côté l'huile essentielle (H.E.), et de l'autre l'hydrolat (Baudoux *et al.*, 2011) ; (Gleizes, 2019).

**Figure 12 : Schéma du procédé d'extraction des huiles essentielles par entrainement à la vapeur sous basse pression (Baudoux et al., 2011)**

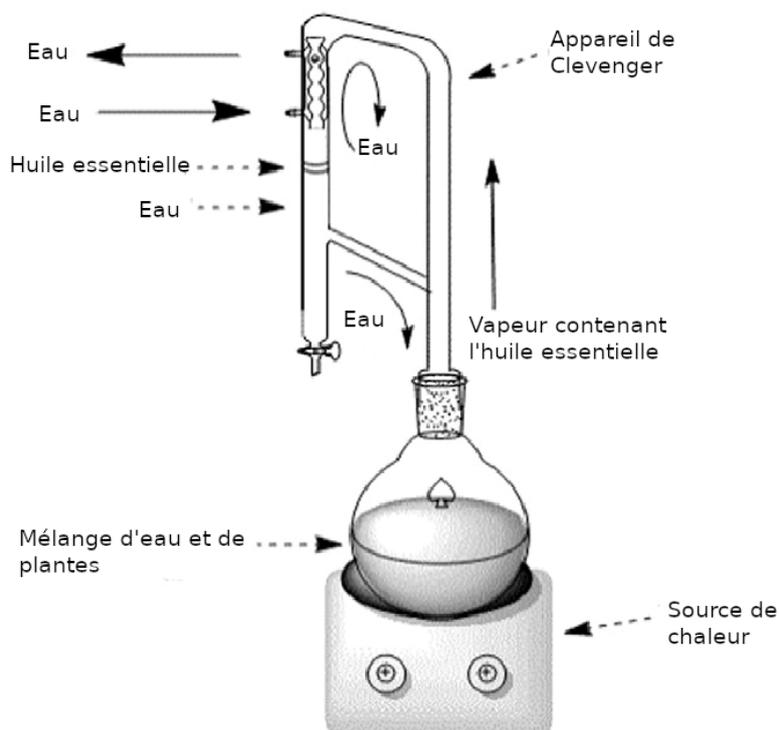


La durée de distillation doit être importante afin de récupérer l'entièreté des molécules composant l'huile essentielle. En effet, les composants les plus volatils seront récupérés en début de procédé (dans les 30 premières minutes souvent), alors que les moins volatils seront obtenus après au moins 1h à 1h30 supplémentaire d'entrainement par la vapeur (Socasau, 2017).

- *Hydrodistillation*

Ce procédé est similaire à l'entrainement à la vapeur, à ceci près que la matière première végétale est immergée dans un bain d'eau. C'est l'ensemble qui est porté à ébullition. La vapeur d'eau, chargée en composés aromatiques, est récupérée après condensation dans un réfrigérant alimenté en eau froide. Un exemple de montage est présenté à la Figure 13 (Meghnam et Sadi, 2016).

**Figure 13 : Exemple d'un montage d'hydrodistillation (Samadi *et al.*, 2016)**



- *Expression à froid*

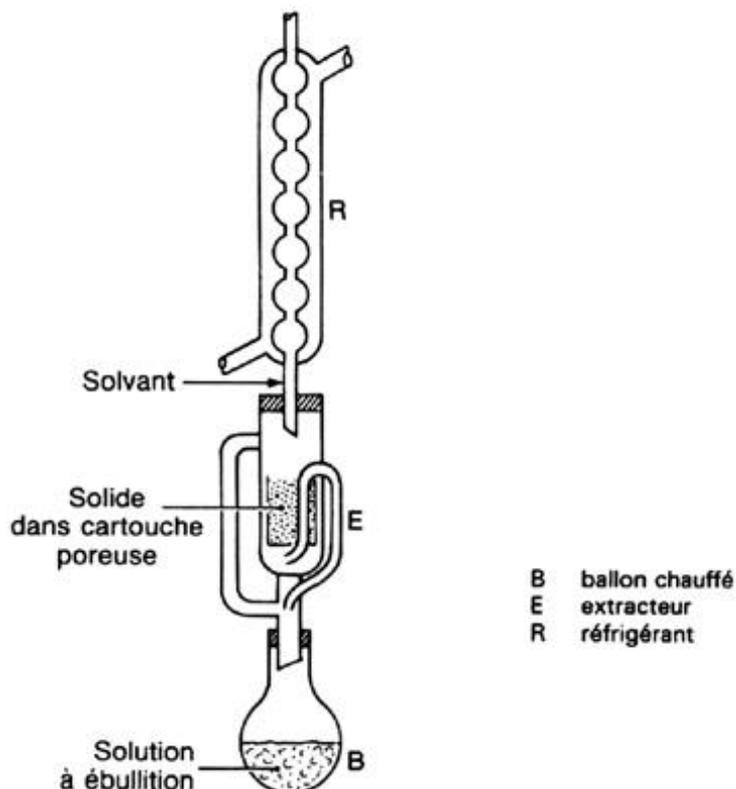
Ce procédé est utilisé uniquement pour les huiles essentielles obtenues à partir de zestes d'agrumes. Les zestes frais sont écrasés, grattés et lavés à l'eau froide. Cette opération permet de briser les parois des sacs oléifères. Une décantation permet ensuite de séparer l'huile essentielle de la phase aqueuse (Meghnam et Sadi, 2016).

- *Extraction par solvant organique*

Bien que non considérée comme méthode de choix dans l'extraction d'huiles essentielles destinées à la médication (Baudoux *et al.*, 2011), elle est décrite dans plusieurs ouvrages ((Kaloustian et Hadji-Minaglou, 2012), (Meghnam et Sadi, 2016)).

Il existe deux grands types d'extraction par solvant : l'extraction au soxhlet (cf. Figure 14), et l'extraction à reflux. Dans les deux cas, la matière première est placée dans le ballon, au contact du solvant extracteur. Le ballon est mis à chauffer à une température choisie, durant un laps de temps déterminé. Un réfrigérant piège les vapeurs de solvant et d'huile essentielle. L'ensemble est récupérable dans le ballon, après évaporation du solvant (Meghnam et Sadi, 2016).

Figure 14 : Montage de l'extraction au Soxhlet (Poirot, 2007)



## C. Caractérisation

### a. Paramètres de variabilité

Les huiles essentielles sont des produits d'une grande variabilité en termes de composition chimique, il est particulièrement difficile d'obtenir une huile essentielle répétable quant à son chémotype (c'est-à-dire sa composition chimique). En effet, de nombreux paramètres entrent en compte dans la composition d'une huile essentielle.

Une plante connue sous un unique nom vernaculaire peut en réalité comporter plusieurs variétés. Par exemple, le nom « lavande » peut à la fois désigner la lavande aspic (*Lavandula latifolia*), lavande papillon (*Lavandula stoechas*) ou la lavande officinale (*Lavandula angustifolia* ou *officinalis*) qui est aussi appelée lavande vraie (ou lavande à feuilles étroites). L'huile essentielle obtenue avec l'une des variétés de cette plante n'aura pas la même composition qu'une huile essentielle obtenue avec une autre variété.

Le lieu de croissance de la plante joue également un rôle sur la composition de l'huile essentielle extraite de celle-ci. Les conditions environnementales comme l'hygrométrie, la luminosité, la température, etc. sont autant de paramètres pouvant faire varier la composition de l'huile essentielle obtenue. Il est même possible d'aller plus loin en considérant le stade de développement de la plante au moment de sa récolte.

La partie de la plante utilisée pour extraire l'huile essentielle peut également changer le chémotype de l'huile essentielle obtenue. En effet, la tige ne possèdera pas les mêmes composés que le fruit ou la feuille (Socasau, 2017).

### **b. Tests de caractérisation et de contrôle qualité**

Une huile essentielle contient un grand nombre de molécules. Ce sont ces dernières qui lui confèrent ses propriétés (médicinales, organoleptiques, etc.). Dans une même espèce, et même d'un lot de matière première à l'autre, il peut y avoir des modifications dans les rapports des molécules composant l'huile essentielle extraite. La caractérisation de ces modifications pour chaque lot d'huile essentielle permet d'établir une carte d'identité des molécules actives : c'est la notion de chémotype (Nicolas--Sourdot, 2022)

Afin d'établir le chémotype des huiles essentielles produites, la méthode la plus utilisée est la chromatographie en phase gazeuse couplée ou non à la spectroscopie de masse. Ces procédés permettent de séparer les différents composés de l'huile essentielle testée, de les identifier et de les quantifier (Gleizes, 2019)

La grande variabilité de composition entre les huiles essentielles issues d'une même plante encourage à sélectionner avec précision le chémotype de l'huile que l'on souhaite utiliser. Ainsi, l'identification de la plante utilisée doit être soigneusement réalisée. Il est donc conseillé d'utiliser des huiles essentielles pour lesquelles les données suivantes sont présentes, sous forme de certificat d'analyse par exemple (Baudoux *et al.*, 2011).

- Certification botanique : c'est-à-dire le nom latin complet de la plante utilisée, ainsi que sa sous-espèce ou sa variété. Cela permet d'éviter toute confusion entre les noms vernaculaires parfois proches de différentes variétés de plantes.
- La zone géographique de récolte. En effet, le climat sous lequel a poussé la plante influence sa concentration en chaque composé chimique, et ainsi la qualité finale de l'huile essentielle recueillie.
- Le mode de culture : cela permet de savoir si la plante récoltée a poussé à l'état sauvage, ou si elle est issue de l'agriculture (biologique ou non). Cela donne une idée des pesticides qui peuvent se retrouver dans l'huile essentielle extraite à partir de cette matière première.
- La partie de la plante utilisée et le stade de développement : la composition de l'huile essentielle peut largement varier en fonction de la partie de la plante utilisée et de son stade de développement. Les plantes récoltées tardivement peuvent par exemple être plus concentrées en composés d'intérêt que des plantes jeunes.
- Le mode d'extraction : les différents modes d'extraction précédemment étudiés peuvent modifier la composition des huiles essentielles récupérées.
- Le chémotype : c'est l'analyse des composés chimiques de l'huile essentielle obtenue. Elle permet à l'utilisateur de savoir si l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* (Thym) qu'il a entre les mains est, par exemple, riche en thymol ou en cavacrol, etc.

Voici un exemple de capture d'écran du site Aroma-zone, illustrant les points précédemment abordés quant à la provenance, le procédé d'extraction et le chémotype (Figure 15) (Aroma-Zone, 2023).

Figure 15 : Capture d'écran de la fiche produit du Thym à thymol (Aroma-Zone, 2023)

## CARTE D'IDENTITÉ

<b>Procédé d'obtention</b>	Distillation complète par entraînement à la vapeur d'eau
<b>Partie de la plante extraite</b>	Sommités fleuries
<b>Nom botanique</b>	Thymus vulgaris sb thymol
<b>Famille botanique</b>	Lamiacées
<b>Qualité</b>	<p><b>Huile Essentielle Botaniquement et Biochimiquement Définie (HEBBD)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 100% pure (exempte d'autres huiles essentielles proches)</li> <li>• 100% intégrale (non décolorée, non déterpénée, non rectifiée...)</li> <li>• 100% naturelle (non dénaturée avec des molécules de synthèse)</li> </ul> <p>Qualité alimentaire</p>
<b>Pays d'origine</b>	France (Provence)
<b>Culture</b>	<p>biologique certifiée par Ecocert Biologique, certifié par Ecocert FR-BIO-01</p> 
<b>Autre nom</b>	Thym vulgaire, Thym commun, Thym cultivé, Farigoule
<b>Présentation</b>	Flacons verre ambré avec codigoutte



## QUALITÉ

<b>Date de production</b>	Juin 2022 (lot 23HE0015)
<b>A utiliser de préférence avant fin</b>	<p>Juin 2026 (lot 23HE0015) <i>Sur l'étiquette, le numéro de lot est suivi d'une lettre indiquant la série de conditionnement.</i></p>
<b>Propriétés organoleptiques</b>	<p>- <b>Aspect</b> : liquide mobile limpide</p> <p>- <b>Couleur</b> : jaune à jaune ambré</p> <p>- <b>Odeur</b> : puissante, typique de l'herbe aromatique</p>
<b>Densité</b>	0.907-0.935
<b>Point éclair</b>	48°C
<b>Composition</b>	<p><b>Principaux constituants biochimiques - Chromatographie phase gaz du lot 23HE0015 :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Phénols terpéniques</b> : thymol (44.79%), carvacrol (3.33%)</li> <li>• <b>Monoterpénols</b> : linalol (3.88%)</li> <li>• <b>Monoterpènes</b> : para-cymène (26.75%), gamma-terpinène (5.02%), myrcène (2.07%)</li> </ul>

### c. Toxicité des huiles essentielles chez l'utilisateur

Les huiles essentielles ne sont pas inoffensives, bien que l'idée soit répandue chez certains utilisateurs de médecines « alternatives » à base de plantes. Les principes actifs de la plante y sont fortement concentrés. Ce sont donc des produits hautement actifs. La toxicité des huiles essentielles est multiple.

La première toxicité à laquelle il est facile de penser, c'est une toxicité dermatologique. Celle-ci peut se manifester par une photosensibilisation, une action dermocaustique, ou une réaction allergique. Pour ce dernier point, il est important de toujours tester l'effet de l'huile essentielle sur une petite zone du corps afin de vérifier toute absence de réaction allergique.

La photosensibilisation se manifeste sous la forme d'un érythème après exposition à la lumière (et plus particulièrement aux rayons ultra-violets). Elle survient majoritairement après une application cutanée. La photosensibilisation est souvent due à la présence de coumarine présente dans les huiles essentielles extraites à partir d'agrumes (Socasau, 2017).

L'action dermocaustique est principalement liée au carvacrol. Une huile essentielle riche en ce composé (par exemple l'huile essentielle d'origan ou de thym) peut provoquer des irritations et parfois des brûlures sur la peau et les muqueuses (Socasau, 2017)

Les huiles essentielles peuvent également avoir des effets plus délétères lors de traitement à long terme : hépatotoxicité (il est donc important d'utiliser des hépatoprotecteurs, ou de les bannir en cas d'hépatite diagnostiquée chez le patient), neurotoxicité (surtout chez les jeunes enfants, les femmes enceintes et les personnes épileptiques), néphrotoxicité (Socasau, 2017). Il est donc important de respecter des pauses thérapeutiques afin de laisser le corps éliminer l'accumulation d'huiles essentielles. Il faut également choisir les patients auxquels administrer chaque huile essentielle, en fonction de sa toxicité propre.

## **D. Réglementation autour des huiles essentielles**

D'après la Direction générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des fraudes (DGCCRF), une huile essentielle doit être présentée avec une fonction établie (alimentaire, cosmétique, etc.) par son vendeur (DGCCRF, 2018).

Il est important de rappeler ici qu'à partir du moment où un effet curatif ou préventif est revendiqué par le vendeur d'une huile essentielle, celle-ci entre dans le domaine du médicament. Elle est alors soumise à une autorisation de mise sur le marché (AMM) qui doit être obtenue auprès de l'ANSM d'après le Code de la Santé Publique.

### **a. Réglementation autour de la vente des huiles essentielles**

Certaines huiles essentielles ne peuvent être délivrées qu'en pharmacie. Elles sont considérées comme ayant une balance bénéfique/risque négative en raison de leur toxicité importante (neurologique, cutanée, cancérigène, etc.). Ces huiles ont été décrites dans le Décret n° 2007-1198 du 3 août 2007 de l'Article D4211-13 du Code de la Santé Publique :

- Grande absinthe (*Artemisia absinthium* L.)
- Petite absinthe (*Artemisia pontica* L.)
- Armoise commune (*Artemisia vulgaris* L.)
- Armoise blanche (*Artemisia herba alba* Asso L.)
- Armoise arborescente (*Artemisia arborescens* L.)
- Thuya du Canada ou cèdre blanc (*Thuja occidentalis* L.)
- Cèdre de Corée (*Thuja Koraenensis* Nakai), dits "cèdre feuille"
- Thuya (*Thuja plicata* Donn ex D. Don.)
- Hysope (*Hyssopus officinalis* L.)
- Sauge officinale (*Salvia officinalis* L.)
- Tanaisie (*Tanacetum vulgare* L.)

- *Sassafras (Sassafras albidum [Nutt.] Nees)*
- *Sabine (Juniperus sabina L.)*
- *Rue (Ruta graveolens L.)*
- *Chénopode vermifuge (Chenopodium ambrosioides et Chenopodium anthelminticum L.)*
- *Moutarde jonciforme (Brassica juncea [L.] Czernj. et Cosson).*

(ANSM, 2017)

Les huiles essentielles qui ne relèvent pas du monopole pharmaceutique sont en vente libre. Elles ne doivent pas revendiquer d'action thérapeutique (sinon elles doivent être enregistrées auprès de l'ANSM) (DGCCRF, 2018).

Pour un usage autre que pharmaceutique (alimentaire, cosmétique, etc., par exemple), les huiles essentielles commercialisées doivent suivre un certain nombre de critères, comme le respect du principe d'innocuité, suivre des règles d'étiquetage, etc. (DGCCRF, 2018).

L'information des acheteurs et utilisateurs quant aux risques d'allergie, de photosensibilisation et de dermaucosticité doit être claire (DGCCRF, 2018).

Voici la capture d'écran de la page du produit « Huile essentielle de thym à thymol » du site Aroma-Zone, qui met en garde l'utilisateur contre les risques lors de l'utilisation de l'huile essentielle (Aroma-Zone, 2023).

**Figure 16 : Capture d'écran de la page "Huile essentielle de thym à thymol" mettant en avant les précautions d'usage de l'huile essentielle (Aroma-Zone, 2023)**

<b>Conditions de conservation</b>	Les huiles essentielles sont sensibles aux rayonnements UV ainsi qu'à l'évaporation progressive de leurs constituants. Il est donc impératif de conserver vos huiles essentielles dans un flacon en verre coloré ou en aluminium à fermeture étanche à une température comprise entre 5°C et 40°C.
<b>Précautions</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Ne pas utiliser chez les femmes enceintes ou allaitantes ni chez les enfants.</b></li> <li>- <b>Dermocaustique : ne jamais utiliser pure sur la peau.</b> Utiliser toujours bien diluée en usage cutané (max 5% et en usage localisé).</li> <li>- <b>Très puissante, s'utilise à faible dose et de manière limitée dans le temps.</b></li> <li>- <b>Usage interne sous contrôle thérapeutique.</b></li> <li>- Contre-indiquée en cas d'insuffisance hépatique.</li> <li>- Tenir hors de portée des enfants.</li> <li>- Éviter le contact avec les yeux.</li> <li>- Certains composés naturels contenus dans cette huile essentielle peuvent présenter un risque d'allergie chez certaines personnes sensibles lorsque l'huile essentielle est incorporée dans une composition cosmétique (selon le 7ème Amendement de la Directive Européenne relative aux produits cosmétiques (2003/15/CE)) : linalol et, dans une moindre mesure, limonène.</li> <li>- En règle générale, faites toujours un test d'application de votre préparation, dans le pli du coude, au moins 48h avant de l'utiliser.</li> <li>- Pour toute utilisation en diffusion, cette huile essentielle puissante doit être fortement diluée (5%max) dans d'autres huiles essentielles plus douces</li> <li>- <b>Téléchargez les précautions générales à lire avant toute utilisation d'huiles essentielles.</b></li> </ul>

### ***b. Utilisation des huiles essentielles chez les animaux de production***

Un médicament, pour être utilisé chez les animaux de production de denrées alimentaires, doit avoir fait l'objet d'une étude visant à fixer une limite maximale de résidus (LMR) pour les denrées consommables par l'homme (viande, lait, œuf) afin de garantir la sécurité du consommateur. Ces LMR permettent la fixation de temps d'attente à respecter avant la collecte de la denrée et sa consommation (Parlement Européen, 2019). Les substances autorisées sont répertoriées dans le tableau 1 du Règlement (UE) 37/2010, régulièrement mis à jour (Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation, 2018).

Toutefois, il existe peu de plantes et d'huiles essentielles inscrites au tableau 1 du règlement (UE) 37/2010 (cf. Annexe 1). La demande d'inscription d'une substance au tableau 1 demande l'obtention d'une LMR. Or, lors de la demande de LMR, une étude substance par substance est réalisée. Une huile essentielle étant variable chimiquement d'un lot à l'autre, et composée de nombreuses substances, il est difficile d'évaluer chacune de ces substances dans le procédé de LMR (ANSES, 2022). Une saisine a été ouverte par l'ANSES afin d'étudier les plantes et substances issues de plantes, d'intérêt dans l'élevage des animaux de production. Ci-après, voici la liste des plantes d'intérêt ayant une LMR sans restriction d'utilisation, étudiées dans la saisine (cf. Tableau 1).

**Tableau 1 : Liste des plantes ayant une LMR sans restriction d'utilisation, d'intérêt pour l'élevage des animaux de production (ANSES, 2022). NB : « H.E. » signifie « Huile essentielle »**

Nom commun de la plante	Nom latin	Partie concernée	Forme utilisée
<b>Absinthe (grande)</b>	<i>Artemisia absinthium</i>	Parties aériennes	Poudre/ extraits
<b>Absinthe (grande)</b>	<i>Artemisia absinthium</i>	Feuille ou sommité fleurie	En vert ou après fauche
<b>Achillée millefeuille</b>	<i>Achillea millefolium</i>		En vert ou après fauche
<b>Camomille romaine</b>	<i>Chamaemelum nobile</i>	Capitule	H.E.
<b>Cannelle</b>	<i>Cinnamomum zeylinacum</i>	Ecorce de jeunes rameaux	H.E.
<b>Cannelle</b>	<i>Cinnamomum zeylinacum</i>	Feuille	H.E.
<b>Cannellier</b>	<i>Cinnamomum cassia</i>	Feuille et jeune rameau	H.E.
<b>Carvi</b>	<i>Carum carvi</i>		
<b>Citron</b>	<i>Citrus limon</i>		
<b>Citronnelle de Java</b>	<i>Cymbopogon winterianus</i>	Partie aérienne	H.E.
<b>Curcuma</b>	<i>Curcuma longa</i>	Rhizome	Extrait
<b><i>Eucalyptus aetheroleum</i></b>	<i>Eucalypti aetheroleum</i>	Feuille ou tige	H.E.
<b>Eucalyptus citronné</b>	<i>Corymbia citriodora</i>	Partie aérienne	H.E.
<b>Eucalyptus globulus</b>	<i>Eucalyptus globulus</i>	Partie aérienne	H.E.
<b>Eucalyptus poly-cryptone</b>	<i>Eucalyptus polybractea à cryptone</i>		H.E.
<b>Fenouil</b>	<i>Foeniculum vulgare</i>	Fruits	Poudre/ extrait
<b>Genévrier</b>	<i>Juniperus communis</i>	Rameau	
<b>Laurier commun</b>	<i>Laurus nobilis</i>	Feuille	H.E.
<b>Lemongrass de l'Amérique centrale</b>	<i>Cymbopogon citratus</i>		H.E.
<b>Lin</b>	<i>Linum usitatissimum</i>	Huile ou graine	
<b>Marjolaine à coquille</b>	<i>Origanum majorana</i>	Feuille et sommité fleurie	H.E.
<b>Marjolaine à thujanol</b>	<i>Origanum majorana</i>	Sommité fleurie	H.E.
<b>Mélisse</b>	<i>Melissa officinalis</i>	Partie aérienne	Extrait
<b>Menthe</b>			H.E.
<b>Menthe poivrée</b>	<i>Mentha x piperita</i>	Partie aérienne	H.E.
<b>Ortie</b>	<i>Urtica dioica</i>	Feuille	Décoction
<b>Palmarosa</b>	<i>Cymbopogon martinii</i>	Partie aérienne	H.E.

Nom commun de la plante	Nom latin	Partie concernée	Forme utilisée
<b>Piment de Cayenne</b>	<i>Capsicum annuum</i> L. var. <i>minimum</i> (Miller) Heiser et des variétés à petits fruits de <i>Capsicum frutescens</i> L., (utilisation sous forme d'oléorésine de piment de Cayenne)	Fruit mûr desséché	Oléorésine
<b>Piment de Cayenne</b>	<i>Capsicum annuum</i> L. var. <i>minimum</i> (Miller) Heiser et des variétés à petits fruits de <i>Capsicum frutescens</i> L.	Fruit	Extrait
<b>Romarin</b>	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Partie aérienne	H.E.
<b>Romarin à verbénone</b>	<i>Rosmarinus officinalis</i> (sb, verbenone)	Partie aérienne	H.E.
<b>Sarriette des montagnes</b>	<i>Satureja montana</i>	Sommité fleurie séchée	H.E.
<b>Sauge sclérée</b>	<i>Salvia sclarea</i>	Tige fleurie, fraîche ou séchée	H.E.
<b>Sureau</b>	<i>Sambucus nigra</i>	Fleur séchée	
<b>Temoe-lawacq</b>	<i>Curcuma xanthorrhiza</i> (Temoe Lawack)	Rhizome	H.E.
<b>Thym commun (à thymol)</b>	<i>Thymus vulgaris</i> (L. <i>thymoliferum</i> )	Partie aérienne	H.E.
<b>Thym d'Espagne</b>	<i>Thymus zygis</i>	Sommité fleurie	H.E.
<b>Thym doux à linalol</b>	<i>Thymus vulgaris linaloferum</i>		H.E.
<b>Thym du Maroc</b>	<i>Thymus serpylloides</i>	Partie aérienne	H.E.
<b>Thym saturéioïde</b>	<i>Thymus satureioïdes</i>	Partie aérienne	H.E.

L'ANSES a également établi une liste des plantes d'intérêt dans l'élevage des animaux de production, avec une LMR, mais soumises à restriction d'utilisation (pour la fabrication de produits homéopathiques seulement par exemple, ou en usage externe uniquement) (ANSES, 2022) (cf. Tableau 2).

**Tableau 2 : Liste des plantes d'intérêt dans l'élevage des animaux de production, ayant une LMR soumise à restriction d'usage (ANSES, 2022)**

Nom commun de la plante	Nom latin	Partie concernée	Forme utilisée
Ail	<i>Allium sativum</i>	Bulbe	H.E.
Ail	<i>Allium sativum</i>	Bulbe	Extrait
Ail	<i>Allium sativum</i>	Bulbe	Jus frais
Armoise	<i>Artemisia vulgaris</i>	Feuille, sommité fleurie	
Arnica	<i>Arnica montana</i>	Capitule	Teinture
Chardon-Marie	<i>Silybum marianum</i>	Feuille, fruit	

Consoude	<i>Symphytum officinale</i>	Feuille	Extrait
Cyprès	<i>Cupressus sempervirens</i>	Rameau	H.E.
Echinacée	<i>Echinacea purpurea</i>	Partie aérienne, plante entière	Jus frais / extrait
Épinette noire	<i>Picea mariana</i>	Aiguille	H.E.
Estragon	<i>Artemisia dracunculoides</i>	Partie aérienne	H.E.
Ginkgo	<i>Ginkgo biloba</i>	Feuille	Extrait
Giroflier	<i>Eugenia caryophyllus</i>	Bouton floral séché = clou de girofle	H.E.
Harpagophyton ou Harpagophytum	<i>Harpagophytum procumbens et H. zeyherii</i>	Rhizome	Extrait
Lavande	<i>Lavandula angustifolia</i>	Fleur, sommité fleurie	H.E.
Lavandin super	<i>Lavandula hybrida clone super</i>		H.E.
Niaouli	<i>Melaleuca viridiflora</i>		H.E.
Niaouli type cinéole	Si espèce: <i>Melaleuca quinquenervia</i>	Jeune rameau feuillé	H.E.
Oignon	<i>Allium cepa</i>	Bulbe	Extrait
Ravintsara	<i>Cinnamomum camphora et cineole</i>	Feuille	H.E.
Solidage Verge d'or	<i>Solidago virgaurea</i>	Partie aérienne	En vert ou après fauche

L'ANSES a aussi établi une liste des plantes d'intérêt dans l'élevage des animaux de production, sans LMR définie au moment de l'étude (ANSES, 2022) (cf. Tableau 3).

**Tableau 3 : Liste des plantes d'intérêt dans l'élevage des animaux de production, sans LMR (ANSES, 2022)**

Nom commun de la plante	Nom latin	Partie concernée	Forme utilisée
Andrographis	<i>Andrographis paniculata</i>	Partie aérienne	Extrait
Artichaut	<i>Cynara sp</i>	Feuille	Extrait
Bardane (grande)	<i>Arctium lappa</i>	Racine	Décoction
Basilic	<i>Ocimum sp</i>	Partie aérienne	H.E.
Cardamome	<i>Elettaria cardamomum</i>	Fruit	H.E.
Carotte	<i>Daucus carota</i>	Semence ou plante grainée	H.E.
Ciste cotonneux	<i>Cistus albidus</i>		H.E.
Ciste ladanifère	<i>Cistus ladaniferus</i> CT pinène	Rameau feuillé	H.E.
Fenugrec	<i>Trigonella foenum-graecum</i>	Graîne mûre	
Fougère mâle	<i>Dryopteris filix-mas</i>		
Frêne	<i>Fraxinus</i>	Feuille	
Gaulthérie couchée	<i>Gaultheria procumbens</i>	Feuille	H.E.
Géranium bourbon	<i>Pelargonium asperum</i>		H.E.
Gingembre	<i>Zingiber officinalis</i>		H.E.
Grenadier	<i>Punica granatum</i>	Fruit	
Hélichryse italienne	<i>Helichrysum italicum</i>		H.E.
Litsée	<i>Litsea cubeba</i>	Partie aérienne	H.E.
Litsée citronnée	<i>Litsea citrata</i>		H.E.
Livèche	<i>Levisticum officinale</i>	Racine	H.E.
Macleaya	<i>Macleaya cordata</i>		Extrait
Manuka	<i>Leptospermum scoparium</i>	Partie aérienne	H.E.
Mélaleuca, Tea tree	<i>Melaleuca alternifolia</i>	Feuille	H.E.
Noyer	<i>Juglans regia</i>	Feuille	
Origan	<i>Origanum vulgare</i> ou <i>Origanum compactum</i>	Partie aérienne	H.E.
Pin		Rameau	
Pin sylvestre	<i>Pinus sylvestris</i>	Feuille et rameau frais	H.E.
Pissenlit	<i>Taraxacum officinale</i>	Partie aérienne et racine	
Poivre	<i>Piper nigrum</i>	Fruit	Extrait
Prêle des champs	<i>Equisetum arvense</i>	Partie aérienne	Extrait
<i>Pueraria lobata</i>	<i>Pueraria lobata</i> , <i>Pueraria montana</i> var. <i>lobata</i>	Liane	
Ravensare anisé	<i>Ravensara anisata</i>	Ecorce	H.E.
Reine-des-prés	<i>Spirea ulmaria</i>	Fleur, sommité fleurie	Extrait
Sainfoin	<i>Onobrychis viciifoliae</i>	Partie aérienne	Poudre/ extrait
Sanguinaire du Canada	<i>Sanguinaria canadensis</i>	Rhizome	Extrait
Saule	<i>Salix</i>	Ecorce	Extrait
Serpolet	<i>Thymus serpyllum</i>	Partie aérienne fleurie séchée, entière ou fragmentée	
Tanaisie	<i>Tanacetum vulgare</i>		En vert ou après fauche
Thé vert	<i>Camellia sinensis</i>	Feuille	
Yucca	<i>Yucca schidigera</i>	Partie aérienne	Extrait

En l'absence d'AMM, les produits à base d'huiles essentielles sont autorisés d'utilisation en production animale dans le cadre de la cascade thérapeutique, avec prescription d'un temps d'attente forfaitaire de 7 jours pour le lait et 28 jours pour la viande (ANSES, 2022).

Les huiles essentielles sont autorisées chez les animaux de production si elles entrent dans l'alimentation animale (sans allégation d'effet préventif ou curatif sur une pathologie), ou si elles sont utilisées comme médicament vétérinaire, dans une spécialité possédant une AMM. Le vétérinaire peut également prescrire une préparation extemporanée, à condition d'en justifier l'emploi par l'absence de spécialité pharmaceutique adaptée (Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation, 2018).

Le faible nombre de spécialités vétérinaire à base d'huiles essentielles avec AMM et une LMR définie rend l'utilisation des huiles essentielles difficiles en élevages. Le Cothivet de Vétoquinol est par exemple l'un des rares produits avec AMM sur le marché vétérinaire (IRCP ANMV ANSES, 2010). Il contient :

- Teinture mère de Centella asiatica : 89,50 %
- Huile essentielle naturelle de Lavandula officinalis : 5,80 %
- Huile essentielle naturelle de Rosmarinus officinalis : 1,50 %
- Teinture mère d'Aesculus hippocastanum : 1,20 %
- Huile essentielle naturelle de Thymus officinalis : 0,90 %
- Huile essentielle naturelle de Cupressus officinalis : 0,80 %
- Teinture mère de Medicago sativa : 0,16 %
- Teinture mère de Carlina acaulis : 0,14 %

(IRCP ANMV ANSES, 2010).

Les autres produits (par exemple Oxylis du laboratoire Vétalis) sont commercialisés en échappant aux AMM et aux LMR en étant vendus comme « produits d'hygiène » ou « compléments alimentaires ».

La question N°10716 posée à l'Assemblée nationale en 2018 au sujet de l'utilisation des huiles essentielles dans les élevages agricoles soulève la question des mesures que souhaite prendre le gouvernement pour permettre le développement de produits à base d'huiles essentielles. La réponse du ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation indique qu'un allègement du dossier d'AMM est possible dans le cas de produits de phytothérapie vétérinaire. De plus, dans ce cadre, la redevance versée à l'ANSES pour la demande d'AMM a été minorée en 2015 afin de ne pas constituer un obstacle à la recherche et la mise sur le marché de nouvelles spécialités vétérinaires à base d'huiles essentielles (Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation, 2018).

## **E. Études expérimentales de l'effet des huiles essentielles sur les tiques**

La volonté de trouver des alternatives « naturelles » aux molécules de synthèse dans la lutte contre les tiques oriente naturellement la recherche de solution vers les huiles essentielles. Dans ce cadre de nombreuses études scientifiques ont été menées sur l'effet des huiles essentielles sur

les tiques (cf. Tableau 4). Nous aborderons ici les études concernant l'action toxique des huiles essentielles sur les tiques dans un premier temps, puis l'action répulsive des huiles essentielles sur les tiques dans un second temps.

#### **a. Études de toxicité sur les tiques**

Les études sur la toxicité des huiles essentielles cherchent à prouver l'effet toxique des huiles essentielles sur les tiques. Cet effet toxique est étudié en mesurant le taux de mortalité d'individus, d'une stase donnée, exposés à une dose fixée d'huile essentielle. Il existe plusieurs méthodes de tests. Les tests les plus fréquents sont le test de paquet larvaire et les tests d'immersion (Gleizes, 2019).

Le test de paquet larvaire est réalisé comme suit. L'huile essentielle testée est dissoute dans un solvant. Un volume connu est déposé sur une surface définie de papier filtre. Le papier filtre est assemblé en paquet. Les larves de tiques sont disposées dans le paquet de papier filtre imprégné. Le paquet contenant les larves est incubé à 27-28 °C, à une humidité relative de 85 %. Après 24h, le taux de mortalité est déterminé par comptage des larves encore vivantes (Gleizes, 2019).

Les tests d'immersion peuvent être réalisés sur les larves ou les adultes, mais n'ont pas le même but. Si le test est réalisé sur des larves, le but est d'évaluer la toxicité directement sur l'individu. Les larves sont introduites dans un tube en verre rempli d'une solution d'huile essentielle à une concentration connue. Elles y sont immergées pendant 10 minutes. Ensuite, elles sont placées dans des paquets de papiers filtres neutres (du même genre que lors du test de paquet larvaire mais sans huile essentielle) et sont incubées dans des conditions de température et d'hygrométrie identiques au test précédent. Après 24h, le taux de mortalité est déterminé par comptage des larves encore vivantes (Gleizes, 2019).

Lorsque le test d'immersion est réalisé sur des femelles adultes, le but est de vérifier la quantité et la qualité de la ponte des femelles après immersion dans l'huile essentielle testée et ainsi de contrôler l'effet toxique de l'huile essentielle sur la reproduction des tiques. Dix femelles gorgées de poids homogène sont placées dans un tube en verre contenant l'huile essentielle à la dilution à tester. Elles sont immergées pendant 5 minutes, puis placées dans des boîtes de Pétri où la ponte est surveillée, collectée et quantifiée par pesée (Gleizes, 2019). L'éclosion est ensuite surveillée de près et l'effet de l'huile essentielle sur la fonction de reproduction de la tique femelle est quantifié en fonction du pourcentage d'éclosion (Drummond *et al.*, 1973).

La thèse de Gleizes (Gleizes, 2019) effectue un formidable travail de revue des articles de littérature sur l'effet toxique des huiles essentielles sur les différentes espèces de tiques. Les familles de plantes les plus fréquemment exploitées sont les Lamiacées, les Astéracées, les Verbénacées, les Poacées et les Myrtacées (Gleizes, 2019).

#### **b. Études de répulsivité sur les tiques**

Les tests de répulsivité *in vitro* sont utilisés pour vérifier si un produit choisi (ici une huile essentielle) appliqué sur un papier filtre, à une dilution donnée, repousse ou non les tiques. L'état repoussé ou non de la tique est défini en fonction de la position de la tique au bout d'un laps de

temps défini. Il existe également des tests de répulsivité *in vivo* où la peau humaine ou animale est le support de l'expérimentation (Kröber *et al.*, 2013). Les expériences sont conduites sur une stase de tique (souvent les nymphes) et une espèce de tique donnée. L'huile essentielle testée, la dose, la méthode de test de la répulsivité varient d'un article à l'autre.

Le tableau 4 regroupe les données des articles d'intérêt dans l'étude de l'effet répulsif des huiles essentielles sur les tiques. Les données suivantes y sont répertoriées : le nom de l'article, les auteurs, l'huile essentielle utilisée, le solvant utilisé, les dilutions testées (telles qu'inscrites dans l'article, sans interprétation), les expériences témoins, les tiques utilisées (espèce et stase), le protocole choisi par l'expérimentateur, la durée entre les relevés, le nombre de réplicats et les résultats.

**Tableau 4 : Tableau récapitulatif des articles sur l'étude de l'effet répulsif des huiles essentielles sur les tiques**

Nom de l'article	ANSES - Note d'appui sur l'efficacité des biocides répulsifs contre les tiques et leur utilisation	Chemical composition and repellency of Essential Oils from four medicinal plants against <i>I. ricinus</i> Nymphs	A standardised in vivo and in vitro test method for evaluating tick repellents	The repellency and toxicity effects of essential oils from the libyan plants <i>Salvadora persica</i> and <i>Rosmarinus officinalis</i> against nymphs of <i>Ixodes ricinus</i>	Tick repellent substances in the essential oil of <i>Tanacetum vulgare</i>
Auteurs	ANSES	El-Seedi, Khalil .al	Kröber, Bourquin, Guerin	Elmahli, Garboui	Palsson, Jeanson, Baeckström, Borg-karlson
Huile essentielle utilisée (et composition si donnée)	Géranol, Acide laurique, Acide décanoïque, Citriodiol (+ mélanges)	<b><i>Rosmarinus officinalis</i></b> (1,8-cineole, borneol, camphor), <b><i>Mentha spicata</i></b> (carvone, pulegone, 1,8 - cineole), <b><i>Origanum majorana</i></b> (4-terpineol $\alpha$ -terpineol), <b><i>Ocimum basilicum</i></b> (Linalol, 4-Allylanisole, methyl trans-cinnamate, 1,8-cineole)	Acide laurique, Geraniol, Citriodiol, HE de Citronelle, HE de Lavande	<i>Rosmarinus officinalis</i> , <i>Salvadora persica</i> : pour les deux huiles : 1,8 - cineol, $\alpha$ -pinene, $\beta$ -pinene	<i>Tanacetum vulgare</i> (tanaïse commune) : $\alpha$ -pinene, $\beta$ -pinene, pinocamphone, 1,3,3-trimethylcyclohex-1-ene-4-carboxaldehyde, 1,8-cineole
Solvant	Ethanol	Hexane	Éthanol	Acetone	Hexane
Dilutions testées	/	0,1% w/v soit 15 $\mu$ g / cm <sup>2</sup>	0,005 ; 0,01 ; 0,5 ; 0,1 ; 0,5 ; 0,8 mg/cm <sup>2</sup> dans de l'éthanol (p.a < 99,8% Merck). Chaque dose dans 360 $\mu$ l d'éthanol	<i>Rosmarinus officinalis</i> (64 $\mu$ l et 32 $\mu$ l dans 1 ml d'acétone -> 0,5 et 1 $\mu$ l/cm <sup>2</sup> de papier), <i>Salvadora persica</i> (64 $\mu$ l d'huile dans 1 ml d'acétone -> 1 $\mu$ l/cm <sup>2</sup> de papier)	1/200 vol.vol -> application de 100 $\mu$ L
Témoins	DEET et Icaridine	Hexane	DEET et Éthanol	Acétone	Hexane
Tique (espèce et stade)	<i>Ixodes ricinus</i> (adultes femelles et nymphes)	<i>Ixodes ricinus</i> - nymphes	<i>Ixodes ricinus</i> - nymphes	<i>Ixodes ricinus</i> - nymphes	<i>Ixodes ricinus</i> - nymphes
Protocole utilisé	Méthode de Kröber	Méthode de Palsson	Méthode de Kröber	Méthode "open filter paper" = Méthode de WHO	Méthode de Palsson
Durée entre les relevés	/	10 nymphes pendant 5 minutes sur le contrôle, puis pendant 5 minutes sur la substance testée	2 nymphes toutes les 5 minutes	10 nymphes dont la position est relevée toutes les 30 minutes pendant 6h.	5 min - 5 nymphes sur le témoin puis sur une substance à tester
Nombre de réplicas	/	4 réplicas	12 nymphes -> 45 minutes	3 réplicas	10
Test statistique utilisé	GML Bayésien et test post hoc de Turkey	% répulsivité = [(nbr nymphes "attirées" - nbr nymphes "repoussées") / nbr nymphes "attirées"] x 100	log logistic regression model / general linearised model (GLM, family = quasibinomial)	% Répulsivité = [(nbr nymphes sur la sous-tasse - nbr nymphes qui n'y sont pas) / total de nymphes utilisées] x 100 /// analyse statistique : ANOVA	wilcoxon matched pair test
Résultats	ED75 ( mg / cm <sup>2</sup> - in vitro - nymphes) : Citriodiol (0,020), Acide laurique (0,010), Géranol (0,158), Huile de citronnelle (0,194), huile de lavande (0,271) /// Proportion de tiques adultes repoussées à la ED75 des nymphes : Géranol (94,4%), Acide laurique (91,7%), Acide décanoïque (83,3%), Citriodiol (77,8%)	<i>Rosmarinus officinalis</i> (100%), <i>Mentha spicata</i> (93,2%), <i>Origanum majorana</i> (84,3%), <i>Ocimum basilicum</i> (64,5%)	ED 75 (mg/cm) : Acide laurique (0,010), Geraniol (0,158), Citriodiol (0,020), HE de Citronelle (0,194), HE de Lavande (0,271)	<i>Rosmarinus officinalis</i> (0,5 $\mu$ l/cm <sup>2</sup> de papier -> 20% de mortalité et 1 $\mu$ l/cm <sup>2</sup> de papier -> 100% de mortalité des tiques après 5h d'exposition), <i>Salvadora persica</i> (1 $\mu$ l/cm <sup>2</sup> de papier -> 100% de répulsivité après 1h30)	Les fractions de distillation U3 (100%), CCU5 (94,4%), S3 (91,7%) et S6 (92,0%) sont très répulsives-> Composants majoritaires : U3 (1-terpineol ; 4,4-dimethyl-2-buten-4-olide), CCU5 (1-terpineol, $\alpha$ -thujone), S3 (4-Terpinenol, Cyclocitral), S6 (6-camphenol, 1-terpineol, 1-hexanol)

Nom de l'article	Repellency of Oils of Lemon eucalyptus, Geranium and Lavender and the Mosquito Repellent MyggA Natural to <i>Ixodes ricinus</i>	Toxic and repellent activity of selected monoterpenoids (thymol, carvacrol, linalool), against the castor bean tick, <i>Ixodes ricinus</i>	Arthropod repellency, especially tick ( <i>Ixodes ricinus</i> ), exerted by extract from <i>Artemisia abrotanum</i> and essential oil from flowers of <i>Dianthus caryophyllum</i>	Preventing tick attachment to dogs using essential oils	Repelling properties of some plant materials on the tick <i>Ixodes ricinus</i>
Auteurs	Jeanson, Garboui, Palsson	Tabari, Youssefi, Maggi, Benelli	Tunon, Thorsell, Mikiver, Malander	Goode, Ellse, Wall	Thorsell, Mikivier, Tunon
Huile essentielle utilisée (et composition si donnée)	<i>Corymbia citriodora</i> , <i>Lavandula angustifolia</i> , <i>Pelargonium graveolens</i> .	Thymol, Carvacrol, ( <i>Origanum vulgare</i> , <i>Thymus vulgaris</i> , <i>Satureja montana</i> L., <i>Trachyspermum ammi</i> ) et Linalool ( <i>Lavandula angustifolia</i> , <i>Coriandrum sativum</i> , <i>Achillea ligustica</i> , <i>Cinnamosma madagascariensis</i> )	<i>Artemisia abrotanum</i> (composé majoritaire : thujyl alcohol), <i>Dianthus caryophyllum</i> (composé majoritaire : phényléthanol)	<i>Myrica gale</i> , <i>Melaleuca cajeputi</i> , <i>Pelargonium graveolens</i> , <i>Zingiber officinale</i> , <i>Citrus paradisi</i> , <i>Lavandula angustifolia</i> , <i>Melaleuca viridiflora</i> , <i>Citrus sinensis</i> , <i>Mentha arvensis</i> , <i>Mentha spicata</i> , <i>Thymus vulgaris</i> , <i>Curcuma longa</i>	<i>Achillea millefolium</i> , huile de pin et/ou de bouleaux, Citronelle, Clou de girofle, Eucalyptus, Géranium ( <i>Pelargonium graveolens</i> ), Lavande (laquelle ?), Muguet ( <i>Convallaria majalis</i> ), Menthe poivrée ( <i>Mentha arvensis</i> )
Solvant	1,2 propanediol	DMSO (1% dans l'eau)	Ethanol	Ethanol	Ethanol
Dilutions testées	Dilution : 30% et 1% - Application d'une goutte (50 µL)	Concentrations : 0,25% ; 0,5% ; 1% ; 2% ; 5%	10% d'HE	Concentration 5% (v/v)	10% (v/v)
Témoins	1,2 propanediol	Perméthrine	DEET et DEM (mandelic acid diethylamide)	DEET, PMD (contrôles positifs), Éthanol (contrôle négatif)	DEET
Tique (espèce et stade)	<i>Ixodes ricinus</i> - nymphes	<i>Ixodes Ricinus</i> - adultes femelles	<i>Ixodes Ricinus</i> - nymphes	<i>Ixodes ricinus</i> - Nymphes	<i>Ixodes ricinus</i> - nymphes
Protocole utilisé	Méthode de Palsson	Méthode de Wanzala et al. (2004) (ressemble au test de Carroll)	Boite de pétri (ouvertes et exposées à l'air ambiant) dans laquelle sont posés 3 papiers filtres. 0,5 ml de solution testée sur chaque papier filtre. Tiques posées par 6 sur le centre de chaque papier.	Méthode utilisant une bande de papier filtre suspendu, traité avec du répulsif et un "attracteur" localisé en partie haute (50 µL)	Boite de pétri (ouvertes et exposées à l'air ambiant) dans laquelle sont posés 3 papiers filtres. 0,5 ml de solution testée sur chaque papier filtre. Tiques posées par 6 sur le centre de chaque papier.
Durée entre les relevés	5 min - nymphe à l'unité	60 minutes	5 minutes	5 minutes	5 minutes
Nombre de réplicas	50-100	10 pour chaque concentration	6 nymphes par papier	10 tiques par huile	6 nymphes par papier
Test statistique utilisé	McNemar change test and binomial test	ANOVA + Tukey's HSD test	/	Fisher's exact Test -> différence entre les huiles, puis ANOVA et Tukey's post-hoc test.	/
Résultats	<i>Corymbia citriodora</i> (100% -> à 30% d'HE), <i>Lavandula angustifolia</i> (1% d'HE -> 55% de répulsion, 30% d'HE -> 100% de répulsion), <i>Pelargonium graveolens</i> (1% d'HE -> 61% de répulsion, 30% d'HE -> 100% de répulsion).	Carvacrol et Thymol : toutes concentrations : + de 90% de répulsion. Linalool : 5% : répulsivité de 50,24%.	<i>Artemisia abrotanum</i> (69,1% à 4h et 56,8% à 8h), <i>Dianthus caryophyllum</i> (100% à 4h et 91,7% à 8h)	100% de répulsivité pour : <i>Mentha spicata</i> , <i>Curcuma longa</i> , <i>Thymus vulgaris</i> , <i>Pelargonium graveolens</i> , <i>Zingiber officinale</i> . 90% pour <i>Lavandula angustifolia</i> , <i>Mentha arvensis</i> . 70% pour <i>Myrica gale</i> . 50% pour <i>Melaleuca viridiflora</i> et <i>Melaleuca cajeputi</i> .	<i>Achillea millefolium</i> (0%), huile de pin et/ou de bouleaux (67% à 4h, 17% à 6h), Citronelle (89% à 4h, 90% à 6h, 83% à 8h), Clou de girofle (68% à 4h, 82% à 6h, 78% à 8h), Eucalyptus (0% à 4h), Géranium ( <i>Pelargonium graveolens</i> ) (0% à 4h), Lavande (laquelle ?) (0% à 4h), Muguet ( <i>Convallaria majalis</i> ) (67% à 4h, 67% à 6h, 67% à 8h), Menthe poivrée ( <i>Mentha arvensis</i> ) (76% à 4h, 71% à 6h, 71% à 8h)

Nom de l'article	Repellency of the <i>Origanum onites</i> L. essential oil and constituents to the lone star tick and yellow fever mosquito	Repellent effects of the essential oil of <i>Lavandula angustifolia</i> against adults of <i>Hyalomma marginatum rufipes</i>	Essential oils as tick repellents on clothing	Essential oils of aromatic Egyptian plants repel nymphs of the tick <i>Ixodes ricinus</i>	In vitro anti tick properties of the essential oil of <i>Tagetes minuta</i> L. on <i>Hyalomma rufipes</i>
Auteurs	Carroll, Demirci, Kramer ...	Magano, Mkolo	Soutar, Cohen, Wall	El-Seedi, Azeem, Khalil, Sakr, Khalifa ...	Nchu, Magano, Eloff
Huile essentielle utilisée (et composition si donnée)	<i>Origanum onites</i> L. (Carvacrol 75,7%, Linalool 9,0%, p-cymene 4,33%), Thymol 1,9%).	<i>Lavandula angustifolia</i>	Origan, Romarin, <i>Mentha spicata</i> , Thym	<i>Conyza dioscoridis</i> L. ( $\alpha$ -cadinol (10,7%), hexadecanoic acide (10,7%)), <i>Artemisia herba-alba</i> (piperitone (26,5%), Ethyl cinnamate (9,5%), Camphre (7,7%), hexadecanoic acid (6,9%)), <i>Calendula officinalis</i> L. ( $\alpha$ -cadinol (21,2%), carvone (18,2%))	<i>Tagetes minuta</i> (cis-ocimene (28,5%), beta-ocimene(16,83%), 3-methyl-2-(2-méthyl-2-butenyl)-furane (11,94%))
Solvant	Éthanol	Dichloromethane	Éthanol	/	N-hexane
Dilutions testées	0,413 mg HE/cm2 et 0,103 mg HE/cm2 (pas plus d'informations dans ma version de l'article)	5%, 10%, 20% (v/v)	5%	1 mg/ml -> concentration obtenue 15µg/cm2.	0,027 ml/ml ; 0,053 ml/ml, 0,107 ml/ml
Témoins	DEET (contrôle positif) et Éthanol (contrôle négatif)	DEET	DEET (20%), Ethanol	Hexane (100µl)	Hexane (100µl)
Tique (espèce et stade)	<i>Amblyomma americanum</i> (L.)	<i>Hyalomma marginatum rufipes</i> - Adultes	<i>Ixodes ricinus</i>	<i>Ixodes ricinus</i> - nymphes	<i>Hyalomma rufipes</i> (adultes et nymphes)
Protocole utilisé	/	Méthode de Carroll	Méthode de test dans les champs	Méthode de Palsson	Modification de la méthode de Carroll
Durée entre les relevés	/	Toutes les 10 minutes pendant 60 minutes, puis toutes les 30 minutes jusqu'à T0+120 minutes.	/	5 minutes avec le témoin, puis 5 minutes avec le produit testé	1h
Nombre de réplicas	/	5 réplicas de 10 tiques non sexées	/	10 nymphes par huile, par concentration, et par réplicas . 5 réplicas en tout (donc 50 nymphes par huile essentielle)	10 tiques et 5 réplicas de mâles, de femelles, pour chaque dilution
Test statistique utilisé	/	Mann-Whitney U-test	negative binomial regression et test du Chi2	Wilcoxon match pair test et Mann-Whitney U test.	ANOVA
Résultats	0,413 mg HE/cm2 -> 100% de tiques repoussées, 0,103 mg HE/cm2 -> 66,7% de tiques repoussées.	Entre 70 et 100% de répulsivité pour chaque dilution pendant les 50 premières minutes. Ensuite % de répulsivité plus faible. (Tableau et relevé toutes les 10min)	Origan et <i>Mentha spicata</i> -> efficaces comme répulsifs (environ 10% de tiques sur le tissu, comme le DEET)	<i>Conyza dioscoridis</i> L. (94% de répulsivité), <i>Artemisia herba-alba</i> (84,2 % de répulsivité), <i>Calendula officinalis</i> L. (82% de répulsivité)	Concentration de répulsion : EC 50 = 0,070 ml/ml. 0,027 ml/ml (1,04% répulsion) ; 0,053 ml/ml (14,81% répulsion), 0,107 ml/ml (93,61% répulsion)

Nom de l'article	Mosquito and tick repellency of two <i>Anthemis</i> essential oils from Saudi Arabia	Essential oils of <i>Cupressus funebris</i> , <i>Juniperus communis</i> and <i>J. chinensis</i> as repellent against ticks and mosquitoes and as toxicants against mosquitoes	Repellent effects of <i>Melaleuca alternifolia</i> (tea tree) oil against cattle tick larvae ( <i>Rhipicephalus australis</i> ) when formulated as emulsions and in beta cyclodextrin inclusion complexes	Acaricidal properties of the essential oil of <i>Melaleuca alternifolia</i> Cheel (tea tree oil) against nymphs of <i>Ixodes ricinus</i>
Auteurs	Yusufoglu, Tabanca, Bernier, Li, Salkini ...	Carroll, Tabanca, Framer, Elejalde, Wedge ...	Yim, Bhandari, Jackson, James	Iori, Grazioli, Gentile, Marano, Salvatore
Huile essentielle utilisée (et composition si donnée)	<b><i>Anthemis melampodina</i></b> ( $\alpha$ -pinene (17,1%) et $\beta$ -eudesmol (13,8%)) et <b><i>Anthemis scrobicularis</i></b> ( $\beta$ -eudesmol (12,8%))	<b><i>Cupressus funebris</i></b> ( $\alpha$ -cedrene (16,9%), cedrol (7,6%), $\beta$ -cedrene (5,7%)), <b><i>Juniperus communis</i></b> (( $\alpha$ -pinene (27%), $\alpha$ -terpinene (14%), linalool (10,9%)), <b><i>J. Chinensis</i></b> (cuparene (11,3%), $\delta$ -cadiene (7,8%))	<i>Melaleuca alternifolia</i> (tea tree) (40% terpinen-4-ol, 20,1% $\gamma$ -terpinene, 11,2% $\alpha$ -terpinene, 4,2% $\alpha$ -terpineol, 4% 1,8-cineol, 3,6% terpinolene...)	<i>Melaleuca alternifolia</i> (42% terpinen-4-ol, 20% $\gamma$ -terpinene, 10% $\alpha$ -terpinene...)
Solvant	/	Éthanol	Eau distillée et 3% d'ALK (??)	/
Dilutions testées	Dilution 2,50 % ; 1,25 % ; 0,625 % ; 0,3125 % ; 0,1562 %	0,827 mg d'huile / cm <sup>2</sup> de papier filtre, mais aussi : 0,413 ; 0,206 et 0,103	0,5% ; 1% ; 2% ; 3% ; 4% ; 5%	4, 6, 8 et 10 $\mu$ L
Témoins	DEET	Éthanol et DEET	Poils de bétail non traités	Coton sans rien
Tique (espèce et stade)	<i>Amblyomma americanum</i> L. - nymphes	<i>Amblyomma americanum</i> - nymphes et <i>Ixodes scapularis</i> - larves et nymphes	<i>Rhipicephalus australis</i> ( <i>Boophilus microplus</i> ) - larves	<i>Ixodes ricinus</i> - nymphes
Protocole utilisé	Méthode de Carroll	Méthode de Carroll	Test d'escalade	Test d'inhalation avec un coton suspendu dans une boîte.
Durée entre les relevés	1, 3, 5, 10, 15 minutes	1, 3, 5, 10, 15 minutes	2, 4, 24, 48h	30 min
Nombre de réplicas	3 réplicas par huile et concentration de 10 nymphes chacun	3 à 4 réplicas de 10 nymphes	10 larves - 3 réplicas	10 nymphes dans chacun des 5 cylindres, 5 réplicas
Test statistique utilisé	/	/	100 - [(proportion de tiques sur les poils traités / proportion de tiques sur les poils non traités) * 100]	ANOVA
Résultats	<b><i>Anthemis melampodina</i></b> (Dilution 2,50 % -> 80% répulsion, Dilution 1,25 % -> 66,67 % répulsion, Dilution 0,625 % -> 26, 67 % répulsion) et <b><i>Anthemis scrobicularis</i></b> (Dilution 2,50 % -> 96,67 % répulsion, Dilution 1,25 % -> 90 % répulsion, Dilution 0,625 % -> 80% répulsion, Dilution 0,3125 % -> 83,33% répulsion, Dilution 0,1562 % ->20% répulsion)	<i>A. Amblyomma</i> : <i>Cupressus funebris</i> ( EC 95 = 0,43 mg / cm <sup>2</sup> ), <i>Juniperus communis</i> (EC 95 = 0,92 mg/cm <sup>2</sup> ), <i>J. Chinensis</i> (EC 95 = 0,51 mg/cm <sup>2</sup> )	Dilutions : 4% et 5% -> 100% de répulsion à 24h. Dilution 5% -> 78% de répulsion à 48h. Dilutions : 2% et 3% : 80% de répulsion	8 $\mu$ L -> Létal pour 70% des tiques. A 10 $\mu$ L, létal pour plus de 80% des tiques.

### 3. Les méthodes de test de répulsivité

Afin de tester l'effet répulsif d'un produit donné (molécule de synthèse ou huile essentielle) sur les tiques, il existe de nombreux protocoles de test dans la littérature. Si tous ont majoritairement pour but de montrer que les tiques ne s'approchent pas de la zone traitée par le produit testé, leur mise en place diffère. Ci-après seront décrits les tests les plus fréquemment retrouvés dans la littérature étudiée lors de la réalisation de cette thèse.

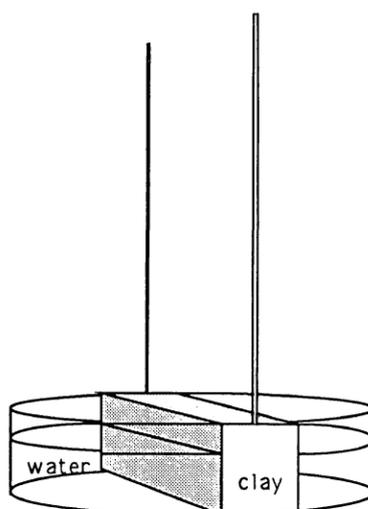
#### A. Test d'escalade

La méthode de test décrite par Carroll (Carroll, 1998) est basée sur le comportement d'escalade des tiques. En effet, lorsqu'elles sont en recherche d'hôte pour se nourrir, les tiques se postent en hauteur pour s'accrocher sur l'hôte à son passage (Gleizes, 2019).

Comme décrit dans l'article (Carroll, 1998), deux tubes capillaires (de diamètre 1 mm et d'une hauteur de 10 cm environ) sont trempés, l'un dans la substance à tester, l'autre dans de l'eau distillée, avant d'être fixés sur une plateforme rectangulaire en argile à modeler (mais cela pourrait être remplacé par du polystyrène par exemple). Il existe une variante de ce test qui place les produits à tester sur du papier filtre, lui-même fixé sur l'extrémité supérieure des tubes capillaires (cf. Figure 17).

Cette plateforme est elle-même fixée dans une boîte de Pétri remplie d'eau afin de maintenir un taux d'humidité adéquat et d'éviter l'échappée des tiques. L'ensemble est placé dans un dessiccateur afin de maintenir les tiques dans un environnement d'hygrométrie adaptée (22-24 °C et une hygrométrie relative de 94 %) (Carroll, 1998).

**Figure 17 : Schéma original du test d'escalade tel que décrit dans l'article (Carroll, 1998)**



*Traduction :*

*Water : eau*

*Clay : argile*

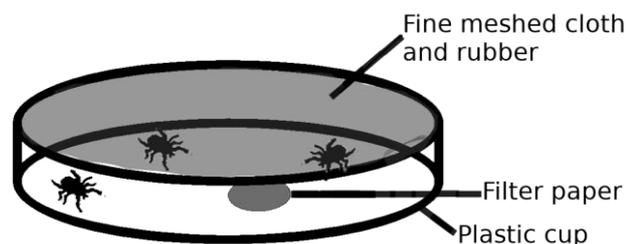
Les tiques sont alors déposées sur la plateforme en argile, à égale distance des deux tubes capillaires.

La position des tiques est relevée au bout d'un délai standardisé (1h, 4h, etc. jusqu'à 24h après la libération des tiques). Les tiques retrouvées sur la surface traitée avec le produit testé sont classées comme non repoussées.

## B. Test d'évitement sur boîte de Pétri

Cette méthode est décrite par l'OMS (World Health Organization, 1996). Le schéma du test d'évitement est expliqué dans la Figure 18. Le produit à tester est appliqué sur un disque de papier filtre (*filter paper* sur le schéma de la Figure 18) à la concentration de 1  $\mu\text{L}$  de produit par  $\text{cm}^2$  de papier. Le papier filtre est laissé à l'air libre pendant 20 minutes afin que l'excédent de solvant s'évapore, puis il est placé dans une boîte de Pétri (*plastic cup*). 10 nymphes sont placées dans la boîte, et un morceau de tissu (*fine meshed cloth*) est fixé sur le dessus de la boîte, afin d'éviter l'échappée des nymphes.

**Figure 18 : Schéma du test d'évitement sur boîte de Pétri (schéma réalisé par moi-même, inspiré de l'article (Elmhalli *et al.*, 2019))**



*Traduction :*

*Fine meshed cloth and rubber : disque de coton maintenu avec un élastique*

*Filter Paper = Papier filtre*

*Plastic cup : boîte de Pétri*

Les nymphes repoussées sont les nymphes qui restent au sommet du dispositif, sur les parois supérieures de la boîte de Pétri. La position des nymphes est vérifiée toutes les demi-heures pendant 6h (Elmhalli *et al.*, 2019).

### **C. Test d'escalade dans un tube de centrifugation**

Ce test est décrit par Pålsson (Pålsson *et al.*, 2008). Il est basé sur le comportement d'escalade des tiques à la recherche d'un hôte.

Un tube de centrifugation de 50 ml (116 mm par 29 mm), en plastique transparent sert de support à l'expérience. Pour prévenir la saturation de l'air, les parois du tube sont perforées de 28 petits trous (diamètre = 0,5 mm) distribués entre 20 et 50 mm du bord supérieur du tube.

Cent microlitres de la substance étudiée sont appliqués sur des bandes de tissu en coton. Les tissus sont laissés sécher à l'air libre 5 minutes. Cinq nymphes sont placées dans le tube de centrifugation, puis le tissu est attaché avec un élastique au niveau de l'ouverture du flacon.

L'expérience commence avec 5 nymphes dans un tube couvert d'un tissu en coton imprégné de la substance contrôle. Leur position est relevée au bout de 5 minutes après la fermeture du flacon. Immédiatement après, les 5 nymphes utilisées pour le contrôle sont réutilisées pour le test avec la substance active. 10 réplicats sont réalisés pour chaque produit testé.

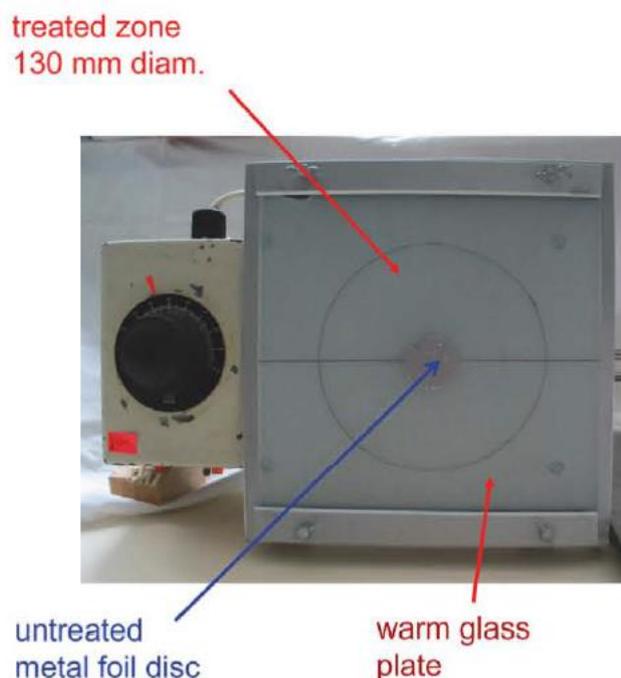
Afin de stimuler les nymphes, l'observateur pose sa main sur la face externe du tissu pendant les 5 minutes que dure l'expérience. Les tiques repoussées sont les tiques qui ne sont pas sur le tissu à la fin des 5 minutes.

### **D. Test d'étude du mouvement sur plan incliné et thermostaté**

Cette méthode d'étude du mouvement des tiques sur un plan incliné et thermostaté est décrite par Kröber afin de reproduire le plus fidèlement *in vitro*, les tests *in vivo* que l'on peut trouver dans la littérature (Kröber *et al.*, 2013).

Le dispositif utilisé pour ce test (cf. Figure 19) consiste en une plaque de verre dépoli (200 x 200 mm, épaisseur 4 mm), placée sur une surface en aluminium dont la température (34 °C) est régulée par un thermostat. Une zone circulaire de 130 mm de diamètre est délimitée sur le verre dépoli. C'est sur cette surface que le produit à tester est appliqué. Un disque de papier aluminium (30 mm de diamètre) est placé au centre de la zone traitée. L'ensemble du dispositif est incliné à 15° de la verticale.

**Figure 19 : Photo du dispositif original du test d'étude du mouvement des tiques sur plan incliné et thermostaté (Kröber *et al.*, 2013)**



*Traduction :*

*Treated zone 130 mm diam = zone traitée de 130 mm de diamètre*

*Untreated metal foil disc = disque de papier d'aluminium non traité*

*Warm glass plate = plaque de verre dépoli thermostaté à 34 °C*

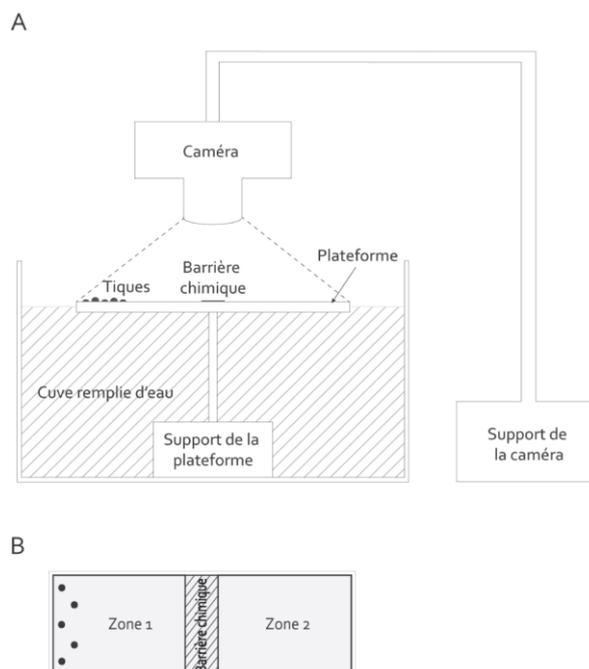
Les tiques sont placées sur le disque en aluminium central. Leur comportement est observé pendant 5 minutes. Les tiques qui se déplacent librement sur la surface traitée sont notées comme « non repoussées ».

Ce test est recommandé par l'ANSES dans sa note d'appui scientifique et technique de 2018 (ANSES, 2018).

### **E. Test d'exploration**

Cette méthode, décrite dans la thèse de Le Mauff (Le Mauff, 2021), elle-même inspirée des travaux de Nchu (Nchu *et al.*, 2012), permet l'étude du comportement d'exploration des tiques sur une plateforme horizontale, en milieu ouvert. Une barrière chimique, sous forme d'une bande de papier filtre imprégnée de la solution à tester, est placée au centre de la plateforme. Les tiques sont placées d'un côté de la barrière chimique et leur comportement est observé durant 30 minutes (Le Mauff, 2021).

**Figure 20 : Schéma du test d'exploration (Le Mauff, 2021)**



L'avantage de ce type de test en milieu ouvert est notamment de prévenir la saturation du milieu ambiant par les vapeurs des produits à testés, contrairement à ce qui survient dans les tests tels que décrits dans une boîte de Pétri (World Health Organization, 1996) ; (Le Mauff, 2021).

## **F. Synthèse sur les tests de répulsivité**

Le tableau de synthèse des articles étudiant l'effet répulsif des huiles essentielles sur les tiques (tableau 4) présenté ci-dessus permet de se faire une idée du type de test le plus fréquemment utilisé dans les articles étudiés.

Les tests les plus utilisés sont le test de Pålsson et le test de Carrol. Ces tests se basent sur l'escalade des tiques pendant leur recherche d'hôte. Cependant, le comportement de chasse des tiques varie d'une espèce à l'autre. Certaines n'escaladent pas : ce type de test n'est donc pas forcément adapté à toutes les espèces. En plus, il peut également exister une affinité des tiques pour certains matériaux plus ou moins poreux, donc plus ou moins faciles à escalader.

De plus, le test de Pålsson demande de pouvoir réaliser de minuscules trous dans le tube de centrifugation afin que les tiques ne s'échappent pas, ce qui n'est pas forcément facile à réaliser.

Le test d'évitement sur papier filtre (World Health Organization, 1996) est également fréquemment utilisé dans les articles étudiés. Il a l'avantage d'être particulièrement simple à réaliser et peu onéreux (il faut une boîte de Pétri et du papier filtre). Il ne laisse toutefois pas beaucoup d'échappatoires aux tiques pour montrer réellement qu'elles sont repoussées (il faut grimper sur le tissu qui recouvre la boîte : elles se retrouvent ainsi au-dessus des émanations de produit à tester).

Le test d'étude du mouvement sur plan incliné (Kröber *et al.*, 2013) est plus compliqué à mettre en place au niveau du matériel, mais, comme le test d'exploration à l'horizontale, il prévient

d'une éventuelle saturation de l'air par le produit testé. Ces deux tests permettent également aux tiques qui escaladent peu ou mal, d'avoir un plan plus facilement explorable.

### **G. Choix du test utilisé pour la partie expérimentale**

Le test retenu pour la partie expérimentale est le test d'exploration décrit dans la thèse de Le Mauff (Le Mauff, 2021).

En effet, des échanges avec Le Mauff on permet de mettre en évidence que les femelles adultes de *I. ricinus* n'escaladaient pas systématiquement les dispositifs tels que décrits par Carroll (Carroll, 1998). Cela permettait difficilement d'avoir une analyse comportementale valable.

De plus, le dispositif expérimental du test d'exploration demande peu de matériel pour sa mise en place, il est économique et facilement reproductible.

Il permet également d'étudier le comportement exploratoire des tiques en s'affranchissant de leur affinité pour l'escalade verticale ou leur affinité pour le matériau à escalader. Enfin, il prévient la saturation du milieu expérimental par le produit testé, ce qui se rapproche des conditions dans lesquelles pourrait être utilisé le répulsif testé : en milieu ouvert.

Maintenant que nous avons fait le tour de la bibliographie disponible sur les trois piliers de cette thèse (les tiques, les huiles essentielles et les méthodes de tests), nous allons vous présenter l'étude expérimentale de la répulsivité des huiles essentielles sélectionnées.

# Deuxième partie : étude expérimentale

---

## 1. Introduction

Les tiques sont des arthropodes, ectoparasites hématophages des vertébrés (à sang chaud et à sang froid). Les tiques ont une phase de vie libre, dans l'environnement durant lequel elles muent et cherchent un hôte, et une phase de vie parasitaire, lors du repas sanguin sur l'hôte. La nature de ce dernier varie selon l'espèce de la tique étudiée et son milieu de vie. Pour effectuer leur repas sanguin, les tiques recherchent leurs proies en explorant leur environnement. C'est au moment de ce repas qu'elles sont en mesure de transmettre les agents pathogènes qu'elles abritent dans leurs glandes salivaires. Ces agents pathogènes ont été acquis lors d'un précédent repas sanguin, sur un hôte infecté par l'agent pathogène.

Afin de se prémunir de l'action pathogène directe (morsure, inflammation, spoliation sanguine) et indirecte (transmission d'agents pathogènes), il existe plusieurs méthodes de lutte ou de prévention. La première, la plus simple, consiste à retirer les tiques manuellement lorsqu'elles sont en train de réaliser leur repas sanguin. Certains produits, acaricides, peuvent également être utilisés chez les animaux afin de tuer la tique pendant son repas sanguin. Il est également possible de prévenir la morsure de la tique à l'aide de répulsifs composés de molécules de synthèse ou d'huiles essentielles.

Les propriétaires des animaux domestiques, en cherchant à réduire leur utilisation des molécules de synthèse se tournent vers les huiles essentielles pour se prémunir des morsures de tiques, pour eux ou pour leurs animaux. Les huiles essentielles sont des substances odorantes obtenues à partir de la distillation de plantes aromatiques. Il existe plusieurs procédés d'extractions des huiles essentielles (entraînement à la vapeur, hydrodistillation, etc.). Les huiles essentielles sont très variables dans leur composition chimique (ou chémotype), il est donc important de connaître avec le plus de précision possible le chémotype de l'huile que l'on utilise afin d'avoir des effets répétables dans nos expériences.

Il est important de rappeler que, bien que dans la pensée générale, les huiles essentielles font partie des « médecines douces », il s'agit de produits très concentrés en molécules actives. Elles possèdent une toxicité parfois forte (neurologique, hépatique, etc.) qu'il ne faut pas négliger. Il est important d'employer les huiles essentielles à bon escient et de tester leurs effets toxiques avant de les appliquer sur des êtres vivants. Dans cette thèse, nous ne nous sommes attachés qu'à leur effet répulsif sur les tiques.

Il existe différents protocoles permettant de tester l'effet répulsif des huiles essentielles. Les plus répandus sont le test d'escalade décrit par Carroll (Carroll, 1998), le test d'évitement sur boîte de Pétri (World Health Organization, 1996), et le test d'escalade dans un tube de centrifugation (Pålsson *et al.*, 2008).

L'objectif de cette étude est de tester le pouvoir répulsif de 5 huiles essentielles sélectionnées préalablement grâce aux recherches de la partie bibliographique, à l'aide du test d'exploration tel que présenté dans la thèse de Le Mauff (Le Mauff, 2021).

L'objectif poursuivi est de tester la répulsivité des 5 huiles essentielles sélectionnées à l'issue de la partie bibliographique sur les nymphes d'*I. ricinus*. Il s'agit ici d'une étude de supériorité des huiles essentielles. C'est-à-dire que l'on cherche à montrer l'existence d'un effet répulsif supérieur lors de l'utilisation d'huiles essentielles sur un papier filtre (servant de barrière chimique), par rapport à l'absence de produit sur le papier filtre. Ce type d'étude est différent d'une étude de non-infériorité, qui s'établit entre un traitement à l'efficacité prouvée (comme le DEET pour repousser les tiques par exemple), et un nouveau traitement (les huiles essentielles par exemple).

## **2. Matériels et méthodes**

Dans cette partie, nous aborderons les critères ayant permis de sélectionner les cinq huiles essentielles, dont l'effet répulsif est testé dans cette thèse, grâce à l'étude bibliographique. Puis les matériaux utilisés pour l'expérimentation (tiques et huiles essentielles) seront présentés. Enfin, la méthode de réalisation du test sera présentée, ainsi que la méthode d'analyse des vidéos et l'analyse statistique des résultats.

### **A. Méthode de sélection des huiles essentielles**

Dans cette étude expérimentale, pour des raisons de temps et de budget, il n'était pas possible de tester l'entièreté des huiles essentielles que l'on peut trouver dans la littérature. Pour sélectionner les huiles essentielles utilisées dans la partie expérimentale, nous avons d'abord sélectionné les huiles essentielles sur la base de leur effet répulsif, démontré dans l'étude bibliographique (cf. Tableau 4). Ensuite nous avons vérifié, dans la littérature, la toxicité, sur les animaux de compagnie, des huiles essentielles sélectionnées. Une sélection rigoureuse a été effectuée afin de restreindre le nombre d'huiles essentielles à tester jusqu'à un nombre raisonnable : cinq.

#### ***a. Effet répulsif***

De nombreuses huiles essentielles ont été testées pour leur activité répulsive sur les ectoparasites, avec des méthodes de tests différentes et à des dilutions variées. Le tableau 4 de la partie bibliographique sur les huiles essentielles récapitule ces informations pour les 20 articles étudiés avant le choix des huiles essentielles pour la partie expérimentale.

Un second tableau a été réalisé, qui classe les huiles essentielles en fonction de leur pourcentage de répulsivité obtenue dans les articles étudiés (tableau 5). Certaines huiles essentielles peuvent s'y retrouver plusieurs fois : soit parce qu'elles ont été testées avec des résultats différents par différents auteurs, soit parce qu'elles ont été plus ou moins diluées dans la même expérience. Les dilutions ne sont pas indiquées, car il n'y a pas d'harmonisation de l'expression de la dilution entre les articles. Il est ainsi difficile de synthétiser l'ensemble dans un tableau.

**Tableau 5 : Synthèse du pourcentage de répulsivité obtenue pour chaque huile essentielle ou composé testé dans les articles étudiés**

% de répulsivité	Huile essentielle	Numéro article
100 %	<i>Rosmarinus officinalis</i>	(El-Seedi <i>et al.</i> , 2012)
	<i>Salvadora persica, Rosmarinus officinalis</i>	(Elmhalli <i>et al.</i> , 2019)
	<i>Tanacetum vulgare</i>	(Pålsson <i>et al.</i> , 2008)
	<i>Corymbia citriodora, Lavandula angustifolia, Pelargonium graveolens</i>	(Jaenson <i>et al.</i> , 2006)
	<i>Mentha spicata, Curcuma longa, Thymus vulgaris, Pelargonium graveolens, Zingiber officinale.</i>	(Goode <i>et al.</i> , 2018)
	<i>Origanum onites L.</i>	(Carroll <i>et al.</i> , 2017)
	<i>Melaleuca alterniflora</i>	(Yim <i>et al.</i> , 2016)
Supérieure à 90 %	Géraniol, Acide laurique	(ANSES, 2018)
	<i>Mentha spicata</i>	(El-Seedi <i>et al.</i> , 2012)
	<i>Tanacetum vulgare</i>	(Pålsson <i>et al.</i> , 2008)
	Carvacrol et Thymol	(Tabari <i>et al.</i> , 2017)
	<i>Dianthus caryophyllum</i>	(Tunón <i>et al.</i> , 2006)
	<i>Lavandula angustifolia, Mentha arvensis.</i>	(Goode <i>et al.</i> , 2018)
	<i>Origanum vulgare, Mentha spicata</i>	(Soutar <i>et al.</i> , 2019)
	<i>Conyza dioscoridis L</i>	(El-Seedi <i>et al.</i> , 2017)
	<i>Tagetes minuta</i>	(Nchu <i>et al.</i> , 2012)
	<i>Anthemis scrobicularis</i>	(Yusufoglu <i>et al.</i> , 2018)
<i>Cupressus funebris, Juniperus communis, Juniperus chinensis</i>	(Carroll <i>et al.</i> , 2011)	
Supérieure à 80 %	Acide décanoïque	(ANSES, 2018)
	<i>Origanum majorana</i>	(El-Seedi <i>et al.</i> , 2012)
	<i>Artemisia herba-alba, Calendula officinalis L.</i>	(El-Seedi <i>et al.</i> , 2017)
	<i>Anthemis melampodina</i>	(Yusufoglu <i>et al.</i> , 2018)
Supérieure à 70 %	Citriodiol	(ANSES, 2018)
	<i>Myrica gale.</i>	(Goode <i>et al.</i> , 2018)
	<i>Lavandula angustifolia</i>	(Mkolo et Magano, 2007)
Supérieure à 60 %	<i>Ocimum basilicum</i>	(El-Seedi <i>et al.</i> , 2012)
	<i>Pelargonium graveolens</i>	(Jaenson <i>et al.</i> , 2006)
	<i>Artemisia abrotanum</i>	(Tunón <i>et al.</i> , 2006)
	<i>Origanum onites L.</i>	(Carroll <i>et al.</i> , 2017)
Supérieure à 50 %	<i>Lavandula angustifolia</i>	(Jaenson <i>et al.</i> , 2006)
	Linalool	(Tabari <i>et al.</i> , 2017)
	<i>Melaleuca viridiflora, Melaleuca cajeputi.</i>	(Goode <i>et al.</i> , 2018)

De ce tableau, ont été conservées les huiles essentielles affichant plus de 90 % d'efficacité. Ont ensuite été éliminées les huiles essentielles issues de plantes ne poussant pas sur le continent européen (ou le pourtour méditerranéen) et/ou ayant un impact et un coût de production important. Cela semblait écologiquement et économiquement responsable de ne choisir que des huiles essentielles pouvant être produites en France, ou à proximité, et ayant donc un impact carbone le plus limité possible.

À ce stade, les huiles essentielles retenues pour la partie expérimentale étaient : *Corymbia citriodora* (Eucalyptus citronné), *Lavandula angustifolia* (Lavande fine aussi dite lavande vraie), *Melaleuca alternifolia* (Arbre à thé), *Pelargonium graveolens* (Géranium rosat), *Rosmarinus officinalis* (Romarin officinal).

Il faut toutefois nuancer la proximité de production de : *Corymbia citriodora* (Eucalyptus citronné) et *Melaleuca alternifolia* (Arbre à thé) qui ont également été sélectionnées, car très répandues dans les « recettes de grand-mère » qui circulent chez les propriétaires d'animaux servant à la lutte contre les tiques. Il a donc été décidé de les inclure pour avoir un regard critique sur leur efficacité.

### **b. Toxicité chez l'animal**

Comme vu dans la partie précédente, les huiles essentielles, bien que faisant partie de la médecine douce, possèdent un fort pouvoir toxique qui varie en fonction de leurs composants. Dans le Guide pratique de phyto-aromathérapie pour les animaux de compagnie, il est par exemple indiqué que les huiles essentielles à phénols, alcools et cétones ont une forte activité antiparasitaire externe (elles seraient donc efficaces sur les tiques par exemple), toutefois, elles sont très vite toxiques pour les animaux sur lesquelles elles sont appliquées (May, 2014).

Afin d'affiner la sélection d'huiles essentielles utilisées dans la partie expérimentale, une recherche bibliographique sur la toxicité des huiles essentielles sélectionnées a été réalisée.

L'huile essentielle de *Corymbia citriodora* (Eucalyptus citronné) contient entre autres de l'eucalyptol (1,8-cineole) et d'autres terpènes. Ces composés peuvent provoquer des nausées et des vomissements dans un premier temps. Des signes neurologiques peuvent suivre à haute dose (dépression, ataxie, coma). Des signes respiratoires peuvent également être présents : des pneumonies accompagnées de bronchospasme et d'œdème pulmonaire sont décrites (Flint, 2020).

Une étude sur l'évaluation de l'irritation cutanée et de la toxicité orale menée sur l'huile essentielle de *Lavandula angustifolia* (Lavande fine) chez des lapins et des souris n'a pas montré de toxicité évidente aux doses testées (Mekonnen *et al.*, 2019). Une étude sur l'effet d'extraits aqueux d'huile essentielle de *L. angustifolia* (Lavande fine) semble même montrer un effet neuroprotecteur et une action antioxydante (Büyükkuroğlu *et al.*, 2003).

Chez les animaux domestiques, l'huile essentielle de *Melaleuca alternifolia* (Arbre à thé) est plus connue pour ses effets toxiques, bien que fréquemment employée en aromathérapie. Toutefois, les effets toxiques rapportés et observés semblent surtout survenir en cas de surdosage important (une demi-tasse à thé d'huile essentielle de *Melaleuca alternifolia* (Arbre à thé) avalée par un patient humain a causé un coma de 12h) ou d'usage chez les jeunes enfants (Hammer *et*

*al.*, 2006). Il est également rapporté que l'huile essentielle de *M. alternifolia* (Arbre à thé) en application cutanée (dans le traitement de dermatite) a provoqué une dépression, une faiblesse et des trémulations musculaires chez des chiens et des chats (Vigan, 2010). Toutefois, il n'est fait aucune mention de l'utilisation pure ou diluée de l'huile essentielle ni de la dose appliquée sur ces animaux. Pour limiter les effets toxiques, il est recommandé d'éviter l'ingestion d'huile essentielle de *M. alternifolia* (Arbre à thé) et de la diluer pour une utilisation topique (Hammer *et al.*, 2006).

La toxicité de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* (Romarin officinal) est étudiée, entre autres, dans un article de revue s'intéressant aux bienfaits de l'huile essentielle de romarin (Borges *et al.*, 2019). Les voies cutanées, intrapéritonéales, orales et inhalatoires de différents chémotypes d'huile essentielle de *R. officinalis* (Romarin officinal) ont été testées sur des souris et des rats par les sources de la revue. Dans chacun des cas, lorsque la dose létale médiane est obtenue, elle l'est pour des doses supérieures à 1 000 mg/kg. L'une des sources rapporte des doses par voie orale supérieure à 3 000 mg/kg qui ont été testées sans manifestation évidente de symptômes révélant une toxicité, ou une létalité. Aucune réaction allergique suite à une application cutanée n'est rapportée dans cette revue. L'auteur de la revue a donc conclu qu'au vu des doses très importantes déployées avant d'obtenir la dose létale médiane, il était possible de dire que l'utilisation de l'huile essentielle de *R. officinalis* (Romarin officinal) ne provoque pas de toxicité à usage thérapeutique. L'auteur appelle toutefois à rester prudent, car les différents chémotypes ne manifestent pas tous la même toxicité et la même efficacité (Borges *et al.*, 2019).

Nous n'avons pas trouvé de littérature quant à la toxicité de *Pelargonium graveolens* (Géranium rosat) sur les animaux domestiques.

L'étude des effets toxiques des huiles essentielles sur les animaux domestiques n'étant pas l'objet de cette thèse, il faut garder à l'esprit que les huiles essentielles montrant une action répulsive satisfaisante à l'issue de la partie expérimentale doivent encore être testées sur les animaux suivant un protocole validé par un comité d'éthique avant d'être validées définitivement pour la lutte contre les tiques chez les animaux domestiques.

Après les recherches sur la toxicité des huiles essentielles, la sélection précédemment retenue ne change pas. Les huiles essentielles étudiées dans la partie expérimentale seront : *Corymbia citriodora* (Eucalyptus citronné), *Lavandula angustifolia* (Lavande fine), *Melaleuca alternifolia* (Arbre à thé) , *Pelargonium graveolens* (Géranium rosat), *Rosmarinus officinalis* (Romarin officinal).

## B. Les tiques

Les tiques utilisées sont des nymphes d'*I. ricinus* nées et élevées en France, au sein de l'animalerie de l'ANSES (numéro d'autorisation Cometh de l'élevage de tiques : APAFIS #35511-2022022111197802 v2).

La femelle mère a été gorgée sur lapin, et les larves ont été gorgées de façon artificielle sur peau de gerbille. Au moment de l'expérience, les nymphes n'ont pas été nourries.

Les nymphes sont conservées en dessiccateur, dans une flasque ventilée de 25 cm<sup>2</sup>. L'hydrométrie est maintenue supérieure à 90 % grâce à du sulfate de magnésium placé dans le fond du dessiccateur. La température est contrôlée et maintenue à +21 °C. Il n'y a pas de substrat nutritif dans les flasques.

Nous disposons de 160 nymphes pour réaliser les expériences. Elles sont réparties en 4 flasques de 40 individus. Chaque flasque est attribuée à une dilution d'huile essentielle ; ainsi, les nymphes de chacun des réplicats sont piochées aléatoirement dans la flasque correspondante.

Au cours des expériences, elles sont manipulées à l'aide de pinceaux et de pinces fines.

## C. Les produits à tester

### a. Les huiles essentielles

Les huiles essentielles sélectionnées ont été achetées sur le site de vente en ligne (Compagnie des Sens, 2022).

Elles sont toutes accompagnées d'une analyse chromatographique (voir les Figures 20, 21, 22, 23, 24) et d'une analyse qualité rigoureuse (reportées en Annexe 2).

**Figure 21 : Analyse chromatographique de l'huile essentielle de *Corymbia citriodora* (Eucalyptus citronné)**

Critères	Spécifications	Résultats
Citral (Géranial + Néral) (%) *	0 - 0,2	(0+0,10) = 0,10
Citronellal (%) *	65 - 82	70,56
Citronellol (%) *	0 - 8	5,37
EugénoL (%) *	0 - 1	0,14
GéranioL (%) *	0 - 0,5	0,05

**Figure 22 : Analyse chromatographique de l'huile essentielle de *Lavandula angustifolia* (Lavande fine)**

Critères	Spécifications	Résultats
Eucalyptol (%) *	0,2 - 1	0,45
Acétate de lavandulyle (%) *	> 2,5	3,51
Camphre (%) *	0 - 0,5	0,19
Cis- $\beta$ -Ocimène (%) *	3 - 9	5,63
Coumarine (%) *	0 - 0,2	ND
Géranol (%) *	0 - 0,5	ND
Lavandulol (%) *	> 0,5	0,80
Limonène (%) *	0 - 1	ND
Linalol (%) *	0 - 36	27,62
3-Octanone (%) *	0,5 - 2	0,73
Terpinèn-4-ol (%) *	2,5 - 5,5	4,52
Trans- $\beta$ -Ocimène (%) *	2,2 - 4,9	4,08
$\alpha$ -Terpinéol (%) *	0 - 0,7	0,28

**Figure 23 : Analyse chromatographique de l'huile essentielle de *Melaleuca alternifolia* (Arbre à thé)**

Critères	Spécifications	Résultats
Eucalyptol (%) *	3,99	3,99
Limonène (%) *	1,15	1,15
Linalol (%) *	0,04	0,04
Para-Cymène (%) *	2,02	2,02
Terpinèn-4-ol (%) *	41,51	41,51
$\alpha$ -Terpinène (%) *	10,53	10,53
$\gamma$ -Terpinène (%) *	51,49	51,49

**Figure 24 : Analyse chromatographique de l'huile essentielle de *Pelargonium graveolens* (Géranium rosat variété Égypte)**

Critères	Spécifications	Résultats
(E)-Oxyde de rose (%) *	0,3 - 0,6	0,549
(Z)-Oxyde de rose (%) *	0,7 - 1,5	1,352
Butyrate de géranyle (%) *	0,7 - 2	-
Citral (Géranial + Néral) (%) *	0 - 1	0,203
Citronellal (%) *	0 - 0,2	0,184
Citronellol (%) *	25 - 36	34,102
Formiate de citronellyle (%) *	4 - 8	8,420
Formiate de géranyle (%) *	2 - 7	2,642
Géraniol (%) *	10 - 18	13,188
Guaia-6,9-diène (%) *	0 - 0,5	0,444
Isomenthone (%) *	4 - 8	6,215
Linalol (%) *	4 - 8,5	5,438
Menthone (%) *	0 - 2,1	2,315
Tiglate de géranyle (%) *	0,9 - 2	0,594
Tiglate de $\beta$ -phényléthyle (%) *	0,5 - 1,2	0,540
$\alpha$ -Terpinéol (%) *	0,3 - 0,6	0,342

**Figure 25 : Analyse chromatographique de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* (Romarin officinal)**

Critères	Spécifications	Résultats
Eucalyptol (%) *	18.262	18.262
Camphène (%) *	11.928	11.928
Camphre (%) *	18.700	18.700
Limonène (%) *	3.933	3.933
Linalol (%) *	1.917	1.917
$\alpha$ -Pinène (%) *	22.736	22.736

Lors de notre protocole expérimental, les huiles essentielles sont diluées dans de l'huile végétale de colza. Cette dernière a été choisie pour trois raisons principales. La première raison est que l'huile végétale de colza est souvent conseillée pour diluer les huiles essentielles utilisées sur la peau en aromathérapie. La deuxième raison est que nous avons réalisé un test comparatif entre l'huile de colza et l'huile d'amande douce. Ce test a été conduit selon le protocole décrit dans les pages suivantes, afin de vérifier que le comportement des tiques n'était pas modifié sur le dispositif par rapport à l'utilisation de papier filtre vierge, de papier filtre avec huile végétale de colza et de papier filtre avec huile végétale d'amande douce. Ce premier test comparatif avec les nymphes n'a pas révélé de différence d'effet répulsif. Enfin, la troisième raison est qu'elle est moins chère que l'huile d'amande douce (seconde huile végétale envisagée pour servir de support de dilution).

Les dilutions étudiées sont 5 %, 2 %, 1 % et 0,1 % pour chaque huile essentielle. Ces dilutions ont été choisies afin de limiter l'impact de l'odeur de l'huile essentielle sur la nymphe (une odeur trop forte pourrait avoir un effet répulsif, sans pour autant que cet effet ne soit dû qu'à l'huile

essentielle testée). Elles ont également été sélectionnées pour un aspect économique : les huiles essentielles coûtant cher, plus la dilution efficace est basse, plus il est possible de produire en grande quantité le mélange adéquat pour une solution répulsive à un prix accessible au grand public.

Les mélanges sont préparés grâce à une micropipette adaptée au volume à prélever. Une quantité de 2 mL est préparée au plus tôt deux jours avant l'utilisation pour expérimentation. Le mélange est stocké dans un flacon hermétique, en plastique teinté. Chaque flacon est identifié du nom de l'huile essentielle et de la dilution préparée (cf. Figure 25). Ils sont stockés à l'abri de la lumière, dans une boîte en carton, dans un sac, entre leur préparation et leur utilisation.

**Figure 26 : Photo des flacons utilisés pour stocker les huiles essentielles une fois diluées**



### ***b. Le N,N-diéthyl-3-méthylbenzamide (DEET)***

Le DEET est un produit largement utilisé pour son effet répulsif sur de nombreux insectes et acariens (moustiques, puces, tiques, etc.). Il est utilisé dans de nombreuses publications scientifiques comme témoin positif de répulsion. Nous avons choisi de le tester pour avoir un point de comparaison de nos résultats avec les huiles essentielles, bien que le but de l'expérience menée ici ne soit pas de montrer que les huiles essentielles sont plus ou moins efficaces que le DEET.

Le DEET utilisé pendant les expériences a été commandé via le laboratoire Sigma-Aldrich aux États-Unis. Le certificat d'analyse est disponible en Annexe 3.

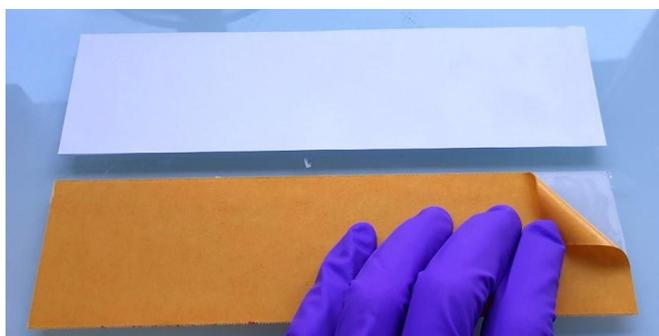
L'effet répulsif du DEET est testé aux dilutions, 5 %, 2 %, 1 % et 0,1 % afin de suivre les dilutions utilisées pour les huiles essentielles. Le produit est dilué dans de l'huile végétale de colza, de la même manière que les huiles essentielles.

#### D. Le test d'exploration

Les tiques du genre *I. ricinus* explorent leur environnement à la recherche d'un repas sanguin, plus qu'elles n'escaladent comme pourraient le faire d'autres espèces. C'est cette capacité d'exploration qui est étudiée lors du test d'exploration sur plateforme, conformément au protocole décrit dans la thèse de Le Mauff (Le Mauff, 2021).

La préparation du matériel s'effectue avec des gants afin de limiter le dépôt d'odeur humaine sur les surfaces. Une plateforme en plexiglas (20 x 5 cm) est recouverte de papier blanc d'imprimerie, découpé préalablement aux bonnes dimensions, et maintenu en place avec une bande de scotch double face sur toute sa surface (cf. Figure 26). Une bande de papier filtre (5 x 1 cm) est découpée et scotchée au milieu de la plateforme de plexiglas avec du scotch double face.

**Figure 27 : Photo de la préparation de la plateforme**



La substance à tester est déposée, à l'aide d'une micropipette, en une fine ligne centrale sur la bande de papier filtre, et laissée séchée 20 minutes à l'air libre (cf. Figure 27). La quantité de solution déposée sur le papier filtre est de 10  $\mu$ L. Ce volume est choisi légèrement supérieur au volume décrit dans le travail de Le Mauff, car les 7,5  $\mu$ L préconisés suffisaient à peine à tracer une ligne sur l'ensemble du papier filtre.

**Figure 28 : Photo du dépôt du produit à tester sur le papier filtre**



L'ensemble est installé dans un conteneur en plastique, sur un promontoire (ici, des pots de confiture vides). Le conteneur est rempli d'eau jusqu'à ce que le niveau affleure la surface de la plateforme en plexiglas afin de garantir une humidité optimale et de prévenir la fuite des nymphes (cf. Figure 28). Une caméra, placée au-dessus de la plateforme grâce à un trépied, permet l'acquisition des images pendant 30 minutes. Deux caméscopes différents sont utilisés : un caméscope de la marque FamBrow (modèle : HDV-301 STRM) et un caméscope de la marque Sanyo (modèle : VPC-CA9EX). Dix nymphes d'*I. ricinus* sont déposées une à une sur l'un des côtés de la plateforme. La caméra servant à l'acquisition est alors lancée.

**Figure 29 : Photos du montage expérimental**



Chaque huile est testée sur une journée. Deux réplicats de la même dilution sont lancés en parallèle, pendant que le support des réplicats suivant est préparé. Chaque dilution est testée 4 fois. Sur la journée, les dilutions d'une même huile essentielle sont testées dans un ordre croissant de concentration afin de ne pas saturer l'air de la pièce (ventilée) d'effluves d'une solution plus concentrée que celle en cours de test.

## E. Analyse des vidéos

Les vidéos devaient être analysées à l'aide du logiciel ToxTrac (Rodriguez *et al.*, 2018), cependant, les nymphes étant trop petites pour être détectées par le logiciel, une méthode d'analyse manuelle est réalisée.

Chaque vidéo est analysée deux fois. La première analyse permet de compter le « **nombre de passages** » des nymphes au-dessus de la barrière chimique. Ne sont comptées que les nymphes qui passent entièrement sur le papier filtre, dans un sens ou dans l'autre. En effet, si une nymphe esquivé le papier filtre en passant dans l'eau ou sur la tranche de la plateforme en plexiglas, son passage n'est pas comptabilisé.

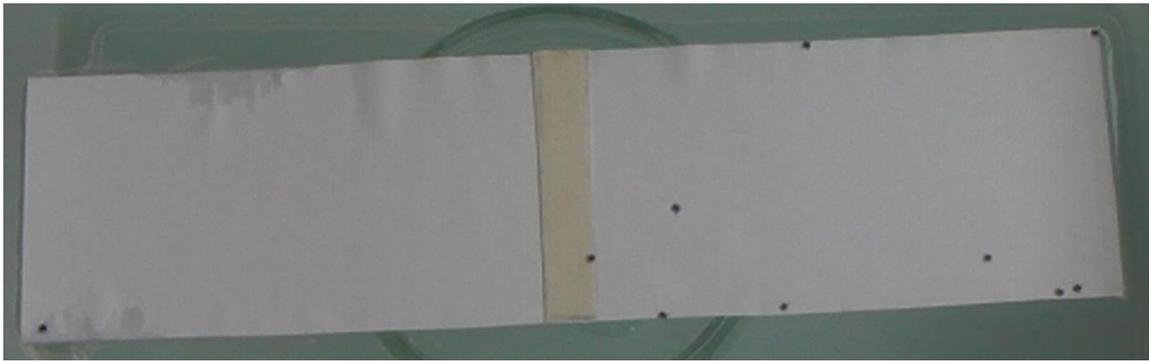
Une seconde analyse suit chaque nymphe individuellement jusqu'à ce qu'elle traverse la barrière chimique ; c'est le « **nombre de nymphes** ». Cela permet de dénombrer le nombre de nymphes qui passent la barrière et ainsi de savoir si le nombre de passages observé n'est le fait que d'une seule nymphe, qui serait insensible au produit testé, ou bien si aucune des nymphes ne semble incommodée par le produit.

Pour résumer :

- Barrière chimique : ensemble composé du papier filtre et de la substance testée (huile essentielle ou DEET) à une dilution donnée.
- Nombre de passages : nombre de passages de nymphes au-dessus de la barrière chimique, quelle que soit la nymphe.
- Nombre de nymphes : nombre d'individus qui ont franchi au moins une fois la barrière chimique.

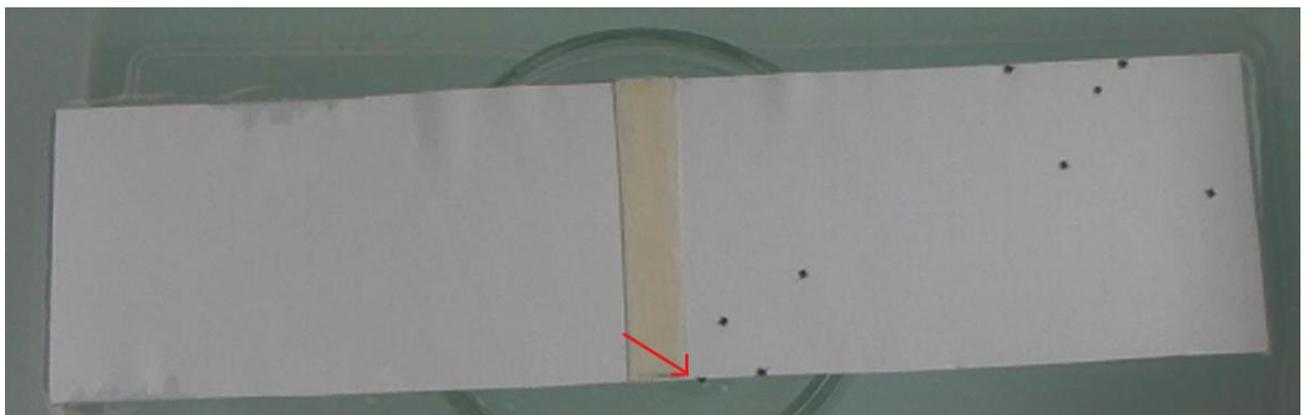
La Figure 29 montre une capture d'écran d'une des vidéos de test de l'huile essentielle *Corymbia citriodora* (Eucalyptus citronné). Au début de la vidéo, les nymphes ont été posées sur la partie droite de la plateforme. On peut voir sur la photo qu'une nymphe est passée dans la partie gauche de la plateforme, sans avoir la certitude qu'elle ait réellement franchi la barrière chimique. En effet, elle a pu marcher sur le côté de la plateforme ou sous l'eau pour passer de l'autre côté. On peut également voir qu'une autre nymphe s'aventure sur le papier filtre.

**Figure 30 : Capture d'écran de la vidéo 3 de test de l'huile essentielle de *Corymbia citriodora* (Eucalyptus citronné) 2% à 14'25''**



Sur la Figure 30, on peut voir l'une des nymphes marcher sur le côté de la plateforme, pourtant immergée, afin d'éviter la barrière chimique et passer de l'autre côté (flèche rouge sur la figure 30).

**Figure 31 : Capture d'écran de la vidéo 3 de test de l'huile essentielle de *Corymbia citriodora* (Eucalyptus citronné) 2% à 5'25''**



## **F. Analyse statistique**

Le but poursuivi ici est de tester l'effet répulsif des huiles essentielles, et donc, qu'il y a moins de tiques qui passent la barrière chimique si elle est composée de papier filtre et d'huile essentielle plus ou moins diluée, plutôt que de papier filtre seul. C'est une étude dite « de supériorité ».

Le fait d'avoir multiplié les tests avec des dilutions différentes dans notre protocole fait augmenter le risque de considérer à tort la différence observée comme réelle. Dans un premier temps, il est possible de considérer chaque huile essentielle comme une famille de paramètres à tester. Dans ces familles, on retrouvera les différentes dilutions utilisées (0,1 %, 1 %, 2 %, 5 %). En effet, on a une hypothèse sur l'action répulsive de chacune de ces huiles essentielles ;

hypothèse portée par la littérature. Cela nous permet de considérer les huiles essentielles comme des familles indépendantes. On va donc vérifier que chacune de ces huiles essentielles a un meilleur effet répulsif sur les nymphes que l'absence d'huile essentielle (Bender et Lange, 2001)

Pour l'analyse statistique, nous prendrons « l'ensemble des nymphes d'*I. ricinus* » comme population cible pour inférer nos résultats. La population source (c'est-à-dire dont sont tirés les individus étudiés dans l'expérience) est « l'ensemble des nymphes d'*I. ricinus* de l'animalerie du laboratoire de l'ANSES ». L'individu étudié dans l'analyse statistique est « une des nymphes d'*I. ricinus* des flasques prêtées pour les expériences ».

L'hypothèse  $H_0$  que nous chercherons à rejeter est : « Dans l'ensemble des nymphes d'*I. ricinus* il n'existe pas d'association réelle entre le passage d'une zone délimitée (le papier filtre) et la présence ou l'absence d'huile essentielle sur la zone délimitée ».

Nous sommes ainsi dans le cadre d'une étude « exposé » / « non exposé » avec :

- Les nymphes exposées = les nymphes qui sont sur la plateforme avec de l'huile essentielle sur le papier filtre
- Les nymphes non exposées = les nymphes qui sont sur la plateforme témoin (sans huile essentielle sur le papier filtre)
- Les nymphes sensibles = les nymphes qui ne sont pas passées sur le papier filtre
- Les nymphes non sensibles = les nymphes qui sont passées sur le papier filtre

On compare le pourcentage de « nymphes d'*I. ricinus* qui ont passé la barrière chimique parmi les nymphes exposées à une huile essentielle », au pourcentage de « nymphes d'*I. ricinus* qui ont passé la barrière chimique parmi les nymphes non exposées à une huile essentielle ». Ainsi, on peut construire un tableau pour chaque huile essentielle, et chaque dilution (cf. Tableau 6).

**Tableau 6 : Exemple de tableau utilisé pour réaliser un test du  $\chi^2$  pour chaque huile essentielle et dilution**

	Sensible (ne passe pas la barrière)	Non sensible (passe la barrière)
Exposé (HE)	a	b
Non Exposé (Papier filtre sans HE)	c	d

On utilise le test de  $\chi^2$  pour comparer les différents groupes et ainsi obtenir un degré de signification (noté « *p-value* »). Le degré de signification est la probabilité d'observer une différence entre les groupes étudiés même s'il n'y avait aucune différence réelle dans la population cible (Desquilbet, 2021).

Pour réaliser le test de  $\chi^2$ , on utilise le site BiostatGV (INSERM et Sorbonne Université, 2000). Se présentent alors deux cas de figure :

- Soit les effectifs attendus sont supérieurs ou égaux à 5 : on retient la « *p-value* » et on calcule l'Odds Ratio (noté OR) associé.
- Soit les effectifs attendus sont inférieurs strictement à 5 : on utilise le test de Fischer pour obtenir la « *p-value* » et l'OR.

Dans le cadre de tests multiples, comme réalisés ici avec l'ensemble des dilutions étudiées, la correction d'Holm permet de corriger la « *p-value* » obtenue et ainsi de savoir si l'association observée est réellement significative ou non. En effet, les tests multiples ont tendance à fausser la « *p-value* » observée et peuvent nous faire considérer à tort qu'une association est significative (Aickin et Gensler, 1996).

La « *p-value* » corrigée sera nommée «  $p_{\text{corr}}$  » dans le reste du document. On obtient donc les  $p_{\text{corr}}$  qui permettent ainsi de savoir s'il y a une différence significative entre l'utilisation ou non de l'huile essentielle étudiée.

### **3. Résultats**

#### **A. Vidéos obtenues**

La partie expérimentale de cette thèse s'est déroulée en deux phases. La première phase consistait en des tests préliminaires pour vérifier le comportement des tiques sur le dispositif expérimental. Cette phase a eu lieu sur trois jours complets.

La seconde phase de test s'est déroulée sur deux semaines complètes. Le matin de 8h à 12h étaient réalisées les vidéos des dilutions 0,1 % puis 1 %. L'après-midi, de 14h à 18h, c'étaient les vidéos des dilutions 2 % puis 5 % de l'huile essentielle qui étaient réalisées. Cet ordre de travail des dilutions nous a permis d'éviter une concentration d'huile essentielle dans l'air de la pièce de travail.

Chaque vidéo dure 30 minutes. Il y a 4 vidéos pour chaque dilution de chaque huile essentielle, de même pour le DEET, ce qui fait 96 vidéos. Lors de certains tournages, la caméra s'est coupée faute de batterie ou de place sur la carte mémoire. Il a donc parfois fallu tourner de nouveau la vidéo.

#### **B. Analyse des vidéos**

L'analyse des vidéos s'est déroulée une fois que toutes les vidéos ont été acquises et que la phase de laboratoire a été terminée. Elle a duré 15 jours complets.

La vidéo est ouverte sur l'ordinateur avec le logiciel vidéo d'origine de la machine. Elle est parcourue une première fois en avance rapide afin de quantifier le nombre de passages des nymphes au-dessus de la barrière chimique. Cette première lecture prend environ 5 à 10 minutes selon la complexité du mouvement des nymphes. Elle a parfois été répétée en cas de doutes (si plusieurs nymphes traversent la barrière chimique ensemble par exemple).

La vidéo est ensuite remise au début et chaque individu est suivi individuellement jusqu'à ce qu'il franchisse la barrière chimique, ou jusqu'à la fin de la vidéo s'il ne la franchit jamais. Cela permet d'obtenir le « nombre de tiques passées au-dessus de la barrière chimique ». Cette seconde phase d'analyse prend entre 20 et 30 minutes selon la complexité du mouvement des nymphes.

Au total, l'analyse d'une vidéo prend environ 40 minutes, il y a 96 vidéos, ce qui fait environ 64 h passées à analyser les vidéos.

Ci-après, le tableau montrant le résultat de l'analyse des vidéos (cf. Tableau 7). Pour rappel, dans le tableau :

- « nbr passages » se rapporte au nombre de passages au-dessus de la barrière chimique, tous individus confondus.
- « nbr tiques » se rapporte au nombre d'individus, sur les 10 individus présents sur chaque vidéo, ayant franchi au moins une fois la barrière chimique au cours de la vidéo.

Tableau 7 : Tableau de l'interprétation des vidéos

		0,10%		1%		2%		5%		100%	
		Nbr de passages	Nbr de tiques								
DEET	Vidéo 1	22	8	8	6	3	3	0	0	0	0
	Vidéo 2	17	9	9	5	3	3	0	0	0	0
	Vidéo 3	5	5	5	5	2	2	0	0	0	0
	Vidéo 4	19	9	5	3	3	3	0	0	0	0
Corymbia citriodora	Vidéo 1	43	9	19	9	1	1	10	7		
	Vidéo 2	33	10	16	10	11	8	2	2		
	Vidéo 3	5	4	15	10	2	2	2	2		
	Vidéo 4	20	9	13	6	4	3	3	3		
Lavandula angustifolia	Vidéo 1	22	10	3	3	12	6	10	5		
	Vidéo 2	16	9	9	6	12	9	9	6		
	Vidéo 3	8	8	13	7	10	8	7	5		
	Vidéo 4	18	9	18	8	14	9	4	3		
Melaleuca alternifolia	Vidéo 1	34	9	42	10	9	6	13	7		
	Vidéo 2	26	9	34	10	17	9	8	4		
	Vidéo 3	24	9	26	9	10	7	6	7		
	Vidéo 4	13	9	33	10	9	6	5	3		
Pelargonium graveolens	Vidéo 1	52	9	24	9	18	10	0	0		
	Vidéo 2	31	8	7	6	7	6	0	0		
	Vidéo 3	22	9	22	8	4	3	2	2		
	Vidéo 4	17	8	23	9	4	4	4	4		
Rosmarinus officinalis	Vidéo 1	43	9	15	6	53	10	38	10		
	Vidéo 2	22	8	23	9	29	9	26	9		
	Vidéo 3	45	10	29	10	30	10	15	8		
	Vidéo 4	30	10	23	9	30	9	11	7		
Papier Filtre seul	Vidéo 1	26	8								
	Vidéo 2	33	9								
	Vidéo 3	20	8								
	Vidéo 4	25	9								

### C. Résultats de l'analyse statistique avec le test du Chi<sup>2</sup>

Ci-après, le tableau présentant les résultats du test statistique du Chi<sup>2</sup>, appliqué au nombre de nymphes qui ont passé la barrière chimique, dilution par dilution, en fonction du produit testé avec successivement : la « *p-value* », le  $p_{corr}$  et l'OR associés. Le tableau préalable permettant l'application du test du Chi<sup>2</sup> est présent en Annexe 4.

**Tableau 8 : Tableau regroupant les résultats du test du Chi<sup>2</sup>, appliqué au nombre de nymphes qui ont passé la barrière chimique, de la correction d'Holm ( $p_{corr}$ ) et du calcul de l'OR associé pour chaque huile essentielle et chaque dilution testée**

HE	Dilution	p-value	$p_{corr}$	OR
<i>Corymbia citriodora</i> (Eucalyptus citronné)	0,10 %	0,556	1	1,42
	1 %	0,745	Erreur	0,81
	2 %	5,01E-06	2,00E-05	10,52
	5 %	5,01E-06	2,00E-05	10,52
<i>Lavandula angustifolia</i> (Lavande fine)	0,10 %	0,498	0,996	4,19
	1 %	0,012	0,036	32,11
	2 %	0,556	0,996	0,63
	5 %	0,00039	0,0015	3,78
<i>Melaleuca alternifolia</i> (Arbre à thé)	0,10 %	0,499	0,499	0,46
	1 %	0,108	0,324	1,00
	2 %	0,108	0,324	0,30
	5 %	0,001	0,004	1,00
<i>Pelargonium graveolens</i> (Géranium rosat)	0,10 %	1	Erreur	0,63
	1 %	0,556	1	3,78
	2 %	0,007	0,021	1,42
	5 %	3,82E-10	1,53E-09	6,26
<i>Rosmarinus officinalis</i> (Romarin officinal)	0,10 %	0,481	1	0,30
	1 %	1	Erreur	1,00
	2 %	0,263	1,05	0,63
	5 %	1	Erreur	0,15
DEET	0,10 %	0,39	0,39	1,65
	1 %	0,00039	0,00078	6,26
	2 %	2,17E-07	6,51E-07	14,94
	5 %	1,47E-14	5,88E-14	Erreur

Erreur ( $p_{corr}$ ) = la valeur de  $p_{corr}$  est trop fortement supérieure à 1.

Erreur (OR) = l'OR ne peut être calculé, car il entraîne une division par zéro.

On considère comme significatif un résultat dont le  $p_{corr}$  est inférieur à 0,05 (il s'agit du seuil classiquement fixé pour le « risque  $\alpha$  » qui correspond au risque de rejeter à tort l'hypothèse  $H_0$ ) (Bender et Lange, 2001).

Ainsi, on observe une différence significative, par rapport à l'utilisation de papier filtre seul, pour les huiles essentielles de *Corymbia citriodora* (Eucalyptus citronné) et de *Pelargonium graveolens* (Géranium rosat) à partir de la dilution 2 %. Pour l'huile essentielle de *Lavandula angustifolia* (Lavande fine) on observe que les résultats obtenus sont significatifs pour les dilutions 1 % et 5 %, mais pas pour la dilution 2 %. Il faut attendre la dilution 5 % pour avoir un résultat significatif pour l'huile essentielle de *Melaleuca alternifolia* (Arbre à thé). Enfin, l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* (Romarin officinal) ne montre aucun résultat significatif.

Le DEET montre des résultats significatifs dès la dilution 1 % par rapport à l'utilisation du papier filtre seul.

#### D. Nombre moyen de passages au-dessus de la barrière chimique

Lors de l'analyse des vidéos, nous avons également relevé le nombre de passages, par les nymphes d'*Ixodes ricinus*, au-dessus de la barrière chimique mise en place. Les résultats sont regroupés dans le tableau suivant (cf. tableau 9).

Sans que la différence avec le témoin (papier filtre seul) ne soit évaluée par un test statistique pour déterminer si l'écart observé est significatif, il est toutefois possible de comparer simplement les moyennes et les pourcentages du nombre de passages pour chaque huile essentielle et chaque dilution.

**Tableau 9 : Tableau regroupant le nombre moyen de passages des nymphes d'*I. ricinus* parmi les 40 nymphes, pour chaque produit étudié et pour chaque dilution**

	0,1 %	1 %	2 %	5 %	Papier filtre seul
<i>Corymbia citriodora</i> (Eucalyptus citronné)	25,25	15,75	4,5	4,25	/
<i>Lavandula angustifolia</i> (Lavande fine)	16	10,75	12	7,6	/
<i>Melaleuca alternifolia</i> (Arbre à thé)	24,25	33,75	11,25	8	/
<i>Pelargonium graveolens</i> (Géranium rosat)	30,5	19	8,25	1,5	/
<i>Rosmarinus officinalis</i> (Romarin officinal)	35	22,5	35,5	22,5	/

DEET	15,75	6,75	2,75	0	/
Papier filtre seul	/	/	/	/	26

On observe que la moyenne du nombre de passages par réplicat diminue à mesure que la concentration du DEET augmente, jusqu'à atteindre « aucun passage » à partir de la dilution à 5 %.

Pour les huiles essentielles de *Corymbia citriodora* (Eucalyptus citronné), et de *Pelargonium graveolens* (Géranium rosat), on observe une décroissance similaire du nombre moyen de passages à celle observée pour le DEET, même si ces huiles essentielles ne réduisent pas le nombre de passages à zéro comme le DEET à la dilution 5 %.

Pour *Lavandula angustifolia* (Lavande fine) la moyenne du nombre de passages au-dessus de la barrière chimique oscille autour de 10 passages, quelle que soit la dilution. C'est bien inférieur au nombre de passages observés sur les autres huiles essentielles, à forte dilution (0,1 % ; 1 %).

Pour *Melaleuca alternifolia* (Arbre à thé), la moyenne du nombre de passages des nymphes au-dessus de la barrière chimique est important sur les dilutions 0,1 % et 1 % (respectivement 24,25 et 33,75 passages). Pour les dilutions 2 % et 5 %, le nombre moyen de passages au-dessus de la barrière chimique chute drastiquement : 11,25 et 8 passages.

Enfin, pour *Rosmarinus officinalis* (Romarin officinal), le nombre moyen de passages des nymphes au-dessus de la barrière chimique reste élevé (35 et 22,5 passages) quelle que soit la dilution. On n'observe pas de décroissance du nombre moyen de passages au-dessus de la barrière chimique avec l'augmentation de la concentration de l'huile essentielle.

### **E. Comparaison des résultats des huiles essentielles avec ceux du DEET quant au nombre de nymphes passant la barrière chimique**

Il est possible de comparer subjectivement les pourcentages du nombre de nymphes ayant traversé la barrière chimique dans notre expérience afin de dire qu'il y a, dans cette expérience, plus ou moins de répulsion des nymphes avec l'un ou l'autre des produits. Pour ce faire, on peut utiliser le tableau suivant (Tableau 10) obtenu en calculant un pourcentage à partir du nombre de nymphes d'*I. ricinus* n'ayant pas franchi la barrière chimique et en prenant le nombre total de nymphes utilisées dans l'expérience, tous réplicats confondus (soit 40 nymphes). Ces pourcentages ne tiennent pas compte du témoin négatif et ne permettent que de comparer subjectivement les huiles essentielles au DEET.

**Tableau 10 : Tableau du pourcentage de nymphes d'*I. ricinus* n'ayant pas franchi la barrière chimique, selon le produit testé et la dilution utilisée (NB : 100 % = 40 individus)**

%	0,1 %	1 %	2 %	5 %
<i>Corymbia citriodora</i> (Eucalyptus citronné)	20	12,5	65	65
<i>Lavandula angustifolia</i> (Lavande fine)	10	40	70	65
<i>Melaleuca alternifolia</i> (Arbre à thé)	10	2,5	55	47,5
<i>Pelargonium graveolens</i> (Géranium rosat)	15	20	42,5	85
<i>Rosmarinus officinalis</i> (Romarin officinal)	7,5	15	5	15
DEET	22,5	52,5	72,5	100

On observe que pour la dilution 0,1 %, c'est l'huile essentielle de *Corymbia citriodora* (Eucalyptus citronné) et le DEET qui ont le plus fort pourcentage de nymphes n'ayant pas franchi la barrière chimique (respectivement 20 et 22,5 %).

Pour la dilution 1 %, c'est l'huile essentielle de *Lavandula angustifolia* (Lavande fine) qui a le plus fort pourcentage de nymphes n'ayant pas franchi la barrière chimique (40 %) avec le DEET (52,5 %). Les autres huiles essentielles restent sur des pourcentages de nymphes n'ayant pas franchi la barrière chimique assez bas (20 % pour *Pelargonium graveolens* (Géranium rosat), moins de 15 % pour les autres).

Pour la dilution 2 %, l'huile essentielle de *Lavandula angustifolia* (Lavande fine) a un pourcentage de nymphes n'ayant pas traversé la barrière chimique presque aussi important que le DEET (70 % contre 72,5 % pour le DEET). *Corymbia citriodora* (Eucalyptus citronné) a 65 % de nymphes n'ayant pas traversé la barrière chimique. Pour les autres huiles essentielles, il y a moins de 50 % des nymphes qui n'ont pas traversé la barrière chimique.

Pour la dilution 5 %, le DEET atteint 100 % de nymphes n'ayant pas traversé la barrière chimique. L'huile essentielle de *Pelargonium graveolens* (géranium rosat) atteint un taux de 85 % des nymphes n'ayant pas franchi la barrière chimique. *Corymbia citriodora* (Eucalyptus citronné) et *Lavandula angustifolia* (Lavande fine) atteignent 65 % de nymphes n'ayant pas traversé la barrière chimique.

## F. Comparaison des résultats des huiles essentielles entre elles

Pour comparer les huiles essentielles entre elles, et ainsi voir laquelle est la plus efficace pour empêcher les nymphes de traverser la barrière chimique, il est possible de comparer les OR calculés entre eux. Plus l'OR s'éloigne de 1, plus le fait, pour les nymphes, de ne pas traverser la barrière chimique était fréquent en présence d'huile essentielle plutôt qu'en présence de papier filtre seul. On pourra donc établir un classement des huiles essentielles dans cette thèse, et sous ces modalités, mais il n'est pas possible de faire de l'inférence<sup>1</sup> dans les conditions de l'expérience. Ce classement est représenté dans le tableau ci-après.

**Tableau 11 : Tableau montrant les huiles essentielles et leurs dilutions triées en fonction de l'OR (par ordre croissant) obtenu suite à la réalisation du test du Chi<sup>2</sup> sur le nombre de nymphes ayant traversé la barrière chimique**

HE	Dilution	p-value	p <sub>corr</sub>	OR
<i>M. alternifolia</i> (Arbre à thé)	1 %	0,108	0,324	0,15
<i>R. officinalis</i> (Romarin officinal)	2 %	0,263	1,05	0,3
<i>R. officinalis</i> (Romarin officinal)	0,10 %	0,481	1	0,46
<i>L. angustifolia</i> (Lavande fine)	0,10 %	0,498	0,996	0,63
<i>M. alternifolia</i> (Arbre à thé)	0,10 %	0,499	0,499	0,63
<i>C. citriodora</i> (Eucalyptus citronné)	1 %	0,745	erreur	0,81
<i>P. graveolens</i> (Géranium rosat)	0,10 %	1	erreur	1
<i>R. officinalis</i> (Romarin officinal)	1 %	1	erreur	1
<i>R. officinalis</i> (Romarin officinal)	5 %	1	erreur	1
<i>C. citriodora</i> (Eucalyptus citronné)	0,10 %	0,556	1	1,42
<i>P. graveolens</i> (Géranium rosat)	1 %	0,556	1	1,42
<i>L. angustifolia</i> (Lavande fine)	2 %	0,556	0,996	1,42
<i>M. alternifolia</i> (Arbre à thé)	2 %	0,108	0,324	2,43
<i>L. angustifolia</i> (Lavande fine)	1 %	0,012	0,036	3,78
<i>P. graveolens</i> (Géranium rosat)	2 %	0,007	0,021	4,19
<i>M. alternifolia</i> (Arbre à thé)	5 %	0,001	0,004	5,13
<i>L. angustifolia</i> (Lavande fine)	5 %	0,00039	0,0015	6,26
<i>C. citriodora</i> (Eucalyptus citronné)	2 %	5,01E-06	2,00E-05	10,52
<i>C. citriodora</i> (Eucalyptus citronné)	5%	5,01E-06	2,00E-05	10,52
<i>P. graveolens</i> (Géranium rosat)	5 %	3,82E-10	1,53E-09	32,11

Dans notre étude expérimentale, c'est l'huile essentielle de *Pelargonium graveolens* (Géranium rosat), à la dilution 5 % dans l'huile végétale de colza, qui a montré le plus d'effet répulsif sur les nymphes, toute huile essentielle et toute dilution confondue.

<sup>1</sup> C'est-à-dire : étendre nos résultats à l'ensemble de la population des nymphes d'*I. ricinus*.



## 4. Discussion

### A. Discussion autour du matériel et méthode

#### a. Choix des tiques

Nous avons choisi d'utiliser les nymphes de la tique *Ixodes ricinus* pour mener à bien nos expériences. Ce choix a été motivé par les caractéristiques d'*I. ricinus* (tique triphasique, télotrope et exophile) quant au choix de l'espèce (Migné, 2022). Le choix de la stase a été fait, car les nymphes sont plus facilement disponibles que les adultes : elles étaient disponibles en large nombre au sein du laboratoire d'étude (UMR BIPAR). De plus, elles sont petites, donc difficiles à détecter sur l'hôte, et peuvent être vectrices de maladies, car elles ont déjà réalisé un repas sanguin.

Le Tableau 4 récapitulant les informations des différents articles étudiant l'effet répulsif des huiles essentielles sur les tiques montre que, dans la majorité des articles lus, ce sont les nymphes qui sont la stase majoritairement utilisée pour les tests.

Pour aller plus loin, il serait intéressant de réaliser le même test sur des tiques adultes non gorgées et sur des larves, afin d'avoir une idée de l'effet de l'huile essentielle sur toutes les stases. De plus, *I. ricinus* n'est pas la seule espèce de tique présente en France : *Dermacentor reticulatus* et *Rhipicephalus sanguineus* sont deux espèces très présentes sur le sol métropolitain (Chabanne et Guillot, 2016). Il serait également intéressant d'étendre l'étude de l'effet répulsif des huiles essentielles à ces deux autres espèces de tiques.

#### b. Choix des huiles essentielles

Dans un souci d'économie et au vu du temps que nous avons pour réaliser la partie expérimentale de cette thèse, nous n'avons testé que 5 huiles essentielles parmi la vingtaine d'huiles essentielles présentées et testées dans la littérature étudiée pour la bibliographie. Il aurait pu être intéressant de choisir plutôt des huiles essentielles encore peu testées, ou jamais testées, afin d'enrichir les connaissances de la littérature au sujet de leur effet répulsif sur les tiques.

Avec plus de moyens et de temps, il aurait effectivement pu être intéressant de tester des huiles essentielles, issues de plantes poussant en France métropolitaine, dont l'effet répulsif n'a pas été testé sur les tiques comme par exemple la menthe verte (*Mentha spicata*), ou le thym officinal (*Thymus vulgaris*). Cela permettrait d'agrandir l'arsenal thérapeutique à notre disposition pour se protéger des tiques.

#### c. Choix de la méthode de test

Le protocole de test que nous avons choisi dans cette thèse n'est pas le protocole de test le plus répandu dans les articles consacrés à l'étude de l'effet répulsif des huiles essentielles. Toutefois, le test d'exploration horizontale présente plusieurs avantages qui nous ont conduit à le sélectionner plutôt qu'un autre.

En effet, le test d'exploration horizontale permet d'étudier le comportement des tiques en s'affranchissant de l'effet de saturation de l'air par les molécules odorantes des huiles essentielles, et de leur affinité pour le matériel sur lequel on essaye de les faire monter dans les tests d'escalade.

De plus, ce dispositif de test demande peu de matériel pour sa mise en place, ce matériel est peu cher et facile à installer.

Il aurait pu être intéressant de réaliser en parallèle un test d'escalade comme décrit par Carroll (Carroll, 1998), mais cela aurait modifié l'objectif de la thèse : nous aurions alors essayé de mettre en évidence que le test d'exploration horizontale donnait le même genre de résultats qu'un test d'escalade. Le but de cette thèse était d'étudier l'effet des huiles essentielles plutôt que de comparer deux tests. Il serait intéressant d'avoir une étude sur la comparabilité des différents tests utilisés pour quantifier la répulsivité d'un produit sur les tiques.

## **B. Analyse des résultats du test statistique du Chi<sup>2</sup>**

Dans la littérature, les protocoles de tests sont divers : on retrouve tous les tests tels que décrits dans la partie bibliographique de cet ouvrage. Les dilutions utilisées dans chaque article ne sont pas toujours clairement exprimées. De même la méthode d'obtention du pourcentage de répulsivité change d'un article à l'autre. Ces deux éléments sont souvent un frein à la compréhension des articles en première lecture.

### **a. *Corymbia citriodora* (Eucalyptus citronné)**

Lors des expériences que nous avons réalisées au sein du laboratoire de l'UMR BIPAR dans le cadre de ma thèse vétérinaire, nous avons utilisé une huile essentielle de *Corymbia citriodora* (Eucalyptus citronné) riche en citronnellal (70,56 %). Cette huile essentielle montre un effet répulsif significatif sur les nymphes d'*I. ricinus* à partir de la dilution à 2 %. À la dilution 2 %, comme à la dilution 5 % : 65 % des 40 nymphes testées ne passent pas la barrière chimique. Dans la littérature, nous avons pu trouver les résultats suivants :

Dans l'article de Jaenson (Jaenson *et al.*, 2006), la composition chimique de l'huile essentielle de *Corymbia citriodora* (Eucalyptus citronné) n'est pas indiquée. L'effet répulsif de l'huile essentielle de *Corymbia citriodora* (Eucalyptus citronné) n'est testé qu'à une dilution de 30 %, ce qui est largement supérieur à la dilution utilisée dans notre étude. Le test utilisé est le test d'escalade dans un tube de centrifugation. Elle montre une répulsivité de 100 % : aucune nymphe d'*I. ricinus* ne passe sur la zone traitée.

L'article de Thorsell (Thorsell *et al.*, 2006) ne mentionne pas la composition chimique de l'huile essentielle de *Corymbia citriodora* (Eucalyptus citronné) utilisée, bien qu'il soit indiqué que les huiles essentielles testées ont été analysées par chromatographie sur couche fine. L'article teste une solution d'huile essentielle de 10%. Le protocole utilisé est le protocole d'exploration sur boîte de Pétri tel que décrit dans la première partie de cette thèse. L'article montre qu'une solution de 10 % d'huile essentielle de *Corymbia citriodora* (Eucalyptus citronné) n'a aucune répulsivité après 4 h. Nous ne savons pas, à la lecture de l'article, quelle variété d'Eucalyptus a été utilisée pour réaliser l'expérience, donc nous ne pouvons pas conclure sur un effet du chémotype de

l'huile essentielle utilisée pour expliquer la différence des résultats observés. De plus, l'expérience se focalise sur la longévité d'un éventuel effet répulsif. Ainsi, le pourcentage de répulsivité indiqué dans l'article est obtenu après 4h d'exposition, quand nous n'avons une durée d'expérience que de 30 minutes. Il est donc difficile de comparer les résultats obtenus entre les deux expériences. Il est cependant possible de penser que l'huile essentielle de *Corymbia citriodora* (Eucalyptus citronné) perd rapidement son effet répulsif dans les heures suivant son application.

Nous pouvons en conclure qu'à partir de la dilution 2 %, nous parvenons à obtenir un effet répulsif sur les nymphes d'*I. ricinus*, sur les 30 minutes d'observation que dure l'expérience conformément au protocole que nous avons mis en place. Il serait intéressant de poursuivre avec des tests de rémanence (en augmentant le temps d'observation du comportement des nymphes) pour rejoindre les conclusions de l'article de Thorsell. De plus, notre expérience permet de montrer qu'il n'y a pas besoin de solutions fortement concentrées en huile : une solution à 2 % suffit pour obtenir un effet répulsif par rapport à l'absence de produit sur la barrière chimique.

### **b. *Lavandula angustifolia* (Lavande fine)**

Nous avons utilisé une huile essentielle de *Lavandula angustifolia* (Lavande fine) composée de 27,62 % de linalol. On observe que les résultats obtenus sont significatifs pour les dilutions 1 % et 5 %, mais pas pour la dilution 2 %. L'absence de résultats significatifs pour la dilution 2 % pose question, d'autant plus que la « *p-value* » et le  $p_{corr}$  obtenus pour la dilution 2 % sont assez proches de ceux obtenus pour la dilution à 0,1 %. Ce résultat peut s'expliquer par la variabilité individuelle des nymphes. En effet, ce ne sont pas les mêmes nymphes qui ont été utilisées pour les expériences avec les dilutions 0,1 %, 1 %, 2 % et 5 %. Certaines des nymphes utilisées pour la dilution 2 % étaient peut-être moins sensibles à l'effet répulsif de l'huile essentielle de *Lavandula angustifolia* (Lavande fine) que les nymphes utilisées pour la dilution 1 %.

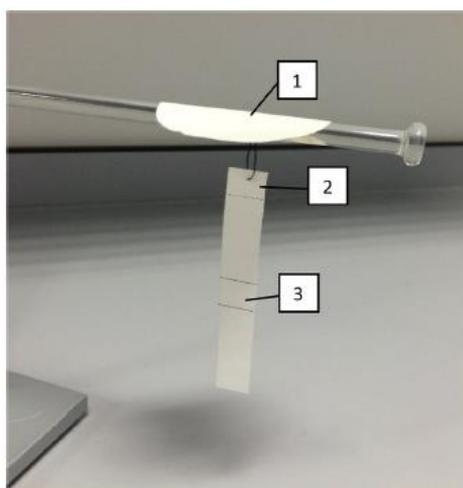
L'article de Kröber (Kröber *et al.*, 2013) n'indique pas le chémotype de l'huile essentielle de *Lavandula angustifolia* (Lavande fine) utilisée. L'article met en évidence une action de l'huile essentielle de *Lavandula angustifolia* (Lavande fine) dès une dilution dite de 0,01 % (mg/cm<sup>2</sup>) avec un protocole d'exploration sur verre thermostaté. Cette concentration de principe actif par centimètres carrés est supérieure à celle que nous avons testée (2 µL/cm<sup>2</sup>). De plus, dans l'article, il n'est pas fait mention de la composition chimique de l'huile essentielle de *Lavandula angustifolia* (Lavande fine) utilisée : le détail de la chromatographie n'est pas indiqué. Il est donc difficile de comparer avec la composition de l'huile essentielle utilisée dans notre expérimentation. Ces différents paramètres peuvent jouer sur les différences de résultats observées.

L'article de Jaenson (Jaenson *et al.*, 2006) ne mentionne pas le chémotype de l'huile essentielle de *Lavandula angustifolia* (Lavande fine) utilisée. L'article obtient un pourcentage de répulsivité de 55 % avec une solution de 1 % d'huile essentielle de *Lavandula angustifolia* (Lavande fine) et un pourcentage de répulsivité de 100 % avec une solution à 30 % d'huile essentielle de *Lavandula angustifolia* (Lavande fine). Le protocole utilisé est le protocole d'escalade dans un tube à essai tel que décrit dans la partie bibliographique de cette thèse. Dans notre étude, à 1 % de dilution, nous obtenons 40 % de nymphes qui ne passent pas la barrière chimique lorsque de l'huile essentielle de *Lavandula angustifolia* (Lavande fine) est présente sur la barrière chimique. Cette différence de répulsivité peut s'expliquer par le protocole de test utilisé dans l'article. Bien que les parois du tube de centrifugation soient perforées de petits trous afin de prévenir la saturation du milieu par les molécules odorantes de l'huile essentielle testée, on peut

penser que le milieu reste plus fermé que dans notre protocole expérimental ouvert. Cela peut expliquer que l'air du test dans un tube de centrifugation soit plus saturé en huile essentielle que l'air de la pièce où ont lieu nos expériences. De plus, la quantité d'huile essentielle déposée sur la zone de test est de 50  $\mu\text{L}$ , ce qui donne une concentration finale supérieure de celle utilisée dans notre protocole. En effet, nous avons appliqué 10  $\mu\text{L}$  de solution sur 5  $\text{cm}^2$  de papier filtre (2  $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ ). Cela peut concourir à avoir un pourcentage de répulsivité plus important à la même dilution entre l'article de Jeanson et notre expérience.

L'article de Goode (Goode *et al.*, 2018) n'indique pas la composition chimique de l'huile essentielle de *Lavandula angustifolia* (Lavande fine) utilisée. L'article obtient un pourcentage de répulsivité de 90 % avec une solution de 5 % d'huile essentielle. Cet article utilise une méthode d'escalade sur papier filtre, en milieu ouvert (comparable au test d'escalade de Carroll (Carroll, 1998)). La quantité d'huile essentielle appliquée sur le papier filtre est de 10  $\mu\text{L}$ . L'huile essentielle est appliquée sur « la fin du papier filtre » (cf. Figure 31) ce qui représente 1  $\text{cm}^2$  d'après l'article (Goode *et al.*, 2018). La concentration finale obtenue (10  $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ ) est donc supérieure à celle obtenue dans notre cas (2  $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ ). Cette différence de concentration peut expliquer la différence de pourcentage de répulsivité observée (65 % de répulsivité dans notre expérience pour 5 % d'huile essentielle de *Lavandula angustifolia* (Lavande fine) contre 90 % dans l'article).

**Figure 32 : Photo du montage utilisé dans l'article de Goode (Goode *et al.*, 2018)**



- 1 : solution de sébum de chien utilisé comme attractif ;
- 2 : zone traitée avec le produit testé.
- 3 : zone de dépôt des nymphes d'*I. ricinus*.

Dans notre expérience, les résultats obtenus avec l'huile essentielle de *Lavandula angustifolia* (Lavande fine) sont peu cohérents. On se serait plutôt attendu à avoir un effet répulsif significatif de la dilution 2 % si la dilution à 1 % avait un effet répulsif significatif. Or, ce n'est pas le cas. Cette différence peut s'expliquer par une variabilité individuelle des nymphes testées. Autrement, pour les solutions à 1 % et à 5 %, l'effet répulsif est significatif, la différence observée avec la littérature provient majoritairement d'une différence de concentration surfacique. Cela montre qu'en augmentant cette concentration surfacique, on peut, à priori, augmenter le pourcentage de répulsivité.

### **c. *Melaleuca alternifolia* (Arbre à thé)**

L'huile essentielle de *Melaleuca alternifolia* (Arbre à thé) utilisée dans notre étude possède 41,51 % de Terpinèn-4-ol. Elle montre un effet répulsif significatif à partir de 5 % de dilution.

L'article de Yim (Yim *et al.*, 2016) utilise une huile essentielle de *Melaleuca alternifolia* (Arbre à thé) ayant un taux de terpinèn-4-ol de 40,8 %. L'article teste l'effet de l'huile essentielle de *Melaleuca alternifolia* (Arbre à thé) sur les tiques *Rhipicephalus australis* grâce à un test d'escalade réalisé sous dessiccateur. Dans l'article, l'huile essentielle de *Melaleuca alternifolia* (Arbre à thé) est complexée avec de la cyclodextrine afin d'augmenter sa dispersion dans l'eau. Les dilutions testées sont 0,5 %, 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, et 5 %. 300 µL de solution testée sont appliqués sur 180 mg de poils de vache. L'effet répulsif de l'émulsion est observé pendant plusieurs heures (jusqu'à 15 jours). Après 2 h de test, l'ensemble des dilutions testées présente plus de 60 % de répulsivité. Les résultats obtenus dans notre expérience ne sont pas comparables avec les résultats de l'article. Il n'est pas possible de comparer la quantité d'huile présente par centimètres carrés entre les deux expériences, car nous ne connaissons pas la surface que représente 180 mg de poils de vache. De plus, ce ne sont pas les mêmes tiques qui sont utilisées entre les deux expériences, et il est possible que les tiques de l'espèce *Rhipicephalus australis* soient plus sensibles que les nymphes d'*Ixodes ricinus* à l'huile essentielle de *Melaleuca alternifolia* (Arbre à thé).

Dans l'article de Iori (Iori *et al.*, 2005) l'huile essentielle testée est composée de 42 % de terpinen-4-ol. L'article teste l'effet acaricide de l'huile essentielle de *Melaleuca alternifolia* (Arbre à thé) sur les nymphes d'*I. ricinus* avec un test d'inhalation de l'huile essentielle. Ce test n'a pas été détaillé dans cette thèse, car il s'agit d'un protocole visant à établir un effet toxique, et que nous nous intéressons ici à l'effet répulsif. Il a toutefois été choisi de garder cet article au vu du faible nombre d'articles dans la littérature s'intéressant à l'effet répulsif de *Melaleuca alternifolia* (Arbre à thé) sur les tiques. L'article montre qu'il y a un effet létal pour 70 % des nymphes lorsque 8 µL d'huile essentielle de *Melaleuca alternifolia* (Arbre à thé) est placé sur le coton. Ce sont 80 % des nymphes qui meurent lorsque 10 µL de *Melaleuca alternifolia* (Arbre à thé) sont placés sur le coton. L'huile essentielle testée dans l'article possède une concentration en terpinen-4-ol comparable à celle de l'huile essentielle que nous avons testée. Les résultats obtenus dans cet article ne sont pas comparables avec les résultats obtenus dans notre expérience, le but recherché n'étant pas identique.

Malgré les difficultés à comparer nos résultats avec l'article de Yim, ou avec l'article de Iori, qui traite plus de l'activité acaricide de l'huile essentielle de *Melaleuca alternifolia* (Arbre à thé), il est possible de dire qu'à partir de 5 % d'huile essentielle dans une solution d'huile végétale de colza, avec une concentration surfacique de 2 µL/cm<sup>2</sup>, il y a une action répulsive sur les nymphes d'*I. ricinus*.

### **d. *Pelargonium graveolens* (Géranium rosat)**

L'huile essentielle de *Pelargonium graveolens* (Géranium rosat) montre un effet répulsif significatif à partir de la dilution 2 %. L'huile essentielle que nous avons utilisée est riche en Citronellol (34,102 %) et en Géraniol (13 %).

L'article de Thorsell (Thorsell *et al.*, 2006) n'indique pas la composition chimique de l'huile essentielle de *Pelargonium graveolens* (Géranium rosat) utilisée. L'article teste une solution d'huile essentielle diluée à 10 % dans de l'éthanol. Le protocole utilisé est le protocole d'exploration sur boîte de Pétri. Au bout de 4 h, la position des nymphes est relevée. Aucune répulsion des nymphes n'est alors observée. Notre expérience s'étale sur un temps plus court (30 minutes). On peut penser que l'huile essentielle de *Pelargonium graveolens* (Géranium rosat) perd son effet répulsif dans les quelques heures qui suivent l'application.

L'article de Jaenson (Jaenson *et al.*, 2006) n'indique pas la composition chimique de l'huile essentielle de *Pelargonium graveolens* (Géranium rosat) utilisée. L'article obtient un pourcentage de répulsivité de 61 % avec une solution d'huile essentielle de *Pelargonium graveolens* (Géranium rosat) à 1 %, et de 100 % avec une solution à 30 %. Le protocole utilisé est le test d'escalade dans un tube de centrifugation. La réduction du nombre de nymphes franchissant la barrière chimique obtenue dans notre test, à une dilution de 1 %, n'est pas significative par rapport au nombre de nymphes franchissant la barrière chimique en l'absence de produit sur le papier filtre. Cette différence entre la littérature et nos résultats peut s'expliquer par le protocole de test utilisé dans l'article. Bien que les parois du tube de centrifugation soient perforées de petits trous afin de prévenir la saturation du milieu par les molécules odorantes de l'huile essentielle testée, on peut penser que le milieu reste plus fermé que dans notre protocole expérimental ouvert. Cela peut expliquer que l'air du test dans un tube de centrifugation soit plus saturé en huile essentielle que l'air de la pièce où ont lieu nos expériences. De plus, la quantité d'huile essentielle déposée sur la zone de test est de 50  $\mu\text{L}$ , ce qui donne une concentration finale de 7,5  $\mu\text{L}/\text{cm}^2$  environ. Cette concentration est plus importante que celle utilisée dans notre protocole (soit 2  $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ ). Cela peut concourir à avoir un pourcentage de répulsivité plus important à la même dilution dans l'article de Jaenson que dans notre expérience.

Nous pouvons conclure de ces observations qu'une action répulsive est certainement présente avec l'huile essentielle de *Pelargonium graveolens* (Géranium rosat) à partir de la dilution 2 %, à condition d'augmenter la quantité de solution appliquée sur la barrière chimique. De plus, une étude de rémanence serait intéressante pour rejoindre ou non les conclusions de l'article de Thorsell.

#### **e. *Rosmarinus officinalis* (Romarin officinal)**

L'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* (Romarin officinal) que nous avons utilisée est riche en  $\alpha$ -pinène (22,7%), en camphre (18,7 %) et en eucalyptol (1,8-cineole) (18,26 %). L'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* (Romarin officinal) ne montre aucun résultat significatif. Il n'y a donc aucune différence entre l'utilisation d'huile essentielle et l'absence d'utilisation de produit sur le papier filtre : la même proportion de nymphes traverse la barrière.

Ce résultat diffère de ce qui est observé dans la littérature. En effet, sur deux articles, on observe un pourcentage de répulsivité de 100 % dans les études menées ((El-Seedi *et al.*, 2012), (Elmhalli *et al.*, 2019)).

Dans l'article d'El-Seedi (El-Seedi *et al.*, 2012), l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* (Romarin officinal) a une teneur en 1,8-cineole est de 51,8 % (contre 18,26 % pour l'huile essentielle que nous avons testée dans notre protocole). La dilution de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* (Romarin officinal) n'est pas indiquée dans l'article, mais on sait que la

concentration finale obtenue sur le tissu est de 7,5  $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ . Le test utilisé est un test d'escalade dans un tube de centrifugation. Le pourcentage de répulsivité obtenu est de 100 %. Cette différence de répulsivité avec nos observations (absence de résultat significatif dans notre expérience) peut s'expliquer de plusieurs manières. La concentration finale obtenue dans l'article (7,5  $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ ) est plus élevée que la concentration testée dans notre étude (2  $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ ). La teneur en 1,8-cineole est plus élevée dans l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* (Romarin officinal) de l'article que dans celle que nous avons utilisée pour nos tests. Enfin, bien que les parois du tube de centrifugation soient perforées de petits trous, il est possible de penser que l'air dans le tube de centrifugation soit plus saturé en molécules odorantes que l'air de la pièce où nous avons conduit nos expériences. Cela peut également jouer un rôle sur la différence d'effet observé.

Dans l'article de Elmhalli (Elmhalli *et al.*, 2019), l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* (Romarin officinal) a une teneur en 1,8-cineole est de 26,76 % (contre 18,26 % pour l'huile essentielle que nous avons testée dans notre protocole). La dilution de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* (Romarin officinal) n'est pas indiquée dans l'article, mais on sait que la concentration finale obtenue sur le papier filtre est de 1  $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ . Le protocole utilisé est un test d'évitement sur boîte de Pétri, en milieu ouvert. Le pourcentage de répulsivité obtenu est de 100 %. La concentration finale de l'huile essentielle dans l'article (1  $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ ) est moins importante que dans notre étude (2  $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ ). Les différences de résultats entre l'article et nos observations peuvent s'expliquer par une différence de composition chimique des huiles essentielles testées, ou par une variation individuelles des nymphes d'*I. ricinus* étudiées.

L'article de Soutar (Soutar *et al.*, 2019), n'indique pas le chémotype de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* (Romarin officinal) utilisée. L'article, qui teste l'action répulsive de *Rosmarinus officinalis* (Romarin officinal) à la dilution 5 % par rapport à l'éthanol (solvant utilisé pour l'expérience) et au DEET dans une expérience sur textile en milieu ouvert, ne montre aucun effet significatif de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* (Romarin officinal) par rapport à l'utilisation de DEET. Cette expérience diffère totalement du protocole expérimental utilisé dans notre étude. Toutefois, cet article montre qu'en plein air, l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* (Romarin officinal) n'a pas d'effet répulsif sur les tiques de la zone testée (majoritairement des tiques de l'espèce *I. ricinus*).

Avant de conclure définitivement à l'absence d'efficacité de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* (Romarin officinal), il serait intéressant de refaire l'expérience en augmentant la concentration surfacique de la solution testée.

#### **f. DEET**

Le DEET montre des résultats significatifs dès la dilution 1 % par rapport à l'utilisation du papier filtre seul. Cela nous conforte avec l'idée que ce produit soit utilisé comme témoin positif dans de nombreuses expériences. Dans de nombreuses publications, le DEET est utilisé à une dilution de 20 % (Le Mauff, 2021). Cette expérience permet donc de montrer que le DEET, même utilisé à un pourcentage plus faible, donne des résultats significatifs pour repousser les nymphes.

De plus, cette expérience avec le DEET montre que les nymphes utilisées dans nos expériences sont sensibles au DEET, comme les nymphes utilisées dans les expériences de la littérature : elles sont repoussées par le DEET.

### **g. Pour résumer**

En conclusion de cette partie visant à comparer les résultats obtenus avec les résultats décrits dans la littérature, il semble important de souligner que différents paramètres diffèrent entre le protocole utilisé et la littérature. En effet, la méthode de test utilisée ici est un test d'exploration horizontale, en milieu ouvert afin de prévenir la saturation du milieu. Le fait que le milieu soit ouvert peut réduire l'impact de l'huile essentielle sur les nymphes, et donc limiter l'effet répulsif. De plus, la concentration surfacique utilisée dans ces expériences est particulièrement faible, cela peut expliquer que les résultats obtenus en termes de pourcentage de répulsivité soient systématiquement inférieurs à ceux des articles étudiés.

## **C. Réduction du nombre moyen de passages au-dessus de la barrière chimique**

Bien que non testé formellement dans cette thèse, le nombre de passages (tous individus confondus) comptabilisé lors de l'analyse des vidéos permet d'obtenir un tableau du nombre moyen de passages des nymphes d'*I. ricinus* par réplicat, pour chaque produit testé et pour chaque dilution, présenté dans la partie « Résultats » (cf. Tableau 9). Cette donnée, bien qu'intéressante, n'est pas éprouvée avec des tests statistiques, car le but de cette thèse est d'avoir « aucune nymphe qui passe » donc de réduire au maximum le nombre de nymphes qui passent par-dessus la barrière chimique. Il est toutefois possible de comparer le nombre moyen de passages au-dessus de la barrière chimique avec huile essentielle, au nombre moyen de passages au-dessus de la barrière chimique en l'absence d'huile essentielle.

Pour les huiles essentielles de *Corymbia citriodora* (Eucalyptus citronné), et de *Pelargonium graveolens* (Géranium rosat), on observe la même décroissance du nombre moyen de passages des nymphes par réplicat avec l'augmentation de la quantité de principes actifs dans la solution testée. Pour *Corymbia citriodora* (Eucalyptus citronné), le nombre moyen de passages des nymphes au-dessus de la barrière chimique est de 15,75 passages à la dilution 1 %. Par rapport au nombre moyen de passages avec du papier filtre seul (26 passages en moyenne), cela représente une réduction d'environ 40 %. La réduction se poursuit à la dilution 2 % (4,5 passages en moyenne), soit une réduction d'environ 83 % des passages par rapport à du papier filtre seul. Pour *Pelargonium graveolens* (Géranium rosat), la réduction du nombre moyen de passages des nymphes au-dessus de la barrière chimique est d'environ 26 % à la dilution 1 % par rapport au papier filtre seul. Le nombre moyen de passages est réduit de 68 % à la dilution 2 %, par rapport au nombre moyen de passages des nymphes sur le papier filtre seul. Pour la dilution 5 %, la réduction du nombre moyen de passages est de 94 % par rapport au papier filtre seul. Il est donc possible de conclure que, dans notre étude, il y a un effet barrière de ces produits testés : ils réduisent le nombre moyen de fois où les nymphes franchissent la barrière chimique pendant la durée de l'expérience, par rapport au nombre moyen de passages au-dessus du papier filtre en l'absence de produit.

Pour les huiles essentielles de *Lavandula angustifolia* (Lavande fine) et de *Melaleuca alternifolia* (Arbre à thé), on observe une vraie réduction (respectivement de 53 % et de 56 %) du nombre de passages par réplicat à partir de la dilution 2 % par rapport au nombre de passages moyen de nymphes sur du papier filtre seul. Cette diminution apparaît dès la dilution 1 % pour

l'huile essentielle de *Lavandula angustifolia* (Lavande fine). Ces résultats montrent que, dans notre étude, même si l'action répulsive de ces huiles essentielles n'est pas toujours significative, elles ont toutefois un effet sur la réduction du nombre moyen de passages par réplicat des nymphes au-dessus de la barrière chimique.

Pour l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* (Romarin officinal) le nombre de passages moyen par réplicat est semblable à celui obtenu avec le papier filtre seul. Il n'y a donc pas d'effet barrière dans les conditions de notre étude.

#### **a. Comparaison des résultats des huiles essentielles avec ceux du DEET**

Lorsque l'on cherche un nouveau produit ou traitement pour remplacer un traitement de référence, déjà établi, il faut commencer par montrer que le nouveau produit que l'on souhaite utiliser a un effet. C'est ce que nous avons montré dans cette thèse. La seconde étape, est de montrer que le nouveau produit est au moins aussi efficace que le produit de référence, ici, le DEET. Pour montrer cela, il faudrait utiliser un test de non-infériorité afin de montrer que les huiles essentielles ne font pas moins bien que le DEET. Ce n'était pas le but de cette thèse. De plus, cela n'est pas réalisable dans le cadre du travail réalisé ici, car les individus ne sont pas indépendants (Elie *et al.*, 2008).

Le tableau regroupant le pourcentage de nymphes d'*I. ricinus* n'ayant pas franchi la barrière chimique, selon le produit testé et la dilution utilisée est présenté Tableau 10 dans la partie « Résultats ».

Pour la dilution 0,1 %, il y a le même pourcentage de nymphes d'*I. ricinus* qui ne passent pas la barrière chimique avec l'huile essentielle de *Corymbia citriodora* (Eucalyptus citronné) qu'avec le DEET : 20 %. Les autres huiles essentielles ont un pourcentage de répulsivité moins important que le DEET. Ces pourcentages vont de 7,5 % à 15 %. Dans notre étude, pour la dilution de 0,1 %, l'huile essentielle de *Corymbia citriodora* (Eucalyptus citronné) fait aussi bien que le DEET. Ce résultat doit toutefois prendre en compte qu'aucun de ces deux produits est significativement plus efficace que le papier filtre seul.

Pour la dilution 1 %, le DEET présente un taux de plus de 50 % de répulsivité. Les autres huiles essentielles sont loin derrière, avec l'huile essentielle de *Lavandula angustifolia* (Lavande fine) qui présente le taux de répulsivité le plus haut des huiles essentielles étudiées. Le taux de répulsivité de *Lavandula angustifolia* (Lavande fine) n'atteint que 40 %, ce qui peut être considéré comme insuffisant pour garantir une protection efficace contre les nymphes d'*I. ricinus* pour un usage courant.

Pour la dilution 2 %, l'huile essentielle de *Lavandula angustifolia* (Lavande fine) présente le même pourcentage de répulsivité que le DEET (70 %). L'huile essentielle de *Corymbia citriodora* (Eucalyptus citronné) est assez proche du DEET avec un pourcentage de répulsivité de 65 %.

Pour la dilution 5 %, le DEET présente un taux de 100 % de répulsivité. C'est l'huile essentielle de *Pelargonium graveolens* (Géranium rosat) qui se rapproche le plus de son pourcentage de répulsivité (85 %).

Dans les expérimentations menées dans le cadre de cette thèse, les huiles essentielles (toute huile essentielle confondue) ne sont pas plus efficaces que le DEET, toutefois, elles peuvent approcher son effet répulsif, selon l'huile essentielle testée, et selon la dilution utilisée.

### **b. Comparaison des résultats des huiles essentielles entre elles**

Le tableau 11 présenté dans la partie « Résultats » présente la classification des huiles essentielles et de leur dilution, triées par OR croissant. En effet, plus l'OR s'éloigne de 1, plus le fait, pour les nymphes, de ne pas traverser la barrière chimique était fréquent en présence d'huile essentielle plutôt qu'en présence de papier filtre seul. Ces résultats ne sont valables que dans notre étude.

On observe que dans notre étude, sous les conditions dans lesquelles ont été menées nos expériences, c'est l'huile essentielle de *Pelargonium graveolens* (Géranium rosat) à 5 % qui empêche le plus les nymphes d'*I. ricinus* de passer la barrière chimique, par rapport à la présence seule de papier filtre. Ensuite, ce sont les huiles essentielles de *Corymbia citriodora* (Eucalyptus citronné) à 5 %, puis 2 %, et enfin l'huile essentielle de *Lavandula angustifolia* (Lavande fine) à 5 % qui sont les plus efficaces à empêcher les nymphes de passer la barrière chimique, par rapport à l'absence de produit sur le papier filtre.

Dans les conditions de l'expérience, il n'est cependant pas possible de dire formellement que l'huile essentielle de *Pelargonium graveolens* (Géranium rosat) est plus efficace que l'huile essentielle de *Corymbia citriodora* (Eucalyptus citronné), car pour cela il faudrait réaliser des tests statistiques, et adapter le protocole d'expérimentation.

## **D. Discussion autour du protocole**

### **a. Non-indépendance des individus**

Lors des expériences, pour des raisons de disponibilité et de budget, ce sont les mêmes nymphes qui ont été utilisées d'un test d'huile essentielle à l'autre. De même pour l'expérience témoin avec le papier filtre seul. Les individus ne sont donc pas indépendants d'une série d'expériences à l'autre. Pour donner des résultats valables, la plupart des tests statistiques doivent être effectués sur des individus indépendants.

Le test de  $\chi^2$  utilisé pour vérifier l'effet répulsif de la présence d'une huile essentielle par rapport à l'utilisation de papier filtre seul comme barrière chimique sur le passage des nymphes d'*I. ricinus* demande l'indépendance des individus. Nous sommes ici dans une situation de non-indépendance. Il faut donc considérer avec précaution les résultats des tests statistiques effectués (donc le degré de signification « *p-value* ») (Desquilbet, 2020).

Pour corriger cela, il faudrait s'assurer, au cours des prochaines manipulations, que les individus soient bien indépendants les uns des autres et ainsi éliminer les individus utilisés après chacun des réplicats et chaque dilution. Cela augmente considérablement le nombre d'individus qu'il faut utiliser. En effet, nous avons à notre disposition 160 individus dans lesquels piocher et nous avons fait face à une mortalité importante dans les flasques, ce qui a fortement réduit ce nombre au cours des expériences. Pour conserver des individus indépendants, il faudrait 40

nymphes par dilution, avec 4 dilutions pour chacun des 6 produits testés. Cela représente 960 nymphes.

Une nouvelle expérimentation, ciblée sur les dilutions et les huiles essentielles ayant montré une première efficacité, pourrait permettre d'affiner le résultat, et de diminuer le nombre de nymphes nécessaires.

### **b. Biais d'association de l'étude statistique**

Un biais est un écart systématique entre la valeur de l'association<sup>2</sup> estimée à partir de notre échantillon et la valeur de l'association réelle dans la population cible (ici : l'ensemble des nymphes d'*I. ricinus*) (Desquilbet, 2021).

Les différents biais d'association que l'on peut discuter dans une étude sont le biais de confusion, le biais de sélection et le biais de classement (Desquilbet, 2020).

Le biais de confusion est un biais généré par des expositions non prises en compte dans l'expérience. Ici, une seule exposition a été prise en compte (la présence ou l'absence d'huile essentielle ou de DEET sur le papier filtre servant de barrière chimique). Le reste des paramètres de la pièce et de l'expérience sont identiques d'une série d'expériences à l'autre (hygrométrie, température, etc.). En effet, les expériences ont été réalisées sur une semaine, dans la même pièce, sous la même luminosité ambiante, la même hygrométrie et la même température (Desquilbet, 2020).

Ici, le biais de sélection ne devrait pas être présent : les nymphes ont été sélectionnées aléatoirement dans l'élevage de l'ANSES d'où elles sont originaires. Il ne devrait a priori pas avoir d'impact sur l'association entre l'exposition à l'huile essentielle et le passage ou l'absence de passage de la barrière chimique par les nymphes, en raison de leur mode de recrutement (Desquilbet, 2020).

Le biais de classement est le fait de classer à tort une nymphe comme repoussée ou non repoussée, ou comme exposée à un produit ou non exposée à un produit. Il peut être différentiel (c'est une erreur sur le classement « repoussée » ou « non repoussée » de la nymphe) ou non différentiel (c'est une erreur sur le classement « exposée » ou « non exposée » de la nymphe) (Desquilbet, 2020).

Ici, il est possible d'avoir un biais de classement différentiel. En effet, pour une dilution plus faible (5 % par exemple), il est envisageable d'avoir classé à tort une nymphe comme repoussée si elle passe plutôt sur le côté que sur la barrière elle-même. Pour pallier le biais de classement différentiel, il faudrait réaliser une analyse des vidéos « à l'aveugle ». C'est-à-dire qu'il faudrait que la personne qui analyse les vidéos ne sache pas quel produit et quelle dilution sont testés sur la vidéo qu'elle analyse. Cela n'a pas été fait ici pour des raisons de main d'œuvre non disponible. Une autre manière de pallier à cela serait de recourir à l'utilisation d'un logiciel d'analyse de vidéo, ce qui avait été envisagé en première solution dans ce travail, mais non réalisable du fait de la trop petite taille des nymphes.

---

<sup>2</sup> Association entre la réduction du nombre de nymphes qui passent par-dessus la barrière chimique et la présence d'huile essentielle

### **c. Affiner l'analyse des vidéos**

Pendant l'analyse des vidéos, il a été constaté que, malgré le soin apporté à la préparation de la plateforme et de la barrière chimique, il restait toujours une infime portion de scotch double face qui dépassait du papier, ou inversement, le papier dépassait du scotch. Cela crée respectivement une zone collante, ou une zone de cachette où les nymphes se figent. Il y a donc des nymphes qui ne sont pas restées en mouvement tout au long de la période d'observation. De même, certaines nymphes sont sorties de la plateforme et ont coulé au fond du réservoir d'eau. Ces nymphes n'ont donc pas été en mouvement (ou visible) tout le long de la période d'observation.

Nous avons pris le parti de considérer que ces différentes nymphes avaient eu l'occasion de traverser la barrière chimique si elles l'avaient souhaité. Toutes sont donc comptabilisées dans le décompte total des nymphes de l'expérience.

Une analyse perprotocole<sup>3</sup> pourrait permettre d'affiner les résultats observés. Par exemple, il serait intéressant de retirer de l'effectif total les tiques noyées ou collées au cours de l'expérience afin de ne garder que les tiques qui ont bougé tout du long.

### **d. Restrictions à une espèce et une stase de tique**

Au cours de cette thèse, nous ne nous sommes intéressés qu'à la stase nymphale de la tique *I. ricinus*. L'inférence statistique que nous pouvons réaliser grâce aux résultats du test du Chi<sup>2</sup> ne permet donc de conclure que sur cette stase et cette espèce de tique. Rigoureusement, il est donc impossible d'inférer l'efficacité des huiles essentielles sur les autres stases d'*I. ricinus*, ou sur les autres espèces de tiques présentes en France.

Pour rappel, la stase nymphale avait été choisie, car les nymphes sont nombreuses, petites (donc difficiles à détecter) et ont déjà eu un repas sanguin, elles sont donc plus à même de pouvoir transmettre un pathogène acquis lors du premier repas sanguin.

Bien qu'il soit raisonnable de penser que les larves et les adultes sont affectées de la même manière par les huiles essentielles, les concentrations efficaces ne sont certainement pas les mêmes : les larves sont beaucoup plus petites que les nymphes, mais les adultes sont plus grands, il peut donc y avoir nécessité d'utiliser une concentration plus importante de produit pour avoir le même effet répulsif.

Il serait intéressant de poursuivre les expérimentations en testant l'effet d'une même huile essentielle (et d'une même dilution) sur les différentes stases d'une espèce afin de vérifier son effet répulsif et les paramètres à ajuster pour obtenir cet effet.

De même, tester l'effet des huiles essentielles sur différentes espèces de tiques présentes en France pourrait permettre d'assurer une protection optimale aux utilisateurs d'un produit à base d'huile essentielle.

---

<sup>3</sup> Modification de la manière d'analyser les vidéos déjà réalisées

## E. Pour aller plus loin vers un produit à base d'huile essentielle commercialisable

Ce travail est le premier pas vers le projet de proposer aux propriétaires d'animaux une solution de lutte dite « naturelle » contre les tiques. Il nous a permis de tester quelques huiles essentielles qui semblaient prometteuses pour avoir une action répulsive contre les tiques. Toutefois, avant de pouvoir proposer une solution efficace contre les tiques, il reste de nombreuses étapes à parcourir.

Il faudrait affiner le choix des huiles essentielles. Comme vu dans une partie précédente (« Discussion autour du protocole »), le protocole utilisé dans cette thèse peut être amélioré pour augmenter la validité des résultats des tests statistiques en garantissant l'indépendance des individus. Il faut alors éliminer chaque individu déjà testé, afin de toujours utiliser un individu « naïf ». De plus, il faudrait étendre le test des huiles essentielles aux autres stases de la tique *I. ricinus*, voir à d'autres espèces de tiques fréquentes en France (*Dermacentor reticulatus*, et *Rhipicephalus sanguineus* par exemple) afin d'assurer une couverture optimale de la ou des huiles essentielles sélectionnées. Il pourrait également être intéressant de tester ces mêmes huiles essentielles en synergie afin d'augmenter leur pouvoir répulsif par exemple.

Il serait également intéressant de tester plusieurs autres huiles essentielles que nous n'avons pas pu tester dans cette étude. D'après notre travail bibliographique, les huiles essentielles de *Mentha spicata* (Menthe verte) (Goode *et al.*, 2018), *Thymus vulgaris* (Thym commun) (Goode *et al.*, 2018), *Origanum onites* (Origan grec) (Carroll *et al.*, 2017) mériteraient d'être testées, car les articles étudiées dans la bibliographie montrent un pourcentage de répulsivité de 100 % pour ces huiles essentielles.

Une fois l'huile essentielle (ou les huiles essentielles) choisie pour leur effet répulsif, il faudrait tester leur effet toxique sur les animaux. Dans cette thèse, ont été choisies des huiles essentielles dont la littérature ne rapportait pas de toxicité trop importante (sauf pour l'huile essentielle de *Maleleuca alternifolia* (Arbre à thé)). Toutefois, aucun essai n'a été formellement réalisé pour valider ou invalider cette toxicité dans ce travail. Il pourrait être intéressant de réaliser ces tests, en les couplant à la forme galénique choisie (spray ou collier imbibé d'huile essentielle par exemple), pour exposer les animaux et les tiques aux huiles essentielles sélectionnées.

Il faudrait ensuite mener des expériences *in vivo* en appliquant la forme galénique choisie directement sur un animal et voir si les tiques montent malgré tout sur l'animal, et y font un repas sanguin. Pour ce faire, le test *in vivo* tel que décrit dans l'article de Kröber (Kröber *et al.*, 2013) serait un bon point de départ. Dans l'article, le cobaye est humain. Un panel de 8 personnes est choisi, avec un ratio homme/femme identique. Une zone de peau est tondu, sur le haut de la cuisse. Une zone de test est délimitée au feutre, puis traitée avec le produit à tester. Au bout de 10 minutes, un disque de papier aluminium de 30 mm de diamètre est plaqué contre la peau, au centre de la zone traitée, en prenant garde que les bords soient bien adhérents à la peau. La jambe est maintenue à la verticale pendant toute l'expérience. Quinze minutes après l'application du produit à tester, les nymphes sont déposées au centre du cercle d'aluminium. Le comportement des nymphes est observé pendant 5 minutes. La présente thèse étant une thèse vétérinaire, il faudrait adapter le test *in vivo* tel que décrit précédemment pour les animaux. L'une des difficultés majeures serait de garantir l'immobilité des animaux testés, ainsi que la représentativité de l'échantillon d'individus sur lesquels seront menés les tests. En effet, un bouledogue et un berger allemand n'ont pas forcément la même peau et les tiques pourraient réagir différemment d'une

race à une autre (quelle que soit l'espèce étudiée). Il faudrait le prendre en compte dans les tests réalisés afin de s'assurer que l'inférence sera réalisable à l'issue des expérimentations.

Enfin, un test de rémanence de l'effet répulsif de l'huile essentielle (ou de la synergie) choisie serait un ajout intéressant. Cela permettrait de conseiller les propriétaires quant à la durée au bout de laquelle l'application du produit doit être renouvelée pour favoriser une protection efficace. Afin de tester la rémanence de l'effet répulsif de l'huile essentielle, il est possible d'augmenter la durée sur laquelle les tiques sont observées (30 minutes dans notre expérience). Cela semble toutefois difficile de tourner des vidéos de plusieurs heures, car le processus serait très chronophage, et les vidéos seraient très lourdes (problème de stockage), et très fastidieuses à analyser. Une autre option serait de laisser plus de temps entre le moment où l'huile essentielle est appliquée sur le papier filtre, et le moment où les nymphes sont posées sur la plateforme pour l'expérience. Dans notre étude, nous avons une durée de 20 minutes entre l'application du produit à tester sur le papier filtre, et le dépôt des nymphes sur la plateforme. Il pourrait être envisageable d'attendre par exemple 1h, 2h, 3h, et 4h entre l'application du produit sur le papier filtre et le dépôt des nymphes sur la plateforme. Cela permettrait de comparer la répulsivité de l'huile essentielle à 1h, 2h, 3h et 4h post-application et ainsi avoir une idée de la rémanence de l'effet répulsif.

Pour résumer, les différentes étapes qu'il reste à parcourir avant de pouvoir prétendre à commercialiser un produit à base d'huiles essentielles pour repousser les tiques, sont :

- Comparer les cinq huiles essentielles entre-elles en améliorant le protocole pour garantir l'indépendance des tiques et ainsi valider le tableau 11 de cette présente thèse.
- Tester de nouvelles huiles essentielles pour enrichir notre répertoire d'huiles essentielles répulsives.
- Tester les huiles essentielles sur d'autres espèces de tiques et d'autres stases.
- Réaliser des tests de toxicité des huiles essentielles retenues, sur les animaux domestiques visés (chiens, chats, bovins, chevaux).
- Réaliser des tests in-vivo de l'effet répulsif des huiles essentielles.
- Tester la rémanence des huiles essentielles en condition réelle.
- Monter un dossier de commercialisation.

# Conclusion

---

L'aromathérapie remporte un franc succès auprès des propriétaires d'animaux dans de nombreux domaines en s'inscrivant dans les rangs des « médecines douces », « alternatives » ou « complémentaires ». L'aromathérapie est notamment utilisée comme alternative aux antiparasitaires externes (contre les puces, tiques, phlébotomes, etc.) proposés traditionnellement en médecine vétérinaire.

Au cours de ce travail, nous nous sommes focalisés sur l'action répulsive des huiles essentielles contre les tiques. Nous avons sélectionné cinq huiles essentielles et quatre dilutions à tester contre la stase nymphale des tiques dures *Ixodes ricinus*. Cette stase a été choisie, car les nymphes sont petites (donc difficiles à repérer et à retirer dans les poils de l'animal) et qu'elles ont déjà eu un repas sanguin à la stase larvaire, au cours duquel elles ont pu se contaminer avec un agent pathogène responsable de maladie vectorielle chez ses futurs hôtes.

Pour tester l'action répulsive des huiles essentielles sélectionnées, nous avons utilisé le comportement exploratoire des nymphes lors de leur recherche d'hôte. Nous avons utilisé un test d'exploration horizontale. Les nymphes ont été déposées sur une plateforme horizontale, au centre de laquelle un papier filtre était positionné sur toute la largeur. Le papier filtre servait ainsi de « barrière chimique » une fois traité avec l'huile essentielle testée. Le comportement des nymphes était filmé pendant 30 minutes. Les vidéos ont ensuite été analysées : le nombre de nymphes ayant traversé la barrière chimique, ainsi que le nombre de passages (toutes nymphes confondues), ont été relevés. Le test de  $\chi^2$  a été utilisé pour comparer le nombre de nymphes ayant traversé le papier filtre en présence d'huile essentielle au nombre de nymphes ayant traversé le papier filtre en l'absence de l'huile essentielle. La correction de Holm a permis d'obtenir un  $p_{\text{corr}}$  qui corrige l'effet des tests multiples réalisés ici.

On observe une réduction significative du nombre de nymphes ayant traversé le papier filtre en présence d'huile essentielle de *Corymbia citriodora* (Eucalyptus citronné) et de *Pelargonium graveolens* (Géranium rosat) pour une dilution à 2 % et 5 % de l'huile essentielle dans de l'huile végétale de colza ( $p_{\text{corr}}$  *C. citriodora* 2% =  $2,00 \times 10^{-5}$  ;  $p_{\text{corr}}$  *C. citriodora* 5 % =  $2,00 \times 10^{-5}$  ;  $p_{\text{corr}}$  *P. graveolens* 2 % = 0,021 et  $p_{\text{corr}}$  *P. graveolens* 5 % =  $1,53 \times 10^{-9}$ ).

Pour l'huile essentielle de *Lavandula angustifolia* (Lavande fine), la réduction du nombre de nymphes ayant traversé le papier filtre est significative aux dilutions 1 % et 5 % (respectivement  $p_{\text{corr}}$  = 0,036 ;  $p_{\text{corr}}$  = 0,0015), mais pas à la dilution 2 % ( $p_{\text{corr}}$  = 0,996).

L'huile essentielle de *Melaleuca alternifolia* (Arbre à thé) à la dilution 5 % réduit significativement le nombre de nymphes ayant traversé le papier filtre ( $p_{\text{corr}}$  = 0,004).

Enfin, l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* (Romarin officinal), ne montre pas de différence significative quant au nombre de nymphes ayant traversé le papier filtre avec l'expérience témoin sans huile essentielle.

Bien que le protocole utilisé puisse être amélioré, en utilisant des individus indépendants et en s'assurant de l'analyse des vidéos en aveugle du produit et de la dilution testés, ce travail a permis de valider l'efficacité de certaines huiles essentielles, à des dilutions souvent plus faibles que ce qui est utilisé dans la littérature. De plus, dans les conditions expérimentales mises en place, nous avons pu observer une réduction du nombre de passages des nymphes au-dessus de la barrière chimique. Cela peut être un paramètre à explorer dans de futurs travaux.

Même si les résultats sont prometteurs, de nombreuses étapes restent nécessaires avant d'arriver à un produit commercialisable. Il faudrait encore réaliser des tests cliniques des huiles essentielles afin de s'assurer de leur effet répulsif malgré l'effet attracteur des animaux sur les tiques. Il faut également s'assurer de l'innocuité des huiles essentielles utilisées sur les espèces cibles. Et enfin, choisir une galénique permettant une bonne application sur le corps et une bonne rémanence des huiles essentielles utilisées.

# Liste des références bibliographiques

---

- AICKIN, M., GENSLER, H. (1996) Adjusting for multiple testing when reporting research results: the Bonferroni vs Holm methods. *American Journal of Public Health* vol. 86, n° 5, p. 726-728.
- ÁNGEL-SAHAGÚN, C.A., LEZAMA-GUTIÉRREZ, R., MOLINA-OCHOA, J., *et al.* (2010) Virulence of Mexican isolates of entomopathogenic fungi (Hypocreales: Clavicipitaceae) upon *Rhipicephalus*=*Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) larvae and the efficacy of conidia formulations to reduce larval tick density under field conditions. *Veterinary Parasitology* vol. 170, n° 3, p. 278-286. [<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.02.037>]
- ANSES (2022) Etat des connaissances sur les huiles essentielles et les plantes d'intérêt pour la phytothérapie et l'aromathérapie chez les animaux producteurs de denrées alimentaires et proposition d'une méthodologie d'évaluation des risques pour la santé humaine. [<https://www.anses.fr/fr/system/files/ERCA2020SA0083Ra.pdf>] (consulté le 02/07/2022).
- ANSES (2018) Note d'appui scientifique et technique de l'ANSES relatif à l'évaluation de l'efficacité des produits biocides répulsifs contre les tiques et aux modalités de leur utilisation. [<https://www.anses.fr/fr/system/files/BIOC2018SA0105.pdf>] (consulté le 01/07/2022).
- ANSM (2017) Les huiles essentielles - ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé. [[https://archiveansm.integra.fr/Activites/Medicaments-a-base-de-plantes/Les-huiles-essentielles/\(offset\)/3](https://archiveansm.integra.fr/Activites/Medicaments-a-base-de-plantes/Les-huiles-essentielles/(offset)/3)] (consulté le 21/07/2022).
- AROMA-ZONE (2023) Bulletin qualité Huile essentielle de Thym à thymol - Aroma-Zone. [<https://www.aroma-zone.com/info/fiche-technique/huile-essentielle-thym-thymol-de-provence-bio-aroma-zone>] (consulté le 08/03/2023).
- BAUDOUX, D., ZHIRI, A., BREDA, M.L. (2011) Huiles essentielles chémotypées et leurs synergies. Luxembourg, Edition Inspir Development.
- BENDER, R., LANGE, S. (2001) Adjusting for multiple testing--when and how? *Journal of Clinical Epidemiology* vol. 54, n° 4, p. 343-349. [[https://doi.org/10.1016/s0895-4356\(00\)00314-0](https://doi.org/10.1016/s0895-4356(00)00314-0)]
- BISSINGER, B.W., ROE, R.M. (2010) Tick repellents: Past, present, and future. *Pesticide Biochemistry and Physiology* vol. 96, n° 2, p. 63-79. [<https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2009.09.010>]
- BONNET, S., HUBER, K., JONCOUR, G., *et al.* (2017) Biologie des tiques. In Boulanger, N., McCoy, K.D. (Éd.), *Tiques et maladies à tiques : Biologie, écologie évolutive, épidémiologie*. Marseille, IRD Éditions, p. 53-84.
- BORGES, R.S., ORTIZ, B.L.S., PEREIRA, A.C.M., *et al.* (2019) Rosmarinus officinalis essential oil: A review of its phytochemistry, anti-inflammatory activity, and mechanisms of action involved. *Journal of Ethnopharmacology* vol. 229, p. 29-45. [<https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.09.038>]
- BOULANGER, N., MCCOY, K.D. (2015) Tiques et maladies à tiques : Biologie, écologie évolutive, épidémiologie. Marseille, IRD Éditions.
- BÜYÜKOKUROĞLU, M.E., GEPDIREMEN, A., HACIMÜFTÜOĞLU, A., *et al.* (2003) The effects of aqueous extract of *Lavandula angustifolia* flowers in glutamate-induced neurotoxicity of cerebellar granular cell culture of rat pups. *Journal of Ethnopharmacology* vol. 84, n° 1, p. 91-94. [[https://doi.org/10.1016/s0378-8741\(02\)00286-6](https://doi.org/10.1016/s0378-8741(02)00286-6)]
- CARROLL, J.F. (1998) Kairomonal activity of white-tailed deer metatarsal gland substances: a more sensitive behavioral bioassay using *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology* vol. 35, n° 1, p. 90-93. [<https://doi.org/10.1093/jmedent/35.1.90>]
- CARROLL, J.F., DEMIRCI, B., KRAMER, M., *et al.* (2017) Repellency of the *Origanum onites* L. essential oil and constituents to the lone star tick and yellow fever mosquito. *Natural Product Research* vol. 31, n° 18, p. 2192-2197. [<https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1280485>]

- CARROLL, J.F., TABANCA, N., KRAMER, M., *et al.* (2011) Essential oils of *Cupressus funebris*, *Juniperus communis*, and *J. chinensis* (Cupressaceae) as repellents against ticks (Acari: Ixodidae) and mosquitoes (Diptera: Culicidae) and as toxicants against mosquitoes. *Journal of Vector Ecology* vol. 36, n° 2, p. 258-268. [<https://doi.org/10.1111/j.1948-7134.2011.00166.x>]
- CERE, F. (2021) Perception des risques de l'utilisation des antiparasitaires externes par les propriétaires de carnivores domestiques, les vétérinaires et les étudiants en médecine vétérinaire - étude RAPE. Thèse de Médecine Vétérinaire. Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.
- CHABANNE, L., GUILLOT, J. (2016) Vade-mecum des maladies à transmission vectorielle chez le chien et le chat. Paris, Med'Com.
- COMPAGNIE DES SENS (2022). [<https://www.compagnie-des-sens.fr/>] (consulté le 09/07/2022).
- DEGENNARO, M. (2015) The mysterious multi-modal repellency of DEET. *Fly* vol. 9, n° 1, p. 45-51. [<https://doi.org/10.1080/19336934.2015.1079360>]
- DESQUILBET, L. (2021) Biostatistiques en Médecine Vétérinaire. Polycopié. Maisons-Alfort, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Unité de Compétence Communication et Réglementation dans la profession vétérinaire.
- DESQUILBET, L. (2020) Epidémiologie Clinique en école vétérinaire. Polycopié. Maisons-Alfort, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Unité de Compétence Communication professionnelle, scientifique et interpersonnelle.
- DGCCRF (2018) Les huiles essentielles. In *Ministère de l'économie, des finances et de la souveraineté industrielle et numérique*. [<https://www.economie.gouv.fr/dgccrf/Publications/Vie-pratique/Fiches-pratiques/Huiles-essentielles>] (consulté le 15/10/2022).
- DRUMMOND, R.O., ERNST, S.E., TREVINO, J.L., *et al.* (1973) *Boophilus annulatus* and *B. microplus*: Laboratory Tests of Insecticides 13. *Journal of Economic Entomology* vol. 66, n° 1, p. 130-133. [<https://doi.org/10.1093/jee/66.1.130>]
- ELIE, C., DE RYCKE, Y., JAIS, J.-P., *et al.* (2008) Aspects méthodologiques et statistiques des essais d'équivalence et de non-infériorité. *Revue d'Épidémiologie et de Santé Publique* vol. 56, n° 4, p. 267-277. [<https://doi.org/10.1016/j.respe.2008.05.027>]
- ELMHALLI, F., GARBOUI, S.S., BORG-KARLSON, A.-K., *et al.* (2019) The repellency and toxicity effects of essential oils from the Libyan plants *Salvadora persica* and *Rosmarinus officinalis* against nymphs of *Ixodes ricinus*. *Experimental & Applied Acarology* vol. 77, n° 4, p. 585-599. [<https://doi.org/10.1007/s10493-019-00373-5>]
- EL-SEEDI, H.R., AZEEM, M., KHALIL, N.S., *et al.* (2017) Essential oils of aromatic Egyptian plants repel nymphs of the tick *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae). *Experimental and Applied Acarology* vol. 73, n° 1, p. 139-157. [<https://doi.org/10.1007/s10493-017-0165-3>]
- EL-SEEDI, H.R., KHALIL, N.S., AZEEM, M., *et al.* (2012) Chemical Composition and Repellency of Essential Oils From Four Medicinal Plants Against *Ixodes ricinus* Nymphs (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology* vol. 49, n° 5, p. 1067-1075. [<https://doi.org/10.1603/ME11250>]
- FLINT, C. (2020) Webinaire Pet Poison Helpline - Sniffing out the truth : updates on the safety of essential oils and pets. [<http://www.petpoisonhelpline.com/wp-content/uploads/2019/12/020420-Essential-Oil-Handout.pdf>] (consulté le 26/07/2022).
- FOREST & KIM STARR (2023) *Melinis minutiflora*. In *Wikipedia*. [[https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Melinis\\_minutiflora&oldid=1140858537](https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Melinis_minutiflora&oldid=1140858537)] (consulté le 28/03/2023).
- FRANÇOIS, J.-B. (2008) Les tiques chez les bovins en France. Thèse de doctorat en Pharmacie. Nancy, Université Henri Poincaré.
- GLEIZES, M. (2019) L'utilisation des huiles essentielles dans la lutte vis-à-vis des ectoparasites chez l'homme et l'animal. Thèse de Médecine Vétérinaire. Maisons-Alfort, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort.
- GOODE, P., ELLSE, L., WALL, R. (2018) Preventing tick attachment to dogs using essential oils. *Ticks and Tick-Borne Diseases* vol. 9, n° 4, p. 921-926. [<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.03.029>]

- GUIGUEN, C., DEGEILH, B. (2001) Les tiques d'intérêt médical : rôle vecteur et diagnose de laboratoire. *Revue Française des Laboratoires* vol. 2001, n° 338, p. 49-57. [https://doi.org/10.1016/S0338-9898(01)80351-6]
- GUILLOT, J. (2020) Les tiques et leur pouvoir pathogène. Polycopié. Maisons-Alfort, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, UC 81 - Acarologie et Entomologie - Unité de Parasitologie, Mycologie, Maladies parasitaires et fongiques, Dermatologie.
- HAMMER, K.A., CARSON, C.F., RILEY, T.V., *et al.* (2006) A review of the toxicity of Melaleuca alternifolia (tea tree) oil. *Food and Chemical Toxicology* vol. 44, n° 5, p. 616-625. [https://doi.org/10.1016/j.fct.2005.09.001]
- INSERM, SORBONNE UNIVERSITÉ (2000) BiostaTGV - Statistiques en ligne. [https://biostatgv.sentiweb.fr/?module=tests/chideux] (consulté le 18/10/2022).
- IORI, A., GRAZIOLI, D., GENTILE, E., *et al.* (2005) Acaricidal properties of the essential oil of Melaleuca alternifolia Cheel (tea tree oil) against nymphs of Ixodes ricinus. *Veterinary Parasitology* vol. 129, n° 1-2, p. 173-176. [https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.11.035]
- IRCP ANMV ANSES (2010) RCP Cothivet de Vétoquinol. [http://www.ircp.anmv.anses.fr/rcp.aspx?NomMedicament=COTHIVET] (consulté le 09/03/2023).
- JAENSON, T.G.T., GARBOUI, S., PALSSON, K. (2006) Repellency of oils of lemon eucalyptus, geranium, and lavender and the mosquito repellent MyggA natural to Ixodes ricinus (Acari: Ixodidae) in the laboratory and field. *Journal of Medical Entomology* vol. 43, n° 4, p. 731-736. [https://doi.org/10.1603/0022-2585(2006)43[731:rooole]2.0.co;2]
- KALOUSTIAN, J., HADJI-MINAGLOU, F. (2012) La connaissance des huiles essentielles : qualilogie et aromathérapie. Paris, Springer.
- KRÖBER, T., BOURQUIN, M., GUERIN, P.M. (2013) A standardised in vivo and in vitro test method for evaluating tick repellents. *Pesticide Biochemistry and Physiology* vol. 107, n° 2, p. 160-168. [https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2013.06.008]
- LE MAUFF, A. (2021) Caractérisation moléculaire et pharmacologique des récepteurs nicotiques neuronaux chez la tique Ixodes ricinus. Thèse de doctorat Universitaire. Orléans, Université d'Orléans.
- LEAL, W.S. (2014) The enigmatic reception of DEET—the gold standard of insect repellents. *Current Opinion in Insect Science* vol. 6, p. 93-98. [https://doi.org/10.1016/j.cois.2014.10.007]
- LEGIFRANCE (2023) Article R5121-1 - Code de la santé publique - Légifrance. *In Légifrance*. [https://www.legifrance.gouv.fr/codes/article\_lc/LEGIARTI000006914715/2004-08-08] (consulté le 23/07/2022).
- MAY, P. (2014) Guide pratique de phyto-aromathérapie pour les animaux de compagnie. Paris, Med'com.
- MED'VET (2023) Médicament BRAVECTO®. [https://www.med-vet.fr/medicament-bravecto-112-5-mg-comprimes-croquer-p2605] (consulté le 05/03/2023).
- MEGHNEM, R., SADI (2016) Extraction de l'huile Essentielle à partir du déchet d'agrumes (orange). Etude paramétrique et caractérisation. Mémoire Universitaire. Tizi-Ouzou, Université Mouloud Mammeri.
- MEKONNEN, A., TESFAYE, S., CHRISTOS, S.G., *et al.* (2019) Evaluation of Skin Irritation and Acute and Subacute Oral Toxicity of Lavandula angustifolia Essential Oils in Rabbit and Mice. *Journal of Toxicology* vol. 2019, p. 5979546. [https://doi.org/10.1155/2019/5979546]
- MIGNÉ, C. (2022) Le virus Kemerovo, un orbivirus encéphalitique transmis par les tiques : études in vivo et in vitro. Thèse de doctorat Universitaire. Paris, AgroParisTech.
- MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE ET DE L'ALIMENTATION (2018) Question n°10716 - Assemblée nationale. De l'utilisation des huiles essentielles dans les élevages agricoles. [https://questions.assemblee-nationale.fr/q15/15-10716QE.htm] (consulté le 15/10/2022).
- MKOLO, M.N., MAGANO, S.R. (2007) Repellent effects of the essential oil of Lavandula angustifolia against adults of Hyalomma marginatum rufipes. *Journal of the South African Veterinary Association* vol. 78, n° 3, p. 149-152. [https://doi.org/10.4102/jsava.v78i3.307]

- MWANGI, E.N., ESSUMAN, S., KAAYA, G.P., *et al.* (1995) Repellence of the tick *Rhipicephalus appendiculatus* by the grass *Melinis minutiflora*. *Tropical Animal Health and Production* vol. 27, n° 4, p. 211-216. [<https://doi.org/10.1007/BF02250692>]
- NCHU, F., MAGANO, S., ELOFF, J. (2012) In vitro anti-tick properties of the essential oil of *Tagetes minuta* L. (Asteraceae) on *Hyalomma rufipes* (Acari: Ixodidae). *The Onderstepoort Journal of Veterinary Research* vol. 79, p. E1-E5. [<https://doi.org/10.4102/ojvr.v79i1.358>]
- NICOLAS--SOURDOT, Q. (2022) Intérêt de l'aromathérapie dans la lutte contre les principaux parasites internes des animaux domestiques en France Métropolitaine. Thèse de Médecine Vétérinaire. Maisons-Alfort, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort.
- PAGES, F., DAUTEL, H., DUVALLET, G., *et al.* (2014) Tick Repellents for Human Use: Prevention of Tick Bites and Tick-Borne Diseases. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* vol. 14, n° 2, p. 85-93. [<https://doi.org/10.1089/vbz.2013.1410>]
- PÅLSSON, K., JAENSON, T.G.T., BAECKSTRÖM, P., *et al.* (2008) Tick repellent substances in the essential oil of *Tanacetum vulgare*. *Journal of Medical Entomology* vol. 45, n° 1, p. 88-93. [[https://doi.org/10.1603/0022-2585\(2008\)45\[88:TRSITE\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0022-2585(2008)45[88:TRSITE]2.0.CO;2)]
- PARLEMENT EUROPÉEN (2019) Règlement (UE) 2019/ du Parlement européen et du Conseil du 11 décembre 2018 relatif aux médicaments vétérinaires et abrogeant la directive 2001/82/CE. [<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32019R0006&from=EN>] (consulté le 15/10/2022).
- PEREZ-EID, C., GILOT, B. (1998) Les tiques : cycles, habitats, hôtes, rôle pathogène, lutte. *Médecine et Maladies Infectieuses* vol. 28, n° 4, Supplément 1, p. 335-346. [[https://doi.org/10.1016/S0399-077X\(98\)70218-5](https://doi.org/10.1016/S0399-077X(98)70218-5)]
- PÉTER, O., BROSSARD, M. (1998) Lutte contre les tiques. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 7e Colloque sur le Contrôle Epidémiologique des Maladies Infectieuses. Institut Pasteur de Paris - 29 mai 1998 vol. 28, n° 4, Supplément 1, p. 383-386. [[https://doi.org/10.1016/S0399-077X\(98\)70228-8](https://doi.org/10.1016/S0399-077X(98)70228-8)]
- POIROT, R. (2007) Méthodologie pour le passage en continu d'extraction de soluté à partir de matière végétale. Thèse de doctorat Universitaire. Toulouse, Institut National Polytechnique de Toulouse.
- RODRIGUEZ, A., ZHANG, H., KLAMINDER, J., *et al.* (2018) ToxTrac: A fast and robust software for tracking organisms. *Methods in Ecology and Evolution* vol. 9, n° 3, p. 460-464. [<https://doi.org/10.1111/2041-210X.12874>]
- SAMADI, M., ABIDIN, Z., YUNUS, R., *et al.* (2016) Assessing the kinetic model of hydro-distillation and chemical composition of *Aquilaria malaccensis* leaves essential oil. *Chinese Journal of Chemical Engineering* vol. 25. [<https://doi.org/10.1016/j.cjche.2016.09.006>]
- SOCASAU, C. (2017) Les huiles essentielles référencées à l'Agence Européenne du Médicament. Thèse de doctorat en Pharmacie. Bordeaux, Université de Bordeaux.
- SOUTAR, O., COHEN, F., WALL, R. (2019) Essential oils as tick repellents on clothing. *Experimental & Applied Acarology* vol. 79, n° 2, p. 209-219. [<https://doi.org/10.1007/s10493-019-00422-z>]
- TABARI, M.A., YOUSSEFI, M.R., MAGGI, F., *et al.* (2017) Toxic and repellent activity of selected monoterpenoids (thymol, carvacrol and linalool) against the castor bean tick, *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology* vol. 245, p. 86-91. [<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.08.012>]
- THOMPSON, K.C., ROA E, J., ROMERO N, T. (1978) Anti-tick grasses as the basis for developing practical tropical tick control packages. *Tropical Animal Health and Production* vol. 10, n° 3, p. 179-182. [<https://doi.org/10.1007/BF02235337>]
- THORSELL, W., MIKIVER, A., TUNÓN, H. (2006) Repelling properties of some plant materials on the tick *Ixodes ricinus* L. *Phytomedicine* vol. 13, n° 1-2, p. 132-134. [<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2004.04.008>]
- TUNÓN, H., THORSELL, W., MIKIVER, A., *et al.* (2006) Arthropod repellency, especially tick (*Ixodes ricinus*), exerted by extract from *Artemisia abrotanum* and essential oil from flowers of *Dianthus caryophyllum*. *Fitoterapia* vol. 77, n° 4, p. 257-261. [<https://doi.org/10.1016/j.fitote.2006.02.009>]

- VIGAN, M. (2010) Essential oils: renewal of interest and toxicity. *European Journal of Dermatology* vol. 20, n° 6, p. 685-692. [<https://doi.org/10.1684/ejd.2010.1066>]
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (1996) Report of the WHO Informal Consultation on the « Evaluation and Testing of Insecticides », [<https://apps.who.int/iris/handle/10665/65962>] (consulté le 10/07/2022).
- YIM, W.T., BHANDARI, B., JACKSON, L., *et al.* (2016) Repellent effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil against cattle tick larvae (*Rhipicephalus australis*) when formulated as emulsions and in  $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes. *Veterinary Parasitology* vol. 225, p. 99-103. [<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.06.007>]
- YUSUFOGLU, H.S., TABANCA, N., BERNIER, U.R., *et al.* (2018) Mosquito and tick repellency of two *Anthemis* essential oils from Saudi Arabia. *Saudi Pharmaceutical Journal* vol. 26, n° 6, p. 860-864. [<https://doi.org/10.1016/j.jsps.2018.03.012>]



# Annexe 1 : Liste des plantes inscrites au tableau 1 du règlement (UE) 37/2010

Substance pharmacologiquement active	Espèce animale	Autres dispositions
Additifs alimentaires (substances avec un nombre E valide autorisées comme additifs dans les aliments destinés à la consommation humaine)	Toutes les espèces productrices d'aliments	Uniquement les substances autorisées comme additifs dans les aliments destinés à la consommation humaine, à l'exception des conservateurs énumérés à l'annexe III, partie C, de la directive 95/2/CE du Parlement européen et du Conseil
<i>Adonis vernalis</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	Uniquement pour usage dans les médicaments vétérinaires homéopathiques préparés selon les pharmacopées homéopathiques à des concentrations dans le produit ne dépassant pas une partie pour cent
<i>Aesculus hippocastanum</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	Uniquement pour usage dans les médicaments vétérinaires homéopathiques préparés selon les pharmacopées homéopathiques à des concentrations dans les médicaments ne dépassant pas une partie pour dix
<i>Agnus castus</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	Uniquement pour usage dans les médicaments vétérinaires homéopathiques préparés selon les pharmacopées homéopathiques à des concentrations correspondant à la teinture mère et aux dilutions de celle-ci
<i>Ailanthus altissima</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	Uniquement pour usage dans les médicaments vétérinaires homéopathiques préparés selon les pharmacopées homéopathiques à des concentrations correspondant à la teinture mère et aux dilutions de celle-ci
<i>Allium cepa</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	Uniquement pour usage dans les médicaments vétérinaires homéopathiques préparés selon les pharmacopées homéopathiques à des concentrations correspondant à la teinture mère et aux dilutions de celle-ci
<i>Aloe vera</i> gel et extrait des feuilles entières d' <i>Aloevera</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	Pour usage topique uniquement
Aloès, des Barbades (aloès ordinaire) et du Cap, leur extrait à sec standardisé et les préparations de celui-ci	Toutes les espèces productrices d'aliments	NÉANT
<i>Angelicae radix aetheroleum*</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	NÉANT
<i>Anisi aetheroleum*</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	NÉANT
<i>Anisi stellati fructus</i> , extraits standardisés et préparations dérivées	Toutes les espèces productrices d'aliments	NÉANT

<i>Apocynum cannabinum</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	Uniquement pour usage dans les médicaments vétérinaires homéopathiques préparés selon les pharmacopées homéopathiques à des concentrations dans le produit ne dépassant pas une partie pour cent  Uniquement à usage oral
<i>Aqua levici</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	Uniquement pour usage dans les médicaments vétérinaires homéopathiques préparés selon les pharmacopées homéopathiques
<i>Arnica montana (arnicae flos et arnicae planta tota)</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	Pour usage topique uniquement
<i>Arnicae radix</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	Uniquement pour usage dans les médicaments vétérinaires homéopathiques préparés selon les pharmacopées homéopathiques à des concentrations dans les médicaments ne dépassant pas une partie pour dix
<i>Artemisia abrotanum</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	Uniquement pour usage dans les médicaments vétérinaires homéopathiques préparés selon les pharmacopées homéopathiques à des concentrations correspondant à la teinture mère et aux dilutions de celle-ci
<i>Atropa belladonna</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	Uniquement pour usage dans les médicaments vétérinaires homéopathiques préparés selon les pharmacopées homéopathiques à des concentrations dans le produit ne dépassant pas une partie pour cent
<i>Balsamum peruvianum</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	Pour usage topique uniquement
<i>Bellis perennis</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	Uniquement pour usage dans les médicaments vétérinaires homéopathiques préparés selon les pharmacopées homéopathiques à
		des concentrations correspondant à la teinture mère et aux dilutions de celle-ci
Bromelaïne	Porcins	NÉANT
<i>Boldo folium</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	NÉANT
<i>Calendula officinalis</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	Uniquement pour usage dans les médicaments vétérinaires homéopathiques préparés selon les pharmacopées homéopathiques à des concentrations dans les médicaments ne dépassant pas une partie pour dix
<i>Calendulae flos</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	Pour usage topique uniquement
<i>Camphora</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	Uniquement pour usage dans les médicaments vétérinaires homéopathiques préparés selon les pharmacopées homéopathiques à des concentrations dans le produit ne dépassant pas une partie pour cent
Camphre	Toutes les espèces productrices d'aliments	Usage externe uniquement
<i>Capsici fructus acer</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	NÉANT
<i>Cardiospermum halicacabum</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	Uniquement pour usage dans les médicaments vétérinaires homéopathiques préparés selon les pharmacopées homéopathiques à des concentrations correspondant à la teinture mère et aux dilutions de celle-ci

<i>Carlinae radix</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	Pour usage topique uniquement
<i>Carvi aetheroleum*</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	NÉANT
<i>Caryophylli aetheroleum*</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	NÉANT
<i>Centellae asiaticae extractum</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	Pour usage topique uniquement
<i>Chrysanthemi cinerariifolii flos</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	À usage local uniquement DJA = 46 µg/kg
<i>Cimicifugae racemosae rhizoma</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	Ne pas utiliser chez les animaux produisant du lait destiné à la consommation humaine
<i>Cinchonae cortex</i> , extraits standardisés et préparations dérivées	Toutes les espèces productrices d'aliments	NÉANT
<i>Cinnamomi cassiae aetheroleum*</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	NÉANT
<i>Cinnamomi cassiae cortex</i> , extraits standardisés et préparations dérivées	Toutes les espèces productrices d'aliments	NÉANT
<i>Cinnamomi ceylanici aetheroleum*</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	NÉANT
<i>Cinnamomi ceylanici cortex</i> , extraits standardisés et préparations dérivées	Toutes les espèces productrices d'aliments	NÉANT
<i>Citri aetheroleum*</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	NÉANT
<i>Citronellae aetheroleum*</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	NÉANT
<i>Condurango cortex</i> , extraits standardisés et préparations dérivées	Toutes les espèces productrices d'aliments	NÉANT
<i>Convallaria majalis</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	Uniquement pour utilisation dans les médicaments vétérinaires homéopathiques préparés selon les pharmacopées homéopathiques à des concentrations dans le produit ne dépassant pas une partie pour mille
<i>Coriandri aetheroleum*</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	NÉANT
<i>Crataegus</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	Uniquement pour usage dans les médicaments vétérinaires homéopathiques préparés selon les pharmacopées homéopathiques à des concentrations correspondant à la teinture mère et aux dilutions de celle-ci
<i>Cupressi aetheroleum*</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	Pour usage topique uniquement
<i>Echinacea</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	Uniquement pour usage dans les médicaments vétérinaires homéopathiques préparés selon les pharmacopées homéopathiques à des concentrations correspondant à la teinture mère et aux dilutions de celle-ci. Pour usage topique uniquement.  Uniquement pour usage dans les médicaments vétérinaires homéopathiques préparés selon les pharmacopées homéopathiques à

		des concentrations dans les médicaments ne dépassant pas une partie pour dix.
<i>Echinacea purpurea</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	Pour usage topique uniquement
<i>Eucalypti aetheroleum*</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	NÉANT
Eucalyptol	Toutes les espèces productrices d'aliments	NÉANT
<i>Eucalyptus globulus</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	Uniquement pour usage dans les médicaments vétérinaires homéopathiques préparés selon les pharmacopées homéopathiques à des concentrations correspondant à la teinture mère et aux dilutions de celle-ci
<i>Euphrasia officinalis</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	Uniquement pour usage dans les médicaments vétérinaires homéopathiques préparés selon les pharmacopées homéopathiques à des concentrations correspondant à la teinture mère et aux dilutions de celle-ci
Extrait d'absinthe	Toutes les espèces productrices d'aliments	NÉANT
Extrait de cardamone	Toutes les espèces productrices d'aliments	NÉANT
Extrait semi-solide purifié de <i>Humulus lupulus</i> L. contenant approximativement 48% de bêta-acides (tels que des sels de potassium)	Abeilles	NÉANT

Extrait de pyrèthre	Toutes les espèces productrices d'aliments	Pour usage topique uniquement
<i>Foeniculi aetheroleum*</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	NÉANT
<i>Frangulae cortex</i> , extraits standardisés et préparations dérivées	Toutes les espèces productrices d'aliments	NÉANT
<i>Gentianae radix</i> , extraits standardisés et préparations dérivées	Toutes les espèces productrices d'aliments	NÉANT
<i>Ginkgo biloba</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	Uniquement pour usage dans les médicaments vétérinaires homéopathiques préparés selon les pharmacopées homéopathiques à des concentrations dans le produit ne dépassant pas une partie pour mille
<i>Ginseng</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	Uniquement pour usage dans les médicaments vétérinaires homéopathiques préparés selon les pharmacopées homéopathiques à des concentrations correspondant à la teinture mère et aux dilutions de celle-ci
<i>Ginseng</i> , extraits standardisés et préparations dérivées	Toutes les espèces productrices d'aliments	NÉANT
<i>Hamamelis virginiana</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	Uniquement pour usage dans les médicaments vétérinaires homéopathiques préparés selon les pharmacopées homéopathiques à des concentrations dans les médicaments ne dépassant pas une partie pour dix
<i>Hamamelis virginiana</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	Pour usage topique uniquement

<i>Harpagophytum procumbens</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	Uniquement pour usage dans les médicaments vétérinaires homéopathiques préparés selon les pharmacopées homéopathiques à des concentrations correspondant à la teinture mère et aux dilutions de celle-ci
<i>Harunga madagascariensis</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	Uniquement pour usage dans les médicaments vétérinaires homéopathiques préparés selon les pharmacopées homéopathiques à des concentrations dans le produit ne dépassant pas une partie pour mille
<i>Hippocastani semen</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	Pour usage topique uniquement
<i>Hyperici oleum</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	Pour usage topique uniquement
<i>Hypericum perforatum<sup>l</sup></i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	Uniquement pour usage dans les médicaments vétérinaires homéopathiques préparés selon les pharmacopées homéopathiques à des concentrations correspondant à la teinture mère et aux dilutions de celle-ci
Isoeugenol	Poisson	Muscle + peau = 6000 µg/kg DJA = 7,5 µg/kg
<i>Jecoris oleum</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	Pour usage topique uniquement
<i>Juniperi fructus</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	NÉANT
<i>Lachnanthes tinctoria</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	Uniquement pour usage dans les médicaments vétérinaires homéopathiques préparés selon les pharmacopées homéopathiques à

		des concentrations dans le produit ne dépassant pas une partie pour mille
<i>Lauri folii aetheroleum*</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	NÉANT
<i>Lauri fructus</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	NÉANT
<i>Lavandulae aetheroleum*</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	Pour usage topique uniquement
Lectine extraite des haricots rouges ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )	Porcins	Uniquement par VO
<i>Lespedeza capitata</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	NÉANT
<i>Lini oleum</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	NÉANT
<i>Lobaria pulmonaria</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	Uniquement pour usage dans les médicaments vétérinaires homéopathiques préparés selon les pharmacopées homéopathiques à des concentrations correspondant à la teinture mère et aux dilutions de celle-ci
<i>Majoranae herba</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	NÉANT
<i>Matricaria recutita</i> et préparations dérivées	Toutes les espèces productrices d'aliments	NÉANT
<i>Matricariae flos</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	NÉANT

<i>Medicago sativa extractum</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	Pour usage topique uniquement
<i>Melissae aetheroleum*</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	NÉANT
<i>Melissae folium</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	NÉANT
<i>Menthae arvensis aetheroleum*</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	NÉANT
<i>Menthae piperitae aetheroleum*</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	NÉANT
Menthol	Toutes les espèces productrices d'aliments	NÉANT
<i>Millefolii herba</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	NÉANT
<i>Myristicae aetheroleum*</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	À n'utiliser que sur l'animal nouveau-né
<i>Okoubaka aubrevillei</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	Uniquement pour usage dans les médicaments vétérinaires homéopathiques préparés selon les pharmacopées homéopathiques à des concentrations correspondant à la teinture mère et aux dilutions de celle-ci
<i>Phytolacca americana</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	Uniquement pour usage dans les médicaments vétérinaires homéopathiques préparés selon les pharmacopées homéopathiques à des concentrations dans le produit ne dépassant pas une partie pour mille

<i>Piceae turiones recentes extractum</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	Uniquement à usage oral
Polyoxyle-huile de ricin avec 30 à 40 unités d'oxyéthylène	Toutes les espèces productrices d'aliments	Pour usage en tant qu'excipient
Polyoxyle-huile de ricin hydrogénée avec 40 à 60 unités d'oxyéthylène	Toutes les espèces productrices d'aliments	Pour usage en tant qu'excipient
Produits d'oxydation de <i>Terebinthinae oleum</i>	Bovins, ovins, caprins, porcins	NÉANT
<i>Prunus laucerasus</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	Uniquement pour usage dans les médicaments vétérinaires homéopathiques préparés selon les pharmacopées homéopathiques à des concentrations dans le produit ne dépassant pas une partie pour mille
<i>Quercus cortex</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	NÉANT
<i>Rhei radix</i> , extraits standardisés et préparations dérivées	Toutes les espèces productrices d'aliments	NÉANT
<i>Ricini oleum</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	Pour usage en tant qu'excipient
<i>Rosmarini aetheroleum*</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	NÉANT
<i>Rosmarini folium</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	NÉANT
<i>Ruscus aculeatus</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	Pour usage topique uniquement

<i>Ruta graveolens</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	Uniquement pour usage dans les médicaments vétérinaires homéopathiques préparés selon les pharmacopées homéopathiques à des concentrations dans le produit ne dépassant pas une partie pour mille Ne pas utiliser chez les animaux produisant du lait destiné à la consommation humaine
<i>Salviae folium</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	NÉANT
<i>Sambuci flos</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	NÉANT
<i>Saponines de quillaia</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	NÉANT
<i>Selenicereus grandiflorus</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	Uniquement pour usage dans les médicaments vétérinaires homéopathiques préparés selon les pharmacopées homéopathiques à des concentrations dans le produit ne dépassant pas une partie pour cent
<i>Serenoa repens</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	Uniquement pour usage dans les médicaments vétérinaires homéopathiques préparés selon les pharmacopées homéopathiques à des concentrations correspondant à la teinture mère et aux dilutions de celle-ci
<i>Silybum marianum</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	Uniquement pour usage dans les médicaments vétérinaires homéopathiques préparés selon les pharmacopées homéopathiques à des concentrations correspondant à la teinture mère et aux dilutions de celle-ci

<i>Sinapis nigrae semen</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	NÉANT
<i>Solidago virgaurea</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	Uniquement pour usage dans les médicaments vétérinaires homéopathiques préparés selon les pharmacopées homéopathiques à des concentrations correspondant à la teinture mère et aux dilutions de celle-ci
<i>Strychni semen</i>	Bovins, ovins, caprins	Jusqu'à l'équivalent de 0,1 mg/kg p.c. de strychnine par VO uniquement
<i>Symphyti radix</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	Uniquement pour usage topique sur peau saine
<i>Syzygium cumini</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	Uniquement pour usage dans les médicaments vétérinaires homéopathiques préparés selon les pharmacopées homéopathiques à des concentrations correspondant à la teinture mère et aux dilutions de celle-ci
<i>Terebinthinae aetheroleum* rectificatum</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	Pour usage topique uniquement
<i>Terebinthinae laricina</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	Pour usage topique uniquement
<i>Thuja occidentalis</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	Uniquement pour usage dans les médicaments vétérinaires homéopathiques préparés selon les pharmacopées homéopathiques à des concentrations dans le produit ne dépassant pas une partie pour cent
<i>Thymi aetheroleum*</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	NÉANT
Thymol	Toutes les espèces productrices d'aliments	NÉANT

<i>Tiliae flos</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	NÉANT
<i>Turnera diffusa</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	Uniquement pour usage dans les médicaments vétérinaires homéopathiques préparés selon les pharmacopées homéopathiques à des concentrations correspondant à la teinture mère et aux dilutions de celle-ci
<i>Urginea maritima</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	Uniquement pour usage dans les médicaments vétérinaires homéopathiques préparés selon les pharmacopées homéopathiques à des concentrations dans le produit ne dépassant pas une partie pour cent
		Uniquement à usage oral
<i>Urticae herba</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	NÉANT
<i>Viola sebifera</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	Uniquement pour usage dans les médicaments vétérinaires homéopathiques préparés selon les pharmacopées homéopathiques à des concentrations dans le produit ne dépassant pas une partie pour mille
<i>Viscum album</i>	Toutes les espèces productrices d'aliments	Uniquement pour usage dans les médicaments vétérinaires homéopathiques préparés selon les pharmacopées homéopathiques à des concentrations correspondant à la teinture mère et aux dilutions de celle-ci

# Annexe 2 : Certificat d'analyse des huiles essentielles

	BULLETIN ANALYSES	Page 1 sur 1
	HE Eucalyptus Citronné	

Lot :	EUCI-00006
DDM :	03/2025
Origine :	Madagascar
Date de libération MP :	N/A

COMPOSITION	CONFORME	
Critères	Spécifications	Résultats
Citral (Géranial + Néral) (%) *	0 - 0,2	(0+0,10) = 0,10
Citronellal (%) *	65 - 82	70,56
Citronellol (%) *	0 - 8	5,37
EugénoI (%) *	0 - 1	0,14
GéranioI (%) *	0 - 0,5	0,05

IDENTIFICATION	CONFORME	
Critères	Spécifications	Résultats
Certification *	Cosmos Organic → AB	AB
Nom botanique *	Eucalyptus citriodora Hook	Eucalyptus citriodora Hook
Partie utilisée *	Feuilles	Feuilles

ORGANOLEPTIQUE	CONFORME	
Critères	Spécifications	Résultats
Aspect *	Liquide	Conforme
Couleur *	Jaune très pâle - Orangé	Conforme
Odeur *	Citronnée - Piquante - Zestée	Conforme

PHYSICO-CHIMIE	CONFORME	
Critères	Spécifications	Résultats
Densité	0,860 - 0,882	0,8740
Indice de réfraction *	1,446 - 1,460	1,4615

\* Contrôles de routine, effectués systématiquement. Les autres critères sont surveillés et vérifiés sur les lots les plus à risques.

	BULLETIN ANALYSES	Page 1 sur 3
	HE Géranium Rosat cv Egypte	

Lot :	<b>GERE-00006</b>
DDM :	10/2023
Origine :	Egypte
Date de libération MP :	21/10/2021

COMPOSITION	CONFORME	
	Critères	Spécifications
(E)-Oxyde de rose (%) *	0,3 - 0,6	0,549
(Z)-Oxyde de rose (%) *	0,7 - 1,5	1,352
Butyrate de géranyle (%) *	0,7 - 2	-
Citral (Géranial + Néral) (%) *	0 - 1	0,203
Citronellal (%) *	0 - 0,2	0,184
Citronellol (%) *	25 - 36	34,102
Formiate de citronellyle (%) *	4 - 8	8,420
Formiate de géranyle (%) *	2 - 7	2,642
Géraniol (%) *	10 - 18	13,188
Guaia-6,9-diène (%) *	0 - 0,5	0,444
Isomenthone (%) *	4 - 8	6,215
Linalol (%) *	4 - 8,5	5,438
Menthone (%) *	0 - 2,1	2,315
Tiglate de géranyle (%) *	0,9 - 2	0,594
Tiglate de β-phényléthyle (%) *	0,5 - 1,2	0,540
α-Terpinéol (%) *	0,3 - 0,6	0,342

COMPOSITIONS RELATIVES		
Critères	Spécifications	Résultats
R = (S)-Citronellol / Citronellol (%)	45 - 55	-

HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES	LOT NON TESTÉ (selon plan de contrôle)	
Critères	Spécifications	Résultats
Benzo(a)pyrène (µg/kg)	0 - 10	-
Somme 4 HAP (µg/kg)	0 - 50	-

IDENTIFICATION	CONFORME	
Critères	Spécifications	Résultats
Certification *	AB	AB

\* Contrôles de routine, effectués systématiquement. Les autres critères sont surveillés et vérifiés sur les lots les plus à risques.

	BULLETIN ANALYSES	Page 2 sur 3
	HE Géranium Rosat cv Egypte	

Lot :	<b>GERE-00006</b>
DDM :	10/2023
Origine :	Egypte
Date de libération MP :	21/10/2021

IDENTIFICATION	CONFORME	
Critères	Spécifications	Résultats
Nom botanique *	Pelargonium graveolens L'Hér. cv Egypte	Pelargonium graveolens L'Hér. cv Egypte
Partie utilisée *	Parties aériennes fleuries	-
Transformation *	Distillation	Distillation
Date de transformation	-	-
DDM fournisseur *	Type : 48 mois à transformation	10/2023

ORGANOLEPTIQUE	CONFORME	
Critères	Spécifications	Résultats
Aspect *	Liquide mobile, limpide	Conforme
Couleur *	Jaune ambré - Jaune verdâtre	Conforme
Odeur *	Rosée - Note menthée	Conforme

PESTICIDES	LOT NON TESTÉ (selon plan de contrôle)	
Critères	Spécifications	Résultats
Screening	LC-QTOF	-

PHYSICO-CHIMIE	CONFORME	
Critères	Spécifications	Résultats
Densité	0,885 - 0,905	0,8900
Indice de peroxyde (meqO2/kg)	0 - 50	-
Indice de réfraction *	1,461 - 1,475	1,4653
Indice d'acide (mgKOH/g)	0 - 10	-
Miscibilité à l'éthanol	3 ; Ethanol 70°	-
Pouvoir rotatoire (°)	(-)14 - (-)8	-8,49

\* Contrôles de routine, effectués systématiquement. Les autres critères sont surveillés et vérifiés sur les lots les plus à risques.

	BULLETIN ANALYSES	Page 3 sur 3
	<b>HE Géranium Rosat cv Egypte</b>	

Lot :	<b>GERE-00006</b>
DDM :	10/2023
Origine :	Egypte
Date de libération MP :	21/10/2021

PHYTOTOXINES	LOT NON TESTÉ (selon plan de contrôle)	
Critères	Spécifications	Résultats
Alcaloïdes pyrrolizidiniques (µg/kg)	0 - 400	-
Alcaloïdes tropaniques (µg/kg)	0 - 25	-

THERMODYNAMIQUE	LOT NON TESTÉ (selon plan de contrôle)	
Critères	Spécifications	Résultats
Point éclair (°C)	83	-

AUTRE		
Critères	Spécifications	Résultats
Commentaires		

\* Contrôles de routine, effectués systématiquement. Les autres critères sont surveillés et vérifiés sur les lots les plus à risques.

	BULLETIN ANALYSES	Page 1 sur 2
	HE Lavande Fine	

Lot :	LAVF-00006
DDM :	10/2023
Origine :	France
Date de libération MP :	N/A

COMPOSITION	CONFORME	
Critères	Spécifications	Résultats
Eucalyptol (%) *	0,2 - 1	0,45
Acétate de lavandulyle (%) *	> 2,5	3,51
Camphre (%) *	0 - 0,5	0,19
Cis-β-Ocimène (%) *	3 - 9	5,63
Coumarine (%) *	0 - 0,2	ND
Géraniol (%) *	0 - 0,5	ND
Lavandulol (%) *	> 0,5	0,80
Limonène (%) *	0 - 1	ND
Linalol (%) *	0 - 36	27,62
3-Octanone (%) *	0,5 - 2	0,73
Terpinèn-4-ol (%) *	2,5 - 5,5	4,52
Trans-β-Ocimène (%) *	2,2 - 4,9	4,08
α-Terpinéol (%) *	0 - 0,7	0,28

COMPOSITIONS RELATIVES		
Critères	Spécifications	Résultats
R = Trans β Ocimène / Octanone-3 *	1,4 - 9	5,6
R = (Linalol + Acétate de linalyle) / (Lavandulol + Acétate de lavandulyle) *	12 - 18	14,8

IDENTIFICATION	CONFORME	
Critères	Spécifications	Résultats
Certification *	AB	AB
Nom botanique *	Lavandula angustifolia Mill.	Lavandula angustifolia Mill.
Partie utilisée *	Sommités fleuries	Sommités fleuries

ORGANOLEPTIQUE	CONFORME	
Critères	Spécifications	Résultats

\* Contrôles de routine, effectués systématiquement. Les autres critères sont surveillés et vérifiés sur les lots les plus à risques.

	BULLETIN ANALYSES	Page 2 sur 2
	<b>HE Lavande Fine</b>	

Lot :	<b>LAVF-00006</b>
DDM :	10/2023
Origine :	France
Date de libération MP :	N/A

Aspect *	Liquide	Conforme
Couleur *	Jaune clair - Orangé	Conforme
Odeur *	Agreste - Florale - Hrebacée	Conforme

PHYSICO-CHIMIE	CONFORME	
Critères	Spécifications	Résultats
Densité	0,880 - 0,890	Conforme
Indice de réfraction *	1,450 - 1,464	1,4642

\* Contrôles de routine, effectués systématiquement. Les autres critères sont surveillés et vérifiés sur les lots les plus à risques.

	BULLETIN ANALYSES	Page 1 sur 1
	HE Romarin à Camphre	

Lot :	ROCA-00005
DDM :	12/2023
Origine :	Espagne
Date de libération MP :	N/A

COMPOSITION		
Critères	Spécifications	Résultats
Eucalyptol (%) *	18.262	18.262
Camphène (%) *	11.928	11.928
Camphre (%) *	18.700	18.700
Limonène (%) *	3.933	3.933
Linalol (%) *	1.917	1.917
α-Pinène (%) *	22.736	22.736

IDENTIFICATION		
Critères	Spécifications	Résultats
Certification *	AB	
Nom botanique *	Rosmarinus officinalis L. camphoriferum	
Partie utilisée *	Sommités fleuries	

ORGANOLEPTIQUE		
Critères	Spécifications	Résultats
Aspect *	Liquide	Conforme
Couleur *	Jaune pâle - Vert-jaune	Conforme
Odeur *	Fraîche - Agreste - Plus ou moins camphrée	Conforme

PHYSICO-CHIMIE		
Critères	Spécifications	Résultats
Densité	0,895 - 0,920	
Indice de réfraction *	1,464 - 1,473	1.4651

\* Contrôles de routine, effectués systématiquement. Les autres critères sont surveillés et vérifiés sur les lots les plus à risques.

	BULLETIN ANALYSES	Page 1 sur 1
	HE Tea Tree	

Lot :	TEAT-00006
DDM :	06/2024
Origine :	Afrique du Sud
Date de libération MP :	N/A

COMPOSITION		
Critères	Spécifications	Résultats
Eucalyptol (%) *	3,99	3,99
Limonène (%) *	1,15	1,15
Linalol (%) *	0,04	0,04
Para-Cymène (%) *	2,02	2,02
Terpinèn-4-ol (%) *	41,51	41,51
α-Terpinène (%) *	10,53	10,53
γ-Terpinène (%) *	51,49	51,49

IDENTIFICATION		
Critères	Spécifications	Résultats
Certification *	AB	
Nom botanique *	Melaleuca alternifolia Maiden	
Partie utilisée *	Feuilles	

ORGANOLEPTIQUE		
Critères	Spécifications	Résultats
Aspect *	Liquide	Conforme
Couleur *	Incolore - Jaune-vert	Conforme
Odeur *	Aromatique - Boisée - Terpénique	Conforme

PHYSICO-CHIMIE		
Critères	Spécifications	Résultats
Densité	0,885 - 0,906	
Indice de réfraction *	1,475 - 1,482	1,4780

\* Contrôles de routine, effectués systématiquement. Les autres critères sont surveillés et vérifiés sur les lots les plus à risques.

# Annexe 3 : Certificat d'analyse du DEET

**SIGMA-ALDRICH**

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103 USA  
Email USA: techserv@sial.com Outside USA: eurtechserv@sial.com

## Certificate of Analysis

**Product Name:** DEET  
PESTANAL™, analytical standard  
**Product Number:** 36542  
**Batch Number:** BCBZ9342  
**Brand:** Sigma-Aldrich  
**CAS Number:** 134-62-3  
**Formula:** C<sub>12</sub>H<sub>17</sub>NO  
**Formula Weight:** 191.27  
**Expiration Date:** DEC 2023  
**Quality Release Date:** 04 JAN 2019

TEST	SPECIFICATION	RESULT
APPEARANCE (COLOR)	COLORLESS TO YELLOW TO BROWN-YELLOW	VERY FAINT YELLOW
APPEARANCE (FORM)	LIQUID	LIQUID
PURITY (HPLC AREA %)	≥ 95.0 %	98.5 %
REFRACTIVE INDEX N20/D	1.5200 - 1.5240	1.5222
PROTON NMR SPECTRUM	CONFORMS TO STRUCTURE	CONFORMS



Dr. Claudia Geitner  
Manager Quality Control  
Buchs, Switzerland

Sigma-Aldrich warrants that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

36542 DEET

Lot Number: BCBZ9342	Sample Name: 0000000600496 001 LC
<b>Dionex Ultimate 3000 RSLC</b>	
Pump : LPG-3400RS	Injection Time: 04.07.17 14:14
Autosampler: WPS-3000	Processed By: Markus Urthaler
Detector: VWD-3400	Vial Number: RB5
Column: Supelco Ascentis Express C18, 2.7 um	Column S/N: -
Column Dim.: 50 x 2.1 mm	Sample Type: unknown
Mobile Phase:	Injection Volume: 1.0 µl
%A : Acetonitrile	Flow: 1.00 ml/min
%B : Methanol	Column Temp. (°C): 35.0
%C : Water	Run Time: 6.00 min
%D : Phosphoric acid 0.01M	
Gradient : see Figure 1	
Sample Prep.: 0.5 mg sample in 1 ml methanol	

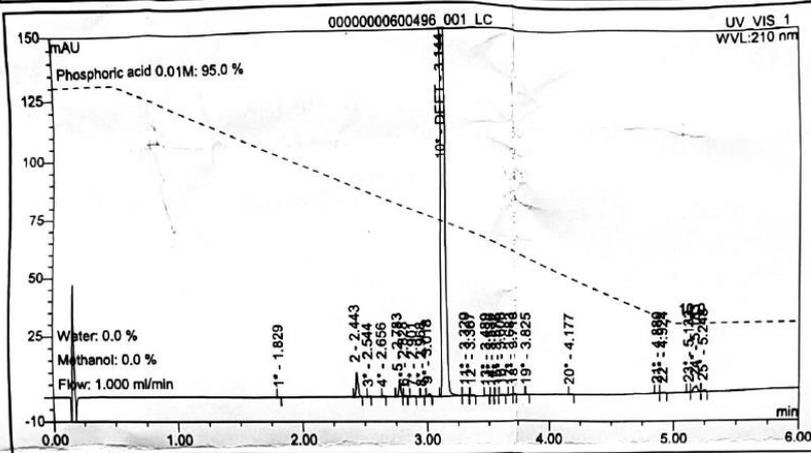


Figure 1: Zoomed Chromatogram

No.	Ret.Time min	Peak Name	Area mAU*min	Height mAU	Amount	Rel.Area %
1	1.829	n.a.	0.00079	0.05351	n.a.	0.00
2	2.443	n.a.	0.17977	9.68667	n.a.	0.58
3	2.544	n.a.	0.00131	0.09287	n.a.	0.00
4	2.656	n.a.	0.00282	0.17771	n.a.	0.01
5	2.783	n.a.	0.10994	6.18116	n.a.	0.36
6	2.828	n.a.	0.00613	0.39415	n.a.	0.02
7	2.901	n.a.	0.00290	0.13056	n.a.	0.01
8	2.968	n.a.	0.00237	0.14394	n.a.	0.01
9	3.018	n.a.	0.02119	1.16474	n.a.	0.07
10	3.144	DEET	30.41216	1604.09486	n.a.	98.46
11	3.320	n.a.	0.01024	0.36213	n.a.	0.03
12	3.367	n.a.	0.00906	0.41491	n.a.	0.03
13	3.489	n.a.	0.00201	0.10052	n.a.	0.01
14	3.530	n.a.	0.00077	0.05256	n.a.	0.00
15	3.576	n.a.	0.00087	0.03593	n.a.	0.00
16	3.608	n.a.	0.00768	0.39828	n.a.	0.02
17	3.683	n.a.	0.00328	0.19447	n.a.	0.01
18	3.718	n.a.	0.00532	0.32046	n.a.	0.02
19	3.825	n.a.	0.00213	0.11838	n.a.	0.01
20	4.177	n.a.	0.00266	0.14997	n.a.	0.01
21	4.880	n.a.	0.00131	0.08071	n.a.	0.00
22	4.924	n.a.	0.00448	0.15093	n.a.	0.01
23	5.133	n.a.	0.00224	0.14275	n.a.	0.01
24	5.183	n.a.	0.08583	2.50306	n.a.	0.28
25	5.248	n.a.	0.01142	0.53820	n.a.	0.04
Total:			30.88866	1627.68343		100.00

Table 1: Integration

## Annexe 4 : Tableaux préalables à la réalisation du test de Chi<sup>2</sup>.

---

HE	Dilution	Statut	Sensible (Non Passé)	Non sensible (passe la barrière)	
<i>Corymbia citriodora</i> (Eucalyptus citronné)	0,10 %	Exposé (HE)	8	32	
		Non Exposé (rien)	6	34	
	1 %	Exposé (HE)	5	35	
		Non Exposé (rien)	6	34	
	2 %	Exposé (HE)	26	14	
		Non Exposé (rien)	6	34	
	5 %	Exposé (HE)	26	14	
		Non Exposé (rien)	6	34	
	<i>Lavandula angustifolia</i> (Lavande fine)	0,10 %	Exposé (HE)	4	36
			Non Exposé (rien)	6	34
1 %		Exposé (HE)	16	24	
		Non Exposé (rien)	6	34	
2 %		Exposé (HE)	8	32	
		Non Exposé (rien)	6	34	
5 %		Exposé (HE)	21	19	
		Non Exposé (rien)	6	34	

HE	Dilution	Statut	Sensible (Non Passé)	Non sensible (passe la barrière)	
<i>Melaleuca alternifolia</i> (Arbre à thé)	0,10 %	Exposé (HE)	4	36	
		Non Exposé (rien)	6	34	
	1 %	Exposé (HE)	1	39	
		Non Exposé (rien)	6	34	
	2 %	Exposé (HE)	12	28	
		Non Exposé (rien)	6	34	
	5 %	Exposé (HE)	19	21	
		Non Exposé (rien)	6	34	
	<i>Pelargonium graveolens</i> (Géranium rosat)	0,10 %	Exposé (HE)	6	34
			Non Exposé (rien)	6	34
1 %		Exposé (HE)	8	32	
		Non Exposé (rien)	6	34	
2 %		Exposé (HE)	17	23	
		Non Exposé (rien)	6	34	
5 %		Exposé (HE)	34	6	
		Non Exposé (rien)	6	34	

HE	Dilution	Statut	Sensible (Non Passé)	Non sensible (passe la barrière)	
<i>Rosmarinus officinalis</i> (Romarin officinal)	0,10 %	Exposé (HE)	3	37	
		Non Exposé (rien)	6	34	
	1 %	Exposé (HE)	6	34	
		Non Exposé (rien)	6	34	
	2 %	Exposé (HE)	2	38	
		Non Exposé (rien)	6	34	
	5 %	Exposé (HE)	6	34	
		Non Exposé (rien)	6	34	
	DEET	0,10 %	Exposé (HE)	9	31
			Non Exposé (rien)	6	34
1 %		Exposé (HE)	21	19	
		Non Exposé (rien)	6	34	
2 %		Exposé (HE)	29	11	
		Non Exposé (rien)	6	34	
5 %		Exposé (HE)	40	0	
		Non Exposé (rien)	6	34	



# ÉTUDE EXPÉRIMENTALE SUR L'ACTION RÉPULSIVE DES HUILES ESSENTIELLES SUR LES TIQUES

---

**AUTEUR : Blandine MARTIN**

## **RÉSUMÉ :**

La prévalence des maladies vectorielles dans le monde est en constante augmentation. La transmission de ces maladies par les tiques est un sujet préoccupant chez les animaux (de compagnie et de rente). Dans le même temps, les propriétaires d'animaux souhaitent de plus en plus utiliser des médecines « alternatives », passant, entre autres, par l'aromathérapie.

Dans cette optique, nous avons choisi d'étudier l'effet répulsif de 5 huiles essentielles (*Corymbia citriodora* (Eucalyptus citronné), *Lavandula angustifolia* (Lavande fine), *Melaleuca alternifolia* (Arbre à thé), *Pelargonium graveolens* (Géranium rosat), *Rosmarinus officinalis* (Romarin officinal)), sur les nymphes d'*Ixodes ricinus*, en utilisant un nouveau protocole d'étude du comportement des tiques : l'exploration d'une plateforme horizontale et le franchissement d'une barrière chimique (du papier filtre traité, ou non, avec des huiles essentielles. Le comportement des nymphes a été filmé pendant 30 minutes, et le nombre de nymphes ayant traversé le papier filtre traité, ou non, a été relevé. Le test du Chi<sup>2</sup> et la correction de Holm ont été utilisés pour vérifier la significativité des différences observées.

Nous avons observé une réduction significative du nombre de nymphes ayant traversé le papier filtre en présence d'huile essentielle de *Corymbia citriodora* (Eucalyptus citronné) et de *Pelargonium graveolens* (Géranium rosat) pour une dilution à 2 % et 5 % de l'huile essentielle dans de l'huile végétale de colza ( $p_{\text{corr}} C. citriodora 2\% = 2,00 \times 10^{-5}$  ;  $p_{\text{corr}} C. citriodora 5\% = 2,00 \times 10^{-5}$  ;  $p_{\text{corr}} P. graveolens 2\% = 0,021$  et  $p_{\text{corr}} P. graveolens 5\% = 1,53 \times 10^{-9}$ ). Pour l'huile essentielle de *Lavandula angustifolia* (Lavande fine), la réduction du nombre de nymphes ayant traversé le papier filtre est significative aux dilutions 1 % et 5 % (respectivement  $p_{\text{corr}} = 0,036$  ;  $p_{\text{corr}} = 0,0015$ ), mais à pas la dilution 2 % ( $p_{\text{corr}} = 0,996$ ). L'huile essentielle de *Melaleuca alternifolia* (Arbre à thé) à la dilution 5 % réduit significativement le nombre de nymphes ayant traversé le papier filtre ( $p_{\text{corr}} = 0,004$ ). Enfin, l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* (Romarin officinal), ne montre pas de différence significative quant au nombre de nymphes ayant traversé le papier filtre avec l'expérience témoin sans huile essentielle.

Bien que le protocole utilisé puisse être amélioré, en utilisant des individus indépendants et en s'assurant de l'analyse des vidéos en aveugle du produit et de la dilution testés, ce travail a permis de valider l'efficacité de certaines huiles essentielles, à des dilutions souvent plus faibles que ce qui est utilisé dans la littérature.

Même si les résultats sont prometteurs, de nombreuses étapes restent nécessaires avant d'arriver à un produit commercialisable.

## **MOTS CLÉS :**

AROMATHERAPIE, TIQUES, IXODES RICINUS, HUILES ESSENTIELLES, REPULSIF

## **JURY :**

Présidente : Pr Caroline GILBERT

Directeur de thèse : Pr Radu BLAGA

Examinatrice : Dr Guillemette CREPEAUX

# EXPERIMENTAL STUDY ON THE REPULSIVE ACTION OF ESSENTIAL OILS ON TICKS

---

**AUTHOR:** Blandine MARTIN

## **SUMMARY:**

The prevalence of vector-borne diseases in the world is increasing. Transmission of these diseases by hematophagous parasites like ticks is a matter of concern in animals (both companion and livestock). At the same time, pet owners are seeking to use "alternative" medicines, including aromatherapy.

In this perspective, we have chosen to study the repulsive effect of 5 essential oils (*Corymbia citriodora* (Lemon Eucalyptus), *Lavandula angustifolia* (Fine Lavender), *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree), *Pelargonium graveolens* (Rose Geranium), *Rosmarinus officinalis* (Rosemary)), and on the nymphs of *Ixodes ricinus*, using a new protocol to study the behavior of ticks. We look if the ticks cross a chemical barrier (filter paper treated, or not with essential oils), placed on a horizontal platform. The behavior of the nymphs was filmed for 30 minutes, and the number of nymphs that crossed the treated or untreated filter paper was recorded. The Chi<sup>2</sup> test and Holm's correction were used to verify the significance of the observed differences.

We observed a significant reduction of the number of nymphs having crossed the filter paper in presence of essential oil of *Corymbia citriodora* (Lemon Eucalyptus) and *Pelargonium graveolens* (Rose Geranium) for a dilution at 2% and 5% of the essential oil in rapeseed vegetable oil ( $p_{\text{corr}} C. citriodora 2\% = 2.00 \times 10^{-5}$ ;  $p_{\text{corr}} C. citriodora 5\% = 2.00 \times 10^{-5}$ ;  $p_{\text{corr}} P. graveolens 2\% = 0.021$  and  $p_{\text{corr}} P. graveolens 5\% = 1.53 \times 10^{-9}$ ). For *Lavandula angustifolia* (Fine lavender) essential oil, reduction of the number of nymphs that passed through the filter paper was significant at the 1% and 5% dilutions (respectively  $p_{\text{corr}} = 0.036$ ;  $p_{\text{corr}} = 0.0015$ ), but not at the 2% dilution ( $p_{\text{corr}} = 0.996$ ). The essential oil of *Melaleuca alternifolia* (Tea tree) at the 5% dilution significantly reduced the number of nymphs that passed through the filter paper ( $p_{\text{corr}} = 0.004$ ). Finally, the essential oil of *Rosmarinus officinalis* (Rosemary) did not show a significant difference on the number of nymphs that passed through the filter paper with the control experiment without essential oil.

Although the protocol used could be improved, using independent individuals and ensuring blind video analysis of the product and dilution tested, this work has validated the efficacy of certain essential oils, often at lower dilutions than used in the scientific literature.

Even if the results are promising, many steps are still necessary before arriving at a marketable product.

## **KEYWORDS:**

AROMATHERAPY, TICKS, IXODES RICINUS, ESSENTIAL OILS, REPULSIVE

## **JURY:**

Chairperson: Pr Caroline GILBERT

Thesis Director: Pr Radu BLAGA

Reviewer: Dr Guillemette CREPEAUX