

LE DIRECTEUR GENERAL

Maisons-Alfort, le 20 mars 2018

NOTE d'appui scientifique et technique de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

relative à l'efficacité des biocides répulsifs contre les tiques et aux modalités de leur utilisation

L'Anses met en œuvre une expertise scientifique indépendante et pluraliste.

L'Anses contribue principalement à assurer la sécurité sanitaire dans les domaines de l'environnement, du travail et de l'alimentation et à évaluer les risques sanitaires qu'ils peuvent comporter.

Elle contribue également à assurer d'une part la protection de la santé et du bien-être des animaux et de la santé des végétaux et d'autre part l'évaluation des propriétés nutritionnelles des aliments.

Elle fournit aux autorités compétentes toutes les informations sur ces risques ainsi que l'expertise et l'appui scientifique technique nécessaires à l'élaboration des dispositions législatives et réglementaires et à la mise en œuvre des mesures de gestion du risque (article L.1313-1 du code de la santé publique).

Ses avis sont rendus publics.

En septembre 2016, la France s'est dotée d'un plan national de lutte contre la maladie de Lyme et les maladies transmises par les tiques. Ce plan vise à développer les connaissances sur les maladies transmissibles par les tiques afin d'améliorer les mesures de lutte et de prise en charge des patients, mais également à mettre en œuvre des mesures immédiates et concrètes en matière de prévention, de diagnostic et de soins afin de répondre aux besoins des malades.

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA NOTE

1.1. Nature et contexte de la demande

Le premier axe stratégique de ce plan est défini comme « Améliorer la Surveillance vectorielle et les mesures de lutte contre les tiques dans une démarche One Health – Une seule santé »

Dans le cadre de l'action 3 de cet axe stratégique, il est demandé à l'Anses de tester l'efficacité des biocides répulsifs contre les tiques et de préciser les modalités de leur utilisation, notamment pour les travailleurs.

Dans le cadre du Règlement biocides (UE) 528/2012¹, les produits biocides répulsifs appartiennent au type de produit 19 (TP19) relatif aux produits utilisés pour lutter contre les organismes nuisibles (qu'il s'agisse d'invertébrés comme les puces ou de vertébrés comme les oiseaux, les poissons ou les rongeurs), en les repoussant, y compris les produits utilisés pour l'hygiène humaine ou vétérinaire, directement sur la peau ou indirectement dans l'environnement de l'homme ou des animaux.

Le Règlement biocide prévoit deux grandes étapes d'évaluation :

- l'évaluation des substances actives : les produits biocides doivent contenir des substances actives inscrites sur la liste de l'Union Européenne des substances actives approuvées. Le processus d'évaluation de ces substances actives pour aboutir à leur approbation (ou non approbation) est réalisé pour toutes les substances actives notifiées au programme d'examen

¹ Règlement (UE) N° 528/2012 du Parlement européen et du Conseil du 22 mai 2012 concernant la mise à disposition sur le marché et l'utilisation des produits biocides.

biocide figurant dans le règlement délégué (UE) n°1062/2014² (Annexe 5). Le statut des substances actives (approuvées, non approuvées, en cours d'évaluation) est disponible sur le site de l'agence Européenne des produits chimiques (ECHA³) ;

- l'évaluation des produits biocides : une fois les substances actives approuvées, les produits biocides sont évalués conformément aux conditions requises à l'article 19 du règlement sus-cité.

Aujourd'hui, certaines substances actives sont encore en cours d'évaluation. Les produits ne sont donc pas encore soumis à autorisation de mise sur le marché (AMM) selon le règlement biocide (UE) n°528/2012. Durant cette période dite « transitoire », chaque Etat membre de l'Union européenne applique ses dispositions nationales pour la mise sur le marché des produits biocides. En France, en période transitoire, les produits biocides n'ont pas d'AMM et sont donc libres de mise sur le marché⁴, après déclaration à l'inventaire français des produits biocides (base SIMMBAD)⁵.

Les produits dont la totalité des substances actives sont approuvées doivent faire l'objet d'une demande qui sera évaluée en vue de la délivrance éventuelle d'une AMM. En France, l'Anses est en charge de réaliser l'évaluation scientifique et de délivrer l'AMM. L'évaluation par l'Anses des produits revendiquant une action répulsive vis-à-vis des tiques comprend systématiquement une évaluation de leur efficacité, ainsi que des évaluations des risques pour l'homme et l'environnement – le tout contribuant à la définition des conditions d'emploi.

A l'heure actuelle, selon leur composition, les produits répulsifs contre les tiques en vente en France n'ont donc pas le même statut :

- certains ont reçu une AMM à l'issue d'une évaluation complète
- pour certains, des demandes d'AMM ont été déposées et les évaluations sont en cours
- pour d'autres enfin, les substances actives sont encore en cours d'évaluation, et les produits ne sont pas encore soumis à AMM. Aucune évaluation n'a donc été menée.

1.2. Objet de la note

Pour répondre à la demande figurant dans l'action 3 du plan Lyme, l'Anses a tout d'abord établi d'une part la liste des substances actives TP19 en cours d'évaluation ou approuvées et pour lesquelles une efficacité répulsive contre les tiques est attendue, et d'autre part la liste des produits répulsifs en France revendiquant un usage « répulsif contre les tiques ».

Par ailleurs, des tests d'efficacité *in vitro* complémentaires sur l'efficacité vis-à-vis des tiques ont été commandités à l'Institut de Biologie de l'Université de Neuchâtel. Ces essais visent à fournir les données sur l'efficacité de substances actives sur deux stades du cycle de vie (nymphe, adulte) des tiques *Ixodes ricinus* (principal vecteur de la maladie de Lyme en France) et à préciser l'efficacité d'une sélection de mélanges de substances actives répulsives sur les nymphes d'*Ixodes ricinus*.

L'ensemble de ces éléments permet à l'Anses d'émettre des recommandations quant aux substances actives d'intérêt pour la protection contre les tiques. Il est à noter qu'en raison d'une part du nombre très important de produits sur le marché en France et, d'autre part, de l'impartialité requise vis-à-vis des industriels, les recommandations de l'Anses portent nécessairement sur des substances actives plutôt que des formulations commerciales.

² Règlement délégué (UE) n°1062/2014 de la Commission du 4 août 2014 relatif au programme de travail pour l'examen systématique de toutes les substances actives existantes contenues dans des produits biocides visé dans le règlement (UE) n°528/2012 du Parlement européen et du Conseil.

³ European chemical Agency : <http://echa.europa.eu/web/guest/information-on-chemicals/biocidal-active-substances>

⁴ Certains produits biocides ayant des usages particuliers sont soumis à un agrément délivré par la DGS. C'est le cas des produits destinés à certains types de désinfection de l'eau (piscines publiques, eau potable) ou encore à la thanatopraxie. Les produits biocides répulsifs ne sont pas soumis à agrément.

⁵ <https://simmbad.fr/public/servlet/produitList.html>

2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise – Prescriptions générales de compétence pour une expertise (Mai 2003) ». L'expertise a été réalisée par la Direction de l'évaluation des produits réglementés (DEPR) de l'Anses.

L'expertise s'est fondée sur les textes réglementaires et documents guides suivants :

- Règlement (UE) N° 528/2012
- Guidance on the Biocidal Products Regulation - Volume II Efficacy - Assessment and Evaluation (Parts B+C) – (section PT18 Insecticide, Acaricides & other Biocidal Products against Arthropods+ PT 19 Repellents & Attractants (arthropods))

La note a été mise à la consultation du comité d'experts spécialisés « Substances et produits biocides » au cours de la séance du 1^{er} mars 2018 puis par voie électronique.

3. METHODOLOGIE

3.1. Liste des substances actives d'intérêt

Dans un premier temps, l'Anses a établi la liste des substances actives d'intérêt, à partir de trois sources de données :

- La liste des substances actives en cours d'évaluation ou approuvées en tant que substance active TP19 ;
- La liste des substances actives entrant dans la composition des produits disposant actuellement d'une autorisation de mise sur le marché en France avec une efficacité revendiquée et démontrée en tant que « répulsif contre les tiques » ;
- La liste des substances actives entrant dans la composition des produits figurant actuellement dans l'inventaire français des produits biocides (SIMMBAD) et revendiquant une action répulsive contre les tiques sans distinction d'utilisation (environnement, homme, animal). Ces produits dont la ou les substances actives sont encore en cours d'évaluation sont mis librement sur le marché et n'ont pas encore fait l'objet d'une évaluation.

3.2. Collecte des données d'efficacité

a. Données issues de l'évaluation des dossiers de demandes d'AMM et des dossiers présentés en vue de l'approbation des substances actives

Les données récoltées sont issues des dossiers présentés en vue de l'approbation de substances actives et produits évalués par la France ou d'autres Etats membres. Seuls sont pris en compte les dossiers pour lesquels l'évaluation est finalisée (substance active approuvée) et/ou une AMM a été délivrée.

Ces données d'efficacité sont conformes aux requis du guide technique relatif à l'Efficacité des produits biocides répulsif vis-à-vis des tiques (section 5.6.4.7 « Ticks » from Guidance on the Biocidal Products Regulation - Volume II Efficacy - Assessment and Evaluation (Parts B+C)).

Ainsi, les essais d'efficacité soumis dans le cadre d'une demande d'AMM, pour un produit à application cutanée, doivent suivre la méthode décrite dans le guide d'efficacité relatif au TP19 fondée sur la méthode OPPTS 810.3700 de l'US EPA⁶:

Il s'agit d'un essai de laboratoire réalisé avec 10 volontaires. Le produit est appliqué sur l'avant-bras, du poignet au coude ; l'autre avant-bras non traité sert en général de témoin positif. Le bras est incliné à au moins 30° afin de favoriser le déplacement des tiques vers la zone traitée (géotropisme négatif).

⁶ US Environmental Protection Agency (US-EPA), Office on Prevention Pesticides and Toxic Substances (OPPTS), 810.3700-Product performance test guidelines. Insect repellents for human skin and outdoor premises (US-EPA, 2010)

Une heure après l'application du produit, cinq tiques indemnes de maladies⁷ sont déposées sur le dos de la main (une tique à la fois), et leurs déplacements sont étudiés pendant 5 minutes (temps d'exposition). Ce test est répété toutes les heures et ce jusqu'à la fin de la durée de protection revendiquée par le pétitionnaire ou jusqu'à la non efficacité du produit (moins de 90 % des tiques repoussées). Une tique est considérée comme repoussée lorsqu'elle ne franchit pas la limite entre la zone non traitée et la zone traitée, ou lorsqu'elle se laisse tomber une fois entrée en contact avec la zone traitée.

Il est à noter que le guide laisse également la possibilité de soumettre des essais réalisés sur des animaux (souris par exemple) selon le même principe que ceux réalisés avec les volontaires humains, mais ce type d'essai est plus rarement retrouvé dans les dossiers.

Le produit est réputé efficace si 90 % des tiques sont repoussées dans le temps de protection revendiqué.

Cette méthodologie permet d'évaluer une dose de produit efficace (par surface de peau exposée), ainsi qu'un temps de protection.

Ces données sont disponibles pour les substances actives DEET, IR3535, et acide laurique, ainsi que pour les produits à base de DEET et d'IR3535.

b. Données issues de la littérature scientifique

Le recensement des données d'efficacité publiées dans la bibliographie scientifique a été effectué sur Scopus sur la période 1995-2016. La recherche a porté sur les mots clés "tick", "repellent", "*Ixodes*" et ("test" ou "bioassay"), dans les champs titre, résumé et mots clés.

Cette requête a permis d'identifier 44 articles desquels ont été exclus ceux :

- n'apportant aucune information sur l'efficacité répulsive des substances en cours d'évaluation ou approuvées en tant que substance active TP19,
- portant sur l'efficacité répulsive contre des espèces autres qu'*Ixodes ricinus*,
- portant sur l'efficacité de produits répulsifs dont l'application n'est pas cutanée.

La liste des articles finalement retenus (8 au total) complétée par une revue de la littérature scientifique sur les répulsifs contre les tiques (Bissinger et Roe, 2009) est détaillée dans la bibliographie reportée en annexe I.

La plupart des publications issues de cette requête évalue l'efficacité répulsive de formulations commerciales, rendant difficile une comparaison de l'efficacité intrinsèque des substances actives. En effet, les coformulants peuvent avoir une influence sur l'efficacité du produit et notamment sur la durée de protection, par conséquent deux formulations avec la même concentration en substance active peuvent avoir des durées de protection effective différentes.

Parmi les études portant sur les substances actives elles-mêmes, trois rassemblent l'essentiel des informations sur l'efficacité répulsive des substances actives d'intérêt identifiées précédemment :

- une étude réalisée selon la méthode OPPTS 810.3700 de l'US EPA (Büchel *et al.*, 2015) compare l'efficacité du DEET, de l'IR3535 et de l'icaridine sur nymphes d'*I. ricinus* et d'*I. scapularis*. Les auteurs concluent dans cette publication que l'IR3535 et l'icaridine sont de bonnes alternatives au DEET.
- la revue de la littérature scientifique publiée par Bissinger et Roe (2009) sur les répulsifs contre les tiques permet de confirmer l'effet répulsif des substances actives en cours d'évaluation ou approuvées en tant que substance active TP19 pour lesquelles cet usage n'est pas nécessairement mentionné dans les dossiers d'approbation ou d'AMM.
- une publication de l'Institut de Biologie de l'Université de Neuchâtel présente des données obtenues par des tests *in vivo* (sur des volontaires selon un protocole assez proche de celui exigé par le guide Efficacité biocide mais sans la détermination d'un temps de protection) et *in vitro* (sur plaque de verre) sur des nymphes d'*Ixodes ricinus* pour l'ensemble des substances actives d'intérêt en simple mélange dans l'éthanol (Kroeber *et al.*, 2013). Cette étude permet de déterminer les efficacités (% de tiques affectées) de différentes substances actives vis-à-vis de la tique *Ixodes ricinus* sur une gamme étendue de concentrations appliquées, i.e. 0.001 mg/m² à 1 mg/m², et notamment la détermination de la dose conduisant à 75 % de tiques repoussées, dite

⁷ Les essais expérimentaux, *in vivo* ou *in vitro*, sont réalisés uniquement avec des tiques saines, non vectrices de *Borrelia burgdorferi*. A ce jour, il n'existe pas d'information indiquant si les tiques infestées ont un comportement vis-à-vis des substances actives répulsives différent des tiques saines.

« ED75 ». Elle compare également les résultats obtenus entre les deux méthodes (*in vivo* et *in vitro*) sur l'ensemble des substances actives d'intérêt, permettant de s'assurer de la cohérence et de la validité de la méthode *in vitro* par rapport à la méthode *in vivo*.

Cette étude permet donc de proposer une alternative aux essais *in vivo* lors de l'évaluation intrinsèque de l'efficacité répulsive d'une nouvelle substance active. Mais cette méthodologie *in vitro* ne permet cependant pas de définir de temps de protection, puisque le produit « sèche » relativement rapidement sur la plaque de verre.

3.3. Tests d'efficacité *in vitro* complémentaires

a – Contexte

Pour compléter les données d'efficacité initialement collectées selon les modalités décrites ci-dessus, la réalisation de tests d'efficacité complémentaires a été envisagée par l'Anses.

La réalisation d'essais complémentaires *in vivo* a été écartée

- d'une part en raison des délais de mise en œuvre (incluant l'obtention d'autorisations requis par de tels essais en vertu des articles L.1121-1 du code de santé publique sur la recherche interventionnelle) incompatible avec l'instruction dans les délais requis de la réponse aux objectifs de l'action 3 du plan national de lutte contre la maladie de Lyme.
- d'autre part en raison du biais apporté par la réalisation d'essais sur des produits formulés, qui ne permet pas d'inférer l'efficacité intrinsèque de la substance active.

La méthodologie alternative développée par l'Institut de Biologie de l'Université de Neuchâtel, a donc été privilégiée. Les résultats d'efficacité sur nymphes de tiques obtenus *in vitro* par Kroeber *et al.* (2013) ont été complétés. Des tests *in vitro* complémentaires, selon le même protocole, ont donc été commandités afin de déterminer l'efficacité intrinsèque:

- de substances actives considérées isolément sur des adultes d'*Ixodes ricinus*. En effet, quelques publications^{8,9} suggèrent que l'efficacité d'une substance active varie en fonction du stade de développement.
- d'une sélection de mélanges de substances actives répulsives sur les nymphes d'*Ixodes ricinus*, dans la perspective d'identifier les avantages potentiels de telles associations.

b – Protocole

Le protocole suivi est celui décrit dans l'article de Kroeber *et al.* (2013).

Les substances actives et mélanges de substances actives ont été sélectionnés par l'Anses parmi les substances actives d'intérêt (constituée selon la méthode décrite ci-dessus, résultats figurant ci-après) en raison de la disponibilité des résultats relatifs à leur efficacité. Celle-ci a été évaluée :

- sur des tiques *Ixodes ricinus* au stade adulte (femelle) : géraniol, DEET, acide laurique, acide décanoïque, citriodiol, IR3535 et icaridine.
- sur des tiques *Ixodes ricinus* au stade nymphal pour les mélanges suivants : géraniol + IR3535, géraniol + citriodiol, géraniol + acide laurique, DEET + citriodiol, IR3535 + citriodiol, icaridine + citriodiol.

Dans le cas de l'exposition des tiques adultes aux substances actives d'intérêt, les essais ont été conduits à la dose ED75 (dose efficace sur 75 % de tiques) estimée dans la publication de Kroeber *et al.* (2013) dans l'essai *in vitro*.

Dans le cas de l'exposition des nymphes aux substances actives en mélange, 50 % de la dose permettant de dériver une ED75 (voire une dose inférieure à 50%) préalablement déterminée *in vitro* a été considérée pour chaque substance dans le mélange (cf. annexe 2).

Pour l'ensemble des tests, le N,N-diéthyl-m-toluamide (DEET) a servi de contrôle positif et l'éthanol de contrôle négatif.

⁸ Guideline for the testing and evaluation of the efficacy of antiparasitic substances for the treatment and prevention of tick and flea infestation in dogs and cats, EMEA/CVMP/EWP/005/200-Rev.3, 2016.

⁹ W.B Bissinger, R.M. Roe, Tick repellents: past present and future. Pest. Biochem. Physiol. 96 (2010) 63-79.

4. SYNTHÈSE DES RESULTATS

4.1. Liste des substances actives d'intérêt

Le Tableau 1 liste les substances actives approuvées ou en cours d'évaluation dans le cadre du Règlement biocides en tant que TP19. Pour chacune, l'existence ou l'absence de données relatives à l'efficacité répulsive contre les tiques a été identifiée. Pour chaque substance active pour laquelle des données (issues des dossiers réglementaires ou de la littérature) en faveur d'une efficacité répulsive contre les tiques ont été identifiées, le nombre de produits la contenant qui figurent actuellement dans l'inventaire français des produits biocides (SIMMBAD) en tant que « répulsif contre les tiques » est indiquée dans le Tableau 2.

Tableau 1 : liste des substances actives répulsives TP19 évaluée dans le cadre du règlement Biocide (UE) 528/2012

Substance (FR)	EMR*	No CAS	Statut	Existence de données en faveur d'une efficacité répulsive anti-tiques
Acide nonanoïque	AT	112-05-0	Approuvée - 01/02/2013	Non
Undécane-2-one (Méthyl-nonylacetone)	ES	112-12-9	Approuvée - 01/05/2014	Oui
N,N-diéthyl-m-toluamide (DEET)	SE	134-62-3	Approuvée - 01/08/2012	Oui
Cis-tricos-9-ene	AT	27519-02-4	Approuvée - 01/10/2014	Non
Acétate de (Z,E)-tétradéca-9,12-diényle	AT	30507-70-1	Approuvée - 01/02/2013	Non
Géraniol	FR	106-24-1	En cours d'évaluation	Oui
Dioxyde de carbone	FR	124-38-9	En cours d'évaluation	Non
Acide laurique	DE	143-07-7	Approuvée - 01/11/2015	Oui
Acide décanoïque	AT	334-48-5	Approuvée - 01/09/2015	Oui
Pyréthrines et pyréthroides	ES	8003-34-7	En cours d'évaluation	Oui
Mélange de cis- et trans-p-menthane-3,8 diol/ Citriodiol	UK	42822-86-6	En cours d'évaluation	Oui
N-acétyl-N-butyl-β-alaninate d'éthyle (IR3535)	BE	52304-36-6	Approuvée - 01/11/2015	Oui
Margosa, extraits	DE	84696-25-3	Approuvée - 01/04/2019	Oui
Lavande, Lavandula hybrida, extraits	PT	91722-69-9	En cours d'évaluation	Oui
Carboxylate de Sec-butyl 2-(2-hydroxyethyl)piperidine-1/Icaridine	DK	119515-38-7	En cours d'évaluation	Oui
Metofluthrine	UK	240494-71-7	En cours d'évaluation	Oui

* EMR : Etat Membre Rapporteur

Tableau 2 : Nombre de produits présents dans l'inventaire SIMMBAD revendiquant un usage « tiques » (extraction janvier 2017)

Substance active	Nombre de produits déclarés sur SIMMBAD avec usage « tiques »	Existence de données en faveur d'une efficacité anti-tiques
Géranol	497	Oui
Undécane-2-one / Methyl-nonyl-ketone	0	Oui
N,N-diéthyl-m-toluamide (DEET)	26	Oui
Acide laurique	1 contenant également du géranol	Oui
Acide décanoïque	1 contenant également du margosa usage vétérinaire	Oui
Pyréthrines et pyréthroïdes	121	Oui
Mélange de cis- et trans-p-menthane-3,8 diol / Citriodiol	69	Oui
N-acétyl-N-butyl-β-alaninate d'éthyle (IR3535)	58	Oui
Margosa, extraits	>500	Oui
Lavande, <i>Lavandula hybrida</i> , extraits	246	Oui
Carboxylate de Sec-butyl 2-(2-hydroxyethyl)piperidine-1 / Icaridine	34	Oui

Pour la suite, seules les substances actives présentes dans des produits TP19 déclarés dans la base SIMMBAD et pour lesquelles des données robustes indiquant une efficacité contre les tiques existent dans la littérature ou dans des dossiers réglementaires, ont été retenues pour l'analyse.

4.2. Collectes des données d'efficacité

a) Données soumises dans le cadre de l'évaluation des substances actives et de l'autorisation de mise sur le marché des produits biocides TP19

Parmi les 6 substances actives d'intérêt approuvées au 01/02/2018 et pour lesquelles existent des données en faveur d'une efficacité répulsive anti-tiques, seules 3 ont fait l'objet d'une évaluation de l'efficacité contre les tiques dans le cadre de leur approbation. Ce sont l'IR3535, le DEET et l'acide laurique :

- Pour l'acide laurique, le produit représentatif est une lotion à 10 % m/m qui appliquée à 0.3 – 0.4 g d'acide laurique / cm², offre une protection de 6 à 8 h contre *I. ricinus*.
- Pour le DEET, le produit représentatif est un aérosol à 15 % m/m, qui appliqué à 0.23 mg de DEET / cm², montre moins d'une heure de temps de protection sur l'espèce *Amblyomma americanum*.
- Pour l'IR3535, des solutions entre 5 et 30 % m/m démontrent des durées de protection de 2 à 4h vis-vis d'*Ixodes ricinus* et *I. scapularis*.

Au 01/02/2018, seuls des produits à base de DEET (12 produits) disposent d'une autorisation de mise sur le marché avec un usage « tique » en France. L'évaluation de produits à base d'IR3535 est actuellement en cours de finalisation pour des usages « tiques ». Pour les autres substances actives déjà approuvées (acide décanoïque, acide laurique, méthyl-nonylcetone), aucun usage « tique » n'est actuellement évalué ou autorisé pour les produits en cours d'évaluation. L'évaluation des produits à base d'extrait de Margosa débutera le 01/04/2019 (date d'approbation de la substance active).

Il est à noter que, pour tout type d'applications confondu, l'inventaire biocides SIMMBAD compte au moins un millier de références commerciales revendiquant une efficacité contre les tiques (tableau 2). Ces produits feront l'objet d'une évaluation lorsque les substances actives contenues dans ces produits seront approuvées à la liste des substances actives biocides de l'Union. En cas de non approbation, les produits devront être retirés du marché.

Le Tableau 3 présente de façon anonymisée les 8 produits de référence disposant d'une AMM nationale pour un usage répulsif contre les tiques, leur teneur en substance active, la dose d'application, l'espèce et le stade de développement testé ainsi que le temps de protection complète (déterminé selon la méthode OPPTS 810.3700 de l'US EPA (voir description dans la section 3.2.a.)).

L'autorisation de mise sur le marché est assortie¹⁰ d'un résumé des caractéristiques du produit (RCP), qui indique les instructions d'emploi et mesures de gestion nécessaire pour garantir une efficacité du produit et une utilisation sans risques inacceptables.

Les données issues des dossiers d'AMM permettent de constater que les durées de protection pour des produits sont très variables : de 0,5 à 8 heures. Cette variation n'est pas directement liée à la dose d'application ni la teneur en substance active dans le produit : dans le cas du DEET par exemple, pour des doses d'application très proches, la durée de protection peut varier sensiblement (par ex. une formulation offre 5h de protection pour une application à 0,32 mg de DEET / cm² et une autre ne montrera que 0,5h à 0,33 mg de DEET / cm²). L'efficacité d'un produit dépend donc également fortement de sa formulation.

Tableau 3 : liste des produits disposant d'une AMM nationale pour un usage répulsif contre les tiques

Produits	substance active	Teneur (%)	Dose d'application en produit	Dose d'application en substance active	Durée de protection (heure)
Produit A	DEET	7	1,55 mg/cm ²	0,11 mg/cm ²	3
Produit B	DEET	29,1	1,67µL/cm ²	0,50 mg/cm ²	3
Produit C	DEET	38,8	1,67µL/cm ²	0,67 mg/cm ²	4
Produit D	DEET	48,5	1,67µL/cm ²	0,84 mg/cm ²	5
Produit E	DEET	48,5	1,67µL/cm ²	0,84 mg/cm ²	5
Produit F	DEET	50	0,4 mg/cm ²	0,20 mg/cm ²	7
Produit G	DEET	25	0,6 mg/cm ²	0,10 mg/cm ²	4
Produit H	DEET	30	1.67 mg/cm ²	0,50 mg/cm ²	6

b) ED75 estimées par Kroeber *et al.* (2013) par tests *in vivo* et *in vitro*

Le Tableau 4 récapitule les doses effectives sur 75 % des tiques au stade nymphal estimées par des tests *in vivo* et *in vitro* par Kroeber *et al.* (2013) pour chacune des substances actives d'intérêt. La faible efficacité observée dans les essais *in vivo* et *in vitro* avec l'extrait de Margosa (huile de neem) ne permet pas de calculer des valeurs ED75.

¹⁰ Les décisions d'autorisation sont consultables sur le site de l'Anses : https://www.anses.fr/fr/decisions_biocide

Tableau 4 : ED75 (mg/cm²) estimée par test *in vivo* et *in vitro* pour chacune des substances actives d'intérêt (tiré de Kroeber *et al.*, 2013)

	Test <i>in vivo</i>	Test <i>in vitro</i>	Ratio
Icaridine	0,013	0,002	5,9
IR3535	0,012	0,005	2,4
DEET	0,013	0,006	2,1
Acide décanoïque	0,020	0,006	3,3
Citriodiol	0,035	0,020	1,7
Acide laurique	0,058	0,010	5,6
Géraniol	0,131	0,158	0,8
Huile de citronnelle	0,463	0,194	2,4
Huile de lavande	1,508	0,271	5,6

A partir de ces résultats, Kroeber *et al.* (2013) distinguent 3 groupes de substances actives :

- Pour les tests *in vivo* :
 - 1) Icaridine, IR3535, DEET et acide décanoïque avec des ED75 comprises entre 0,013 and 0,020 mg/cm² ;
 - 2) Citriodiol et acide laurique avec des ED75 comprises entre 0,035 and 0,058 mg/cm² ;
 - 3) Géraniol, huile essentielle de citronnelle et huile essentielle de lavande avec des ED75 comprises entre 0.131 et 1.508 mg/cm².
- Pour les tests *in vitro* :
 - 1) Icaridine, IR3535, DEET et acide décanoïque avec des ED75 comprises entre 0,002 et 0,006 mg/cm² ;
 - 2) Citriodiol et acide laurique avec des ED75 comprises entre 0,01 et 0,02 mg/cm² ;
 - 3) Géraniol, huile essentielle de citronnelle et huile essentielle de lavande avec des ED75 comprises entre 0,158 et 0,271 mg/cm².

Les résultats des deux méthodes mettent en évidence les mêmes tendances, démontrant ainsi la robustesse de la méthode *in vitro* pour caractériser l'activité intrinsèque des substances actives. Si les tests *in vitro* ne permettent pas d'estimer une durée de protection, ils permettent de classer les substances en fonction de leur efficacité.

4.3. Tests *in vitro* complémentaires

a) Effet de 7 substances actives sur des femelles d'*Ixodes ricinus*

Cette série d'essais visait à comparer l'efficacité de chaque substance d'intérêt pour les stades de développement adulte et nymphe des tiques. Les mêmes substances que précédemment testées au stade nymphal ont été reprises hormis les huiles essentielles de citronnelle et de lavande et l'extrait de Margosa, compte-tenu de leur efficacité moindre déjà observée sur le stade nymphal par comparaison avec les autres substances actives.

Tableau 5 : proportion de tiques affectées (%) pour chacune des substances actives (test *in vitro* sur tiques femelles adultes *Ixodes ricinus* réalisé à la dose correspondant à l'ED75 sur la tique au stade nymphal)

	Dose mg/cm ² *	Moyenne	Ecart type
Témoin (éthanol)	-	25,0	22,6
DEET (témoin positif)	0,006	72,9 ¥	18,5
Icaridine	0,002	63,9 ¥	9,6
IR3535	0,005	72,2 ¥	26,8
Citriodiol	0,02	77,8 ¥¥	19,2
Acide décanoïque	0,006	83,3 ¥¥	14,4
Acide laurique	0,01	91,7 ¥¥	8,3
Géranol	0,158	94,4 ¥¥	4,8

* dose ED75, valeur issue de la publication de Kroeber *et al.* (2013)

¥ différence significative par rapport au contrôle négatif ($P \leq 0.05$)¹¹

¥¥ différence significative par rapport au contrôle négatif ($P \leq 0.01$)¹¹

Dans cet essai il apparait que les femelles, testées pour la première fois sur plaque en verre, ont un comportement différent des nymphes. Dans les contrôles négatifs d'éthanol, seules 60 % des tiques femelles montaient, contre 88% chez les nymphes (résultat des tests présentés en chapitre 4.3.b). Près d'un quart des tiques femelles a montré une réponse typique de tiques affectées en marchant vers le bas (comportement dit « repoussé»). Cela a réduit la différence entre les résultats issus du contrôle négatif et ceux des tests avec les produits et, ainsi, le pouvoir discriminatif de la méthode. Néanmoins, l'observation de différences significatives ($P \leq 0.05$) entre le contrôle négatif et les produits testés, permet aux auteurs de l'étude de conclure que la méthode est applicable aux femelles adultes d'*Ixodes ricinus*.

Les 7 substances actives testées contre des tiques adultes ont démontré un « bon » (équivalent ou supérieur à celui du DEET, le contrôle positif) effet répulsif contre les femelles de la tique *I. ricinus*. Les deux acides carboxyliques (l'acide décanoïque et l'acide laurique), ainsi que le géranol ont montré l'efficacité la plus élevée. L'analyse statistique avec le test post hoc de Tukey ne relève pas de différences significatives entre les produits testés mais montre des différences significatives entre ces derniers et le contrôle négatif ($P \leq 0.05$).

Concernant la dose d'application correspondant à la dose entraînant un effet sur 75% des tiques au stade nymphal, les résultats obtenus tendent à montrer que :

- Pour acide laurique et géranol, l'efficacité de la substance active est plus grande pour les adultes que les nymphes,
- Pour le DEET, l'IR3535, le citriodiol et l'acide décanoïque, l'efficacité est similaire,
- Pour l'icaridine, l'efficacité semble légèrement inférieure.

Ainsi, ces résultats préliminaires ne semblent pas montrer de différence forte d'efficacité selon les stades de développement. La mise en œuvre de l'essai sur tiques adulte est cependant délicate. Ces premiers résultats mériteraient d'être confirmés du fait des limites des tests mis en œuvre ici, évoquées précédemment.

¹¹ analyse statistique : GLM Bayésien et test post hoc de Tukey

b) Effets de mélanges de substances actives sur des nymphes d'*Ixodes ricinus*

Cette deuxième série d'essais visait à évaluer l'efficacité de mélanges de substances actives répulsives. Un focus a été mis sur les substances actives les plus efficaces telles qu'identifiées par les tests précédents.

L'étude a été menée en deux parties, chacune avec son groupe de témoins positifs et négatifs. Dans la première partie, 6 mélanges de substances actives, chacune appliquée à la moitié de sa dose ED75, ont été évalués. Dans la deuxième partie, 3 de ces mélanges ont été testés en diminuant la dose soit de l'une soit de l'autre des substances actives d'un mélange.

Evaluation de mélanges binaires, avec chaque substance active à la moitié de sa dose ED75

Tableau 6 : proportion de nymphes d'*Ixodes ricinus* affectées (%) pour 6 mélanges

	Dose mg/cm ²	Moyenne	Ecart type
Témoin (éthanol)	-	0	0
DEET (témoin positif)	0,006	72,2 †	21
DEET + citriodiol	0,003 / 0,01	75 †	28,9
Icaridine + citriodiol	0,001 / 0,01	86,1 †	12,7
IR3535 + citriodiol	0,0025 / 0,01	91,7 †	14,4
IR3535 + géraniole	0,0025 / 0,079	94,4 †	4,8
Acide laurique + géraniole	0,005 / 0,079	94,4 †	9,6
Citriodiol + géraniole	0,01 / 0,079	100 †	0

† différence significative par rapport au contrôle négatif ($P \leq 0.05$)¹¹

Comme le montre le Tableau 6, hormis le mélange DEET + citriodiol, pour tous les mélanges testés il est observé un taux supérieur de tiques affectées comparés au DEET seul (témoin positif). Ces différences ne sont toutefois pas significatives. Tous les mélanges testés et le contrôle positif DEET se révèlent être significativement supérieurs au contrôle négatif ($P \leq 0.05$).

Les mélanges contenant du géraniole montrent un net effet répulsif en mélange avec l'IR3535, le citriodiol et l'acide laurique (94 à 100% de tiques affectées). En groupant les mélanges contenant du géraniole d'une part et du citriodiol (sans géraniole) d'autre part, les mélanges avec géraniole (IR3535 + géraniole, acide laurique + géraniole, citriodiol + géraniole) sont significativement plus efficaces que le DEET ($P \leq 0.05$).

Evaluation de 3 mélanges binaires à des concentrations variables de substances actives

Pour cette deuxième partie de l'étude, les mélanges binaires suivants ont été sélectionnés : géraniole + citriodiol, géraniole + IR3535 et IR3535 + citriodiol. Chacune des substances actives d'un mélange a été testée à la moitié de son ED75 et à des doses inférieures. Les résultats sont reportés dans les Tableaux 7, 8 et 9 ci-dessous.

Tableau 7 : proportion de tiques affectées [% moyen (écart type)] pour le mélange citriodiol + IR3535 (test *in vitro* sur nymphes d'*Ixodes ricinus*)

		Citriodiol®			Contrôle positif (DEET)	contrôle négatif
mg/cm ²		0,001	0,005	0,01 [#]	-	-
IR3535	0,001	-	50,0 (22,0) ¥¥¥	83,3 (16,7) ¥¥¥	58,3 (5,3) ¥¥¥	0,6 (2,2)
	0,0025 [#]	41,7 (8,3) ¥¥¥	86,1 (17,3) ¥¥¥	97,2 (4,8) ¥¥¥ *		

[#] moitié de la dose ED75, valeur issue de la publication de Kroeber *et al.* (2013)

¥¥¥ différence significative par rapport au contrôle négatif ($P \leq 0.001$)¹¹

* différence significative par rapport au contrôle positif ($P \leq 0.05$)¹¹

Tableau 8 : proportion de tiques affectées [% moyen (écart type)] pour le mélange géraniole + IR3535 (test *in vitro* sur nymphes d'*Ixodes ricinus*)

		Géraniole				Contrôle positif (DEET)	contrôle négatif
mg/cm ²		0,005	0,01	0,05	0,079 [#]	-	-
IR3535	0,001	-	-	-	11,1 (19,2) ***	58,3 (5,3) ¥¥¥	0,6 (2,2)
	0,0025 [#]	5,6 (4,8) ***	50,0 (22,0) ¥¥¥	80,6 (19,2) ¥¥¥	94,4 (9,6) ¥¥¥		

[#] moitié de la dose ED75, valeur issue de la publication de Kroeber *et al.* (2013)

¥¥¥ différence significative par rapport au contrôle négatif ($P \leq 0.001$)¹¹

*** différence par rapport au contrôle positif ($P \leq 0.001$)¹¹

Tableau 9 : proportion de tiques affectées [% moyen (écart type)] pour le mélange citriodiol + géraniole (test *in vitro* sur nymphes d'*Ixodes ricinus*)

		géraniole				Contrôle positif (DEET)	contrôle négatif
mg/cm ²		0,005	0,01	0,05	0,079 [#]	-	-
Citriodiol®	0,001	-	-	-	41,7 (16,7) ¥¥¥	58,3 (5,3) ¥¥¥	0,6 (2,2)
	0,005	-	-	-	61,1 (17,3) ¥¥¥		
	0,01 [#]	-	41,7 (8,3) ¥¥¥	66,7 (22,0) ¥¥¥	91,7 (8,3) ¥¥¥		

[#] moitié de la dose ED75, valeur issue de la publication de Kroeber *et al.* (2013)

¥¥¥ différence significative par rapport au contrôle négatif ($P \leq 0.001$)¹¹

Les trois mélanges (géraniole + citriodiol, IR3535 + géraniole et IR3535 + citriodiol), où chaque substance active a été testée à la moitié de sa dose ED75, ont démontré des effets répulsifs très satisfaisants et très similaires ($P \geq 0.99$, GLM Bayésien avec le test post hoc de Tukey), supérieur au contrôle positif DEET à sa dose ED75.

Lorsque la dose d'une des deux substances actives en mélange binaire est diminuée (la dose de la deuxième SA restant à la moitié de sa dose ED75), une réduction d'efficacité en termes de proportion de

tiques affectées est observée pour les trois mélanges testés. Néanmoins, l'efficacité de certains mélanges à des doses inférieures à la moitié de l'ED75 est supérieure au contrôle positif. C'est le cas par exemple du mélange IR3535 + citriodiol ou IR3535 + géraniole. A noter qu'aux doses les plus faibles, certains mélanges sont si peu efficaces qu'ils ne diffèrent pas du contrôle négatif.

CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS DE L'ANSES

Les produits répulsifs contre les tiques et les substances actives qu'ils contiennent sont soumis au règlement biocides (UE) 528/2012. En Europe, 12 substances actives susceptibles de présenter une efficacité contre les tiques sont approuvées ou en cours d'examen en vue de leur approbation. Les résultats d'études de laboratoire, réalisées au moyen d'essais *in vivo* ou *in vitro*, confirment l'efficacité répulsive de plusieurs molécules contre les tiques. C'est le cas en particulier de l'icaridine, l'IR3535, le DEET, l'acide décanoïque, le citriodiol, l'acide laurique, ou encore le géraniole.

En France, plus d'un millier de produits revendiquant une efficacité répulsive contre les tiques sont actuellement sur le marché. En raison de la mise en œuvre progressive du Règlement biocide, la grande majorité de ces produits ne sont pas encore soumis à AMM et n'ont par conséquent pas encore fait l'objet d'une évaluation. A ce jour, seuls les produits contenant exclusivement du DEET comme substance active ont fait l'objet d'une évaluation achevée (il est à noter que l'évaluation des produits contenant de l'IR3535 est en cours de finalisation). L'autorisation de mise sur le marché est dans ce cas assortie d'un résumé des caractéristiques du produit, qui indique les instructions d'emploi et mesures de gestion nécessaires pour garantir une efficacité du produit et une utilisation sans risques inacceptables. La liste des produits disposant d'une AMM et dont l'efficacité a donc été vérifiée est appelée à évoluer au fur et à mesure de l'instruction des dossiers et en fonction de calendrier d'approbation des substances actives TP19 au niveau européen.

Les données issues des dossiers d'AMM montrent que l'efficacité d'un produit dépend non seulement de la (des) substance(s) active(s) qu'il contient, mais également de sa formulation. Il paraît donc difficile de recommander une substance active ou une association de substances actives plutôt qu'une autre tant que la durée de protection conférée par cette (ces) substance(s) active(s) incluse(s) dans la formulation d'un produit n'a pas été testée selon les requis réglementaires.

Toutefois, les résultats des tests *in vitro* complémentaires menés sur les tiques adultes et nymphes indemnes de maladies apportent des éléments de connaissance résumés ci-après.

Selon les essais *in vitro*, il existe peu de différences d'efficacité selon les stades de développement des tiques. Néanmoins il conviendrait de conforter ces résultats par des essais réalisés *in vivo*, du fait des limites méthodologiques de l'essai *in vitro* mis en œuvre. A ce stade, les essais menés sur des tiques au stade nymphal pour démontrer l'efficacité répulsive des substances actives ne sont donc pas remis en cause.

Par ailleurs, les essais menés avec des mélanges de deux substances actives ont démontré un effet répulsif efficace contre les nymphes d'*I. ricinus* supérieur au DEET (témoin positif). Il apparaît ainsi que certains mélanges de substances actives se révèlent prometteurs en termes d'efficacité intrinsèque. En particulier, les résultats des essais *in vitro* montrent que, pour certaines associations de substances actives, l'efficacité répulsive contre les tiques pourrait être conservée tout en diminuant de plus de moitié les doses. La recherche de synergies ou effets additifs entre substances actives ouvre des perspectives en matière de définition de produits au profil toxicologique plus favorable, tout en garantissant une protection efficace contre les tiques. Cependant, du fait que l'efficacité d'un produit dépend non seulement de la (des) substance(s) active(s) qu'il contient, mais également de sa formulation, les résultats obtenus dans cette étude ne permettent pas de prédire avec certitude que les mélanges de substances actives permettront d'obtenir des produits offrant une durée de protection améliorée contre les tiques.

Par ailleurs, il convient de souligner que les données présentées ici ne portent que sur l'efficacité. Comme mentionné précédemment, l'évaluation menée préalablement à la délivrance d'une autorisation de mise sur le marché pour un produit biocide, ainsi que le résumé des caractéristiques du produit, qui indique les instructions d'emploi et mesures de gestion nécessaires, visent également à garantir une utilisation sans risques inacceptables pour la santé humaine et l'environnement.

Des recommandations relatives aux modalités d'utilisation des produits ne peuvent donc être proposées de façon générale. Les modalités (doses et durée de protection notamment) garantissant l'efficacité répulsive contre les tiques et l'absence de risques inacceptables pour la santé humaine et l'environnement sont évaluées et définies pour chaque produit lors de l'instruction de la demande d'autorisation de mise sur le marché. Le choix et les modalités d'utilisation des produits répulsifs doivent donc s'appuyer sur les éléments définis dans les AMM pour chaque contexte d'usage.

Dr Roger GENET

ANNEXE I

BIBLIOGRAPHIE

- Abdel-Ghaffar F, Al-Quraishy S, Mehlhorn H. (2015). Length of tick repellency depends on formulation of the repellent compound (icaridin = Saltidin®): tests on *Ixodes persulcatus* and *Ixodes ricinus* placed on hands and clothes. *Parasitol Res.* 114(8):3041-5.
- Bissinger, B. et Roe, M.R. (2010). Tick repellents: Past, present, and future. *Pesticide Biochemistry and Physiology.* 96(2): 63-79.
- Büchel K., Bendin J., Gharbi A., Rahlenbeck S., Dautel H. (2015). Repellent efficacy of DEET, Icaridin, and EBAAP against *Ixodes ricinus* and *Ixodes scapularis* nymphs (Acari, Ixodidae). *Ticks and Tick-borne Diseases*, 6, 494–498.
- Dautel H. (2004). Test systems for tick repellents. *Int. J. Med. Microbiol.* 293, Suppl.37, 182-188.
- Dautel, H., Dippel, C., Werkhausen, A., Diller, R. (2013). Efficacy testing of several *Ixodes ricinus* tick repellents: Different results with different assays. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 4 (3), pp. 256-263.
- Guerin P. et Kröber T. (2017). Les effets répulsifs de 7 produits et 21 mélanges binaires de substances sur la tique *Ixodes ricinus* *in vitro*. Lab ID A003 & 024. Institut de Biologie, Université de Neuchâtel, 18 p
- Jaenson, T.G.T., Garboui, S., Pålsson, K. Repellency of oils of lemon eucalyptus, geranium, and lavender and the mosquito repellent MyggA natural to *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in the laboratory and field (2006) *Journal of Medical Entomology*, 43 (4), pp. 731-736.
- Kröber T., Bourquin T. M. et P.M. Guerin (2013). A standardised *in vivo* and *in vitro* test method for evaluating tick Repellents *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 107, 160–168.
- Schwantes, U., Dautel, H., Jung, G. (2008). Prevention of infectious tick-borne diseases in humans: Comparative studies of the repellency of different dodecanoic acid-formulations against *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae) *Parasites and Vectors*, 1 (1), art. no. 8.
- US EPA [US Environmental Protection Agency] Insect repellents for human skin and outdoor premises. Washington, DC: US EPA, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention, (OPPTS 810.3700 Product Performance Test Guidelines. EPA 712-C-10-001), 2010.
- Žáková, A., Nejezchlebová, H., Bartoňková, N., Rašovská, T., Kučerová, H., Norek, A., Ovesná, P. (2013). Activity of the tick *Ixodes ricinus* monitored in a suburban park in Brno, Czech Republic, in association with the evaluation of selected repellents *Journal of Vector Ecology*, 38 (2), pp. 295-300.

ANNEXE II:

Concentrations des mélanges considérées dans les tests d'efficacité *in vitro* sur l'efficacité vis-à-vis des tiques commandités à l'Institut de Biologie de l'Université de Neuchâtel :

- 0.003 mg/cm² de DEET + 0.01 mg/cm² de citriodiol
- 0.0025 mg/cm² IR3535 + 0.079 de géraniol
- 0.001 mg/cm² IR3535 + 0.079 de géraniol
- 0.0025 mg/cm² IR3535 + 0.05 de géraniol
- 0.0025 mg/cm² IR3535 + 0.01 de géraniol
- 0.0025 mg/cm² IR3535 + 0.005 de géraniol

- 0.01 mg/cm² citriodiol + 0.079 mg/cm² de géraniol
- 0.005 mg/cm² citriodiol + 0.079 mg/cm² de géraniol
- 0.001 mg/cm² citriodiol + 0.079 mg/cm² de géraniol
- 0.01 mg/cm² citriodiol + 0.05 mg/cm² de géraniol
- 0.01 mg/cm² citriodiol + 0.01 mg/cm² de géraniol

- 0.0025 mg/cm² IR3535 + 0.01 mg/cm² de citriodiol
- 0.001 mg/cm² IR3535 + 0.01 mg/cm² de citriodiol
- 0.001 mg/cm² IR3535 + 0.005 mg/cm² de citriodiol
- 0.0025 mg/cm² IR3535 + 0.001 mg/cm² de citriodiol
- 0.0025 mg/cm² IR3535 + 0.005 mg/cm² de citriodiol