



Composition chimique et activité larvicide sur *Culex pipiens* d'huile essentielle de *Thymus vulgaris* cultivées au Maroc Chemical composition and larvicidal activity of *Culex pipiens* essential oil of *Thymus vulgaris* grown in Morocco

F. El-Akhal^{1,2}, H. Greche³, F. Ouazzani Chahdi⁴, R. Guemmouh²,
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- Université Sidi Mohamed Ben Abdellah, Faculté des Sciences Dhar EL Mahraz, Laboratoire d'Analyse et de Modélisation des Ecosystèmes Continentaux, Fès, Maroc.

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

4- Laboratoire de Chimie Organique Appliquée, Faculté des Sciences et techniques Sais, Fès, Maroc.

Received 25 Apr 2014, Revised 2 Oct 2014, accepted 2 Oct 2014

Auteur correspondant : E-mail : eloualilalami@yahoo.fr ; Tel : (+212661937474)

Résumé

L'huile essentielle obtenue par hydrodistillation des feuilles sèches de *Thymus vulgaris*, cultivée au Maroc a été analysée et testée sur l'espèce de larve *Culex pipiens*. Le rendement d'extraction obtenu pour le *Thymus vulgaris* est de 1%. L'analyse et l'identification des différents constituants de l'huile et la détermination de sa composition centésimale relative a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM). Celle-ci a révélé que l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* a une teneur en thymol de 41,4 %, la fraction monoterpénique prédomine avec de 97,35%, constituée de 46,5% sous forme d'hydrocarbures et de 50,85% sous forme de composés oxygénés, les hydrocarbures sesquitépéniques ne représentent qu'un faible pourcentage de 1,7%. Les constituants de l'huile du thym ont été identifiés avec une totalité de 99%. Le test biologique effectué selon une méthodologie inspirée du protocole standard de l'OMS, légèrement modifié, a révélé que l'huile essentielle de thym possède de remarquables propriétés larvicides. Les concentrations minimales nécessaires pour obtenir 100% de mortalité des larves de *Culex pipiens* a été évaluée à 220 ppm pour *Thymus vulgaris*. La concentration létale CL50 et CL90 mesurée pour l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* semble être efficace avec des valeurs respectives de l'ordre de 103 ppm et de 178 ppm.

Mots-clés : Huile essentielle, *Thymus vulgaris*, *Culex pipiens*, test biologique, Maroc, Fès,

Abstract

The essential oil obtained by steam distillation of the dried leaves of *Thymus vulgaris* cultivated in Morocco has been analyzed and tested on the species *Culex pipiens* larvae. The extraction yield obtained for *Thymus vulgaris* is 1%. The analysis and identification of the various constituents of the oil and determining its relative percentage composition was performed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). This analysis revealed that the essential oil of *Thymus vulgaris* thymol content of 41.4%, the dominant monoterpene fraction with 97.35 %, consisting of 46.5 % in the oil form and 50.85% in oxygenated compounds form, hydrocarbons sesquitépéniques represent only a small percentage of 1.7%. The constituents of thyme oil have been identified with a total of 99%. Biological test performed according to a standard methodology inspired by the WHO protocol, slightly modified, showed that the essential oil of thym has remarkable larvicidal properties. The minimum levels necessary to achieve 100% mortality of larvae of *Culex pipiens* was estimated at 220 ppm for *Thymus vulgaris*. Lethal concentration LC50 and LC90 measured essential oil *Thymus vulgaris* appears to be effective with the respective values of the order of 103 ppm and 178 ppm.

Keywords: Essential oil, *Thymus vulgaris*, *Culex pipiens*, bioassay, Morocco, Fes.

1. Introduction

Les moustiques causent, en plus de leur nuisance, des maladies vectorielles [1, 2] et leur impact sur la Santé Publique humaine est très considérable [3].

Dans le monde, les espèces de moustiques notamment du genre *Culex* sont responsables de la transmission de maladies parasitaires telles la filariose, la fièvre jaune et le virus West Nile [4].

Au Maroc, l'espèce *Culex pipiens* a été fortement suspecté dans la transmission des épidémies qui l'ont touché en 1996 [5, 6], en 2003 [7] et récemment en 2010. Sa forte densité qui coïncide dans le temps et dans l'espace avec la date de dépistage des cas équitains fait de lui le vecteur le plus probable [8].

La lutte anti-moustique par des insecticides est très efficace sur les moustiques culicidés, mais présente plusieurs inconvénients. En effet, ils peuvent être, en plus d'un effet néfaste sur la vie aquatique, à l'origine de divers problèmes environnementaux [4] notamment le phénomène de la résistance des insectes aux insecticides [9, 10, 11, 12]. D'après Georghiou *et al* [13] et Sinégre *et al* [14], les insectes traités développent une résistance aux insecticides chimiques. Par ailleurs, les chercheurs et scientifiques tentent d'ores et déjà de trouver des alternatives efficaces et accessibles à partir de produits naturels qui connaissent de nos jours un regain d'intérêt et jouissent d'une popularité grandissante [15].

Au Maroc, les études menées sur l'activité insecticide des extraits végétaux vis-à-vis des larves de moustique sont très limitées [4, 16, 17]. Par ailleurs, la comparaison des produits naturels avec les produits chimiques de synthèse permettrait de mieux valoriser ces bio-insecticides naturels.

C'est dans ce cadre que s'inscrit ce travail, réalisé pour la première fois au centre Nord du Maroc, qui a pour objectif d'évaluer l'activité larvicide de l'huile essentielle *Thymus vulgaris* (Lamiacée) sur l'espèce *Culex pipiens*.

2. Matériels et méthodes

2.1. Collecte de plante et extraction d'huile essentielle de *Thymus vulgaris*

La plante de *Thymus vulgaris* a été récoltée durant la période Mars-Juin de 2010, de différentes stations de la région du centre du Maroc. La plante fraîchement collectée a été séchée à l'ombre à l'abri de la lumière et dans un endroit sec et aéré. Devenue sèche, les feuilles ont été récupérées et mises dans des sacs en papier et stockées jusqu'à leur utilisation.

Une biomasse de 200g de feuilles de plante a été soumise à une hydro distillation pendant 3 h, à l'aide d'un appareillage de type Clevenger modifié. L'huile essentielle recueillie par décantation à la fin de la distillation a été séchée 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 son utilisation.

2.2. Etude chimique et identification des composés de l'huile essentielle

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); ce qui permet à la fois l'analyse chromatographique de chaque huile ainsi que la détermination qualitative des composés majoritaires.

L'identification des constituants a été réalisée par couplage d'un chromatographe en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. 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(30 m de longueur, 0,25 mm de diamètre interne, 0,25 µm d'épaisseur du film). Le mode d'ionisation est l'impact électronique avec une énergie d'ionisation de 70 eV.

Les conditions opératoires sont les suivantes: solvant : Acétate d'éthyle température d'injection 220 °C, volume d'injection 1 µl, débit 1,4 ml/min, avec une programmation de température du Four de 40 °C à 250 °C, à raison de 6 °C/min, avec un palier de 20 mn à 300 °C, gaz vecteur : hélium. Le couplage avec le spectromètre de masse Polaris Q MS ce fait avec une température d'interface de 300 °C.

L'identification des différents constituants est réalisée par comparaison des spectres de masse obtenus avec ceux de la banque de données informatisées Wiley 275.L et de la littérature [18]. Les confirmations sont obtenues par la détermination des indices de rétention et comparaison avec les données de la littérature [19, 18].

2.3. Caractéristique du gîte larvaire

La collecte des larves du *Culex pipiens* a été effectuée dans un gîte larvaire permanent nommé Grand Canal (402m d'altitude ; 30°03.369' de latitude et 005°08.035' de longitude) situé à l'est de la ville de Fès. Ce gîte est caractérisé par une très forte densité de l'espèce *Culex pipiens*, ceci grâce à la présence d'une eau chaude originaire d'une source thermale limitrophe nommée « Ain Lah », favorisant ainsi la prolifération des larves de moustiques.

2.4. Collecte des larves de *Culex pipiens*

Les larves sont 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 sont maintenues en élevage dans

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

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 [20] et le logiciel d'identification des moustiques de l'Afrique méditerranéenne [21].

2.6. Tests de sensibilité larvaire:

Nous avons préparé une solution stock à 1000ppm (0,1%) d'huile essentielle dans l'éthanol et par une série de dilutions, nous avons obtenu la gamme des solutions suivantes: 40, 80, 120, 160, 200 et 220 ppm. 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 de *Culex pipiens*, 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 d'huile essentielle utilisée. 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 [22].

$$\% \text{ Mortalité corrigée} = [(\% \text{ Mortalité Observée} - \% \text{ Mortalité Témoin}) / (100 - \% \text{ Mortalité Témoin})] \times 100.$$

Si la mortalité chez les témoins excède 20%, le test est invalide et doit être recommencé.

2.7. Analyse statistique :

Pour la saisie et le traitement des données, nous avons utilisé le logiciel d'analyse Loge- probit (WinDL de la version 2.0) développé par CIRAD-CA/MABIS [23]. Pour évaluer plus précisément l'efficacité de la toxicité de cette huile, nous avons calculé les CL50 et CL90, définies comme étant les concentrations létales provoquant respectivement 50 % et 90 % de mortalité dans la population de larves traitées. Ces valeurs ont été déterminées à partir d'une courbe expérimentale donnant les variations du pourcentage de mortalité, à 24 h, en fonction des doses croissantes d'huile essentielle.

3. Résultats et discussion

3.1. Rendement d'huile essentielle de *Thymus vulgaris*

Le rendement en huile essentielle de plante étudiée *Thymus vulgaris* est de 1%. Ce rendement moyen en huile essentielle a été calculé sur la base de la matière sèche. Il est relativement faible par rapport à certaines plantes qui sont exploitées industriellement comme source des huiles essentielles [15]. Le même rendement (1%) de *Thymus vulgaris* a été signalé dans l'Est du Maroc par [24].

3.2. Composition chimique d'huile essentielle de *Thymus vulgaris*

L'analyse de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris*, cultivé au Maroc a permis l'identification de 99% des constituants. Le thymol présente la teneur la plus élevée de l'ordre 41,4 %, γ -terpinène 22,25% et p-cymène 15,59% (tableau 1). La fraction monoterpénique prédomine avec de 97,35%, constituée de 46,5% sous forme d'hydrocarbures et 50,85% sous forme de composés oxygénés. Cette dernière a été trouvée chez la même espèce cultivée au Cameroun, en quantité plus importante avec un pourcentage de 93,9%, dont la proportion en monoterpènes hydrocarbonés sensiblement identique (45,0%), et même pour les monoterpènes oxygénés (48,9%), le principal constituant de la fraction oxygénée est le thymol (40,1%) [25], ce qui est en accord avec le résultat obtenu. D'après Roman P. [26], les analyses ont montré que les substances majoritaires pour *Thymus vulgaris* étaient le thymol 60,3% et le p-cymène à 10,1%. Les hydrocarbures sesquiterpéniques ne représentent qu'un faible pourcentage (1,7%). Pino et al. [27], ont rapporté avoir extrait un échantillon caractérisé par un fort taux de thymol (34,6 %), de γ -terpinène (17,6 %) et de p-cymène (17,6 %). En revanche, ils diffèrent de ceux publiés par Naguib [28], dont l'essence se caractérise plutôt par une forte teneur en thymol (36,6 %), α - thujone (23,2 %) et 1,8-cinéole (13,4 %). Alexandre et al. [29] ont rapporté également que le thymol (44,77%), p-cymène (18,6%) et γ -terpinène (16,5%) sont des substances majoritaires de *Thymus vulgaris* cultivé au Rio de Janeiro State (Brazil).

3.3. Activité larvicide d'huile essentielle de *Thymus vulgaris* sur *Culex pipiens*

3.3.1 Variation du taux de mortalité

Après avoir exposé les larves du stade 3 et 4 de l'espèce *Culex pipiens* aux différentes concentrations de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* pendant 24 h, le % de mortalité a varié selon les concentrations (tableau 2). Les

concentrations minimales nécessaires pour obtenir 100 % de mortalité des larves du *Culex pipiens* ont été évaluées à 220ppm pour *Thymus vulgaris*. L'activité larvicide très importante observée chez l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* pourrait être expliquée par l'action ou l'effet des composés majoritaires. En effet, l'huile de *Thymus vulgaris*, est caractérisée par une teneur élevée en Thymol de 41,4 %, connu pour ses propriétés antiseptiques [24].

Tableau 1 : Composition chimique d'huile essentielle de *Thymus vulgaris* analysée par CPG-SM
Table.1 : Chemical composition of essential oil of *Thymus vulgaris* analyzed by GC-MS

Composés chimiques	Indice de rétention	Pourcentage %	Références					
			[25]	[26]	[27]	[28]	[29]	
Monoterpènes		97,35%	93,9%,					
Monoterpènes hydrocarbonés		46,5%	45,0%					
α -thujéne	924	1,76				23,2		
α -pinène	932	0,85						
Sabinène	969	0,33						
β -pinène	974	1,63						
α -phellandrène	1002	0,28						
α -terpinène	1014	3,25						
p-cymène	1020	15,59		10,1	17,6			18,6
γ -terpinène	1054	22,25			17,6			16,5
Camphène	946	0,40						
Terpinolène	1086	0,16						
Monoterpènes oxygénés		50,85%	48,9%					
Isothymol	-	0,27						
Linalol	1095	1,79						
Camphène	1141	0,24						
Bornéol	1165	0,65						
Thymol	1289	41,39	40,1	60,3	34,6	36,6		44,77
Carvacrol	1298	2,06						
Méthyl 2-méthylbutanoate	-	0,18						
2-hexen-1-ol 2-éthyl	-	0,41						
4-terpinène	-	1,15						
2-isopropyl-4-méthylanisole	-	0,88						
Thymol méthyl ether	1232	1,18						
p-menth-2-én-1-ol	-	0,65						
Sesquiterpènes		1,7%						
Sesquiterpènes hydrocarbonés		1,7%						
β - Caryophyllène	-	1,30						
Germacrène D	1484	0,40						

Dans la littérature, nous n'avons pas rencontré d'auteurs qui ont examiné l'action larvicide de *Thymus vulgaris* sur *Culex pipiens*. Nous avons, donc dans la suite de ce travail, comparé l'action sur l'espèce *Culex pipiens* d'autres huiles, proche de composition à celle de l'huile de *Thymus vulgaris*. Ainsi, Vatandoosta H. et al [30] ont rapporté que les huiles essentielles de plantes *Kelussia*, *Odoratissima Mozaffarian* ont été trouvées également d'une activité larvicide plus importante contre *Culex pipiens*, les principaux constituants de cette huile étaient Z-ligustilide (77,73%), l'acétate de 2-octène-1-ol (6,27%), E-ligustilide (2,27%) et phthalide butylidène (1,97%). Des études similaires réalisées par Traboulsi et al [31], ont démontré l'activité insecticide de quatre plantes médicinales récoltées au Liban (*Myrtus communis* L., *Lavandula stoechas* L., *Origanum syriacum* L. et *Mentha*

microphylla K.Koch) sur les larves de *Culex pipiens* spp, les CL50 obtenues étaient comprises entre 16 à 89 mg/l.

Tableau 2: Mortalité(%) des larves de *Culex pipiens* en fonction de la concentration d'huile essentielle (ppm) de *Thymus vulgaris* et leur Concentrations létales CL50 et CL90 après 24 heures d'exposition

Table.2 : Mortality (%) of larvae of *Culex pipiens* depending on the essential oil concentration (ppm) of *Thymus vulgaris* and LC50 and LC90 lethal concentrations after 24-hour exposure.

Espèces végétaux	Concentrations (ppm)	Mortalité des larves (%)	CL50 (ppm) *(LI-LS)	CL90 (ppm) *(LI-LS)	Equation de la droite de régression	Chi2 calculé (χ^2)
<i>Thymus vulgaris</i>	Témoins	7,14	102,027 (10,181-138,547)	179,186 (129,563-592,859)	Y=10,52627 +5,24030X	15,098
	40	23,07				
	80	35,79				
	120	67,88				
	160	78,46				
	200	96,15				
	220	100				

*LI-LS: Limite Inférieure- Limite Supérieure

3.3.2. Concentrations létales CL50 et CL90

Le tableau 2 montre également que l'huile essentielle testé de *Thymus vulgaris* demeure la plus efficace, avec une valeur de 103 ppm pour la CL50 et 178 ppm pour la CL90. L'équation de la droite de régression pondéré est $Y=10,52627+5,24030X$ et le Chi 2 = 15,098.

D'autre huile essentielle de *Kelussia odoratissima Mozaffarian* sur *Culex pipiens* ont montré un effet important avec une valeur de CL50 à 2,69 ppm et une CL90 de 7,90 ppm [30]. Selon le Roman P. [26], les huiles essentielles obtenues à partir de *Thymus vulgaris* ont été testés pour la mortalité des larves de moustiques *Culex quinquefasciatus*. Ce dernier a été trouvé sensible à une CL50 de 33 microgrammes/ml (33 ppm).

Conclusion

Dans notre étude, nous avons évalué l'activité larvicide sur les larves de *Culex pipiens* de l'huile essentielle de *Tyhmus vulgaris*. Elle a montré une intéressante activité larvicide envers l'espèce *Culex pipiens*, avec une valeur de 103 ppm pour la CL50 et 178 ppm pour la CL90.

Nous envisageons de poursuivre cette étude afin de préciser la nature des composés responsables de l'activité par un fractionnement mené en parallèle avec les tests biologiques ainsi que d'étudier l'évaluation de l'activité larvicide sur d'autres larves de moustiques notamment les anophélinæ et par d'autres espèces de plantes végétales récoltées y compris les extraits aqueux.

Conflit d'intérêt : aucun.

Remerciements-Nous remercions toute personne qui contribué de loin ou de près à la réalisation de ce travail.

Références

- Seye F., Ndione R.D., Ndiaye M., Effets larvicides des produits de neem (huile de *neem pure* et *neemix*) comparés à deux insecticides chimiques de synthèse (la deltaméthrine et le fenitrothion) sur les larves du moustique *Culex quinquefasciatus* (diptera: culicidae), *J. Sci.Tech.* 4(1) (2006) 27-36.
- Youssef L., Driss B., Youssef E., Omar L., Khadija E., Abdellatif K., Zakaria K., Cartographie de la faune culicidienne dans la province de Khémisset (Maroc), *Sci. Lib Edi. Mersenne* 3 (2011) 7p.
- Pascal D., Pierre M., Pierre F., Les moustiques d'intérêt médical, *Revue Française des Laboratoires*, 338 (2001) 27-36.
- Aouinty B., Oufara S., Mellouki F., Mahari S., Évaluation préliminaire de l'activité larvicide des extraits aqueux des feuilles du ricin (*Ricinus communis* L.) et du bois de thuya (*Tetraclinis articulata* (Vahl) Mast.) sur les larves de quatre moustiques culicidés : *Culex pipiens* (Linné), *Aedes caspius* (Pallas), *Culiseta longiareolata* (Aitken) et *Anopheles maculipennis* (Meigen), *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 10 (2006) (2) 67-71.
- Harrack M.E., Guenno L.E.B., Gounno L.E.P., Isolement du virus West Nile au Maroc., *Virologie.* 1 (1997) 248-249.
- Murgue B., Murri S., Triki H., Deubel V., Zeller H.G., West Nile in the Mediterranean basin: 1950-2000., *Ann N V Acad Sci.* 951 (2001) 117-126.

7. Schuffenecker I., Peyrefitte C.N., Harrak M.E.L., Murri S., Lebond A., Zeller H.G., West Nile virus in Morocco, 2003., *Emer. Infect. Diseases*, 11 (2005) 306-309.
8. Laboratoire d'entomologie médicale, Enquête entomologique dans les foyers du West Nile au Maroc. Rapport de mission, 2002, *Institut National d'Hygiène. Rabat.*, 3p.
9. Cui F, Tan Y, Qiao CL Filariasis vector in China: Insecticide resistance and population structure of mosquito *Culex pipiens* complex., *Pest. Manag. Sci.* 63 (2007) 453-458.
10. Daaboub J, Ben Cheikh R, Lamari A, et al Resistance to pyrethroid insecticides in *Culex pipiens pipiens* (Diptera: Culicidae) from Tunisia., *Acta. Tropica.* 107 (2008) 30-36.
11. Kioulos I, Kampouraki A, Morou E, Skavdis G, Vontas J., Insecticide resistance status in the major West Nile virus vector *Culex pipiens* from Greece., *Pest. Manag. Sci. Doi.70(4)* (2013) 623-627.
12. El Ouali Lalami A., El-Akhal F., El Amri N., Maniar S., Faraj C., Etat de la résistance du moustique *Culex pipiens* vis-à-vis du téméphos au centre du Maroc., *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 107 (2014) 194-198.
13. Georghiou G.P., Ariaratnam V., Pasternak M.E., Lin C.S., Organophosphorus multiresistance in *Culex quinquefasciatus* in California., *J. Econ. Entomol.* 68 (1975) 461-467.
14. Sinegre G., Jilien J.L., Gaven B., Acquisition progressive de la résistance au chlorpyrifos chez les larves de *Culex pipiens*(L.) dans le Midi de la France., *Parasitologia.* 19(1/2) (1977) 79-94.
15. El Ouali Lalami A., El-Akhal F., Oudrhiri W., Ouazzani C.F., Guemmouh R., Grech 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 (31) (2013) 27-33.
16. Slimani N.A., Faune culicidienne d'une zone marécageuse de Rabt-Salé: Biotypologie et contribution à la lutte par des substances naturelles., Thèse Doct. Es Sci. Biol., Fac.Sci.Univ.Mohammed V., Rabat, Maroc. (2002) 192p.
17. Bouallam T.S., Ecologie des diptères culicidés de la région de Marrakech: Contribution à l'amélioration des moyens de lutte chimique et biologique., Thèse. Doct. Es Sci., Fac. Sci. Semlalia., Unv.Cadi Ayyad., Marrakech, Maroc. (2001) 148p.
18. Adams R.P., Identification of essential oils by gas chromatography quadrupole mass spectroscopy. Carol stream, IL, USA: *Allured Publishing Corporation* (2001) Carol Stream. 455p.
19. Joulain D., König W.A., The Atlas of Spectral Data of Spectral Data of Sesquiterpene Hydrocabones., *Hambourg: E.B. Verlag.* (1998) 405p.
20. Himmi O., Dakk 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.
21. Brunhes J., Rhaim A., Geoffroy B, 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).
22. Abbott W.S., A methode of computing the effectiveness of an insecticide., *J. Econ. Entomol.* 18 (1925) 265-267.
23. Giner M., Vassal M., Vassal C., Chiroleu F. and Kouaik Z., logiciel, CIRAD.URBI/MABIS, Montpellier, France.
24. Imelouane B., Amhamdi H., Wathelet J.P., Ankit M., Khedid K., El Bachiri A., Chemical composition of the essential oil of thyme (*Thymus vulgaris*) from Eastern Morocco., *Int. J. Agric. Biol.* 11 (2009) 205-208.
25. François T., Pierre M.J.D., Modeste L.S., Edwige N.M., Guy B.T.F., Paul H H.A.Z., Chantal M., Activité larvicide sur *Anopheles gambiae* Giles et composition chimique des huiles essentielles extraites de quatre plantes cultivées au Cameroun, *Biotechnol., Agron. Soc. Environ.* 13 (1) (2009) 77-84.
26. Roman P., Larvicidal property of essential oils against *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae)., *Ind. Crops . Prod.* 30(2) (2009) 311-315.
27. Pino J.A., Estarron M., Fuentes V. Essential oil of thyme (*Thymus vulgaris* L.) grown in Cuba., *J. Essent. Oil Res.* 9 (5) (1997) 609-610.
28. Naguib N.Y., Thyme (*Thymus vulgaris* L.) growth, oil quality, yield and chemical composition as affected by of chelated iron and two potassium forms., *Arab Univ. J. Agric. Sci.* 10 (3) (2002) 893-918.
29. Alexandre P., Ronoel L., Godoy O., Chemical composition of *thymus vulgaris* L.(thyme) essential oil from the Rio de Janeiro State (Brazil)., *J. Serb. Chem.Soc.* 73 (3) (2008) 307-310.
30. Vatandoost H., Sanei Dehkordi D.A., Sadeghi S.M.T., Davari B., Karimian F., Abai M.R., Sedaghat M.M., Identification of chemical constituents and larvicidal activity of *Kelussia odoratissima* Mozaffarian essential oil against two mosquito vectors *Anopheles stephensi* and *Culex pipiens*(Diptera: Culicidae), *Exp parasitol.* 132(4) (2012) 470-474.
31. Traboulsi A.F., Taoubi K., El-haj S., Bessiere J.M., Rammal S., Insecticidal properties of essential plant oils against the mosquito *Culex pipiens molestus* (Diptera: Culicidae)., *Pest. Manage. Sci.* 58 (2002) 491-495.