



Activités larvicide et nymphocide des huiles essentielles des péricarpes des fruits mûrs de quelques espèces de *Citrus* sur *Culex pipiens* Linnaeus 1758, vecteur de la filariose de Bancroft au Cameroun

Larvicidal and nymphocidal activities of essential oils from pericarps of ripe fruits of some species of *Citrus* on *Culex pipiens* Linnaeus 1758, vector of Bancroft filariasis in Cameroon

AKONO NTONGA P^{1*}, TONGA C¹, KEKEUNOU S², JAZET DONGMO P M³, MAGNE TAMDEM G¹, KOUTOU S², LOPEDJI TEDONGMO N², LEHMAN L G¹

¹Laboratory of Biology and Animal Physiology, Department of Animal Biology, Faculty of Science, University of Douala, P.O. Box 24 157 Douala, Cameroon; ²Laboratory of Zoology, Department of Animal Biology and Physiology, Faculty of Science, University of Yaounde I, P.O. Box 812 Yaounde, Cameroon; ³Laboratory of Biochemistry, Department of Biochemistry, Faculty of Science, University of Douala, P.O. Box 24 157 Douala, Cameroon (*Corresponding author: Laboratory of Biology and Animal Physiology, Department of Animal Biology, Faculty of Science, University of Douala, P.O. Box 24 157 Douala, Cameroon; patakono2000@yahoo.fr. Tel. +237 677 74 56 54.)

Received July, 2015; revised November, 2015; accepted January, 2016.

RESUME

La lutte contre les filarioses est entravée depuis quelques décennies par la résistance des vecteurs aux insecticides conventionnels et leur accumulation dans le milieu. La présente recherche propose une méthode de lutte contre les stades pré-imaginaux de *Culex pipiens* à base d'huile essentielle des péricarpes de quelques fruits de *Citrus*. Les huiles essentielles ont été obtenues par hydrodistillation des péricarpes de fruits mûrs de *Citrus aurantifolia*, *C. sinensis* et *C. grandis* à l'aide d'un appareillage de type Clevenger. L'analyse des huiles a été faite par chromatographie en phase gazeuse (CPG) et par couplage chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse (CPG/SM). Les activités larvicides et nymphocides sur *Cx. pipiens* ont été évaluées selon une méthodologie inspirée du protocole standard de l'OMS. Les rendements d'extraction ont montré que les péricarpes de fruits mûrs de *C. sinensis* (0,72 %) ont une teneur plus élevée en huile essentielle que ceux de *C. aurantifolia* (0,32 %) et de *C. grandis* (0,19%). Bien que le composé majoritaire était le limonène (91,20 %, 93,88 % et 44,91 % respectivement pour *C. grandis*, *C. sinensis* et *C. aurantifolia*) dans toutes les huiles, la détermination des concentrations tuant 50% de larves et de nymphes (CL₅₀) au bout de 12 h d'exposition a montré que l'huile essentielle des péricarpes des fruits mûrs de *C. aurantifolia* est plus efficace, suivie de celles de *C. sinensis* et de *C. grandis*. Sa forte toxicité serait due à l'action synergique du limonène et d'autres composés minoritaires. Ces résultats constituent un atout dans la recherche de stratégies de lutte contre *Cx. pipiens*. Les programmes nationaux de lutte anti-vectorielle devraient se pencher sur les possibilités d'utilisation des huiles essentielles de *C. aurantifolia* comme larvicide et nymphocide pour un meilleur contrôle des vecteurs des filarioses.

Mots clés: *C. aurantifolia*, *C. grandis*, *C. sinensis*, Huile essentielle, *Cx. pipiens*, Activité insecticide.

ABSTRACT

In recent decades, the fight against filariasis is hampered by increasing vector resistance to conventional insecticides that accumulate in the environment. This study proposes an approach for fighting against pre-imaginal stages of *Culex pipiens* based on essential oils from pericarps of some citrus fruits. Essential oils were obtained by steam distillation of pericarps of ripe fruit of *Citrus aurantifolia*, *C. sinensis* and *C. grandis* using a Clevenger-type apparatus. Gas chroma-

tography coupled with mass spectrometry were used for essential oils analysis. Their larvicidal and nymphocidal activities on *Cx. pipiens* were assessed according to WHO standard protocol. The extraction yields showed that pericarp of ripe fruit of *C. sinensis* (0.72%) have a higher content of essential oil than that of *C. aurantifolia* (0.32%) and *C. grandis* (0.19%). The major component is limonene which represents 91.20%, 93.88% and 44.91% for *C. grandis*, *C. sinensis* and *C. aurantifolia* respectively. Although limonene was the major component in all citrus species, determination of lethal concentration killing fifty percent mosquitoes (LC₅₀) after 12 hours of exposure revealed that the essential oil from *C. aurantifolia* is most effective, followed by those of *C. sinensis* and *C. grandis*. This high toxicity might be due to the synergistic action of limonene and some other minor compounds. These results represent an asset in the search for strategies against *Cx. pipiens* ; national vector control programmes should consider the use of essential oils from *C. aurantifolia* as larvicide and nymphocide for better control of filaria worms vectors.

Key words: *C. aurantifolia*, *C. grandis*, *C. sinensis*, essential oil, *Cx. pipiens*, Insecticidal activity.

1. Introduction

Depuis quelques années, l'importance de la filariose lymphatique en tant que problème de santé publique a été considérablement réévaluée. On estime que de par le monde, plus de 120 millions de personnes sont atteintes par la maladie parmi lesquelles 40 millions souffrent de manifestations cliniques stigmatisantes et invalidantes (OMS 2013). Selon Michael et al. (1996), plus d'un tiers des cas sont rencontrés en Afrique et particulièrement au Cameroun où plusieurs foyers de filariose lymphatique ont été signalés (Boussinesq 1999). La filariose lymphatique est causée par *Wuchereria bancrofti* ou *Brugia malayi* deux nématodes transmis d'un sujet infecté à un autre par les moustiques des genres *Anopheles*, *Aedes*, *Mansonia* et *Culex*. *Culex pipiens* est un vecteur anthropophile dont les femelles piquent préférentiellement la nuit à l'intérieur des habitations (Baldet 1995). Ce moustique est très abondant surtout en milieu urbain où les larves se développent dans des collections d'eaux usées (caniveaux, fosses septiques, marres....) riches en matières organiques (Baldet 1995).

Dans les années 2000, l'O.M.S a lancé un vaste programme mondial visant à éliminer la maladie en tant que problème de santé publique d'ici 2020 (OMS 2013). La stratégie retenue repose sur deux axes : la distribution massive des médicaments aux populations à risque et le contrôle des vecteurs. La lutte anti-larvaire basée sur l'utilisation des larvicides demeure l'une des meilleures méthodes de contrôle des vecteurs, en particulier pour ceux du genre *Culex*. En effet, leurs gîtes pré-imaginaux en milieu urbain sont facilement repérables, accessibles, de tailles limitées et par conséquent facilement traitables. Le contrôle des vecteurs est heurté depuis quelques années à de multiples problèmes liés à l'utilisation des insecticides de synthèse. Ces derniers induisent une résistance au sein des populations des vecteurs, agissent sur les organismes non cibles, polluent l'environnement et représentent des risques réels d'intoxication chez les mammifères (Yang et al. 2002, Kiran et al. 2006, Senthilkumar et al. 2008). Cette résistance des vecteurs

qui tend à se généraliser dans toutes les régions africaines où l'on utilise les pesticides pour booster la production agricole suscite un besoin réel de mettre sur pied une stratégie de lutte efficace et durable. Les plantes ont l'avantage d'être biodégradables, accessibles à tous et sans danger pour l'environnement. Depuis des années, de nombreux travaux mettant en exergue les propriétés insecticides des plantes issues de la pharmacopée camerounaise ont été menés (Tchoumboungang et al. 2009, Akono et al. 2015). Il en ressort principalement que le potentiel insecticide de ces plantes est accru sous forme d'huile essentielle. Le nombre de molécules bio-actives retrouvées dans ces essences volatiles et leur facilité à diffuser à travers les téguments des arthropodes serait à l'origine de cette efficacité (Boyom et al. 2003, Lucia et al. 2007, Cheng et al. 2008). Le caractère très volatile de ces essences recommande que ces biocides soient utilisés sous forme de larvicides si l'on veut améliorer leur efficacité. Utilisées sous cette forme, les huiles essentielles de quelques plantes ont démontré une forte efficacité insecticide sur les larves de plusieurs espèces de moustiques avec les valeurs de LC₅₀ variant de 1 à 275 ppm (Bassolé et al. 2003). Ces résultats encourageants interpellent les dirigeants des pays endémiques à intégrer l'usage des larvicides naturels dans la mise en œuvre de leur politique de contrôle des vecteurs.

Le Cameroun regorge une forte diversité floristique aux ressources alimentaires, thérapeutiques, insecticides et insectifuges inestimables. Cependant, la plupart de ces propriétés sont encore inexploitées ou alors exploitées sous forme traditionnelle. C'est le cas de certaines espèces de *Citrus* dont le liquide issu des fruits est utilisé traditionnellement dans certaines régions africaines comme insectifuge (Tchoumboungang, com. pers.).

La présente recherche se propose d'évaluer l'activité insecticide des huiles essentielles des péricarpes des fruits mûrs de *Citrus aurantifolia*, *C. sinensis* et *C. grandis* sur les larves de stade 4 et les nymphes de *Culex pipiens* collectées au quartier Logbessou (Douala).

2. Matériel et Méthodes

2.1. Matériel végétal

Trois espèces d'agrumes ont été choisies en raison de leur activité insecticide sur *Rhyzopertha dominica* (Abbas et al. 2012). Il s'agit de *Citrus sinensis*, *C. aurantifolia* et *C. grandis*. Leurs fruits étaient cueillis dans un verger de la

région forestière du sud-Cameroun dépourvu de tout traitement insecticide. Le lieu, la date de récolte et l'organe de la plante exploitée sont résumés dans le tableau 1.

Tableau 1. Données sur les huiles essentielles des plantes récoltées au sud-Cameroun en Mars 2013

Plante			Récolte		Huile essentielle	
Famille	Espèce	Organe	Lieu	Date	Couleur	Rendement (%)
Rutaceae	<i>Citrus aurantifolia</i>	Péricarpe	Yabassi	21/03/13	Jaune clair	0,32
Rutaceae	<i>Citrus grandis</i>	Péricarpe	Yaoundé	21/03/13	Jaune-clair	0,19
Rutaceae	<i>Citrus sinensis</i>	Péricarpe	Yaoundé	21/03/13	Jaune-clair	0,72

2.2. Huiles essentielles

Extraction. Les huiles essentielles étaient extraites des péricarpes par hydro-distillation à l'aide d'un appareillage de type Clevenger de marque Barnstead electrothermal, pendant 5h. L'huile essentielle recueillie par décantation était filtrée sur colonne de sulfate de sodium anhydre pour éliminer les traces d'eau résiduelles. L'essence ainsi obtenue était introduite dans les flacons sombres et conservée à 4°C à l'abri de la lumière.

Analyse chimique. L'analyse des huiles était effectuée à l'aide d'un chromatographe de type Varian CP-3380 équipé d'un détecteur à ionisation de flamme et d'une colonne capillaire (30 m x 0,25 mm) avec une phase stationnaire apolaire de type methylsilicone (DB5, épaisseur du film 0,25µm). Le four était programmé de 50-200°C avec un gradient de température de 5°C/min. La température de l'injecteur était de 200°C, le détecteur réglé à 200°C. L'azote était utilisé comme gaz vecteur avec un débit de 1 mL/min.

Les indices de rétention des constituants étaient déterminés par rapport aux temps de rétention d'une série de *n*-alkanes et leurs pourcentages relatifs calculés par intégration électronique sans tenir compte de leurs facteurs de réponse.

Le couplage chromatographie en phase gazeuse - spectrométrie de masse était réalisé à l'aide d'un appareillage de marque Hewlett-Packard HP 5970 A, équipé d'une colonne capillaire apolaire (30 m x 0,25 mm) en silice fondue de type HP-1 (épaisseur du film 0,25 µ) et d'un détecteur de type quadripôle (énergie d'ionisation 70 eV). La température de l'injecteur était de 220 °C et celle de la zone d'interface à 210 °C. La température du four était programmée de 70 °C à 200 °C avec un gradient de 10 °C.min⁻¹. Le gaz vecteur est l'hélium avec un débit de 0,6 mL.min⁻¹. L'acquisition était effectuée en mode scan (35-300 amu) à 2,96 scan.sec⁻¹.

L'identification des constituants était faite sur la base de leurs indices de rétention et de leurs spectres de masse par comparaison avec les données de la littérature (Taton et al. 2000, Dieringer et al. 2006, Visaria et al. 2006, Bhattacharya & Mukherjee 2008).

2.3. Collecte, élevage et identification des larves de *Culex pipiens*

La collecte des larves a eu lieu à Douala (04° 04'N- 09° 47'E). Les larves de *Cx. pipiens* étaient prélevées au mois de décembre 2013 dans un gîte domestique constitué d'un récipient en plastique d'une contenance de 10 litres dans lequel étaient abandonnées des eaux usées de ménages. Elles étaient ensuite placées dans des bacs en plastique (30 x 20 x 10 cm) puis maintenues en élevage à l'insectarium de l'Université de Douala (Cameroun) selon les recommandations de Desfontaines et al. (1991). L'identification morphologique a été faite au stade larvaire puis confirmée au stade adulte grâce aux clés d'identification d'Harry & Chester (1963) et de Jupp (1996).

2.4. Tests biologiques

La méthodologie utilisée est inspirée du protocole de l'OMS (WHO 1985). Les tests biologiques étaient réalisés dans des bacs de 5 cm de diamètre contenant chacun 99,9 mL d'eau de source et 25 nymphes ou 25 larves de stade 4 de *Cx. pipiens*. Des tests préliminaires étaient réalisés à l'effet de sélectionner une gamme de concentrations. Au préalable, la solution mère de chaque échantillon d'essence volatile était préparée en diluant 20000 µl d'huile avec 20000 µl d'éthanol à 70° (dilution au 1/2). Ainsi, plusieurs autres dilutions étaient effectuées à partir de la solution mère et les quantités variées de solution d'éthanol à 70°. Les concentrations suivantes étaient obtenues : 1000 ppm, 700 ppm et 500 ppm. 0,1 mL de chaque concentration ainsi définie était enfin introduite dans chaque bac. Quatre répétitions étaient réalisées pour chaque concentration. Le témoin négatif contenait 99,9 mL d'eau de source et 0.1 mL d'éthanol à 70°. Le comptage des larves et des nymphes mortes était fait toutes les 30 mn pendant 12 heures.

2.5. Analyses statistiques

Les analyses ont été faites avec les logiciels Statview version 5.0 (SAS Institute, Inc, USA). Le test H de

Kruskal Wallis a permis de comparer les mortalités larvaire et nymphale sous l'effet des concentrations des

huiles essentielles. Les équations des droites de régression obtenues à partir de la table simplifiée d'Henry qui

transforme les pourcentages de mortalité en probits (Frontier et al. 2001) ont permis de déterminer les CL₅₀ et

CL₉₅. Le degré de significativité a été fixé à une valeur de probabilité inférieure à 0,05.

Tableau 2. Composition chimique des huiles essentielles des péricarpes de *C. grandis*, *C. sinensis* et *C. aurantifolia*

Composés	Pourcentages (%)		
	<i>C. grandis</i>	<i>C. sinensis</i>	<i>C. aurantifolia</i>
Composé aromatique		0,17	3,33
Methylnaphtalene I	0,36	0,17	3,33
Monoterpènes	95,67	95,23	88,16
Monoterpènes Hydrocarbonés	92,35	94,84	77,67
α-thuyène	-	-	0,34
α-Pinène	0,37	0,39	2,51
Camphène	-	-	0,12
Δ ³ Carène	-	0,02	-
Sabinène	-	-	2,79
β-Pinène	0,32	0,31	24,76
Myrcène	0,33	0,03	0,17
β-Phéllandrène	-	0,09	-
Limonène	91,20	93,88	44,91
(E)-β-Ocimène	-	-	0,37
α-terpinène	-	0,08	0,36
p-cymène	-	-	1,34
γ-terpinène	0,13	0,04	-
Monoterpènes oxygénés	3,32	0,39	10,49
Hydrate de E-sabinène	0,10	0,03	5,24
Oxyde de linalol I	0,48	0,09	-
Oxyde de linalol II	0,91	0,06	-
Linalol	0,47	0,04	0,32
Oxyde de limonène I	0,05	-	-
Terpinène-4-ol	-	-	0,12
α-terpinéol	0,14	-	1,29
myrténal	-	-	-
Oxyde d'α-pinène	0,08	-	-
γ-terpinéol	0,34	-	-
Carvone	0,10	-	-
Carvéol	0,26	0,03	0,23
Néral	-	-	-
Nérol	0,10	-	0,37
Acétate de linalyle	0,09	-	0,29
Géranol	0,20	0,11	2,63
Acétate de bornyle	-	0,03	-
Sesquiterpènes		0,05	2,40
Sesquiterpènes hydrocarbonés	0,45	0,05	2,40
Bicyclo-élémente	-	-	0,15
β-élémente	0,04	-	0,12
santalène	-	-	-
β-caryophyllène	0,25	-	0,54
(E-E)α-bergamotène	-	-	0,47
Germacrène D	0,05	-	-
β-bisabolène	-	0,05	0,59
γ-cadinène	0,11	-	0,53
Sesquiterpènes oxygénés	0,0	-	-
Globulol	-	-	-
Composés linéaires	0,64	1,94	2,34
Octanol	-	-	-
Octanal	-	1,69	1,11
Décénol	0,09	0,09	-
Decanal	-	0,16	1,23
Nonanal	0,55	-	-

3. Résultats et discussion

La présente étude montre que les péricarpes des fruits mûrs de *C. aurantifolia*, *C. grandis* et *C. sinensis* ont

respectivement des teneurs en huile essentielle de 0,32%, 0,19% et 0,72% (tableau 1). Ces rendements sont moins élevés que ceux obtenus avec la même espèce végétale

par Jazet et al. (1999). Cette différence serait liée au fait que l'extraction a été faite sur les péricarpes alors que nos prédécesseurs l'ont faite sur les feuilles.

De ce point de vue on pourrait admettre que pour une même espèce de plante, la teneur en huile essentielle peut varier d'un organe à un autre (Tchoumboungang et al. 2009), Cette variabilité de rendement pourrait aussi être liée à la période de récolte, aux facteurs édaphiques et climatiques, à l'état physiopathologique de la plante et au temps de distillation (Jazet et al. 1999, Tchoumboungang et al. 2009).

L'analyse chimique a montré que les huiles essentielles des péricarpes de *C. aurantifolia*, *C. sinensis* et *C. grandis* ont toutes une teneur élevée en composés monoterpéniques hydrocarbonés (tableau 1). Le composé majoritaire obtenu est le limonène dont le pourcentage est fonction de l'espèce d'agrumes. Il est de 44,91 %, 93,88 % et 91,2 % respectivement pour *C. aurantifolia*, *C. sinensis* et *C. grandis* (tableau 2). Ces résultats corroborent ceux d'Azzous et al. (1976) et Haro & Faas (1985) qui ont aussi trouvé que le limonène était le composé majoritaire de l'huile essentielle des péricarpes de fruits mûrs de *Citrus aurantifolia* originaire de l'Inde. Cette molécule a aussi été majoritairement retrouvée dans les huiles essentielles des péricarpes des fruits mûrs de *Citrus sinensis* originaires du Vietnam et de Tunisie (Quoc et al. 2011, Soumaya et al. 2012). La même observation a été faite sur les essences de péricarpes des fruits mûrs de *C. aurantifolia*, *C. sinensis* et *C. grandis* récoltés au Cameroun et en Egypte (Jazet 1999, Mansour et al. 2004). Fort de ce qui précède, il convient de relever que le limonène est caractéristique des huiles essentielles des péricarpes des fruits des espèces du genre *Citrus* (Choi & Sawamura 2000, Lota et al. 2002).

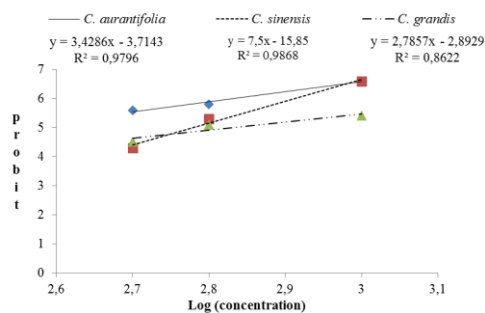


Figure 1 : Droites de régression illustrant l'activité insecticide des huiles essentielles des péricarpes de *Citrus sinensis*, *Citrus grandis* et *Citrus aurantifolia* sur les larves de stades 4 de *Culex pipiens*

Les tests biologiques ont montré que les huiles essentielles de *C. sinensis*, *C. aurantifolia* et *C. grandis* possèdent de remarquables propriétés insecticides vis-à-vis des larves de stade 4 et des nymphes de *Culex pipiens* (tableau 3). Cette efficacité serait le fait de la présence d'une forte teneur des huiles essentielles extraites en

limonène. De nombreux travaux ont démontré l'activité insecticide de cette molécule à l'état pur sur certains stades de développement des Culicidae (Kassir et al. 1989, Mohsen et al. 1989, Ibrahim et al. 2001, Mansour et al. 2004). Les valeurs de CL₅₀ et CL₉₅ (tableau 4) calculées à partir des équations de droites (figures 1 et 2) ont montré que l'essence volatile de *C. aurantifolia* est la plus active malgré sa teneur en limonène relativement faible (46, 84%) (tableau 2). Ce résultat tranche cependant avec celui enregistré sur les larves d'*An. gambiae* (souche Logbessou) par Akono et al. (2015). Les travaux de ces derniers ont montré que les larves d'*An. gambiae* (souche Logbessou) sont plutôt plus sensibles à l'huile essentielle des péricarpes de *C. limon* qu'à l'huile des péricarpes de *C. aurantifolia*. Cette différence de susceptibilité entre les deux espèces de moustiques suggère que le limonène ne serait pas la seule molécule mise en cause dans cette activité biologique.

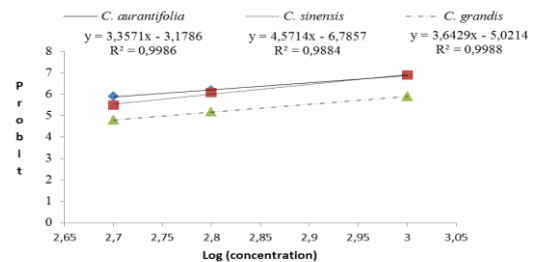


Figure 2 : Droites de régression illustrant l'activité insecticide des huiles essentielles des péricarpes de *Citrus sinensis*, *Citrus grandis* et *Citrus aurantifolia* sur les nymphes de *Culex pipiens*

Certains composés minoritaires des huiles extraites seraient impliqués dans cette toxicité. Les activités insecticides avérées de l' α -pinène sur *Tribolium confusum* et de la β -pinène sur *Aedes aegypti* montrent le rôle important joué par ces deux composés minoritaires sur la toxicité de certaines huiles essentielles (Ojimekwe & Alder, 1999 et Lucia et al. 2007). Récemment, Cheng et al. (2009) ont attribué l'efficacité de l'huile essentielle de *C. arizonica* sur les larves d'*An. stephensi* à l'action synergique du limonène et de l' α -pinène. Par ailleurs, Jazet (1999) au cours de ses travaux ayant conduit à l'évaluation des effets antifongiques des huiles essentielles de *Citrus latifolia*, *Citrus limon*, *Citrus sinensis*, *Citrus paradisi*, *Citrus grandis*, *Citrus unshiu*, a trouvé que les extraits les plus actifs se sont révélés beaucoup plus riches que les autres en citral et en β -pinène. A la lumière de ce qui précède, il convient de penser que le potentiel toxique de l'huile essentielle des péricarpes des fruits de *C. aurantifolia* est plus élevé par le fait que le limonène agirait en synergie avec l' α -pinène et le β -pinène ce d'autant plus que les proportions de ces deux composés minoritaires sont relativement plus élevées chez *C. aurantifolia* que chez *C. sinensis* et *C. grandis*.

Tableau 3: Mortalité (%) des nymphes et des larves de stade 4 de *Culex pipiens* en fonction de la concentration des huiles essentielles des espèces végétales étudiées après 12 h d'exposition (IC= 95%).

	Huiles essentielles	Concentrations (ppm)			Témoin
		1000	700	500	
Taux de mortalité des larves de stade 4 de <i>Culex pipiens</i> (%)	<i>C. aurantifolia</i>	94 (92-96)	80 (68-92)	74 (68-80)	0(0-0)
	<i>C. sinensis</i>	94 (88-100)	63 (56-80)	24 (16-32)	0(0-0)
	<i>C. grandis</i>	64 (32-72)	54 (40-60)	29 (24-40)	0(0-0)
Taux de mortalité des nymphes de <i>Culex pipiens</i> (%)	<i>C. aurantifolia</i>	97 (92-100)	89 (80-92)	82 (72-88)	0(0-0)
	<i>C. sinensis</i>	97 (92-100)	87 (84-96)	69 (56-80)	0(0-0)
	<i>C. grandis</i>	81 (80-84)	54 (32-64)	34 (28-44)	0(0-0)

IC= Intervalle de Confiance

Tableau 4 : Concentrations létales 50 et 95 des huiles essentielles étudiées au bout de 12 h d'exposition des larves de stade 4 et des nymphes de *Culex pipiens*.

Huile essentielle	Larves de stade 4		Nymphes	
	CL ₅₀ (ppm)	CL ₉₅ (ppm)	CL ₅₀ (ppm)	CL ₉₅ (ppm)
<i>Citrus aurantifolia</i>	348	997	273	841
<i>Citrus sinensis</i>	603	1047	379	865
<i>Citrus grandis</i>	681	2643	564	1589

Tableau 5. Sensibilité des larves de stade 4 et des nymphes de *Culex pipiens* soumises aux différentes concentrations d'huiles essentielles de *Citrus aurantifolia* au bout de 12 h d'exposition (test H de Kruskal Wallis, P<0,05)

Concentration (ppm)	Stades de développement			
	Larves de stade 4	Nymphes	H	P
1000	23,5 ± 0,6	24,25 ± 0,95	3,50	0,17
700	20 ± 3,46	22 ± 1,4	3,5	0,32
500	18,5 ± 1,72	20,75 ± 1,9	7	0,13
H	13,5	13,37	--	--
P	0,009	0,02	--	--

(Moyenne ± Ecart type)

Tableau 6 : Sensibilité des larves de stade 4 et des nymphes de *Culex pipiens* soumises aux différentes concentrations d'huiles essentielles de *Citrus sinensis* au bout de 12h d'exposition (test H de Kruskal Wallis, P<0,05)

Concentrations (ppm)	Stades de développement			
	Larves de stade 4	Nymphes	H	P
1000	23,5 ± 1,3	24,25 ± 1	2,33	0,3
700	15,75 ± 2,98	21,75 ± 1,5	7,0	0,1
500	6 ± 1,6	17,25 ± 2,8	7,0	0,3
H	15,0	14,6	--	--
P	0,1	0,06	--	--

(Moyenne ± Ecart type)

Tableau 7: Sensibilité des larves de stade 4 et des nymphes de *Culex pipiens* soumises aux différentes concentrations d'huiles essentielles de *Citrus grandis* au bout de 12h d'exposition (test H de Kruskal Wallis, P<0,05)

Concentrations (ppm)	Stades de développement			
	Larves de stade 4	Nymphes	H	P
1000	16±3,4	20,25±0,5	7,0	0,13
700	13,5±2,38	13,5±3,7	3,5	0,4
500	7,25±1,89	8,5±1,9	5,2	0,2
H	14,62	15	--	--
P	0,06	0,059	--	--

(Moyenne ± Ecart type)

Par ailleurs, Le test H de Kruskal Wallis a montré que la mortalité des nymphes n'est significativement pas différente de celle des larves (tableaux 5, 6, 7). Ce résultat montre que les huiles essentielles étudiées sont efficaces sur les deux stades de développement de *Cx. pipiens*, même s'il est démontré que le stade nymphal ne s'alimente pas. Ce résultat suggère donc que les huiles essentielles de péricarpes des fruits de *C. aurantifolia*,

C. sinensis et *C. grandis* peuvent également agir par diffusion tégumentaire comme l'avaient relevé Seye et al. (2006) et Boyom et al. (2007).

5. Conclusion

Cette recherche a montré que l'huile essentielle de péricarpes des fruits de *C. aurantifolia* est dotée de remarquables propriétés insecticides vis-à-vis des larves et nymphes de *Cx. pipiens*. La prise en compte de cette huile comme larvicide ou nymphocide par les

décideurs des pays endémiques dans la mise en oeuvre de leur politique nationale de contrôle efficace des vecteurs de filarioses s'avère nécessaire.

6. Remerciements

Les auteurs remercient le Professeur Chantal MENUT pour avoir accepté d'analyser leurs essences volatiles.

Références

- Abbas S K, Ahmad F, Sagheer M, Mansoor-Ul-Hasan, Yasir M, Ahmad S and Muhammad W (2012). Insecticidal and Growth Inhibition Activities of *Citrus paradisi* and *Citrus reticulata* Essential Oils Against Lesser Grain Borer, *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrichidae). *World Journal of Zoology* **7**, 289-294.
- Akono N P, Jazet DPM, Tonga C, Kouotou S, Kekeunou S and Lehman LG (2015). Larvicidal activity of essential oils from pericarps of ripe fruits cultivated in Cameroon on pyrethroids sensitive and resistant strains of *An. gambiae* Giles, 1902. *Entomology and Zoology Studies* **3**(4), 334-339.
- Azzous M A, Reineccus G A and Mashonas M G (1976). Comparison between cold pressed and distilled lime oils through the application of gas chromatography and mass spectrometry. *Journal Food Science* **4**, 324-328.
- Baldet T (1995). Etude comparative de deux stratégies de lutte contre *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 par *Bacillus sphaericus* Neide, 1904 dans la ville de Maroua (Nord-Cameroun). Thèse de Doctorat, Université de Montpellier, France, 376 p.
- Bassole I H, Guelbeogo W M, Nebie R, Costantini C, Sagnon N, Kabore Z I and Traore S A (2003). Ovicidal and larvicidal activity against *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae* complex mosquitoes of essential oils extracted from three spontaneous plants of Burkina Faso. *Parassitologia* **45**, 23-26.
- Bhattacharya R and Mukherjee P (2008). Biological properties of "naked" metal nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews* **60**,1289-1306.
- Boussinesq M (1999). La filariose lymphatique au Cameroun : état des connaissances. *Bulletin de liaison doc O.C.E.A.C.* **32**, 7-12.
- Boyom F, Ngouana V, Amvam zollo P H, Menut C, Bessiere J M, Gut J and Rosenthal P J (2007). Composition and anti-plasmodial activities of essential oils from some Cameroonian medicinal plants. *Phytochemistry* **64**, 1269-1275.
- Choi H S and Sawamura M (2000). Composition of the essential oil of *Citrus tamurana* Hort. Ex Tanaka (Hyuganatus). *Journal of Agricultural Food Chemistry* **48**, 4868-4873.
- Desfontaine M, Tchikangwa I, Le Goff G, Robert V and Carnevale P (1991). Influence de l'alimentation des larves d'*Anopheles gambiae* (Diptera, Culicidae) sur le développement pré-imaginal en insectarium. *Bulletin de liaison O.C.E.A.C.* **98**, 12-14.
- Frontier S, Davoult D, Gentilhomme V and Langadeuc Y (2001). Statistique pour les sciences de la vie et de l'environnement : Cours et exercices corrigés. Dunod, Paris, 410p.
- Haro L and Faas W E (1985). Comparative study of essential oil of key persian lime. *Perfumer and flavoris* **10**, 67-72.
- Harry D and Chester J (1963). Pictorial key to United State Education and Welfare. Public health service. Center for Disease Control. Atlanta, Georgia, 177 p.
- Ibrahim M A, Pirjo K, Abbas A and Jarmo K H (2001). Insecticidal, repellent and microbial activity and phytotoxicity of essential oils: with special preference to limonen and its suitability for control of insect pests. *Agricultural and food science in Finland* **10**, 243-259.
- Jazet D P M (1999). Les huiles essentielles de *Citrus* du Cameroun : variabilité chimique et activités biologiques vis-à-vis de *Phaeoramularia angolensis*. Thèse de Doctorat 3^{ème} cycle, Université de Yaoundé I, Cameroun, 224 p.
- Jupp PG (1996). Mosquitoes of southern Africa. *Journal of Entomology Society of South Africa*, 156 p.
- Kassir J T, Mohsen Z H and Mehdi N S (1989). Toxic effect of limonene against *Culex quinquefasciatus* Say larvae and its interference with oviposition. *Anzeiger fur Schadlingskunde Pflanze-Nschutz Umweltschutz* **62**, 19-21.
- Kiran R S, Bhavani K, Devi S P, Rao R B R and Reddy J K (2006). Composition and larvicidal activity of leaves and stem essential oils of *Chloroxylon swietenia* DC. Against *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi*. *Bioresource Technology* **97**, 2481-2484.
- Lota M L, De Rocca S D, Tomi F, Jacquemond C and Casanova J (2002). Volatile components of peel and leaf oils of lemon and lime species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, 796-805.
- Lucia A, Audino G A, Seccacini E, Licastro S, Zerba E and Masuh H (2007). Larvicidal effect of *Eucalyptus grandis* essential oil and turpentine and their major components on *Aedes aegypti* larvae. *Journal of the America Mosquito Control Association* **3**, 299-303.
- Mansour S A, El-Sharkawy A Z and Ali A R (2004). Botanical biocides .12. mosquitocidal activity of Citrus peel oils with respect to their limonene content. *Egyptian Journal of Natural Toxins* **1**, 111-134.
- Michael E, Bundy D A and Grenfell B T (1996). Re-assessing the global prevalence and distribution of lymphatic filariasis. *Parasitology* **112**, 409-428.
- Mohsen Z H, Al-Chalabi B M, Kassir J T and Chalabi B M A L (1989). Factors influencing the larvicidal activity of limonene against *Culex quinquefasciatus*. *Journal of Applied Entomology* **108**, 107-110.

- O.M.S. (2013). *Filariose lymphatique*, 97 p.
- Ojimekwe P C and Alder C (1999). Potential of Zimtaldehyde, 4-allylanisol, linalool, terpinol and others phytochemicals for the control of the confused flour beetle (*Tribolium confusum* J.D.C.) (G.L. Tenebrionidea). *Journal of Pest Science* **72**, 81-86.
- Quoc L P T, My Vo A and Nguyet T T M (2011). Volatile constituents of essential oil from *Citrus sinensis* grown in Tien Giang Province, Vietnam. *Asian Journal of Food and Agro-Industry* **4**, 183-186.
- Senthilkumar A, Kannathasan K and Venkatesalu V (2008). Chemical constituents and larvicidal property of the essential oil of *Blumea mollis* (D. Don) Merr. Against *Culex quinquefasciatus*. *Parasitology. Research* **103**, 959-962.
- Seye F, Ndione R D and Ndiaye M (2006). Etude comparative de deux produits de neem (huile et poudre) sur les stades pré-imaginaux du moustique *Culex quinquefasciatus*. *Afrique Science* **2**, 212 – 225.
- Soumaya B, Fatma Z R, Ourghemmi I and Moufida S T (2012). Changes of peel essential oil composition of four tunisian citrus during fruit maturation. *The scientific word journal*, 10 p.
- Tchoumboungang F, Jazet D P M, Sameza M L, Nkouaya M E G, Tiako F G B, Amvam Zollo P H et Menut C (2009). Activité larvicide sur *Anopheles gambiae* Giles et composition chimique des huiles essentielles extraites de quatre plantes cultivées au Cameroun. *Biotechnology Agronomy Society and Environment* **13**, 77-84.
- Visaria RK, Griffin RJ ,Williams BW, Ebbini ES, Paciotti GF, Song CW and Bischof JC (2006). Enhancement of tumor thermal therapy using gold nanoparticle-assisted tumor necrosis factor-alpha delivery. *Molecular Cancer Therapeutics* **5**, 1014-1020.
- World Health Organization (W. H. O.) (1985). Bioassay method for the titration of *Bacillus sphaericus*: consultation on the development of *Bacillus sphaericus* as a microbial larvicide. World Health Organization **3**, 85-95.
- Yang Y C, Lee S G, Lee H K, Kim M K, Lee S H and Lee H S (2002). A piperidine amide extracted from *Piper longum* L. fruit shows activity against *Aedes aegypti* mosquito larvae. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, 3765-3767.