

ONIRIS - ECOLE NATIONALE VETERINAIRE,
AGROALIMENTAIRE ET DE L'ALIMENTATION

2019-2020

**CINÉTIQUES DE RÉSIDUS D'HUILES
ESSENTIELLES (*Eucalyptus citriodora*, *Leptospermum
scoparium*, *Litsea citrata*, *Melaleuca alternifolia*, *Salvia
sclarea*) DANS LE LAIT : ÉTUDE EXPÉRIMENTALE
CHEZ LA VACHE LAITIÈRE APRÈS APPLICATION
CUTANÉE MAMMAIRE**

THÈSE

pour le diplôme d'État de

DOCTEUR VETERINAIRE

présentée et soutenue
publiquement le 30 Octobre 2020

devant

la Faculté de Médecine de Nantes par

Mélanie PASCOLAT

Née le 29/12/1994 à Belfort (90)

JURY

Président : Patrick Lustenberger, Professeur à la faculté de Médecine de Nantes

Rapporteur : Hervé Pouliquen, Professeur à Oniris

Assesseur : Jean-Michel Cappelier, Professeur à Oniris

ONIRIS - ECOLE NATIONALE VETERINAIRE,
AGROALIMENTAIRE ET DE L'ALIMENTATION

2019-2020

**CINÉTIQUES DE RÉSIDUS D'HUILES
ESSENTIELLES (*Eucalyptus citriodora*, *Leptospermum
scoparium*, *Litsea citrata*, *Melaleuca alternifolia*, *Salvia
sclarea*) DANS LE LAIT : ÉTUDE EXPÉRIMENTALE
CHEZ LA VACHE LAITIÈRE APRÈS APPLICATION
CUTANÉE MAMMAIRE**

THÈSE

pour le diplôme d'État de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

présentée et soutenue
publiquement le 30 Octobre 2020

devant

la Faculté de Médecine de Nantes par

Mélanie PASCOLAT

Née le 29/12/1994 à Belfort (90)

JURY

Président : Patrick Lustenberger, Professeur à la faculté de Médecine de Nantes

Rapporteur : Hervé Pouliquen, Professeur à Oniris

Assesseur : Jean-Michel Cappelier, Professeur à Oniris

Liste des membres du corps enseignant

Département BPSA Biologie, Pathologie et Sciences de l'Aliment		
Responsable : Hervé POULIQUEN - adjoint : Emmanuel JAFFRES		
Nutrition et endocrinologie	Patrick NGuyen* (Pr)	
Pharmacologie et Toxicologie	Jean-Claude Desfontis (Pr) Yassine Mallem (Pr) Antoine Rostang (MCC)	Martine Kammerer (Pr) Hervé Pouliquen* (Pr)
Physiologie fonctionnelle, cellulaire et moléculaire	Jean-Marie Bach (Pr) Lionel Martignat (Pr)	Julie Herve (MC) Grégoire Mignot (MC)
Histologie et anatomie pathologique	Jérôme Abadie* (MC) Laetitia Jaillardon* (MC)	Marie-Anne Colle* (Pr) Frédérique Nguyen* (MC)
Pathologie générale, microbiologie et immunologie	François Meurens (Pr) Jean-Louis Pellerin* (Pr)	Emmanuelle Moreau (MC HDR) Hervé Sebbag (MC)
Biochimie alimentaire industrielle	Clément Cataneo (MC) Laurent Le Thuaut (MC) Thierry Serot (Pr)	Joëlle Grua (MC) Carole Prost (Pr) Florence Texier (MC)
Microbiotech	Géraldine Boue (MC) Emmanuel Jaffres (MC) Raouf Tareb (MCC) Bénédictine Sorin (IE)	Nabila Haddad (MC) Mathilde Mosser (MC) Hervé Prevost (Pr)
Département SAESP Santé des Animaux d'Élevage et Santé Publique		
Responsable : Alain CHAUVIN - adjoint : Raphaël GUATTEO		
Hygiène et qualité des aliments	Jean-Michel Cappelier* (Pr) Michel Federighi (Pr) Catherine Magras* (Pr) Fanny Renois -Meurens (MC)	Eriic Dromigny (MC HDR) Bruno Le Bizec (Pr) Marie-France Pilet(Pr)
Médecine des animaux d'élevage	Sébastien Assie* (MC) Isabelle Breyton (MC) Alain Douart* (MC) Mily Leblanc Maridor (MC) Anne Relun (MCC)	Catherine Belloc* (Pr) Christophe Chartier* (Pr) Raphaël Guatteo* (Pr)
Parasitologie, aquaculture, Faune sauvage	Albert Agoulon (MC) Ségolène Calvez (MC) Nadine Ravinet (MC)	Suzanne Bastian (MC) Alain Chauvin* (Pr)
Maladies réglementées, zoonoses et réglementation sanitaire	Carole Peroz (MC)	Nathalie Ruvoen* (Pr)
Élevage, nutrition et santé des animaux domestiques	Nathalie Bareille* (Pr) Christine Fourichon* (Pr HDR) Henri Dumon* (Pr) Lucile Martin (Pr)	François Beaudeau* (Pr) Aurélien Madouasse (MC) Nora Navarro-Gonzalez (MCC)

Département DSC Sciences Cliniques		
Responsable : Catherine IBISCH – adjoint : Olivier GAUTHIER		
Anatomie comparée	Eric Betti (MC) Claude Guintard (MC)	Claire Douart (MC)
Pathologie chirurgicale et anesthésiologie	Eric Aguado (MC HDR) Eric Goyenvalle (MC HDR) Caroline Tessier* (MC)	Olivier Gauthier (Pr) Béatrice Lijour (MC) Gwénola Touzot-Jourde* (MC)
Dermatologie, parasitologie des carnivores et des équidés, mycologie	Patrick Bourdeau* (Pr)	Emmanuel BENSIGNOR (Pr Ass)
Médecine interne, imagerie médicale et législation professionnelle vétérinaire	Nora Bouhsina (MCC) Anne Courouce * (Pr) Amandine Drut* (MC) Catherine Ibisch (MC) Odile Senecat (MC)	Nicolas Chouin (MC) Jack-Yves Deschamps (Pr) Marion Fusellier-Tesson (MC) Françoise Roux* (Pr)
Biotechnologies et pathologie de la reproduction	Djemil Bencharif (MC HDR) Jean-François Bruyas* (Pr)	Lamia Briand (MC HDR) Francis Fieni* (Pr)
Département GPA Génie des Procédés Alimentaires		
Responsable : Olivier ROUAUD - adjoint : Sébastien CURET-PLOQUIN		
Lionel Boillereaux (Pr) Marie De Lamballerie (Pr) Francine Fayolle (Pr) Vanessa Jury (MC) Alain Lebail (Pr) Jean-Yves Monteau (MC HDR) Laurence Pottier (MC) Cyril Toubanc (MC)	Sébastien Curet Ploquin (MC) Dominique Della Valle (MC HDR) Michel Havet (Pr) Emilie Korbel (MCC) Catherine Loisel (MC) Olivier Rouaud (Pr) Eve-anne Norwood (MCC)	
Département MSC Management, Statistiques et Communication		
Responsable : Michel SEMENOU - adjoint Pascal BARILLOT		
Mathématiques, statistiques, Informatique	Véronique Cariou (MC) El Mostafa Qannari (Pr) Chantal Thorin (Pr AG.)	Philippe Courcoux (MC) Michel Semenou (MC) Evelyne Vigneau (Pr)
Economie, gestion	Pascal Barillot(MC) Florence Beaugrand (MC) Sonia EL Mahjoub (MC) Samira Rousseliere (MC)	Ibrahima Barry (MCC) Sibylle Duchaine (MC) Jean-Marc Ferrandi (Pr)
Langues et communication	Marc Bridou (PLPa) David Guylér (ens. cont.) Shaun Meehan (ens. cont.)	Franck Insignares (IE) Linda Morris (PCEA)

BTs : **Laurence Freret (PCEA)** Christophe Caron (PLPA), Pascale Fleury(PCEA), Virginie Magin (Ens. Cont.), Françoise Bricchet (IAE).

Professeurs émérites : Poncelet

guide de lecture des tableaux suivants :Pr : Professeur, Pr. AG : Professeur agrégé. MC : maître de Conférences, MCC : MC contractuel, PLPA : Professeur Lycée Professionnel Agricole, PCEA : Professeur Certifié Enseignement Agricole, IE : Ingénieur d'Etudes ; IAE : Ingénieur de l'Agriculture et de l'Environnement ; ens. cont.: enseignant contractuel; HDR : Habilité à Diriger des Recherches

* Vétérinaire spécialiste d'une spécialité européenne, américaine ou française

Remerciements

À Monsieur Patrick Lustenberger

Professeur à la Faculté de Médecine de Nantes

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider ce jury de thèse,

Hommages respectueux

À Monsieur Hervé Pouliquen

Professeur à Oniris

Pour m'avoir proposé ce sujet, pour le temps que vous avez consacré à mon travail, votre disponibilité et votre patience,

Sincères remerciements

À Monsieur Jean-Michel Cappelier

Professeur à Oniris

Pour avoir accepté d'être l'assesseur de ma thèse,

Sincères remerciements

À Monsieur Julien Daspét

Docteur vétérinaire à la clinique vétérinaire des Faluns

Pour avoir porté ce projet et pour votre investissement,

Sincères remerciements

À L'UMR Pegase de l'INRAE de Rennes et plus particulièrement à Monsieur Philippe Lamberton

Pour avoir mené les expérimentations m'ayant permis de réaliser cette thèse,

Sincères remerciements

À l'INRAE de Theix et plus particulièrement Monsieur Jeremy Ratel

Pour votre implication et pour avoir analysé les échantillons de lait,

Sincères remerciements

À **mes parents**, pour m'avoir toujours soutenue, permis de réaliser ce rêve et d'être celle que je suis aujourd'hui.

À **ma sœur**, pour ces années de disputes, **pour Adèle**, pour cette relation que nous sommes en train de construire.

À **mes grands-parents**, à **Papi Michel** et **Mamie Jacqueline**, qui n'auront pas vu ce que j'ai accompli mais qui j'en suis sûre auraient été fiers. À **Papi Marcel**, pour avoir toujours cru en moi et été si fier. À **Mamie Mireille**, pour ces weekends dans le centre où j'ai toujours beaucoup trop mangé. Pour votre amour à tous les quatre.

À mes 5A canine dans l'instalove ...

À **Lola**, qui as dû supporter toutes mes sautes d'humeurs pendant ces années, pour avoir été là et être resté malgré tout, pour tous ces guacamoles, cheese-cakes et autres plats. À mon mimilove toujours dans mon cœur (et dans ma peau ...).

À **Charlotte**, pour tes nombreux conseils avisés, ta bienveillance, les deux mois de galères auxquels on a survécu, nos goûts musicaux et à notre future clinique du Cocker Anglais.

À **Laurie**, pour nos après-midis nantais qui se finissaient toujours par une boîte à meuh, les piercings, pour avoir été notre Maïté à la coloc, pour la découverte du sport et pour ta sincérité.

À **Céline**, pour avoir été là dès le début, pour nos personnalités si différentes et si complémentaires, pour ces lendemains de soirée, ces semaines de révisions et notre amour pour les sauvetages d'animaux.

À la team groupe 6 ...

À **Claire**, pour ces balades avec jojo les soirs d'été, ton hyperactivité, ta bonne et moins bonne humeur.

À **Diane**, parce que « c'était cool, merci », pour ces partages de tentes aux wei, pour ton retard légendaire et notre amour pour le Sud.

À **Camille**, pour ton stress, les téléfilms et soirées dans le samedi, notre partage de galères, crois en toi et tout ira bien.

À **Josie**, pour ta bonne humeur constante et tes idées farfelues.

À **Géraldine**, pour les sensations fortes en Allemagne, ton franc parler et notre goût pour les relations humaines.

A mes toulousaines préférées ...

À **Charline**, pour avoir été mon binôme et celle qui m'a permis de tenir cette première année, pour ce magnifique mariage, que du bonheur pour vous deux.

À **Manon**, pour cette année difficile de prépa qu'on a partagé et surmonté ensemble, que du bonheur à venir pour toi.

À **Alizée, Hélène et Marjorie**, pour nos virées montpelliéraines, pour avoir accepté mon emploi du temps compliqué, et pour être toujours les mêmes.

À **Alexia**, pour ces presque vingt ans d'amitié qui ont survécu à la distance, ces séances de marche autour du lac, la relecture de cette thèse, pour avoir toujours été là.

À **la Cup** pour m'avoir accueillie ces deux derniers mois à Nantes, ces petits apéro-piscines et m'avoir permis de prolonger cette vie nantaise.

À **la Clinique Vétérinaire Arcadia**, pour m'avoir permis de faire mes débuts, fait confiance et beaucoup appris.

À **Ulotte et Chloé**, mes cockers préférés, qui m'ont tant apporté et toujours supporté mon amour débordant.

Table des matières

Liste des abréviations	9
Table des illustrations.....	10
Table des figures	10
Table des tableaux.....	12
Table des annexes.....	13
Introduction.....	14
I. Généralités sur les huiles essentielles et l’aromathérapie.....	16
1. Définition d’une huile essentielle	16
2. Composition d’une huile essentielle	16
3. Propriétés physico-chimiques	17
4. Voies d’administration – Résorption des principes actifs	17
a. Interface digestive.....	17
b. Interface respiratoire	18
c. Interface génito-urinaire	18
d. Interface oculaire et auriculaire	18
e. Interface cutanée	19
f. Voie parentérale.....	19
5. Pharmacocinétique des huiles essentielles	20
a. Absorption	20
b. Distribution et circulation sanguine mammaire.....	22
c. Biotransformations.....	24
d. Élimination.....	24
6. Toxicité des huiles essentielles.....	26
a. Différents types de toxicité	26
b. Fixation d’une limite maximale de résidus (LMR) et d’un temps d’attente.....	27
c. Toxicité des composés des huiles essentielles.....	27
i. <i>Les aldéhydes terpéniques</i>	27
ii. <i>Les alcools monoterpéniques</i>	28
iii. <i>Les monoterpènes</i>	29
iv. <i>Les esters terpéniques</i>	29
v. <i>Les diterpénols</i>	30
vi. <i>Les tricétones cycliques</i>	31
7. Aspect réglementaire de l’utilisation des huiles essentielles	33
II. Matériel et méthode	34
1. Choix des animaux et de leur alimentation	34

2.	Choix des huiles essentielles	35
3.	Composition des mélanges d'huiles essentielles	37
a.	Mélange M1	37
-	Huile essentielle d' <i>Eucalyptus citronné (Eucalyptus citriodora)</i>	37
-	Huile essentielle de <i>Litsée citronnée (Litsea citrata)</i>	37
-	Huile essentielle de <i>Tea tree (Melaleuca alternifolia)</i>	38
-	Huile essentielle de <i>Manuka (Leptospermum scoparium CT cap est)</i>	38
-	Huile essentielle de <i>Sauge sclarée (Salvia sclarea)</i>	39
b.	Mélange M2	40
c.	Mélange M3	40
4.	Voie d'administration et préparation de la solution.....	41
5.	Protocole	43
a.	Prise de sang	43
b.	Prélèvement de lait.....	44
6.	Conservation des échantillons.....	44
7.	Analyse des échantillons	44
a.	Extraction des composés volatils par espace de tête dynamique aussi appelé « Dynamic HeadSpace » (DSH) ou « purge and trap »	44
b.	Chromatographie en phase gazeuse	45
c.	Spectrométrie de masse	46
d.	Réalisation de courbes de calibration	47
e.	Réalisation de contrôles qualités.....	47
III.	Résultats.....	48
1.	Données zootechniques	48
a.	Taux de cellules somatiques dans le lait.....	48
b.	Production laitière.....	50
c.	Taux butyreux et taux protéique	50
2.	Dosages des résidus d'huiles essentielles dans le lait	52
a.	Cinétique des marqueurs d' <i>Eucalyptus citriodora</i>	52
b.	Cinétique des marqueurs de <i>Melaleuca alternifolia</i>	54
c.	Cinétique des marqueurs de <i>Leptospermum scoparium</i>	55
d.	Cinétique d'autres composés détectés	56
3.	Dosages des résidus d'huiles essentielles dans le sang	59
IV.	Discussion	60
1.	Évaluation du risque pour le consommateur dans le lait.....	60
2.	Absence de certains marqueurs	61
a.	Concentration basale en composés dans le mélange d'huiles essentielles trop faible pour être détectées après absorption par la mamelle.....	61

b.	Oxydation des composés	62
c.	Défaut d'absorption cutanée	63
d.	Interactions entre les composés des différentes huiles essentielles	64
3.	Limites de l'étude	64
	Conclusion	65
	Bibliographie	66
	Annexes	72

Liste des abréviations

- *ANSES* : Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail
- C_{max} : concentration maximale en résidu
- *CSP* : code de la santé publique
- *DJA* : dose journalière admissible
- *DL50* : dose létale 50
- *EFSA* : European Food Safety Authority (autorité européenne de sécurité des aliments)
- *EMA* : European Medicines Agency
- *FAO* : Food and Agriculture Organization (organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture)
- *INRAE* : Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement
- *JECFA* : Joint Expert Committee for Food Additives (comité mixte FAO/OMS d'experts des additifs alimentaires)
- *LMR* : limite maximale de résidus
- *NOAEL* : No Observed Adverse Effect Level (dose sans effet toxique observé)
- *OCDE* : Organisation de Coopération et de Développement Économiques
- *OMS* : Organisation Mondiale de la Santé
- *PLm / PLs* : prise de lait le matin / prise de lait le soir
- *TA* : temps d'attente
- *TB* : taux butyreux
- T_{max} : temps correspondant à la concentration maximale en résidu (C_{max})
- *TP* : taux protéique

Table des illustrations

Table des figures

Figure 1 : évolution de la part des cheptels nationaux conduits en agriculture biologique de 2013 à 2019 d'après l'Agence BIO, 2020 [4]	15
Figure 2 : représentation des différentes voies d'administration des médicaments d'après PHARMACOMédicale.org	20
Figure 3 : mécanismes de pénétration cutanée d'un principe actif d'après Herman and Herman, 2015 [19]	21
Figure 4 : temps de résorption cutanée de différents composants d'huiles essentielles d'après Franchomme et al., 1990 [10]	22
Figure 5 : système vasculaire de la mamelle de la vache d'après Reece, 2015 [22]	23
Figure 6 : biotransformation et élimination d'un xénobiotique d'après Dancygier, 2010 [24]	25
Figure 7 : Formules topologiques du géraniol, néral et citronellal d'après Molbase et Sigma Aldrich.....	27
Figure 8 : formules topologiques du terpinène-4-ol et du citronellol d'après Sigma Aldrich... ..	28
Figure 9 : formule topologique du γ -terpinène d'après Sigma Aldrich.....	29
Figure 10 : formule topologique de l'acétate de linalyle d'après Sigma Aldrich.....	29
Figure 11 : formule topologique du sclaréol d'après Sigma Aldrich.....	30
Figure 12 : formules topologiques du leptospermone et du flavésone d'après Molbase.....	31
Figure 13 : distinction entre les laits en fonction de l'alimentation donnée aux vaches d'après Cornu et al., 2002 [48]	34
Figure 14 : huiles essentielles utilisées dans 304 cas de mammites cliniques d'après Adage 35, 2016 [50]	35
Figure 15 : feuille d'eucalyptus citronné d'après pierrefranchomme-lab.com	37
Figure 16 : baies de Litsée citronnée d'après boutique-vegetale.com	37
Figure 17 : feuilles de tea tree d'après boutique-vegetale.com	38
Figure 18 : fleurs, feuilles et rameaux de manuka d'après wikipedia.fr	38
Figure 19 : fleurs de sauge sclarée d'après jardinage.ooreka.fr	39
Figure 20 : déroulement de l'expérimentation	42
Figure 21 : extraction de composés volatils par dynamic headspace d'après bronkhorst.com	45
Figure 22 : composition de la colonne RTX 5 d'après restek.fr.....	46
Figure 23 : différentes étapes de l'analyse des échantillons	46
Figure 24 : variations du taux de cellules somatiques de la vache 9034 durant l'expérimentation	49

Figure 25 : variations du taux de cellules somatiques de la vache 6057 durant l'expérimentation	49
Figure 26 : : variations du taux de cellules somatiques de la vache 1328 durant l'expérimentation	49
Figure 27 : variations de la production laitière journalière des trois vaches au cours de l'expérimentation	50
Figure 28 : variations du taux butyreux pondéré des trois vaches au cours de l'expérimentation	51
Figure 29 : variation du taux protéique pondéré des trois vaches au cours de l'expérimentation	51
Figure 30 : cinétique du β -citronellal dans le lait durant l'expérimentation pour les trois vaches	52
Figure 31 : cinétique du β -citronellol dans le lait durant l'expérimentation pour les trois vaches	53
Figure 32 : cinétique du terpinèn-4-ol dans le lait durant l'expérimentation pour les trois vaches	54
Figure 33 : cinétique du flavésone dans le lait durant l'expérimentation pour les trois vaches	55
Figure 34 : cinétique du leptospermone dans le lait durant l'expérimentation pour les trois vaches	55
Figure 35 : cinétique de l'eucalyptol dans le lait durant l'expérimentation pour les trois vaches	56
Figure 36 : cinétique de l' α -copaène dans le lait durant l'expérimentation pour les trois vaches	57
Figure 37 : cinétique de l'E-cadina-1(2),4-diène dans le lait durant l'expérimentation pour les trois vaches	57
Figure 38 : dégradation du γ -terpinène en terpinèn-4-ol d'après SCCP, 2008 [32]	62
Figure 39 : répartition des composés de l'huile essentielle de Tea tree dans différents compartiments de la peau d'après Capetti et al., 2020 [62]	63

Table des tableaux

Tableau 1 : caractéristiques morphologiques de la peau de différentes espèces d'après Netzlaff et al., 2006 [21]	22
Tableau 2 : récapitulatif des données toxicologiques disponibles pour les marqueurs utilisés dans cette étude	32
Tableau 3 : caractéristiques de l'huile essentielle d'eucalyptus citronné	37
Tableau 4 : caractéristiques de l'huile essentielle de litsée citronnée	37
Tableau 5 : caractéristiques de l'huile essentielle de tea tree	38
Tableau 6 : caractéristiques de l'huile essentielle de manuka	38
Tableau 7 : caractéristiques de l'huile essentielle de sauge sclarée	39
Tableau 8 : informations concernant les trois vaches de l'expérimentation.....	48
Tableau 9 : récapitulatif des C_{max} et T_{max} des deux marqueurs de l'huile essentielle d'Eucalyptus citronné.....	53
Tableau 10 : récapitulatif des C_{max} et T_{max} du marqueur de l'huile essentielle de Tea Tree	54
Tableau 11 : récapitulatif des C_{max} et T_{max} des deux marqueurs de l'huile essentielle de <i>Leptospermum scoparium</i>	56
Tableau 12 : récapitulatif des C_{max} et T_{max} des composés détectés.....	58
Tableau 13 : récapitulatif des données toxicologiques disponibles pour les trois composés détectés.....	58
Tableau 14 : pourcentages de quelques composés de l'huile essentielle de <i>Melaleuca alternifolia</i> en fonction son degré d'oxydation d'après Southwell, 2016 [61]	62

Table des annexes

Annexe 1 : liste out of scope de l'EMA	72
Annexe 2 : liste des 21 huiles essentielles inscrites au règlement (UE) n°37/2010 de la Commission du 22 décembre 2009 d'après Pôle Herbivore CA de Bretagne	74
Annexe 3 : caractéristiques et chromatographie de l'huile essentielle d'Eucalyptus citriodora (eucalyptus citronné).....	75
Annexe 4 : caractéristiques et chromatographie de l'huile essentielle de Litsea citrata (litsée citronnée).....	77
Annexe 5 : caractéristiques et chromatographie de l'huile essentielle de Salvia sclarea (sauge sclarée)	79
Annexe 6 : caractéristiques et chromatographie de l'huile essentielle de Melaleuca alternifolia (tea tree)	81
Annexe 7 : caractéristiques de l'huile essentielle de Leptospermum scoparium (manuka).....	83
Annexe 8 : liste des 10 marqueurs utilisés.....	84
Annexe 9 : liste des composés identifiés lors de l'analyse du mélange M1.....	84
Annexe 10 : limites de quantification pour les 11 terpènes présentant des coefficients de détermination > 0,98	85
Annexe 11 : tableau récapitulatif des concentrations des différents composés détectés	86

Introduction

Le premier plan Écoantibio mené par le ministère de l'agriculture auprès des différents acteurs de la santé vétérinaire s'est déroulé de 2012 à 2016. Il avait pour but de réduire et de raisonner l'utilisation des antibiotiques chez les animaux de production mais également chez les animaux de compagnie et les équidés afin de diminuer l'antibiorésistance et ainsi préserver les outils thérapeutiques en santé animale et humaine [1].

Les objectifs quantitatifs étaient d'obtenir une diminution de 25 % de l'utilisation des antibiotiques en médecine vétérinaire en cinq ans et de réduire l'utilisation des antibiotiques dits d'importance critique (notamment les céphalosporines de troisième et quatrième générations et les fluoroquinolones) [1].

Ce plan était articulé autour de cinq axes qui ont permis d'atteindre les objectifs en 2017, en passant par la sensibilisation et la communication auprès de tous les acteurs de la santé animale, en favorisant la recherche sur des alternatives à l'emploi des antibiotiques (favorisant leur substitution ou évitant leur utilisation par exemple), en renforçant la réglementation de la prescription-délivrance des antibiotiques, en mettant en place un meilleur suivi de l'utilisation de ces antibiotiques et des résistances engendrées, et enfin en communiquant sur ces mesures aux niveaux européen et international [1].

Ce premier plan Écoantibio a été suivi par le plan Écoantibio 2 qui se déroule en cinq ans également, de 2017 à 2021. Ce plan est toujours articulé autour des mêmes axes afin de consolider les actions et résultats obtenus lors d'Écoantibio 1 [2].

Dans ce cadre, il devient nécessaire de développer des traitements alternatifs à l'utilisation des antibiotiques. Cela passe par la prévention des maladies, l'utilisation de vaccins, l'amélioration des techniques d'élevage et le développement de la phytothérapie et de l'aromathérapie [2].

Dans la filière bovine, de 2011 à 2017, l'utilisation des antibiotiques a diminué de plus de 23 % notamment grâce à une forte diminution de l'utilisation des antibiotiques d'importance critique [3].

Cette réduction s'est également réalisée en parallèle de l'émergence de la phytothérapie et de l'aromathérapie en médecine bovine.

Aujourd'hui, le pourcentage d'exploitations agricoles se convertissant à l'agriculture biologique est en hausse chaque année, toutes productions animales confondues (Figure 1) [4].

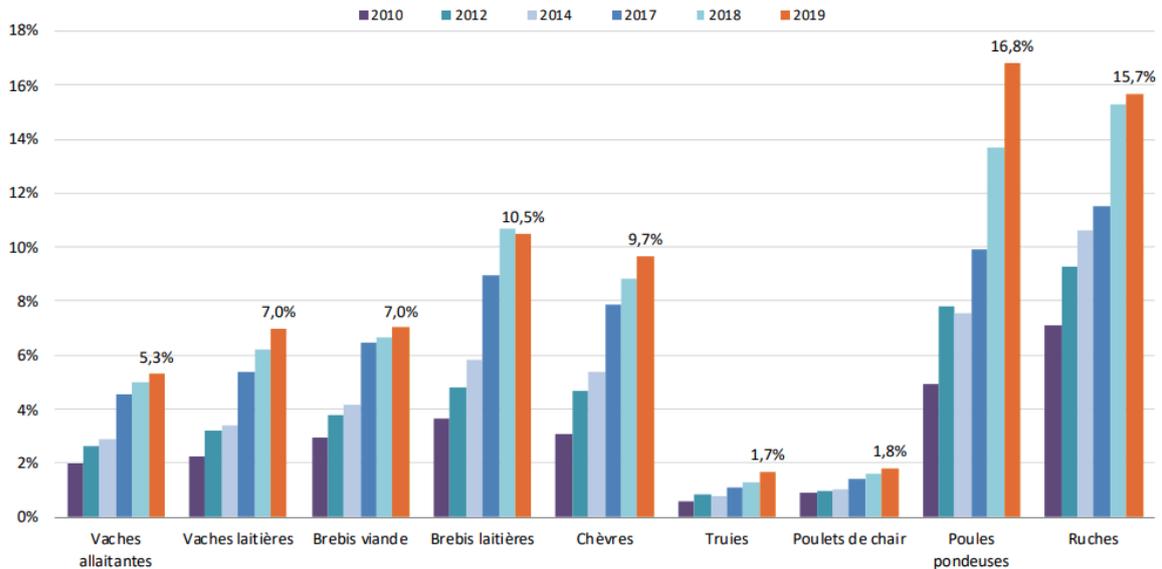


Figure 1 : évolution de la part des cheptels nationaux conduits en agriculture biologique de 2010 à 2019 d'après l'Agence BIO, 2020 [4]

Le cahier des charges de l'agriculture biologique est strict en ce qui concerne les traitements vétérinaires administrés à l'animal. En effet, sur une période de 12 mois, le bovin (allaitant ou laitier, de plus d'un an) ne peut recevoir plus de trois « médicaments vétérinaires allopathiques chimiques de synthèse ou antibiotique » [5]. Ces restrictions sont alors aussi en faveur du développement de traitements alternatifs.

A ce jour, la majorité des huiles essentielles utilisées comme traitement alternatif aux antibiotiques par les vétérinaires ou par les éleveurs, en auto-médication, sur les animaux de production, notamment les bovins laitiers ou allaitants, n'est pas autorisée par la réglementation. En effet, aucune donnée concernant les limites maximales de résidus dans les denrées alimentaires d'origine animale et donc le temps d'attente associé permettant la sécurité du consommateur ne sont connus pour ces huiles essentielles (non inscrites au tableau 1 du règlement 37/2010 ou à la liste « out of scope » de l'EMA (European Medicines Agency) respectivement en annexe 2 et 1) [6,7].

Cette étude a pour but d'identifier s'il existe ou non un risque à consommer des denrées issues d'animaux soumis à des traitements aromathérapiques. Ce serait alors un premier pas vers la sécurisation de l'utilisation de l'aromathérapie en production animale. Pour cela, il a été recherché la présence de résidus d'huiles essentielles dans le lait (et le sang) après application cutanée sur la mamelle de l'animal d'un mélange défini de cinq huiles essentielles.

Trois mélanges d'huiles essentielles ont été choisis. Le présent travail sera relatif au premier mélange composé d'huiles essentielles d'Eucalyptus citronné (*Eucalyptus citriodora*), de Litsée citronnée (*Litsea citrata*), de Tea tree (*Melaleuca alternifolia*), de Sauge sclarée (*Salvia sclarea*) et de Manuka (*Leptospermum scoparium ct cap est*).

I. Généralités sur les huiles essentielles et l'aromathérapie

1. Définition d'une huile essentielle

L'aromathérapie est une branche de la médecine utilisant les huiles essentielles en tant que médicament.

Selon l'article L. 5111-1 du Code de la Santé Publique, un médicament est défini comme étant : « toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales [...] [ou] pouvant être utilisée chez l'homme ou chez l'animal ou pouvant leur être administrée, en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier leurs fonctions physiologiques en exerçant une action pharmacologique, immunologique ou métabolique » [8].

Selon la pharmacopée européenne, une huile essentielle est un « produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, soit par un procédé mécanique approprié sans chauffage. L'huile essentielle est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition » [9].

2. Composition d'une huile essentielle

La plante aromatique ayant permis la production de l'huile essentielle est directement liée à sa composition. En effet, celle-ci est déterminée génétiquement mais l'expression de ces gènes peut fortement varier en fonction de multiples paramètres notamment : [10–12]

- *La nature du sol* : le pH influe la qualité des huiles essentielles. Certains minéraux comme le fer, le zinc, le manganèse ou le cuivre sont moins solubles dans les sols alcalins et donc moins disponibles pour les plantes.
- *Le climat* : la durée d'ensoleillement, la température, l'altitude, l'hygrométrie influencent la croissance des plantes mais peuvent également avoir un effet sur la prolifération de nuisibles tels que les insectes, les parasites et les micro-organismes qui peuvent avoir un effet négatif sur le rendement de la plante et la composition de l'huile essentielle. Par exemple, l'huile essentielle de sureau est composée en grande quantité de linalol qui est oxydé par la présence d'un champignon dans ses feuilles.
- *Le période de la récolte* : la composition chimique de la plante varie tout au long de la croissance de celle-ci. Des techniques chromatographiques sont utilisées par les producteurs pour déterminer le moment optimal de la récolte des plantes aromatiques.
- *Le type d'extraction* utilisé.

Ainsi, les huiles essentielles sont composées de diverses molécules et donc divers principes actifs tels que des phénols (thymol, carvacrol), des oxydes (eucalyptol), des terpénols (viridiflorol, géraniol), des cétones (italidione), des terpènes (γ -terpinène), des aldéhydes (géraniol), des éthers (acetate de linalyle) à l'origine de leurs actions thérapeutiques. [13]

Chaque huile essentielle utilisée est caractérisée par son nom de genre et d'espèce (exemple : *Eucalyptus citriodora*) mais également par son chémotype (exemple : *Leptospermum scoparium ct cap est*). Celui-ci est obtenu à la suite d'une chromatographie en phase gazeuse associée à une spectrométrie de masse qui permet de déterminer les composants chimiques majoritaires de l'huile [14].

Le rendement de production d'une huile essentielle est également très variable d'une plante aromatique à une autre. Par exemple pour produire un litre d'huile essentielle, il faut 50 kg de lavandin contre cinq tonnes de mélisse [15]. L'impact environnemental de production est alors très variable d'une huile essentielle à une autre.

3. Propriétés physico-chimiques

Les huiles essentielles sont volatiles, généralement liquides à température ambiante et peuvent cristalliser à basse température. Elles ne sont pas solubles dans l'eau mais sont lipophiles et facilement miscibles dans les huiles dites « grasses ». Leur densité est d'ailleurs souvent plus faible que celle de l'eau [10–12,14].

4. Voies d'administration – Résorption des principes actifs

Diverses modalités d'administration s'offrent au praticien (médecin, vétérinaire) quant à l'utilisation qu'il souhaite en faire. Ce choix conditionne la biodisponibilité des molécules actives des huiles essentielles, c'est-à-dire la quantité de principe actif (substance administrée et éventuellement ses métabolites actifs) atteignant la circulation sanguine et l'organe cible mais également la vitesse à laquelle ce principe actif y parvient.

[10,14,16,17]

a. Interface digestive

Cette interface est largement utilisée en médecine humaine. En effet, cette voie permet d'être précis quant à la quantité d'une ou de plusieurs huiles essentielles administrées. De plus aujourd'hui de nombreuses formes galéniques facilitent l'utilisation de cette interface (gélules, capsules, solutés huileux ou alcooliques, etc.). Ainsi différentes voies peuvent être envisagées :

- *Voie orale, buccale* : facile d'utilisation, la résorption des molécules actives commence dès le contact avec la cavité buccale car la langue est richement vascularisée. Les principes actifs contenus dans les huiles essentielles sont également résorbés tout le long du tractus digestif. La forme galénique permet alors de cibler la zone où l'huile essentielle doit être résorbée. Cette voie n'est pas privilégiée chez les ruminants car la résorption digestive est médiocre (volume des estomacs très important, flore du rumen dégradant les molécules).

- *Voie sublinguale* : elle permet un passage direct des principes actifs dans la circulation sanguine générale. Il apparaît clairement difficile d'employer cette voie en médecine vétérinaire.
- *Voie rectale* : le rectum étant richement vascularisé, la résorption des molécules s'effectue notamment via les veines hémorroïdales et permet aux principes actifs d'atteindre la circulation générale sans effet de premier passage hépatique. Chez les ruminants cette voie peut être utilisée, cependant ceux-ci ont tendance à déféquer fréquemment ce qui peut gêner l'absorption des huiles essentielles.

Il y a tout de même quelques contre-indications à l'utilisation des huiles essentielles via l'interface digestive. Certains composants des huiles essentielles peuvent être irritants pour la muqueuse gastro-intestinale et la muqueuse buccale, notamment en fonction de la concentration de ceux-ci dans la préparation administrée. Il est donc conseillé de ne pas les utiliser pures, mais diluées en mélange et adjointes à un support tels que des gélules par exemple.

La biodisponibilité par ces voies est très bonne et a été évaluée à plus de 10 fois celle d'huiles essentielles appliquées par voie cutanée.

b. Interface respiratoire

L'utilisation de cette interface permet de cibler les voies respiratoires supérieures (cavités nasales notamment) et les voies respiratoires inférieures. Pour avoir un effet maximal de l'administration des huiles essentielles par le biais de l'interface respiratoire, les cavités nasales doivent être nettoyées afin de ne pas avoir de gêne au passage des molécules lors de la respiration.

L'arbre respiratoire est une voie privilégiée d'utilisation des huiles essentielles grâce à sa vascularisation importante. Deux voies sont possibles :

- *Aérosolthérapie* : via l'utilisation de système diffuseurs tels que des nébuliseurs ou des brumisateurs diffusant les huiles essentielles en fines particules (moins de 3 microns).
- *Inhalation* : cette technique est largement utilisée en médecine humaine, utilisée en médecine des carnivores domestiques, mais est compliquée à mettre en œuvre dans le cadre de la médecine des animaux de production (gabarit des animaux, nécessité d'un temps de contact long, etc.).

Il est fortement déconseillé d'utiliser les huiles essentielles riches en phénols et aldéhydes qui peuvent irriter les voies respiratoires.

c. Interface génito-urinaire

Il est possible d'administrer des ovules ou des suppositoires vaginaux renfermant des huiles essentielles, lentement résorbées par les voies génitales.

d. Interface oculaire et auriculaire

La voie oculaire est difficile d'utilisation car les huiles essentielles sont souvent irritantes pour la muqueuse oculaire. Celles-ci sont administrées généralement dans des mélanges huileux.

La voie auriculaire est contre-indiquée pour l'utilisation des huiles essentielles pures. Cependant elles peuvent être appliquées via une solution huileuse.

e. Interface cutanée

Lors de cette expérimentation, nous avons privilégié la voie cutanée, notamment au niveau de la mamelle de la vache. C'est également la voie la plus utilisée en aromathérapie.

La résorption cutanée de la majorité des huiles essentielles est rapide : de quelques minutes, par exemple environ 2 minutes pour le linalol de l'huile essentielle de lavande administrée à un cheval [18] à quelques heures. C'est ce qui en fait une bonne voie d'utilisation pour ce type de composé, l'action étant alors, soit topique, soit systémique en fonction notamment de leur concentration.

Sur la peau, l'application pure d'huile essentielle est rare, elle est généralement mélangée à une huile végétale favorisant son absorption.

Les voies utilisées sont les suivantes :

- *Onction* : c'est l'application d'une huile essentielle ou d'un mélange d'huiles essentielles sur la peau.
- *Perfusion aromatique* : c'est l'application de l'huile essentielle sur des zones richement vascularisées tels que le creux du coude ou la face palmaire du poignet par exemple. Cette voie est notamment utilisée en cas d'« urgence » car la résorption chez l'Homme est très rapide (quelques secondes) et permet d'éviter l'effet de premier passage hépatique.

L'utilisation d'huiles essentielles dermocaustiques et photosensibilisantes est à proscrire par ces voies.

f. Voie parentérale

L'administration d'huiles essentielles, pures ou diluées dans l'espace sous-cutané, intramusculaire ou intraveineux est totalement contre-indiqué. Quelques exceptions peuvent être faites mais elles ne seront pas détaillées ici.

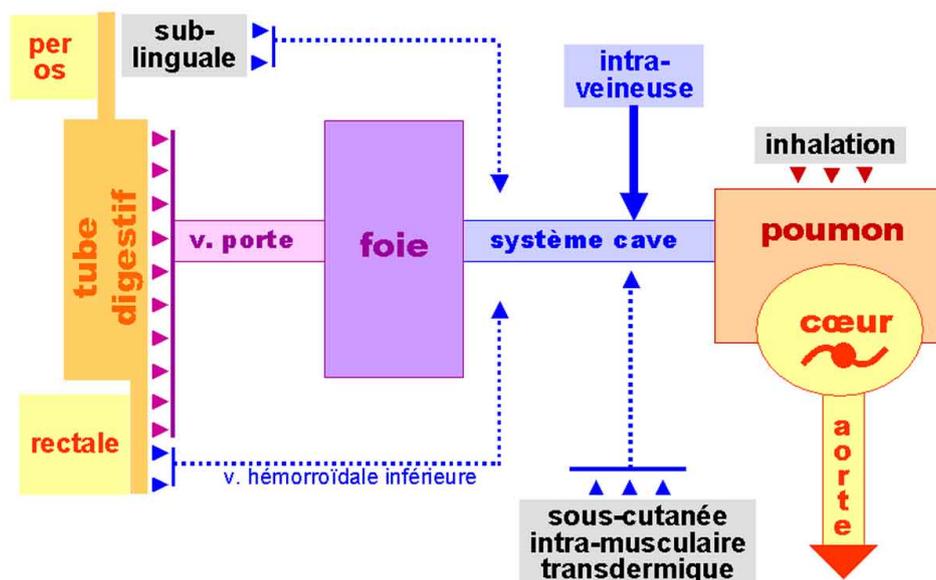


Figure 2 : représentation des différentes voies d'administration des médicaments d'après PHARMACOMédicale.org

5. Pharmacocinétique des huiles essentielles

La pharmacocinétique est l'étude du devenir des xénobiotiques (ici les huiles essentielles) dans l'organisme. Elle se divise en plusieurs étapes : l'absorption, la distribution, les biotransformations aussi appelées métabolisations et enfin l'élimination.

Ici, nous nous attarderons surtout au devenir des huiles essentielles après application cutanée et notamment sur la mamelle de la vache.

a. Absorption

L'absorption correspond à l'entrée du xénobiotique dans l'organisme et donc son arrivée jusqu'à la circulation générale. Cette étape se divise généralement en deux étapes : la résorption et l'effet de premier passage hépatique (lorsque le principe actif est résorbé par voie orale).

La peau est un organe qui a primitivement un rôle de barrière et donc de protection contre les agents extérieurs (physiques ou chimiques) auxquels elle pourrait être soumise. Elle est composée de multiples couches permettant de répondre à cette fonction. La couche impliquée dans ces rôles est surtout le *stratum corneum* ou couche cornée (située dans l'épiderme), associée au film hydrolipidique recouvrant l'ensemble de l'épiderme (Figure 3). En effet, la couche cornée est composée de cellules apoptotiques et anucléées appelées cornéocytes, riches en kératine qui sont entourées d'une matrice lipidique extracellulaire formant une couche cellulaire solide et résistante, cette couche est également composée de nombreux lipides [17,19,20].

Le passage de cette couche correspond à la **phase de pénétration**.

Les molécules qui pourront être absorbées au niveau de cette barrière devront répondre à certaines caractéristiques physico-chimiques. Elles doivent être amphiphiles et de faible poids

moléculaire pour traverser la couche cornée par diffusion passive. De plus, la présence de brèches cutanées favorise l'absorption de molécules [16,17].

L'utilisation de la température (par exemple lors de massages) ainsi que l'emploi d'un vecteur tel qu'une solution hydrolipidique permet une meilleure pénétration des huiles essentielles. Par ailleurs, plus la zone traitée à l'aide de l'huile essentielle est vascularisée, meilleure sera l'absorption [16,17].

Plusieurs mécanismes permettent le franchissement de l'épiderme. Les molécules peuvent passer entre les cellules grâce à leur liposolubilité. Elles peuvent emprunter les glandes sudoripares ou les follicules pileux (plus ceux-ci sont nombreux meilleure est l'absorption). Elles peuvent aussi suivre les faisceaux de kératines intercellulaires (Figure 3) [19].

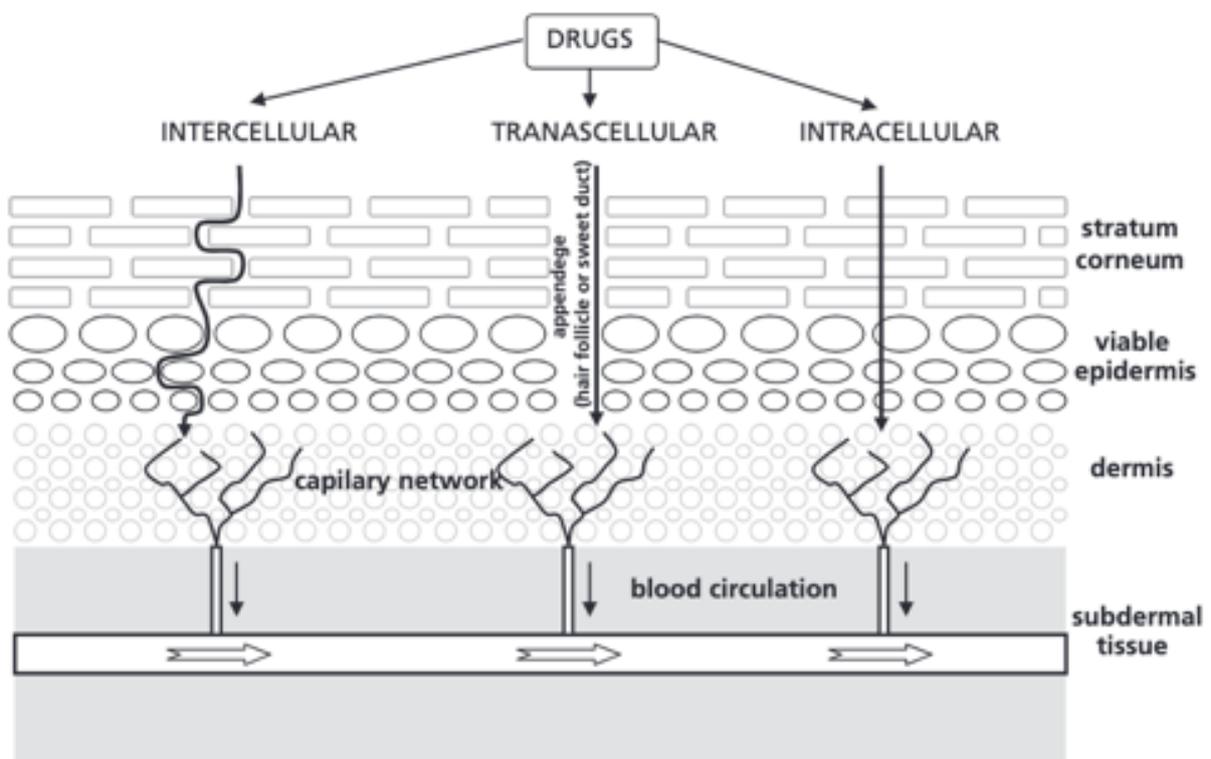


Figure 3 : mécanismes de pénétration cutanée d'un principe actif d'après Herman and Herman, 2015 [19]

Une fois la couche cornée franchie, l'absorption au travers des autres couches de la peau est plus aisée car la surface est dite « désépithélialisée » [16].

C'est alors que commence la **phase de résorption** qui correspond au passage des molécules dans la circulation sanguine ou lymphatique.

Comme vu précédemment, les composants des huiles essentielles ont une résorption rapide (Figure 4) [10], cependant la plupart des études réalisées sont menées sur des rongeurs, le Porc ou l'Homme [20].

Temps de résorption cutanée de quelques molécules aromatiques et huiles essentielles

20 min	20 à 40 min	40 à 60 min	60 à 80 min	100 à 120 min
α-pinène térébenthine 1,8-cinéole	eucalyptus sp. thym à thymol eugéno linalol ac. de linalyle ac. de géranyle anéthole mét. nonyl cétone	bergamote anis citron (z.) salicylate de mét.	pin sp. (aig.) lavande vraie géranium citronnelle Ceylan cinnamaldéhyde	coriandre géraniol rue citrais menthe poivrée

Figure 4 : temps de résorption cutanée de différents composants d'huiles essentielles d'après Franchomme et al., 1990 [10]

Une étude de 2006, a comparé la perméabilité de la peau de la mamelle de vache, de la peau humaine et de la peau porcine vis-à-vis de différentes molécules (caféine, acide benzoïque, testostérone et acide flufénamique). La peau de la mamelle de bovin s'est révélée être deux à trois fois plus perméable que la peau humaine [21].

Ces variations de perméabilité peuvent notamment s'expliquer par des différences morphologiques entre des peaux animales (Tableau 1) [21].

Tableau 1 : caractéristiques morphologiques de la peau de différentes espèces d'après Netzlaff et al., 2006 [21]

Type de peau	Humaine	Porcine	Mamelle de bovin
Nombre de follicule pileux (/cm ²)	6	30 – 36	207 – 338
Profondeur des follicules pileux (cm)	1,8 – 2,5	1,3 – 3,5	1,5
Épaisseur de l'épiderme (µm)	57 – 82	40	54 – 92

Ainsi, plus le nombre de follicules pileux est élevé, meilleure sera l'absorption des principes actifs. Au contraire, plus l'épiderme est épais, moins la pénétration sera facilitée. Le profil lipidique de la peau semble également avoir son influence, la peau de la mamelle étant moins riche en lipides (notamment triglycérides, céramides, etc.) que la peau humaine [21].

De plus, chez l'Homme, la capacité des molécules à pénétrer la peau est notamment dépendante de l'âge, du sexe, mais également de la région du corps [21].

b. Distribution et circulation sanguine mammaire

Cette étape est peu décrite dans la littérature en ce qui concerne les huiles essentielles et leurs composants. La distribution des molécules est régie par leurs caractéristiques physico-chimiques, leur concentration et la voie par laquelle elles sont administrées. La plupart des

constituants des huiles essentielles sont liposolubles et sont donc plus affins pour les organes riches en lipides tels que le cerveau, le foie, le rein ou la mamelle.

Seules les molécules sous forme libre sont distribuées aux organes cibles et ont une action biologique. Par conséquent, le pourcentage de molécules sous forme liées aux protéines plasmatiques (notamment liées à l'albumine, appelée fraction liée) est un facteur limitant la distribution des principes actifs dans les tissus.

Par ailleurs, l'acheminement des molécules aux organes cibles s'effectue via la circulation sanguine générale. C'est pourquoi plus l'organe cible est vascularisé, plus il reçoit de molécules biologiquement actives [17]. La concentration dans les tissus cibles en molécule active est également dépendante de la capacité de celle-ci à franchir l'endothélium vasculaire [16].

Notre étude est relative à l'application d'un mélange de cinq huiles essentielles (huiles essentielles *Eucalyptus citriodora*, *Litsea citrata*, *Melaleuca alternifolia*, *Salvia sclarea* et *Leptospermum scoparium ct cap est*) sur le quartier avant droit de la mamelle de trois vaches. Il est donc important de s'intéresser au devenir des molécules administrées à cet endroit précis.

Une fois la peau franchie, les huiles essentielles peuvent être stockées dans la citerne de la mamelle. Elles atteignent ensuite la circulation sanguine générale via le réseau artériel et veineux du sinus lactifère puis les veines mammaires crânielles et caudales. Ces vaisseaux cheminent jusqu'à la veine cave caudale et le cœur afin d'être ensuite dirigé vers le réseau artériel (Figure 5). Ainsi les composants des huiles essentielles sont distribués à tous les tissus et peuvent avoir une action systémique. Il est estimé qu'au moins 500 L de flux sanguin est nécessaire pour produire 1 L de lait ; la mamelle est donc un organe très vascularisé [22].

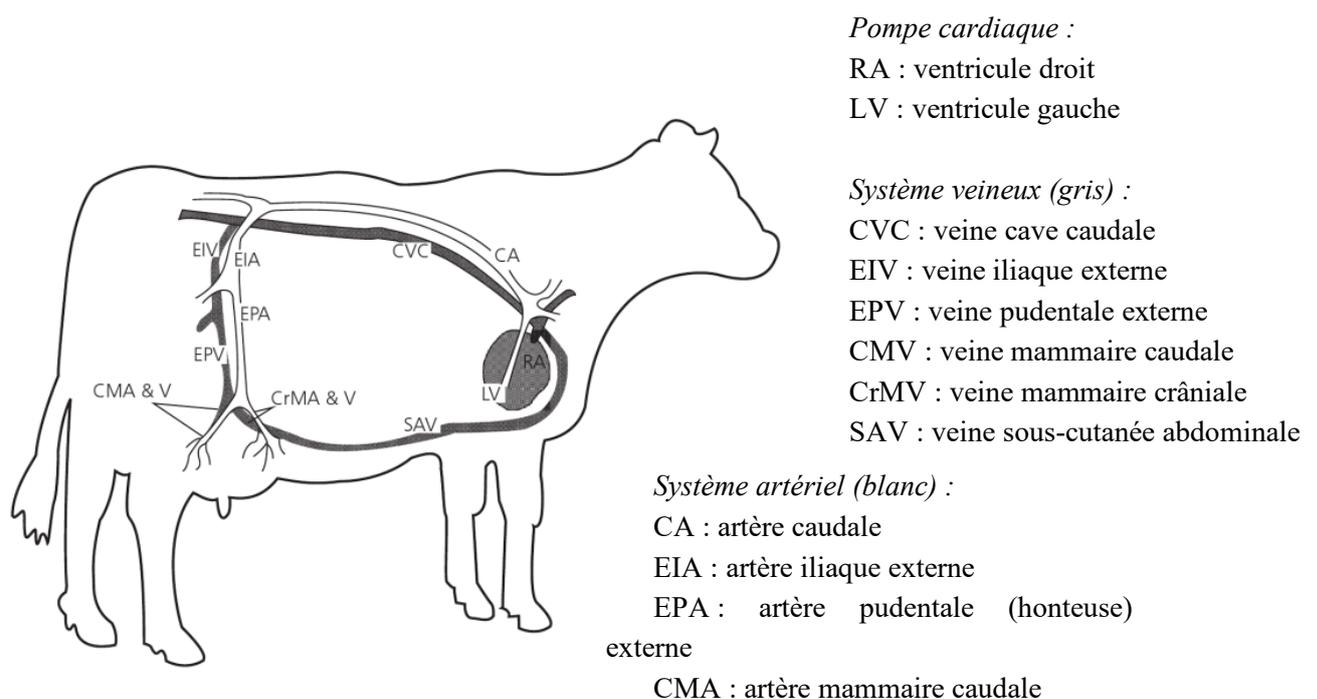


Figure 5 : système vasculaire de la mamelle de la vache d'après Reece, 2015 [22]

c. Biotransformations

Le rôle majeur des biotransformations ou de la métabolisation est de faciliter l'élimination de xénobiotiques. Le but est de rendre ceux-ci plus hydrosolubles et polaires par le biais de nombreuses réactions de phase I (oxydations, réductions, hydrolyses) et/ou de phase II (conjugaisons) qui ont lieu majoritairement dans le foie [16,17,22].

L'ensemble de ces réactions se déroule donc en deux phases (I et II) et peuvent aboutir à trois types de métabolites : inactif, moins actif ou plus actif que le xénobiotique initial.

- *Phase I* : ensemble des réactions d'oxydation, de réduction, d'hydrolyse visant à polariser le xénobiotique. Ces réactions sont réalisées en majorité par le cytochrome P450 présent dans les hépatocytes, mais également au niveau du rein, des intestins, de la peau, etc.
- *Phase II* : phase de conjugaison. Les métabolites issus de cette phase sont conjugués à d'autres groupements moléculaires (tels que l'acide glucuronique, la glycine, la cystéine, la méthionine, le sulfate, l'acétyl) et sont alors hydrophiles et polaires, permettant leur élimination par le rein, la vésicule biliaire et l'intestin. Ces métabolites conjugués issus de la phase II sont généralement inactifs.

Les huiles essentielles étant composées parfois de plus d'une centaine de molécules, le suivi des métabolites primaires et secondaires est très difficile. Cependant de nombreuses études ont étudié ces biotransformations, *in vivo* et *in vitro*, chez l'Homme, le Rat, le Chien, etc., mais rarement voire jamais chez les ruminants et notamment les bovins [23].

d. Élimination

Le rein ainsi que la vésicule biliaire sont les deux organes majoritairement à l'origine de l'élimination des xénobiotiques, sous forme métabolisée ou non [16].

Les xénobiotiques peuvent également être éliminés par la glande mammaire, les glandes sudoripares, la salive, les poumons, etc., cependant ces voies restent minoritaires [16].

i. *Élimination rénale*

Les xénobiotiques excrétés par le rein sont hydrosolubles et de faible poids moléculaire (inférieur à 300). Plusieurs mécanismes permettent leur élimination dans les urines : la **filtration glomérulaire** pour les formes libres des molécules par transport passif via les glomérules rénaux ; la **sécrétion tubulaire** via un transport actif au niveau du tube contourné proximal ; la **réabsorption tubulaire passive** pH-dépendante par diffusion simple via le tube contourné distal et le tube collecteur, plutôt pour les molécules liposolubles et ionisables [16].

Tous ces mécanismes sont dépendants du débit de filtration glomérulaire. L'élimination est généralement rapide lorsque les molécules sont faiblement liposolubles et ionisables [16].

ii. Élimination biliaire

Cette voie est privilégiée pour les xénobiotiques ou métabolites secondaires de poids moléculaire plus élevé (supérieur à 300) et possédant des groupements polaires. Les molécules sont excrétées par transport actif. Le contenu de la vésicule biliaire est ensuite déversé dans le duodénum afin d'être éliminé dans les selles. Cependant certains métabolites peuvent subir de nouvelles transformations, notamment par des réactions d'hydrolyses médiées par les bactéries commensales du tube digestif. Ces modifications peuvent permettre la réabsorption de molécules actives dans la circulation sanguine générale [16].

L'élimination est aussi déterminée par la demi-vie des xénobiotiques qui semble être relativement courte pour les composés des huiles essentielles et également dépendante de la teneur en tissu adipeux [17].

L'ensemble des étapes de biotransformations et élimination sont résumées sur la figure 6.

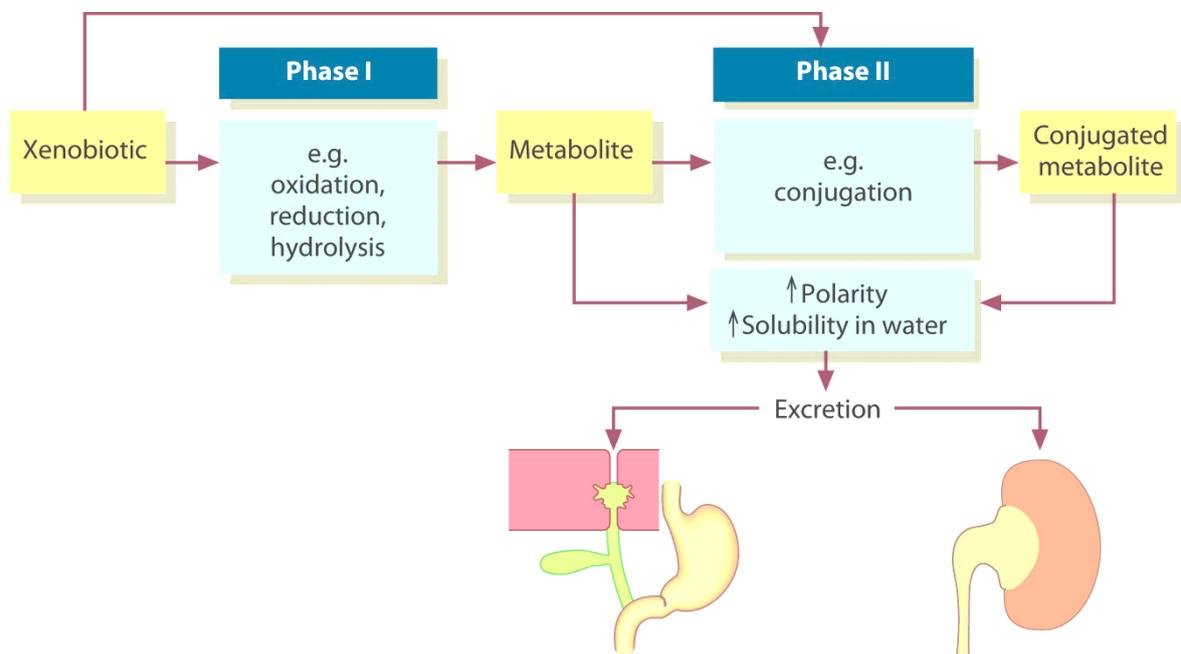


Figure 6 : biotransformation et élimination d'un xénobiotique d'après Dancygier, 2010 [24]

6. Toxicité des huiles essentielles

La toxicité d'un principe actif est dépendante du mode d'administration, de la dose administrée, de la biodisponibilité de la molécule, de sa répartition dans l'organisme, mais aussi des mécanismes de biotransformation et d'élimination. [17]

Afin de permettre l'utilisation des huiles essentielles en alternative aux antibiotiques dans le traitement des mammites, il faut s'assurer de l'innocuité de celles-ci pour l'animal (par voie cutanée) et pour l'Homme (par voie orale après ingestion de denrée animale, ici le lait).

a. Différents types de toxicité

On peut définir plusieurs types de toxicité, en fonction de la durée d'utilisation des huiles essentielles [10,25,26].

La **toxicité aiguë** apparaît chez un organisme vivant après une exposition à dose unique et élevée d'une substance ou d'une préparation. L'évaluation de cette toxicité se traduit par la détermination d'une « Dose Létale 50 » (DL50 en mg/kg), c'est-à-dire d'une dose provoquant la mort de 50 % des individus après une administration unique du produit testé. Cet indicateur est calculé statistiquement après des essais de toxicité aiguë, généralement réalisés chez des petits animaux tels que des rats, des souris ou des lapins. Cela nous permet également de déterminer les signes cliniques associés à une exposition importante du produit. Ces essais peuvent se réaliser par administration *per os* du produit (par gavage via l'alimentation ou l'eau de boisson par exemple) mais également par voie cutanée, par inhalation ou par voie parentérale.

En fonction de la valeur de la DL50, on peut définir une échelle de toxicité pour un composé [11] :

- *Toxique* : $DL50 < 1 \text{ g/kg}$
- *Modérément toxique* : $1 \text{ g/kg} < DL50 < 2 \text{ g/kg}$
- *Peu toxique* : $2 \text{ g/kg} < DL50 < 5 \text{ g/kg}$
- *Non toxique* : $DL50 > 5 \text{ g/kg}$

La **toxicité à terme**, après administration répétée sur une durée plus ou moins longue (allant d'une dizaine de jours à plusieurs années) d'une substance ou d'une préparation. Elle nous permet d'établir un « No Observed Adverse Effect Level » (NOAEL en mg/kg/j) aussi appelé « Dose Sans Effet Toxique Observé » (DSEO). Cet indicateur correspond à la dose de produit qui ne provoque pas d'effet toxique par rapport au lot d'animaux témoins non exposés au même produit. D'autres indicateurs peuvent être employés pour caractériser la toxicité à terme, mais ceux-ci ne seront pas développés. La durée de l'étude de toxicité est corrélée à la durée d'utilisation prévue du toxique en pharmacologie, cosmétique ou agroalimentaire. Comme pour les essais de toxicité aiguë, les animaux utilisés sont généralement des rats, des souris, des lapins, etc. Il en est de même pour les voies d'administration utilisées.

L'ensemble des lignes directrices de ces essais est régi par l'OCDE (Organisation de Coopération et de Développement Économiques).

Ainsi les huiles essentielles peuvent présenter : une toxicité cutanée (notamment par photosensibilisation, dermocausticité, allergie de contact), une toxicité pulmonaire, une toxicité cardiovasculaire, une toxicité rénale, une toxicité digestive, une toxicité hépatique, une neurotoxicité, une cancérogénicité ou des propriétés « hormon-like ».

b. Fixation d'une limite maximale de résidus (LMR) et d'un temps d'attente

Lorsque les animaux producteurs de denrées sont traités avec un produit contenant une substance pharmacologiquement active, celle-ci et ses métabolites peuvent être stockés en plus ou moins grande quantité dans la viande ou le lait par exemple. Ainsi, afin de protéger la santé du consommateur, il est nécessaire de fixer une « Dose Journalière Admissible » (DJA en mg/kg/j), qui correspond à une estimation de la quantité de résidus présents dans l'alimentation qui peut être ingérée quotidiennement et toute la vie du consommateur sans risque appréciable pour sa santé. L'obtention de cette DJA nous permet par la suite de déterminer une « Limite Maximale de Résidus » (LMR) dans un aliment donné. Si l'on dépasse cette LMR, l'aliment n'est pas commercialisé car il y a un risque toxicologique pour le consommateur.

Pour ne pas dépasser ces LMR et risquer la non commercialisation de la denrée, des « Temps d'Attente » (TA en jours avant abattage ou récolte de la denrée) ont été fixés. Ils sont dépendants de la cinétique de décroissance du principe actif et de ses métabolites dans la denrée concernée et de l'espèce animale [27].

c. Toxicité des composés des huiles essentielles

Ainsi, nous allons étudier la toxicité générale des huiles essentielles puis étudier les données disponibles sur la toxicité des marqueurs sélectionnés dans le cadre de cette étude.

iii. *Les aldéhydes terpéniques*

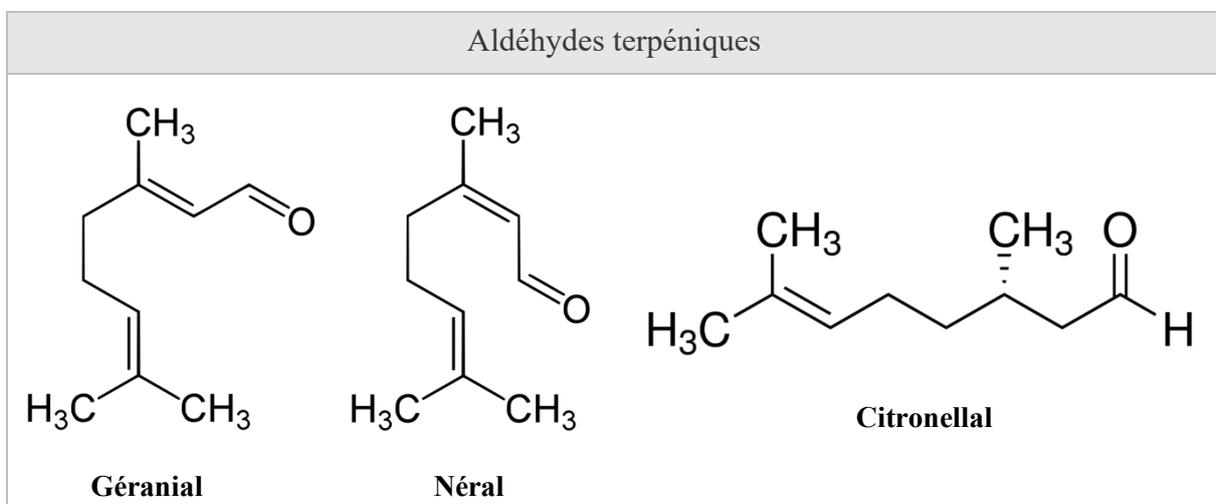


Figure 7 : Formules topologiques du géraniol, nérol et citronellal d'après Molbase et Sigma Aldrich

Le **géraniol** et le **nérol** sont les deux composés utilisés comme « marqueur » de l'huile essentielle de *Litsea citrata*. Ce sont deux stéréo-isomères du **citral**, appelés respectivement

citral a et citral b. Les données toxicologiques de la littérature font rarement la différence entre les deux composés et étudient la toxicité du citral comme étant composé à moitié de géraniol et à moitié de néral.

D'après le rapport de l'OCDE sur le citral, la toxicité aiguë chez les rongeurs après administration orale ou cutanée a permis de déterminer une DL50 supérieure à 1 000 mg/kg : certains animaux présentaient, après une administration cutanée, des irritations de la peau (chez le Lapin) ou une sensibilisation de la peau (chez le cochon d'Inde). Chez le rat, la NOAEL par voie orale est de 200 mg/kg/j [28].

Une DJA a été déterminée entre 0 et 0,5 mg/kg/j par le Comité d'experts FAO/OMS sur les additifs alimentaires (JECFA pour « Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives »). De plus, la consommation quotidienne estimée en Europe du citral est de 114 mg/kg/j [29].

Le **citronellal** est un des « marqueurs » utilisé pour l'huile essentielle d'*Eucalyptus citriodora*. Il est utilisé comme agent aromatisant dans l'alimentation [30].

Les études de toxicité aiguë par voie orale chez le Rat ont permis de déterminer une DL50 supérieure à 5 000 mg/kg [30].

Il est considéré qu'en Europe la dose journalière ingérée est de 16 µg/kg/j. Le JEFCA indique qu'à ces niveaux il n'y a pas de problème pour la santé du consommateur [29].

iv. Les alcools monoterpéniques

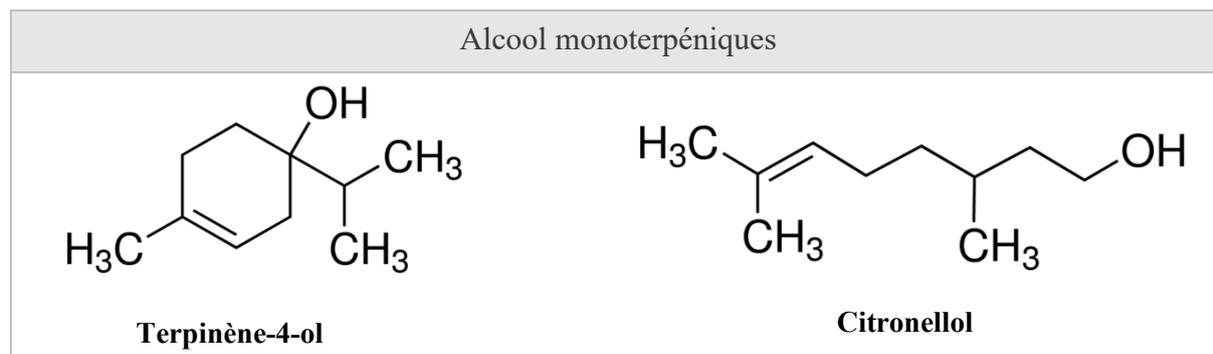


Figure 8 : formules topologiques du terpinène-4-ol et du citronellol d'après Sigma Aldrich

Le **terpinène-4-ol** est un des « marqueurs » utilisés pour l'huile essentielle *Melaleuca alternifolia*. Il s'agit du composant majoritaire de cette huile essentielle (Annexe 6). D'après les données de PubChem, les études de toxicité aiguë par voie orale déterminée chez le Rat et la Souris ont permis de déterminer une DL50 comprise entre 1 016 et 1 300 mg/kg. Les signes observés sont de l'ataxie et de la léthargie. Une DL50 de 5 000 mg/kg a été déterminée à la suite d'un essai de toxicité aiguë par voie cutanée chez le Lapin [30].

Une NOAEL par voie orale de 400 mg/kg/j a été fixée suite à une étude de toxicité rénale chez le Rat [31,32].

Il est considéré qu'en Europe la dose journalière ingérée est de 150 µg/habitant/j soit 1,2 µg/kg/j [33]. Le JEFCA indique qu'à ces niveaux il n'y a pas de problème pour la santé du consommateur [34].

Le **citronellol** est le deuxième « marqueur » utilisé pour l'huile essentielle d'*Eucalyptus citriodora*. Ce composé est utilisé dans l'industrie alimentaire comme arôme alimentaire [30].

Les études de toxicité aiguë ont permis de fixer une DL50 par voie cutanée chez le Lapin de 2 650 mg/kg et par voie orale chez le Rat de 3 450 mg/kg [35].

Chez le Rat également, la NOAEL par voie orale est de 50 mg/kg/j [35].

Selon le rapport JECFA, la DJA fixée est de 0-0,5 mg/kg/j sachant qu'il est estimé en Europe que la dose journalière moyenne ingérée est de 6,2 µg/kg/j [36].

v. Les monoterpènes

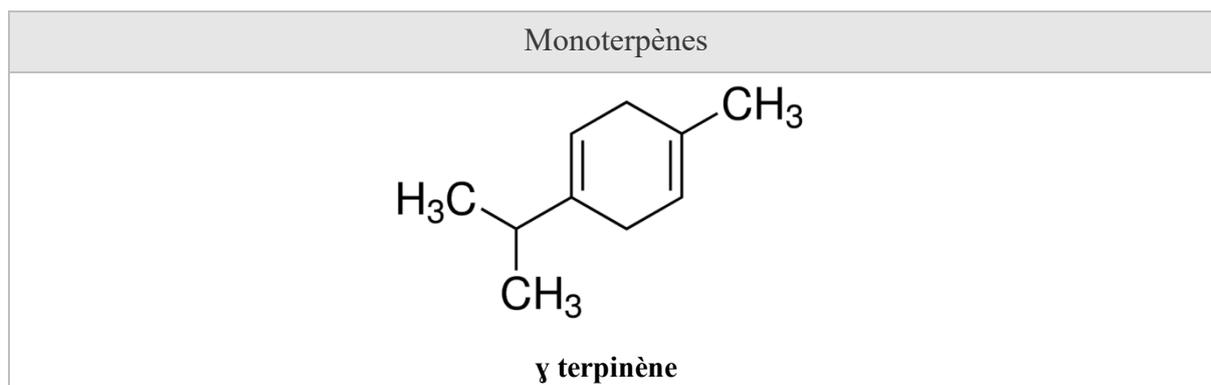


Figure 9 : formule topologique du γ-terpinène d'après Sigma Aldrich

Le **γ terpinène** est le deuxième « marqueur » de l'huile essentielle de *Melaleuca alternifolia*. Peu de données sont disponibles dans la littérature concernant la toxicité de ce terpène. D'après les données de PubChem sur ce monoterpène, les études de toxicité aiguë chez le Rat ont permis de fixer une DL50 par voie orale à 3 650 mg/kg [30].

vi. Les esters terpéniques

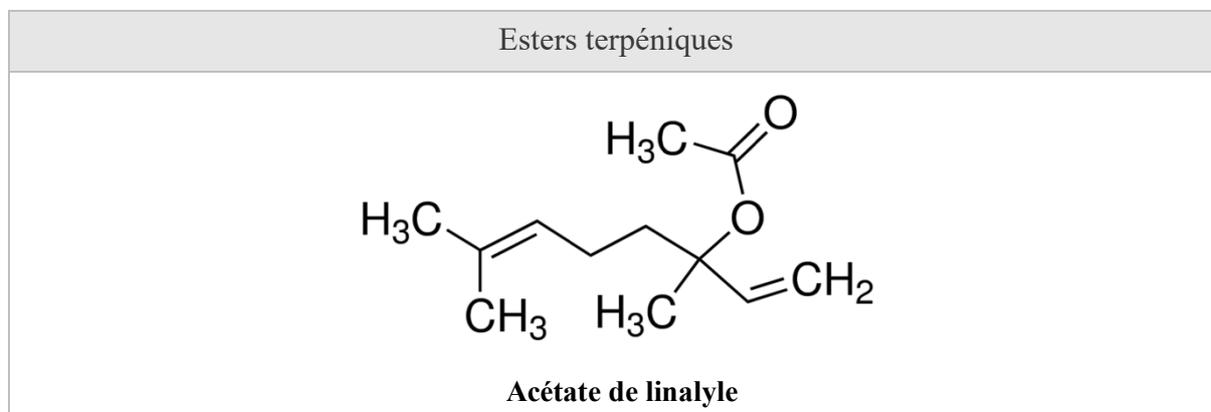


Figure 10 : formule topologique de l'acétate de linalyle d'après Sigma Aldrich

L'**acétate de linalyle** est un des « marqueurs » de l'huile essentielle de *Salvia sclarea*. Il est utilisé dans l'industrie cosmétique comme composant de certains shampoings, savons, déodorants et est également utilisé dans la composition de produits ménagers [37].

D'après le rapport de l'OCDE et les données de PubChem sur cet ester terpénique, les études de toxicité aiguë chez le Lapin, le Rat et la Souris ont permis de fixer une DL50 par voie orale à 12 000 mg/kg. Les signes cliniques présentés par les animaux étaient de l'ataxie et de la somnolence pouvant aller jusqu'au coma. Un essai de toxicité aiguë par voie cutanée effectué chez le lapin n'a montré aucun signe clinique avec une DL50 alors supérieure à 5 000 mg/kg [30,38].

Chez l'Homme, il ne semble pas y avoir d'irritation cutanée ou de sensibilisation cutanée. Cependant, chez le Cochon d'Inde, l'acétate de linalyle semble modérément irritant alors que chez le Lapin il paraît être sévèrement irritant. Par contre, le Porc miniature ne présentait pas d'irritation cutanée après l'application de 50 mg d'acétate de linalyle pendant 48 heures [37].

La toxicité à terme de l'acétate de linalyle n'a pas été étudiée. Les données de toxicologies disponibles sont basées sur le linalol, un alcool terpénique, supposé produit de dégradation de l'acétate de linalyle dans le tractus digestif. Une étude conduite chez le rat permet de déterminer une NAOEL par voie orale de 160 mg/kg/j pour le linalol équivalent à 148 mg/kg/j pour l'acétate de linalyle [38].

Une DJA a été déterminée entre 0 et 0,5 mg/kg/j par le Comité d'experts FAO/OMS sur les additifs alimentaires [39].

vii. Les diterpénols

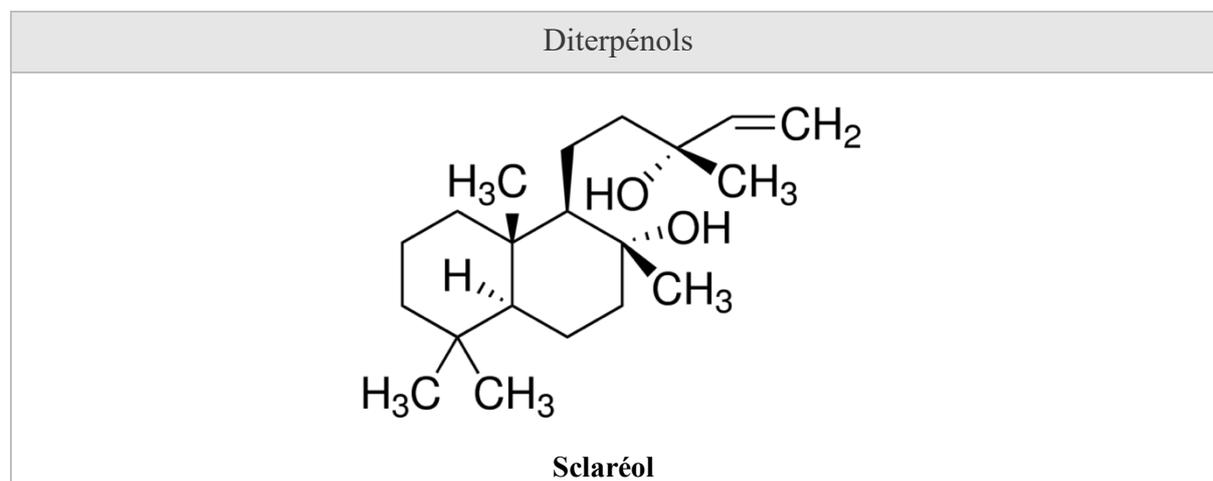


Figure 11 : formule topologique du sclaréol d'après Sigma Aldrich

Le **sclaréol** est le deuxième « marqueur » de l'huile essentielle de *Salvia sclarea*. Il est utilisé dans l'industrie cosmétique dans de nombreux produits (parfums, shampoings, etc.) mais également en tant qu'arôme alimentaire [30].

Ainsi, de nombreuses données de toxicologiques sont disponibles. La DL50 du sclaréol est supérieure à 5 000 mg/kg que ce soit pour les études de toxicité aiguë par voie orale ou par voie cutanée chez le Rat ou le Lapin. Les seuls signes rapportés sont une diminution de la fréquence respiratoire avec une augmentation de l'amplitude des respirations mais également une augmentation de l'activité motrice [30,35,40].

Une NOAEL de 8,8 mg/kg/j est fixée pour les études de toxicité à terme chez le Rat, avec quelques variations de rapport de poids moyen (rein/cerveau et cœur-rate/cerveau) à cette dose

mais sans répercussions macro-, microscopique, histopathologique ou variation des enzymes hépatiques [40].

De plus, aucune DJA n'a été déterminée car selon le JECFA et l'EFSA (European Food Safety Authority), le sclaréol est considéré comme ne présentant pas de problème de sécurité pour le consommateur lorsque celui-ci est utilisé comme additif alimentaire [35,40].

viii. *Les tricétones cycliques*

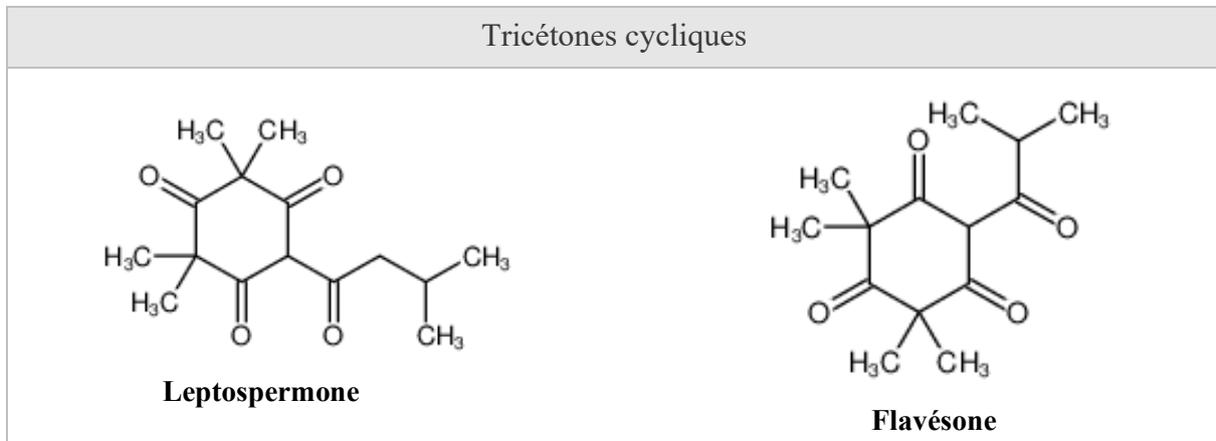


Figure 12 : formules topologiques du leptospermone et du flavésone d'après Molbase

La **leptospermone** est un des « marqueurs » de l'huile essentielle de *Leptospermum scoparium*.

La **flavésone** est le deuxième « marqueur » de l'huile essentielle de *Leptospermum scoparium*.

Concernant ces deux composés, très peu de données sont disponibles. Ils sont tous les deux utilisés comme herbicide ou insecticides [41,42]. Les seules informations toxicologiques sont relatives à des insectes ou des plantes.

Tableau 2 : récapitulatif des données toxicologiques disponibles pour les marqueurs utilisés dans cette étude

Huile essentielle	Marqueur	DL50 (mg/kg)		NOAEL (mg/kg/j)	DJA (mg/kg/j)
		Cutanée	Orale		
<i>Eucalyptus citriodora</i>	Citronellal	/	> 5 000	/	Pas de risque ¹
	Citronellool	3 450	2 650	50	0 – 0,5
<i>Litsea citrata</i>	Néral	> 1 000	> 1 000	200	0 – 0,5
	Géranial				
<i>Melaleuca alternifolia</i>	γ -terpinène	/	3 650	/	Pas de risque ¹
	Terpinèn-4-ol	/	1 016	400	Pas de risque ¹
<i>Leptospermum scoparium</i>	Leptospermone	/	/	/	/
	Flavésone	/	/	/	/
<i>Salvia sclarea</i>	Acétate de linalyle	> 5 000	12 000	148	0 - 0,5
	Sclaréol	> 5 000	> 5 000	8,8	Pas de risque ¹

¹Pas de risque pour la santé du consommateur aux doses utilisées comme agent aromatisant dans l'alimentation.

/ : absence de données toxicologique disponible.

7. Aspect réglementaire de l'utilisation des huiles essentielles

Actuellement il est difficile de prouver l'efficacité des huiles essentielles car leur effet thérapeutique est souvent moins évident que celui des antibiotiques (ou autres classes de médicaments). Ainsi l'ANSES (Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail) considère que pour obtenir une autorisation de mise sur le marché (AMM), une huile essentielle doit montrer son innocuité envers l'animal, l'utilisateur du produit mais aussi le consommateur de la denrée animale [9].

125 plantes sont inscrites au tableau 1 du règlement (UE) n°37/2010 de la Commission du 22 décembre 2009, dont seulement 21 huiles essentielles, 3 d'entre elles étant uniquement réservées à un usage topique (Annexe 2). Pour celles-ci, aucune LMR (limite maximale de résidus) n'est requise (comme pour celles qui sont sur la liste « out of scope » de l'EMA en annexe 1) [6]. Seules les huiles essentielles de ces plantes sont donc utilisables chez les animaux producteurs de denrées alimentaires. Si en plus, la prescription se fait dans le cadre de la « cascade » (article L. 5143-4 du Code de la Santé Publique et Arrêté du 4 mai 2010), le temps d'attente doit être d'au moins 7 jours pour le lait et 28 jours pour la viande et les abats. Ces durées sont doublées en agriculture biologique [43,44].

Il paraît donc évident que la plupart des huiles essentielles utilisées par les vétérinaires ou en automédication par les éleveurs ne devraient pas être administrées aux animaux de production [15].

II. Matériel et méthode

1. Choix des animaux et de leur alimentation

L'étude expérimentale *in vivo* (APAFIS n°19258-2019021819063335v2) s'est déroulée sur le site de l'INRAE (Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement) de Rennes dans l'unité mixte de recherche Pegasus dirigée par Philippe Lambertton.

Durant l'expérimentation, trois vaches sont utilisées. Ce sont toutes des vaches de race Prim'Holstein. Elles n'ont participé au cours de l'année 2019 qu'à l'expérimentation concernant les huiles essentielles (mélange 1, mélange 2 et pour deux d'entre elles mélange 3).

Durant les manipulations, les vaches sont en fin de lactation permettant ainsi de limiter les risques de développement de pathologies de la mamelle, telles des mammites [45].

L'alimentation des animaux durant l'expérimentation est très importante. En effet celle-ci contient de nombreux composés aromatiques tels que des terpènes ou dérivés de terpènes (similaires à ceux présents dans les huiles essentielles) qui sont absorbés par le rumen et les intestins puis diffusent par le sang dans la glande mammaire. Ces composés peuvent également être absorbés par voie respiratoire par l'inhalation des terpènes présents dans l'air (libérés par l'alimentation) mais aussi lors de l'éructation des gaz ruminiaux et atteindre de la même façon la glande mammaire [46].

Chaque plante possède son propre profil terpénique : par exemple les terpènes sont assez rares chez les légumineuses. Ce profil varie en fonction de la saison mais également de la zone géographique et donc du sol sur lequel la plante est cultivée, de même que la composition des huiles essentielles [47].

On peut alors discriminer le lait de différentes vaches en fonction de l'alimentation donnée et donc de « l'empreinte terpénique » de celle-ci (Figure 13) [48].

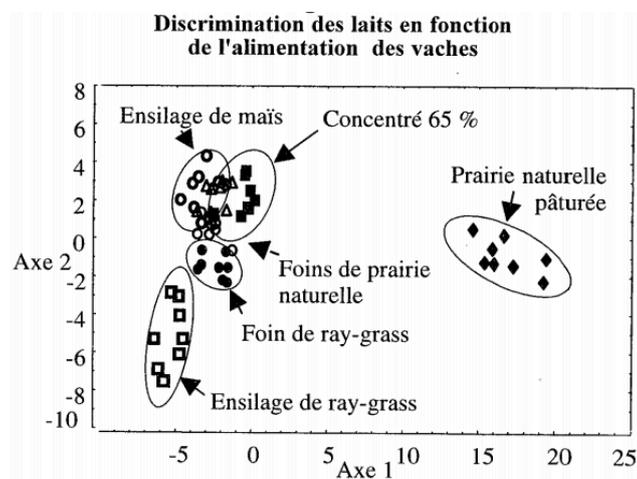


Figure 13 : distinction entre les laits en fonction de l'alimentation donnée aux vaches d'après Cornu et al., 2002 [48]

On note également une saveur différente du lait en fonction de la ration alimentaire de la vache. Il a été démontré des différences sensorielles entre un lait issu d'une alimentation au pâturage et un lait issu d'une alimentation à base de foin et d'ensilage [49].

Ainsi, pour pouvoir apprécier uniquement la quantité de chaque composant d'huile essentielle contenu dans le lait après l'application du traitement, un dosage dans le lait et dans le sang des composés est réalisé en amont afin d'identifier les terpènes d'origine alimentaire.

Les fourrages permettant de nourrir les vaches sont exclusivement produits sur l'exploitation tandis que les tourteaux sont achetés. La ration est composée de 65,5 % d'ensilage de maïs, 7,7 % de luzerne déshydratée, 13,2 % de tourteau de soja et 13,6 % de concentré à base de céréales.

2. Choix des huiles essentielles

Comme nous l'avons vu précédemment, la majorité des huiles utilisées sur le terrain en élevage ne sont pas autorisées réglementairement, eu égard à leur « absence de statut LMR ». Ainsi le choix des huiles essentielles étudiées a été réalisé en fonction des utilisations réelles sur le terrain. Une étude de l'ADAGE de 2016 a recensé auprès d'éleveurs et de vétérinaires les huiles essentielles utilisées en fonction de différentes pathologies (mammites cliniques, mammites sub-cliniques, diarrhées néonatales, non délivrances, etc.)[50]. Ainsi, sur la figure 14, il est possible de voir que 304 cas de mammites cliniques ont été traités en aromathérapie et qu'aucune des huiles essentielles utilisées n'est autorisée en élevage bovin.

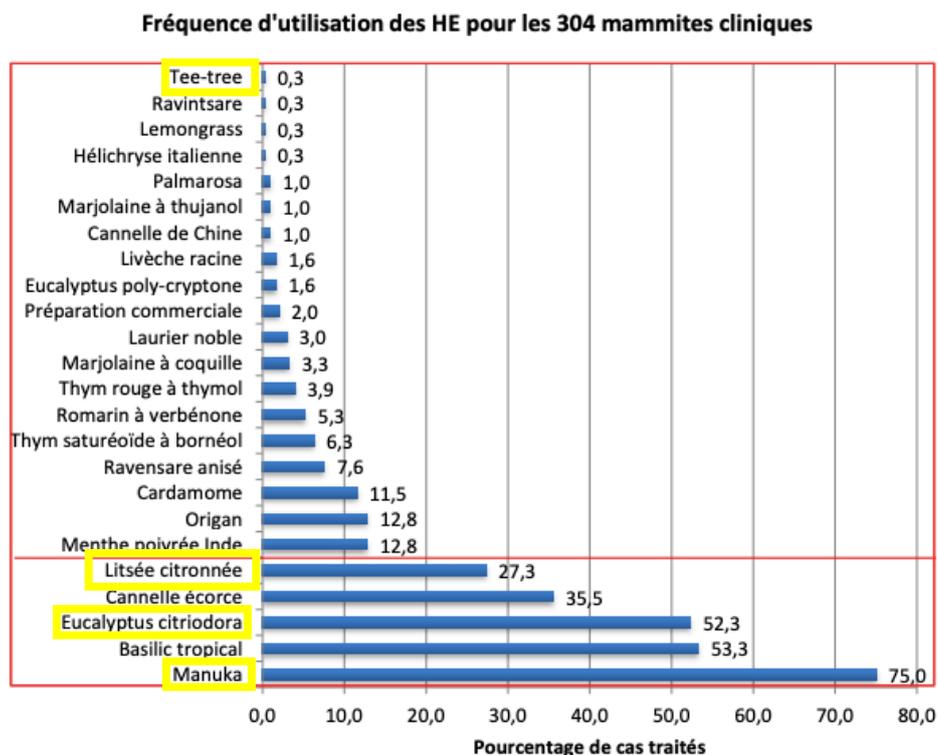


Figure 14 : huiles essentielles utilisées dans 304 cas de mammites cliniques d'après Adage 35, 2016 [50]

Trois mélanges d'huiles essentielles (appelés M1, M2 et M3) font l'objet de l'étude financée par le plan Ecoantibio 2. Ce travail de thèse porte exclusivement sur le mélange M1 (dont certaines huiles essentielles sont encadrées en jaune sur la figure 14).

Les huiles essentielles choisies pour ces trois mélanges, sont celles utilisées majoritairement sur le terrain par les éleveurs et le vétérinaire partenaire de l'étude. Chaque mélange est quant à lui déterminé de telle sorte que les marqueurs recherchés dans le lait et le sang (deux par huiles essentielles) soient différents d'une huile essentielle à une autre.

3. Composition des mélanges d'huiles essentielles

a. Mélange M1

Le mélange M1 est composé des huiles essentielles suivantes [10,13,14,51]:

- Huile essentielle d'Eucalyptus citronné (*Eucalyptus citriodora*)



Figure 15 : feuille d'eucalyptus citronné d'après pierrefranchomme-lab.com

Tableau 3 : caractéristiques de l'huile essentielle d'eucalyptus citronné

Famille	Myrtacées
Partie utilisée	Feuilles
Composants majoritaires	Aldéhydes terpéniques : citronellal (74,11 %)
	Alcools monoterpéniques : citronellol (7,77 %), trans-pinocarvéol, géraniol, trans-p-menthane-3,8-diols (PMD)
Composants minoritaires	Esters terpéniques : acétate, butyrate et citronellate de citronellyle
Usages thérapeutiques traditionnels	Anti-inflammatoire majeur, antalgique, antiviral, sédatif, myorelaxant, léger antispasmodique
Contre-indications	Aucune

- Huile essentielle de Litsée citronnée (*Litsea citrata*)



Figure 16 : baies de Litsée citronnée d'après boutique-vegetale.com

Tableau 4 : caractéristiques de l'huile essentielle de litsée citronnée

Famille	Lauracées
Partie utilisée	Baies
Composants majoritaires	Aldéhydes terpéniques : citrals (néral 28,6 % et géraniol 41 %), citronellal (0,6 %)
	Monoterpènes : limonène (12,5 %), myrcène 1,5 %)
Composants minoritaires	Monoterpénols (4 %) : linalol, α -terpinéol, citronellol, nérol, géraniol
	Sesquiterpènes : β -caryophyllène (1,2 %)
	Esters (2 %) : acétates de linalyle, de terpényle, de néryle et de géranyle
	Cétones : méthylhepténone (0,6 %)
Usages thérapeutiques traditionnels	Sédatif/calmant, anti-inflammatoire majeur, antalgique, anti-infectieuse
Contre-indications	Aucune

- Huile essentielle de Tea tree (*Melaleuca alternifolia*)



Figure 17 : feuilles de tea tree d'après boutique-vegetale.com

Tableau 5 : caractéristiques de l'huile essentielle de tea tree

Famille	Myrtacées
Partie utilisée	Feuilles
Composants majoritaires	Monoterpènes : γ-terpinène (20,2 %), α -terpinènes (8,7 %), α -pinène (3,3 %), β -pinène (0,7 %), myrcène (0,8%), p-cymène (3,4 %), limonène (0,9 %), terpinolène (3,3 %)
	Alcools monoterpéniques (45-50 %) : terpinène-4-ol (25-45 %), α -terpinéol (3 %)
Composants minoritaires	Sesquiterpènes : β -caryophyllène (1,2 %), aromadendrène (2,7-5 %), aromadendrène (0,4 %), viridiflorène (1 %), δ -cadinène (1%)
	Alcools sesquiterpènes. : globulol (0,3 %), viridiflorol (0,15 %)
	Oxydes terpéniques : 1,4-cinéole, 1,8-cinéole (5-9 %), époxycaryophyllène II
Usages thérapeutiques traditionnels	Antiviral, antibactérien large spectre, antifongique, antiparasitaire interne, antiseptique, immunostimulant, neurotonique, antiasthénique
Contre-indications	Quelques allergies cutanées

- Huile essentielle de Manuka (*Leptospermum scoparium* CT cap est)



Figure 18 : fleurs, feuilles et rameaux de manuka d'après wikipedia.fr

Tableau 6 : caractéristiques de l'huile essentielle de manuka

Famille	Myrtacées
Partie utilisée	Rameaux
Composants majoritaires	Sesquiterpènes (50 %) : calaménène (13,4 %), δ -cadinène (7,1 %), α - et β -selinène (4 et 4,7 %), α -copaène (5,2 %), cadina-1,4-diène (5,1 %), α -cubébène (2,9 %), β -caryophyllène (2,2 %), aromadendrène (1,9 %), etc.
	Tricétones cycliques : leptospermone (18,3 %), isoleptospermone (3 %), flavésone (5 %)
Composants minoritaires	Sesquiterpénols 5-7 %
	Monoterpènes (< 3 %) : α - et β -pinène, limonène
Usages thérapeutiques traditionnels	Antiviral, antibactérien et antifongique puissant, antiseptique
Contre-indications	Utilisation contre-indiquée chez les animaux gestants et jeunes animaux

- Huile essentielle de Saugé sclarée (*Salvia sclarea*)



Figure 19 : fleurs de saugé sclarée d'après jardinage.ooreka.fr

Tableau 7 : caractéristiques de l'huile essentielle de saugé sclarée

Famille	Laminacées
Partie utilisée	Sommités fleuries
Composants majoritaires	Esters terpéniques (> 75 %) : acétates de linalyle (64,5 %), de néryle (0,35 %), de géranyle (0,65 %), etc.
	Monoterpénols (15 %) : linalol (11,5 %), terpinène-1-o1-4, α -terpinéol (0,7 %), nérol (0,2 %), géraniol (0,5 %), etc.
Composants minoritaires	Diterpénols (5 %) dont le sclaréol (1,2 %)
	Sesquiterpènes : β -caryophyllène (3 %), β -gurjunène, germacrène D (9,5 %), curcumène, transcalanlénène (< 1%)
	Monoterpènes (2,5 %) : α - et β -pinènes, camphène, myrcène, limonène, cis/trans-ocimènes, allo-ocimène, paracymène, terpinolène
	Sesquiterpénols : spathuléol, junéol, α -bisabolol, 10-épi- γ -eudesmol, β -eudesmol, caryophylléol 1 et II
	Alcools non terpéniques, oxydes, cétones non terpéniques et terpéniques, aldéhydes, coumarines, etc.
Usages thérapeutiques traditionnels	Sédatif, calmant, anti-spasmodique, neurotonique, antibactérien, inductrice de la sécrétion d'œstrogènes, hypocholestérolémiante
Contre-indications	Aucune

En annexes 3 à 7 se trouvent les compositions et chromatographies de chaque huile essentielle utilisée ici.

Pour chacune des huiles testées, deux marqueurs sont dosés dans le lait et dans le sang afin de suivre le devenir des huiles essentielles dans l'organisme. Ces marqueurs sont sélectionnés pour être propre à une huile essentielle du mélange. Ils sont notés **en gras** dans le tableau des constituants de chaque huile.

b. Mélange M2

Le mélange M2 sera le sujet d'une prochaine thèse et est composé des huiles essentielles suivantes :

- Huile essentielle d'Origan d'Espagne (*Coridothymus capitatus*)
- Huile essentielle de Niaouli (*Melaleuca quinquenervia*)
- Huile essentielle de Palmarosa (*Cymbopogon martinii*)
- Huile essentielle d'Hélichryse italienne (*Helichrysum italicum spp italicum*)
- Huile essentielle de Gaulthérie couchée (*Gaultheria procumbens*)

c. Mélange M3

Le mélange M3 sera le sujet d'une prochaine thèse et est composé des huiles essentielles suivantes :

- Huile essentielle de Livèche (*Levisticum officinale*)
- Huile essentielle de Thym à feuille de sarriette (*Thymus satureioides*)
- Huile essentielle de Romarin (*Romarinus officinalis CT verbenonifera*)
- Huile essentielle de Giroflier (*Eugenia caryophyllus*)
- Huile essentielle de Patchouli (*Pogostemon cablin*)

4. Voie d'administration et préparation de la solution

Les cinq huiles essentielles sont mélangées à de l'huile de pépin de raisin. Tout comme les huiles essentielles, la composition de l'huile de pépin de raisin dépend de la technique d'extraction, du moment de la récolte, du lieu de culture, etc. Elle contient des composés hydrophiles (largement représentés par des composés phénolés tels que des flavonoïdes, des caroténoïdes, des tannins, etc.) et des composés lipophiles (dont un acide gras insaturé : l'acide linoléique qui est majoritaire à 66 à 75,3 % ; mais aussi de nombreux autres acides gras insaturés). L'huile de pépin de raisin contient également de la vitamine E et ses dérivés tocophérols en quantité importante. Cette vitamine possède des propriétés anti-oxydantes, anti-tumorales et neuroprotectrices [52]. Dans cette expérimentation, il a été décidé d'utiliser cette huile car il s'agit de celle utilisée en majeure partie en élevage bovin par les vétérinaires du Grand-Ouest pratiquant l'aromathérapie.

L'application du mélange d'huiles essentielles est réalisée par voie cutanée, exclusivement sur le quartier avant droit de la mamelle, à l'aide d'une seringue Luer lock® et d'une canule à vaccin intranasal. Le flacon contenant le mélange d'huiles essentielles est homogénéisé avant application. Le quartier est massé durant quelques minutes afin de permettre la pénétration du mélange.

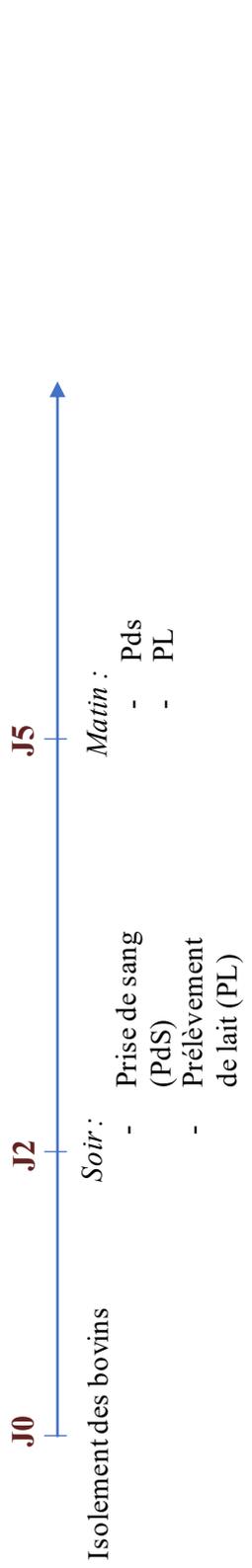
L'opérateur porte des équipements de protection (lunettes, gants, masques) lors de l'application du mélange d'huiles essentielles.

Préparation du mélange d'huile essentielles :

Le mélange contient 10 % de chacune des huiles essentielles suivantes : *Eucalyptus citriodora*, *Litsea citrata*, *Melaleuca alternifolia*, *Salvia sclarea*, *Lepstospermum scoparium ct cap est* et 50 % d'huile végétale de pépin de raisin.

Un volume de 5 mL est appliqué sur le quartier avant droit matin et soir durant la semaine de traitement (identifiée sur la figure 20).

Semaine témoin



Semaine de traitement

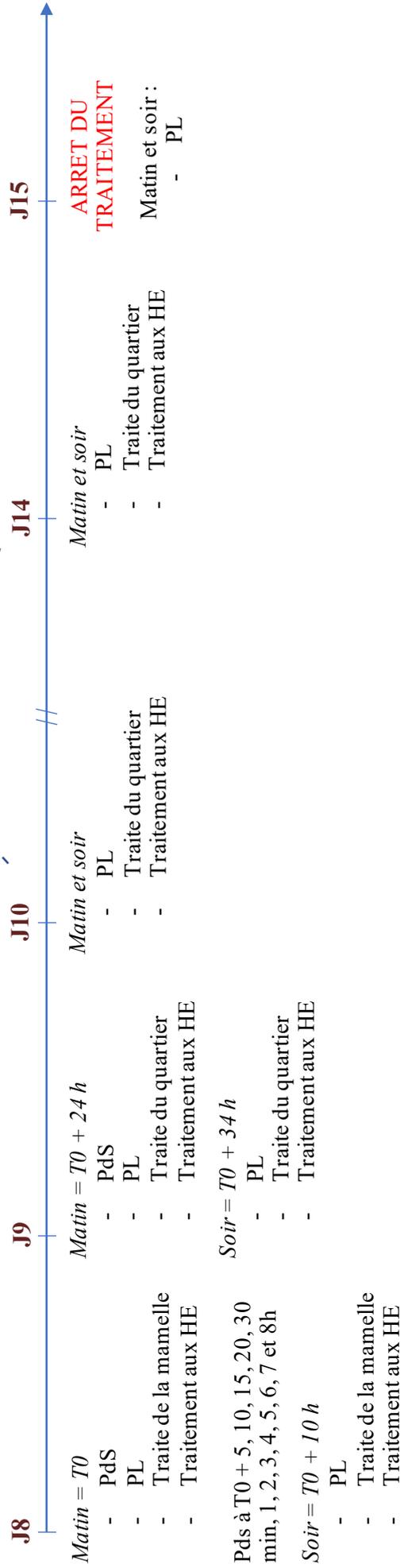


Figure 20 : déroulement de l'expérimentation

5. Protocole

L'étude commence par plusieurs semaines d'acclimations des vaches, aucune manipulation n'étant entreprise durant cette période. Les vaches sont placées dans la stabulation qui permettra de réaliser les expérimentations. Trois emplacements sont présents dans cette salle pour chacune des vaches ; il est alors possible de quantifier la quantité de boisson ingérée (non réalisé pour cette expérimentation) mais également la quantité d'aliment consommée par chaque animal. Les vaches sont placées sur une litière de type copeaux.

Ensuite démarre la semaine témoin à J0. Dès le deuxième jour au soir (J2), une prise de sang ainsi qu'un prélèvement de lait est réalisé sur chaque vache. Il en est de même le cinquième jour au matin (J5).

Deux cathéters dans les veines jugulaires sont posés, deux jours avant le début de la semaine témoin. Dans le cas où le cathéter principal auquel est attaché un prolongateur ne permettrait pas de prélever du sang, le second cathéter prendrait le relai. Ainsi, il est aisé de récolter les échantillons de sang et les cathéters sont retirés un jour après l'arrêt des prises de sang. Pour la pose de ces cathéters, une anesthésie locale à l'aide de PROCAMIDOR® (procaïne) est mise en place.

La semaine de traitement commence le huitième jour (J8) au matin par une prise de sang, un prélèvement de lait du quartier avant droit après élimination des premiers jets, suivis d'une traite complète de la mamelle.

Le traitement à base d'huiles essentielles est réalisé pendant une semaine, durée moyenne d'un traitement d'aromathérapie prescrit par le vétérinaire partenaire de l'étude.

L'ensemble des manipulations est synthétisé sous la forme d'un schéma (Figure 20).

a. Prise de sang

Comme vu précédemment, le sang est récolté directement à l'aide du cathéter veineux connecté lui-même à un prolongateur facilitant au technicien la prise de sang. Dans ce prolongateur sont injectés systématiquement : 5 mL de sérum physiologique puis 5 mL de sérum physiologique hépariné. Ainsi à chaque prélèvement, 10 mL de sang sont retirés avant de remplir le tube lui-même hépariné qui permettra de réaliser les analyses. Environ 9 mL de sang sont récoltés dans chaque tube (MONOVETTE® hépariné) et trois tubes sont remplis systématiquement.

Les prises de sang ne sont effectuées que lors des deux premiers jours de traitement sous forme d'une cinétique car il ne semble pas que les composés des huiles essentielles persistent sous leur forme primaire dans le sang plus longtemps. En effet, chez le Cheval, la concentration plasmatique en linalol a été suivie après l'administration transcutanée de l'huile essentielle de lavande par massage durant 2 minutes. Sa concentration augmente dès les premières minutes mais au bout de 20 minutes, elle diminue [18].

b. Prélèvement de lait

Le lait est prélevé matin et soir lors de la traite. Le lactoduc est directement relié à la fosse à lisier car le lait n'est pas destiné à la consommation humaine du fait de l'application d'un produit non autorisé chez un animal producteur de denrées alimentaires. Cinq échantillons de 10 mL et un échantillon de 80 mL de lait du quartier avant droit sont prélevés. Ensuite la traite complète de la mamelle est réalisée chaque matin et chaque soir ; il est alors possible de quantifier la production laitière de la vache concernée.

6. Conservation des échantillons

Chaque prélèvement (sang et lait) est identifié avec la date, l'heure, le numéro de travail de l'animal ainsi que le numéro de lot du mélange d'huile essentielle (M1, M2 ou M3).

Les échantillons de lait et de sang sont congelés à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Préalablement l'air présent dans chaque tube est remplacé par de l'azote gazeux afin de limiter les réactions d'oxydation.

Tous les échantillons sont ensuite acheminés sous couvert de froid à l'INRA de Theix, UR370 QuaPA (Qualité des Produits Animaux), où ils sont stockés à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Sont ensuite réalisés les dosages de résidus d'huiles essentielles, par l'équipe de Jérémy Ratel.

7. Analyse des échantillons

Les analyses des composés des huiles essentielles (deux marqueurs par huile), sont réalisées par l'association de différentes technologies résumées sous la forme d'un schéma (Figure 23).

a. Extraction des composés volatils par espace de tête dynamique aussi appelé « Dynamic Headspace » (DSH) ou « purge and trap »

[53,54]

Cette technique permet d'extraire des composés volatils présents en faible quantité voire à l'état de trace dans un échantillon (ici dans le lait) avant de les analyser par chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse. Ainsi, l'échantillon est placé dans un four afin de contrôler la température à laquelle les composés à doser sont volatils (Figure 21 a).

On appelle « espace de tête », la portion gazeuse située au-dessus de l'échantillon liquide (lait). Un équilibre se met en place entre les composés volatils présents dans la phase liquide et présents dans la phase gazeuse.

Un gaz vecteur (souvent de l'hélium ou de l'azote) est instillé continuellement dans l'échantillon (Figure 21 b) et permet d'entraîner le gaz de l'espace de tête contenant les composés volatils à doser. Ceux-ci sont ensuite piégés sur une colonne avant d'être analysés. Cette technique permet d'obtenir un gradient de concentration des composés entre la phase gazeuse et liquide et ainsi de faciliter leur extraction de la matrice liquide.

Afin de permettre l'analyse des composés absorbés sur la colonne, une désorption thermique est réalisée (Figure 21 c).

En pratique, les échantillons sont décongelés pendant 20 minutes à 25°C au bain marie. 3,6 g de chlorure de sodium ainsi que 2,5 % (volume/volume) d'acétone sont ajoutés à chaque échantillon de lait.

Ceux-ci ainsi préparés, sont placés sous agitation à 500 rotations par minute et préchauffés à 30 °C afin de piéger les composés volatils avec un piège de type Tenax pendant 30 minutes sous un flux d'hélium à 40 mL/min. Puis, les échantillons sont soumis à une étape de séchage durant 30 minutes à 100 mL/min dans le but d'éliminer l'eau résiduelle. Enfin, les composés organiques sont désorbés durant 10 min à 280 °C avant d'accéder à l'injecteur refroidi à -30 °C.

De plus, le piège est systématiquement nettoyé durant 1h à 290 °C une fois les échantillons injectés dans le chromatographe.

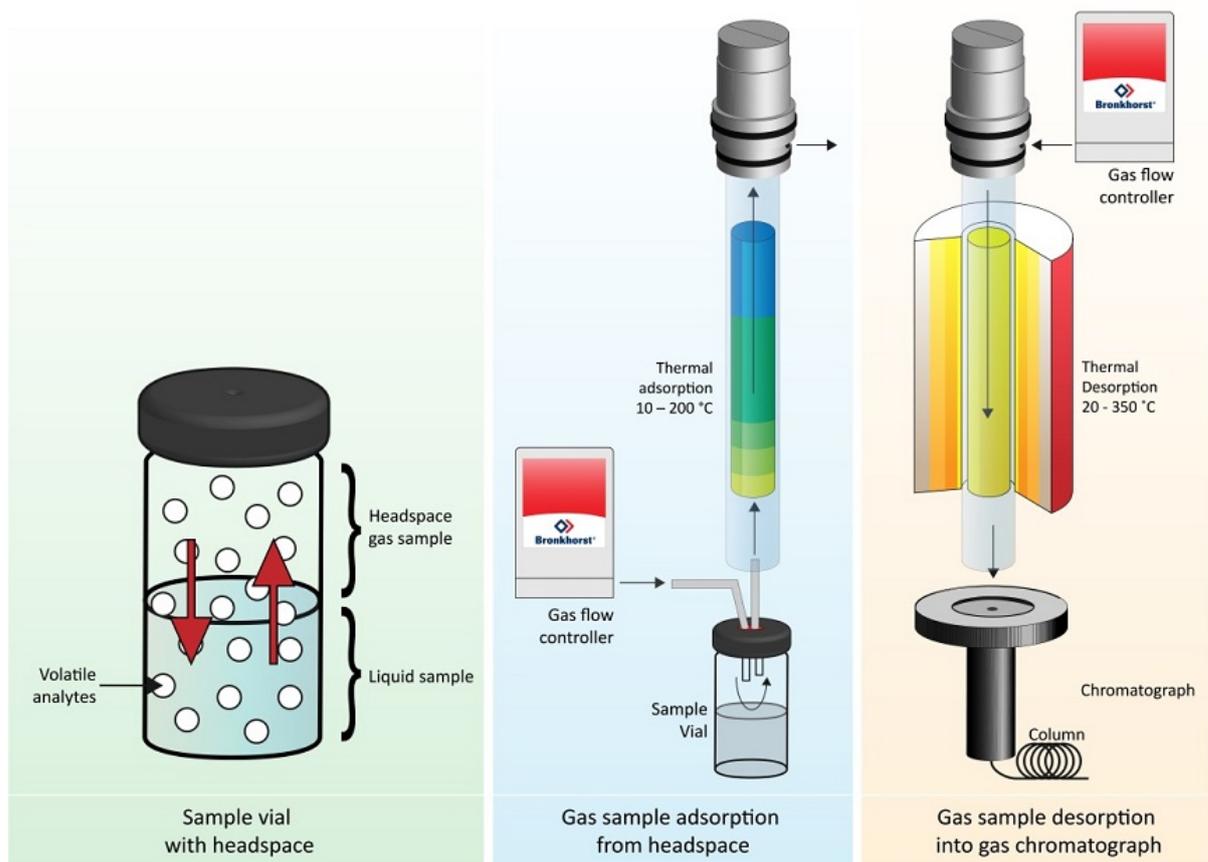


Figure 21 : extraction de composés volatils par dynamic headspace d'après bronkhorst.com

L'appareillage utilisé est un système Gerstel DSH-TDU.

Les composés organiques volatils sont ensuite analysés par chromatographie en phase gazeuse couplée à une spectrométrie de masse.

b. Chromatographie en phase gazeuse

La chromatographie en phase gazeuse est une méthode analytique basée sur la séparation de mélanges gazeux. Ici on utilise une chromatographie gaz-liquide, c'est-à-dire que la phase stationnaire est liquide et donc immobilisée sur un support solide.

Les différents constituants de la chromatographie sont :

- *La phase mobile* : appelé gaz vecteur chimiquement inerte vis-à-vis des échantillons, ici on utilise de l'hélium à 1 mL/min.
- *La phase stationnaire* : ici on utilise une colonne RTX 5 (60 m x 0,32 m x 1 µm) qui est reliée à l'injecteur et au détecteur. Elle est composée de 5 % de diphenyle et 95 % de diméthyle polysiloxane (Figure 22), et dite de faible polarité. Elle est, elle aussi contenue dans un four permettant de réguler la température (ici, 250°C).

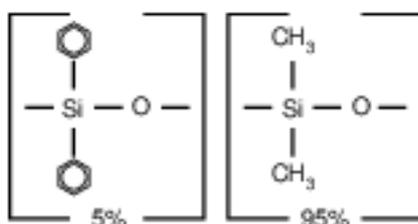


Figure 22 : composition de la colonne RTX 5 d'après restek.fr

- *L'injecteur* : il permet l'injection de l'échantillon à travers de la colonne, échantillon qui est vaporisé et mélangé au gaz vecteur. L'injecteur est dans un four qui permet de réguler la température de celui-ci (ici 2 minutes à 230 °C).
- *Le détecteur* : il est relié à la colonne et détecte le changement de composition du gaz vecteur.

c. Spectrométrie de masse

L'une des dernières étapes de l'analyse des composés volatils présents dans le lait des échantillons prélevés lors de l'expérimentation est la spectrométrie de masse.

Il s'agit d'une technique d'analyse permettant de déterminer les masses moléculaires de composés (ici, les marqueurs d'huiles essentielles sélectionnées) et ainsi de les identifier mais également de les quantifier [55].

Le système utilisé pour la détection et le dosage des terpènes est le MS Q-Extractive Orbitrap.

Enfin, l'ensemble des données est analysé grâce au logiciel TraceFinder de ThermoScientific.

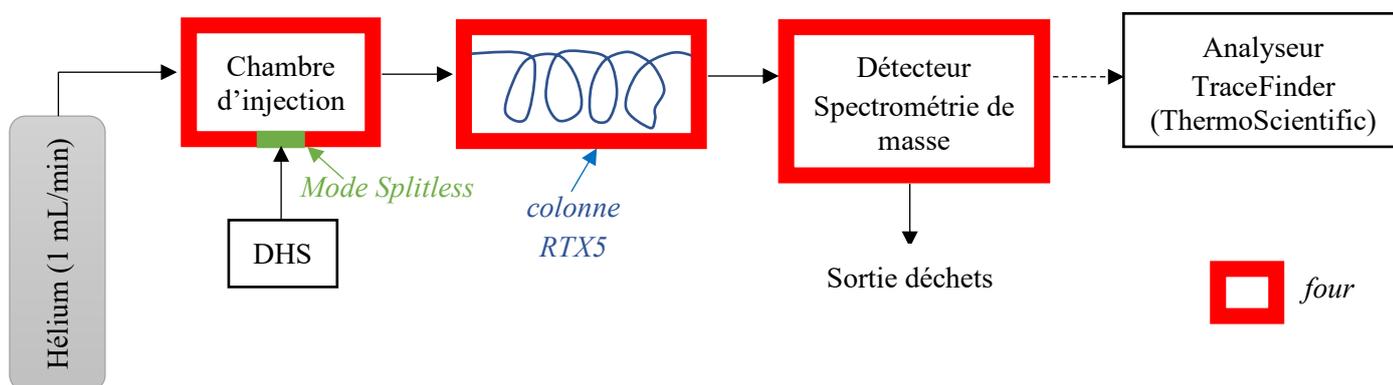


Figure 23 : différentes étapes de l'analyse des échantillons

d. Réalisation de courbes de calibration

Afin de réaliser des courbes de calibration pour cette méthode, des standards analytiques sont utilisés (différents fournisseurs : Accustandard, Fluka, Alfa Aesar). Cependant seuls 3 des 10 marqueurs des huiles essentielles que nous avons choisis sont présents sous forme de standard. 26 autres terpènes sont alors utilisés en supplément pour réaliser ces gammes.

En pratique, des échantillons de lait du J2 (période pré-traitement) sont utilisés. Dix concentrations en terpènes sont testées (0 ; 0,1 ; 0,5 ; 1 ; 5 ; 10 ; 25 ; 50 ; 100 et 200 ppb ou $\mu\text{g/L}$) et répétées six fois afin d'obtenir la courbe de calibration propre à chaque terpène.

Les paramètres de chaque droite de calibration des différents terpènes sont calculés grâce au logiciel R lorsque $r^2 \geq 0,98$. On obtient également une limite de quantification qui est utilisée dans l'analyse des résultats (Annexe 10).

e. Réalisation de contrôles qualités

Des contrôles qualités sont réalisés régulièrement afin de fiabiliser les résultats obtenus. Ainsi, un terpène deutéré (R-(-)-carvone) est ajouté systématiquement à chaque échantillon à $50 \mu\text{g/L}$.

De plus, régulièrement lors des analyses, un échantillon de lait du J2 (période pré-traitement) est analysé après ajout de ce terpène deutéré mais également des 29 autres terpènes à la concentration de $25 \mu\text{g/L}$.

III. Résultats

1. Données zootechniques

Les vaches ayant permis l'expérimentation sont les suivantes :

Tableau 8 : informations concernant les trois vaches de l'expérimentation

Numéro de travail	Date de naissance	Rang de lactation	Date du dernier vêlage	Nombre de jour entre le vêlage et J0
1328	09/09/2011	6	04/11/2018	120
6057	11/10/2006	8	11/12/2017	448
9037	01/11/2009	6	10/12/2017	449

Les vaches ayant été mises en stabulation plus précocement que prévu, J0 correspond au premier jour de l'expérimentation.

a. Taux de cellules somatiques dans le lait

L'expérimentation a commencé le 05 Février 2019 (J -26) par la phase d'acclimatation, soit environ 1 mois avant le début de la semaine témoin.

La vache 9037, a présenté le 28 Février 2019 (J -3) une mammite, traitée par l'administration d'antibiotiques : UBROLEXIN Suspension Intramammaire Pour Vaches Laitières En Lactation® (céfalexine, kanamycine) une fois par jour pendant trois jours et 40 mL d'AXENTYL 200 mg/mL Solution Injectable Pour Bovins, Ovins, Caprins Et Porcins® (tylosine) par voie intramusculaire pendant trois jours également.

Les données du lait (quantité produite, taux butyreux, taux protéique, nombre de cellules somatiques) sont suivies tout au long de l'expérimentation. Ainsi, comme nous pouvons le voir sur la figure 24 relative à la vache 9037, dès J -5 (soit le 26 Février 2019), il y a une nette augmentation des cellules somatiques dans le lait (passant de 111 000 à plus de 2 100 000 cellules) traduisant une atteinte de la mamelle. Après traitement antibiotique, il y a une diminution de ces cellules dans le lait mais celles-ci ne descendront pas en dessous des 300 000 cellules durant les semaines témoin et traitement.

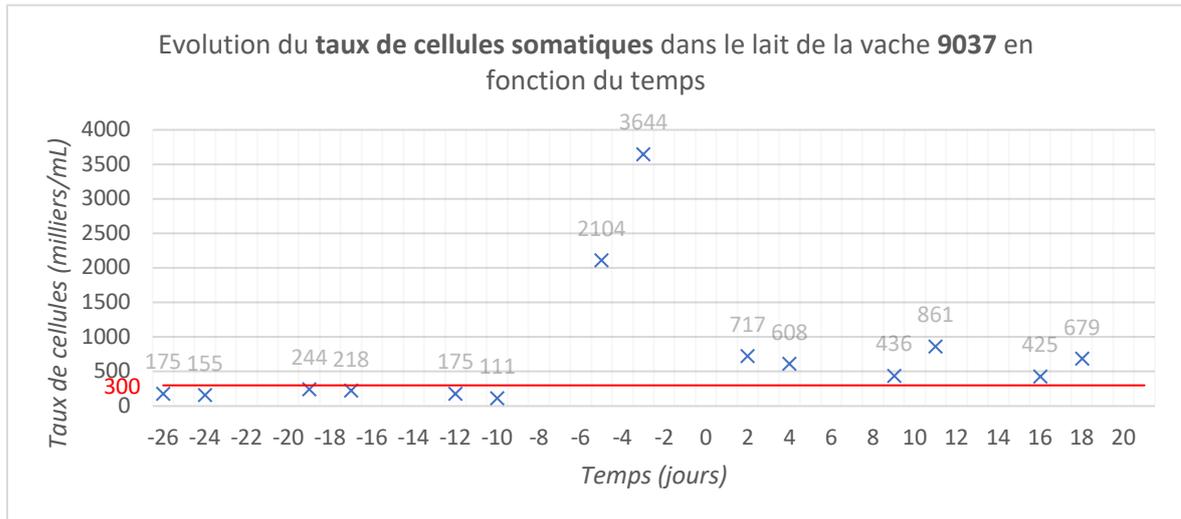


Figure 24 : variations du taux de cellules somatiques de la vache 9034 durant l'expérimentation

Les deux autres vaches n'ont pas présenté de mammite durant l'expérimentation, comme l'indiquent les graphes ci-dessous. Néanmoins, le taux de cellules de la vache 6057 est compris entre 300 000 et 700 000 cellules tout le long de l'expérimentation.

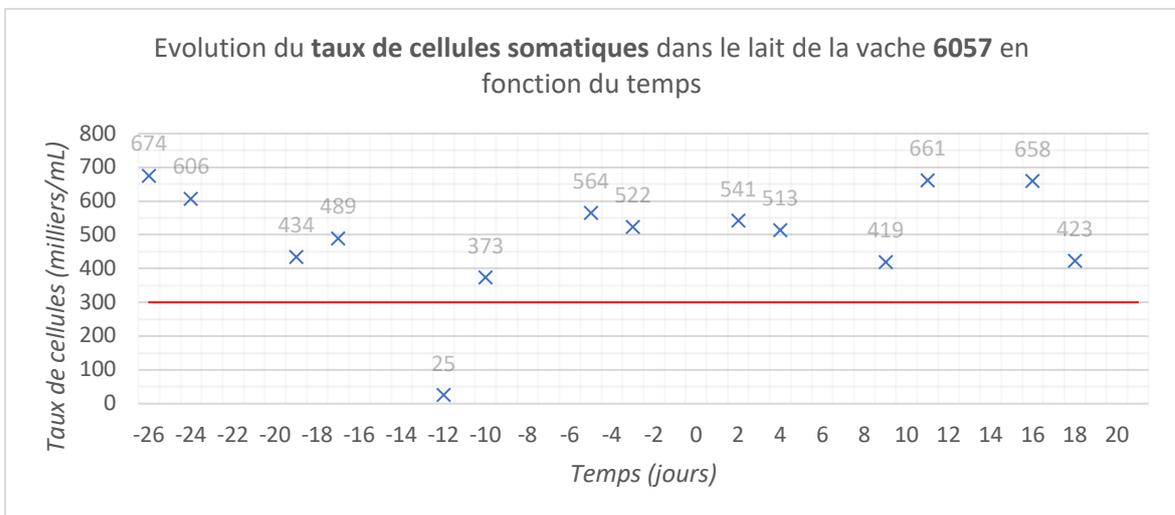


Figure 25 : variations du taux de cellules somatiques de la vache 6057 durant l'expérimentation

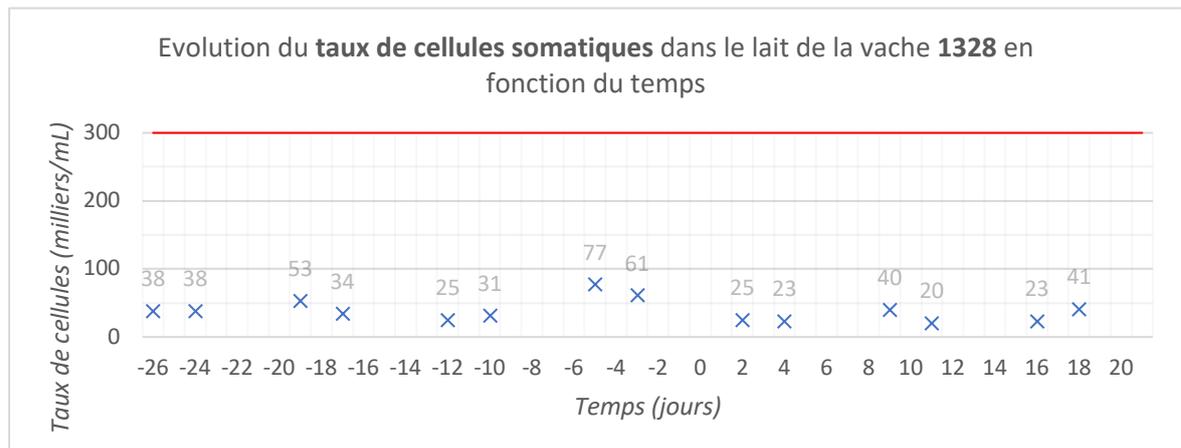


Figure 26 : : variations du taux de cellules somatiques de la vache 1328 durant l'expérimentation

b. Production laitière

La production laitière des trois vaches est suivie matin et soir pendant toute la durée de l'expérimentation (semaines d'acclimatation, semaine témoin et semaine de traitement).

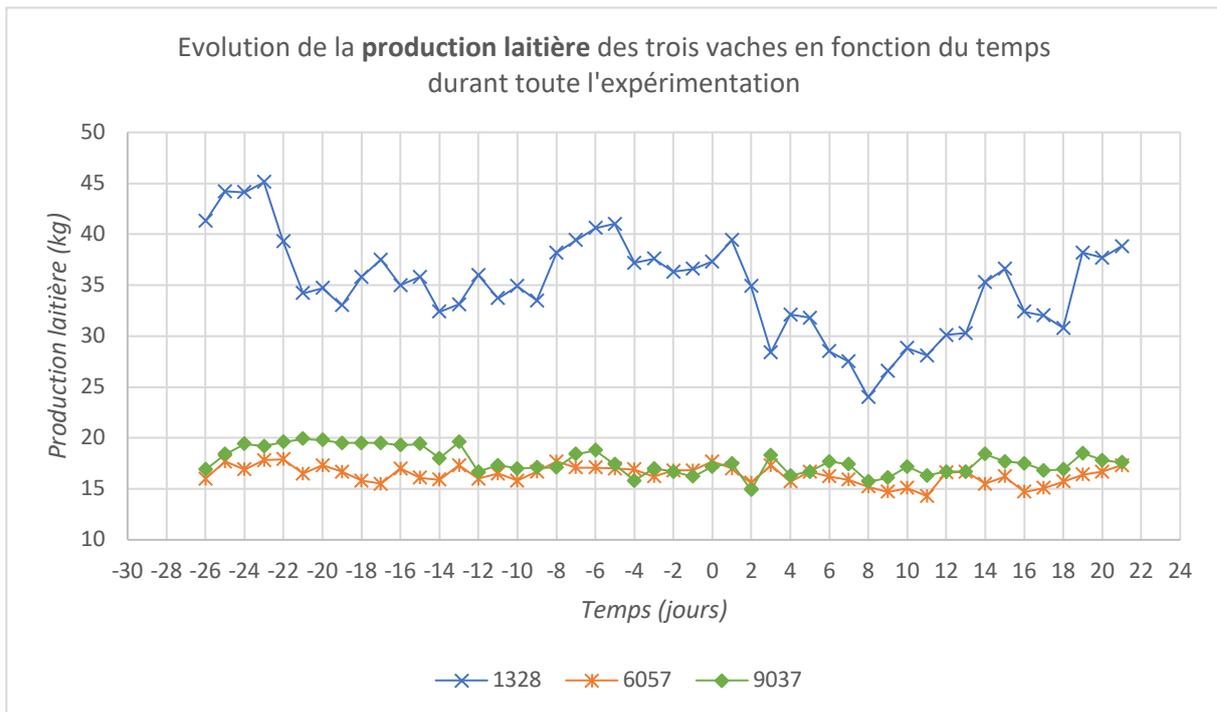


Figure 27 : variations de la production laitière journalière des trois vaches au cours de l'expérimentation

La vache 1328 est à son 120^{ème} jour de lactation au moment du début de l'expérimentation : c'est celle qui a la plus grosse production laitière (plus d'une vingtaine de kg de lait par rapport aux vaches 6057 et 9037). On peut également observer de plus grandes variations dans la courbe de lactation chez cette vache par rapport aux vaches 6057 et 9037. Ceci peut s'expliquer car ces deux dernières vaches sont à plus d'un an de leur dernier vêlage (Tableau 8) et ont donc une production laitière moindre et peu sujette aux variations.

c. Taux butyreux et taux protéique

La mesure du taux butyreux (TB) et du taux protéique (TP) est réalisée matin et soir, deux fois par semaine durant la période d'acclimatation, la semaine témoin et la semaine de traitement.

Chaque taux est pondéré en fonction de la production laitière comme suit :

Avec :

- PL_m : prélèvement de lait le matin
- PL_s : prélèvement de lait le soir
- TB/TP_m : taux butyreux (ou protéique) du prélèvement de lait le matin
- TB/TP_s : taux butyreux (ou protéique) du prélèvement de lait le soir

$$TB \text{ pondéré} = \frac{(PL_m \times TB_m) + (PL_s \times TB_s)}{PL_{m+s}}$$

$$TP \text{ pondéré} = \frac{(PL_m \times TP_m) + (PL_s \times TP_s)}{PL_{m+s}}$$

Le taux butyreux et le taux protéique correspondent respectivement à la quantité de matières grasses et de matières protéiques contenues dans le lait par rapport à la quantité de lait produite par la vache. Les figures 28 et 29 reflètent ces deux paramètres sur la durée de l'expérimentation chez les trois vaches.

Ainsi, pour les trois vaches il n'y a pas de variation majeure de ces deux paramètres lors de l'expérimentation.

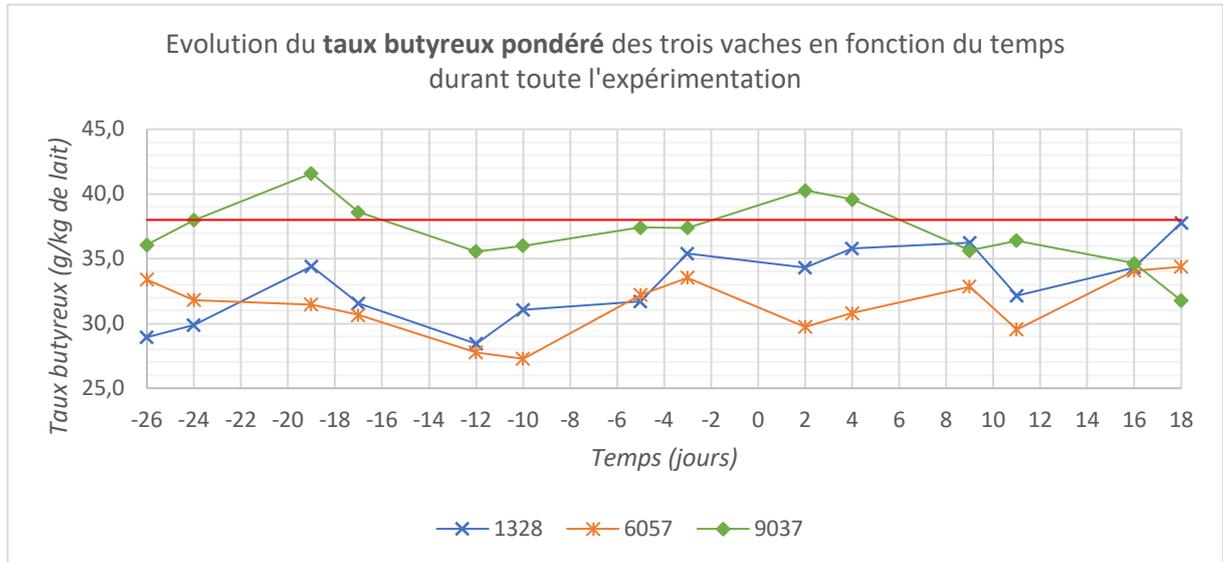


Figure 28 : variations du taux butyreux pondéré des trois vaches au cours de l'expérimentation

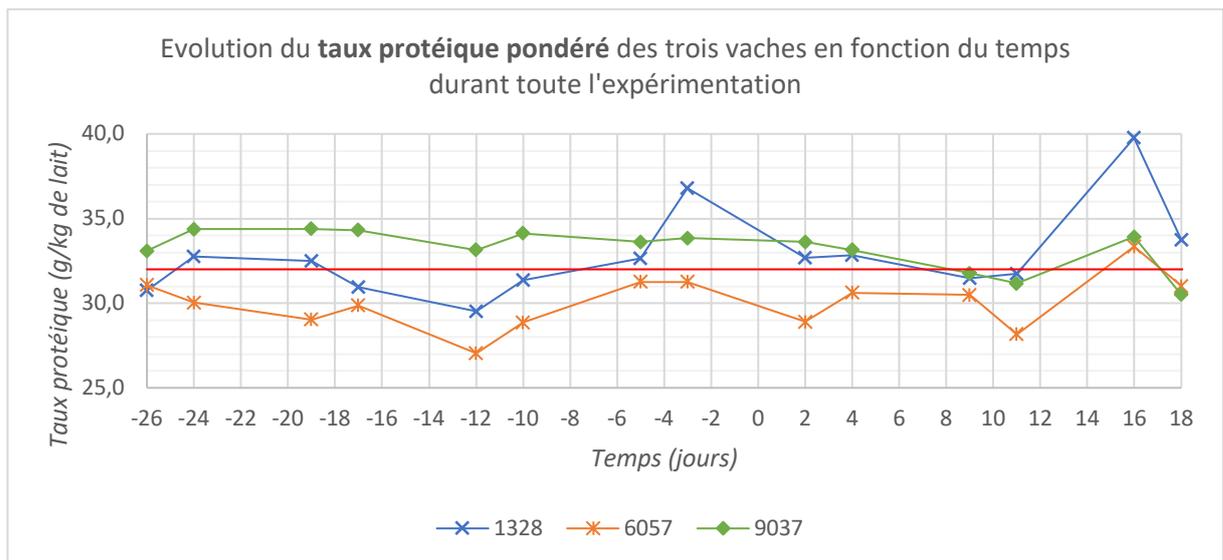


Figure 29 : variation du taux protéique pondéré des trois vaches au cours de l'expérimentation

2. Dosages des résidus d'huiles essentielles dans le lait

Tous les marqueurs que nous avons sélectionnés (Annexe 8) n'ont pas été retrouvés dans les échantillons analysés. Seules des cinétiques pour le β -citronellal, β -citronellol, terpinèn-4-ol, flavésone et leptospermone ont pu être réalisées. Par ailleurs, d'autres composés terpéniques que les marqueurs sélectionnés se sont révélés être présents durant la phase de traitement dans les différents échantillons de lait : l'eucalyptol (1,8-cinéole), l' α -copaène et l'E-cadina-1(2),4-diene.

D'autres composés ont également été détectés dans l'analyse du mélange M1 mais ne semblent pas être en quantité suffisante dans le lait durant l'expérimentation pour pouvoir être quantifiés (Annexe 9).

Les figures ci-après représentent les cinétiques de concentrations en résidus durant toute la durée de l'expérimentation. Les tableaux de valeurs ayant permis de construire ces figures sont présents en annexe 11.

Par soucis de clarté, J 8 (premier jour de traitement) décrit sur la figure 20 correspond sur les figures suivantes à J 0.

a. Cinétique des marqueurs d'*Eucalyptus citriodora*

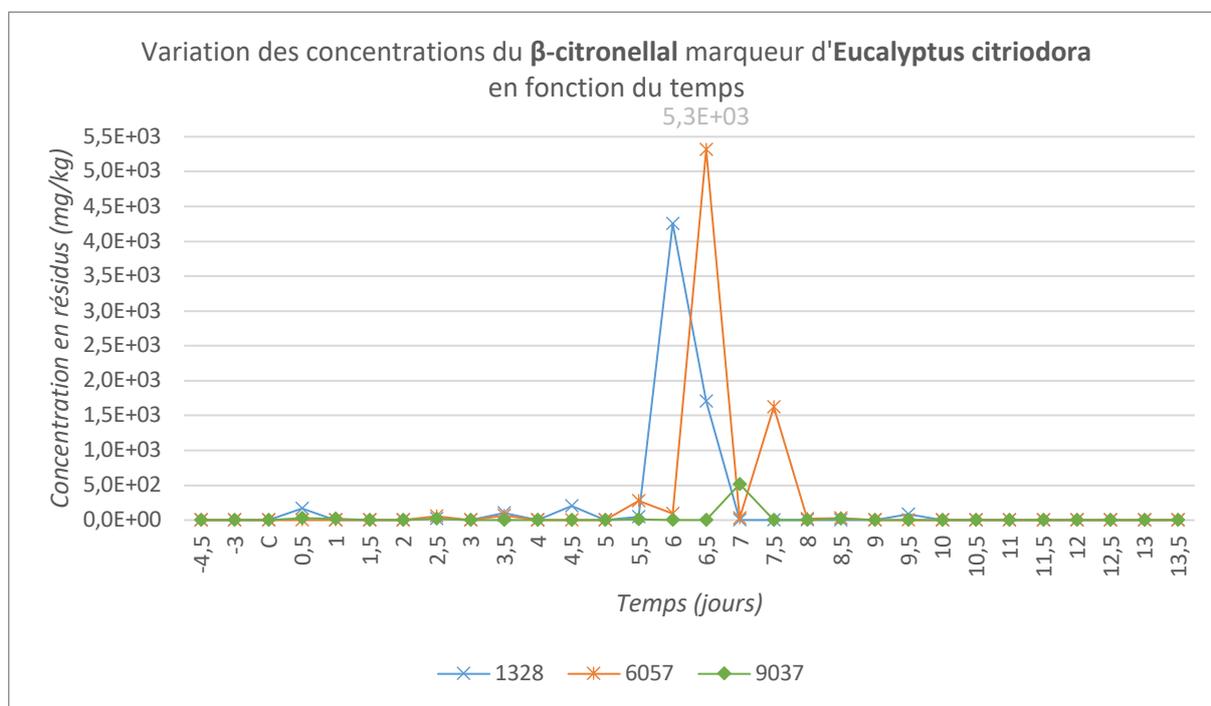


Figure 30 : cinétique du β -citronellal dans le lait durant l'expérimentation pour les trois vaches

Les concentrations en β -citronellal dans le lait sont de l'ordre du $\mu\text{g}/\text{kg}$ jusqu'au cinquième jour de traitement. On voit alors une nette augmentation de l'ordre du g/kg pour les vaches 1328 et 6057. Après le traitement, ces concentrations diminuent de l'ordre d'une dizaine de $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Annexe 11). Les concentrations dans le lait sont très variables d'une vache à l'autre. La concentration maximale (C_{max}) pour le temps correspondant (T_{max}) est indiquée dans le tableau 9.

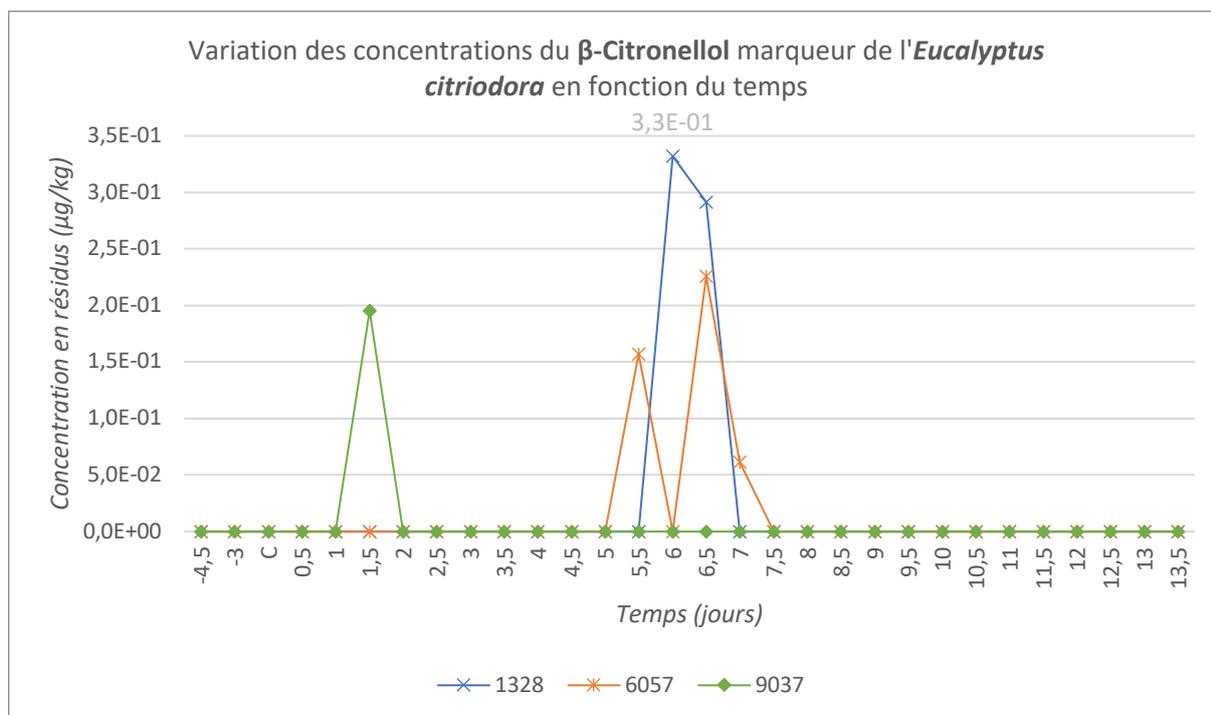


Figure 31 : cinétique du β -citronellol dans le lait durant l'expérimentation pour les trois vaches

Les concentrations en β -citronellol dans le lait sont non détectables pour la majorité des prélèvements réalisés. Seules cinq valeurs sont obtenues durant la période de traitement et une seule valeur lors de la phase post-traitement.

Comme pour le β -citronellal, les C_{max} et T_{max} du β -citronellol sont indiquées dans le tableau 9.

Tableau 9 : récapitulatif des C_{max} et T_{max} des deux marqueurs de l'huile essentielle d'Eucalyptus citronné

Marqueurs	C_{max}	T_{max} (j)
β -Citronellal	$5,3 \cdot 10^3$ mg/kg	6,5
β -Citronellol	$3,3 \cdot 10^{-1}$ μ g/kg	5,5

La consommation alimentaire théorique maximale de lait pour un homme ou une femme adulte est de 1,5 kg/j [56]. Ainsi, on obtient un total ingéré de 0,495 μ g/j pour le β -citronellol et de $7,95 \cdot 10^3$ mg/j pour le β -citronellal.

Pour un adulte de 60 kg, la dose ingérée de β -citronellol est de $8,25 \cdot 10^{-3}$ μ g/kg/j et de 132,5 mg/kg/j pour le β -citronellal.

La DJA maximale pour le β -citronellol est de 0,5 mg/kg/j soit près de 60 000 fois plus élevée que la dose estimée ingérée en consommant le lait en consommant le lait des vaches traitées par le mélange d'huiles essentielles.

Aucune DJA n'a été fixée pour le β -citronellal car il ne présente pas de risque pour la santé humaine aux doses actuellement utilisées comme agent aromatisant dans l'alimentation

humaine. Il est estimé que la consommation quotidienne de ce composé est de 945 µg/habitant en Europe, soit pour un adulte de 60 kg : 16 µg/kg/j. [36]

La dose estimée ingérée quotidiennement de β-citronellal en Europe est près de 8 300 fois plus faible que la dose estimée ingérée en consommant le lait des vaches traitées par le mélange d'huiles essentielles.

b. Cinétique des marqueurs de *Melaleuca alternifolia*

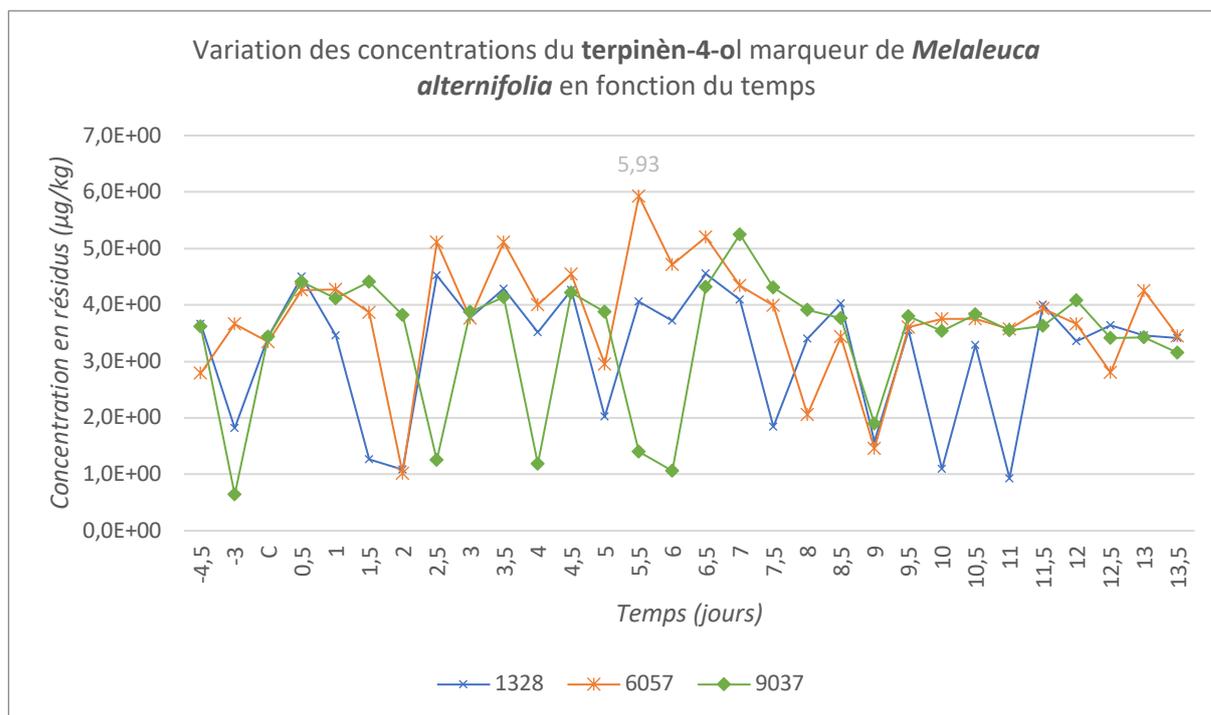


Figure 32 : cinétique du terpinèn-4-ol dans le lait durant l'expérimentation pour les trois vaches

Les concentrations en terpinèn-4-ol dans le lait sont constantes et de l'ordre du µg/kg tout au long de l'expérimentation (que ce soit en période de pré-traitement, traitement ou post-traitement). Néanmoins, il est possible de noter une légère augmentation des concentrations en terpinèn-4-ol durant le traitement : il est observé un maximum au 5^{ème} jour du traitement, atteint chez la vache 6057 (Tableau 10).

Tableau 10 : récapitulatif des C_{max} et T_{max} du marqueur de l'huile essentielle de Tea Tree

Marqueur	C _{max} (µg/kg)	T _{max} (j)
Terpinèn-4-ol	5,93	5,5

Pour 1,5 kg de lait ingéré quotidiennement, il est obtenu un total ingéré en terpinèn-4-ol de 8,895 µg/j. Pour un adulte de 60 kg la dose ingérée de terpinèn-4-ol est donc de 0,148 µg/kg/j.

Aucune DJA n'a été fixée pour ce composé comme pour le β-citronellal car il ne présente pas de risque pour la santé humaine aux doses actuellement utilisées comme agent aromatisant

dans l'alimentation humaine. Il est estimé que la consommation quotidienne de ce composé est de 150 µg/habitant, en Europe soit pour un adulte de 60 kg : 2,5 µg/kg/j [33].

La dose estimée ingérée quotidiennement de terpinèn-4-ol en Europe est donc près de 17 fois plus élevée que la dose estimée ingérée en consommant le lait de vaches traitées par le mélange d'huiles essentielles.

c. Cinétique des marqueurs de *Leptospermum scoparium*

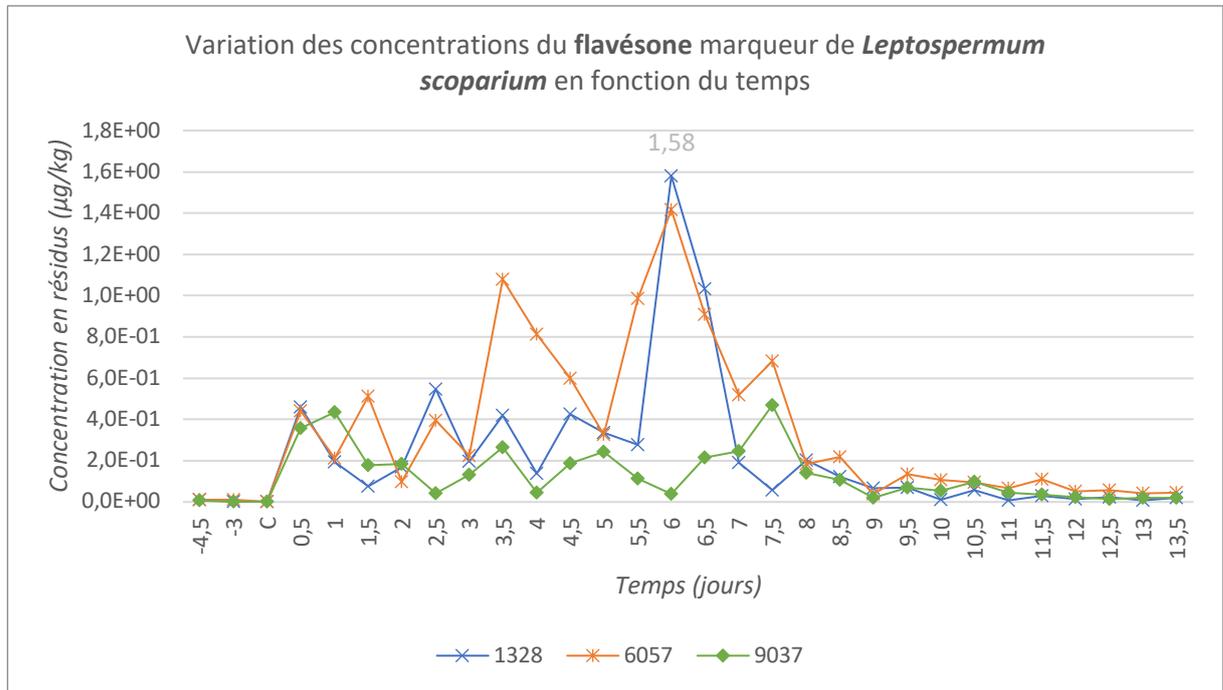


Figure 33 : cinétique du flavésone dans le lait durant l'expérimentation pour les trois vaches

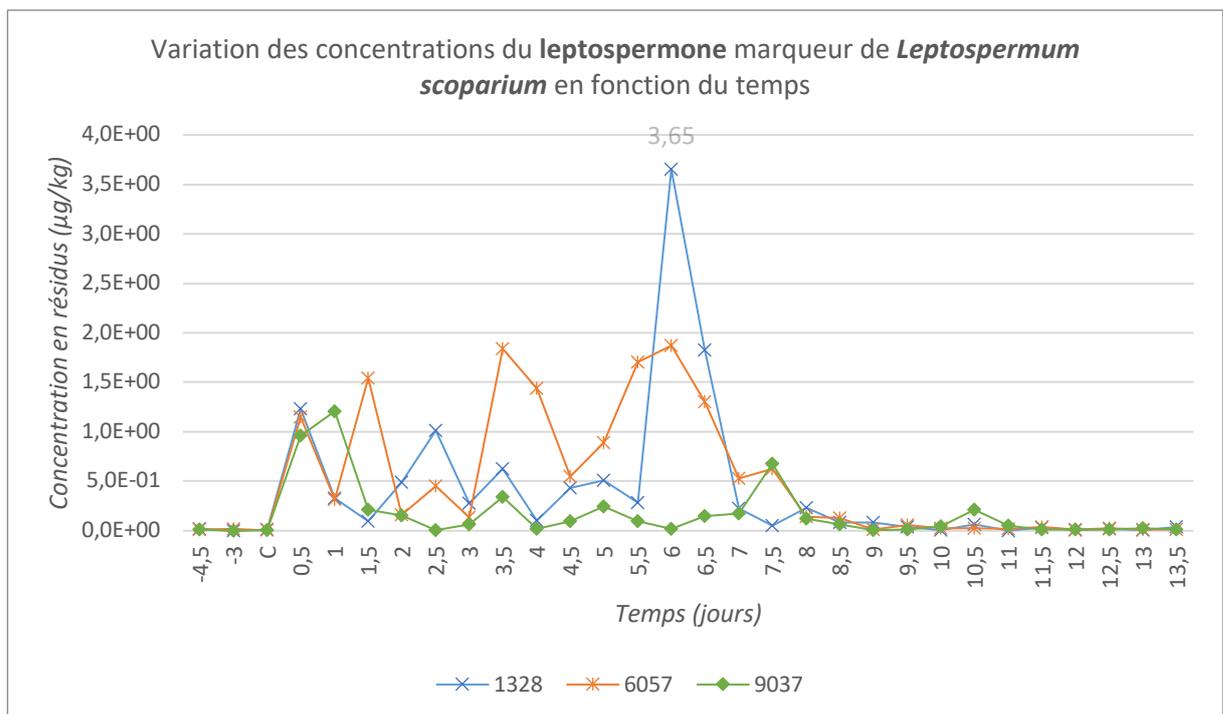


Figure 34 : cinétique du leptospermone dans le lait durant l'expérimentation pour les trois vaches

Le profil de cinétique des concentrations dans le lait de ces deux composés est similaire. Les concentrations en pré-traitement sont de l'ordre de 10^{-2} à 10^{-3} $\mu\text{g}/\text{kg}$, augmentent pendant la phase de traitement (Figure 33 et 34) et ensuite diminuent en post-traitement. La C_{max} est obtenue pour ces deux composés au 6^{ème} jour de traitement chez la vache 1328 (Tableau 11).

Tableau 11 : récapitulatif des C_{max} et T_{max} des deux marqueurs de l'huile essentielle de *Leptospermum scoparium*

Marqueurs	C_{max} ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	T_{max} (j)
Flavésone	1,58	6
Lepstosermon	3,65	6

Pour les marqueurs de cette huile essentielle, aucune donnée toxicologique n'est disponible, pas plus que des informations sur la consommation quotidienne de ces marqueurs par habitant en Europe.

d. Cinétique d'autres composés détectés

Lors des analyses, d'autres composés semblaient être présents quasi uniquement lors de la phase de traitement. Il s'agit de l'eucalyptol (ou 1,8-cinéole), de l' α -copaène et de l'E-cadina-1(2),4-diene (Figures 35, 36 et 37).

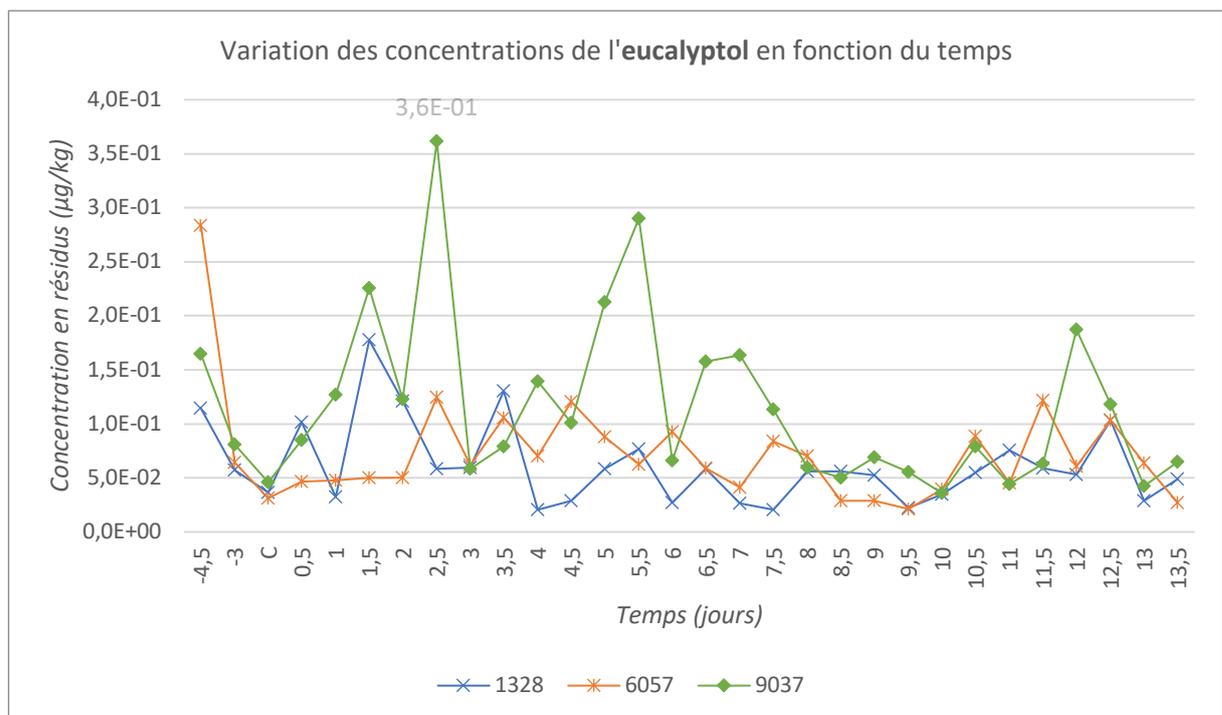


Figure 35 : cinétique de l'eucalyptol dans le lait durant l'expérimentation pour les trois vaches

L'eucalyptol est retrouvé dans le lait tout au long de l'expérimentation. Cependant, les concentrations en eucalyptol semblent être plus élevées lors de la phase de traitement, allant jusqu'à $3,6 \cdot 10^{-1}$ $\mu\text{g}/\text{kg}$ durant le deuxième jour de traitement chez la vache 9037 (Tableau 12).

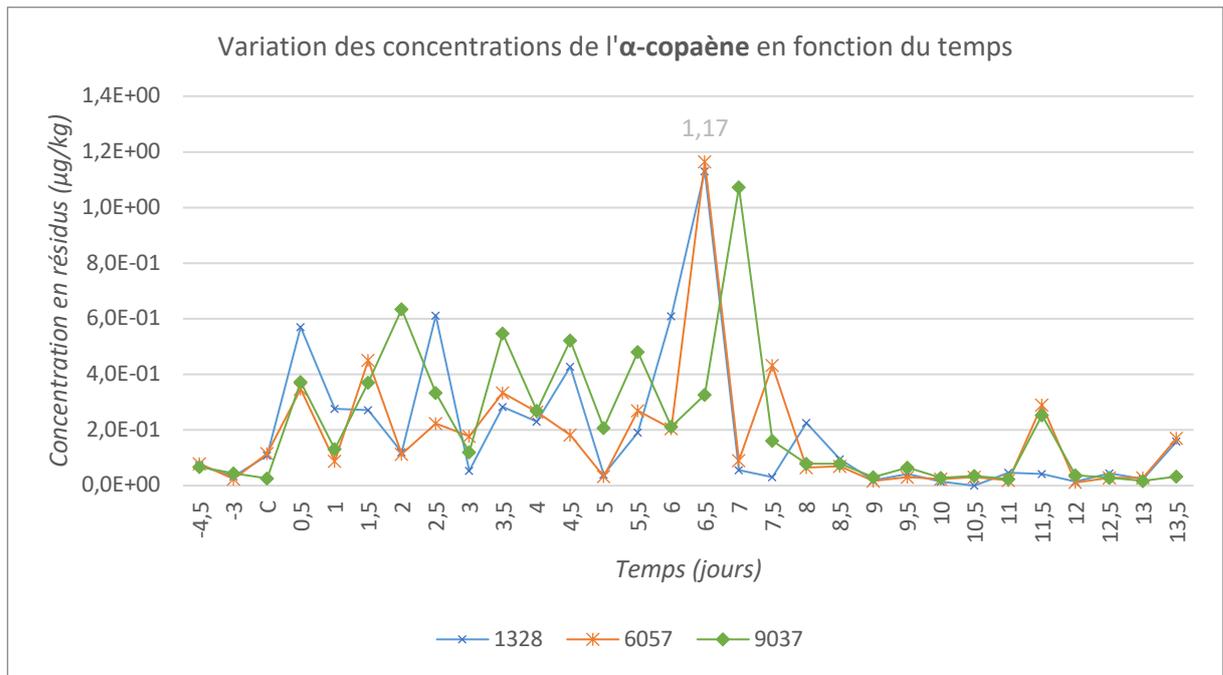


Figure 36 : cinétique de l'α-copaène dans le lait durant l'expérimentation pour les trois vaches

L'α-coapène est également détecté dans les différents laits analysés. Un pic de concentration est observé entre le sixième et le septième jour de traitement chez les trois vaches (Tableau 12), avec une concentration maximale de 1,17 µg/kg pour la vache 6057.

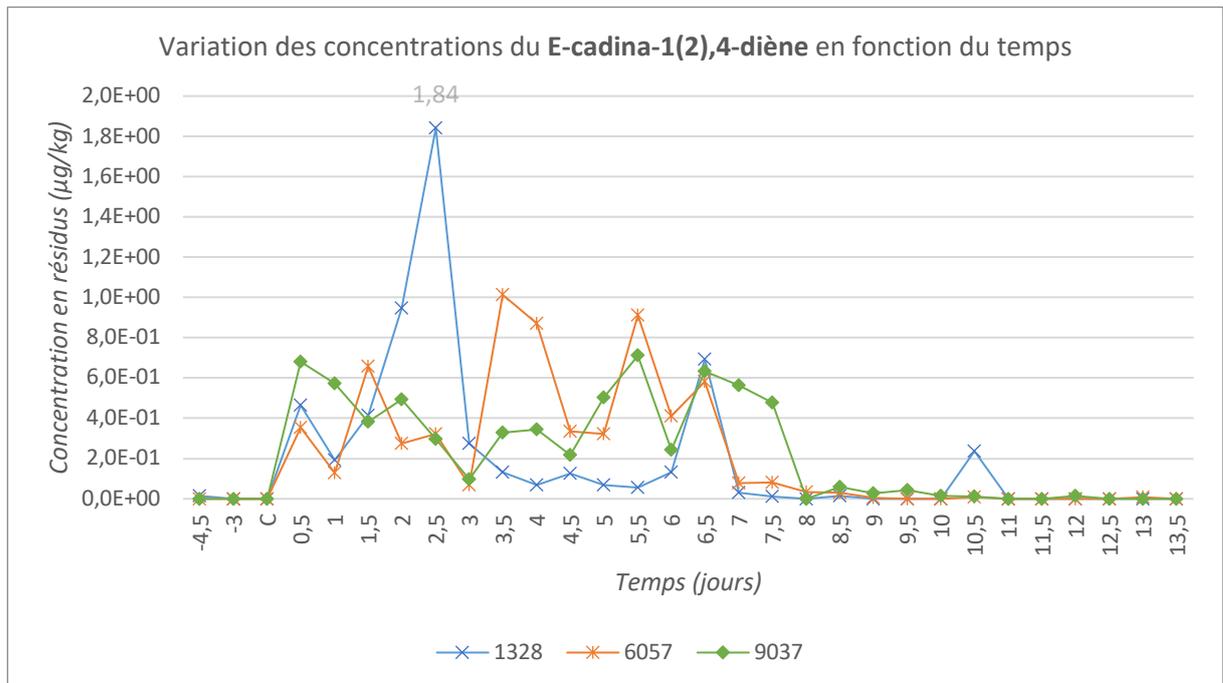


Figure 37 : cinétique de l'E-cadina-1(2),4-diène dans le lait durant l'expérimentation pour les trois vaches

Le dernier composé mis en évidence lors des différents dosages dans le lait est l'E-cadina-1(2),4-diène. Non détectable par la méthode durant la phase de pré-traitement, il est possible de noter une augmentation de ses concentrations dans le lait durant la phase de traitement et une diminution nette après l'arrêt de l'application du mélange d'huile essentielles sur la mamelle des trois vaches, certaines concentrations devenant une fois de plus non détectables dans le lait.

Tableau 12 : récapitulatif des C_{max} et T_{max} des composés détectés

Marqueurs	C_{max} ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	T_{max} (j)
Eucalyptol (1,8-cinéole)	0,36	2,5
α -copaène	1,17	6,5
E-cadina-1(2),4-diène	1,84	2,5

Pour 1,5 kg de lait ingéré quotidiennement, il est obtenu un total ingéré en eucalyptol de 0,54 $\mu\text{g}/\text{j}$. Pour un adulte de 60 kg la dose ingérée d'eucalyptol est donc de 0,009 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$.

Selon les données du rapport du JECFA (tableau 13), pour l'eucalyptol, il n'y a pas de risque aux doses actuellement utilisées comme arôme alimentaire. Il est ainsi estimé que la consommation quotidienne par habitant est de 1 439 $\mu\text{g}/\text{j}$, soit pour un adulte de 60 kg, 24 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$ [29].

La dose estimée ingérée quotidiennement d'eucalyptol en Europe est près de $2,7 \cdot 10^3$ fois plus élevée que la dose estimée ingérée en consommant le lait de vaches traitées par le mélange d'huiles essentielles.

Pour 1,5 kg de lait ingéré quotidiennement, il est obtenu un total ingéré en α -copaène de 1,755 $\mu\text{g}/\text{j}$. Pour un adulte de 60 kg la dose ingérée d' α -copaène est donc de 0,029 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$.

Selon les données du rapport du JECFA (tableau 13), pour l' α -copaène, il n'y a pas de risque aux doses actuellement utilisées comme arôme alimentaire.

Pour 1,5 kg de lait ingéré quotidiennement, il est obtenu un total ingéré en E-cadina-1(2),4-diène de 2,76 $\mu\text{g}/\text{j}$. Pour un adulte de 60 kg la dose ingérée d'E-cadina-1(2),4-diène est donc de 0,046 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$.

Aucune donnée toxicologique n'est disponible pour l'E-cadina-1(2),4-diène, pas plus que des informations sur la consommation quotidienne de cette molécule par habitant en Europe.

Tableau 13 : récapitulatif des données toxicologiques disponibles pour les trois composés détectés

Composé	DL50 (mg/kg)		NOAEL (mg/kg/j)	DJA (mg/kg/j)
	Cutanée	Orale		
Eucalyptol (1,8-cinéole)	/	1 280	300	Pas de risque ¹
α -copaène	/	/	/	Pas de risque ¹
E-cadina-1(2),4-diène	/	/	/	/

¹Pas de risque pour la santé du consommateur aux doses utilisées comme agent aromatisant dans l'alimentation [29,57,58].

/ : absence de donnée toxicologique disponible

3. Dosages des résidus d'huiles essentielles dans le sang

En raison de la crise sanitaire liée à la Covid 19, ces résultats ne sont pas traités dans cette thèse car l'acquisition de ceux-ci n'a pas pu être réalisée à ce jour par le laboratoire de Theix.

IV. Discussion

1. Évaluation du risque pour le consommateur dans le lait

Pour l'huile essentielle de *Lepstopermum scoparium*, il est impossible de conclure quant à la sécurité pour le consommateur qui ingère le lait dont la mamelle de la vache a été traitée avec cette huile au vu de l'absence de données toxicologiques pour le flavésone et leptospermone. Cependant, on peut voir une nette augmentation des concentrations de ceux-ci lors de la phase de traitement et une rapide diminution lors de l'arrêt du traitement. Ils ne persistent pas dans le lait au-delà de la période de traitement via l'application cutanée du mélange sur la mamelle.

D'autres marqueurs auraient pu être utilisés pour cette huile essentielle. En effet, on retrouve dans la composition de l'huile essentielle de *Leptospermum scoparium* (Annexe 7) l' α -copaène à 5,19 % et le cadina-3,5-diène à 4,13 % qui est un isomère du E-cadina-1(2),4-diène (les marqueurs leptospermone et flavésone composent respectivement 18,34 % et 4,97 % de l'huile). On retrouve également l'eucalyptol (1,8-cinéole) mais à l'état de trace (0,16 %).

On peut supposer que l'E-cadina-1(2),4-diène est le reflet du passage du cadina-3,5-diène dans le lait. En effet il s'agit de deux isomères. De plus, comme présenté en annexe 9, certains composés ont été détectés comme majoritaires au cours du dosage dans le mélange M1 tels que l'E-calaménène, le δ -cadinène, etc. qui peuvent également être formés à partir du cadina-3,5-diène et conduire à l'E-cadina-1(2),4-diène [59]. En outre, certains sont déjà présents dans l'huile essentielle de *Leptospermum scoparium* en quantité non négligeable (Annexe 7), contrairement aux autres huiles essentielles de ce mélange dans lequel ces composés sont retrouvés à une teneur de moins de 1 %.

L'eucalyptol et l' α -copaène entrent également dans la composition de l'huile essentielle de *Litsea citrata* mais en très faible quantité (respectivement 0,81 % et 0,13 %, annexe 4). Comme nous n'avons retrouvé aucun des deux marqueurs de cette huile essentielle (néral présent à 28,64 % et géranial présent à 40,97 %) il semble peu probable que l'eucalyptol et l' α -copaène détectés lors des dosages proviennent de cette huile.

De même l' α -copaène est présent à 1,35 % dans l'huile essentielle de *Salvia sclarea* (Annexe 4) et à 0,09 % dans l'huile essentielle de *Melaleuca alternifolia* (Annexe 6). L'isomère du E-cadina-1(2),4-diène, le cadina-1(6),4-diène est présent à 0,21 % dans l'huile essentielle de *Melaleuca alternifolia*. La concentration la plus élevée d'eucalyptol est retrouvée (3,21 %) dans cette huile essentielle.

Le terpinèn-4-ol (marqueur de l'huile essentielle de *Melaleuca alternifolia*), est quant à lui présent dès la phase d'acclimatation et persiste après la phase de traitement : on peut alors supposer qu'il est déjà apporté par l'alimentation des vaches. On observe malgré cela une augmentation minimale des concentrations de ce marqueur durant la phase de traitement pour les trois vaches (Figure 32 et annexe 11).

Le β -citronellal est retrouvé à des concentrations de l'ordre du g/kg dans les échantillons de lait des vaches 1328 et 6057, cinq à sept jours après le début du traitement. Cependant, les courbes de calibrations n'ont été réalisées que jusqu'à la concentration maximale de 200 μ g/kg. Il est donc difficile d'affirmer que ces concentrations pour ce marqueur sont précises. De plus, en dehors des jours cinq à sept après le début du traitement, les concentrations en β -citronellal sont de l'ordre du mg/kg ou du μ g/kg. Il est également observé des variations entre les trois vaches : un pic de concentration plus dix fois plus faible est observé pour les échantillons de lait de la vache 9037 (maximum à $5,2 \cdot 10^5$ μ g/kg au premier jour de la phase de post traitement).

Selon les données toxicologiques disponibles, ce marqueur semble être malgré tout très faiblement toxique aux doses ingérées actuellement en Europe.

Les composés ne traversent pas de la même façon la peau et donc une quantité différente de ceux-ci peut se retrouver dans le lait. Il est donc difficile d'affirmer qu'il n'y a pas de risque pour la consommation sans étudier l'ensemble des composés de chacune des huiles essentielles. Néanmoins, on retrouve la majorité des terpènes à l'état de traces ou de l'ordre du microgramme par kilogramme dans les différents échantillons de lait. De plus, une grande partie des composés des huiles essentielles est en quantité infime dans le mélange. En effet, en prenant l'exemple de l'huile essentielle de *Litsea citrata*, seuls dix de ses composants sont présents à plus de 1 %.

Tous les marqueurs testés (à l'exception du β -citronellal) et qui ont pu être dosés sont en quantité trop faible pour entraîner un risque pour la santé du consommateur de lait selon les données toxicologiques disponibles. Il ne semble pas nécessaire de fixer une LMR et donc un temps d'attente de 0 jour dans le lait pourrait être proposé.

2. Absence de certains marqueurs

Certains marqueurs n'ont pas été retrouvés dans les différents échantillons de lait (néral, géranial, sclaréol, acétate de linalyle et γ -terpinène). Ainsi, nous n'avons pas de suivi de résidus pour les huiles essentielles de *Litsea citrata* et de *Salvia sclarea* et nous avons un seul marqueur pour l'huile essentielle de *Melaleuca alternifolia*.

Les concentrations de ces marqueurs sont donc en dessous des limites de quantification. Plusieurs explications peuvent être avancées.

a. Concentration basale en composés dans le mélange d'huiles essentielles trop faible pour être détectées après absorption par la mamelle

C'est probablement le cas du sclaréol présent à seulement 1,23 % dans l'huile essentielle de *Salvia sclarea* (Annexe 5).

b. Oxydation des composés

Les conditions de stockage du mélange d'huiles essentielles mais également les conditions de stockage des échantillons de lait peuvent influencer sur la quantité de certains composés et donc des résidus que l'on peut trouver dans le lait. En prenant l'exemple de l'huile essentielle de *Melaleuca alternifolia* on peut observer d'importantes variations de composition lorsque celle-ci est oxydée [31,60,61].

Tableau 14 : pourcentages de quelques composés de l'huile essentielle de *Melaleuca alternifolia* en fonction son degré d'oxydation d'après Southwell, 2016 [61]

Composé	Norme ISO 4730	HE non oxydée	HE intermédiaire	HE oxydée
Terpinèn-4-ol	30 – 48	37,7	36,1	34,3
p-cymène	0,5 - 8	2,4	10,2	19,2
α -terpinène	5 - 13	9,1	5,3	1,1
γ -terpinène	10 - 28	19,5	13,6	6,9
α -terpinolène	1,5 - 5	3,5	2,6	1,5

Sur ce tableau on peut voir une nette diminution du γ -terpinène, l'un des marqueurs que nous n'avons pas détecté dans nos échantillons de lait. Il s'agit d'un composé très sensible qui s'oxyde en terpinèn-4-ol et p-cymène comme le montre la figure 38 [32].

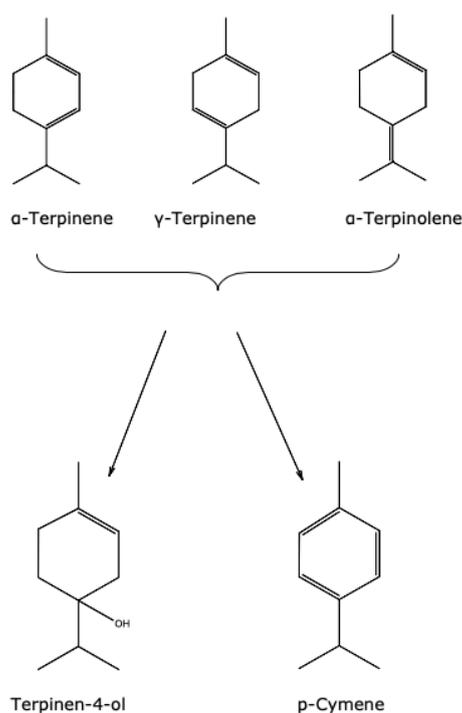


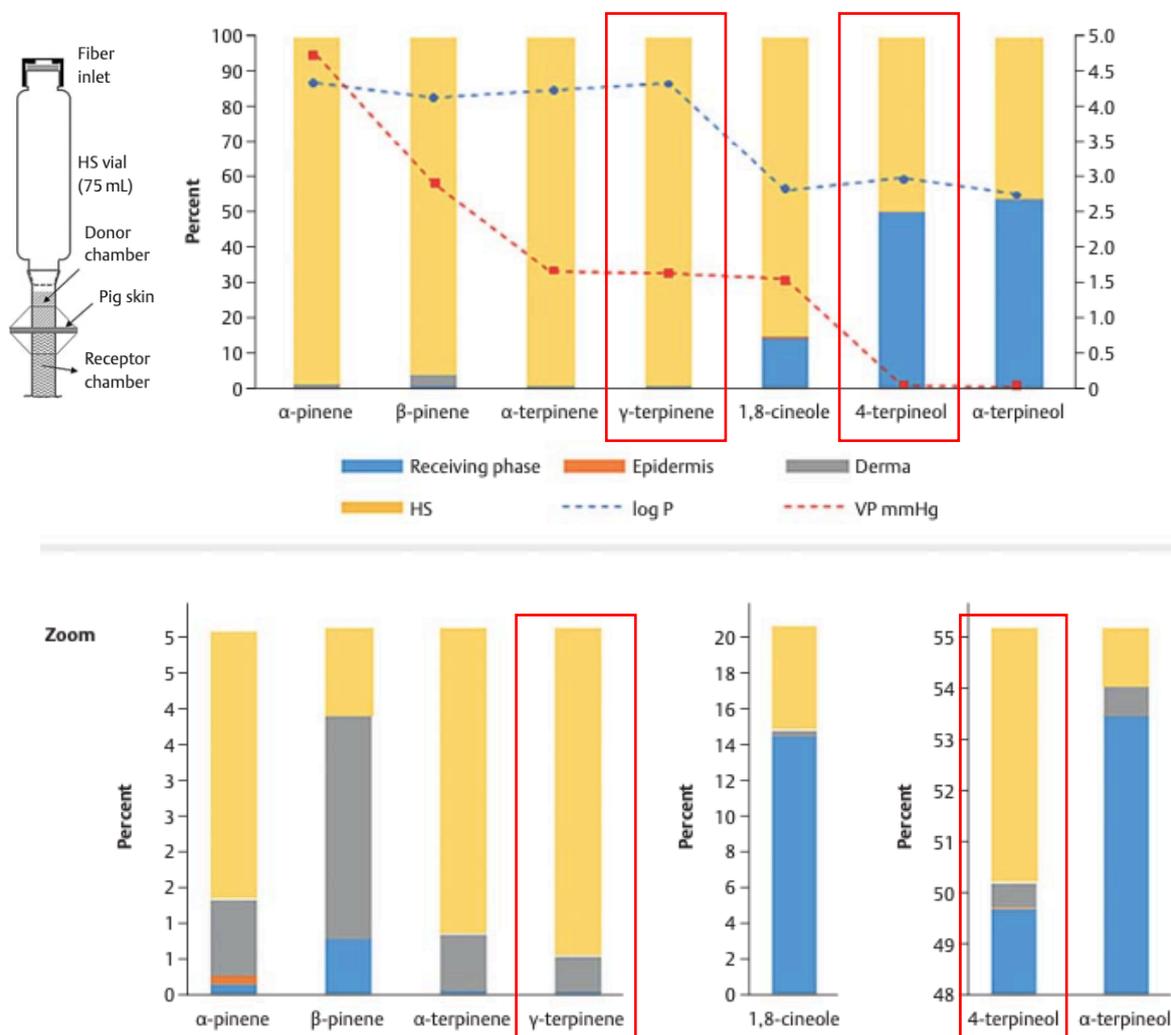
Figure 38 : dégradation du γ -terpinène en terpinèn-4-ol d'après SCCP, 2008 [32]

Ceci est donc une hypothèse à l'absence de certains marqueurs dans nos échantillons. Cependant, afin de limiter au maximum ces phénomènes d'oxydation, le mélange d'huile essentielle a été conservé à l'abri de la lumière et après chaque prélèvement de lait, l'air contenu dans les tubes a systématiquement été remplacé par de l'azote.

c. Défaut d'absorption cutanée

Comme détaillé dans la partie dédiée à l'absorption des huiles essentielles par voie transcutanée, les caractéristiques physico-chimiques influent la pénétration des molécules. En reprenant l'exemple des marqueurs de l'huile essentielle de *Melaleuca alternifolia*, il n'y a pas de différence d'absorption pour les terpènes oxygénés (terpinèn-4-ol) au travers de la peau d'oreille de Porc et pour les terpènes tel que le γ -terpinène. La différence mise en évidence lors de cette étude est due à la différence de concentration en différents composés dans la formulation initiale.

Cependant, il est mis en évidence que les terpènes hydrocarbonés sont plus volatils que les terpènes oxygénés et pénètrent moins les différentes couches de la peau. En effet, on peut voir sur la figure 39 représentant la répartition des différents composés de l'huile essentielle au cours de l'expérimentation que le γ -terpinène est majoritairement retrouvé dans l'espace de tête (HS) tandis que le terpinèn-4-ol a majoritairement franchi toutes les couches de peau (« receiving phase ») [62].



d. Interactions entre les composés des différentes huiles essentielles

Le mélange des cinq huiles essentielles a pu permettre l'apparition et la disparition, via des réactions chimiques de certains composés. Dans l'analyse du mélange M1 (Annexe 9), on trouve des composés qui n'étaient pas présents initialement dans au moins une des huiles essentielles sélectionnées. Pareillement, on peut noter l'absence de nombreux composés (concentration trop faible, ou modification de structure aboutissant à de nouveaux composés).

3. Limites de l'étude

L'une des premières limites de cette étude est le faible nombre d'animaux testés. Ces vaches étaient notamment à différents stades de lactation (deux vaches sont à plus d'un an après leur vêlage). Néanmoins, on retrouve globalement le même profil de concentrations en résidus chez ces trois vaches.

Le mélange des cinq huiles essentielles n'est pas équivalent à chaque huile essentielle prise individuellement. L'évaluation précise du passage dans le lait des composants d'une seule huile essentielle pourrait montrer des résultats différents de ceux observés ici.

Cette étude a pour but de sécuriser l'utilisation des huiles essentielles, notamment dans le cadre du traitement de mammites chez la vache laitière. Nous nous sommes concentrés sur l'excrétion dans le lait de résidus d'huiles essentielles. Cependant, sans les cinétiques de ces résidus dans le sang, on ne peut pas affirmer l'absence de diffusion de ceux-ci dans la viande et les abats.

Les caractéristiques physico-chimiques du lait sont modifiées lors de mammites. En effet, il est possible d'observer une diminution de la quantité de lactose, une augmentation de la quantité de protéines (protéines de l'inflammation, mais aussi protéines sériques telles que l'albumine et les globulines), un déséquilibre des concentrations électrolytiques mais également une augmentation des enzymes dans le lait (enzymes d'origines bactériennes telles que la phosphatase acide par exemple) [63]. Il est donc possible de supposer que toutes ces modifications de la composition du lait peuvent modifier l'absorption et le devenir des huiles essentielles dans le lait.

Conclusion

L'objectif de cette étude est d'amorcer un premier pas vers la sécurisation de l'utilisation des huiles essentielles en médecine des animaux d'élevage et plus précisément, celle de l'utilisation de l'aromathérapie comme alternative aux antibiotiques dans le traitement des mammites chez la vache laitière.

L'essai mené sur trois vaches laitières Prim'Holstein a donné lieu à de premiers résultats permettant de quantifier des résidus d'huiles essentielles dans le lait de vache après application sur la mamelle d'un mélange de cinq huiles essentielles fréquemment prescrites en pratique par les vétérinaires. Il est possible d'observer le passage de composants d'huiles essentielles dans le lait mais généralement en très faible quantité de l'ordre du $\mu\text{g}/\text{kg}$ voire du ng/kg . Certains des composants n'étaient pas détectables par la technique utilisée. De nombreux composants sélectionnés comme marqueurs d'une huile essentielle sont actuellement utilisés comme additifs alimentaires. Des données toxicologiques précises sont alors disponibles.

Exception faite du β -citronellal dont les concentrations dans le lait atteignent le g/kg , tous les autres marqueurs sélectionnés sont à des concentrations dans le lait conduisant à un ingéré calculé nettement en dessous des DJA (lorsqu'elles sont disponibles) ou des quantités ingérées quotidiennement en Europe. Cependant, les concentrations du β -citronellal dans le lait sont nettement supérieures à la concentration maximale des courbes de calibrations établies, ce qui impose de les analyser avec précaution. Les données toxicologiques montrent néanmoins qu'il s'agit d'un composant très faiblement toxique pour lequel aucune DJA n'a été fixée.

Sur la base de ces premiers résultats, il semble possible de proposer qu'il ne soit pas nécessaire de fixer une LMR pour les huiles essentielles et marqueurs choisis. Un temps d'attente de 0 jour dans le lait pourrait être proposé pour les huiles essentielles d'*Eucalyptus citriodora*, *Litsea citrata*, *Melaleuca alternifolia*, *Salvia sclarea* et *Leptospermum scoparium* et cap est. Des prélèvements sanguins doivent être analysés dans les prochains mois. Ainsi, aucune conclusion définitive quant à la fixation de LMR et de temps d'attente dans le lait, et plus encore dans les viandes et abats, ne peut être établie.

Malgré ces résultats, il existe cependant des limites à cette expérimentation, notamment le faible nombre de vaches testées et l'utilisation d'un mélange d'huiles essentielles pouvant modifier les caractéristiques individuelles de chacune des huiles essentielles.

Deux autres mélanges de cinq huiles essentielles ont été appliqués chez ces trois vaches laitières. Leurs résultats des dosages seront disponibles en 2021 et permettront d'aller plus loin dans l'interprétation des résultats obtenus suite à ce premier essai.

Bibliographie

1. Ministère de l'agriculture, de l'agroalimentaire et de la forêt. Plan EcoAntibio 2012-2017 : lutte contre l'antibiorésistance [Internet]. 2011 nov [cité 17 sept 2019] p. 24. Disponible sur : <https://agriculture.gouv.fr/plan-ecoantibio-2012-2017-lutte-contre-lantibioresistance>
2. Ministère de l'agriculture, de l'agroalimentaire et de la forêt. ÉcoAntibio 2, Plan national de réduction des risques d'antibiorésistance en médecine vétérinaire, 2017-2021 [Internet]. 2017 mai [cité 17 sept 2019] p. 20. Disponible sur : <https://agriculture.gouv.fr/le-plan-ecoantibio-2-2017-2021>
3. ANSES. Suivi des ventes de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques en France en 2017 [Internet]. 2018 nov [cité 16 sept 2019] p. 104. Disponible sur : <https://www.anses.fr/fr/system/files/ANMV-Ra-Antibiotiques2017.pdf>
4. Agence BIO. La consommation bio en hausse en 2019 stimule la production et la structuration des filières françaises - Les chiffres 2019 du secteur bio [Internet]. 2020 juill [cité 29 oct 2020] p. 32. Disponible sur : https://www.agencebio.org/wp-content/uploads/2020/07/DP-AGENCE-BIO-CHIFFRES-2019_def.pdf
5. Journal officiel de l'Union européenne. Règlement (CE) No 889/2008 de la commission du 5 septembre 2008 portant modalités d'application du règlement (CE) no 834/2007 du Conseil relatif à la production biologique et à l'étiquetage des produits biologiques en ce qui concerne la production biologique, l'étiquetage et les contrôles. 5 sept 2008 ; 84.
6. Journal officiel de l'Union européenne. Règlement (UE) no 37/2010 de la Commission du 22 décembre 2009 relatif aux substances pharmacologiquement actives et à leur classification en ce qui concerne les limites maximales de résidus dans les aliments d'origine animale. 20 janv 2010;(470):72.
7. European Medicines Agency. Substances considered as not falling within the scope of Regulation (EC) No. 470/2009, with regard to residues of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. 9 sept 2020 ; 7.
8. Article L. 5111-1 [Internet]. Code de la santé publique. Disponible sur : <https://www.legifrance.gouv.fr/codes/id/LEGIARTI000006689867/2020-10-02/>
9. ANSES. Évaluation des demandes d'autorisation de mise sur le marché de médicaments vétérinaires à base de plantes [Internet]. 2016 févr [cité 16 sept 2019] p. 119. Report No.: Saisine n° 2014-SA-0081. Disponible sur : <https://www.anses.fr/fr/system/files/MV2014SA0081Ra.pdf>
10. Franchomme P, Jallois R, Pénéol D. L'aromathérapie exactement. Roger Jallois. 1990. 490 p.
11. Heitz F, Delbecq V. Soins des animaux par les plantes : phytothérapie, gemmothérapie,

- aromathérapie, élixirs floraux. Aubagne : Quintessence ; 2016. 224 p. (Ressources & Santé).
12. Bruneton J. Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales. Paris : Tec & Doc Lavoisier; 2009. 1269 p.
 13. Labre P. Médecines naturelles en élevage : Tome 2, Phytothérapie et Aromathérapie chez les ruminants et le cheval. Thônes : Formation et édition en médecines naturelles vétérinaires ; 2017. 352 p.
 14. Heitz F. Aromathérapie pour les ruminants. France Agricole. 2017. 243 p.
 15. Jouët L. Aromathérapie : principes, méthodes et applications pratiques en productions animales. 2016;71-80.
 16. Adams I, Richard H. Veterinary Pharmacology and Therapeutics. 7th ed. John Wiley & Sons; 1995. 1181 p.
 17. Poirot T. Bon usage des huiles essentielles, effets indésirables et toxicologie [Internet] [other]. Université de Lorraine ; 2016 [cité 25 mars 2020]. p. non renseigné. Disponible sur : <https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01732166>
 18. Poutaraud A, Guilloteau L, Gros C, Lobstein A, Meziani S, Steyer D, et al. Lavender essential oil decreases stress response of horses. Environ Chem Lett. 1 juin 2018;16(2):539-44.
 19. Herman A, Herman AP. Essential oils and their constituents as skin penetration enhancer for transdermal drug delivery: a review. J Pharm Pharmacol. avr 2015;67(4):473-85.
 20. Godin B, Touitou E. Transdermal skin delivery: Predictions for humans from in vivo, ex vivo and animal models. Adv Drug Deliv Rev. 30 sept 2007;59(11):1152-61.
 21. Netzlaff F, Schaefer UF, Lehr C-M, Meiers P, Stahl J, Kietzmann M, et al. Comparison of bovine udder skin with human and porcine skin in percutaneous permeation experiments. Atla-Altern Lab Anim. 1 oct 2006;34(5):499-513.
 22. Reece WO. Dukes' Physiology of Domestic Animals. 13th edition. John Wiley & Sons; 2015. 763 p.
 23. Baser KHC, Buchbauer G. Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications, Second Edition. CRC Press; 2015. 1113 p.
 24. Dancygier H. Hepatic Biotransformation. In: Clinical Hepatology: Principles and Practice of Hepatobiliary Diseases [Internet]. Berlin, Heidelberg : Springer-Verlag; 2010 [cité 12 mars 2020]. p. 127-30. Disponible sur : https://doi.org/10.1007/978-3-540-93842-2_8
 25. McClellan RO. Chapter 2 - Concepts in veterinary toxicology. In: Veterinary Toxicology (Second Edition) [Internet]. Boston: Academic Press; 2012 [cité 16 sept 2020]. p. 8-36. Disponible sur : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123859266000028>
 26. Afsapps. Recommandations relatives à l'évaluation du risque lié à l'utilisation des huiles

- essentielles dans les produits cosmétiques [Internet]. Direction de l'évaluation de la publicité, des produits cosmétiques et biocides Unité d'évaluation toxicologique et microbiologique ; 2010 oct [cité 16 sept 2020]. Report No. : Saisine 2008BCT0004. Disponible sur : https://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/599485607ae049abfac313b71943d612.pdf
27. Journal officiel de l'Union européenne. Règlement (CE) no 470/2009 du Parlement européen et du Conseil du 6 mai 2009 établissant des procédures communautaires pour la fixation des limites de résidus des substances pharmacologiquement actives dans les aliments d'origine animale, abrogeant le règlement (CEE) no 2377/90 du Conseil et modifiant la directive 2001/82/CE du Parlement européen et du Conseil et le règlement (CE) no 726/2004 du Parlement européen et du Conseil. 6 mai 2009 ;12.
28. OCDE SIDS. Citral - CAS N°:5392-40-5 [Internet]. Suisse ; 2001 nov [cité 9 sept 2020] p. 113. (13th SIAM). Disponible sur: <https://hvpchemicals.oecd.org/UI/handler.axd?id=0ea83202-3f4f-4355-be4f-27ff02e19cb9>
29. Joint Expert Committee on Food Additives. Evaluation of certain food additives and contaminants: sixty-first report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives ; [meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Rome 2003] [Internet]. Geneva : WHO ; 2004 [cité 16 sept 2020]. 176 p. Disponible sur : https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42849/WHO_TRS_922.pdf?sequence=1
30. PubChem. PubChem [Internet]. [cité 9 sept 2020]. Disponible sur : <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
31. Cosmetic Ingredient Review. Safety Assessment of Melaleuca alternifolia (Tea Tree)-Derived Ingredients as Used in Cosmetics [Internet]. Washington DC ; 2020 août [cité 9 sept 2020] p. 59. Disponible sur : <https://cir-safety.org/sites/default/files/melalt092020SLR.pdf>
32. Scientific Committee on Consumer Products. Opinion on tea tree oil [Internet]. 2008 déc [cité 9 sept 2020]. Report No. : SCCP/1155/08. Disponible sur : https://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/docs/sccp_o_160.pdf
33. EFSA. Scientific Opinion on Flavouring Group Evaluation 18, Revision 3 (FGE.18Rev3): Aliphatic, alicyclic and aromatic saturated and unsaturated tertiary alcohols, aromatic tertiary alcohols and their esters from chemical groups 6 and 8. EFSA J. 2015;13(5):25.
34. EFSA. Scientific Opinion on Flavouring Group Evaluation 18, Revision 2 (FGE.18Rev2): Aliphatic, alicyclic and aromatic saturated and unsaturated tertiary alcohols, aromatic tertiary alcohols and their esters from chemical groups 6 and 8. EFSA J. 2011;9(5):91.
35. Belsito D, Bickers D, Bruze M, Calow P, Greim H, Hanifin JM, et al. A toxicologic and dermatologic assessment of cyclic and non-cyclic terpene alcohols when used as fragrance ingredients. Food Chem Toxicol. nov 2008;46(11) : S1-71.
36. Joint FAO WHO Expert Committee on Food Additives. Safety evaluation of certain food

- additives and contaminants [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2004 [cité 12 sept 2020] p. 648. Disponible sur: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/43038/924166052X.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
37. Letizia CS, Cocchiara J, Lalko J, Api AM. Fragrance material review on linalyl acetate. *Food Chem Toxicol Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc.* juill 2003;41(7):965-76.
 38. OCDE SIDS. Linalyl acetate - CAS N° : 115-95-7 [Internet]. Paris ; 2002 mars [cité 9 sept 2020] p. 57. (14th SIAM). Disponible sur: <https://hpcvchemicals.oecd.org/ui/handler.axd?id=5b85ed29-f43a-4fdc-a6eb-d65811fb68ad>
 39. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (1998 : Geneva S. Evaluation of certain food additives : fifty-first report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives [Internet]. WHO ; 2000 [cité 16 sept 2020] p. 176. Disponible sur : <https://apps.who.int/iris/handle/10665/42245>
 40. Santé Canada. Évaluation préalable pour le défi concernant le [1R-[1a(R*),2[beta],4a[beta],8aa]]-2-hydroxy-a,2,5,5,8a-pentaméthyl-a-vinyldécahydronaphtalène-1-propan-1-ol (sclaréol): numéro d'enregistrement du Chemical Abstracts Service 515-03-7. [Internet]. 2017 [cité 12 sept 2020]. 67 p. Disponible sur : http://publications.gc.ca/collections/collection_2018/eccc/En14-294-2017-fra.pdf
 41. Dayan FE, Howell J, Marais JP, Ferreira D, Koivunen M. Manuka Oil, A Natural Herbicide with Preemergence Activity. *Weed Sci.* déc 2011;59(4):464-9.
 42. Park CG, Jang M, Shin E, Kim J. Myrtaceae Plant Essential Oils and their β -Triketone Components as Insecticides against *Drosophila suzukii*. *Mol J Synth Chem Nat Prod Chem* [Internet]. 24 juin 2017 [cité 30 sept 2020];22(7). Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6152387/>
 43. Article L. 5143-4 [Internet]. Code de la santé publique. Disponible sur : <https://www.legifrance.gouv.fr/codes/id/LEGIARTI000006690256/2007-04-26/>
 44. Arrêté du 4 mai 2010 relatif à la fixation par le vétérinaire du temps d'attente applicable lors de l'administration d'un médicament en application de l'article L. 5143-4 du code de la santé publique - Légifrance [Internet]. Disponible sur : <https://www.legifrance.gouv.fr/jorf/id/JORFTEXT000022205090/>
 45. Faye B, Landais E, Coulon JB, Lescourret F. Incidence des troubles sanitaires chez la vache laitière : bilan de 20 années d'observation dans 3 troupeaux expérimentaux. *INRA Prod Anim.* 1994 ; 7(3):191-206.
 46. Viallon C, Martin B, Verdier-Metz I, Pradel P, Garel J-P, Coulon J-B, et al. Transfer of monoterpenes and sesquiterpenes from forages into milk fat. *Le Lait.* 1 nov 2000 ; 80(6):635-41.
 47. Cornu A, Kondjoyan N, Martin B, Verdier-Metz I, Pradel P, Berdagué J-L, et al. Terpene

- profiles in Cantal and Saint-Nectaire-type cheese made from raw or pasteurised milk. *J Sci Food Agric.* 2005;85(12):2040-6.
48. Cornu A, Kondjoyan N, Martin B, Ferlay A, Pradel P, Coulon J-B, et al. Vers une reconnaissance des principaux régimes alimentaires des vaches à l'aide des profils terpéniques du lait- 3R - Rencontres autour des Recherches sur les Ruminants. In 2002 [cité 12 déc 2019]. Disponible sur : <http://www.journees3r.fr/spip.php?article1026>
 49. Dubroeuq H, Martin B, Ferlay A, Pradel P, Verdier-Metz I, Chilliard Y, et al. L'alimentation des vaches est susceptible de modifier les caractéristiques (...) - 3R - Rencontres autour des Recherches sur les Ruminants. In 2002 [cité 12 déc 2019]. Disponible sur : <http://www.journees3r.fr/spip.php?article1013>
 50. ADAGE 35. 8 pathologies des élevages bovins laitiers. In 2016 [cité 29 oct 2020]. p. 37. Disponible sur : <http://www.adage35.org/wp-content/uploads/2009/11/Observatoire.pdf>
 51. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils – A review. *Food Chem Toxicol.* 1 févr 2008;46(2):446-75.
 52. Garavaglia J, Markoski MM, Oliveira A, Marcadenti A. Grape Seed Oil Compounds: Biological and Chemical Actions for Health. *Nutr Metab Insights.* 16 août 2016 ; 9:59-64.
 53. Snow NH, Slack GC. Sample Preparation Techniques for Gas Chromatography. In: *Modern Practice of Gas Chromatography* [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2004 [cité 2 avr 2020]. p. 545-604. Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/0471651141.ch11>
 54. Wojnowski W, Majchrzak T, Dymerski T, Gębicki J, Namieśnik J. Dynamic Headspace Sampling as an Initial Step for Sample Preparation in Chromatographic Analysis. *J AOAC Int.* 1 nov 2017;100(6):1599-606.
 55. Menet M-C. Principes de la spectrométrie de masse. *Rev Francoph Lab.* 1 déc 2011;2011(437):41-53.
 56. Pouliquen H, Mallem Y. Chapitre 20 - Résidus de médicaments vétérinaires. In : *Risques chimiques liés aux aliments : Principes et applications.* Tec & Doc Lavoisier ; 2018. p. 560.
 57. Jalilzadeh-Amin G, Maham M. The application of 1,8-cineole, a terpenoid oxide present in medicinal plants, inhibits castor oil-induced diarrhea in rats. *Pharm Biol.* 3 avr 2015;53(4):594-9.
 58. Joint Expert Committee on Food Additives. Evaluation of certain food additives: sixty-third report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2005. 157 p. (WHO technical report series). Disponible sur: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/43141/WHO_TRS_928.pdf;jsessionid=E5607285875F07A9BE0972EC1C1A41E1?sequence=1
 59. Melching S, Bülow N, Wihstutz K, Jung S, König WA. Natural occurrence of both enantiomers of cadina-3,5-diene and δ -amorphene. *Phytochemistry.* 1 avr

1997;44(7):1291-6.

60. European Medicines Agency. Assessment report on *Melaleuca alternifolia* (Maiden and Betch) Cheel, *M. linariifolia* Smith, *M. dissitiflora* F. Mueller and/or other species of *Melaleuca*, *aetheroleum* [Internet]. 2014 nov [cité 9 sept 2020] p. 71. Report No. : EMA/HMPC/320932/2012. Disponible sur : https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-report/final-assessment-report-melaleuca-alternifolia-maiden-betch-cheel-m-linariifolia-smith-m/other-species-melaleuca-aetheroleum_en.pdf
61. Southwell I. p-Cymene and organic peroxides as indicators of oxidation in tea tree oil [Internet]. Rural Industries Research and Development Corporation; 2006 sept [cité 9 sept 2020] p. 55. Report No.: No. 06/112 Project No ISO 2A. Disponible sur: <https://agrifutures.com.au/wp-content/uploads/publications/06-112.pdf>
62. Capetti F, Sgorbini B, Cagliero C, Argenziano M, Cavalli R, Milano L, et al. *Melaleuca alternifolia* Essential Oil: Evaluation of Skin Permeation and Distribution from Topical Formulations with a Solvent-Free Analytical Method. *Planta Med.* avr 2020;86(6):442-50.
63. Waes G, Van Belleghem M. Influence de la mammite sur les propriétés technologiques du lait et sur la qualité des produits laitiers. *Le Lait.* 1969 ; 49(485_486):266-90.

Annexes

Annexe 1 : liste out of scope de l'EMA

2. Substances considered as not falling within the scope of Regulation (EC) No 470/2009

Excipients

Acetone (CAS No: 67-64-1): for cutaneous use only

Alcohols, C9-11, ethoxylated (CAS 68439-46-3)

Aqua purificata (CAS No: 7732-18-5)

Bentonite (CAS No: 1302-78-9): for cutaneous and oral use only

Benzethonium chloride (CAS 121-54-0): for use as a preservative at concentrations of up to 0.01% resulting in target animal doses of up to 8 µg/kg bw

Bis(2,6-diisopropylphenyl)carbodiimide (CAS No: 2162-74-5): for cutaneous or in-hive use only

2-(2-n-Butoxyethoxy) ethanol (CAS No: 112-34-5)

Carbomer (CAS No: 9003-01-4)

Carbomer copolymer A (CAS No: 1456857-02-1): for topical administration at doses of up to 1.6 mg/kg bw

Casein hydrolysate (CAS No: 65072-00-6)

Cetearyl ethylhexanoate (CAS No: 59130-70-7): for cutaneous use only at doses of up to 35.0 mg/kg bw

Chlorbutanol (CAS No: 57-15-8): at concentrations up to 1%

Coconut oil (CAS No: 8001-31-8)

Collagen hydrolysate (CAS No: 9007-34-5)

Copolymer of polyvinylpyrrolidone and vinyl acetate (CAS No: 25086-89-9): for cutaneous use only

Com oil (CAS No: 8001-30-7)

Cotton seed oil (CAS No: 8001-29-4)

Cytosine-phosphate-guanine 23877: for use as an adjuvant at concentrations of up to 100 µg per dose

Denatonium benzoate (CAS No: 3734-33-6): for topical administration at doses of up to 0.25 mg/kg bw

N-(2-deoxy-2-L-leucylamino-β-D-glucopyranosyl)-N-octadecyl-dodecanoylamide hydroacetate: for use as an adjuvant at concentrations of up to 1 mg per dose

Didodecyl 3,3'-sulfanedioldipropionate (CAS No: 693-36-7): for in-hive use only

Diethylaminoethyl (DEAE)-dextran (CAS No: 9013-34-7) and diethylaminoethyl (DEAE)-dextran hydrochloride (CAS No: 9064-91-9): at concentrations up to 150 mg/ml

Diethylhexyladipate (DEHA) (CAS No: 103-23-1): for cutaneous use only at doses of up to 45 mg/kg bw

Dimethyldioctadecylammonium bromide (CAS No: 3700-67-2): for use as an adjuvant at a total dose of not greater than 21 mg/animal.

Dimethyl ether (CAS No: 115-10-6): for use as a propellant for topical administration

Substances considered as not falling within the scope of Regulation (EC) No 470/2009, with regard to residues of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin
EMA/CVMP/519714/2009

Page 3/6

di-n-butyl-adipate (CAS No: 105-99-7)

Di-polyethylene glycol-6 ester of oleic acid (CAS No: 879124-92-2): at doses of up to 1 mg/kg bw

Dipropylene glycol methyl ether (CAS No: 34590-94-8)

2-[2-(dodecyloxy)ethoxy]ethanol (CAS No: 3055-93-4): for cutaneous use only

Dolomite (CAS No: 16389-88-1)

Erucamide (CAS No: 112-84-5): for in-hive use only

Ethoxyquin (CAS No: 91-53-2): at concentrations up to 0.1 mg/g

N-Ethylglucamine (CAS No 14216-22-9)

Fatty acid methyl esters (CAS No: 67762-38-3): for topical administration

Fibrous materials of plant origin

Gamma hexalactone (CAS No: 685-06-7): for topical administration at doses of up to 14 mg/kg bw

Gelatin (CAS No: 9000-70-8)

Glycerol dimethylketal (CAS No: 100-79-8): at concentrations up to 150 mg/ml

4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) (CAS No: 7365-45-9): for use as a buffering agent in vaccines and vaccine diluents

Isopropyl myristate (CAS No: 110-27-0): at doses up to 5 mg/kg bw

Isoctadecanol ethoxylates (CAS no. 69011-36-5)

Macrogol cetostearyl ether (CAS No: 68439-49-6): for administration by the intramammary route at doses of up to 0.95 mg/kg bw

Maleic acid (CAS No: 110-16-7): for use in buffering systems at doses up to 0.39 mg/kg bw

Meglumine (CAS No: 6284-40-8): at doses up to 1.5 mg/kg bw

Metacresol (CAS No: 108-39-4): at concentrations up to 0.2%

Methacrylic acid - ethyl acrylate copolymer (CAS No 25212-88-8): for oral use only

Monophosphoryl lipid A (CAS No 1246298-63-4): for use as an adjuvant at concentrations of up to 6 µg per dose

Octadecenoxyethyl-heptadecenyloxyethylimidazolium chloride (DOTIM) (CAS: 214909-22-5): for intramuscular use as part of a vector for immunostimulants at doses up to 356 µg/animal

2-Octyl-dodecanol (CAS No: 5333-42-6): when administered topically at doses up to 20 mg/kg bw

Oleic acid (CAS No: 112-80-1)

Olive oil (CAS No: 8001-25-0)

Peanut oil (CAS No: 8002-03-7)

Pentaerythrityl tetrakis[3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)propionate (CAS No: 6683-19-8): for in-hive use only

Phosphodiester oligodeoxynucleotides: for use as adjuvant

Substances considered as not falling within the scope of Regulation (EC) No 470/2009, with regard to residues of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin
EMA/CVMP/519714/2009

Page 4/6

Pine wood flour: for in-hive use only
 Polybutene (CAS No: 9003-29-6)
 Polydimethyl siloxane, dimethylvinyl-terminated (CAS No: 68083-19-2): for in-hive use only
 Polyethylene glycol-8 beeswax
 Polyethylene glycol-75 lanolin (CAS no 8039-09-6 and 61790-81-8): for topical use only
 Poly(ethylene-vinyl acetate) (CAS No: 24937-78-8)
 Poly(lactic-co-glycolic acid)
 Polysaccharides naturally occurring such as celluloses and hydroxycelluloses, dextrans and glucaans
 Polymyxin B (CAS No: 1404-26-8): for use as an endotoxin neutralising agent in vaccines at doses of not more than 500 µg/dose (approximately 5000 IU per dose) or not more than 8 µg/kg bw (approximately 80 IU/kg bw), whichever is the lower
 Polyvinyl chloride homopolymer (PVC) (CAS No: 9002-86-2), with a vinyl chloride limit < 1 ppm
 Polyoxyethylene cetyl ethers (ceteths, CAS No 9004-95-9): at doses up to 1 mg/kg bw
 Polyoxyethylene (9) lauryl ether (CAS No: 3055-99-0): for cutaneous use only
 Polyoxyethylene oleate (CAS No. 9004-96-0): at doses up to 1.15 mg/kg bw
 Polyoxyethylene oleic alcohol (CAS No 9004-98-2): at doses up to 0.95 mg/kg bw
 Polyoxyethylene (40) sorbitol septeaoleate (CAS No: 63089-85-0): for cutaneous use only
 Polyoxypropylene (PPG-2) myristyl ether propionate (CAS No: 74775-06-7): for cutaneous use only
 Polypropylene (CAS No: 9003-07-0)
 Propolis
 Propylene carbonate (CAS No: 108-32-7): at doses up to 1.4 mg/kg bw
 Sesame oil (CAS No: 8008-74-0)
 Silicones (CAS No: 9006-65-9)
 Simethicone (CAS No: 8050-81-5)
 Sodium starch glycolate (CAS: 9063-38-1): for oral and cutaneous use only
 Soybean (milled and hulled)
 Soybean oil, including epoxidized soybean oil (CAS No: 8001-22-7 and 8013-07-8)
 Squalane (CAS No: 111-01-3): as a component of the adjuvant system
 Starches normally found in food and food grade starches
 Styrene-butadiene block copolymer (CAS No: 9003-55-8): with a butadiene limit of less than 1 ppm
 Sulfolipo-cyclodextrin
 Triethanolamine (CAS No: 102-71-6)
 Tris(ronylphenyl)phosphite (CAS No: 26523-78-4)

Substances considered as not falling within the scope of Regulation (EC) No. 417/2009: with regard to residues of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin
 EMA/CVMP/519714/2009

Trometamol (CAS No: 77-86-1): for use in buffering systems at doses up to 0.65 mg/kg bw
 Vanillin (CAS No: 121-33-5)
 Vermiculite (CAS No: 1318-00-9), including expanded vermiculite
 Zymosan A (CAS No: 58856-93-2): for use as an adjuvant at doses of up to 0.12 mg/kg bw

Normal foodstuffs

Avena (oats)
 Carbohydrates naturally occurring
 Cereals
 Chocolate flavour
 Coffea arabica
 Honey
 Lipids as constituents of the human diet
 Royal jelly
 Petroselinum crispum (parsley)
 Peptides and proteins as constituents of the human diet
 Pulses
Chemically complex substances of natural origin
 Organ autolysates
 Immunoglobulines
 Dried dialysate derived from blood
 Lyophilised ruminal fluid
Natural substances essential for animal and human life
 Oxygen (CAS No: 7782-44-7)
Biologically active constituents
 Probiotic components including bacteria and yeasts
 Stem cells

Substances that act by purely physical mechanisms

Cross-linked polyacrylamide hydrogel (CAS no. 9003-05-8), with impurity concentrations of acrylamide ≤ 1.5 ppm, and N,N'-methylene-bis-acrylamide ≤ 1 ppm, for intra-articular use in horses up to a dose of 0.08 ml/kg bw

Substances considered as not falling within the scope of Regulation (EC) No. 417/2009: with regard to residues of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin
 EMA/CVMP/519714/2009



Pôle Herbivores
CA de Bretagne

Phytothérapie et Huiles Essentielles : réglementation

La législation actuelle stipule que

- seules les HE inscrites au tableau 1 du règlement LMR (Limites maximales de résidus) sont autorisées.
- avec des Délais d'attente d'au moins 7 jours pour le lait et 28 jours pour la viande (principe de la cascade)

Liste des huiles essentielles autorisées en médecine vétérinaire (extrait du tableau 1 du règlement LMR) (NB : usage topique : usage externe local)

Substance pharmacologiquement active	Espèce animale	Autres dispositions
Angelicae radix aetheroleum*	Toutes les espèces productrices d'aliments	-
Anisi aetheroleum*	Toutes les espèces productrices d'aliments	-
Carvi aetheroleum*	Toutes les espèces productrices d'aliments	-
Caryophylli aetheroleum*	Toutes les espèces productrices d'aliments	-
Cinnamomi cassiae aetheroleum*	Toutes les espèces productrices d'aliments	-
Cinnamomi ceylanici aetheroleum*	Toutes les espèces productrices d'aliments	-
Citri aetheroleum*	Toutes les espèces productrices d'aliments	-
Citronellae aetheroleum*	Toutes les espèces productrices d'aliments	-
Coriandri aetheroleum*	Toutes les espèces productrices d'aliments	-
Cupressi aetheroleum*	Toutes les espèces productrices d'aliments	Pour usage topique uniquement
Eucalypti aetheroleum*	Toutes les espèces productrices d'aliments	-
Foeniculi aetheroleum*	Toutes les espèces productrices d'aliments	-
Lauri folii aetheroleum*	Toutes les espèces productrices d'aliments	-
Lavandulae aetheroleum*	Toutes les espèces productrices d'aliments	Pour usage topique uniquement
Melissae aetheroleum*	Toutes les espèces productrices d'aliments	-
Menthae arvensis aetheroleum*	Toutes les espèces productrices d'aliments	-
Menthae piperitae aetheroleum*	Toutes les espèces productrices d'aliments	-
Myristicae aetheroleum*	Toutes les espèces productrices d'aliments	À n'utiliser que sur l'animal nouveau-né
Rosmarini aetheroleum*	Toutes les espèces productrices d'aliments	-
Terebinthinae aetheroleum* rectificatum	Toutes les espèces productrices d'aliments	Pour usage topique uniquement
Thymi aetheroleum*	Toutes les espèces productrices d'aliments	-

Au delà des seules huiles essentielles, pour tous les médicaments à base de plantes, il y a plusieurs statuts

- Interdites : Aristoloche -> Tableau 2
- Autorisées : « out of scope » : produits alimentaires
- Autorisées : sans LMR requise -> Tableau 1 (voir pages suivantes)

Les autres ne sont pas autorisées

Huile essentielle analysée : Eucalyptus Citronné

Date de l'analyse : 04 Juin 2018
 Lot : 151BV810
 DLU : Juillet 2020

❖ **Description générale.**

Huile essentielle	Eucalyptus Citronné	Origine	Brésil
Nom latin	Eucalyptus citriodora Hook		

❖ **Caractéristiques organoleptiques.**

Aspect	Liquide limpide et assez mobile	Conforme
Couleur	Incolore	Conforme
Odeur	Caractéristique et citronnée	Conforme

❖ **Caractéristiques physico-chimiques.**

Résultats analyses (à 20°C)	Spécifications fiche technique LRD	
Densité	0,868	0,860 < d < 0,870
Indice de réfraction	1,4500	1,4500 < IR < 1,4585
Pouvoir rotatoire	+1,40°	-1° < [α] _D ²⁰ < +3°

❖ **Analyse chromatographique.**

CG : Perkin Elmer – Clarus 500
 Colonne : Elite – Wax, 30 m, Ø 0,25 mm, 0,25 µm df
 Injection : split
 Détecteur : FID
 Gaz vecteur : H₂
 Intégration : pourcentage d'aire – seuil : 0,02%

⇒ voir chromatogramme joint : colonne polaire

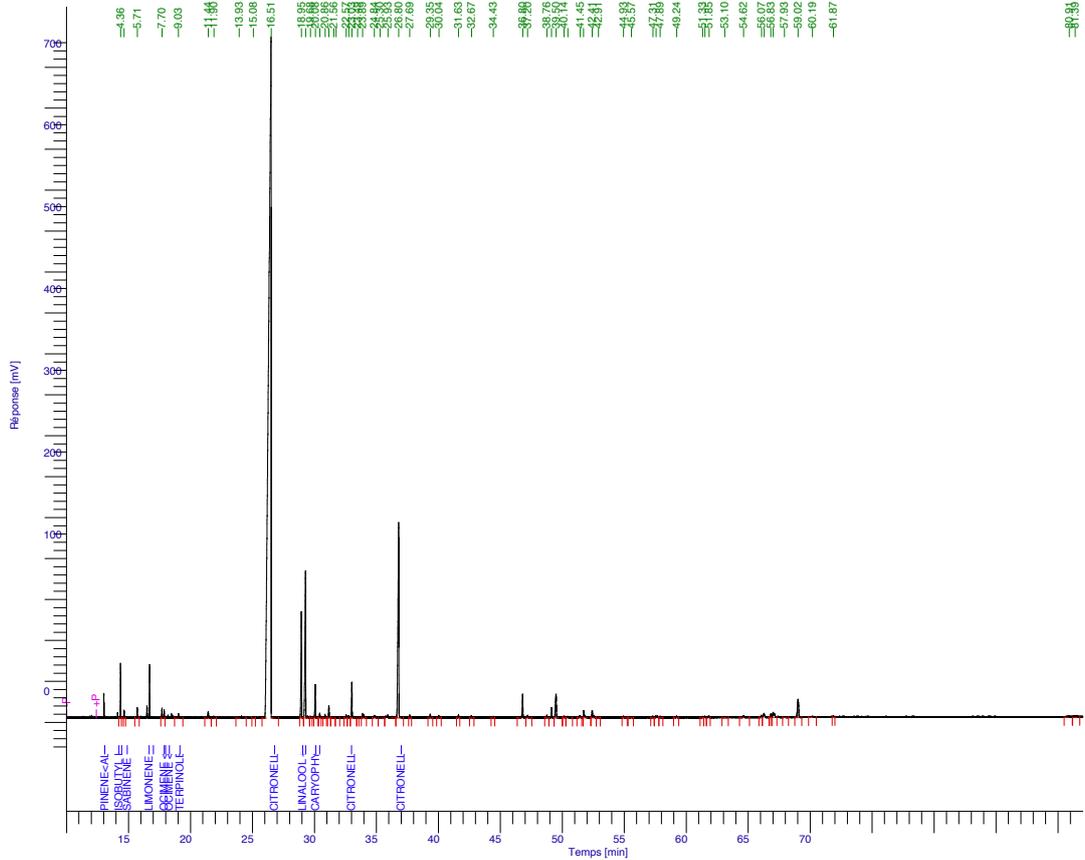
❖ **Conclusion**

Lot accepté.

Contrôle par Charlene Bru, responsable analytique Le 05/06/18		Libérée par Benoit Pichon, responsable assurance qualité Le 05/06/18	
--	--	---	--

Chromatogram

Sample Name : HE Eucalyptus citronne 151BV810
 File Name : C:\Data\Colonne Polaire\Huile Essentielle\Eucalyptus Citronne\2018\euca\yptus citronne 151BV810.mw
 Method : Eucalyptus citronne.pur.mh
 Start Time : 0:00 min
 End Time : 82:00 min
 Plot Offset : -38.90 mV
 Time of Injection: 6/2/2018 10:59:57 AM
 Low Point : -38.90 mV
 High Point : 837.04 mV
 Plot Scale: 875.9 mV



6/4/2018 2:29:14 PM Result:

pic #	Nom composant	TR [min]	Aire [%]
58		56.29	0.22
59		57.03	0.26
60		57.81	0.34
61		57.93	0.96
62		59.02	0.96
63		60.19	0.03
64		61.87	0.02
65		80.91	0.03
66		81.39	0.06
			100.00

Laboratoire Poesler Davenne

Date : 6/4/2018 2:29:14 PM
 Data Acquisition Time : 6/2/2018 10:59:57 AM
 Channel : B
 Operator : seglaire
 Dilution Factor : 1.000000

Software Version : 6.3.2.0646
 Sample Name : HE Eucalyptus citronne 151EBV510
 Instrument Name : CLARUS 500
 Rack/Vial : 015
 Sample Amount : 0.000000
 Cycle : 15

Result File :
 Sequence File : C:\Sequences\CPG\2018\180601.seq

Rapport d'analyse

colonne polaire Elite WAX

pic #	Nom composant	TR [min]	Aire [%]
1	pinene-<beta>-isobutyl isobuty	4.36	0.78
2		4.65	0.11
3		5.71	0.19
4	ocimene <(Z)-beta>	7.70	0.35
5	terpinolene	9.03	0.12
6		11.44	0.19
7		11.90	0.04
8		13.93	0.06
9		15.08	0.02
10	citronellal	16.51	74.11
11	linalool + isopulegol<iso>	18.95	2.91
12	isopulegol <neo>	19.29	4.82
13		19.68	0.03
14	carvophyllene <(E)>	20.08	0.92
15	terpinen-4-ol	20.44	0.12
16		21.17	0.31
17		21.56	0.03
18		21.74	0.02
19		22.57	0.06
20		22.77	0.06
21		23.03	0.95
22	citronellyl acetate	23.49	0.01
23		23.89	0.17
24		24.84	0.13
25		25.30	0.03
26		25.93	0.18
27		26.80	7.77
28	citronellol	27.69	0.06
29		29.35	0.08
30		30.04	0.05
31		31.63	0.08
32		32.67	0.04
33		34.43	0.62
34		36.80	0.68
35		37.20	0.08
36		38.76	0.05
37		39.14	0.27
38		39.50	1.02
39		40.14	0.03
40		40.45	0.05
41		41.45	0.09
42		41.72	0.29
43		42.41	0.30
44		42.91	0.02
45		44.93	0.03
46		45.57	0.02
47		47.31	0.03
48		47.56	0.09
49		47.89	0.02
50		49.24	0.04
51		51.33	0.01
52		51.80	0.02
53		51.86	0.02
54		53.10	0.02
55		54.62	0.06
56		56.07	0.05
57			

Annexe 4 : caractéristiques et chromatographie de l'huile essentielle de Litsea citrata (litsée citronnée)

Laboratoire Rosier Davenne

BULLETIN D'ANALYSES

Motus/Revision Date de révision: BAHEF0017_01.10.01.19
 Modifications: aucune
 Edition le : 10/01/19

p/1

Huile essentielle analysée : **Litsée**

Date de l'analyse : 12 Décembre 2018
 Lot : 330QB804
 Date de contrôle (DRC) : Mai 2020

❖ Description générale.

Huile essentielle	Litsée	Origine	Chine
Nom latin	Litsea citrata		
Partie distillée	Fruits		

❖ Caractéristiques organoleptiques.

Aspect	Liquide mobile, limpide	Conforme
Couleur	Jaune	Conforme
Odeur	Caractéristique, fraîche, rappelant le citral et la verveine	Conforme

❖ Caractéristiques physico-chimiques.

Résultats analyses (à 20°)	Spécifications fiche technique LRD		
Densité	0,888	< d	< 0,892
Indice de réfraction	1,4843	< IR	< 1,4900
Pouvoir rotatoire	+9,35°	< [α] _D ²⁰	< +12°

❖ Analyse chromatographique.

CG : Perkin Elmer – Carius 500
 Colonne : Elite – Wax, 30 m, Ø 0,25 mm, 0,25 µm df
 Injection : split
 Détecteur : FID
 Gaz vecteur : H₂
 Intégration : pourcentage d'aire – seuil : 0,02%

⇒ voir chromatogramme joint : colonne polaire

❖ Conclusion

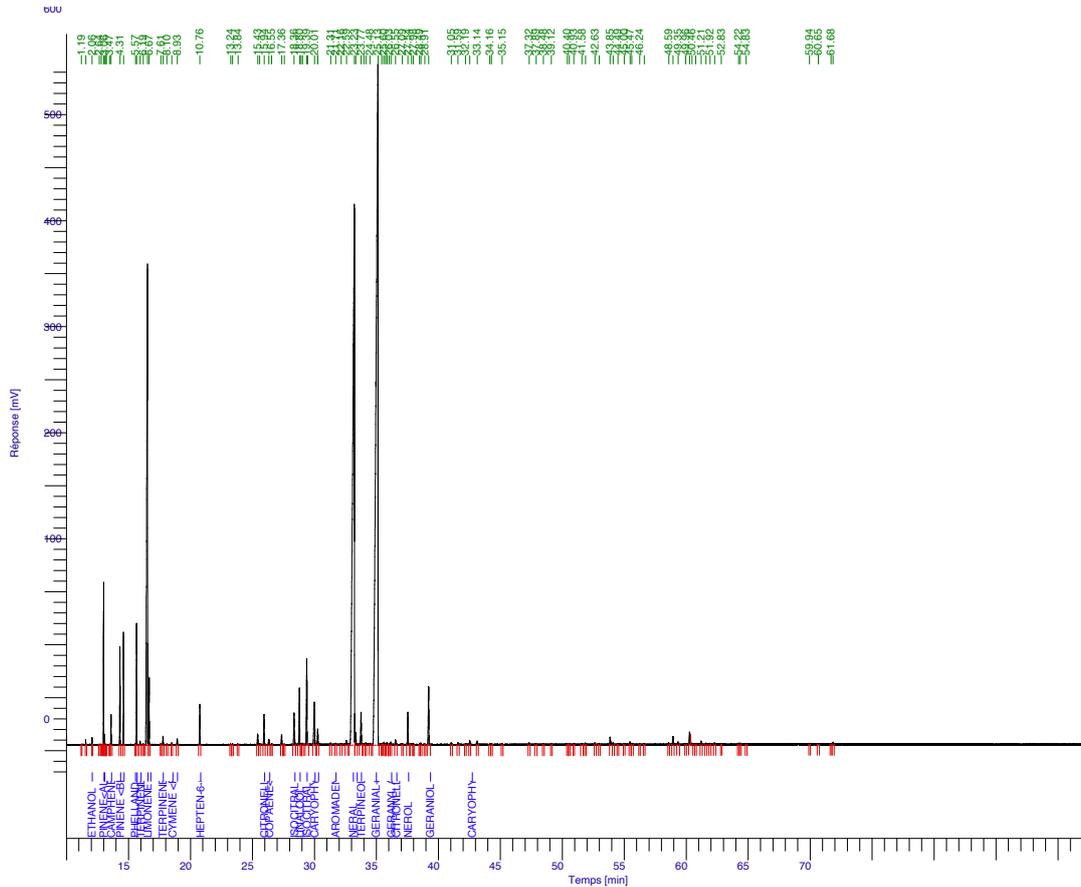
Lot libéré.

Contrôle par Isométrie Lièvre, contrôle analytique	Le 10/01/19	Libéré par Benoit Pichon, responsable assurance qualité	Le 10/01/19
---	-------------	---	-------------

LABORATOIRE ROSIER DAVENNE – Domaine Saint Priest – 7189 avenue Sainte Catherine – 81140 MONTFAVET - FRANCE
 tel : +33 4 90 22 22 22 - fax : +33 4 90 22 22 24 - email : labo.davenne@wanadoo.fr

Chromatogram

Sample Name : HE Litsea 330QB804
 File Name : C:\Data\Clonne Polaire\Huil Essentielle\Litsea2018\litsea bio 181213.raw
 Page 1 of 1
 Method : litsea pure.mh
 Start Time : 0,00 min
 End Time : 82,00 min
 Time of Injection : 12/13/2018 12:17:19 PM
 Plot Offset : -28,91 mV
 Low Point : -28,91 mV
 High Point : 647,66 mV
 Plot Scale: 6766 mV



Software Version : 6.3.2.0646
 Sample Name : HE_Litsea_330QB804
 Instrument Name : CLARUS 500
 Rack/Vial : 0/3
 Sample Amount : 1.000000
 Cycle : 2
 Date : 12/13/2018 3:23:57 PM
 Data Acquisition Time : 12/13/2018 12:17:19 PM
 Channel : B
 Operator : bmerle
 Dilution Factor : 1.000000
 Result File : C:\Sequences\CPQ2018181213.seq
 Sequence File : C:\Sequences\CPQ2018181213.seq

Rapport d'analyse

colonne polaire Elite WAX

pic #	Nom composant	TR [min]	Aire [%]
1		1.19	0.00
2		1.55	0.03
3	ethanol	2.06	0.05
4		2.64	0.00
5		2.81	0.01
6	pinene-<alpha>	2.99	1.39
7	thujene-<alpha>	3.06	0.09
8		3.14	0.01
9		3.22	0.00
10		3.47	0.00
11	camphene	3.59	0.30
12	pinene <beta>	4.31	1.05
13	sabinene	4.60	1.20
14	phellandrene-<alpha>	5.57	0.01
15	myrcene	5.66	1.46
16		6.14	0.05
17	terpinene-<alpha>	6.19	0.02
18	limonene	6.54	12.47
19	cinole<1,8>-p<h>ellandrene-<beta>	6.67	0.81
20		7.61	0.01
21	terpinene-<gamma>	7.79	0.12
22		8.10	0.01
23	cymene <p>	8.49	0.02
24	terpinolene	8.93	0.09
25	hepten-6-one <2-methyl-2>	10.76	0.61
26		13.24	0.01
27		13.40	0.01
28		13.84	0.01
29		15.43	0.18
30		15.59	0.02
31	citronellal	15.94	0.52
32	copaene-<alpha>	16.33	0.13
33		16.55	0.01
34		17.26	0.01
35		17.36	0.01
36	isocitral <Z>	18.26	0.65
37	linalcol	18.80	0.98
38		18.93	0.01
39		19.04	0.02
40	isocitral <E>	19.39	1.56
41		19.46	0.02
42	carvophyllene <E>-elemene<be	20.01	1.17
43	terpinen-4-ol	20.27	0.27
44		21.31	0.02
45	aromadendrene-<allo>	21.71	0.02
46		22.16	0.01
47		22.59	0.09
48	neral	23.23	28.84
49	muurolene-<gamma>	23.34	0.26
50	terpineol <alpha>-borneol	23.77	0.63
51		23.99	0.02
52		24.16	0.03
53		24.44	0.02
54	geraniol+?	25.13	40.97
55		25.43	0.01
56		25.60	0.03
57		25.74	0.02

12/13/2018 3:23:57 PM Result:

pic #	Nom composant	TR [min]	Aire [%]
58		25.87	0.05
59		26.01	0.01
60	geranyl acetate	26.18	0.05
61	citronellol	26.55	0.10
62		27.09	0.01
63	nerol	27.54	0.59
64		27.84	0.03
65		27.98	0.02
66		28.49	0.01
67		28.59	0.03
68		28.91	0.01
69	geraniol	29.21	1.05
70		31.05	0.03
71		31.59	0.04
72		32.19	0.01
73	carvophyllene oxide	32.54	0.08
74		33.14	0.06
75		34.16	0.01
76		34.29	0.02
77		37.02	0.01
78		37.92	0.01
79		37.99	0.02
80		38.48	0.01
81		39.12	0.01
82		40.40	0.01
83		40.57	0.01
84		40.93	0.01
85		41.58	0.02
86		41.87	0.03
87		42.63	0.04
88		42.97	0.02
89		43.85	0.18
90		44.10	0.04
91		44.49	0.01
92		45.00	0.01
93		45.47	0.05
94		45.61	0.02
95		46.24	0.01
96		46.41	0.01
97		48.59	0.03
98		48.93	0.17
99		49.35	0.06
100		49.96	0.01
101		50.27	0.25
102		50.46	0.02
103		50.76	0.01
104		51.21	0.08
105		51.59	0.02
106		51.92	0.02
107		52.29	0.04
108		52.83	0.01
109		54.22	0.02
110		54.35	0.02
111		54.83	0.01
112		59.84	0.02
113		60.65	0.02
114		61.66	0.01
115		61.85	0.04
			100.00

Laboratoire Rosier Davenne

BULLETIN D'ANALYSES

Modèle/Révision/Date de révision : BANIER001/0/25.05.18
 Modifications : aucune
 Edition n° : 2/2009/16

p1/1

Huile essentielle analysée : **Sauge Sclarée Bio**

Date de l'analyse : 23 Mai 2018
 Lot : 129AA808
 Date de recontrôle (DRC) : Juin 2021

❖ Description générale.

Huile essentielle	Sauge Sclarée	Origine	France
Nom latin	<i>Salvia sclarea</i> L.		

❖ Caractéristiques organoleptiques.

Aspect	Liquide mobile et limpide	Conforme
Couleur	Jaune clair	Conforme
Odeur	Caractéristique	Conforme

❖ Caractéristiques physico-chimiques.

	Résultats analyses (à 20°C)	Spécifications fiche technique LRD
Densité	0,900	0,886 < d < 0,929
Indice de réfraction	1,4610	1,4500 < IR < 1,4700
Pouvoir rotatoire	-24,45°	-29° < [α] _D < -10°

❖ Analyse chromatographique.

CG : Perkin Elmer – Clarus 500
 Colonne : Elite – Wax, 30 m, Ø 0,25 mm, 0,25 µm df
 Injection : split
 Détecteur : FID
 Gaz vecteur : H₂
 Intégration : pourcentage d'aire – seuil : 0,02%
 ⇒ voir chromatogramme joint : colonne polaire

❖ Conclusion

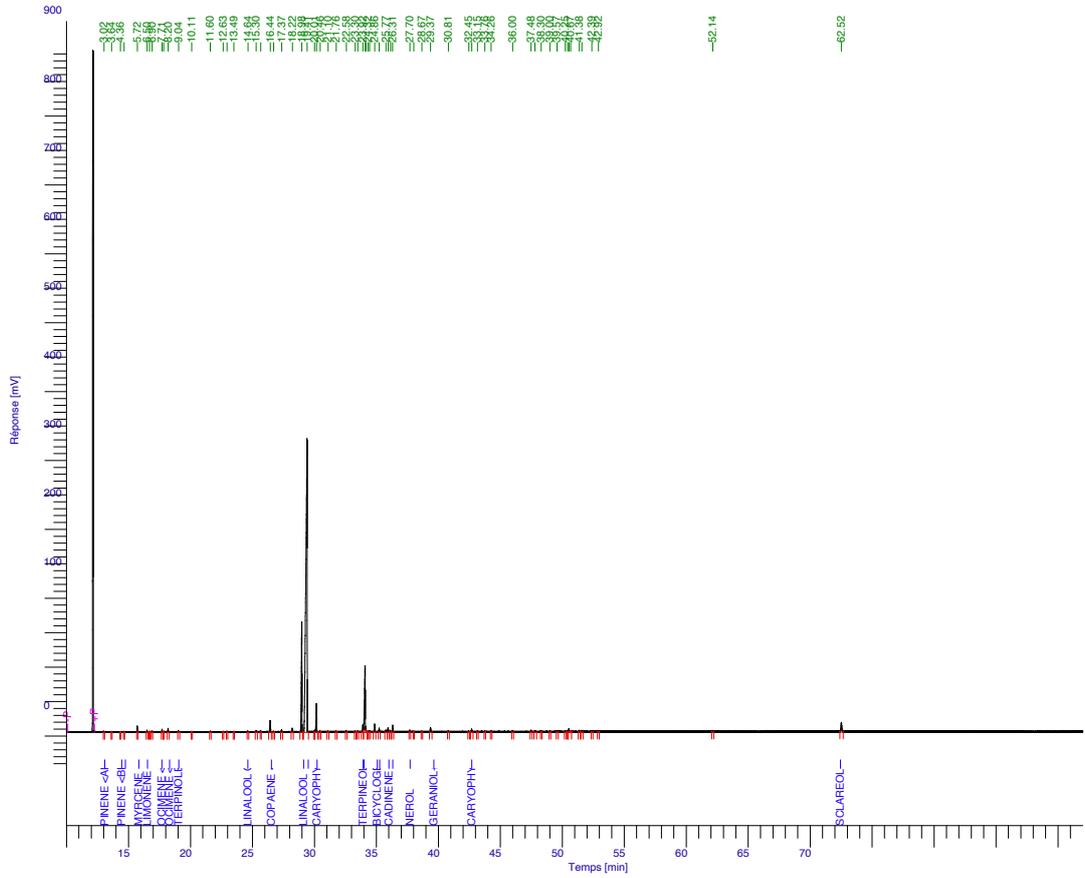
Lot accepté. Les caractéristiques physico-chimiques et l'analyse chromatographique sont conformes à la Pharmacopée Européenne 6.0 et à l'AFNOR NF T75-255.

Contrôlée par Charlene Bru, responsable analytique	Le 25/05/18	Libérée par Benoit Pichon, responsable assurance qualité	Le 25/05/18
---	-------------	--	-------------

LABORATOIRE ROSIER DAVENNE – Domaine Saint Perret – 789 avenue Sainte Catherine – 84140 MONTEFAVET - FRANCE
 tél : +33 4 90 22 22 22 - fax : +33 4 90 22 22 24 - email : labo.davenne@wanadoo.fr

Chromatogram

Sample Name : HE Sauge Sclaree 129AA808
 File Name : C:\Data\Colonne Polaire\HuilEssentielles\Sauge\Sauge Sclaree\2018\saugescleared bio 180523.raw
 Method : saugescleared bio
 Start Time : 0:00 min
 End Time : 82:00 min
 Plot Offset : -47,13 mV
 Low Point : -47,13 mV
 High Point : 993,88 mV
 Plot Scale : 1041,0 mV



Software Version : 6.3.2.0646
 Sample Name : HE Saugie Sclarees 129AA608
 Instrument Name : CLARUS 500
 Rack/Vial : 0/2
 Sample Amount : 1.000000
 Cycle : 6

5/25/2018 10:00:58 AM Result:

Date : 5/25/2018 10:00:58 AM
 Data Acquisition Time : 5/25/2018 11:56:07 PM
 Channel : B
 Operator : Charelne
 Dilution Factor : 1.000000

Result File :
 Sequence File : C:\Sequences\CPG\2018\180523b.seq

Rapport d'analyse

colonne polaire Elite WAX

pic #	Nom composant	TR [min]	Aire [%]
1	pinene <alpha>	3.02	0.05
2	pinene <beta>	3.64	0.01
3	sabinene	4.36	0.05
4	myrcene	4.65	0.02
5	limonene	5.72	0.37
6	limonene	6.50	0.12
7		6.70	0.01
8		6.90	0.05
9	ocimene <(Z)-beta>	7.71	0.17
10		7.83	0.03
11	ocimene <(E)-beta>	8.20	0.30
12	terpinolene	9.04	0.07
13		10.11	0.02
14		11.60	0.03
15		12.63	0.02
16		13.29	0.04
17		13.49	0.02
18	linalool oxide <cis>	14.64	0.09
19		15.30	0.10
20		15.67	0.03
21	copaene <alpha>	16.44	1.35
22		16.71	0.02
23		17.37	0.21
24		18.22	0.36
25	linalool	18.98	11.47
26	linalool acetate	19.41	64.46
27		20.01	0.08
28	caryophyllene<E>+elemene<beta>	20.17	3.12
29		20.46	0.07
30		21.10	0.04
31		21.76	0.04
32		22.58	0.11
33		23.30	0.04
34		23.80	0.24
35	terpineol<alpha>	23.89	9.51
36	germacrene D	24.16	0.20
37		24.32	0.02
38		24.45	0.04
39		24.86	0.82
40	bicyclogermacrene	25.23	0.34
41	neryl acetate	25.77	0.21
42		25.95	0.41
43	cedrene <delta>	26.14	0.12
44		26.31	0.65
45	geranyl acetate	27.70	0.16
46	nerol	28.02	0.02
47		28.67	0.03
48	geraniol?	29.37	0.45
49		30.61	0.04
50		32.45	0.03
51	caryophyllene oxide+	32.69	0.34
52		33.77	0.03
53		33.78	0.03
54		34.26	0.04
55		36.00	0.06
56		37.48	0.12
57			

Laboratoire Rosier Davenne

pic #	Nom composant	TR [min]	Aire [%]
58		37.80	0.13
59		38.30	0.04
60		39.00	0.03
61		39.57	0.08
62		40.25	0.04
63		40.44	0.09
64		40.54	0.40
65		40.67	0.05
66		41.38	0.12
67		41.58	0.17
68		42.39	0.04
69		42.92	0.07
70		52.14	0.08
71	sclareol	62.52	1.23
			100.00

Bulletin d'analyses

Huile essentielle analysée : Tea Tree Bio

Date de l'analyse : 23 Mars 2017
 Lot : 082RD701
 DLU : Avril 2020

❖ Description générale.

Huile essentielle	Tea Tree	Origine	Australie
Nom latin	Melaleuca alternifolia		

❖ Caractéristiques organoleptiques.

Aspect	Liquide mobile et limpide	Conforme
Couleur	Incolore	Conforme
Odeur	Caractéristique	Conforme

❖ Caractéristiques physico-chimiques.

	Résultats analyses (à 20°C)	Spécifications fiche technique LRD	
Densité	0.898	<	0.906
Indice de réfraction	1.4774	<	1.4820
Pouvoir rotatoire	+9.85°	<	[α] _D ²⁰ <
			+15°

❖ Analyse chromatographique.

CG : Perkin Elmer – Clarus 500
 Colonne : Elite - Wax, 30 m, Ø 0.25 mm, 0.25 µm df
 Injection : split
 Détecteur : FID
 Gaz vecteur : H₂
 Intégration : pourcentage d'aire – seuil : 0.02%

⇒ Voir chromatogramme joint : colonne polaire

❖ Conclusion

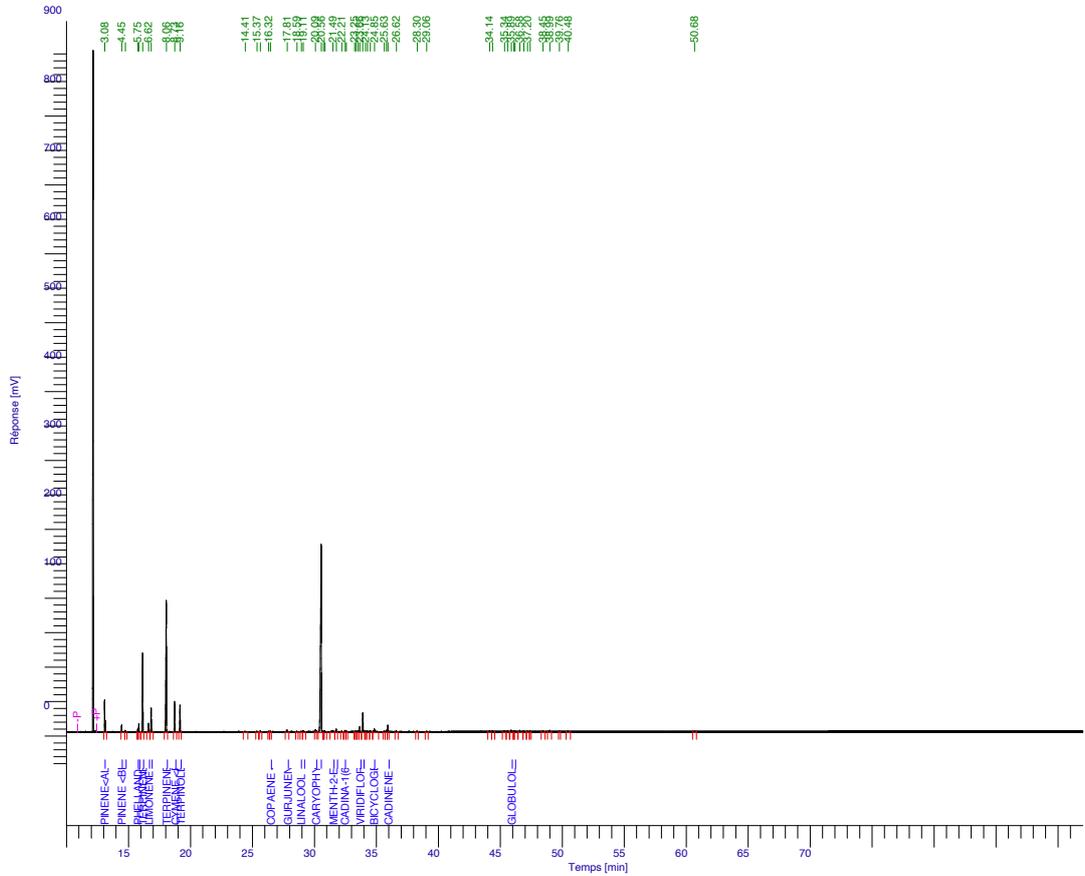
Lot accepté. Ce lot est conforme à l'AFNOR NF T75-358.
 Le 23/03/17, responsable contrôle qualité :

Charlene Bru

S.A au capital de 90 000 € Siège social : Saint Pierre 84140 Montfavet Code NAF: 461
 R.C.S Avignon 394 894 653 T.V.A C.E.E. N° FR 79 394894653 Siret : 394 894 653 000

Chromatogram

Sample Name : Tea tree 082RD701 Page 1 of 1
 File Name : C:\Data\Chromes Polaire\HuilEssentielles\Tea Tree\2017\tea tree bio 170223.raw
 Method : tea tree.mh Time of Injection: 9/23/2017 10:27:36 AM
 Start Time : 0:00 min Low Point : -47.13 mV High Point: 968.88 mV
 End Time : 8:00 min Plot Scale: 1041.0 mV



Software Version : 6.3.2.0646
 Sample Name : Tea tree 062RD701
 Instrument Name : CLARUS 500
 Rack/Vial : 0 / 1
 Sample Amount : 1.000000
 Cycle : 1
 Date : 3/23/2017 4:09:57 PM
 Data Acquisition Time : 3/23/2017 10:27:36 AM
 Channel : B
 Operator : Charelne
 Dilution Factor : 1.000000

Result File :
 Sequence File : C:\Sequences\CPG2017\170323a.seq

Rapport d'analyse

colonne polaire Elite WAX

pic #	Nom composant	TR [min]	Aire [%]
1	pinene<alpha>-thujene<alpha>	3.08	3.33
2	pinene <beta>	4.45	0.71
3	sabinene	4.75	0.20
4	phellandrene <alpha>	5.75	0.38
5	myrcene	5.84	0.83
6	terpinene <alpha>	6.15	8.74
7	limonene	6.62	0.93
8	citriole <1,8>	6.83	3.21
9	terpinene <gamma>	8.06	20.19
10	cymene <p>	8.73	3.68
11	terpinolene	9.16	3.30
12		14.41	0.08
13		15.37	0.05
14		15.65	0.09
15		16.32	0.05
16	copaene <alpha>	16.45	0.49
17	gujanene <alpha>	17.81	0.31
18		18.59	0.05
19	linalol	18.96	0.07
20	menth-2-en-1-ol <cis-p>	19.11	0.24
21	caryophyllene <E>	20.09	0.29
22	terpinen-4-ol+aromadendrene	20.56	43.04
23		20.74	0.05
24		20.85	0.15
25	menth-2-en-1-ol <trans-p>	21.49	0.27
26	aromadendrene <sal>	21.77	0.47
27		22.21	0.06
28	cadina-1(6),4-diene <cis>	22.48	0.21
29		22.58	0.07
30		23.25	0.05
31		23.36	0.10
32	viridiflorene	23.54	0.11
33	terpineol <alpha>	23.66	0.88
34		23.71	2.95
35		24.43	0.14
36		24.22	0.14
37		24.52	0.09
38	bicyclogermacrene+muurolene<al	24.85	0.59
39		25.63	0.10
40		25.82	0.23
41	cadinene <delta>	25.94	1.05
42		26.62	0.16
43		28.30	0.12
44		29.06	0.06
45		34.14	0.09
46		34.37	0.09
47		35.34	0.20
48		35.59	0.15
49	globulol	35.89	0.30
50	viridiflorol	36.09	0.06
51		36.19	0.15
52		36.58	0.20
53		37.00	0.10
54		37.21	0.15
55		37.41	0.08
56		38.45	0.14

3/23/2017 4:09:57 PM Result:

pic #	Nom composant	TR [min]	Aire [%]
57		38.99	0.19
58		39.76	0.04
59		40.48	0.11
60		50.68	0.07
			100.00

Laboratoire Resier Davenne

Annexe 7 : caractéristiques de l'huile essentielle de *Leptospermum scoparium* (manuka)



Bulletin d'analyse

HUILE ESSENTIELLE
MANUKA

BA-CHM21

N° de lot : CHM21B8
Date de péremption : 10/2022

Origine : Nouvelle Zélande

Partie distillée : Feuille

Propriétés Organoleptiques :

Aspect : liquide limpide
Couleur : jaune
Odeur : épicé, boisé, fruité

Propriétés Physico-chimiques :

Densité à 20° C : 0.970
Indice de réfraction à 20° C : 1.502
Pouvoir rotatoire à 20° C : ND

Constituants	%
α-PINENE + α-THUYENE	1.50
β-PINENE	0.14
β-MYRCENE	0.36
LIMONENE	0.11
1,8-CINEOLE	0.16
γ-TERPINENE	0.13
TRANS-β-OCIMENE	0.04
p-CYMENE	0.17
TERPINOLENE	0.08
α-CUBEBENE	2.92
α-COPAENE	5.19
LINALOL	0.07
β-ELEMENE	0.46
β-CARYOPHYLLENE	2.24
AROMADENDRENE	1.87
CADINA-3,5-DIENE	4.13
ALLO-AROMADENDRENE	0.72
ZONARENE	3.25
α-HUMULENE	0.27
γ-SELINENE	0.50
γ-MUUROLENE	1.39
LEDENE	0.64
β-SELINENE	4.68
α-SELINENE	4.01
α-FARNESENE	0.72
δ-CADINENE	7.07
CADINA-1,4-DIENE	5.08
CALAMENENE	13.37
OXYDE DE CARYOPHYLLENE	0.42
FLAVESONE	4.97
LEPTOSPERMONE	18.34
ISO LEPTOSPERMONE	2.93
TOTAL	87.93

Annexe 8 : liste des 10 marqueurs utilisés

Huile essentielle	Marqueurs	CAS	Masse moléculaire (g.mol ⁻¹)	Fragment m/z ^a	Temps de rétention (min)	IR (litt.) ^b	IR (calculé) ^c
<i>Melaleuca alternifolia</i>	γ -terpinène	99-85-4	136	91,05426	33,1	1060	1070
	Terpinen-4-ol	562-74-3	154	93,06987	38,4	1177	1194
<i>Eucalyptus citriodora</i>	β -citronellal	106-23-0	154	121,10136	36,7	1153	1154
	β -citronellol	106-22-9	156	69,06998	39,5	1226	1223
<i>Litsea citrata</i>	Z-néral = Z-citral	106-26-3	152	94,07774	40,5	1238	1258
	E-géranial	141-27-5	152	94,07770	41,2	1267	1276
<i>Leptospermum scoparium</i>	Flavésone	22595-45-5	252	164,08318	50,6	1547	1556
	Leptospermone	567-75-9	266	251,12779	52,9	1631	1633
<i>Salvia sclarea</i>	Sclaréol	515-03-7	308		ND*	2223	
	Acétate de linalyle	115-95-7	196	93,06988	41,4	1257	1283

Annexe 9 : liste des composés identifiés lors de l'analyse du mélange M1

Composés	CAS	Masse moléculaire (g.mol ⁻¹)	Fragment m/z ^a	Temps de rétention (min)	IR (litt.) ^b	IR (calculé) ^c
L-isopulégol	89-79-2	154		37,6	1150	1175
terpenoid e(154)				38,8		1203
Z-nérol	106-25-2	154		39,5	1230	1226
Terpenoid (93,91,121,80,43,136,154)				40,2		1251
Terpenoid (93,91,81,121)				40,6		1259
α -cubebène	17699-14-8	204		44,5	1351	1370
Acétate de nérol	141-12-8	196		44,8	1362	1378
α -ylangène	14912-44-8	204		45,5	1375	1399
α -copaène	3856-25-5	204	119,08561	45,7	1377	1406
β -bourbonnène	5208-59-3	204		46,1	1388	1418
α -gurjunène	489-40-7	204		46,9	1410	1442
α -guaïène	3691-12-1	204		48,1	1440	1477
Z-muurola-3,5-diene		204		48,3	1450	1484
E-cadina-1(6),4-diene	16729-00-3	204		48,9	1477	1503
Germacrène D	23986-74-5	204		49,4	1485	1519

Z-β-guaiène	88-84-6	204		49,8	1493	1530
γ-amorphène	6980-46-7	204		50,2	1496	1546
E-calamenène	483-77-2	202		50,5	1529	1553
Zonarène	41929-05-9	204		50,5	1530	1555
α-calacorène	21391-99-1	200		50,8	1546	1563
E-Cadina-1(2)4-diene	29837-12-5	204	119,08564	50,8	1535	1565
β-calacorene	50277-34-4	200		51,8	1566	1597

^a Fragment de masse utilisé pour quantifier le marqueur

^{b, c} Indices de rétention pour une colonne GC DB5-MS déterminés d'après les données de la littérature (^b) ou expérimentalement (^c)

Annexe 10 : limites de quantification pour les 11 terpènes présentant des coefficients de détermination > 0,98

COV ^a	LOQ ^b	R ^{2 c}	Gamme de linéarité ^d
γ-terpinene *	2,06	0,98	0-25ppb
Terpinolene	1,57	0,99	0-25ppb
Linalool	3,68	1	0-200ppb
β-citronellal *	9,72	0,99	0-200ppb
L-isopulégol	2,61	1	0-200ppb
Camphor	6,82	0,98	0-100ppb
DL-bornéol	4,77	1	0-200ppb
α-terpinéol	2,64	1	0-200ppb
E-géranol	7,30	0,99	0-200ppb
E-géranial	1,61	1	0-200ppb
Z-nééral *	1,59	0,99	0-25ppb

^a Composés organiques volatils, appartenant pour certains à la liste des marqueurs pré-ciblés (*)

 terpène oxygéné
 monoterpène

^b Limite de quantification en ppb (μg.L⁻¹)

^c Coefficient de détermination

^d Gamme de concentration sur laquelle une réponse entre abondance et signal est linéaire (6 répétitions par point de concentration)

Annexe 11 : tableau récapitulatif des concentrations des différents composés détectés

Données en µg/kg de lait	β-Citronellal			β-Citronellol			Terpinen-4-ol			Flavosone			Leptospermonone		
	1328	6057	9037	1328	6057	9037	1328	6057	9037	1328	6057	9037	1328	6057	9037
2,5	-4,5	1,0E+01	1,0E+01	ND	ND	ND	3,9E+00	2,2E+00	3,7E+00	2,0E-02	4,2E-03	1,0E-02	5,00E-02	4,87E-03	1,81E-02
2,5	-4,5	1,0E+01	1,0E+01	ND	ND	ND	2,9E+00	9,5E-01	2,9E+00	2,4E-03	1,1E-02	6,8E-03	6,16E-03	2,38E-02	1,28E-02
2,5	-4,5	1,0E+01	1,0E+01	ND	ND	ND	3,6E+00	3,9E+00	3,8E+00	1,3E-02	7,8E-03	1,1E-02	2,24E-02	1,08E-02	1,88E-02
2,5	-4,5	1,0E+01	1,0E+01	ND	ND	ND	4,3E+00	4,2E+00	4,0E+00	5,0E-03	1,7E-02	4,3E-03	1,03E-02	2,10E-02	6,94E-03
2,5	-4,5	/	1,7E+03	/	ND	/	/	2,5E+00	/	/	6,6E-04	/	/	5,46E-04	/
5	-3	2,0E+03	1,0E+01	2,2E+02	ND	ND	1,8E+00	3,7E+00	6,4E+01	2,1E-03	1,1E-02	4,3E-04	2,74E-03	2,20E-02	ND
8	0	1,0E+01	1,0E+01	1,0E+01	ND	ND	3,4E+00	3,3E+00	3,4E+00	2,9E-03	1,1E-03	1,1E-03	1,56E-02	3,52E-03	5,61E-03
8,5	0,5	1,7E+05	1,7E+03	3,1E+04	ND	ND	4,50	4,26	4,41	0,46	0,44	0,36	1,23E+00	1,15E+00	9,60E-01
9	1	1,9E+03	1,5E+03	2,3E+04	ND	ND	3,46	4,28	4,11	0,19	0,21	0,44	3,27E-01	3,13E-01	1,21E+00
9,5	1,5	1,5E+03	1,1E+03	1,9E+03	ND	0,20	1,27	3,87	4,41	0,08	0,51	0,18	9,96E-02	1,54E+00	2,10E-01
10	2	2,3E+03	1,5E+03	1,0E+01	ND	ND	1,08	1,01	3,82	0,17	0,10	0,18	4,92E-01	1,59E-01	1,54E-01
10,5	2,5	2,4E+04	5,5E+04	2,0E+04	ND	ND	4,52	5,11	1,26	0,55	0,40	0,04	1,01E+00	4,49E-01	8,72E-03
11	3	1,0E+01	1,0E+01	1,0E+01	ND	ND	3,78	3,77	3,88	0,20	0,22	0,13	2,75E-01	1,38E-01	6,40E-02
11,5	3,5	9,9E+04	6,7E+04	1,0E+01	ND	ND	4,28	5,11	4,13	0,42	1,08	0,27	6,25E-01	1,84E+00	3,43E-01
12	4	1,0E+01	6,2E+03	2,0E+03	ND	ND	3,51	4,00	1,18	0,14	0,81	0,04	1,01E-01	1,44E+00	1,98E-02
12,5	4,5	2,0E+05	1,0E+01	1,0E+01	ND	ND	4,26	4,55	4,21	0,42	0,60	0,19	4,31E-01	5,45E-01	9,42E-02
13	5	3,1E+03	1,0E+03	1,0E+03	ND	ND	2,02	2,95	3,88	0,34	0,33	0,24	5,08E-01	8,90E-01	2,45E-01
13,5	5,5	4,3E+04	2,8E+05	1,1E+04	ND	1,6E-01	4,06	5,93	1,41	0,28	0,98	0,11	2,81E-01	1,71E+00	9,42E-02
14	6	4,3E+06	8,9E+04	1,7E+03	3,3E-01	ND	3,72	4,71	1,07	1,58	1,42	0,04	3,65E+00	1,87E+00	1,63E-02
14,5	6,5	1,7E+06	5,3E+06	4,3E+02	2,9E-01	2,3E-01	4,55	5,20	4,32	1,03	0,91	0,21	1,82E+00	1,30E+00	1,46E-01
15	7	5,3E+03	2,5E+04	5,2E+05	ND	6,1E-02	4,1E+00	4,3E+00	5,2E+00	1,9E-01	5,2E-01	2,5E-01	2,23E-01	5,29E-01	1,71E-01
15,5	7,5	1,5E+03	1,6E+06	1,0E+01	ND	ND	1,8E+00	4,0E+00	4,3E+00	5,8E-02	6,8E-01	4,7E-01	5,46E-02	6,25E-01	6,77E-01
16	8	4,8E+03	2,4E+04	1,0E+01	ND	ND	3,4E+00	2,1E+00	3,9E+00	2,0E-01	1,8E-01	1,4E-01	2,34E-01	1,41E-01	1,23E-01
16,5	8,5	1,0E+01	3,0E+04	1,8E+04	ND	ND	4,0E+00	3,4E+00	3,8E+00	1,2E-01	2,2E-01	1,1E-01	8,57E-02	1,31E-01	6,27E-02
17	9	2,3E+02	7,0E+02	1,8E+03	ND	ND	1,6E+00	1,5E+00	1,9E+00	6,7E-02	3,9E-02	2,1E-02	8,07E-02	1,18E-02	5,38E-03
17,5	9,5	8,2E+04	1,0E+01	1,0E+01	ND	ND	3,5E+00	3,6E+00	3,8E+00	7,0E-02	1,3E-01	7,1E-02	3,74E-02	5,77E-02	1,32E-02
18	10	1,0E+01	1,0E+01	1,0E+01	ND	ND	1,1E+00	3,7E+00	3,5E+00	1,0E-02	1,1E-01	5,4E-02	7,98E-03	2,39E-02	4,56E-02
18,5	10,5	1,0E+01	1,0E+01	1,0E+01	ND	ND	3,3E+00	3,7E+00	3,8E+00	5,6E-02	9,3E-02	9,8E-02	6,53E-02	2,86E-02	2,14E-01
19	11	2,6E+02	1,0E+01	1,0E+01	ND	ND	9,3E-01	3,6E+00	3,5E+00	7,7E-03	6,8E-02	4,5E-02	1,75E-03	2,15E-02	5,01E-02
19,5	11,5	1,0E+01	1,0E+01	1,0E+01	ND	ND	4,0E+00	3,9E+00	3,6E+00	2,9E-02	1,1E-01	3,5E-02	3,05E-02	3,77E-02	1,55E-02
20	12	1,0E+01	1,0E+01	1,0E+01	ND	ND	3,4E+00	3,7E+00	4,1E+00	1,3E-02	5,1E-02	2,5E-02	3,92E-03	9,75E-03	1,36E-02
20,5	12,5	1,0E+01	7,0E+02	5,8E-02	ND	ND	3,6E+00	2,8E+00	3,4E+00	2,4E-02	5,7E-02	1,3E-02	1,63E-02	2,48E-02	1,52E-02
21	13	1,0E+01	1,0E+01	1,0E+01	ND	ND	3,5E+00	4,2E+00	3,4E+00	8,1E-03	4,1E-02	2,1E-02	5,28E-03	1,48E-02	2,62E-02
21,5	13,5	1,0E+01	1,0E+01	1,0E+01	ND	ND	3,4E+00	3,4E+00	3,1E+00	1,9E-02	4,6E-02	1,9E-02	3,76E-02	1,39E-02	1,48E-02

Données en µg/kg de lait		Eucalyptol			Copaene			Cadina-1(2),4-diene		
Jours		1328	6057	9037	1328	6057	9037	1328	6057	9037
2,5	-4,5	8,52E-02	1,68E-01	1,59E-01	6,98E-02	5,24E-02	4,81E-02	ND	ND	ND
2,5	-4,5	1,33E-01	7,00E-01	1,96E-01	6,45E-02	1,39E-01	3,87E-02	ND	ND	ND
2,5	-4,5	8,97E-02	9,21E-02	4,65E-02	5,27E-02	5,26E-02	4,85E-02	ND	ND	ND
2,5	-4,5	1,49E-01	1,75E-01	2,57E-01	9,73E-02	6,81E-02	1,32E-01	1,41E-02	ND	ND
2,5	-4,5	/	1,04E-01	/	/	4,00E-02	/	/	ND	/
5	-3	5,73E-02	6,44E-02	8,06E-02	3,39E-02	2,26E-02	4,47E-02	ND	ND	ND
8	0	3,66E-02	3,15E-02	4,58E-02	1,10E-01	1,16E-01	2,52E-02	ND	ND	ND
8,5	0,5	1,02E-01	4,64E-02	8,52E-02	5,70E-01	3,47E-01	3,73E-01	4,64E-01	3,54E-01	6,81E-01
9	1	3,24E-02	4,78E-02	1,27E-01	2,77E-01	8,79E-02	1,33E-01	1,91E-01	1,27E-01	5,74E-01
9,5	1,5	1,77E-01	4,99E-02	2,26E-01	2,72E-01	4,51E-01	3,70E-01	4,14E-01	6,59E-01	3,82E-01
10	2	1,21E-01	4,99E-02	1,23E-01	1,19E-01	1,13E-01	6,35E-01	9,46E-01	2,74E-01	4,95E-01
10,5	2,5	5,85E-02	1,25E-01	3,61E-01	6,12E-01	2,24E-01	3,34E-01	1,84E+00	3,22E-01	2,96E-01
11	3	5,93E-02	6,21E-02	5,85E-02	5,40E-02	1,77E-01	1,21E-01	2,75E-01	6,96E-02	9,60E-02
11,5	3,5	1,31E-01	1,05E-01	7,89E-02	2,83E-01	3,34E-01	5,48E-01	1,32E-01	1,01E+00	3,27E-01
12	4	2,05E-02	7,04E-02	1,39E-01	2,29E-01	2,65E-01	2,70E-01	6,96E-02	8,72E-01	3,43E-01
12,5	4,5	2,86E-02	1,21E-01	1,01E-01	4,29E-01	1,81E-01	5,22E-01	1,27E-01	3,34E-01	2,19E-01
13	5	5,85E-02	8,80E-02	2,13E-01	3,94E-02	3,28E-02	2,06E-01	6,86E-02	3,21E-01	5,03E-01
13,5	5,5	7,68E-02	6,23E-02	2,90E-01	1,91E-01	2,69E-01	4,80E-01	5,64E-02	9,13E-01	7,11E-01
14	6	2,69E-02	9,24E-02	6,60E-02	6,10E-01	2,06E-01	2,13E-01	1,32E-01	4,10E-01	2,41E-01
14,5	6,5	5,82E-02	5,88E-02	1,58E-01	1,13E+00	1,17E+00	3,26E-01	6,94E-01	5,81E-01	6,32E-01
15	7	2,65E-02	4,13E-02	1,63E-01	5,55E-02	9,10E-02	1,07E+00	3,17E-02	7,86E-02	5,62E-01
15,5	7,5	2,08E-02	8,41E-02	1,13E-01	3,12E-02	4,32E-01	1,62E-01	1,12E-02	8,21E-02	4,78E-01
16	8	5,59E-02	6,99E-02	5,96E-02	2,27E-01	6,56E-02	7,95E-02	ND	3,47E-02	ND
16,5	8,5	5,57E-02	2,87E-02	5,01E-02	9,57E-02	7,06E-02	7,77E-02	1,40E-02	3,12E-02	5,75E-02
17	9	5,22E-02	2,88E-02	6,90E-02	1,96E-02	1,70E-02	3,14E-02	ND	6,14E-03	2,87E-02
17,5	9,5	2,24E-02	2,12E-02	5,52E-02	4,19E-02	3,07E-02	6,59E-02	ND	ND	4,45E-02
18	10	3,48E-02	3,94E-02	3,58E-02	1,49E-02	2,43E-02	2,77E-02	ND	ND	1,59E-02
18,5	10,5	5,45E-02	8,86E-02	7,88E-02	ND	3,15E-02	3,55E-02	2,35E-01	6,98E-03	1,25E-02
19	11	7,58E-02	4,52E-02	4,43E-02	4,76E-02	2,02E-02	2,40E-02	ND	ND	ND
19,5	11,5	5,90E-02	1,21E-01	6,28E-02	4,10E-02	2,90E-01	2,54E-01	ND	ND	ND
20	12	5,28E-02	6,06E-02	1,87E-01	1,54E-02	1,11E-02	3,64E-02	ND	ND	1,61E-02
20,5	12,5	1,03E-01	1,03E-01	1,18E-01	4,41E-02	2,84E-02	2,86E-02	ND	ND	ND
21	13	2,87E-02	6,37E-02	4,26E-02	2,27E-02	2,94E-02	1,73E-02	ND	8,76E-03	ND
21,5	13,5	4,90E-02	2,73E-02	6,47E-02	1,60E-01	1,70E-01	3,25E-02	ND	ND	ND

Vu : L'enseignant Rapporteur

De l'Ecole Nationale Vétérinaire,
Agroalimentaire et de l'Alimentation
Oniris

05.10.2020



Vu : Le Directeur Général

par interim
De l'Ecole Nationale Vétérinaire,
Agroalimentaire et de l'Alimentation
Oniris
Marc GOGNY

Handwritten signature in blue ink and the text "Par ordre et par délégation" in blue ink.

Sandy LECOQ-ESPALLARGAS

Nantes, le
6/10/20

Directrice des Etudes
et de la Vie Etudiante

Vu :

Le Président de la Thèse

Professeur P. LUSTENBERGER

A handwritten signature in black ink, appearing to be "P. Lustenberger".

Vu :

Le Doyen de la Faculté de
Médecine de Nantes

Professeur Pascale JOLLIET

Vu et permis d'imprimer

NOM :

Prénom :

Handwritten name: PASCOLAT
Handwritten first name: JÉLANIE

CINÉTIQUE DE RÉSIDUS D'HUILES ESSENTIELLES (*Eucalyptus citriodora*, *Leptospermum scoparium*, *Litsea citrata*, *Melaleuca alternifolia*, *Salvia sclarea*) DANS LE LAIT : ÉTUDE EXPÉRIMENTALE CHEZ LA VACHE LAITIÈRE APRÈS APPLICATION CUTANÉE MAMMAIRE

RESUMÉ :

L'aromathérapie prend une part de plus en plus importante dans l'arsenal thérapeutique du vétérinaire et des éleveurs notamment suite aux plans EcoAntibio 1 et 2. Cependant l'utilisation de la majorité des huiles essentielles n'est pas autorisée chez les animaux producteurs de denrées destinées à la consommation humaine ; c'est le cas de la vache laitière. L'application d'un mélange de cinq huiles essentielles (*Eucalyptus citriodora*, *Leptospermum scoparium*, *Litsea citrata*, *Melaleuca alternifolia*, *Salvia sclarea*) sur la mamelle de trois vaches laitières, le prélèvement du lait puis le dosage de deux marqueurs par huile essentielle dans les échantillons de lait (chromatographie en phase gazeuse couplée à une spectrométrie de masse) ont permis d'établir des courbes de concentrations de résidus en fonction du temps. Certains marqueurs n'étaient présents dans le lait que lors de la phase de traitement (correspondant à l'application du mélange sur la mamelle), un marqueur a été retrouvé durant toute la durée de l'essai (reflet probable de l'alimentation des vaches) et d'autres n'ont pas pu être détectés. Les dosages de la majorité des composés ont mis en évidence de très faibles concentrations en résidus dans le lait, très inférieures aux données toxicologiques disponibles pour ces marqueurs (à l'exception d'un marqueur retrouvé à des concentrations élevées). Ainsi, il est possible de considérer que le risque est faible pour la santé de consommer un lait dont la vache a été traitée par application cutanée mammaire du mélange d'huiles essentielles testé.

MOTS CLÉS :

- Lait
- Aromathérapie
- Vache laitière
- Huile essentielle
- Sécurité alimentaire

JURY

Président : Monsieur Patrick Lustenberger, Professeur à la faculté de Médecine de Nantes

Rapporteur : Monsieur Hervé Pouliquen, Professeur à Oniris

Assesseur : Monsieur Jean-Michel Cappelier, Professeur à Oniris

ADRESSE DE L'AUTEUR

Mélanie Pascolat

22, rue du pays de cocagne,

31590 VERFEIL