



Valorisation en tant que bioinsecticide de deux huiles essentielles de *Citrus sinensis* et *Citrus aurantium* cultivées au centre du Maroc (Valorization as a bio-insecticide of essential oils of *Citrus sinensis* and *Citrus aurantium* cultivated in center of Morocco)

F. EL-Akhal^{1,2}, R. Guemmouh², H. Greche³, A. El Ouali Lalami^{1*}

1-Laboratoire Régional de Diagnostic Epidémiologique et d'Hygiène du Milieu,

Direction Régionale de la Santé, Hôpital EL Ghassani, Fès, Maroc.

2- Laboratoire d'Analyse et de Modélisation des Ecosystèmes Continentaux, Fès, Maroc.

Faculté des Sciences Dhar EL Mahraz, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah, Fès, Maroc.

3-Département de Valorisation et Application Industrielle, Institut National des Plantes Médicinales et Aromatiques, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah, Fès, Maroc.

*E-mail de l'auteur correspondant : eloualilalami@yahoo.fr

Résumé

Les plantes aromatiques possèdent de plus en plus un atout considérable grâce à la valorisation de leurs huiles essentielles dans différentes applications notamment en tant que anti-inflammatoires, antiseptiques, antifongiques, bactéricides, antitoxiques, insecticides et insectifuges, tonifiantes, stimulantes, calmantes, etc. Ce travail rapporte la valorisation, en tant que bio insecticide, de deux huiles essentielles de deux plantes de la famille de Rutacée (*Citrus sinensis* et *Citrus aurantium*), extraites par hydro distillation et analysées par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM). Le limonène a été obtenu, comme composé majoritaire, avec un pourcentage de 95,36% chez *Citrus sinensis* et 90,0% chez *Citrus aurantium*. Les tests de sensibilité réalisés dans les conditions du laboratoire de ces huiles vis-à-vis du moustique *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae), vecteurs de maladies parasitaires, ont montré que l'huile essentielle de *Citrus aurantium* possède une activité larvicide intéressante que celle de l'huile essentielle de *Citrus sinensis*. En effet, 100 % de mortalité des larves des stades 3 et 4 de l'espèce *Culex pipiens* a été obtenu à des concentrations de 300ppm pour *Citrus aurantium* et 600 ppm pour *Citrus sinensis*. Les CL50 et les CL90 de *Citrus aurantium* et de *Citrus sinensis* calculées ont été respectivement de l'ordre de 139,48 et 280ppm et de 212,04 et 516ppm.

Mots-clés : Huiles Essentielles, *Citrus sinensis*, *Citrus aurantium*, *Culex pipiens*, Bio essais, Valorisation, Bio insecticide.

Abstract

Aromatic plants have an increasingly important asset by the valorization of their essential oils in different applications particularly as anti-inflammatory, antiseptic, antifungal, antibacterial, antitoxic, insecticides and repellents, toning, stimulating, soothing, etc.. This study reports the valorization, as bio insecticide, two essential oils from two plants of the family Rutaceae (*Citrus aurantium* and *Citrus sinensis*), extracted by distillation and analyzed by hydrocarbon gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). Limonene was obtained as majority compound, with a percentage of 95.36% with 90.0% *Citrus sinensis* and in *Citrus aurantium*. The bio tests conducted in laboratory conditions of these oils against the mosquito *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae), vectors parasitic diseases showed that the essential oil of *Citrus aurantium* has an interesting than the essential oil of *Citrus sinensis* larvicidal activity. Indeed, 100% mortality of larvae stages 3 and 4 of *Culex pipiens* was obtained at concentrations of 300 ppm for *Citrus aurantium* and 600 ppm for *Citrus sinensis*. The LC50 and LC90 of *Citrus aurantium* and *Citrus sinensis* were calculated respectively in the order of 139.48 ; 212.04 and 280ppm ; 516ppm.

Keywords: Essential oils, *Citrus sinensis*, *Citrus aurantium*, *Culex pipiens*, Bio tests, valorization, Bio insecticide.

1. Introduction

Le moustique *Culex pipiens* est un vecteur compétent pour plusieurs agents pathogènes affectant l'homme et/ou l'animal tel est le cas du virus West Nile [1], le virus de la fièvre de la vallée de Rift [2-4], et de filaires [5-8].

Au Maroc, l'espèce *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) a été fortement suspectée lors de la fièvre West Nile qui a été rapportée en 1996 avec 42 équidés morts [9], en 2003 [10] et en 2010 [11-12].

La lutte chimique contre ce type de moustique est une stratégie efficace dans la vie quotidienne [13]. Cependant, l'utilisation généralisée des insecticides chimiques de synthèse a entraîné de nombreuses conséquences négatives pour l'homme et son environnement [14], ce qui a entraîné une plus grande attention aux produits naturels [15]. Parmi les bio insecticides, les végétaux qui connaissent actuellement un regain d'intérêt en raison de leurs propriétés éco-toxicologiques [16].

En effet, les vertus thérapeutiques des plantes médicinales et aromatiques ont été expérimentées depuis des siècles et la valorisation de leurs huiles essentielles dans différentes applications notamment en tant que anti-inflammatoires, antiseptiques, antifongiques, bactéricides, antitoxiques, insecticides et insectifuges, tonifiantes, stimulantes, calmantes, a été rapportée [17,18].

Les huiles essentielles peuvent être utilisées comme une alternative aux insecticides synthétiques pour les programmes de lutte antivectorielle [19]. En général, les huiles essentielles de plantes ont été reconnues comme une ressource importante naturel d'insecticides [20].

C'est dans ce cadre que s'inscrit l'objectif de cette étude, réalisée pour la première fois au centre du Maroc, qui consiste à développer une stratégie nouvelle de lutte contre les larves des moustiques vecteurs de maladies parasitaires, en apportant un intérêt majeur à l'utilisation d'huile de plante comme bio-insecticide.

2. Matériels et Méthodes

2.1. Récolte de plante et extraction d'huile essentielle

Le *Citrus sinensis* ou l'oranger douce (Rutacée) est un arbre, pouvant atteindre 10 m de hauteur environ, avec un feuillage vert sombre persistant et légèrement ailé, la floraison blanche très parfumée, les fruits mettent 10 à 12 mois pour murir, de taille moyenne, de forme sphérique, et de couleur caractéristique orange.

Le *Citrus aurantium* (Rutaceae), orange amère ou bigaradier est très connu, arbre de 5 à 10 mètres, le fruit, les feuilles, les rameaux et la fleur ont de nombreuses applications alimentaires ainsi qu'en parfumerie.

Le choix de ces deux plantes a été guidé par leurs utilisations par l'Homme dans ses traditions et ses coutumes en tant que des répulsifs et des insectifuges contre les moustiques et également du fait de leurs abondances dans notre pays.

Les plantes de *Citrus sinensis* et le *Citrus aurantium* ont été récoltées en mois de mars 2011 au niveau de la province de Taounate. Une biomasse de 200g de matière végétale a été soumise à une hydro distillation pendant 3 h, à l'aide d'un appareillage de type Clevenger. Les huiles essentielles recueillies par décantation à la fin de la distillation ont été séchées sur du sulfate de sodium anhydre pour éliminer les traces d'eau résiduelles. L'essence ainsi obtenue a été mise dans de petits flacons opaques et stockée à 4°C avant leur utilisation.

2.2. Etude chimique et identification des composés

L'analyse chimique de l'huile essentielle a été effectuée à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-MS).

Les analyses chromatographiques en phase gazeuse ont été réalisées à l'aide d'un appareil Trace GC ULTRA, équipé d'un injecteur en mode Split, d'une colonne VB-5 (Longueur : 30 m, Diamètre interne : 0.25 mm, Epaisseur du film : 0.25 µm). Les conditions opératoires sont les suivantes: gaz vecteur: hélium, solvant : Acétate d'éthyle température d'injection 220 C°, volume d'injection 1 µl, débit 1,4 ml/min, programmation de température: de 40 à 180°C à 4°C/mn, avec un palier de 20 mn à 300°C.

Le couplage avec le spectromètre de masse Polaris QMS se fait avec une température d'interface de 300 C°. Les conditions opératoires sont les suivantes: Type d'ionisation EI (70 eV), Température de la source d'ionisation 200°C, détecteur Trappe à ionique. La base de données utilisée : NIST M Search.

L'identification des différents constituants des huiles essentielles a été faite sur la base de leurs indices de rétention et de leurs spectres de masse par comparaison avec les données de la littérature [21-22].

2.3. Caractéristique du gîte larvaire

La collecte des larves du *Culex pipiens* a été effectuée dans un gîte larvaire situé dans la zone urbaine de la ville de Fès, nommé Grand canal (402m d'altitude ; 30°03.369' de latitude et 005°08.035' de longitude). Ce gîte est caractérisé par une très forte densité larvaire de culicidés grâce à son eau chaude issue d'une source thermale nommée Ain Lah, favorisant ainsi la prolifération des larves du *Culex pipiens*.

2.4. Collecte des larves de *Culex pipiens*

Les larves ont été collectées à l'aide de plateau rectangulaire en plastique, qu'on incline de 45° par rapport à la surface de l'eau, la force de tension qui en résulte attire les larves vers le plateau. Les larves récoltées ont été

maintenues en élevage dans des plateaux rectangulaires à une température moyenne de $22,6 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ dans l'unité d'entomologie au laboratoire Régional de Diagnostic Epidémiologique et d'Hygiène du Milieu (LRDEHM).

2.5. Identification des larves

L'identification des caractères morphologiques des larves a été déterminée à l'aide de la clé d'identification Marocaine des culicidés [23] et le logiciel d'identification des moustiques de l'Afrique méditerranéenne [24].

2.6. Tests de sensibilité larvaire

Nous avons préparé dans l'éthanol une solution stock de 10% des huiles essentielles étudiées et une série de dilution. Des expériences préliminaires ont permis de sélectionner une gamme de concentrations pour les tests proprement dit. Ainsi nous avons préparé une gamme des solutions suivantes : pour le *Citrus sinensis* (50, 100, 200, 300, 400, 500 et 600ppm) et pour le *Citrus aurantium*, (50, 100, 150, 200, 250, 300, 400ppm). 1ml de chaque solution préparée est mis dans des béchers contenant 99ml d'eau distillée en contact avec 20 larves du stade 3 et 4, le même nombre de larves a été placé dans un bécher témoin contenant 99 ml d'eau distillée plus 1 ml d'éthanol. Trois répétitions ont été réalisées pour chaque dilution ainsi que pour le témoin. Après 24h de contact nous avons dénombré les larves mortes et vivantes.

Les résultats des tests de sensibilité larvaires ont été exprimés en pourcentage de la mortalité en fonction des concentrations des huiles essentielles utilisées. Si le % de mortalité chez les témoins est supérieur à 5%, le % de mortalité chez les larves exposées à l'huile essentielle doit être corrigé en utilisant la formule d'Abbott [25].

% Mortalité corrigée = (% Mortalité Observée - %Mortalité Témoin) / (100-%Mortalité Témoin) \times 100. Si la mortalité chez les témoins excède 20%, le test est invalide et doit être recommencé.

2.7. Analyse statistique des données

Pour la saisie et le traitement des données, nous avons utilisé le logiciel d'analyse Log- probit (WinDL de la version 2.0) développé par CIRAD-CA/MABIS [26].

3. Résultats et discussion

3.1. Rendement et composition chimique des huiles essentielles de *Citrus sinensis* et *Citrus aurantium*

Le rendement moyen en huiles essentielles, des deux plantes *Citrus sinensis* et *Citrus aurantium*, calculé sur la base de la matière sèche a été trouvé de l'ordre de 1,2%. Tandis que, les résultats des analyses chimiques des deux huiles essentielles étudiées ont montré qu'elles sont très riches en mono terpènes et le limonène est le constituant majoritaire avec des pourcentages respectifs de 95,36% et 90,0%. Notons que de nombreux facteurs peuvent influencer le rendement, les caractéristiques physico-chimiques et la composition chimique des huiles essentielles tels que les conditions environnementales, la technique d'extraction, le séchage, la période et le milieu de récolte, les pratiques culturales et l'âge du matériel végétal [27-30].

Nos résultats sont en accord avec les travaux de Rossi Y.E.[31], qui ont trouvé que le composé majoritaire de *C. sinensis* est le limonène avec un pourcentage de l'ordre de 95,1% et ceux de Dongmo P.M.J. et al., [32] qui ont obtenu le limonène également comme principal composé avec un pourcentage de 82,36%. D'autre part, les fruits récoltés à partir des plantes adultes de *Citrus aurantium* par Aline de Moraes Pultrini et al., [33] dans un verger à São Paulo State University, ont pu donner une huile essentielle composée par deux mono terpènes : limonène comme constituant majoritaire à 97,83% et le myrcène à 1,43% et un aldéhyde: octanal à 0,45%. Le reste de l'huile 0,29% dans la composition n'a pas été identifiée.

3.2. Variation du taux de mortalité des huiles essentielles de *Citrus sinensis* et *Citrus aurantium* sur l'espèce *Culex pipiens*

Dans notre expérience, les différentes huiles essentielles étudiées (*Citrus sinensis* et *Citrus aurantium*) ont été soumises au laboratoire à des essais biologiques contre l'espèce *Culex pipiens*. Après 24 heures de contact, le taux de mortalité a varié selon les concentrations et les huiles essentielles ont donné des résultats satisfaisants dans la mesure qu'elles ont montré un important effet larvicide. En effet, nous avons observé que la concentration nécessaire de l'huile essentielle de *Citrus sinensis* pour obtenir 100% de mortalité des larves du *C. pipiens* a été évaluée à 600ppm (figure 1). Par contre, l'huile essentielle de *Citrus aurantium* a présenté une forte activité larvicide avec 100% de mortalité sur les larves de l'espèce *Culex pipiens* à partir d'une concentration de 300ppm (figure 2). Cette activité pourrait être due à la composition chimique des deux huiles constituée majoritairement de limonène, appartenant aux monoterpènes qui sont célèbres pour leur effet insecticide envers plusieurs espèces d'insectes [34].

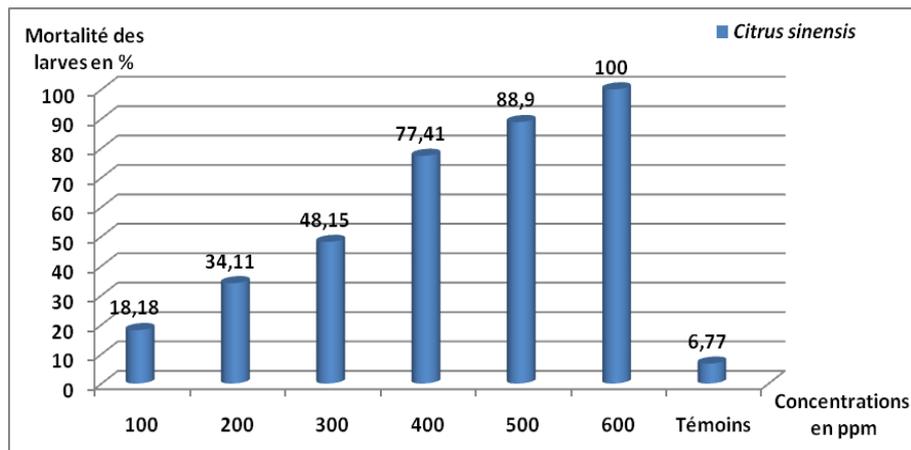


Figure 1: Mortalité(en %) des larves de *Culex pipiens* en fonction de la concentration (en ppm) de l'huile essentielle de *Citrus sinensis*.

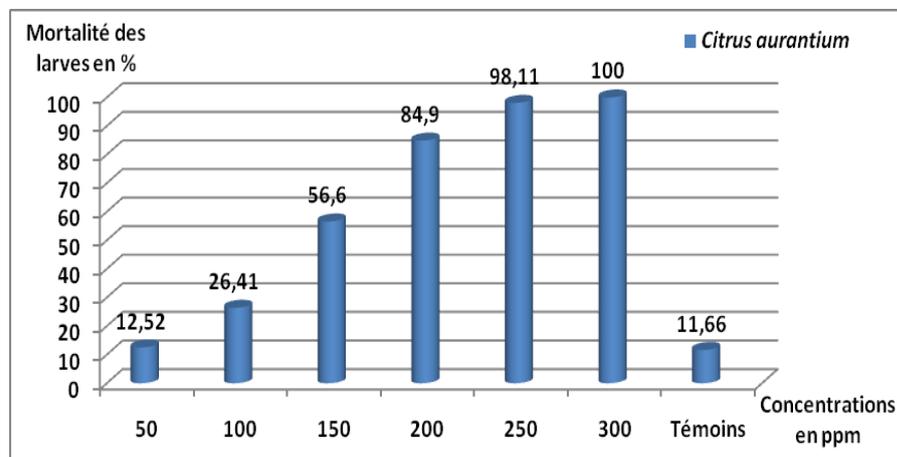


Figure 2 : Mortalité (en %) des larves de *Culex pipiens* en fonction de la concentration de l'huile essentielle (en ppm) de *Citrus aurantium*.

Des travaux effectués par Mwaiko [35] et par Mwaiko et Savaeli [36] ont rapporté que les extraits de citrus possèdent un bon potentiel larvicide contre les culicidés (notamment contre l'*Aedes Albopictus*). D'autres auteurs [37] ont trouvé également une toxicité importante des extraits de cinq plantes médicinales de la famille de citrus contre le quatrième stade larvaire de *Culex quinquefasciatus*, espèce de même genre que *Culex pipiens*.

3.3. Concentrations létales CL50 et CL90

Le tableau 2 montre que l'huile essentielle de *Citrus aurantium* testée sur l'espèce *Culex pipiens* est plus efficace que celle de *Citrus sinensis*. En effet, les valeurs de la CL50 et la CL90 enregistrées pour *Citrus aurantium* sont de l'ordre de 139,48ppm et de 212,04ppm (Equation de la droite de régression pondérée: $Y = -15,11461 + 7,04799X$; $\chi^2 = 5,1347$) alors que celles de *Citrus sinensis* sont de l'ordre de 280,82 ppm et 516,25 ppm (Equation de la droite de régression pondérée: $Y = -11,86832 + 4,84730X$; $\chi^2 = 15,1618$).

Tableau 2 : Mortalité(%) des larves de *Culex pipiens* en fonction de la concentration létales CL50 et CL90 des huiles essentielles de *Citrus sinensis* et *Citrus aurantium* après 24 heures d'exposition

Espèces végétales	CL50 (ppm) (LI-LS)*	CL90 (ppm) (LI-LS)*
<i>Citrus sinensis</i>	280,82 (37,441-381,70)	516,25 (379,57-2454,87)
<i>Citrus aurantium</i>	139,48 (120,70-154,76)	212,04 (193,82-238,06)

*LI-LS : Limite Inférieure- Limite Supérieure

Selon Traboulsi et al [38] et Cheng et al [39], la CL50, obtenue par l'activité larvicide de l'huile essentielle de *Citrus sinensis* contre *Culex pipiens*, a été trouvée de l'ordre de 60 ppm. Pavela en 2009 [40] a trouvé également des résultats intéressants concernant l'activité de *Citrus aurantium* sur *Culex quinquefasciatus*, avec une CL50 = 179,8 ppm et une CL90 de 351,1 ppm. Récemment en inde des chercheurs [41] ont observé des valeurs de la CL50 et de la CL90 de l'ordre de 370,96 et de 446,84 ppm au cours des tests larvicide de *Citrus sinensis*, contre un moustique culicidé l'*Aedes aegypti* du même genre que *Culex pipiens*.

En comparant nos résultats aux travaux antérieurs peu nombreux cités ci-dessus, ils indiquent que les huiles essentielles étudiées (*Citrus sinensis* et *Citrus aurantium*) ont un bon potentiel larvicide contre les larves de *Culex pipiens* étant donné le pourcentage de mortalité et les CL50 et CL90 enregistrées.

Ainsi, nous pouvons considérer les dérivés de plantes comme des sources de certains agents biologiquement actifs pouvant être utilisée pour le contrôle des moustiques dans l'avenir [42].

Conclusion

Cette étude, sur la valorisation, en qualité de bioinsecticide, de deux huiles essentielles de *Citrus sinensis* et *Citrus aurantium* cultivées au centre du Maroc, a montré que l'huile essentielle de *Citrus aurantium* possède une activité larvicide intéressante contre *Culex pipiens* par rapport à l'huile essentielle de *Citrus sinensis* avec des CL50 et des CL90 respectivement égales à (139,48 ; 212,04ppm) et (280,82 ; 516ppm).

En perspective de ce travail, nous envisageons d'étudier et de comparer l'activité larvicide des extraits aqueux de ces deux plantes contre les larves de moustiques *Culex pipiens* ainsi que sur d'autres vecteurs potentiels de maladies parasitaires notamment les anophélineae.

Conflit d'intérêt : aucun.

Références

1. Nicolas V., Huiles essentielles: Production mondiale, échanges internationaux et évaluation des prix. 10^{ème} journée internationale des huiles essentielles. *Actes, Ravista italiana Eppos* ; numéro spécial 02 (1992) 534-539.
2. Mishara A.K. & Dubey N.K., Evaluation of some essential oils for their toxicity against fungi causing deterioration of stored food commodities. *Appl. Environ. Microbiol.* 60(4) (1994) 1101-1105.
1. Krida G., Diancourt L., Bouattour A., Rhim A., Chermiti B., Failloux AB., Assessment of the risk of introduction to Tunisia of the Rift Valley fever virus by the mosquito *Culex pipiens*. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 104(4) (2011) 250-259.
2. Hoogstraal H, Meegan JM, Khalil GM, Adham FK, The Rift Valley fever epizootic in Egypt 1977-78. 2. Ecological and entomological studies. *Trans. R Soc. Trop. Med. Hyg.* 73 (1979) 624-629.
3. Meegan J.M., Khalil G.M., Hoogstraal H., Adham F.K., Experimental transmission and field isolation studies implicating *Culex pipiens* as a vector of Rift Valley fever virus in Egypt. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 29 (1980) 1405.
4. Moutailler S., Krida G., Schaffner F., Vazeille M., Failloux A.B., Potential vectors of Rift Valley fever virus in the Mediterranean Region. *Vector. Borne. Zoonot. Dis.* 8 (2008) 749-753.
5. Harb M., Faris R., Gad A.M., Hafez O.N., Ramzi R., Buck A.A., The resurgence of lymphatic filariasis in the Nile Delta. *Bull. WHO* 71 (1993) 49-54.
6. Krida G., Bouattour A., Rodhain .F, Failloux A.B., Variability among Tunisian populations of *Culex pipiens*: genetic structure and susceptibility to a filarial parasite, *Brugiapahangi*. *Parasitol. Res.* 84 (1998) 139-142.
7. Abdel-Hamid Y.M., Soliman M.I., Allam K.M., Spatial distribution and abundance of culicine mosquitoes in relation to the risk of filariasis transmission in El Sharqiya Governorate, Egypt. *Egypt. Acad. J. Biolog.Sci.* 1 (2009) 39-48.
8. Abdel-Hamid Y.M., Soliman M.I., Kenawy M.A., Mosquitoes (Diptera: Culicidae) in relation to the risk of disease transmission in El Ismailia governorate, Egypt. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* 41 (2011) 109-118.
9. El Harrack M., Le Guenno B., Gounon P., Isolement du Virus West Nile au Maroc. *Virologie* 1(1997) 248-249.
10. Schuffenecker I., Peyrefitte CN., El Harrak M., Murri S., Leblond A. & Zeller HG., West Nile virus in Morocco. *Emerg. Infect. Dis.* 11(2005) (2003) 306-309.
11. Roberts H., Hancock R., West-Nile Virus in horses in Morocco. Preliminary outbreak assessment. Department of Environment, *Food and Rural Affairs ed*, Morocco: 2010, 3.
12. Fassil H., El Harrak M., Marie J.L. Aspects épidémiologiques de l'infection à virus West-Nile au Maroc. *Médecine et Santé Tropicales* (2012) 123-125.
13. Pavela R., Larvicidal effects of some Euro-Asiatic plants against *Culex quinquefasciatus* Say larvae (Diptera: Culicidae), *Parasitology Research*, 105 (2009) 887-892.
14. Pavela R., Larvicidal effects of various Euro-Asiatic plants against *Culex quinquefasciatus* Say larvae (Diptera: Culicidae), *Parasitology Research*, 102 (2008) 555-559.
15. Pirali-Kheirabadi K., da Silva J.A.T., *Lavandula angustifolia* essential oil as a novel and promising natural candidate for tick (*Rhipicephalus (Boophilus) annulatus*) control, *Experimental Parasitology* (2010) <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2010.04.012>.

16. Cosimi S., Rossi E., Cioni P.L., Canale A., Bioactivity and qualitative analysis of some essential oils from Mediterranean plants against stored-product pests: Evaluation of repellency against *Sitophilus zeamais* Motschulsky, *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens) and *Tenebriomolitor* (L.), *Journal of Stored Products Research*, 45 (2009)125–132.
17. Haddouchi F, Benmansour A. Huiles essentielles, utilisations et activités biologiques. Application à deux plantes aromatiques. Les technologies de laboratoire : 2008, 8, 20-27.
18. El Ouali Lalami A., EL-Akhal F., Ouedrhiri W., Ouazzani Chahdi F., Guemmouh R., Greche H., Composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles de deux plantes aromatiques du centre nord marocain : *Thymus vulgaris* et *Thymus satureioidis* LES TECHNOLOGIES DE LABORATOIRE , 8 N°31 (2013) 27-33.
19. Govindarajan M., Sivakumar R., Rajeswary M., Yogalakshmi K., Chemical composition and larvicidal activity of essential oil from *Ocimum basilicum* (L.) against *Culex tritaeniorhynchus*, *Aedes albopictus* and *Anopheles subpictus* (Diptera: Culicidae). *Experimental Parasitology* 134 (2013)7–11.
20. Gbolade, A.A., Oyedele, A.O., Sosan, M.B., Adayin, F.B., Soyela, O.L., Mosquito repellent activities of essential oils from two Nigerian *Ocimum* species. *J. Trop. Med. Plants* 1 (2000)146–148.
21. Joulain D. & Köning W.A., The atlas of spectral data of sesquiterpene hydrocarbons. Hamburg, Germany: EB-Verlag (1998).
22. Adams R.P., Identification of essential oils by gas chromatography quadrupole mass spectroscopy. Carol Stream, IL, USA: Allured Publishing Corporation (2001).
23. Himmi O., Dakki M., Trari B., El Agbani M.A., Les Culicidae du Maroc : clés d'identification avec données biologiques et écologiques. *Travaux de l'institut Scientifiques*. Série Zool. Rabat. 44 (1995) 1-51.
24. Brunhes J., Rhaim A., Geoffroy, Hervy J.P., Les moustiques de l'Afrique méditerranéenne. Logiciel d'identification et d'enseignement Montpellier, France, IRD & IPT, CD-Rom collection didactique, Éditions IRD. (2000).
25. Abbott W.S., Method of computing the effectiveness of an insecticide, *J. Econ. Entomol* 18 (1925)265-267.
26. Giner M., Vassal M., Vassal C, Chiroleu F., Kouaik Z., logiciel, CIRAD.URBI/MABIS, Montpellier, France.
27. Aberchane M. , Fechtal M. , Chaouch A., Bouayoune T. Influence de la durée et de la technique d'extraction sur le rendement et la qualité des huiles essentielles du cèdre de l'Atlas (*Cedrus atlantica* manetti). *Annales de la recherche forestière au Maroc* ISSN 0483-8009 CODEN AFRMA. 34 (2010) 110- 118.
28. Bourkhiss M., Hnach M., Bourkhiss B., Ouhssine M., Chaouch A., Satrani B., Effet de séchage sur la teneur et la composition chimique des huiles essentielles de *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters. *Agrosolutions*. 20(1) (2009) 44.
29. Okoh O.O., Sadimenko A., An A.J., The Effects of Age on the Yield and Composition of the Essential Oils of *Calendula officinalis*. *J. Applied Sci.* 7 (2007) 3806-3810.
30. Bourkhiss M., Hnach M., Lakhilfi T., Boughdad A., Farah A., Satrani B., Effet de l'Age et du Stade Végétatif sur la Teneur et la Composition Chimique des Huiles Essentielles de *Thuya de Berbère*. *Les technologies de laboratoire*. 6(23) (2011) 64-68.
31. Rossi Y. E., Palacios S.M., Fumigant toxicity of *Citrus sinensis* essential oil on *Musca domestica* L. adults in the absence and presence of a P450 inhibitor, *Acta Tropica* 127 (2013) 33– 37.
32. Dongmoa P.M. J., Kuatéb J., Boyom F.F., Ducelier D., Damesse F., Zolloa P.H.A., Menut C., Bessière J. M., Composition chimique et activité antifongique in vitro des huiles essentielles de *Citrus* sur la croissance mycélienne de *Phaeoramularia angolensis*, *Fruits*, vol. 57 (2) (2001).
33. Pultrini A.M., Galindo L.A., Costa M., Effects of the essential oil from *Citrus aurantium* L. in experimental anxiety models in mice, *Life Sciences* 78 (2006) 1720 – 1725
34. Papachristos, D.P., Stamopoulos, D.C., Repellent, toxic and reproduction inhibitory effects of essential oil vapours on *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of Stored Products Research* 38 (2002) 117-128.
35. Mwaiko, G.L., Citrus peel oil extracts as mosquito larvae insecticides. *East Afr. Med. J.*, 69 (1992) 223-226.
36. Mwaiko, G.L. and Z.X. Savaeli., Lemon peel oil extract as mosquito larvicide. *East Afr. Med. J.*, 71 (1994) 797-799.
37. Chansang U., N. Zahiri, S. Bansiddhi, Jaree, B. Thidarat, T. Ratom, M. Jiranuch, B. Nipa, Mulla, S. Mir., Mosquito larvicidal activity of aqueous extracts of long pepper (*Piper retrofractum* vahl) from Thailand, *J. vect. Ecol.*, 30 (2005) 195.
38. Traboulsi, A., El-Haj, S., Tueni, M., Taoubi, K., Nader, N.B., Mrad, A., Repellency and toxicity of aromatic plant extracts against mosquito *Culex pipiens molestus* (Diptera: Culicidae). *Pest. Manage. Sci.* 61(2005)597–604.
39. Cheng, S.S., Liu, J.Y., Tsai, K.H., Chen, W.J., Chang, S.T., Chemical composition and mosquito larvicidal activity of essential oils from leaves of different *Cinnamomum mophloeum* provenances. *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 4395.
40. Roman Pavela., Larvicidal property of essential oils against *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *Industrial Crops and Products*, 30(2) (2009) 311-315.
41. Radhika W., Ankita R., Jasdeep K. S., Roopa S., Naim W., Sarita K., Larvicidal and irritant activities of hexane leaf extracts of *Citrus sinensis* against dengue vector *Aedes aegypti* L. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* (2012)152-155
42. Mathur, S.J.N., Prospects of using herbal products in the control mosquito vectors. *ICMR Bulletin. New Delhi* (2003).