

UNIVERSITÉ DE YAOUNDÉ I
UNIVERSITY OF YAOUNDE I



FACULTE DES SCIENCES
FACULTY OF SCIENCE

DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES
DEPARTMENT OF ANIMAL BIOLOGY AND PHYSIOLOGY
LABORATOIRE DE ZOOLOGIE
LABORATORY OF ZOOLOGY

**Effets insecticide et adjuvant des huiles essentielles
de *Cannabis sativa* et de *Piper umbellatum* sur
Anopheles gambiae (Gilles, 1902) et *Culex*
quinquefasciatus (Say, 1900) (Diptera, Culicidae)**

THESE
présentée en vue de l'obtention du Diplôme de Doctorat /Ph.D
en Biologie des Organismes Animaux

Option : Zoologie

Par :

ABE Henri

Matricule : 96R696

D.E.A en Zoologie Appliquée et Approfondie



Soutenue publiquement le 21 juin 2024 devant le jury composé de :

Président : **FOMENA Abraham**, Professeur, Université de Yaoundé 1 ;

Rapporteurs : **TAMESSE Joseph Lebel**, Professeur, Université de Yaoundé 1 ;

Membres : **KEKEUNOU Sévilor**, Professeur, Université de Yaoundé 1;

TCHUINKAM Timoléon, Professeur, Université de Dschang

DJIETO-LORDON Champlain, Professeur, Université de Yaoundé 1 ;

Année 2024

UNIVERSITÉ DE YAOUNDE I Faculté des Sciences Division de la Programmation et du Suivi des Activités Académiques		THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I Faculty of Science Division of Programming and Follow-up of Academic Affairs
LISTE DES ENSEIGNANTS PERMANENTS		LIST OF PERMANENT TEACHING STAFF

ANNÉE ACADEMIQUE 2023/2024

(Par Département et par Grade)

DATE D'ACTUALISATION 04 Juin 2024

ADMINISTRATION

DOYEN : TCHOUANKEU Jean- Claude, *Professeur*

VICE-DOYEN / DPSAA: ATCHADE Alex de Théodore, *Professeur*

VICE-DOYEN / DSSE : NYEGUE Maximilienne Ascension, *Professeur*

VICE-DOYEN / DRC : NOUNDJEU Pierre, *Maître de Conférences*

Chef Division Administrative et Financière : NDOYE FOE Florentine Marie Chantal, *Maître de Conférences*

Chef Division des Affaires Académiques, de la Recherche et de la Sclarité DAARS : AJEAGAH Gideon AGHAINDUM, *Professeur*

1- DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE (BC) (43)

N°	NOMS ET PRÉNOMS	GRADE	OBSERVATIONS
1.	BIGOGA DAIGA Jude	Professeur	En poste
2.	FEKAM BOYOM Fabrice	Professeur	En poste
3.	KANSCI Germain	Professeur	En poste
4.	MBACHAM FON Wilfred	Professeur	En poste
5.	MOUNDIPA FEWOUL Paul	Professeur	<i>Chef de Département</i>
6.	NGUEFACK Julienne	Professeur	En poste
7.	NJAYOU Frédéric Nico	Professeur	En poste
8.	OBEN Julius ENYONG	Professeur	En poste

9.	ACHU Merci BIH	Maître de Conférences	En poste
10.	ATOCHO Barbara MMA	Maître de Conférences	En poste
11.	AZANTSA KINGUE GABIN BORIS	Maître de Conférences	En poste
12.	BELINGA née NDOYE FOE F. M. C.	Maître de Conférences	<i>Chef DAF / FS</i>
13.	DAKOLE DABOY Charles	Maître de Conférences	En poste
14.	DONGMO LEKAGNE Joseph Blaise	Maître de Conférences	En poste
15.	DJUIDJE NGOUNOUE Marceline	Maître de Conférences	En poste
16.	DJUIKWO NKONGA Ruth Viviane	Maître de Conférences	En poste
17.	EFFA ONOMO Pierre	Maître de Conférences	<i>VD/FS/Univ Ebwa</i>
18.	EWANE Cécile Annie	Maître de Conférences	En poste
19.	KOTUE TAPTUE Charles	Maître de Conférences	En poste
20.	LUNGA Paul KEILAH	Maître de Conférences	En poste
21.	MANANGA Marlyse Joséphine	Maître de Conférences	En poste
22.	MBONG ANGIE M. Mary Anne	Maître de Conférences	En poste

23. 112	MOFOR née TEUGWA Clotilde	Maître de Conférences	<i>Doyen FS / UDs</i>
24.	NANA Louise épouse WAKAM	Maître de Conférences	En poste
25.	NGONDI Judith Laure	Maître de Conférences	En poste
26.	Palmer MASUMBE NETONGO	Maître de Conférences	En poste
27.	PECHANGOU NSANGOU Sylvain	Maître de Conférences	En poste
28.	TCHANA KOUATCHOUA Angèle	Maître de Conférences	En poste

29.	AKINDEH MBUH NJI	Chargé de Cours	En poste
30.	BEBEE Fadimatou	Chargée de Cours	En poste
31.	BEBOY EDJENGUELE Sara N.	Chargé de Cours	En poste
32.	FONKOUA Martin	Chargé de Cours	En poste
33.	FOUPOUAPOUOGNIGNI Yacouba	Chargé de Cours	En poste
34.	KOUOH ELOMBO Ferdinand	Chargé de Cours	En poste
35.	MBOUCHE FANMOE Marceline J.	Chargé de Cours	En poste
36.	OWONA AYISSI Vincent Brice	Chargé de Cours	En poste
37.	WILFRED ANGIE ABIA	Chargé de Cours	En poste

38.	BAKWO BASSOGOG Christian Bernard	Assistant	En Poste
39.	ELLA Fils Armand	Assistant	En Poste
40.	EYENGA Eliane Flore	Assistant	En Poste
41.	MADIESSE KEMGNE Eugénie Aimée	Assistant	En Poste
42.	MANJIA NJIKAM Jacqueline	Assistant	En Poste
43.	WOGUIA Alice Louise	Assistant	En Poste

2- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES (BPA) (49)

1.	AJEAGAH Gideon AGHAINDUM	Professeur	<i>DAARS/FS</i>
2.	DIMO Théophile	Professeur	En Poste
3.	DJIETO LORDON Champlain	Professeur	En Poste
4.	DZEUFET DJOMENI Paul Désiré	Professeur	En Poste
5.	ESSOMBA née NTSAMA MBALA	Professeur	<i>CD et Vice Doyen/FMSB/UYI</i>
6.	KEKEUNOU Sévior	Professeur	<i>Chef de Département (a.i)</i>
7.	NJAMEN Dieudonné	Professeur	En poste
8.	NOLA Moïse	Professeur	En poste
9.	TAN Paul VERNYUY	Professeur	En poste
10.	TCHUEM TCHUENTE Louis Albert	Professeur	<i>Inspecteur de service / Coord.Progr./MINSANTE</i>
11.	ZEBAZE TOGOUET Serge Hubert	Professeur	En poste

12.	ALENE Désirée Chantal	Maître de Conférences	<i>Vice Doyen/ Uté Ebwa</i>
13.	ATSAMO Albert Donatien	Maître de Conférences	En poste
14.	BILANDA Danielle Claude	Maître de Conférences	En poste
15.	DJIOGUE Séfirin	Maître de Conférences	En poste
16.	GOUNOUE KAMKUMO Raceline épouse FOTSING	Maître de Conférences	En poste

17.	JATSA BOUKENG Hermine épouse MEGAPTCHE	Maître de Conférences	En Poste
18.	KANDEDA KAVAYE Antoine	Maître de Conférences	En poste
19.	LEKEUFACK FOLEFACK Guy B.	Maître de Conférences	En poste
20.	MAHOB Raymond Joseph	Maître de Conférences	En poste
21.	MBENOUN MASSE Paul Serge	Maître de Conférences	En poste
22.	MEGNEKOU Rosette	Maître de Conférences	En poste
23.	MOUNGANG Luciane Marlyse	Maître de Conférences	En poste
24.	NOAH EWOTI Olive Vivien	Maître de Conférences	En poste
25.	MONY Ruth épouse NTONE	Maître de Conférences	En Poste
26.	MVEYO NDANKEU Yves Patrick	Maître de Conférences	En poste
27.	NGUEGUIM TSOFAK Florence	Maître de Conférences	En poste
28.	NGUEMBOCK	Maître de Conférences	En poste
29.	TAMSA ARFAO Antoine	Maître de Conférences	En poste
30.	TOMBI Jeannette	Maître de Conférences	En poste

31.	AMBADA NDZENGUE GEORGIA ELNA	Chargé de Cours	En poste
32.	BASSOCK BAYIHA Etienne Didier	Chargé de Cours	En poste
33.	ETEME ENAMA Serge	Chargé de Cours	En poste
34.	FEUGANG YOUNSSI François	Chargé de Cours	En poste
35.	FOKAM Alvine Christelle Epse KENGNE	Chargé de Cours	En poste
36.	GONWOUO NONO Legrand	Chargé de Cours	En poste
37.	KOGA MANG DOBARA	Chargé de Cours	En poste
38.	LEME BANOCK Lucie	Chargé de Cours	En poste
39.	MAPON NSANGO Indou	Chargé de Cours	En poste
40.	METCHI DONFACK MIREILLE FLAURE EPSE GHOU MO	Chargé de Cours	En poste
41.	NGOUATEU KENFACK Omer Bébé	Chargé de Cours	En poste
42.	NJUA Clarisse YAFI	Chargée de Cours	<i>Chef Div. Uté Bamenda</i>
43.	NWANE Philippe Bienvenu	Chargé de Cours	En poste
44.	TADU Zephyrin	Chargé de Cours	En poste
45.	YEDE	Chargé de Cours	En poste
46.	YOUNOUSSA LAME	Chargé de Cours	En poste

47.	KODJOM WANCHE Jacguy Joyce	Assistante	En poste
48.	NDENGUE Jean De Matha	Assistant	En poste
49.	ZEMO GAMO Franklin	Assistant	En poste

3- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE VÉGÉTALES (BPV) (32)

1.	AMBANG Zachée	Professeur	<i>Chef de Département</i>
2.	DJOCGOUE Pierre François	Professeur	En poste
3.	MBOLO Marie	Professeur	En poste
4.	MOSSEBO Dominique Claude	Professeur	En poste
5.	NDONGO BEKOLO	Professeur	En poste
6.	ZAPFACK Louis	Professeur	En poste

7.	ANGONI Hyacinthe	Maître de Conférences	En poste
8.	BIYE Elvire Hortense	Maître de Conférences	En poste
9.	MAHBOU SOMO TOUKAM. Gabriel	Maître de Conférences	En poste

10.	MALA Armand William	Maître de Conférences	En poste
11.	MBARGA BINDZI Marie Alain	Maître de Conférences	DAAC /UDla
12.	NGALLE Hermine BILLE	Maître de Conférences	En poste
13.	NGONKEU MAGAPTCHE Eddy L.	Maître de Conférences	CT / MINRESI
14.	TONFACK Libert Brice	Maître de Conférences	En poste
15.	TSOATA Esaïe	Maître de Conférences	En poste
16.	ONANA JEAN MICHEL	Maître de Conférences	En poste

17.	DJEUANI Astride Carole	Chargé de Cours	En poste
18.	GONMADGE CHRISTELLE	Chargé de Cours	En poste
19.	MAFFO MAFFO Nicole Liliane	Chargé de Cours	En poste
20.	MANGA NDJAGA JUDE	Chargé de Cours	En poste
21.	NNANGA MEBENGA Ruth Laure	Chargé de Cours	En poste
22.	NOUKEU KOUAKAM Armelle	Chargé de Cours	En poste
23.	NSOM ZAMBO EPSE PIAL ANNIE CLAUDE	Chargé de Cours	En détachement/UNESCO MALI
24.	GODSWILL NTSOMBOH NTSEFONG	Chargé de Cours	En poste
25.	KABELONG BANAHO Louis-Paul-Roger	Chargé de Cours	En poste
26.	KONO Léon Dieudonné	Chargé de Cours	En poste
27.	LIBALAH Moses BAKONCK	Chargé de Cours	En poste
28.	LIKENG-LI-NGUE Benoit C	Chargé de Cours	En poste
29.	TAEDOUNG Evariste Hermann	Chargé de Cours	En poste
30.	TEMEGNE NONO Carine	Chargé de Cours	En poste
31.	DIDA LONTSI Sylvere Landry	Assistant	En poste
32.	METSEBING Blondo-Pascal	Assistant	En poste

4- DÉPARTEMENT DE CHIMIE INORGANIQUE (CI) (27)

1.	GHOGOMU Paul MINGO	Professeur	Ministre Chargé de Mission PR
2.	NANSEU NJIKI Charles Péguy	Professeur	En poste
3.	NDIFON Peter TEKE	Professeur	CT MINRESI
4.	NENWA Justin	Professeur	En poste
5.	NGOMO Horace MANGA	Professeur	Vice Chancellor/UB
6.	NJOMOU C. épse DJANGANG	Professeur	En poste
7.	NJOYA Dayirou	Professeur	En poste

8.	ACAYANKA Elie	Maître de Conférences	En poste
9.	EMADAK Alphonse	Maître de Conférences	En poste
10.	KAMGANG YOUNI Georges	Maître de Conférences	En poste
11.	KEMMEGNE MBOUGUEM Jean C.	Maître de Conférences	En poste
12.	KENNE DEDZO GUSTAVE	Maître de Conférences	En poste
13.	MBEY Jean Aime	Maître de Conférences	En poste
14.	NDI NSAMI Julius	Maître de Conférences	Chef de Département
15.	NEBAH Née NDOIRI Bridget NDOYE	Maître de Conférences	Sénatrice/SENAT
16.	NYAMEN Linda Dyorisse	Maître de Conférences	En poste
17.	PABOUDAM GBAMBIE AWAWOU	Maître de Conférences	En poste
18.	TCHAKOUTE KOUAMO Hervé	Maître de Conférences	En poste
19.	BELIBI BELIBI Placide Désiré	Maître de Conférences	Chef Service/ ENS Bertoua

20	CHEUMANI YONA Arnaud M.	Maître de Conférences	En poste
21	KOUOTOU DAOUDA	Maître de Conférences	En poste

22.	MAKON Thomas Beauregard	Chargé de Cours	En poste
23.	NCHIMI NONO KATIA	Chargée de Cours	En poste
24.	NJANKWA NJABONG N. Eric	Chargé de Cours	En poste
25.	PATOUOSSA ISSOFA	Chargé de Cours	En poste
26.	SIEWE Jean Mermoz	Chargé de Cours	En Poste
27.	BOYOM TATCHEMO Franck W.	Assistant	En Poste

6- DÉPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE (CO) (34)

1.	Alex de Théodore ATCHADE	Professeur	<i>Vice-Doyen / DPSAA</i>
2.	DONGO Etienne	Professeur	<i>Vice-Doyen/FSE/UYI</i>
3.	NGOUELA Silvère Augustin	Professeur	<i>Chef de Département UDS</i>
4.	PEGNYEMB Dieudonné Emmanuel	Professeur	<i>Recteur UBertoua/ Chef de Département</i>
5.	MBAZOA née DJAMA Céline	Professeur	En poste
6.	MKOUNGA Pierre	Professeur	En poste
7.	TCHOUANKEU Jean-Claude	Professeur	<i>Doyen /FS/ UYI</i>
8.	AMBASSA Pantaléon	Maître de Conférences	En poste
9.	EYONG Kenneth OBEN	Maître de Conférences	En poste
10	FOTSO WABO Ghislain	Maître de Conférences	En poste
11	KAMTO Eutrophe Le Doux	Maître de Conférences	En poste
12	KENMOGNE Marguerite	Maître de Conférences	En poste
13	KOUAM Jacques	Maître de Conférences	En poste
14	MVOT AKAK CARINE	Maître de Conférences	En poste
15	NGO MBING Joséphine	Maître de Conférences	<i>Chef de Cellule MINRESI</i>
16	NGONO BIKOBO Dominique Serge	Maître de Conférences	<i>C.E.A/ MINESUP</i>
17	NOTE LOUGBOT Olivier Placide	Maître de Conférences	<i>Dir ENS/Uté Bertoua</i>
18	NOUNGOUE TCHAMO Diderot	Maître de Conférences	En poste
19	TABOPDA KUATE Turibio	Maître de Conférences	En poste
20	TAGATSING FOTSING Maurice	Maître de Conférences	En poste
21	OUAHOUE WACHE Blandine M.	Maître de Conférences	En poste
22	ZONDEGOUMBA Ernestine	Maître de Conférences	En poste

23	MESSI Angélique Nicolas	Chargé de Cours	En poste
24	MUNVERA MFIFEN Aristide	Chargé de Cours	En poste
25	NGNINTEDO Dominique	Chargé de Cours	En poste
26	NGOMO Orléans	Chargée de Cours	En poste
27	NONO NONO Éric Carly	Chargé de Cours	En poste
28	OUETE NANTCHOUANG Judith Laure	Chargée de Cours	En poste
29	SIELINOUE TEDJON Valérie	Chargé de Cours	En poste
30	TCHAMGOUE Joseph	Chargé de Cours	En poste
31	TSAFFACK Maurice	Chargé de Cours	En poste
32	TSAMO TONTSA Armelle	Chargé de Cours	En poste

33	TSEMEUGNE Joseph	Chargé de Cours	En poste
----	------------------	-----------------	----------

34	NDOGO ETEME Olivier	Assistant	En poste
----	---------------------	-----------	----------

6- DEPARTEMENT DES ENERGIES RENOUVELABLES (ER) (1)

1.	BODO Bertrand	Professeur	<i>Chef de Département</i>
----	---------------	------------	----------------------------

7- DÉPARTEMENT D'INFORMATIQUE (IN) (22)

1.	ATSA ETOUNDI Roger	Professeur	<i>Chef de Division des SI/ MINESUP</i>
2.	FOUDA NDJODO Marcel Laurent	Professeur	<i>Inspecteur Général Académique/ MINESUP</i>

3.	NDOUNDAM René	Maître de Conférences	En poste
4.	TSOPZE Norbert	Maître de Conférences	En poste

5.	ABESSOLO ALO'O Gislain	Chargé de Cours	<i>Chef de Cellule MINFOPRA</i>
6.	AMINOU HALIDOU	Chargé de Cours	<i>Chef de Département</i>
7.	DJAM Xaviera YOUH - KIMBI	Chargé de Cours	En Poste
8.	DOMGA KOMGUEM Rodrigue	Chargé de Cours	En poste
9.	EBELE Serge Alain	Chargé de Cours	En poste
10.	HAMZA Adamou	Chargé de Cours	En poste
11.	JIOMEKONG AZANZI Fidel	Chargé de Cours	En poste
12.	KOUOKAM KOUOKAM E. A.	Chargé de Cours	En poste
13.	MELATAGIA YONTA Paulin	Chargé de Cours	En poste
14.	MESSI NGUELE Thomas	Chargé de Cours	En poste
15.	MONTHÉ DJIADEU Valéry M.	Chargé de Cours	En poste
16.	NZEKON NZEKO'O ARMEL JACQUES	Chargé de Cours	En poste
17.	OLLE OLLE Daniel Claude Georges Delort	Chargé de Cours	<i>Directeur Adjoint ENSET Ebolowa</i>
18.	TAPAMO Hyppolite	Chargé de Cours	En poste

19.	BAYEM Jacques Narcisse	Assistant	En poste
20.	EKODECK Stéphane Gaël Raymond	Assistant	En poste
21.	MAKEMBE. S. Oswald	Assistant	<i>Directeur CUTI</i>
22.	NKONDOCK. MI. BAHANACK.N.	Assistant	En poste

8- DÉPARTEMENT DE MATHÉMATIQUES (MA) (33)

1.	AYISSI Raoult Domingo	Professeur	<i>Chef de Département</i>
----	-----------------------	------------	----------------------------

2.	KIANPI Maurice	Maître de Conférences	En poste
3.	MBANG Joseph	Maître de Conférences	En poste
4.	MBEHOU Mohamed	Maître de Conférences	<i>Chef de Division/ENSPY</i>
5.	MBELE BIDIMA Martin Ledoux	Maître de Conférences	<i>Chef de Département de modélisation et applications industrielles/ENSPY</i>
6.	NOUNDJEU Pierre	Maître de Conférences	<i>VDRC/FS/UYI</i>
7.	TAKAM SOH Patrice	Maître de Conférences	En poste
8.	TCHAPNDA NJABO Sophonie B.	Maître de Conférences	<i>Directeur/AIMS Rwanda</i>
9.	TCHOUNDJA Edgar Landry	Maître de Conférences	En poste

10	AGHOUEKENG JIOFACK Jean Gérard	Chargé de Cours	<i>Chef Cellule MINEPAT</i>
11	BOGSO ANTOINE Marie	Chargé de Cours	En poste
12	BITYE MVONDO Esther Claudine	Chargé de Cours	En poste
13	CHENDJOU Gilbert	Chargé de Cours	En poste
14	DJIADEU NGAHA Michel	Chargé de Cours	En poste
15	DOUANLA YONTA Herman	Chargé de Cours	En poste
16	KIKI Maxime Armand	Chargé de Cours	En poste
17	LOUMNGAM KAMGA Victor	Chargé de Cours	En poste
18	MBAKOP Guy Merlin	Chargé de Cours	En poste
19	MBATAKOU Salomon Joseph	Chargé de Cours	En poste
20	MENGUE MENGUE David Joël	Chargé de Cours	<i>Chef Dpt /ENS Université d'Ebolowa</i>
21	MBIAKOP Hilaire George	Chargé de Cours	En poste
22	NGUEFACK Bernard	Chargé de Cours	En poste
23	NIMPA PEFOUKEU Romain	Chargée de Cours	En poste
24	OGADOA AMASSAYOGA	Chargée de Cours	En poste
25	POLA DOUNDOU Emmanuel	Chargé de Cours	<i>En stage</i>
26	TENKEU JEUFACK Yannick Léa	Chargé de Cours	En poste
27	TCHEUTIA Daniel Duviol	Chargé de Cours	En poste
28	TETSADJIO TCHILEPECK M. Eric.	Chargé de Cours	En poste

29	FOKAM Jean Marcel	Assistant	En poste
30	GUIDZAVAI KOUCHERE Albert	Assistant	En poste
31	MANN MANYOMBE Martin Luther	Assistant	En poste
32	MEFENZA NOUNTU Thiery	Assistant	En poste
33	NYOUMBI DLEUNA Christelle	Assistant	En poste

9- DÉPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE (MIB) (24)

1.	ESSIA NGANG Jean Justin	Professeur	<i>Chef de Département</i>
2.	NYEGUE Maximilienne Ascension	Professeur	<i>VICE-DOYEN / DSSE</i>

3.	SADO KAMDEM Sylvain Leroy	Professeur	En poste
----	---------------------------	------------	----------

4.	ASSAM ASSAM Jean Paul	Maître de Conférences	En poste
5.	BOUGNOM Blaise Pascal	Maître de Conférences	En poste
6.	BOYOMO ONANA	Maître de Conférences	En poste
7.	KOUITCHEU MABEKE Epse KOUAM Laure Brigitte	Maître de Conférences	En poste
8.	RIWOM Sara Honorine	Maître de Conférences	En poste
9.	NJIKI BIKOÏ Jacky	Maître de Conférences	En poste
10.	TCHIKOUA Roger	Maître de Conférences	<i>Chef de Service de la Scolarité</i>

11.	ESSONO Damien Marie	Chargé de Cours	En poste
12.	LAMYE Glory MOH	Chargé de Cours	En poste
13.	MEYIN A EBONG Solange	Chargé de Cours	En poste
14.	MONI NDEDI Esther Del Florence	Chargé de Cours	En poste
15.	NKOUDOU ZE Nardis	Chargé de Cours	En poste
16.	NKOUÉ TONG Abraham	Chargé de Cours	En poste
17.	TAMATCHO KWEYANG Blandine Pulchérie	Chargé de Cours	En poste
18.	SAKE NGANE Carole Stéphanie	Chargé de Cours	En poste
19.	TOBOLBAÏ Richard	Chargé de Cours	En poste

20.	EZO'O MENGO Fabrice Télésfor	Assistant	En poste
21.	EHETH Jean Samuel	Assistant	En poste
22.	MAYI Marie Paule Audrey	Assistant	En poste
23.	NGOUE NAM Romial Joël	Assistant	En poste
24.	NJAPNDOUNKE Bilkissou	Assistant	En poste

10. DEPARTEMENT DE PHYSIQUE(PHY) (42)

1.	BEN- BOLIE Germain Hubert	Professeur	En poste
2.	BIYA MOTTO Frédéric	Professeur	<i>DG/HYDRO Mekin</i>
3.	DJUIDJE KENMOE épouse ALOYEM	Professeur	En poste

4.	EKOBENA FOU DA Henri Paul	Professeur	<i>Vice-Recteur. Uté Ngaoundéré</i>
5.	ESSIMBI ZOBO Bernard	Professeur	En poste
6.	EYEBE FOU DA Jean sire	Professeur	En poste
7.	HONA Jacques	Professeur	En poste
8.	NANA ENGO Serge Guy	Professeur	En poste
9.	NANA NBENDJO Blaise	Professeur	En poste
10.	NDJAKA Jean Marie Bienvenu	Professeur	<i>Chef de Département</i>
11.	NJANDJOCK NOUCK Philippe	Professeur	En poste
12.	NOUAYOU Robert	Professeur	En poste
13.	SAIDOU	Professeur	<i>Chef de centre/IRGM/MINRESI</i>
14.	SIMO Elie	Professeur	En poste
15.	TABOD Charles TABOD	Professeur	<i>Doyen FSUniv/Bda</i>
16.	TCHAWOUA Clément	Professeur	En poste
17.	WOAFO Paul	Professeur	En poste
18.	ZEKENG Serge Sylvain	Professeur	En poste

19.	ENYEGUE A NYAM épse BELINGA	Maître de Conférences	<i>Chef de Division de la formation continue et à distance</i>
20.	FEWO Serge Ibraïd	Maître de Conférences	En poste
21.	FOUEJIO David	Maître de Conférences	<i>Chef Cell. MINADER</i>
22.	MBINACK Clément	Maître de Conférences	En poste
23.	MBONO SAMBA Yves Christian U.	Maître de Conférences	En poste
24.	MELI'I Joelle Larissa	Maître de Conférences	En poste
25.	MVOGO ALAIN	Maître de Conférences	En poste
26.	NDOP Joseph	Maître de Conférences	En poste
27.	SIEWE SIEWE Martin	Maître de Conférences	En poste
28.	VONDOU Derbetini Appolinaire	Maître de Conférences	En poste
29.	WAKATA née BEYA Annie Sylvie	Maître de Conférences	<i>Directeur/ENS/Uyi</i>
30.	WOULACHE Rosalie Laure	Maître de Conférences	<i>En stage depuis février 2023</i>
31.	ABDOURAHIMI	Chargé de Cours	En poste
32.	AYISSI EYEBE Guy François Valérie	Chargé de Cours	En poste
33.	CHAMANI Roméo	Chargé de Cours	En poste
34.	DJOTANG TCHOTCHOU Lucie Angennes	Chargée de Cours	En poste
35.	EDONGUE HERVAIS	Chargé de Cours	En poste
36.	KAMENI NEMATCHOUA Modeste	Chargé de Cours	En poste
37.	LAMARA Maurice	Chargé de Cours	En poste
38.	NGA ONGODO Dieudonné	Chargé de Cours	En poste
39.	OTTOU ABE Martin Thierry	Chargé de Cours	Directeur Unité de production

			des réactifs/IMPM
40.	TEYOU NGOUPO Ariel	Chargé de Cours	En poste
41.	WANDJI NYAMSI William	Chargé de Cours	En poste
42.	SOUFFO TAGUEU Merimé	Assistant	En poste

11- DÉPARTEMENT DE SCIENCES DE LA TERRE (ST) (43)

1.	BITOM Dieudonné-Lucien	Professeur	<i>Doyen / FASA /Uds</i>
2.	EKOMANE Emile	Professeur	<i>Chef Div./Uté Ebolowa</i>
3.	GANNO Sylvestre	Professeur	En poste
4.	NDAM NGOUPAYOU Jules-Remy	Professeur	En poste
5.	NDJIGUI Paul-Désiré	Professeur	<i>Chef de Département</i>
6.	NGOS III Simon	Professeur	En poste
7.	NKOUMBOU Charles	Professeur	En poste
8.	NZENTI Jean-Paul	Professeur	En poste
9.	ONANA Vincent Laurent	Professeur	<i>Chef de Département/Uté. Eb.</i>
10.	YENE ATANGANA Joseph Q.	Professeur	<i>Chef Div. /MINTP</i>

11.	BISSO Dieudonné	Maître de Conférences	En poste
12.	Elisé SABABA	Maitre de Conférences	En poste
13.	EYONG John TAKEM	Maître de Conférences	En poste
14.	FUH Calistus Gentry	Maître de Conférences	<i>Sec. D'Etat/MINMIDT(ai)</i>
15.	GHOGOMU Richard TANWI	Maître de Conférences	<i>Chef de Div. /Uté Bertoua</i>
16.	MBIDA YEM	Maitre de Conférences	En poste
17.	MBESSE Cécile Olive	Maitre de Conférences	En poste
18.	METANG Victor	Maître de Conférences	En poste
19.	MOUNDI Amidou	Maître de Conférences	<i>CT/MINIMDT</i>
20.	NGO BIDJECK Louise Marie	Maître de Conférences	En poste
21.	NGUEUTCHOUA Gabriel	Maître de Conférences	<i>CEA/MINRESI</i>
22.	NJILAH Isaac KONFOR	Maître de Conférences	En poste
23.	NYECK Bruno	Maître de Conférences	En poste
24.	TCHAKOUNTE Jacqueline épouse NUMBEM	Maître de Conférences	<i>Chef. Cell /MINRESI</i>
25.	TCHOUANKOUE Jean-Pierre	Maître de Conférences	En poste
26.	TEMGA Jean Pierre	Maître de Conférences	En poste
27.	ZO'O ZAME Philémon	Maître de Conférences	<i>DG/ART</i>

28.	ANABA ONANA Achille Basile	Chargé de Cours	En poste
29.	BEKOA Etienne	Chargé de Cours	En poste
30.	ESSONO Jean	Chargé de Cours	En poste
31.	MAMDEM TAMTO Lionelle Estelle, épouse BITOM	Chargée de Cours	En poste

32.	MINYEM Dieudonné	Chargé de Cours	<i>Chef Serv./Uté Maroua</i>
33.	NGO BELNOUN Rose Noël	Chargée de Cours	En poste
34.	NGO'O ZE ARNAUD	Chargé de Cours	En poste
35.	NOMO NEGUE Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
36.	NTSAMA ATANGANA Jacqueline	Chargée de Cours	En poste
37.	TCHAPTCHET TCHATTO De P.	Chargé de Cours	En poste
38.	TEHNA Nathanaël	Chargé de Cours	En poste
39.	FEUMBA Roger	Chargé de Cours	En poste
40.	MBANGA NYOBE Jules	Chargé de Cours	En poste

41.	KOAH NA LEBOGO Serge P.	Assistant	En poste
42.	NGO'O ZE ARNAUD	Assistant	En poste
43.	TENE DJOUKAM Joëlle Flore, épouse KOUANKAP NONO	Assistante	En poste

Répartition chiffrée des Enseignants de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I

NOMBRE D'ENSEIGNANTS					
DÉPARTEMENT	Professeurs	Maîtres de Conférences	Chargés de Cours	Assistants	Total
BCH	8 (01)	20 (12)	9 (04)	6 (05)	43 (22)
BPA	11 (01)	19 (09)	16 (05)	3 (02)	49 (17)
BPV	6 (01)	10 (02)	14 (08)	2 (00)	32 (11)
CI	7 (01)	14 (04)	5 (01)	1 (00)	27 (06)
CO	7 (01)	15 (05)	11 (05)	1 (00)	34 (11)
ER	1 (00)		/	/	1 (0)
IN	2 (00)	2 (00)	14 (01)	4 (00)	22 (01)
MAT	1 (00)	8 (00)	19 (02)	5 (01)	33 (03)
MIB	3 (01)	7 (03)	9 (05)	5 (02)	24 (11)
PHY	18 (01)	12 (04)	11 (01)	1 (00)	42 (06)
ST	10 (00)	17 (03)	13 (03)	3 (01)	45 (09)
Total	74 (07)	124 (42)	121 (35)	31 (11)	350 (95)

Soit un total de **350 (95)** dont :

- Professeurs **74 (07)**
- Maîtres de Conférences **124 (42)**
- Chargés de Cours **121 (35)**
- Assistants **31 (11)**

() = Nombre de Femmes **95**

DEDICACE

Je dédie ce travail à ma mère et à mon père.

REMERCIEMENTS

Nous voulons remercier :

Pr. TAMESSE Joseph Lebel, Chef du laboratoire de Zoologie de l'Ecole Normale Supérieure de l'Université de Yaoundé I qui a dirigé des mains de maître ces travaux ;

Pr. FOKO DADJI Gisèle Aurélie, enseignante à l'Ecole Normale Supérieure de l'Université de Yaoundé I pour son encadrement technique tout au long de ces travaux ;

Dr. CHRISTOPHE-NKONDJIO. Antonio, Chercheur à l'OCEAC (Laboratoire de Recherche sur le Paludisme) pour nous avoir guidé dans le choix de ce sujet et pour l'identification moléculaire des moustiques du genre *Anopheles* ;

Pr. BILONG BILONG Charles Félix, Chef de Département de Biologie et Physiologie Animales de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I, qui nous a encouragé pour une inscription en thèse et pour ses multiples conseils ;

Pr. SONKE Bonaventure, Chef de Département des Sciences Biologiques de l'Ecole Normale Supérieure de l'Université de Yaoundé I pour l'espace de travail qu'il nous a accordé ;

Pr. NJINTANG YANOU Nicolas, enseignant à l'ENSAI de l'Université de Ngaoundéré pour nous avoir invité à une Conférence internationale sur les extraits de plantes ;

Pr. NYEGUE Maximilienne, enseignante à la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I au Département de Microbiologie pour l'assistance lors de l'extraction des huiles essentielles de nos plantes ;

Pr. DICKO Amadou de l'Université de Metz en France, pour l'analyse chimique des huiles essentielles des feuilles de *Piper umbellatum* ;

Pr. ONANA Jean Michel, Botaniste à l'Herbier National au Cameroun pour l'identification des plantes : *Cannabis sativa* et *Piper umbellatum* ;

Dr. AWONO AMBENE Herman Parfait, Chercheur à l'OCEAC et chef du Laboratoire de Recherche sur le Paludisme pour son appui matériel et ses conseils ;

Mr. CASABIANCA Hervé, Ingénieur à l'Institut des Sciences Analytiques de France, pour l'analyse chimique de l'huile essentielle des feuilles de *Cannabis sativa* ;

tous les enseignants du Département de Biologie et Physiologie Animales de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I et tous les enseignants du Département des Sciences Biologiques de l'Ecole Normale Supérieure de l'Université de Yaoundé I pour leurs enseignements et leurs conseils ;

tous les membres de ma famille et tous ceux qui sans être cités ici ont contribué matériellement, financièrement pour l'aboutissement de ces travaux ;

tous mes camarades de promotion pour les échanges d'informations et de matériels.

SOMMAIRE

DEDICACE.....	xiii
SOMMAIRE	xv
LISTE DES ABREVIATIONS :	xxiv
RESUME.....	xxv
ABSTRACT	xxvii
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I:GENERALITES SUR LES CULICIDAE, LA LUTTE ANTIVECTORIELLE, LES INSECTICIDES, <i>Cnnabis sativa</i> ET <i>Piper umbellatum</i>	5
I.1. Position Systématique des Culicidae étudiés : <i>Anopheles gambiae</i> s.l. et <i>Culex quinquefasciatus</i>	6
I.2. Morphologie et Bioécologie des Culicidae	8
I.2.1- Morphologie des Culicidae.....	9
I.2.2. Bioécologie des Culicidae.....	17
I.3. Présentation des différentes espèces d'anophèles en Afrique et au Cameroun.....	20
I.3.1. Présentation des différentes espèces d'anophèles en Afrique.....	20
I.3.2. Distribution des espèces anophéliennes en fonction des faciès géographiques au Cameroun	22
I.3.3. Présentation des différentes espèces de <i>Culex</i> sp.	24
I.4. Rôle épidémiologique des Culicidae	25
I.4.1. Anophelinae	25
I.4.2. Culicinae.....	26
I.5. Généralités sur le paludisme	26
I.5.1. Définition	26
I.5.2. Agents pathogènes du paludisme	27
I.5.3. Cycle biologique du <i>plasmodium</i>	28
I.6. Généralités sur les filarioses lymphatiques.....	30
I.6.1. Epidémiologie des filarioses.....	31
I.6.2. Cycle des filaires	32
I.6.3. Prévalence selon la géographie.....	33
I.7. Stratégie de lutte contre les Culicidae	34
I.7.1. Méthodes de lutte contre les larves	34
I.7.2- Lutte contre les vecteurs adultes.....	36

I.7.3- Evaluation	37
I.7.4- Mesures de protection individuelle.....	37
1.8. Notion d'insecticide	38
I.8.1.Définition	38
I.8.2. Classification des Insecticides.....	39
I.9. Mécanismes de résistance des vecteurs aux insecticides.....	41
I.9.1- Résistance comportementale	42
I.9.2- Résistance cuticulaire	42
I.9.3-Résistance par modification de cibles.....	43
I.9.4- Résistance métabolique.....	43
I.10. Notions d'adjuvant.....	43
I.11. Généralités sur <i>Cannabis sativa</i> et <i>Piper umbellatum</i>	45
I.11.1. Position Systématique de <i>Cannabis sativa</i>	45
I.11.2. Position Systématique de <i>Piper umbellatum</i>	46
I.11.3. Bioécologie de <i>Cannabis sativa</i>	47
I.11.4. Applications diverses de <i>Cannabis sativa</i>	48
I.11.5. Bioécologie de <i>Piper umbellatum</i>	49
I.11.6. Applications diverses de <i>Piper umbellatum</i>	50
I.12. Généralités sur les huiles essentielles	50
I.12.1. Aperçu historique	50
I.12.2. Concept et définition	51
I.12.3. Variabilité des huiles essentielles	53
I.12.4. Présence et fonctions des huiles essentielles dans le règne végétal.....	53
I.12.5- Contrôle et analyses	54
I.12.6. Composition chimique	55
I.12.7. Utilisation des huiles essentielles	57
I.12.8. Techniques d'extraction des huiles essentielles	59
CHAPITRE II : CADRE D'ETUDE ET METHODOLOGIE	67
II.1. CADRE D'ETUDE	68
II.2. METHODOLOGIE.....	68
II.2.1. Matériel.....	68
II.2.2. Récolte des larves de Culicidae.....	71
II.2.3. Elevage des larves de Culicidae et constitution de la souche au laboratoire .	73
II.2.4. Gorgement des femelles d'anophèles	74
II.2.5. Entretien de la souche d' <i>Anopheles gambiae</i> s.s. au laboratoire	75
II.2.6. Identification des plantes, extraction et caractérisation des huiles	

essentielles des feuilles de <i>Cannabis sativa</i> et de <i>Piper umbellatum</i>	76
II.2.7. Caractérisation des huiles essentielles de <i>Cannabis sativa</i> et de <i>Piper umbellatum</i>	78
II.2.8. Préparation des solutions mères et des concentrations tests.....	79
II.2.9. Tests biologiques de toxicité.....	83
II.2.10. Identification des moustiques adultes	87
II.2.11. Analyse des données.....	91
CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION	92
III.1. RESULTATS.....	93
III.1.1. Rendements d'extraction des huiles essentielles des feuilles de <i>Cannabis sativa</i> et de <i>Piper umbellatum</i>	93
III.1.2. Résultats de l'analyse chimique des huiles essentielles des feuilles de <i>Cannabis sativa</i> et de <i>Piper umbellatum</i>	93
. III.1.3. Composition spécifique des moustiques sauvages récoltés à l'étang de Melen et aux abords de la rivière Ewoé	98
III.1.4. Activités insecticide et adjuvant des huiles essentielles des feuilles de <i>Cannabis sativa</i> et de <i>Piper umbellatum</i> sur <i>Anopheles gambiae</i> s.l. et <i>Culex quinquefasciatus</i>	100
III.1.5. Effet adjuvant des huiles essentielles des feuille de <i>Cannabis sativa</i> et de <i>Piper umbellatum</i> pour l'efficacité du témephos sur les larves d' <i>Anopheles gambiae</i> s.l. et de <i>Culex quinquefasciatus</i>	106
III.1.6. Activités Knock Down et adulticide des huiles essentielles des feuilles de <i>Cannabis sativa</i> et de <i>Piper umballatum</i> sur <i>Anopheles gambiae</i> s.l. et <i>Culex quinquefasciatus</i>	113
III.1.7. Effet adjuvant des huiles essentielles des feuilles de <i>Cannabis sativa</i> et de <i>Piper umbellatum</i> pour l'efficacité de la permethrine sur les adultes femelles d' <i>Anopheles gambiae</i> s.l. et de <i>Culex quinquefasciatus</i>	122
III.2. DISCUSSION	131
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	143
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	147

LISTE DES FIGURES :

Figure 1 : Cycle biologique des moustiques	9
Figure 2 : Œufs de Culicidae.....	10
Figure 3. Larves de Culicidae ; A : <i>Anopheles</i> sp. B: <i>Culex</i> sp.....	11
Figure 4: Morphologie d'une nymphe de Culicidae. A : nymphe de <i>Culex</i> sp. ; B : nymphe d' <i>Anopheles</i> sp.....	12
Figure 5.A et B : Morphologie d'une aile de Culicidae	13
Figure 6: Morphologie générale schématique d'un imago de Culicidae	15
Figure 7. Différences entre les Anophelinés et les Culicinés au niveau de la tête des mâles et des femelles.....	16
Figure 8: Différentes positions de repos des adultes de <i>Culex</i> sp. et d' <i>Anopheles</i> sp. par rapport au support	17
Figure 9. Distribution spatiale des espèces vectrices de paludisme en Afrique	21
Figure 10 : Distribution géographique des espèces d'anophèles recensées au Cameroun entre 2000 et 2018	23
Figure 11 : Distribution du complexe <i>Culex pipiens</i> et de ses espèces jumelles	25
Figure 12 : Cycle biologique de <i>Plasmodium</i> spp.	30
Figure 13 : Cycle de <i>Wuchereria bancrofti</i>	33
Figure 14 : Sites de récolte des stades aquatiques des Culicidae ; A : Rivière Ewoé encaissée ;B et C : lieux de récolte aux abords de la rivière Ewoé	69
Figure 15 : Parties aériennes de A- <i>Cannabis sativa</i> et B- <i>Piper umbellatum</i>	70
Figure 16 : Matériel animal ; A : œufs d' <i>Anopheles gambiae</i> s.s. ; B: larves d' <i>Anopheles gambiae</i> s.s. ; C : nymphes d' <i>Anopheles gambiae</i> s.s. ;D : lapin mâle	71
Figure 17 : Différentes étapes de récoltes des stades aquatiques de Culicidae par la méthode Dipping. A et B : pression du récipient dans l'eau ; C et D : remontée vers la rive ;E Pipettage des stades aquatiques de Culicidae ; F : introduction de Culicidae récoltés dans le bidon	73
Figure 18 : Tri des nymphes de Culicidae ramenées du terrain. A : bassine contenant des larves et des nymphes ; B et C : transfert des nymphes dans des gobelets en plastique ;	

D : gobelet en plastique contenant des nymphes ; E : cage pour émergence des imagos de Culicidae..... 74

Figure 19 : Entretien de la souche d'*Anopheles gambiae* s.s. au laboratoire ; A: cage contenant des adultes de moustique ; B : dispositif de gorgement des femelles ; C : œufs sur un pondoir ; D : étagères avec des bassines contenant des larves et des nymphes; E : nymphe de Culicidae. 76

Figure 20. Quelques étapes de l'extraction de l'huile essentielle par hydrodistillation ; A : plante pour extraction ; B : appareillage de type Clavenger ; C : pesage de l'huile 77

Figure 21. Différentes étapes de préparation des solutions mères et des concentrations tests. A : étalonnage de la balance ; B : pipetage de l'huile essentielle ; C : pesage de l'huile essentielle ; D : balance montrant 200 mg d'huile essentielle ; E : mélange de l'éthanol à 95% avec l'huile essentielle ; F : agitation vigoureuse du mélange 80

Figure 22. Etapes du test larvicide. A : mesure du volume d'eau dans une éprouvette ; B : mesure d'eau dans des gobelets en plastique ; C, D : prélèvement et introduction de 1ml d'une solution tests dans un gobelet ; E, F : sélection des larves L3 et L4 ; G introduction des larves dans les gobelets traités ; H : gobelets protégés par des morceaux de tulles moustiquaires non imprégnés..... 84

Figure 23. Quelques étapes du test adulticide. A : séchage des morceaux de moustiquaires imprégnés à différentes concentrations ; B : montage des morceaux de moustiquaire imprégnés avec des cônes sur support incliné à 45° ; C : collecte des femelles adultes ; D, E : comptage et introduction des femelle adultes dans le gobelet en carton ; F,G : retrait et introduction des moustiques femelles dans les cônes ; H : observation 86

Figure 24. Profil chromatographique de l'analyse chimique de l'huile essentielle des feuilles de *Cannabis sativa* par GC-SM et GC-FID 94

Figure 25. Profil chromatographique de l'analyse de l'huile essentielle des feuilles de *Piper umbellatum* par GC-SM 96

Figure 26 : Photographie d'observation sous UV d'un gel d'agarose après migration

des amplicons d'ADN pour l'identification des espèces du complexe	
<i>Anopheles gambiae</i> s.l.	98
Figure 27. Moustiques récoltés dans les abords de la rivière Ewoé et à l'étang de Melen ; A : <i>Anopheles gambiae</i> s.l. B : <i>Culex quinquefasciatus</i>	99
Tableau XII : Activité larvicide de l'huile essentielle des feuilles de <i>Cannabis sativa</i> sur <i>Anopheles gambiae</i> s.l. et <i>Culex quinquefasciatus</i>	100
Figure 28. Activité larvicide de l'huile essentielle des feuilles de <i>Cannabis sativa</i> sur <i>Anopheles gambiae</i> s.l. et <i>Cx. quinquefasciatus</i> après 24 heures	101
Figure 29: Activité larvicide de l'huile essentielle des feuilles de <i>Cannabis sativa</i> sur <i>Anopheles gambiae</i> s.l. et <i>Culex quinquefasciatus</i> après 48 heures.....	102
Figure 30. Activité larvicide de l'huile essentielle des feuilles de <i>Piper umbellatum</i> sur <i>Anopheles gambiae</i> s.l. et <i>Culex quinquefasciatus</i> après 24 heures.....	104
Figure 31. Activité larvicide de l'huile essentielle des feuilles de <i>Piper umbellatum</i> sur <i>Anopheles gambiae</i> s.l. et <i>Culex quinquifasciatus</i> après 48 heures	105
Figure 32. Effet adjuvant de l'huile essentielle des feuilles de <i>Cannabis sativa</i> pour l'efficacité du témephos sur les larves d' <i>Anopheles gambiae</i> s.l. et de <i>Culex quinquifasciatus</i> après 24 heures	108
Figure 33: Effet adjuvant de l'huile essentielle des feuilles de <i>Cannabis sativa</i> pour l'activité larvicide du témephos sur <i>Anopheles gambiae</i> s.l. et <i>Culex quinquefasciatus</i> après 48 heures.....	109
Figure 34: Effet adjuvant de l'huile essentielle des feuilles de <i>Piper umbellatum</i> pour l'efficacité du témephos sur les larves d' <i>Anopheles gambiae</i> s.l. et de <i>Culex quinquefasciatus</i> après 24 heures.....	111
Figure 35. Effet adjuvant de l'huile essentielle des feuilles de <i>Piper umbellatum</i> pour l'efficacité du témephos sur les larves d' <i>Anopheles gambiae</i> s.l. et de <i>Culex quinquifasciatus</i> après 48 heures.....	112
Figure 36 : Effet knock down de l'huile essentielle des feuilles de <i>Cannabis sativa</i> sur <i>Anophles gambiae</i> s.l. et <i>Culex quinquefasciatus</i>	115
Figure 37 : Activité adulticide de l'huile essentielle des feuilles de <i>Cannabis sativa</i>	

sur <i>Anopheles gambiae</i> s.l.et <i>Culex quinquefasciatus</i>	116
Figure 38. Activité knock down de l’huile essentielle des feuilles de <i>Piper umbellatum</i> sur <i>Anopheles gambiae</i> s.l. et <i>Culex quinquefasciatus</i>	119
Figure 39. Activité adulticide de l’huile essentielle des feuilles de <i>Piper umbellatum</i> sur <i>Anopheles gambiae</i> s.l. et <i>Culex quinquefasciatus</i>	121
Figure 40: Effet adjuvant de l’huile essentielle des feuilles de <i>Cannabis sativa</i> pour l’activité knock down de la permethrine sur <i>Anopheles gambiae</i> s.l. et <i>Culex</i> <i>quinquefasciatus</i>	124
Figure 41. Effet adjuvant de l’huile essentielle des feuilles de <i>Cannabis sativa</i> pour l’efficacité de la permethrine sur les adultes d’ <i>Anopheles gambiae</i> s.l. et de <i>Culex</i> <i>quinquefasciatus</i>	125
Figure 42. Effet adjuvant de l’huile essentielle des feuilles de <i>Piper umbellatum</i> pour l’activité knock down de la permethrine sur les adultes d’ <i>Anopheles gambiae</i> s.l. et de <i>Culex quinquefasciatus</i>	128
Figure 43. Effet adjuvant de l’huile essentielle des feuilles de <i>Piper umbellatum</i> pour l’activité adulticide de la permethrine sur <i>Anopheles gambiae</i> s.l. et <i>Culex quinquefasciatus</i>	129

LISTE DES TABLEAUX :

Tableau I. Distribution géographique des filarioses lymphatiques.....	32
Tableau II. Dilutions en série des huiles essentielles de <i>Cannabis sativa</i> et de <i>Piper umbellatum</i> à partir des solutions mère à 1% suivant le protocole de l'O.M.S, (2005).....	80
Tableau III. Mélanges des huiles essentielles des feuilles de <i>Cannabis sativa</i> et de <i>Piper umbellatum</i> avec le témephos pour les tests larvicides.....	82
Tableau IV. Mélanges des huiles essentielles des feuilles de <i>Cannabis sativa</i> et de <i>Piper umbellatum</i> avec la perméthrine pour les tests adulticides.....	82
Tableau V. Amorce des séquences d'ADN d' <i>Anopheles gambiae</i> s.l.....	89
Tableau VI. Milieu réactionnel pour la PCR SINE200 pour l'identification d' <i>Anopheles gambiae</i> s.l.....	89
Tableau VII. Profil thermique de la PCR-SINE200 pour l'identification d' <i>Anopheles gambiae</i> s.l.....	90
Tableau VIII. Rendement d'extraction des huiles essentielles de <i>Cannabis sativa</i> et de <i>Piper umbellatum</i> (récolées au village salla et au Campus de l'Université de Yaoundé I).....	93
Tableau IX. Composition chimique de l'huile essentielle des feuilles de <i>Cannabis sativa</i>	94
Tableau X. Composition chimique de l'huile essentielle des feuilles de <i>Piper umbellatum</i>	97
Tableau XI : Composition spécifique des moustiques adultes récoltés à l'étang de Melen et aux abords de la rivière Ewoé (les moustiques ont été récoltés durant toute l'année pour l'étang de Melen et pour les abords de la rivière Ewoé, d'avril à juin et de septembre à mi-novembre 2016).....	99
Tableau XII : Activité larvicide de l'huile essentielle des feuilles de <i>Cannabis sativa</i> sur <i>Anopheles gambiae</i> s.l. et <i>Culex quinquefasciatus</i>	100
Tableau XIII: Activité larvicide de l'huile essentielle des feuilles de <i>Piper umbellatum</i> sur <i>Anopheles gambiae</i> s.l. et <i>Culex quinquefasciatus</i>	103
Tableau XIV : Effet adjuvant de l'huile essentielle des feuilles de <i>Cannabis sativa</i> pour l'activité larvicide du témephos sur <i>Anopheles gambiae</i> s.l. et <i>Culex quinquefasciatus</i>	107
Tableau XV: Effet adjuvant de l'huile essentielle des feuilles de <i>Piper umbellatum</i> pour l'activité larvicide du témephos sur <i>Anopheles gambiae</i> s.l. et <i>Culex quinquefasciatus</i>	110
Tableau XVI : Activité Knock down et adulticide de l'huile essentielle des feuilles de	

<i>Cannabis sativa</i> sur <i>Anopheles gambiae</i> s.l. et <i>Culex quinquefasciatus</i>	114
Tableau XVII: Activité Knock down et adulticide de l'huile essentielle des feuilles de	
<i>Piper umbellatum</i> sur <i>Anopheles gambiae</i> s.l et <i>Culex quinquefasciatus</i>	118
Tableau XVIII : Effet adjuvant de l'huile essentielle des feuilles <i>Cannabis sativa</i>	
pour l'efficacité de la permethrine sur <i>Anopheles gambiae</i> s.l et <i>Culex quinquefasciatus</i> ..	123
Tableau XIX: Effet adjuvant de l'huile essentielle des feuilles de <i>Piper umbellatum</i>	
pour l'activité adulticide de la permethrine sur <i>Anopheles gambiae</i> s.l.	
et <i>Culex quinquefasciatus</i>	127

LISTE DES ABREVIATIONS :

ADN: Acide DésoxyRibonucléique

AFNOR: Association Française de Normalisation

AMM : Administration Massive de Médicaments

APG III: Angiosperm Phylogeny Group III

CDC: United States Centre for Disease Control

CTAB: Cytidyl Trimethyl Ammonium Bromide

CL₅₀ : Concentration létale pour 50% de mortalité

CL₉₅ : Concentration létale pour 95% de mortalité

EDTA : Ethylène Diamine Tétra Acétique

GPS: Global Positioning System

IRAC : Insecticide Resistance Action Comitee

IRAD : Institut de Recherche Agricole pour le Développement

IRMS : Spectrométrie de Masse par Rapport élément Isotope-analyseur

ISO: International Organization for Standardization

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

OCEAC: Organisation de Coordination pour la Lutte contre les Endémies en Afrique Centrale

PCR : Polymerase Chain Reactions (Réactions de Polymérisation en Chaîne)

PNLP : Programme National de Lutte contre le Paludisme ;

RTI: Research Triangle Institute

SINE: Short Interspersed Element

s.l. : sensu lato (sens large)

s.s. : sensu stricto (sens strict)

TKD₅₀ : Temps nécessaire pour assommer 50% d'individus exposés

TKD₉₅ : Temps nécessaire pour assommer 95% d'individus exposés

RESUME

La prévention des maladies à transmission vectorielle et principalement le paludisme repose essentiellement sur l'utilisation des insecticides de synthèse. Cependant, du fait du développement et de l'expansion rapide de la résistance des vecteurs aux insecticides, les travaux récents envisagent l'utilisation des insecticides à base des extraits de plantes, comme une alternative dans la lutte contre les vecteurs. Ces extraits ont l'avantage d'avoir plusieurs principes actifs dans leur composition, sont moins nocifs pour les organismes non cibles et par ailleurs biodégradables. La présente étude a consisté en l'évaluation des activités insecticide et adjuvant des huiles essentielles des feuilles de *Cannabis sativa* et de *Piper umbellatum* sur deux vecteurs majeurs des maladies au Cameroun : *Anopheles gambiae* s.l. et *Culex quinquefasciatus*, dans les conditions de laboratoire. Les huiles essentielles des feuilles de *Cannabis sativa* et de *Piper umbellatum* ont été extraites par hydrodistillation à l'aide d'un appareillage de type Clavenger et analysées par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. Les tests biologiques de susceptibilité ont été réalisés selon les procédures édictées par l'OMS (2005, 2013) et la CDC (2013) sur les larves de troisième stade et les adultes femelles d'*Anopheles gambiae* s.l. et de *Culex quinquefasciatus* âgées de deux à cinq jours et n'ayant pas pris de repas sanguin. Ces essais se sont déroulés sous une température comprise entre 25⁰C et 28⁰C, une humidité relative moyenne de 78% et une photopériode de 12L : 12D. Les rendements d'extraction des huiles essentielles de *Cannabis sativa* et de *Piper umbellatum* ont été très faibles (0,044% et 0,012%) respectivement pour *Cannabis sativa* et *Piper umbellatum*. L'analyse chimique de ces huiles essentielles a révélé 81 composés pour *Cannabis sativa* et 24 composés pour *Piper umbellatum*. Ces constituants sont en majorité des terpènes et d'autres composés aromatiques. La caractérisation moléculaire par la PCR des moustiques du complexe *Anopheles gambiae* récoltés aux abords de la rivière Ewoé a donné 4,33% d'*Anopheles gambiae* s.s. et 95,77% d'*Anopheles coluzzii* ; tandis que l'identification morphologique des moustiques récoltés à l'étang de Melen a donné : 2% d'*Anopheles gambiae* s.l., 7% de *Culex perfuscus* et 91% de *Culex quinquefasciatus*. Pour l'activité larvicide après 24 heures d'exposition, les CL₅₀ ont été de : 0,501% ; 1,168% ; 0,03% pour *Cannabis sativa* et 0,51% ; 0,61% ; 0,09% pour *Piper umbellatum*, tandis que les CL₉₅ ont été de : 0,95% ; 2,21% ; 0,17% pour *Cannabis sativa* et 0,91% ; 1,09 % ; 0,23% pour *Piper umbellatum*, respectivement pour les souches de laboratoire d'*Anopheles gambiae* s.s., sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. et pour *Culex quinquefasciatus*. Après une exposition de 48 heures, les CL₅₀ ont été de : 0,201% ; 0,217% ; 0,005% pour *Cannabis sativa* et 0,43% ; 0,58% ; 0,05% pour *Piper umbellatum*, tandis que les CL₉₅ ont été de : 0,381% ; 0,412 ; 0,110 pour *Cannabis sativa* et 0,79% ; 1,05% ; 0,160% pour *Piper umbellatum*, respectivement pour les souches de laboratoire d'*Anopheles gambiae*

s.s, sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. et pour *Culex quinquefasciatus*. Concernant l'effet adjuvant des huiles essentielles des feuilles de *Cannabis sativa* et de *Piper umbellatum* pour l'efficacité du témephos sur les larves traitées, après une exposition de 24 heures, les CL₅₀ ont été de : 0,14% et 0,002% pour *Cannabis sativa* ; 0,30% et 0,0011% pour *Piper umbellatum*, tandis que les CL₉₅ ont été de: 0,35% et 0,026% pour *Cannabis sativa* ; 0,64% et 0,024% pour *Piper umbellatum*, respectivement pour la souche sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. et pour *Culex quinquefasciatus*. Après 48 heures d'exposition les CL₅₀ ont été de: 0,011% et 0,0013% pour *Cannabis sativa*, 0,023% et 0,001% pour *Piper umbellatum*, tandis que les CL₉₅ ont été de : 0,17% et 0,013% pour *Cannabis sativa* ; 0,38% et 0,015% pour *Piper umbellatum*, respectivement pour la souche sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. et *Culex quinquefasciatus*. S'agissant des essais adulecticides, les TKD₅₀ ont été de : 23±0,7min ; 28±1,55min et 6±0,24min pour *Cannabis sativa* et 5±0,4min ; 9±0,2min et 19±0,57min pour *Piper umbellatum* ; tandis que les TKD₉₅ ont été de : 45±0,91min ; 55±0,95min ; 47±0,90min pour *Cannabis sativa* et 40±0,32min ; 47±0,47min et 51±0,4min pour *Piper umbellatum*, respectivement pour les souches de laboratoire d'*Anopheles gambiae* s.s, sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. et pour *Culex quinquefasciatus*. Pour l'effet adjuvant par rapport à l'efficacité de la permethrine, les TKD₅₀ ont été de : 16±0,75min et 8±0,15min pour *Cannabis sativa* ; 27±0,4min et 14±0,8min pour *Piper umbellatum*, tandis que les TKD₉₅ ont été de: 53±0,95min et 53±0,6min pour *Cannabis sativa*, 53±0,6min et 52±0,14min pour *Piper umbellatum*, respectivement pour la souche sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. et pour *Culex quinquefasciatus*. Les CL₅₀ pour les adultes femelles ont été de: 0,107% ; 0,15% et 0,17% pour *Cannabis sativa* et 0,40% ; 0,43% et 0,24% pour *Piper umbellatum*, tandis que les CL₉₅ ont été de: 0,339% ; 0,369% et 0,42% pour *Cannabis sativa* L et 0,73% ; 0,76% et 0,52% pour *Piper umbellatum*, respectivement pour les souches de laboratoire d'*Anopheles gambiae* s.s, sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. et pour *Culex quinquefasciatus*. Pour l'effet adjuvant des huiles essentielles, les CL₅₀ et CL₉₅ ont été de: 0,027% ; 0,01% et 0,118% ; 0,15% pour *Cannabis sativa* ; 0,024% ; 0,011% et 0,18% ; 0,17% pour *Piper umbellatum*, respectivement pour la souche sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. et pour *Culex quinquefasciatus*. Les huiles essentielles des feuilles de *Cannabis sativa* et de *Piper umbellatum* ont été efficaces aussi bien pour l'activité insecticide qu'adjuvant sur *Anopheles gambiae* s.l et *Culex quinquefasciatus*.

Mots Clés : *Cannabis*, *Piper*, huile essentielle, insecticide, adjuvant, *Anopheles*, *Culex*.

ABSTRACT

The control of Arthropods borne diseases and mainly malaria rely on the use of synthetic insecticides. However, due to the rapid development and expansion of vector resistance to the synthetic insecticides, several authors have suggested the use of insecticides based on plant extracts as alternative. These offer the advantage of having several active ingredients in their composition, which are less harmful for non-target organisms and are biodegradable. Thus, our study consisted in the evaluation of the insecticidal and adjuvant activities of *Cannabis sativa* and *Piper umbellatum* leaves essential oils on two major vectors in Cameroon: *Anopheles gambiae* s.l. and *Culex quiquefasciatus*, under laboratory conditions. *Cannabis sativa* and *Piper umbellatum* leaves essential oils were extracted by hydrodistillation using a Clavenger-type apparatus and analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry. Biological susceptibility tests were performed according to the WHO (2005; 2013) and CDC (2013) procedures with third instar larvae and 2-5 days old non blood fed female adult of *Anopheles gambiae* s.l. and *Culex quinquefasciatus*. These tests were conducted at temperature of 25⁰C-28⁰C, relative humidity of 78% and a photoperiod of 12L: 12D. The extraction of *Cannabis sativa* and *Piper umbellatum* leaves essential oils yielded very low (0.044% and 0.012%) respectively for *Cannabis sativa* and *Piper umbellatum*. Chemical analysis of these essential oils revealed 81 compounds for *Cannabis sativa* and 24 for *Piper umbellatum*. These constituents are mainly terpenes and other aromatic compounds. Molecular characterization by PCR of mosquitoes of the *Anopheles gambiae* complex collected near Ewoé River revealed 4.33% of *Anopheles gambiae* s.s. and 95.77% of *Anopheles coluzzii*; while the morphological identification of those collected at melen pound revealed 2% of *Anopheles gambiae* s.l., 7% of *Culex perfuscus* and 91% of *Culex quinquefasciatus*. For larvicidal activity, after 24 hours exposure period, the LC₅₀ are: 0.501%; 1.168%; 0.03% for *Cannabis sativa* and 0.51%, 0.61%; 0.09% for *Piper umbellatum*, while the LC₉₅ are: 0.95%; 2.21%; 0.17% for *Cannabis sativa* and 0.91%; 1.09%; 0.23% for *Piper umbellatum*, respectively for laboratory strain of *Anopheles gambiae* s.s., wild strain of *Anopheles gambiae* s.l. and *Culex quinquefasciatus*. For a 48 hours exposure period, the LC₅₀ are: 0.201%; 0.217%; 0.005% for *Cannabis sativa* L and 0.43%; 0.58%; 0.05% for *Piper umbellatum*, while the LC₉₅ are: 0.381%; 0.412; 0.110 for *Cannabis sativa* and 0.79%; 1.05%, 0.160% for *Piper umbellatum*, respectively for laboratory strain of *Anopheles gambiae* s.s., wild strain of *Anopheles gambiae* s.l. and for *Culex quiquefasciatus*. Concerning the adjuvant properties of *Cannabis sativa* and *Piper umbellatum* leaves essential oils for the efficiency of temephos on the third instar larvae, after 24 hours exposure, the LC₅₀ are: 0.14% and 0.002% for *Cannabis sativa*; 0.30% and 0.0011% for *Piper umbellatum*, while the LC₉₅ are: 0.35% and 0.026% for *Cannabis sativa*; 0.64% and 0.024% for *Piper umbellatum*,

respectively for wild strain of *Anopheles gambiae* s.l. and *Culex quinquefasciatus*. After 48 hours exposure, the LC_{50} are: 0.011% and 0.0013% for *Cannabis sativa*; 0.023% and 0.001% for *Piper umbellatum*, while the LC_{95} are: 0.17% and 0.013% for *Cannabis sativa*; 0.38% and 0.015% for *Piper umbellatum*, respectively for wild strain of *Anopheles gambiae* s.l. and *Culex quinquefasciatus*. For adulticidal effect, the KDT_{50} are: 23 ± 0.7 min; 28 ± 1.55 min and 6 ± 0.24 min for *Cannabis sativa* and 5 ± 0.4 min; 9 ± 0.2 min and 19 ± 0.57 min for *Piper umbellatum*, while the KDT_{95} are: 45 ± 0.91 min; 55 ± 0.95 min; 47 ± 0.90 min for *Cannabis sativa* and 40 ± 0.32 min; 47 ± 0.47 min and 51 ± 0.4 min for *Piper umbellatum*, respectively for laboratory strain of *Anopheles gambiae* s.s., wild strains of *Anopheles gambiae* s.l. and *Culex quinquefasciatus*. Concerning the adjuvant effect for the efficacy of permethrin, the KDT_{50} are: 16 ± 0.75 min and 8 ± 0.15 min for *Cannabis sativa*; 27 ± 0.4 min and 14 ± 0.8 min for *Piper umbellatum*, while the KDT_{95} are: 53 ± 0.95 min and 53 ± 0.6 min for *Cannabis sativa*; 53 ± 0.6 min and 52 ± 0.14 min for *Piper umbellatum*, respectively for the wild strain of *Anopheles gambiae* s.l. and *Culex quinquefasciatus*. The LC_{50} are: 0.107%; 0.15% and 0.17% for *Cannabis sativa* and 0.40%; 0.43% and 0.24% for *Piper umbellatum*, while the LC_{95} are: 0.339%; 0.369% and 0.42% for *Cannabis sativa* and 0.73%; 0.76% and 0.52% for *Piper umbellatum*, respectively for the laboratory strain of *Anopheles gambiae* s.s., wild strain of *Anopheles gambiae* s.l. and for *Culex quinquefasciatus*. For the adjuvant effect of essential oils on adult mosquitoes, the LC_{50} and LC_{95} are: 0.027%; 0.01% and 0.18%; 0.15% for *Cannabis sativa*, 0.024%; 0.011% and 0.18%; 0.17% for *Piper umbellatum*, respectively for the wild strain of *Anopheles gambiae* s.l. and for *Culex quinquefasciatus*. *Cannabis sativa* and *Piper umbellatum* leaves essential oils have been shown to be effective as well as for insecticidal activity and for adjuvant property on *Anopheles gambiae* s.l. and *Culex quinquefasciatus*.

Key words: *Cannabis*, *Piper*, essential oil, insecticide, adjuvant, *Anopheles*, *Culex*.

INTRODUCTION

Les moustiques sont des arthropodes d'importance majeure pour la santé de l'Homme et des animaux. En effet, outre la nuisance, les Culicidae transmettent de nombreuses maladies: paludisme, filarioses (filariose lymphatique à *Wuchereria bancrofti*, éléphantiasis, hydrocèle, chilurie...) et viroses (dengue, encéphalite japonaise, chikungunya, west Nile, Rift valley fever, sindbis, wesselsbron, Zika) (Peter *et al.*, 1996). La pullulation de ces vecteurs est favorisée par des aménagements hydro-agricoles et l'urbanisation qui modifient l'environnement et favorisent l'expansion des maladies à transmission vectorielles (Janko *et al.*, 2018, Oladepo *et al.*, 2010).

Dans les régions tropicales du globe et en Afrique sub-saharienne en particulier, le paludisme demeure la principale cause de morbidité et de mortalité. Les enfants de moins de cinq ans et les femmes enceintes constituent les cibles de choix (OMS, 2016 ; OMS, 2023 ;PNLP, 2021). La prévention des maladies à transmission vectorielle repose essentiellement sur l'utilisation des insecticides de synthèse (Zaim *et al.*, 2002). Cette lutte préventive contre le paludisme et les autres maladies à transmission vectorielle est rendue difficile par plusieurs facteurs parmi lesquels : le manque de techniciens en santé publique, l'extension des souches de *Plasmodium falciparum* résistantes à la chloroquine et aux autres molécules (Carnevale, 1991 ; Nannan *et al.*, 2007), le cycle de développement complexe du *Plasmodium* qui rendait impossible la mise sur pied d'un vaccin contre le paludisme (Bejon *et al.*, 2014), des financements insuffisants pour les recherches sur le paludisme et ses vecteurs (Hemingway *et al.*, 2014), l'existence des vecteurs exophiles (Saavedra *et al.*, 2019) , le changement de comportement des vecteurs après une couverture étendue d'insecticide à longue durée d'action (Agossa *et al.*,2015), le développement et l'expansion de la résistance des vecteurs aux insecticides usuels (Ndo *et al.*, 2018 ; Gnankiné *et al.*, 2013 ; Menze *et al.*, 2016 ; Ranson *et al.*, 2011) et la pauvreté des populations concernées. Les stratégies de lutte préventive préconisent l'utilisation des moustiquaires imprégnées d'insecticides à longue durée d'action, les pulvérisations intra et extra domiciliaires et le traitement des malades avec des nouvelles thérapies. Malheureusement, l'utilisation des moustiquaires imprégnées et les pulvérisations intra domiciliaires sont loin d'éliminer la nuisance et la transmission des maladies vectorielles. En effet, tout le monde n'a pas accès à ces services (OMS, 2015) et une partie de la population est hostile à l'utilisation des moustiquaires à cause de la chaleur générée en saison sèche (Ingabire *et al.*, 2015). La résistance des vecteurs est engendrée par plusieurs facteurs : l'utilisation des mêmes insecticides aussi bien en agriculture qu'en santé publique, l'urbanisation, les industries et autres activités anthropiques qui modifient l'environnement (Čabanová *et al.*, 2018 ; Pimnon *et al.*, 2018), l'exposition des larves de

moustiques à certains polluants et à des faibles doses d'insecticides usuels pendant plusieurs générations (David *et al.*, 2009 ; Diniz *et al.*, 2015), l'utilisation des insecticides et des fertilisants en agriculture (Müller *et al.*, 2008 ; Nkya *et al.*, 2014 ; Bossu *et al.*, 2013 ; Chouaïbou *et al.*, 2016 ; Agossa *et al.*, 2015) , l'application des insecticides non appropriés. Tous ces facteurs qui modifient l'environnement exercent une forte pression sur les vecteurs, entraînant plusieurs mutations qui favorisent le développement des mécanismes de résistance (Cvijovi *et al.*, 2015). Ainsi, du fait de cette résistance des vecteurs contre la plupart des insecticides usuels de synthèse, les efforts de lutte contre les vecteurs demeurent non satisfaisants. Plusieurs études ont confirmé le fait que les insecticides recommandés pour l'imprégnation des moustiquaires (Strode *et al.*, 2014) rencontrent une grande résistance des vecteurs. Ainsi, une étude préalable devrait être menée afin de déterminer l'insecticide le plus efficace dans une région donnée. Cette résistance qui s'est accrue ces dernières années s'est répandue dans presque toute l'Afrique subsaharienne en général (Ting et Nannan, 2013 ; Toé *et al.*, 2015 ; Bonizzoni *et al.*, 2015 ; Sangba *et al.*, 2016) et au Cameroun en particulier (Etang *et al.*, 2016 ; Müller *et al.*, 2008, Antonio *et al.*, 2012).

Malgré la résistance des vecteurs aux insecticides de synthèse, l'OMS (2006) et certains auteurs (Fontenille, 2008 ; Fournet *et al.*, 2018) recommandent la lutte anti vectorielle comme le moyen le plus efficace pour prévenir la transmission du paludisme et les autres maladies à transmission vectorielle. Considérant la perte d'efficacité des insecticides de synthèse et leurs effets néfastes sur des organismes non ciblés (OMS, 2013), la recherche de nouveaux insecticides biodégradables et moins nocifs pour l'environnement est une nécessité urgente (Regnault *et al.*, 2012 ; Gnankiné *et al.*, 2017). L'utilisation des extraits bruts et des huiles essentielles de plantes comme insecticides ou comme adjuvant pour les insecticides recommandés en perte d'efficacité constitue une alternative pour vaincre la résistance des vecteurs (Regnault *et al.*, 2012 ; Nkya *et al.*, 2012 ; Deletre *et al.*, 2015 ; Samuel *et al.*, 2016) tout en préservant l'environnement (Bolzonella *et al.*, 2019). Dans cette lancée, plusieurs travaux effectués dans de nombreux pays tropicaux, en Afrique subsaharienne (Bossu *et al.*, 2013) et au Cameroun en particulier (Foko *et al.*, 2018 ; Tapopda *et al.*, 2008 ; Tchoumboungang *et al.*, 2009 ; Akono *et al.*, 2012 ; Matasyoh *et al.*, 2011 ; Remia *et al.*, 2017), ont mis en évidence l'efficacité des extraits bruts et des huiles essentielles de plantes sur les vecteurs des genres *Anopheles*, *Culex* et *Aedes*. Ainsi, notre travail s'inscrit dans le cadre de la poursuite des recherches dans cette nouvelle approche de la lutte antivectorielle à travers l'efficacité des extraits bruts et des huiles essentielles sur les vecteurs du paludisme et d'autres maladies transmises par les Culicidae.

Cette étude a pour objectif principal la caractérisation chimique et l'évaluation des effets insecticide et adjuvant des huiles essentielles de deux plantes locales, *Cannabis sativa* et *Piper umbellatum* sur les moustiques vecteurs majeurs de maladies au Cameroun, *Anopheles gambiae* s.l. et *Culex quinquefasciatus*, en vue d'identifier et proposer de nouvelles molécules candidates au remplacement ou au renforcement des insecticides usuels en santé publique, contre lesquelles ces vecteurs ont développé plusieurs types de résistances. Pour atteindre cet objectif principal, on a élaboré les objectifs spécifiques suivants :

- déterminer les rendements d'extraction des huiles essentielles ;
- déterminer la composition chimique des huiles essentielles des feuilles de *Cannabis sativa* et de *Piper umbellatum* ;
- déterminer la diversité des moustiques récoltés dans les gîtes naturels ;
- évaluer l'activité insecticide et adjuvant de l'huile essentielle des feuilles de *Cannabis sativa* sur *Anopheles gambiae* s.l. et *Culex quinquefasciatus* ;
- évaluer l'activité insecticide et adjuvant de l'huile essentielle des feuilles de *Piper umbellatum* sur *Anopheles gambiae* s.l. et *Culex quinquefasciatus*.

Ce travail est subdivisé en quatre chapitres :

- le Chapitre I, qui traite des généralités sur les Culicidae, la stratégie de lutte anti-vectorielle, les notions d'insecticide et d'adjuvant, *Cannabis sativa* et *Piper umbellatum* et les huiles essentielles ;
- le Chapitre II, parle de matériel et méthodes ;
- le Chapitre III, traite des résultats et discussion ;
- conclusion et perspectives.

**CHAPITRE I : GENERALITES SUR LES CULICIDAE, LA LUTTE
ANTIVECTORIELLE, LES INSECTICIDES, *Cnnabis sativa* ET *Piper umbellatum***

I.1. Position Systématique des Culicidae étudiés : *Anopheles gambiae* s.l. et *Culex quinquefasciatus*

La systématique des Culicidae présentée dans cette étude est tirée de Gillott (2005)

Embranchement ou Phylum des Uniramia :

Arthropodes ayant des appendices constitués d'une série de segments non ramifiés ;

- corps métamérisé avec des métamères groupés en tagmes ;
- corps recouvert d'une cuticule tégumentaire ;
- présence d'appendices articulés.

Sous-phylum des Hexapoda :

- arthropodes caractérisés par la présence de trois paires de pattes
- tête portant une paire d'antenne et de mandibules.

Classe des Insecta :

- corps divisé en 03 tagmes : tête, thorax, abdomen ;
- présence de pièces buccales externes et d'au moins une paire d'yeux composés

Sous-classe des Ptérygotes :

présence d'ailes au moins à un stade de leur développement post-embryonnaire.

Infraclasse Néoptères

insectes ptérygotes dont les ailes peuvent se replier en arrière, soit à plat, soit en forme de toit

Division des Oligonéoptères ;:

champ jugal avec une seule nervure longitudinale simple.

Ordre des Diptères :

- présence d'une paire d'ailes, les ailes postérieures étant transformées en haltères ou balanciers ;
- larves apodes à tête généralement peu ou non différenciée ;
- pièces buccales de type piqueur– suceur.

Sous – Ordre des Nématocères (Latreille, 1825) :

- antennes longues et multi-articulées ;
- pronotum séparé du mésonotum par une seule suture transverse ;
- palpes grêles présentant 3 ; 4 ou 5 articles.

Famille des Culicidae :

- corps recouvert d'écailles filiformes ;
- bords postérieurs des ailes frangés d'écailles ;
- appareil buccal avec une trompe allongée droite et recourbée, toujours dirigée vers l'avant.

Sous-famille des Anophelinae :

- trompe dressée en avant, beaucoup plus longue que le reste de la tête ;
- palpes maxillaires aussi longs que la trompe, chez le mâle et la femelle ;
- scutellum régulièrement recourbé au bord postérieur ;
- oeufs munis de flotteurs latéraux.

Genre *Anopheles* :

- taches formées par les écailles claires et sombres sur la costa ;
- présence ou non de touffes latérales d'écailles sur l'abdomen.

Espèce *Anopheles gambiae* s.l. (Giles, 1902):

- palpes : trois (parfois quatre) bandes pâles, l'apicale plus développée que les autres ;
- costa : cinq taches pâles dont deux basales ;
- base de la première nervure : pâle ;
- fémurs et tibia antérieurs : largement avec des taches pâles ;
- tarses antérieurs : largement annelés de pâle aux articulations ;
- tarses postérieurs : étroitement (mais pas toujours) annelés de pâle aux articulations ;
- au repos, les adultes se positionnent obliquement au support.

Sous-famille des Culicinae :

- présence d'un scutellum trilobé ;
- les femelles ont des palpes courts, les mâles ont des palpes plus longs que la trompe ;
- au repos les adultes se positionnent parallèlement au support.

Genre *Culex* :

- adultes n'ayant pas de poils spiraculaires et post-spiraculaires ;
- extrémité de l'abdomen des femelles émoussée et le premier segment flagellaire des antennes est plus court que les autres segments.

Espèce *Culex quinquefasciatus* :

- trompe : tache pâle ventralement sur le plan médian ;

- fémurs : dépourvus de taches pâles ;
- tibias : tibia antérieurs et moyens dépourvus de taches pâles ;
- tarsomères 2-3 de toutes les pattes : avec une bande pâle à l'apex.

I.2. Morphologie et Bioécologie des Culicidae

Les Culicidae regroupent l'ensemble des insectes connus sous le nom de moustiques. Comme tous les Diptères, ce sont des Insectes holométaboles, c'est-à-dire que leur développement présente des métamorphoses complètes et passent, au cours de leur vie, par quatre stades successifs : œuf, larve, nymphe, et adulte ou imago (Grassé, 1961). Les trois premiers stades sont aquatiques alors que les adultes mènent une vie aérienne. Les mâles se nourrissent exclusivement du nectar des fleurs, donc ils ne piquent pas. Les femelles au contraire ont besoin de protéines pour assurer le développement de leurs ovaires ; ces protéines sont fournies par le repas sanguin qu'elles prélèvent sur les vertébrés. C'est à cette occasion que la transmission des germes pathogènes à l'hôte a lieu. Le cycle biologique des Culicidae est présenté sur la figure 1.

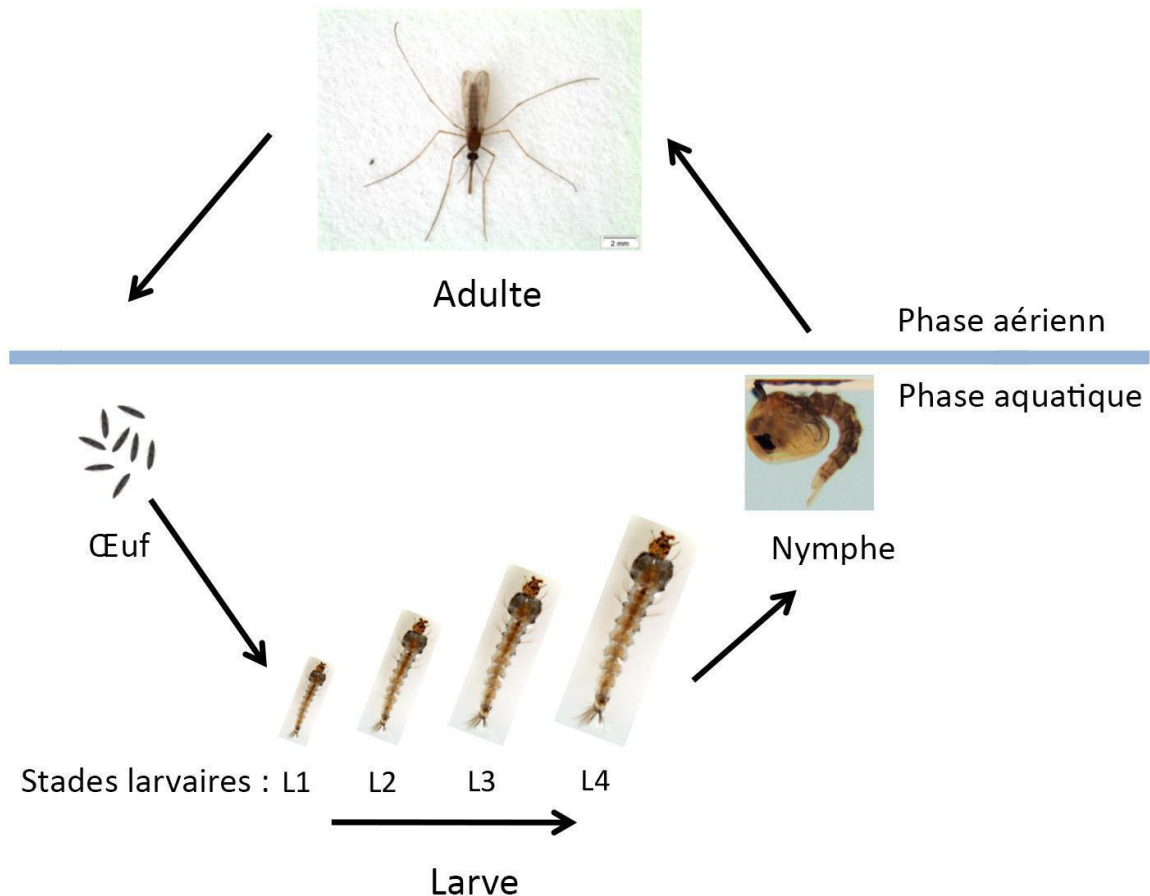


Figure 1 : Cycle biologique des moustiques (Williams et Pinto, 2012)

I.2.1- Morphologie des Culicidae

- **Morphologie des œufs de Culicidae**

Les œufs de Culicidae (figure 2), de forme élliptique, ont une coque dure, lisse et portent ou non des expansions latérales ou apicales servant de flotteurs. A maturité, ils contiennent de l'intérieur vers l'extérieur : l'embryon, la membrane vitelline, l'endochorion épais et l'exochorion plus ou moins pigmenté (Hinton, 1967).

Les œufs dans le genre *Anopheles* sont ovoïdes et pourvus latéralement de flotteurs qui leur permettent de conserver une position horizontale. Ceux du genre *Culex* sont collés les uns aux autres et forment des nacelles.

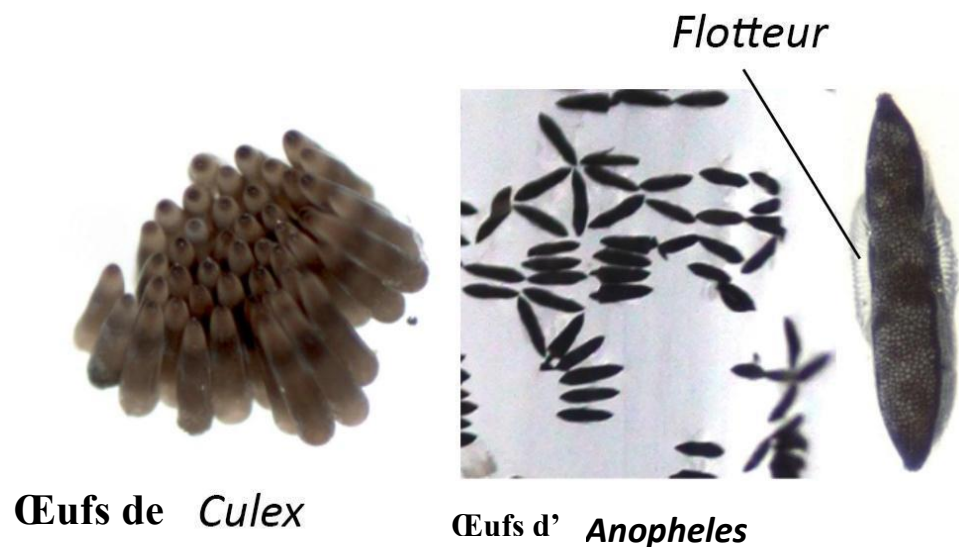


Figure 2 : Œufs de Culicidae (Williams et Pinto, 2012)

- **Morphologie des larves de Culicidae**

Les larves de Culicidae (figure 3) sont vermiformes, apodes et cylindroïdes. Leur corps est subdivisé en trois régions : tête, thorax et abdomen (Grassé, 1979).

La tête est formée par une plaque médiane chitinisée (le fronto-clypéus) et deux plaques latérales (les épicroâniens). Le fronto-clypéus porte une plaque antérieure étroite : le proclypéus qui est muni des brosses buccales et de nombreuses soies (Peter *et al.*, 1996) . Les larves ont parfois des taches ocellaires sur les côtés de la tête. La structure des antennes varie d'un groupe à un autre et elles ont des soies et parfois des spicules.

Le thorax est plus large que la tête et l'abdomen ; il porte des soies longues ou courtes plus ou moins ramifiées. Ces soies constituent un critère d'identification des espèces (Holstein, 1949 ; Grassé, 1961).

L'abdomen est constitué de neuf segments dont les sept premiers portent des soies. Ces dernières sont palmées chez les Anophelinae. On note également l'existence de soies tergales. Le huitième segment porte deux structures qui sont :

- sur sa face latérale se trouve un peigne formé d'un ensemble d'épines et d'écailles ;
- sur sa face dorsale, deux spiracles (orifices respiratoires) s'ouvrent soit directement au niveau du tégument chez les Anophelinae, soit à l'extrémité d'un siphon respiratoire chez les

Culicinae. Ce siphon est muni à son extrémité de cinq valves et porte de part et d'autre, une rangée d'épines pourvue de, une ou plusieurs touffes de soies (Grassé, 1979 ; Peter *et al.*, 1996).

Le neuvième segment est anal et ne se trouve pas dans le prolongement du corps mais forme avec celui-ci un angle de 130° ouvert vers le bas.

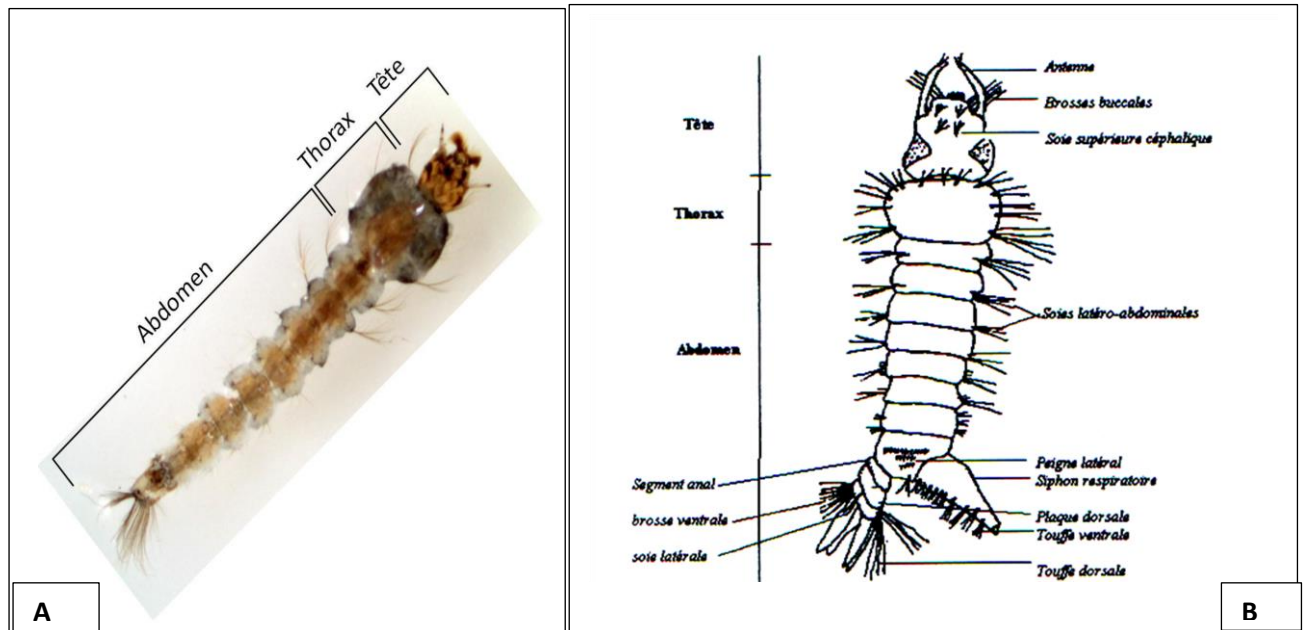


Figure 3. Larves de Culicidae ; A : *Anopheles* sp. (Williams et Pinto, 2012); B: *Culex* sp. (Gillie et de Meillon, 1968)

- **Morphologie des nymphes de Culicidae**

Toutes les nymphes (figure 4) de Culicidae sont virguliformes. Leur corps est divisé en deux parties :

- le céphalothorax, antérieur est arrondi et porte les ébauches des yeux et des différents appendices. Il est également muni de deux trompes respiratoires siphonothoraciques en forme de trompettes ;
- l'abdomen, postérieur est subdivisé en huit segments et un neuvième atrophié portant des soies. Le premier segment est muni d'une soie palmée alors que les autres segments abdominaux sont munis de soies simples. Le huitième segment porte deux palettes natatoires ainsi qu'une soie palmée (Grassé, 1961).

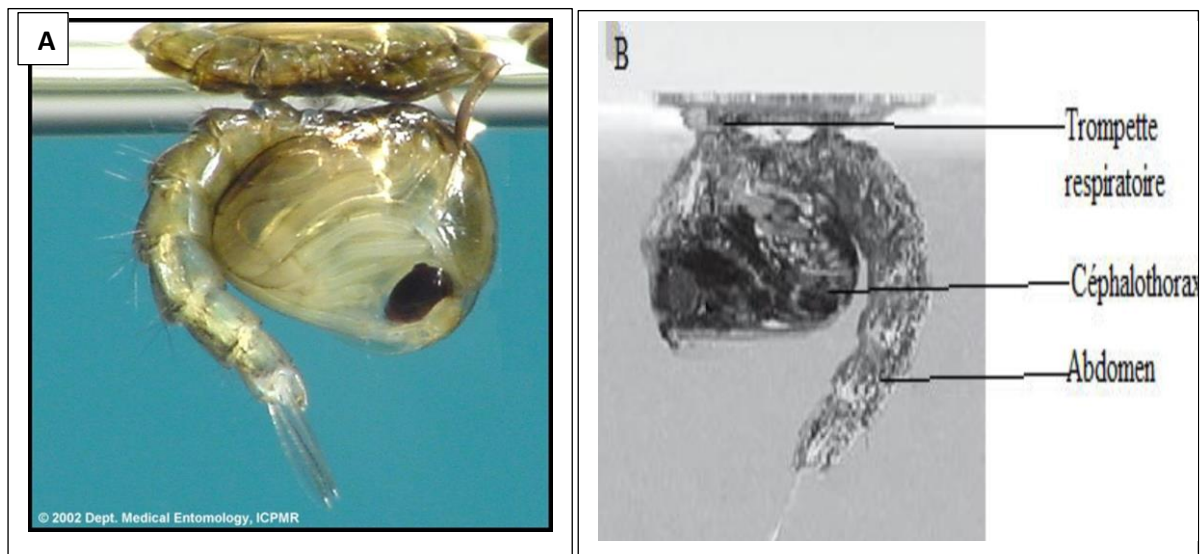


Figure 4: Morphologie d'une nymphe de Culicidae. A : nymphe de *Culex* sp. ; B : nymphe d'*Anopheles* sp. (Williams et Pinto, 2012)

- **Morphologie des adultes de Culicidae :**

Le corps des adultes de Culicidae est recouvert d'écailles et est subdivisé en trois parties distinctes (figure 5): tête, thorax et abdomen.

La tête porte :

- de chaque côté un œil à facettes, volumineux, souvent coloré en bleu ou vert métallique ;
- des antennes plumeuses chez le mâle ou quelques touffes de poils courts à la base des articles chez la femelle. Chez les mâles, les deux derniers articles sont relativement plus longs que les autres.

Les pièces buccales situées en avant et au milieu de la tête comprennent selon Grassé (1961) et Boué et Chanton (1962) :

- deux palpes maxillaires plus ou moins recouverts d'écailles et de poils, divergents chez le mâle à l'extrémité et aussi longs ou plus longs que la trompe ; chez le mâle, ils sont aussi longs que la trompe (Anophelinae) ou beaucoup plus courts (Culicinae : *Culex*, *Aedes*) ;
- la trompe composée de :

* labium, ou lèvre inférieure, pièce épaisse couverte de poils et d'écailles, sorte de gouttière à ouverture supérieure engainant d'autres pièces ;

* six pièces servant à perforer les tissus de l'hôte :

- deux impaires, le labre ou épipharynx et l'hypopharynx qui est creusé de canal salivaire ;
- quatre paires : deux maxilles ou mâchoires, portant à l'extrémité des dents dont le nombre varie avec l'espèce considérée et deux mandibules.

Chez les mâles certaines pièces peuvent manquer, ce qui les rend incapables de piquer.

Le thorax renflé dorsalement et globuleux est formé de trois segments soudés : prothorax, mésothorax et métathorax. En arrière, une partie du mésothorax se détache pour former le scutellum, simple chez les Anophelinae mais à trois lobes chez les Culicinae (Peter *et al.*, 1996).

Le thorax porte :

- deux ailes, minces et transparentes, portant une frange de soies au bord postérieur et à nervures couvertes d'écailles.

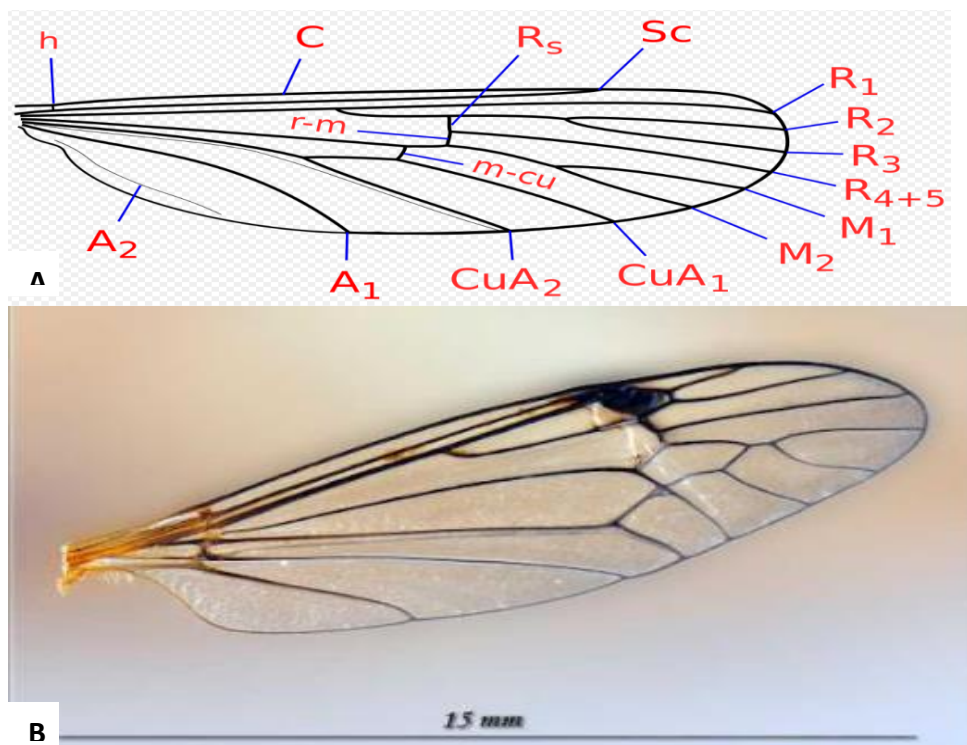


Figure 5.A et B : Morphologie d'une aile de Culicidae : C : costale ; Sc : souscostale ; R : radiale ; M : médiane ; Cu : cubitale ; A : anale ; h : humérale ; r-m : radio-médiane ; m-cu : médio-cubitale

Au repos, les ailes sont croisées l'une sur l'autre. Les nervures longitudinales et transversales du bord antérieur au bord postérieur sont :

- * la nervure costale, encore appelée costa ;
- * la nervure sous-costale, ou sub-costa, dont la base se confond avec celle de la nervure suivante ;
- * la première nervure longitudinale ;
- * la deuxième longitudinale qui se divise en deux branches ;
- * la troisième longitudinale ;
- * la quatrième longitudinale, divisée en deux branches ;
- * la cinquième longitudinale également bifurquée ;
- * la sixième longitudinale.

Les nervures transversales du bord antérieur au bord postérieur sont :

- * la transverse humérale ;
 - * la transverse sous-costale ;
 - * la transverse marginale ;
 - * la transverse surnuméraire ;
 - * la transverse moyenne ;
 - * la transverse postérieure ;
- deux balanciers, ou haltères, qui sont des vestiges de la deuxième paire d'ailes ;
- trois paires de pattes articulées au thorax par la hanche (ou coxa) et le trochanter (antérieures, moyennes et postérieures). Chaque patte comprend: le fémur, le tibia et le tarse. Ce dernier est formé de cinq articles (I, II, III, IV, et V) dont le dernier porte deux griffes, inégales ou égales, munies d'une ou de deux dents dans le genre *Aedes*. Par contre, dans le genre *Culex*, les deux dents sont accompagnées de pulvilli (Holstein, 1949).

L'abdomen allongé est constitué de dix segments distincts dont neuf pratiquement visibles n'ayant des écailles que chez les Culicinae (sauf de rares exceptions chez les Anophelinae) (Gillie et Coetzee, 1987).

Chez le mâle, le neuvième segment porte l'armature génitale ou hypopygium. Chez la femelle, ce segment porte des cerques plus ou moins visibles (Peter *et al.*, 1996).

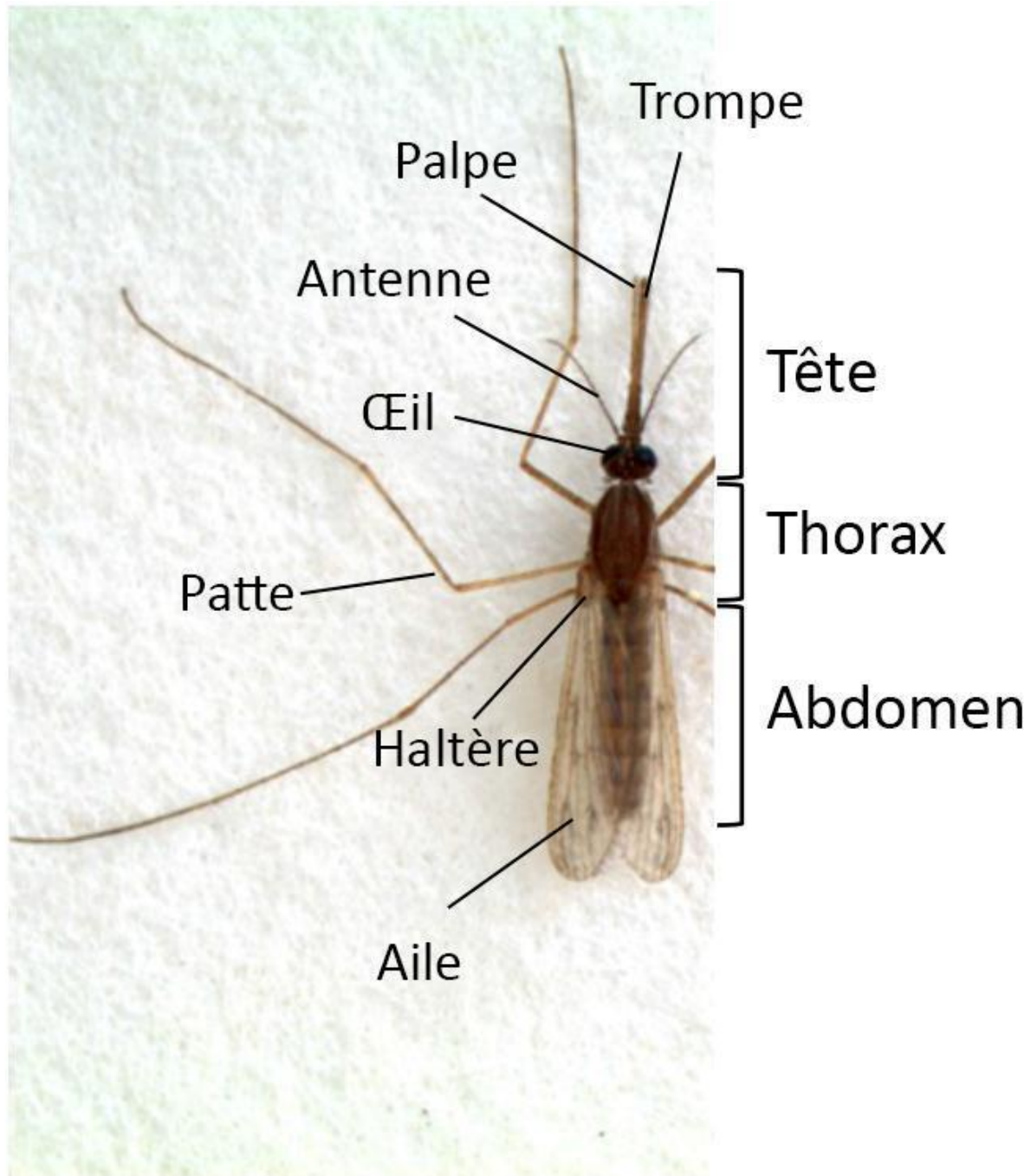


Figure 6: Morphologie générale schématique d'un imago de Culicidae (Williams et Pinto, 2012)

Deux principales caractéristiques permettent de distinguer les Anophelinae adultes des Culicinae adultes : les palpes maxillaires (Figure 6) et la position de repos (Figure 7).

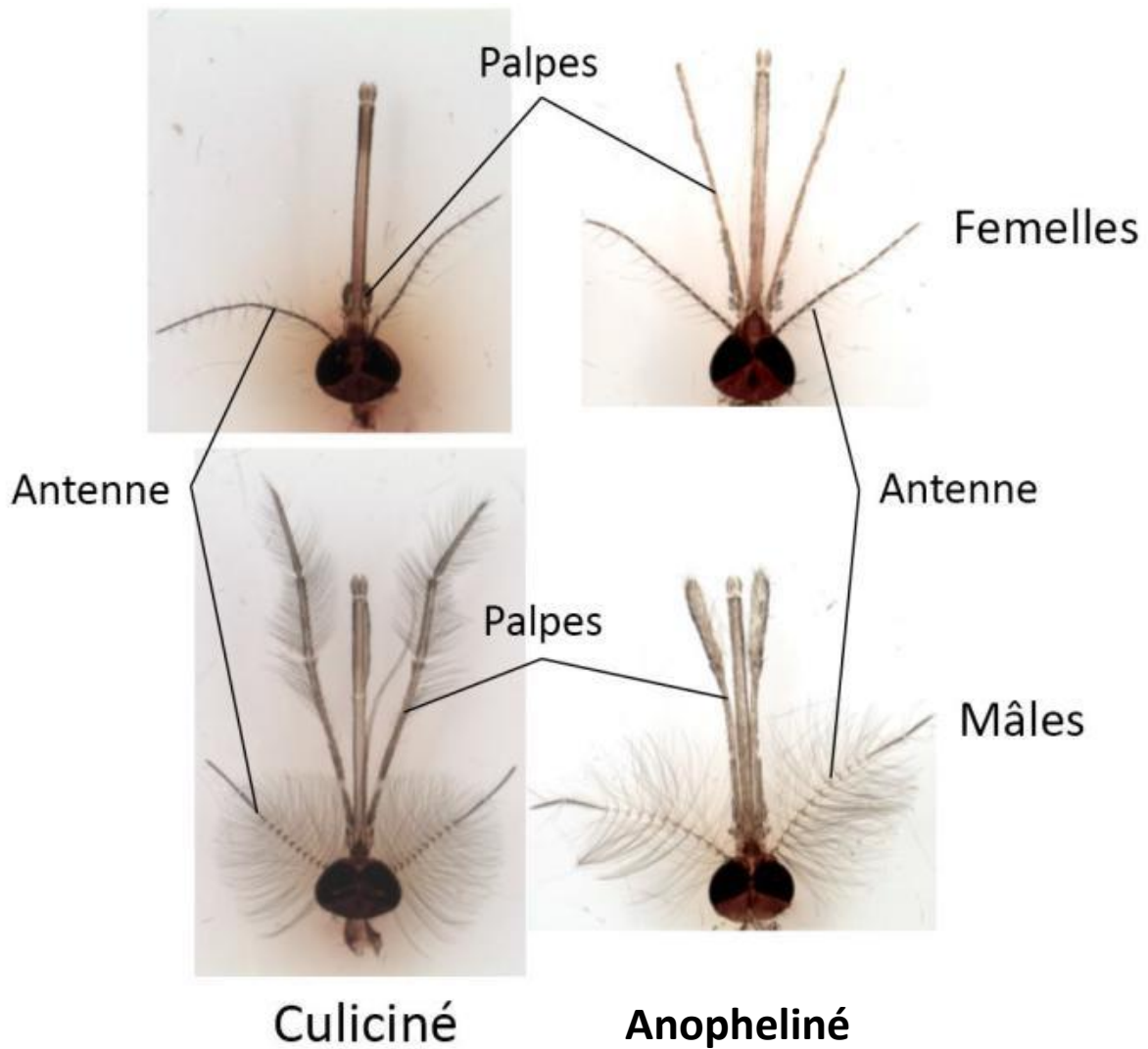


Figure 7. Différences entre les Anophelinés et les Culicinés au niveau de la tête des mâles et des femelles (Williams et Pinto, 2012).

Les femelles du genre *Anopheles* présentent des palpes maxillaires aussi longs que la trompe ; alors que les palpes des femelles des Culicinés sont bien plus courts que leur trompe.

Le bout des palpes d'anophèles mâles est arrondi, ce qui n'est pas le cas pour les Culicinés.

Les Anophelinae et les Culicinae présentent en commun le dimorphisme sexuel au niveau de l'antenne. Les mâles présentent une antenne épaisse (plumeuse) tandis que celle des femelles est simple (pileuse) (Figure 6).

Les anophèles adultes ont tendance à se poser suivant un angle de 50^0 à 90^0 par rapport à la surface. Les culicinés ont tendance à se reposer parallèlement à la surface du support (figure 7).

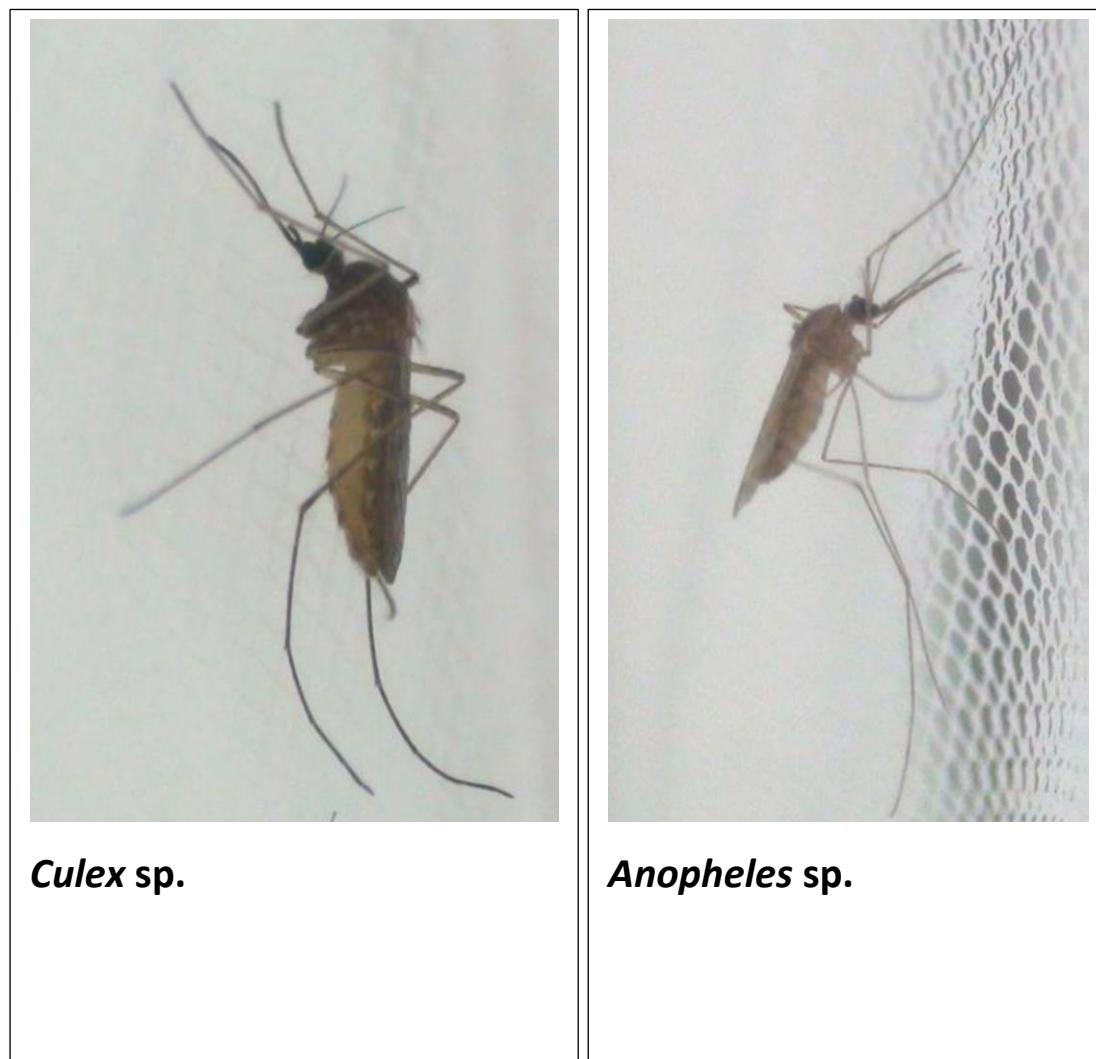


Figure 8: Différentes positions de repos des adultes de *Culex* sp. et d'*Anopheles* sp. par rapport au support (Williams et Pinto, 2012)

I.2.2. Bioécologie des Culicidae

- Bioécologie des œufs de Culicidae

La ponte ou l'oviposition se fait en milieu aquatique et est conditionnée principalement par la température, le pH, le degré de pollution. Les œufs peuvent être déposés à la surface de l'eau ou sur un substratum humide ; dans ce dernier cas, les œufs doivent être inondés avant l'éclosion (Peter *et al*, 1996). Ils sont déposés le plus souvent pendant la nuit à la surface des eaux calmes. Leur nombre varie de 100 à 400 œufs par femelle et par ponte (Cywinska *et al.*, 2006). Ils peuvent être pondus isolément à la surface de l'eau (*Anopheles*, *Aedes* et *Toxorhynchites*...) ou en radeau (*Culex*), ou fixés à un support (*Mansonia*...). La flottaison

est due soit à des phénomènes de tension superficielle, soit à la présence des flotteurs latéraux dans le genre *Anopheles* ou apicaux dans le genre *Culex*.

La période du développement embryonnaire dure 2 à 3 jours pendant lesquels l'embryon évolue pour atteindre le stade de larve I (Peter *et al.*, 1996). Les œufs du genre *Anopheles* sont peu résistants à la dessiccation, alors que ceux du genre *Aedes* résistent plus longtemps (jusqu'à 4 ans après la ponte) grâce à la cuticule sérotique qui les enveloppe (Hawley, 1988).

- **Boécologie des larves de Culicidae**

A l'éclosion, la larve de stade I mesure à peine quelques millimètres (Mouchet et Carnevale, 1991). En se développant, la taille et le nombre de soies portées par des individus permettent de distinguer 4 stades larvaires, tous aquatiques. Les gîtes sont variables : il s'agit des eaux courantes, stagnantes, saumâtres ou douces, des milieux ombragés ou ensoleillés de dimensions très réduites ou grandes, permanents ou temporaires, naturels ou artificiels.

Au repos, les larves se positionnent sous la surface de l'eau et respirent l'air atmosphérique grâce à l'affleurement de leur spiracle qui s'ouvre sur le 8^e tergite abdominal dans le genre *Anopheles* ou par un siphon dans les genres *Culex* et *Aedes* (Robert, 1989). Certaines espèces des genres *Mansonia* et *Mimomyia* se fixent par leur siphon aux tiges ou aux racines des végétaux aquatiques afin d'y prélever l'air des aquifères nécessaire à la respiration.

Généralement, les larves se nourrissent d'algues et d'autres microorganismes. Certaines larves sont zoophages : c'est le cas de celles de *Culex tigripes* qui peuvent dévorer, chacune 20 autres larves de moustiques en 2 jours (Moirangthem *et al.*, 2018). Les larves de 3^e stade d'*Aedes albopictus* sont capables de présenter un comportement cannibale (Mastrantonio *et al.*, 2018).

La durée de la phase larvaire varie. Elle est en moyenne de 6 à 10 jours mais elle peut être plus courte pour les espèces adaptées au climat sec (*Aedes vitatus*) ou beaucoup plus longue (Peter *et al.*, 1996). Les facteurs de variation de cette durée sont : l'alimentation, la concurrence vitale d'une part et d'autre part la température, le pH, la salinité, la quantité des matières organiques dissoutes dans l'eau. A la mue nymphale, les larves de quatrième stade (L4) se transforment en nymphes (Grassé, 1979 ; Mouchet et Carnevale, 1991).

- **Bioécologie des nymphes de Culicidae**

La nymphe, caractéristique des insectes holométaboles, est un stade situé entre la larve et l'imago (Grassé, 1979). Apode, aquatique chez les Culicidae, elle ne se nourrit pas. Elle respire l'air atmosphérique ou inspire l'oxygène des plantes aquatiques grâce aux trompettes respiratoires. La durée du stade nymphal oscille entre 1 à 6 jours suivant les espèces. A la fin de ce stade, la cuticule du céphalothorax de l'organisme se fendille dorsalement selon un plan sagittal. Les plans hydrophobes empêchent la noyade et libèrent successivement les différentes parties de l'adulte : thorax, tête, antennes, ailes, trompe, pattes et abdomen. L'adulte désormais à l'air libre reste immobile, posé sur son exuvie nymphale pour que ses ailes se déploient, sa cuticule durcisse et ses organes reproducteurs soient aptes avant son envol.

L'émergence dure quelques minutes et représente une phase délicate dans la vie de l'insecte au cours de laquelle survient une mortalité par noyade allant à près de 80% dans certains cas (Rodhain et Perez, 1985).

- **Bioécologie des Imagos de Culicidae**

L'accouplement se déroule généralement près des gîtes larvaires (Peter, 1996). Très souvent, les femelles s'accouplent une fois et conservent les spermatozoïdes dans leurs spermathèques (Mouchet et Carnevale, 1991).

Les mâles se nourrissent uniquement des sucs végétaux ; quant aux femelles, elles se nourrissent également des sucs végétaux mais sont surtout hématophages. Le repas de sang conditionne la ponte ; toutefois, il existe des espèces de Culicidae dont les femelles peuvent pondre des œufs fertiles bien que n'ayant pas pris un repas sanguin. C'est le cas chez *Malaya taeniarostris* (Peter *et al.*, 1996).

Le premier repas de sang est en général insuffisant pour assurer le développement des ovocytes dans le genre *Anopheles* ; la femelle prend alors un second repas ; on dit qu'elle passe par une phase pré-gravide (Mouchet et Carnevale, 1991).

L'ensemble des processus qui débutent par la recherche de l'hôte et se terminent par la ponte est connu sous le nom de cycle gonotrophique (Mouchet, 1997). Après la ponte, la femelle recherche un nouvel hôte et un nouveau cycle recommence. On peut ainsi observer jusqu'à huit cycles successifs et parfois plus (Mouchet et Carnevale, 1991).

Les adultes ne s'éloignent pas en général des gîtes larvaires ; leur rayon d'action est en moyenne de 1500 m pour les Anophèles mais peut atteindre 40 km pour certains *Aedes* (Rodhain et Perez, 1985). A cette dispersion active (vol) s'ajoute une dispersion passive par le vent (dispersion anémochore) ou par les moyens de transport humain comme la voiture, le train, le bateau, l'avion (Gaüzer et al., 1997). En effet, *Anopheles gambiae*, transporté d'Afrique par les bateaux et les avions, a provoqué 14.000 morts par le paludisme dans le Nord – Est du Brésil en 1939 (Ambroise-Thomas et al., 1992). La plupart des espèces de Culicidae montrent un pic d'agressivité bien précis, généralement crépusculaire ou nocturne (Mouchet et Carnevale, 1991).

I.3. Présentation des différentes espèces d'anophèles en Afrique et au Cameroun

I.3.1. Présentation des différentes espèces d'anophèles en Afrique

La connaissance de la systématique et de la distribution des vecteurs a un intérêt très capital dans les stratégies de contrôle actuel et futur des vecteurs du paludisme (Fontenille et al. 2003). Diverses études ont permis de démontrer que la distribution des vecteurs est étroitement liée aux conditions climatiques, écologiques et hydrographiques (Dossou et al. 1998). En Afrique, les vecteurs de *Plasmodium* appartiennent essentiellement à des complexes d'espèces (Fontenille et al. 2003). Les complexes d'espèces regroupent des espèces jumelles non différenciables à l'aide de critères morphologiques connus quel que soit leur stade mais différentes par leurs caractéristiques écologiques et génétiques (Pages et al. 2007).

En Afrique subsaharienne, les vecteurs du paludisme se répartissent entre le complexe *gambiae* (huit espèces dont trois sont vectrices : *An. gambiae* s.s ; *An. arabiensis* et *An. coluzzii*), le groupe *funestus* (neuf espèces dont deux vectrices : *An. funestus* s.s. et *An. rivulorum*), le groupe *nili* (quatre espèces dont trois vectrices : *An. nili* s.s., *An. carnevalei* et *An. ovengensis*) (Fontenille et al. 2003, Coetzee et Fontenille, 2004). Au sein du complexe *An. gambiae* qui regroupait avant 2013 sept espèces à savoir : *An. gambiae* s.s. Giles 1902; *An. arabiensis* Patton 1905; *An. quadriannulatus* A Théobald 1911; *An. bwambae* White 1973 ; *An. quadriannulatus* Hunt et al. (1998) ; *An. merus* Dönitz 1902 ; et *An. melas* Théobald 1911, on a révélé récemment l'existence de deux « formes moléculaires » : la forme M (*An. coluzzii*) et la forme S (*An. gambiae* s.s) qui sont aujourd'hui considérées comme deux espèces différentes (Coetzee et al. 2013). Par ailleurs, *An. quadriannulatus* B est devenu *An.*

amharicus Hunt, Wilkerson et Coetzee 2013. Le complexe *Anopheles gambiae* compte désormais huit espèces jumelles.

Moins de 20 des 140 espèces d'anophèles présentes en Afrique sub-saharienne sont capables de transmettre le paludisme à l'homme (Hervy *et al.*, 1998). Cinq de ces espèces à savoir *Anopheles gambiae* Giles, *Anopheles arabiensis* Patton, *Anopheles funestus* Giles, *Anopheles moucheti* Evans et *Anopheles nili* (Theobald), sont considérées comme des vecteurs majeurs et responsables de 95% de transmission totale des plasmodies dans le continent (Mouchet *et al.*, 2004). Les vecteurs secondaires ou vecteurs d'importance locale sont responsables de 5% de transmission des plasmodies (Mouchet *et al.*, 2004). *Anopheles coluzzii* est restreinte à l'Afrique centrale et de l'ouest (Coetzee *et al.* 2013). En Afrique tropicale et subtropicale *An. arabiensis* et *An. funestus* s.s. sont plus répandues (Figure 8) bien que *An. arabiensis* préfère les habitats plus secs (Sinka *et al.* 2010).

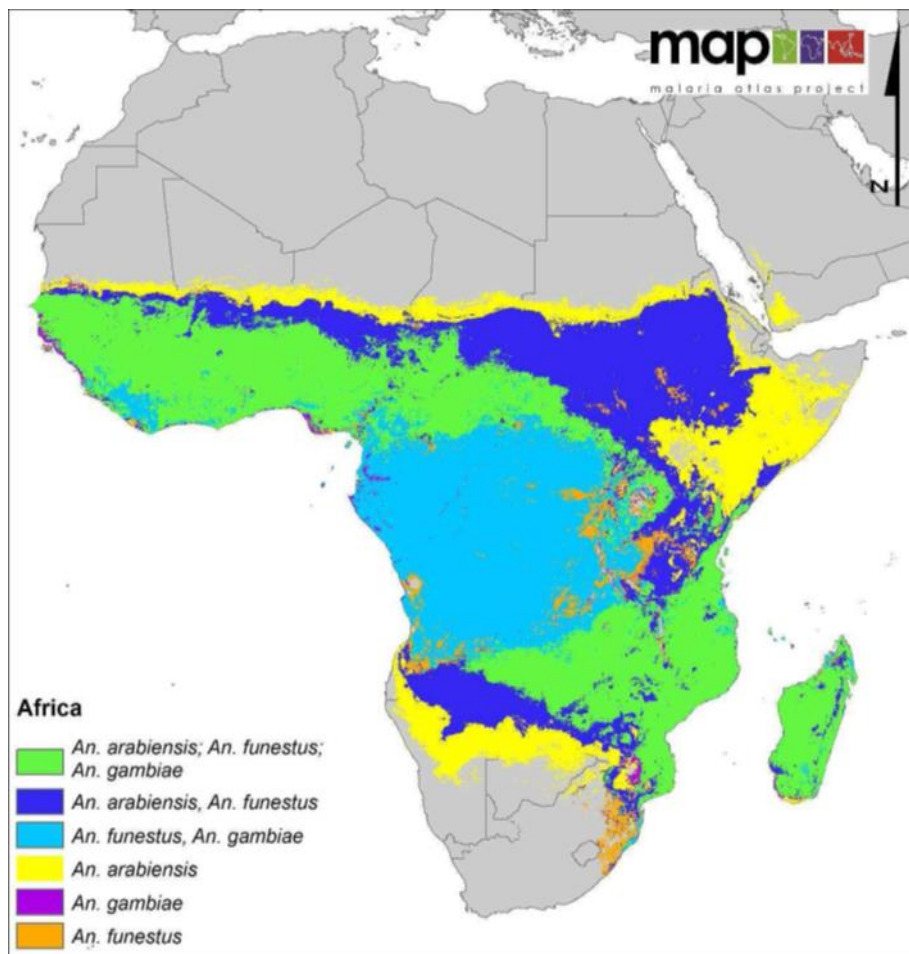


Figure 9. Distribution spatiale des espèces vectrices de paludisme en Afrique (Sinka *et al.*, 2012)

1.3.2. Distribution des espèces anophéliennes en fonction des faciès géographiques au Cameroun

Les anophèles présents au Cameroun peuvent être regroupés en fonction de leur aire de distribution géographique de prédilection (Figure 9).

- Espèces cosmopolites : espèces distribuées sur tout le territoire : *Anopheles nili*, *An. wellcomei*, *An. gambiae*, *An. coluzzii*, *An. funestus*, *An. coustani* et *An. lesoni*.
- Espèces savanicoles : espèces fréquemment retrouvées en zone de savane : *An. arabiensis*, *An. longipalpis*, *An. rivulorum*, *An. squamosus*, *An. pretoriensis*, *An. rufipes*, *An. brunnipes*, *An. sergentii macmahoni*, *An. flavicosta* et *An. brohieri*.
- Espèces forestières : espèces présentes en zone forestière : *An. hargreavesi*, *An. cinctus*, *An. obscurus*, *An. paludis*, *An. smithii*, *An. jebudensis*, *An. fretownensis*, *An. moucheti*, *An. carnevalei*, *An. ovengensis*, *An. implexus* et *An. dualaensis*.
- Espèces sahéliennes : espèces inféodées aux zones sahéliennes : *An. arabiensis*, *An. rufipes* et *An. pharoensis*.
- Espèces d'altitude : espèces inféodées aux zones de montagne ; *An. buxtoni*, *An. natalensis*, *An. demeilloni*, *An. squamosus*, *An. cydippis*, *An. okuensis*, *An. eouzani*, *An. rhodesiensis*, *An. deemingi* et *An. hancocki*.
- Espèces côtières : espèces inféodées aux mangroves, îles et zones insulaires : *An. melas*, *An. coluzzi* et *An. tenebrosus*.

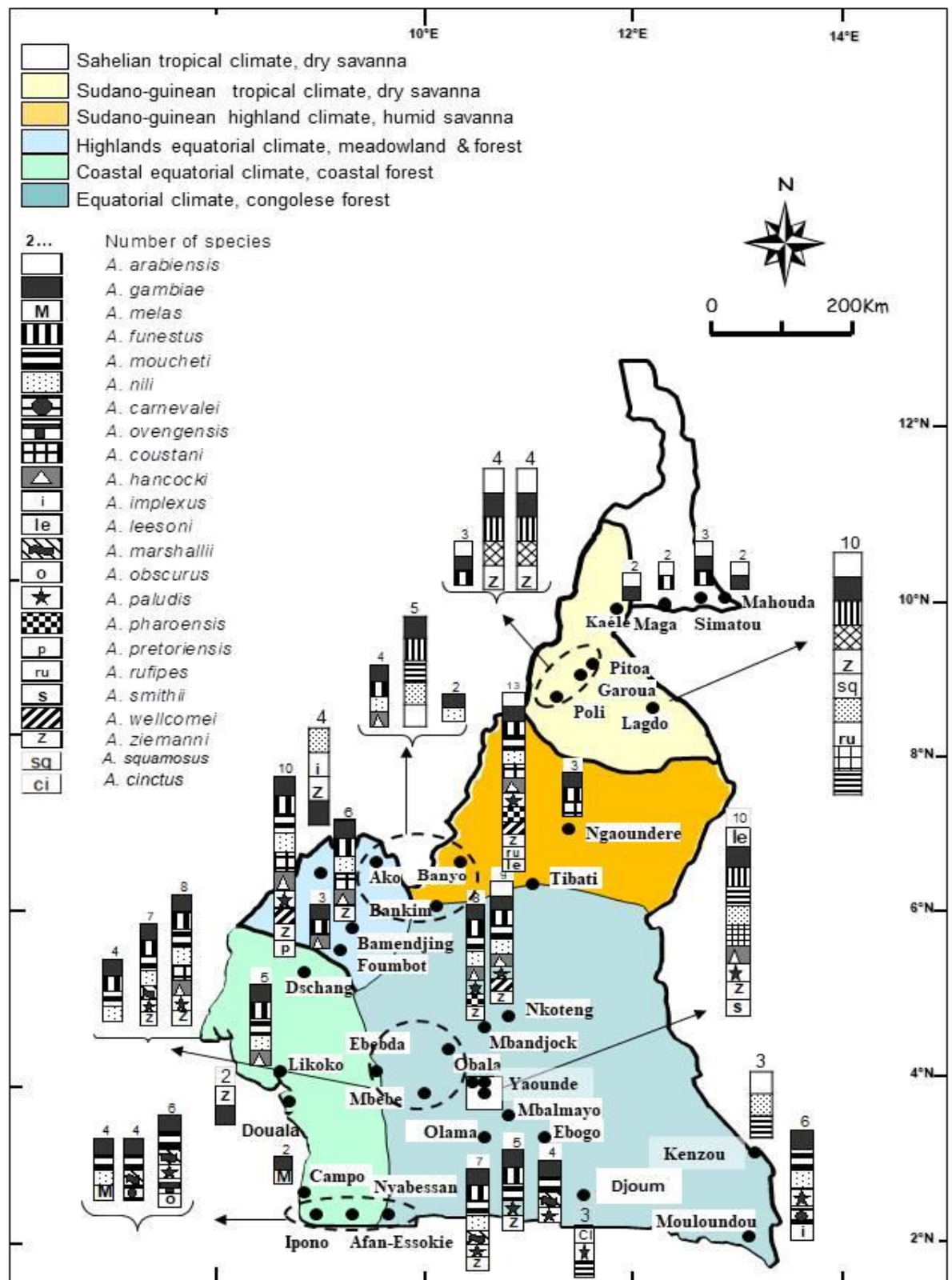


Figure 10 : Distribution géographique des espèces d'anophèles recensées au Cameroun entre 2000 et 2018 (Ayala *et al.*, 2009 ; Antonio-Nkondjio *et al.*, 2019).

I.3.3. Présentation des différentes espèces de *Culex* sp.

La distribution géographique des membres du complexe *Cx. pipiens* est très hétérogène (Figure 1). En effet, *Cx. pipiens* est présent en Europe, au Nord et au Sud de l'Afrique, en Asie et dans les régions tempérées d'Amérique du Nord et du Sud (Harbach *et al.*, 1985, Vinogradova 2000 ; 2003). Par ailleurs, seule sa forme *molestus* est présente en Corée du Sud, au Japon et en Australie (Vinogradova 2000). Pour ce qui est de *Cx. quinquefasciatus*, sa répartition couvre la ceinture intertropicale, le Sud-Est de l'Asie et de l'Australie (Smith et Fonseca, 2004 ; Fonseca *et al.*, 2006). Deux espèces, *Cx. globocoxitus* et *Cx. australicus* sont quasi endémiques de l'Australie pendant que *Cx. pallens* est surtout présent à l'Est de l'Oural à travers l'Asie tempérée (Fonseca *et al.*, 2009). *Cx. pervigilans* et *Cx. fatigans* sont présents en Nouvelle Zélande et dans les îles voisines (Belkin, 1968). *Culex torrentium* est présent en Europe et en Asie (Vinogradova, 2000) et *Cx. vagans* est présent en Chine, en Inde, en Russie, au Japon et en Corée (Belkin, 1968). Bien que l'utilisation de certains organes comme le génitalia et certaines caractéristiques liées à la reproduction, la physiologie et à l'écologie puissent nous permettre de distinguer quelques espèces du complexe, identifier les membres du complexe *Cx. pipiens* sur la base des critères morphologiques est très difficile, coûteux en temps et très souvent limité aux adultes mâles. De ce fait, un recours aux critères génétiques paraît nécessaire pour distinguer les membres du complexe *Cx. pipiens*. Dans cette optique, des techniques moléculaires basées principalement sur la réaction de polymérisation en chaîne ont été développées et proposées (Aspen et Savage, 2003 ; Smith et Fonseca, 2004 ; Bahnc et Fonseca 2006, Shaikevich 2007 ; Kasai *et al.*, 2008). 10 Pour mieux aborder la bioécologie et décrire les différents stades de développement chez les *Culex*, l'espèce *Cx. quinquefasciatus* sera utilisée comme modèle. Il s'agit non seulement d'une espèce qui a été particulièrement étudiée (Subra, 1981 ; Bhattacharya et Basu, 2016) mais également de l'espèce dominante des populations culicidiennes dans les grandes agglomérations de la ceinture intertropicale en général (Subra, 1981) et du Cameroun en particulier (Antonio-Nkondjio *et al.*, 2012 ; Mbida *et al.*, 2016 ; Talipouo *et al.*, 2017).

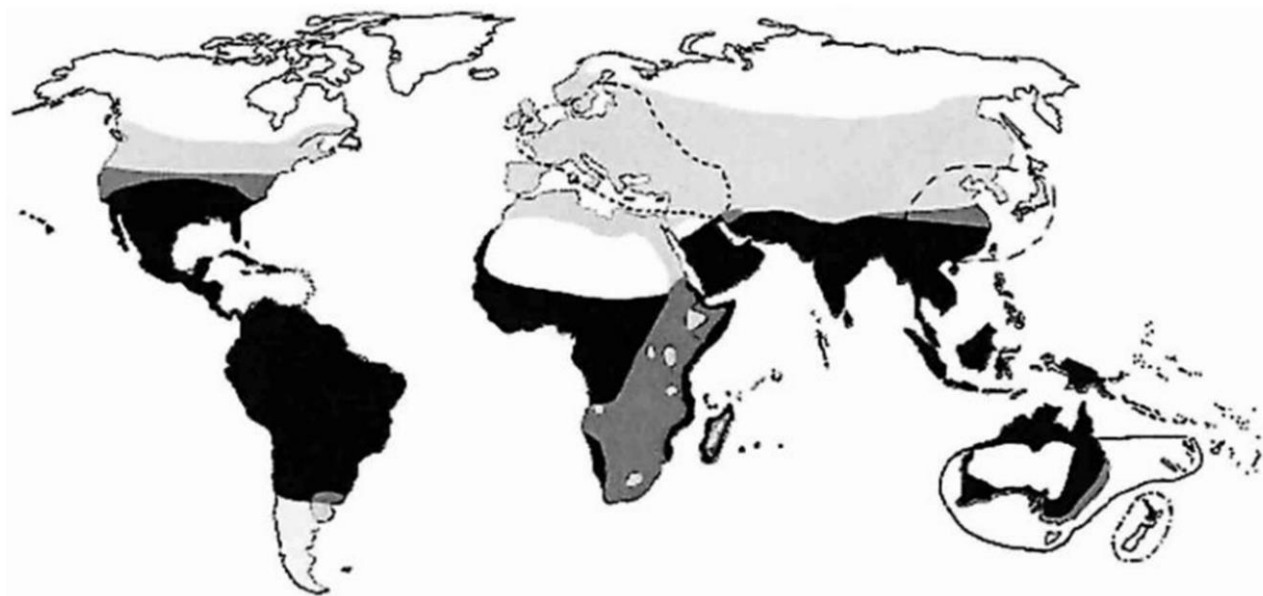


Figure 11 : Distribution du complexe *Culex pipiens* et de ses espèces jumelles (Smith et Fonseca, 2004)

Légende : Gris clair : *Cx. pipiens*, Noir : *Cx. quinquefasciatus*, Gris foncé : Chevauchement de *Cx. pipiens* et *Cx. quinquefasciatus*, Région marquée par la ligne en pointillés : *Cx. torrentium*, Région marquée par une ligne en trait continu : *Cx. australicus*, Région marquée par une ligne en trait interrompu : *Cx. pipiens pallens*, Nouvelle Zélande marquée par une ligne en pointillés et en trait interrompu : *Cx. pervigilans*

I.4. Rôle épidémiologique des Culicidae

Sur le plan médical et vétérinaire, les moustiques ont une très grande importance, car les femelles hématophages de certaines espèces sont des vecteurs de nombreux agents pathogènes pour l'Homme et les animaux.

I.4.1. Anophelinae

Les Anophèles sont réputés dans la transmission des espèces de *Plasmodium*. Parmi les espèces de *plasmodiums* connues, seules six espèces sont responsables du paludisme chez l'homme. Il s'agit de : *Plasmodium falciparum* ; *Plasmodium ovale* ; *Plasmodium malariae* ; *Plasmodium vivax* ; *Plasmodium knowlesi* et *Plasmodium cynomolgi*. Au Cameroun, les données disponibles révèlent que 23,6% des cas de maladie dans les formations sanitaires, 68,7% des décès chez les enfants de moins de cinq ans et 16,9% des décès chez les femmes enceintes sont attribués au paludisme (PNLP, 2016).

Dans toute la région intertropicale africaine, le vecteur principal du paludisme est *Anopheles gambiae* s.l. (Mouchet et Carnevale, 1991).

Les Anophèles transmettent aussi des *plasmodiums* aux animaux. Il s'agit de :

- *Plasmodium gallinaceum* et *Plasmodium relictum* aux Oiseaux (Alavi *et al.*, 2004) ;
- *Plasmodium yoelli* et *Plasmodium bergeri* aux Rongeurs (Pakpour *et al.*, 2016 ; Wang *et al.*, 2017)
- *Plasmodium cynomolgi* et *Plasmodium knowlesi* aux Singes (Imwong *et al.*, 2018).

Plusieurs espèces d'Anophèles transmettent aussi des filarioses et des maladies virales à l'Homme et aux animaux. *Anopheles gambiae* s.l transmet la filariose lymphatique causée par *Wuchereria bancrofti* (Pi-Bansa *et al.*, 2019) et le virus du chikungunya à l'Homme (Brustolin *et al.*, 2018).

I.4.2. Culicinae

L'activité vectorielle des Culicinae est également très importante. En effet, *Culex quinquefasciatus* transmet plusieurs agents pathogènes à l'Homme et aux animaux. Ainsi, ce vecteur transmet :

- des virus tels que, West Nile virus (Reisen *et al.*, 2007); Rift Valley fever virus (Turell *et al.*, 2007) et le virus du Zika (Smartt *et al.*, 2018) ;
- des Protozoaires tels que : *Plasmodium cathemerium* (Pruck-Ngern *et al.*, 2015), *Plasmodium relictum* (Valkiūnas *et al.*, 2018 ; Schoener *et al.*, 2019) aux Oiseaux ;
- des Nématodes tels que : *Wuchereria bancrofti* (Jones *et al.*, 2018), *Dirofilaria immitis*(De Carvalho *et al.*, 2008) et *Brugia malayi* (Chandra *et al.*, 2008).

I.5. Généralités sur le paludisme

I.5.1. Définition

Le paludisme est une maladie parasitaire qui peut être contractée à tout âge, et due à un Hématozoaire du genre *Plasmodium* transmis à l'Homme principalement par la piqure de moustiques femelles du genre *Anopheles* parasitées (Carnevale *et al.*, 2009 ; Fouet, 2010). L'on note également la possibilité de transmission congénitale et par transfusion sanguine.

Cette maladie a été découverte en 1880 à Constantine par Charles-Louis-Alfonse Laveran, médecin de l'armée française (Guiguen *et al.*, 1990; OMS, 2009).

I.5.2. Agents pathogènes du paludisme

Les *plasmodiums* sont des protozoaires intracellulaires de forme amiboïde (Guiguen *et al.*, 1990). Ils appartiennent au Phylum des Apicomplexa ; Classe des Haemosporidea ; Ordre des Haemosporida ; Famille des Plasmodiidae ; Genre *Plasmodium* Laveran, 1881. Six espèces de *Plasmodium* seulement sur les 80 espèces décrites sont pathogènes pour l'Homme.

Plasmodium falciparum (Welch, 1897) est l'espèce la plus répandue et la plus redoutable qui occupe une grande aire de distribution. Elle sévit toute l'année dans les régions tropicales où elle subit cependant des recrudescences saisonnières (Guiguen *et al.* 1990). Elle est responsable de la fièvre tierce (variété de fièvre intermittente se caractérisant par le retour des crises le troisième jour avec un jour d'intervalle entre les épisodes d'hyperthermie) maligne et de la majorité des infections palustres graves et mortelles avec 90% de décès en Afrique noire (Mouchet *et al.*, 2004).

Plasmodium malariae (Laveran, 1881) sévit en Afrique de manière plus sporadique; sa période d'incubation est de 15 à 21 jours. Il est responsable de la fièvre quarte qui est une variété de fièvre intermittente au cours de laquelle les épisodes d'hyperthermie réapparaissent le quatrième jour avec deux jours d'intervalle d'apyrexie entre les accès d'hyperthermie. (Guiguen *et al.*, 1990).

Plasmodium vivax (Grassi et Feletti, 1890) est l'agent responsable de la fièvre tierce bénigne en Afrique du Nord, en Asie du Sud-Est et en Amérique du Sud. Sa période d'incubation est d'environ 15 jours mais peut s'étendre jusqu'à 9 mois ou plus, avec des rechutes à brève ou à longue échéance, observables pendant 3 à 4 ans (Guiguen *et al.*, 1990).

Plasmodium ovale (Stephens, 1922) est l'agent de la fièvre bénigne en Afrique Centrale. Son incubation est de 15 jours au maximum, mais peut aller jusqu'à 4 ans (Guiguen *et al.* 1990).

Plasmodium knowlesi (Karadjian, 2011) est une espèce découverte récemment chez l'Homme ; essentiellement trouvée en Malaisie (Asie du Sud-Est), elle est morphologiquement très proche du *Plasmodium ovale*. C'est un *Plasmodium* affectant originellement les singes avec un cycle de développement court (Cox-Singh, 2008).

Plasmodium cynomolgi (Thuy *et al.*, 2014) est une espèce découverte pour la première fois chez l'Homme par Thuy *et al.*, (2014) à Hulu Terengganu (Malaisie). Elle est assez proche de *Plasmodium malariae* car responsable d'une fièvre quarte, et avec des stades hypnozoïtes morphologiquement identiques.

I.5.3. Cycle biologique du *plasmodium*

Trois acteurs liés par le cycle biologique du parasite sont impliqués: le parasite (agent pathogène), l'anophèle femelle (hôte définitif et vecteur exclusif) et un vertébré (hôte intermédiaire et seul réservoir) (Bréhima, 2008). Le cycle se déroule successivement en deux phases (Figure 10) une phase de reproduction asexuée des *Plasmodium* par schizogonie dans l'organisme de l'Homme et une phase de reproduction sexuée par sporogonie dans les organes de l'anophèle femelle (Kamaté, 2002)

- Développement du *plasmodium* chez l'Homme

Chez l'Homme, le cycle est lui-même divisé en deux phases: la phase hépatique ou schizogonie exo-érythrocytaire et la phase sanguine ou schizogonie érythrocytaire :

- la phase hépatique ou schizogonie exo-érythrocytaire qui correspond à la phase d'incubation cliniquement asymptomatique (Bouteille *et al.*, 2007, Chabasse *et al.*, 2007). Les sporozoïtes inoculés par l'anophèle femelle lors de son repas sanguin restent pendant une trentaine de minutes dans la peau, la lymphe et le sang avant de se réfugier dans les hépatocytes via les vaisseaux sanguins, où ils se transforment en schizontes pré-érythrocytaires ou «corps bleus» (formes multi-nucléées) (Bouteille *et al.*, 2007 ; Fouet 2010).

Ces derniers se multiplient, deviennent matures, éclatent et libèrent les mérozoïtes qui passent dans les globules rouges (Bouteille *et al.*, 2007, Chabasse *et al.*, 2007 ; Fouet 2010).

- la phase sanguine ou schizogonie érythrocytaire correspond à la phase clinique de la maladie (Chabasse *et al.*, 2007). La pénétration du mérozoïte dans l'érythrocyte (par endocytose) et sa maturation en trophozoïtes puis en schizontes prend 48 à 72 heures et conduit à la destruction du globule rouge. Puis la libération de nouveaux mérozoïtes dans le sang marque le début d'un nouveau cycle de réplication (OMS 2003, Bouteille *et al.*, 2007; Fouet 2010). Cette partie du cycle correspond à la phase clinique; alors, la parasitémie s'élève, le sujet devient fébrile, c'est l'accès palustre (Bouteille *et al.*, 2007 ; Fouet 2010). Après plusieurs cycles érythrocytaires, certains trophozoïtes se transforment en gamétocytes mâles ou femelles (Kamaté, 2002).

- **Développement du *plasmodium* chez l'anophèle**

Les gamétocytes ingérés lors d'un repas sanguin sur un sujet infecté, se transforment en gamètes mâles et femelles qui fusionnent en un œuf libre, mobile, appelé ookinète (Bouteille *et al.*, 2007; Chabasse *et al.*, 2007). Cet ookinète quitte la lumière du tube digestif, se fixe ensuite à la paroi externe de l'estomac et se transforme en oocyste (OMS, 2003). Les cellules parasites se multiplient à l'intérieur de cet oocyste, produisant des centaines de sporozoïtes, puis l'oocyste éclate et les libère dans l'hémolymph. Ces derniers migrent ensuite vers les glandes salivaires du moustique (Chabasse *et al.*, 2007; Fouet, 2010). Les sporozoïtes sont les formes infectantes, prêtes à être inoculées avec la salive du moustique lors d'un repas sanguin sur un hôte vertébré (Kamaté, 2002).

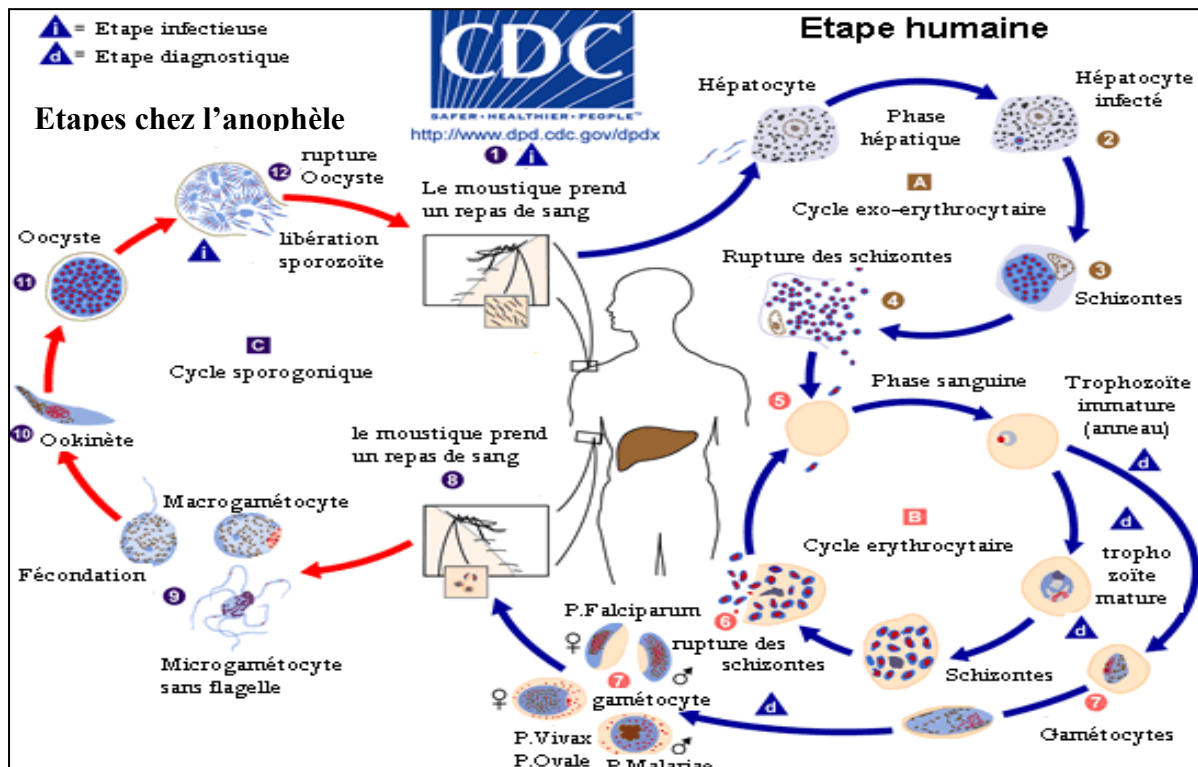


Figure 12 : Cycle biologique de *Plasmodium* spp. (CDC, 2018)

I.6. Généralités sur les filarioses lymphatiques (Aubry et Guzère, 2019)

Les filarioses sont un groupe de maladies endémiques tropicales dues à des nématodes (ou vers ronds) vivipares les filaires qui ont en commun des réactions sérologiques de groupe et une sensibilité à la diéthylcarbamazine, mais qui ont une symptomatologie propre à chaque filariose, un hôte intermédiaire spécifique et une distribution géographique particulière.

Chaque filaire passe par deux stades : un stade adulte avec des macrofilaires qui vivent dans le système lymphatique ou le tissu sous-cutané ; et un stade larvaire avec des microfilaires qui vivent dans le sang, dans le tissu sous-cutané ou dans le corps même de la filaire et le milieu extérieur. Il faut un hôte intermédiaire (HI : moustique vecteur) pour que la larve devienne infestante.

Les filarioses pathogènes comprennent :

- les filarioses lymphatiques ;
- les filarioses cutanéomuqueuses : l'onchocercose (filaires adultes et microfilaires dans la peau) ; la loase (filaires adultes dans la peau, microfilaires dans le sang), la dracunculose

(filaires adultes dans la peau, microfilaires dans le corps même de la filaire adulte et dans le milieu extérieur) qui font l'objet de cas cliniques.

La physiopathologie des filarioses pathogènes est commune chez l'homme avec deux phases :

- phase de pré-patence ou phase de développement helminthique en règle silencieuse rarement symptomatique, qui s'achève, après une longue période selon la réponse immunitaire de l'hôte (jusqu'à un an), au moment de l'apparition de la microfilarémie,
- phase de parasitisme adulte, avec une symptomatologie propre aux filaires adultes et commune aux microfilaires non infestantes, une longue vie des adultes et une grande prolificité.
- les mansonelloses dues à des filaires adultes peu ou pas pathogènes ; elles sont souvent associées aux filarioses pathogènes et leurs microfilaires (sang, peau) peuvent persister après traitement faisant croire à un échec thérapeutique de la filariose pathogène,
- les dirofilarioses qui sont des zoonoses en impasse parasitaire chez l'Homme.

I.6.1. Épidémiologie des filarioses (Aubry et Guzère, 2019)

Chez l'homme, on rencontre trois filaires lymphatiques : *Wuchereria bancrofti* ou filaire de Bancroft, *Brugia malayi* ou filaire de Malaisie et *B. timori*.

Les filaires adultes émettent des microfilaires qui circulent en permanence dans la lymphe et périodiquement dans le sang (périodicité nocturne ou diurne).

La distribution géographique des filarioses lymphatiques est résumée avec la périodicité des microfilaires dans le tableau I ci-dessous.

Tableau I. Distribution géographique des filarioses lymphatiques (Aubry et Guzère, 2019)

Espèces de filaire	<i>Wuchereria bancrofti</i>	<i>Brugia malayi</i>	<i>Brugia timori</i>
Périodique nocturne	Amérique, Afrique, Océan Indien, Asie	Asie du Sud-Est	Timor et îles voisines
Sub-Périodique diurne	Dénommé <i>W. bancrofti</i> variété pacifique du Pacifique	-	-

I.6.2. Cycle des filaires (Aubry et Guzère, 2019)

Le parasite est transmis d'un sujet infecté à un autre sujet par les moustiques vecteurs qui jouent le rôle d'hôtes intermédiaires. Les vecteurs sont des *Culex* (en particulier *Culex quinquefasciatus*), des *Anopheles*, des *Aedes*, des *Mansonia*. Les réservoirs de parasites sont l'Homme pour *W. bancrofti* et l'Homme et les animaux pour *B. malayi* et *B. timori*.

A l'occasion d'un repas sanguin, les microfilaires sont ingurgitées par les moustiques. Elles subissent deux mues et deviennent infestantes (L3). Lorsque le moustique devenu infestant pique pour prendre un nouveau repas sanguin, les larves infestantes L3 peuvent pénétrer dans l'organisme de l'hôte définitif par l'orifice de la piqûre. Chez l'Homme, environ 10 % de L3 poursuivent leur évolution dans les vaisseaux lymphatiques, y subissent une nouvelle mue (L4) et se transforment en adultes en 3 à 6 mois.

Filariasis (*Wuchereria bancrofti*)

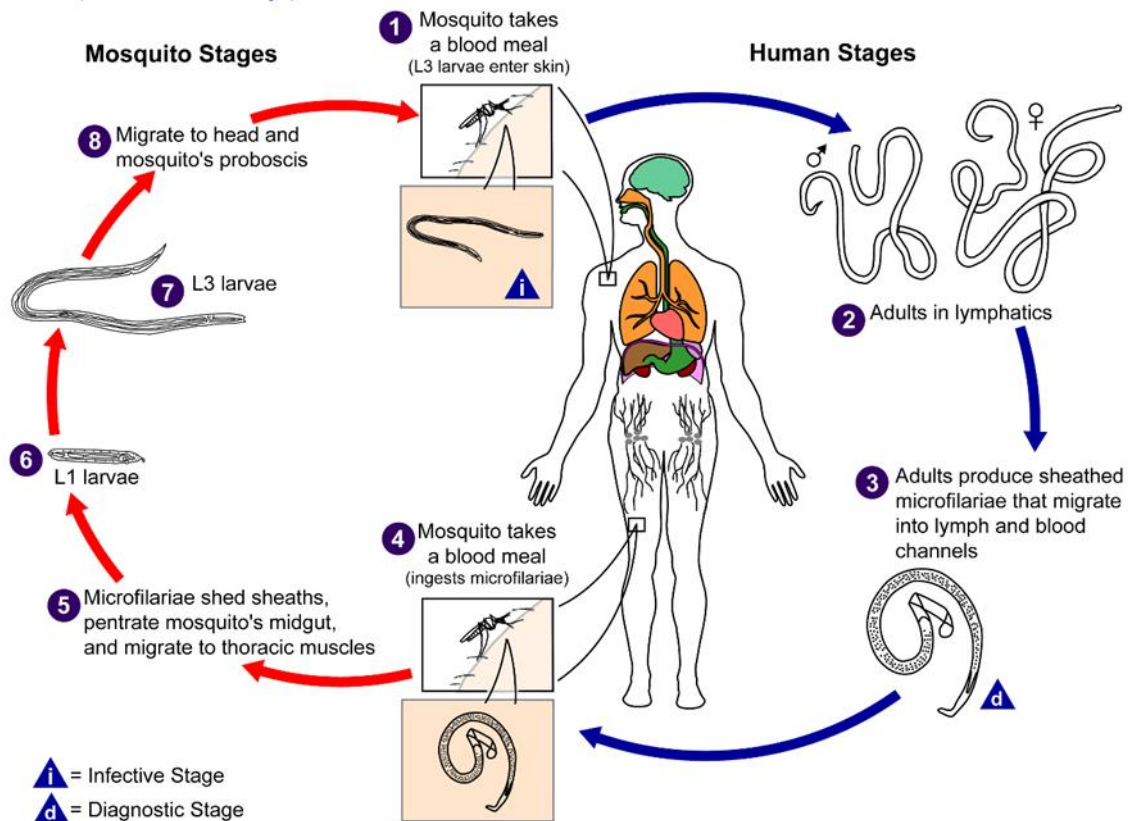


Figure 13 : Cycle de *Wuchereria bancrofti* (CDC, 2018)

I.6.3. Prévalence selon la géographie

On estime qu'environ 120 millions de personnes dans 72 pays sont actuellement infectées et que 1 milliard d'êtres humains vivent dans des zones où la filariose est endémique et où l'administration massive de médicaments (AMM) est nécessaire. Quatre-vingt millions de personnes sont porteuses de microfilaries, près de 40 millions souffrent de difformités et sont handicapées (2ème principale cause d'handicap dans le monde). Environ 80 % des personnes concernées vivent dans les six pays suivants : Côte d'Ivoire, Inde, Indonésie, Myanmar, Nigeria, RDC (CDC, 2018).

Dans l'océan Indien, la filariose lymphatique est présente sur la côte Est de Madagascar et sur la côte Ouest dans la province de Mahajanga. Elle est absente des Hautes Terres. La prévalence sur la côte varie de 12 à 30 %. L'archipel des Comores est un des foyers mondiaux qui a atteint les plus fortes prévalences. Dans les îles montagneuses (Madagascar, Anjouan, Mayotte), la prévalence diminue en allant du littoral vers les hauteurs et disparaît vers 600

mètres d'altitude. La filariose lymphatique diminue actuellement dans l'ouest de l'océan Indien, en particulier aux Comores, qu'il y ait eu une administration de masse de médicaments comme à Mayotte, ou non comme à Anjouan. *Culex quinquefasciatus*, qui pullule en cas d'urbanisation est probablement un très mauvais vecteur. Un programme mondial pour l'élimination des filarioses lymphatiques en tant que problème de santé publique en 2020 a été mis sur pied en 2000 avec administration de masse de médicaments (AMM) (CDC, 2018).

I.7. Stratégie de lutte contre les Culicidae

La stratégie de lutte contre les Culicidae présentée ci-dessous est tirée de l'OMS (2006).

La lutte anti-vectorielle est l'une des composantes majeures de la lutte contre les maladies à transmission vectorielle et un outil complémentaire à la prise en charge des accès palustres afin de réduire la morbidité et la mortalité (OMS, 2006). En effet, certaines méthodes ont pour objectif de réduire la densité de moustiques ou la longévité des femelles adultes, tandis que d'autres visent à réduire le contact homme-vecteur. Mais le choix de l'une ou l'autre doit tenir compte de la bioécologie des espèces visées, de leur comportement et du contexte épidémiologique dans lequel s'effectue la transmission de la maladie.

I.7.1. Méthodes de lutte contre les larves

La lutte antilarvaire a pour cibles les stades aquatiques (œufs, larves et nymphes) des moustiques. Ces méthodes de lutte contre les larves sont physico-chimiques, biologiques et chimiques.

- Méthodes physico-chimiques

Les méthodes physico-chimiques préconisent, les modifications ou manipulations des gîtes larvaires et l'application d'une pellicule huileuse ou autre à la surface de l'eau afin d'entraîner la mort des larves par asphyxie constituent les méthodes physico-chimiques de lutte contre les larves de moustiques.

* modifications physiques des gîtes pouvant aller jusqu'à leur élimination:

- élimination des sites les moins étendus : par comblement ou assèchement ;
- fluctuation du niveau des eaux ou chasse par délestage (évacuation régulière faisant appel à de petits barrages avec siphons et vannes d'écluses) ;

- élimination de la végétation ;
- modification de la salinité.

* La modification du gîte de façon à le rendre inaccessible aux moustiques adultes (barrières anti-moustiques mécaniques pour de petits gîtes tels que des puits ou latrines)

* L'application d'une pellicule huileuse ou autre à la surface de l'eau afin d'entraîner la mort des larves par asphyxie. Dans des gîtes clos (fosses septiques, réservoir d'eau) le recours à des billes de polystyrène expansé en couches à la surface de l'eau empêche la prolifération des moustiques pour de longues périodes ; ce système a été appliqué avec succès contre *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* et *Culex quinquefasciatus*.

- Méthodes biologiques

Les poissons larvivores et les Bactéries sont utilisés dans la lutte biologique contre les larves de moustiques :

* L'introduction de poissons ou autres prédateurs larvivores. La mise en place de poissons larvivores en eau propre (*Gambusia*) ou en eaux polluées (*Poecilia*) doit être faite de façon à ne pas déséquilibrer l'écologie locale.

* La lutte bactérienne : Elle inclut des organismes produisant des protéines cristallines qui sont toxiques pour les larves, ceci est le cas de *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) *Bacillus sphaericus*, *Brevibacillus laterosporus* et *Clostridium bifermentans*. Toutefois, seules les espèces *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) et *Bacillus sphaericus* sont communément utilisées, ceci due à leur forte toxicité et à leur large spectre d'espèces cibles (Qi Zhang *et al.*, 2017).

- Méthodes chimiques

Les méthodes de lutte chimique reposent sur l'utilisation des larvicides chimiques de synthèse, les hormones et les régulateurs de croissance des insectes.

* L'utilisation des composés chimique organiques synthétiques (insecticides usuels) : les organophosphorés, organochlorés, les pyréthrinoïdes sont utilisés à cet effet. Parmi ces composés seuls les organophosphorés (temephos et fenthion) sont recommandés, (OMS, 2013).

* Les Juvenoïdes sont (méthoprène et Pyriproxyfen) actifs sur les larves matures.

* Les Ecdysoïdes inhibent la formation de l'exosquelette de la larve après mue et sont actifs sur tous les stades larvaires.

* L'utilisation du Spinosyns ; ce sont des produits issus de la fermentation de *Saccharopolyspora spinosa*. Ces composés agissent sur le système nerveux en allant se fixer sur les récepteurs de l'AGAB (Acide Gamma AminoButyrique) et sur ceux de l'acétylcholine, interrompant ainsi la transmission normale de l'influx nerveux.

* L'utilisation des régulateurs de croissance des insectes (RCI): tels que le methoprene et les pyriproxyprene qui sont des hormones anti-juvéniles qui préviennent le développement des larves ou des nymphes en adultes.

I.7.2- Lutte contre les vecteurs adultes

Cette lutte est essentiellement basée sur l'utilisation des insecticides contre les adultes des moustiques.

* Pulvérisation d'insecticides sur les murs des habitations. Ces pulvérisations constituent une méthode appropriée de lutte antivectorielle quand toutes les conditions ci-après sont réunies :

- la population des vecteurs est en majorité endophile (le vecteur se repose à l'intérieur des habitations) ;
- le vecteur est susceptible à l'insecticide utilisé ;
- une proportion élevée des bâtiments dans la zone concernée ont des surfaces qu'il est possible de traiter correctement.

* Pulvérisation spatiale. On peut exceptionnellement avoir recours à ces méthodes pour la lutte contre les vecteurs exophiles et exophages.

* Une autre méthode aussi efficace pour la lutte contre les adultes est la stérilisation des mâles, puis leur relâchement dans la nature, l'introduction chez les vecteurs des gènes délétères au *Plasmodium*. Des essais de contrôle des maladies à transmission vectorielle à base des moustiques transgéniques ont donné des résultats intéressants au laboratoire (Catterucia *et al.*, 2003), mais leur utilisation en condition naturelle reste controversée.

I.7.3- Evaluation

* On considèrera attentivement les points ci-après dans un programme de larvicides et de pulvérisations :

- le moment d'application ;
- l'équipement ;
- les coûts ;
- la possibilité d'avoir recours à d'autres méthodes ;
- le choix, la formulation et le dosage de l'insecticide ainsi que les techniques de pulvérisation et les précautions à prendre.
 - On pourra faire appel aux éléments ci-après comme indicateurs de résultat ou de processus :
- couverture (proportion des zones adéquatement traitées) ;
- acceptation par la communauté ;
- attentes de la communauté ;
- indicateurs d'ordre entomologique.

I.7.4- Mesures de protection individuelle

- Insecticides et répulsifs à usage domestique

On trouve dans le commerce un vaste choix d'insecticides et répulsifs à usage domestique destinés à la lutte contre les vecteurs dans les foyers (aérosols, serpentins anti-moustiques, vaporisateurs et pulvérisateurs). Leur efficacité à diminuer les contacts entre vecteurs et humains est bien établie.

- Matériaux imprégnés d'insecticides

Parmi les matériaux imprégnés d'insecticides, on peut utiliser des moustiquaires, des tentures, des hamacs, des tissus disposés sous les avant-toits, des nattes en papyrus ou des pièces de tissu, après imprégnation, comme barrières ou répulsifs afin de diminuer les contacts entre l'Homme et les vecteurs. Le système de soin de santé primaire peut incorporer le traitement par insecticides des matériels destinés par exemple à la fabrication de

moustiquaires, sous la surveillance d'agents de santé communautaire ayant reçu une formation à cet effet.

- **Protection des habitations contre les vecteurs**

Les méthodes relatives à la protection des habitations contre les vecteurs peuvent toucher à l'architecture de la maison ainsi qu'à la pose de grillage au niveau des portes, des fenêtres et des avant-toits. L'emplacement des habitations et la qualité de la construction affectent les possibilités d'entrée des moustiques, leurs habitudes de repos et les contacts entre l'homme et les vecteurs. Les communautés doivent être sensibilisées aux conditions qui aggravent le risque d'exposition aux moustiques.

- **Aspects opérationnels relatifs aux moustiquaires et aux tentures imprégnés d'insecticides**

On tiendra compte des éléments ci-après :

- dosage de l'insecticide ;
- couverture / utilisation ;
- pourcentage de foyers et des individus au sein de chaque foyer qui utilisent les moustiquaires chaque nuit ;
- dosages biologiques / tests de mesure de l'efficacité rémanente de l'insecticide ;
- fréquence et taux de retraitements ;
- coûts.

1.8. Notion d'insecticide

La définition et le classement des insecticides présentés dans ces travaux sont de l'IRAC(2014)

I.8.1.Définition

Les insecticides sont des substances actives ou des préparations phytosanitaires ayant la propriété de tuer les insectes, leurs larves et/ou leurs œufs. Ils font partie de la famille des pesticides, eux-mêmes inclus dans la famille des biocides, tous deux réglementés en Europe par des directives spécifiques.

I.8.2. Classification des Insecticides

L'IRAC classe les insecticides en groupes ayant un mode d'action commun, puis en groupes chimiques à l'intérieur de ces groupes, l'ensemble comprend une cinquantaine de classes chimiques d'insecticides.

Le mode d'action est considéré comme la propriété la plus fondamentale d'un insecticide, davantage que la structure chimique elle-même, car des composés de structures chimiques très différentes peuvent se lier au même site cible et avoir exactement le même mode d'action. L'objectif poursuivi est de fournir un outil permettant aux utilisateurs de varier les traitements avec des substances de groupes différents, de façon à prévenir ou retarder le développement de phénomènes de résistance chez les insectes et les autres nuisibles.

Selon le mode d'action, on distingue les groupes suivants :

- toxines neuromusculaires qui attaquent le système nerveux ou les muscles ;
- régulateurs de croissance des insectes (IGR), qui affectent la croissance et le développement
- poisons respiratoires, également appelés poisons métaboliques, qui affectent le métabolisme de l'énergie ;
- perturbateurs de l'intestin, qui détruisent l'intégrité de la muqueuse intestinale ;
- perturbations au niveau de l'ADN polymérase, ce qui induit à la malformation de testicules ;
- des composés considérés comme des inhibiteurs multi-sites non spécifiques, qui interagissent avec une ou plusieurs cibles spécifiques ;
- des composés dont on considère qu'ils ont une action spécifique, mais dont les cibles sont actuellement inconnues.

Selon les groupes et sous-groupes chimiques on distingue :

- les Carbamates ou uréthanes sont une famille de composés organiques porteur de la fonction $R-HN(C=O)O-R'$; ce sont des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase, parmi les plus connus nous avons : le bendiocarbe, aldicarbe, benfuracarbe, aminocarbe, carbaryl, carbosulfan, carbosulfuran....
- composés organophosphorés qui sont des composés organiques comportant au moins un atome de phosphore ; ils sont également des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase ; parmi ces

composés nous avons : le cadusafos, chlorfenvinphos, chlorméphos, chlopyrifos, disulfoton, fenthion, malathion....

-Cyclodiènes / Hydrocarbures chlorés qui sont des antagonistes du canal ionique chlorure de l'acide gamma-amino-butyrique (GABA), parmi ces insecticides nous avons : le clodane et endosulfan ;

-phénylpyrazoles qui sont également des antagonistes du canal ionique chlorure du GABA ; dans ce groupe nous avons l'éthioprole et le fipronil ;

-pyréthrinoides qui sont des composés organochlorés, organofluorés ou organobromés dont la structure est dérivée de la pyréthrine, ce sont des perturbateurs du canal sodium ; ce groupe parmi les plus prisés comprend : la cyflothine, la cyhalothrine, la cyperméthrine la perméthrine, la deltaméthrine, l'élofenprox, la transfluthrine.....

-DDT et Méthoxychlore, ce sont également des perturbateurs du canal sodium ;

-néonicotinoides qui sont des dérivés de la nicotine, un alcaloïde toxique et psychotrope produit principalement par le tabac ; ce sont des antagonistes des récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine ; on distingue dans ce groupe : l'acetamipride, le clothianidine, l'imidaclopride, le thiaclopride....

-benzoylurés, ce sont des inhibiteurs de la biosynthèse de la chitine chez les insectes ; parmi ces insecticides nous avons : le diflobenzuron, le triflomoton, l'hexaflumuron, le chlofluazuron....

-spinosynes qui sont des activateurs des récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine ; ils sont au nombre de deux : le spinosad et le spinetoram ;

-Analogues d'hormones juvéniles : ce sont des inhibiteurs de l'hormone juvénile ; parmi ces analogues nous avons le méthoprene, l'hydroxyprène et le kinoprene ;

-*Bacillus* (bactéries du genre *Bacillus* et les protéines insecticides qu'elles produisent) : ce sont des perturbateurs microbiens des membranes de l'intestin moyen des insectes ; parmi ces Bactéries nous avons : *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus sphaericus*.

De tous ces groupes d'insecticides, seuls les organochlorés, les organophosphorés, les carbamates et les pyréthrinoides sont les plus utilisés aussi bien en santé publique qu'en agriculture.

I.9. Mécanismes de résistance des vecteurs aux insecticides

La résistance aux insecticides peut être définie comme «une modification héréditaire dans la sensibilité d'une population d'organismes nuisibles, se traduisant par l'échec répété d'un produit pour atteindre le niveau escompté de contrôle, lorsque le produit est utilisé conformément aux recommandations requises pour cette espèce nuisible» (IRAC, 2011).

L'utilisation d'insecticides en tant que telle, ne crée pas de résistance. Cependant, celle-ci peut se développer à cause d'une utilisation abusive ou mauvaise d'un insecticide contre une espèce nuisible. La résistance progresse lorsque la variation génétique qui survient naturellement permet à une faible proportion de la population, de résister et de survivre aux effets de l'insecticide. Si cet avantage est entretenu par utilisation constante du même insecticide, les insectes résistants se reproduisent et les changements génétiques qui confèrent la résistance sont transmis des parents aux descendants. La proportion de population résistante devient alors la majeure partie de la population.

Les principaux facteurs qui influencent le développement de la résistance sont: la fréquence d'application, la dose, la perennité de l'effet, le taux de reproduction, et l'isolement de la population.

Plusieurs types de mécanismes de résistance des moustiques et autres insectes aux insecticides ont été identifiés. La résistance peut impliquer un comportement d'évitement de l'insecte qui ne rentre pas en contact avec l'insecticide (résistance comportementale), une modification de l'absorption ou de l'excrétion de l'insecticide (résistance cuticulaire), une détoxification ou enfin une modification de sa cible. La résistance comportementale et les modifications de l'absorption ou de l'excrétion des insecticides sont des mécanismes de résistance relativement rares mais surtout mal élucidés. En revanche, l'augmentation de la détoxification des insecticides et les modifications des cibles sont des mécanismes à l'origine de niveaux de résistance très élevés chez les insectes. Chez les insectes, deux termes sont souvent employés pour décrire les différents types de résistance aux insecticides: la résistance croisée et la résistance multiple (Dusfour *et al.*, 2019). Lorsqu'une mutation est responsable de la résistance à plusieurs familles d'insecticides, on parle de résistance croisée. Un tel phénomène s'observe généralement entre les molécules ayant le même site d'action. A titre d'exemple, les organophosphorés et les carbamates ont des cibles et des modes d'action relativement similaires et la résistance à une famille entraîne souvent une résistance à l'autre. La résistance croisée désigne également la résistance à plusieurs insecticides avec des modes

d'action différents mais qui sont métabolisés par les mêmes enzymes (Hancock *et al.*, 2018). La résistance multiple est celle conférée par plusieurs mécanismes de résistance présents simultanément chez un insecte. Par exemple, un insecte possédant une ou deux mutations distinctes qui le rendent résistant à deux familles d'insecticides ayant des modes d'action différents (da Cruz *et al.*, 2019). La résistance multiple peut être aussi qualifiée de résistance multiplicative lorsque le niveau de résistance conféré par plusieurs mécanismes de résistance aux insecticides chez un insecte est plus élevé (synergie) que la sommation des niveaux de résistance conférée par ces mêmes mécanismes isolés (Kisinza *et al.*, 2017).

I.9.1- Résistance comportementale

Une modification du comportement en réponse à l'exposition aux insecticides peut conduire à une meilleure survie des insectes. L'insecte irrité par l'insecticide, s'envole plus ou moins rapidement en contact avec des surfaces traitées (Carasso *et al.*, 2019). Même si l'hyperirritabilité peut retarder l'apparition d'individus résistants au sein de la population, elle réduit néanmoins l'efficacité des traitements insecticides (Sherrard-Smith *et al.*, 2019). Cependant, très peu d'études sont disponibles sur ce type de mécanisme de résistance. Des pulvérisations répétées d'insecticides à l'intérieur des habitations en Thaïlande ont induit un changement de régime, endophile et anthropophile des femelles du moustique *Anopheles minimus* vers un régime plus exophile et zoophile (Tisgratog *et al.*, 2012). Ce changement de comportement trophique a été également observé chez *An. gambiae* et *An. funestus* en Tanzanie (Sherrard-Smith *et al.*, 2019) et au Bénin (Moiroux *et al.*, 2012).

I.9.2- Résistance cuticulaire

Elle correspond à toute modification chimique de la cuticule de l'insecte conduisant à une réduction de la pénétration de l'insecticide dans l'organisme. Des cas de résistance « cuticulaire » ont été rapportés chez des souches de *Musca domestica* (Wang *et al.*, 2019) et des moustiques du genre *Culex* (Huang *et al.*, 2018). Des études récentes ont montré une sur-transcription des gènes cuticulaires chez une souche d'*An. gambiae* résistante à la deltaméthrine suggérant leur rôle potentiel dans la résistance aux pyréthrinoides (Ingham *et al.*, 2018). Des observations au microscope électronique à balayage ont montré une plus grande épaisseur de cuticule chez une souche d'*An. funestus* résistante aux pyréthrinoides comparée à une souche sensible (Wood *et al.*, 2010). Seul, ce mécanisme offre des niveaux de

résistance faible comparé aux autres mécanismes physiologiques mais combiné à d'autres mécanismes, il est susceptible de générer des niveaux de résistance beaucoup plus importants (résistance multiplicative). Ainsi, il a été suggéré que ce phénomène pouvait être impliqué dans la résistance aux pyréthrinoides et agir de concert avec la résistance métabolique chez des moustiques du genre *Anopheles* (Djouaka *et al.*, 2008a).

I.9.3-Résistance par modification de cibles

Une modification de la conformation de la protéine cible de l'insecticide peut diminuer la capacité de fixation de ce dernier et donc son effet létal. Elle provient de la substitution d'un ou de plusieurs acide(s) aminé(s) dans la séquence de la protéine cible suite à une mutation ponctuelle (French-Constant, 2004). Dans la littérature, trois cibles principales au niveau du système nerveux ont été décrites: les mutations du canal sodium voltage dépendant (Jones *et al.*, 2012a ; Lynd *et al.*, 2018), du récepteur GABA (Wondji *et al.*, 2011) et de l'acétylcholinestérase (Alout *et al.*, 2008).

I.9.4- Résistance métabolique

La résistance métabolique se traduit par une augmentation du métabolisme des insecticides, généralement par des familles d'enzymes à large spectre de substrats. L'augmentation du métabolisme des insecticides peut être due à une surproduction d'une ou de plusieurs enzymes de détoxications existantes soit à un meilleur métabolisme de l'insecticide suite à une mutation d'une ou de plusieurs enzymes (Hemingway *et al.*, 2004). Ce phénomène se traduit par une diminution de la quantité d'insecticide atteignant la cible et donc à une augmentation de la tolérance/résistance de l'insecte. Chez les moustiques, trois grandes familles d'enzymes de détoxication sont impliquées dans la résistance aux insecticides: les monooxygénases à cytochrome P450 (CYPs) (Ibrahim *et al.*, 2016), les carboxylestérases (COEs) (Marcombe *et al.*, 2009) et les glutathion- S-transférases (Hemingway *et al.*, 2004, Enayati *et al.*, 2005).

I.10. Notions d'adjuvant

Un adjuvant est tout composé qui peut être ajouté à une formulation d'herbicide pour faciliter le mélange, l'application ou l'efficacité de cet herbicide. Les adjuvants sont déjà inclus dans les formulations de certains herbicides disponibles sur le marché (par exemple

RoundUp®), ou ils peuvent être achetés séparément et ajouté dans un mélange en réservoir avant utilisation (Pringnitz, 1998). Les herbicides doivent surmonter une variété de barrières à leur entrée dans les usines pour être efficace. Par exemple, les herbicides appliqués sur le feuillage doivent rester sur la feuille au lieu de se perler et de rouler, puis dépasser les poils et cires des feuilles à la surface des feuilles, puis pénétrer enfin à travers les parois cellulaires et les membranes cellulaires (DiTomaso 1999; Hull *et al.*, 1982). Certains adjuvants modifient la formulation de sorte qu'ils couvrent plus complètement et uniformément la surface des plantes, maintenant ainsi l'herbicide en contact avec des tissus végétaux plutôt que de perler et de rouler. D'autres formulations augmentent la pénétration à travers la cire cuticulaire, les parois cellulaires et / ou les ouvertures stomatiques. Dans certaines situations, un adjuvant peut améliorer la capacité de la formulation à tuer l'espèce ciblée sans nuire d'autres plantes (c.-à-d. améliorer sa sélectivité; Hess et Foy, 2000). Les adjuvants peuvent également améliorer l'efficacité d'un herbicide de sorte que la concentration ou la quantité totale d'herbicide nécessaire pour l'effet donné est réduite, parfois jusqu'à cinq ou dix fois (WSSA, 1982). De cette façon l'ajout d'un adjuvant approprié peut diminuer la quantité d'herbicide appliquée et réduire les coûts de la lutte contre les mauvaises herbes (Green, 1992 et 2001).

Les adjuvants sont des composés chimiquement et biologiquement actifs (non chimiquement inertes). Ils produisent des effets prononcés chez les plantes et les animaux, et certains adjuvants ont le potentiel d'être des polluants pour les eaux de surface ou souterraines. Il faut en être particulièrement conscient de l'utilisation d'adjuvants près de l'eau, car des effets nocifs peuvent survenir chez certaines espèces aquatiques (Parr, 1982). Les fiches de données de sécurité (FDS) de la plupart des adjuvants doivent répertorier les matières incompatibles avec les adjuvants, les conditions dans lesquelles ils ne doivent pas être utilisés et certaines informations toxicologiques (CL₅₀ ou DL₅₀), mais cette information n'est généralement pas aussi complète que celle trouvée sur les étiquettes d'herbicide et fiches signalétiques. Malheureusement, il n'y a pas de bon système disponible permettant de choisir ou de sélectionner les types d'adjuvants pour différentes situations, et encore moins quelles marques répondent le mieux aux besoins.

Les adjuvants peuvent être classés selon : leur fonction (activateur ou utilitaire), leur composition chimique (comme les organosilicones) ou selon leur origine (huiles végétales ou pétrolières) (Penner, 2000b).

Les adjuvants activateurs agissent pour améliorer l'activité de l'herbicide, souvent en augmentant les taux de l'absorption de l'herbicide dans la ou les plantes cibles. Les adjuvants

utilitaires, parfois appelés spray modificateurs, agissent en modifiant les caractéristiques physiques ou chimiques du mélange de pulvérisation pour améliorer sa facilité d'application, sa capacité à rester à la surface de la plante plutôt que de rouler, ou sa persistance dans l'environnement (McWhorter, 1982). Il y a beaucoup de désaccord concernant comment certains adjuvants doivent être catégorisés. Car en effet, certains adjuvants remplissent plus d'une fonction et rentrent donc dans plus d'une catégorie.

Dans notre étude, la notion d'adjuvant sera appliquée non par rapport aux herbicides mais par rapport aux insecticides de synthèse recommandés par l'OMS (Zaim et Atto, 2002) en perte d'efficacité ou nocifs aux organismes non ciblés.

I.11. Généralités sur *Cannabis sativa* et *Piper umbellatum*

I.11.1. Position Systématique de *Cannabis sativa*

La position systématique de *Cannabis sativa* L présentée dans ces travaux est tirée de Des Abbeyes *et al.*, (1963) et de APG III (Angiosperm Phylogeny Group III).

Règne des Plantae : êtres vivants organisés constitués de cellules ayant une membrane cytoplasmique doublée par une membrane cellulosique ou pectocellulosique ;

Embranchement des Cormophytes Tracheobionta : plantes comportant un appareil végétatif constitué de tissus et de vaisseaux bien différenciés dans lesquels circule la sève ;

Sous-Embranchement des Spermatophytes : plantes à fleurs ou à graines ;

Classe des Angiospermes ou Magnoliophyta : plantes à ovule enfermé dans l'ovaire.

Sous-classe des Dicotylédones : Angiospermes à plantules possédant deux cotylédons.

Ordre des Rosales ou Urticales : plantes aromatiques possédant un appareil sécréteur de résine et caractérisées par le développement de la coupe ou hypanthium portant sur ses bords périanthes et androcée.

Famille des Cannabaceae ou Cannabinaceae : plantes annuelles ou vivaces aux feuilles alternes ou opposées pétiolées, entières ou composées-palmées, stipulées, à limbe entier ou découpé, les inflorescences en cyme condensé.

Genre *Cannabis* : tige cannelée, plus ou moins ramifiée avec une taille comprise entre 1 et 2m. Les feuilles de la base de la tige sont opposées, celles de la partie supérieure sont alternes. Ces feuilles sont palmitisées avec 5 ou 7 segments ; 3 et 11 étant les nombres extrêmes ;

Espèce : *Cannabis sativa*

Le Chanvre (*Cannabis sativa*), est une herbe annuelle dressée, à tige cannelée pouvant atteindre de 1 à 4 mètres de hauteur. À la partie inférieure, les feuilles stipulées sont opposées, palmatiséquées avec 5 à 7 segments inégaux allongés et dentés. Vers le sommet de l'axe, les feuilles deviennent alternes, simples ou seulement à 3 segments. Ces plantes présentent des poils cystolithiques, des poils tecteurs et sécréteurs de résine. Les feuilles portent en effet trois types de poils caractéristiques :

- les uns sont formés d'une cellule renflée à la base, où se déposent des cristaux de carbonate de calcium : ce sont les poils cystolithiques ;
- d'autres poils, également unicellulaires mais sans bulbe à leur base, tapissent les épidermes : ce sont des poils tecteurs ;
- d'autres enfin ont un pied volumineux se terminant par un amas de plusieurs cellules, chacune sécrétant de la résine : ce sont les poils sécréteurs, abondants dans les chanvres riches en résine, surtout sur les bractées qui entourent les fleurs femelles (Botineau, 2010).

Les pieds mâles sont plus grêles et moins feuillus que les pieds femelles ; ses fleurs sont discrètes.

I.11.2. Position Systématique de *Piper umbellatum*

Tout comme *Cannabis sativa*, la position systématique de *Piper umbellatum* présentée dans ces travaux est tirée de Des Abbeyes *et al.*, (1963) et de APG III (Angiosperm Phylogeny Group III).

Règne des Plantae : êtres vivants organisés constitués de cellules ayant une membrane cytoplasmique doublée par une membrane cellulosique ou pectocellulosique ;

Embranchement des Cormophytes Tracheobionta : plantes comportant un appareil végétatif constitué de tissus et de vaisseaux bien différenciés dans lesquels circule la sève ;

Sous-Embranchement des Spermaphytes : plantes à fleurs ou à graines ;

Classe des Angiospermes ou Magnoliophyta : plantes à ovule enfermé dans l'ovaire.

Sous-classe des Dicotylédones : Angiospermes à plantules possédant deux cotylédons.

Ordre des Pipérales : Inflorescences spiciformes, de petites fleurs nues ou à périanthes rudimentaires ; les feuilles sont simples ;

Famille des Piperaceae : plantes herbacées, lianoïde ou ligneuses. Feuilles plus souvent alternes à stipules soudés sur le pétiole ; inflorescences en épis allongés et denses ; le fruit est une baie à péricarpe mince ;

Genre et espèce : *Piper umbellatum* :

Les estimations du nombre d'espèces que comprend le genre *Piper* vont de 1400 à plus de 2000 ; une quinzaine d'espèces sont originaires d'Afrique tropicale ou s'y sont naturalisées. Plante herbacée vivace ou arbuste grimpant atteignant 4 m de haut, fortement ramifié près de la base ; tiges issues d'un rhizome ligneux, succulentes, côtelées, s'enracinant aux nœuds. Feuilles alternes, simples et entières ; stipules absentes ; pétiole de 6,5–30 cm de long, s'engainant à la base ; limbe presque circulaire à réniforme, de 5–36(–40) cm × 4,5–37(–42) cm, base profondément cordée, apex courtement acuminé à arrondi, relativement mince, vert foncé au-dessus, grisâtre au-dessous, ponctué de glandes noires, peu à densément poilu sur les nervures au-dessus et au-dessous, 11–15-palmatinervé ; les fleurs sont blanches, minuscules et en épis.

I.11.3. Bioécologie de *Cannabis sativa*

- Appareil reproducteur

Les fleurs mâles sont réunies en panicules, réduites à 5 sépales verdâtres libres et 5 étamines épisépales à filets dressés dans le bouton floral.

Les fleurs femelles sont en cymes compactes, entremêlées de bractées : le calice urcéolé enveloppe l'ovaire bicarpellé, mais l'un des carpelles avorte et il n'y a qu'un seul ovule. Le fruit, usuellement nommé « chènevis » est un akène ovoïde lisse, grisâtre, de 2,5 à 3,5 mm de longueur sur 2,5 à 3 mm de diamètre (Bitineau, 2010). La répartition entre les sexes est proche de 50/50. À la germination, on ne peut pas distinguer les jeunes plantes mâles des femelles. C'est seulement durant la dernière phase de croissance, lorsque débute la formation des fleurs, que la détermination du sexe devient possible. Les plantes mâles développent de petits sacs de pollen qui serviront à féconder les plantes femelles à stigmates poilus et résineux. Les fleurs femelles possèdent deux longs stigmates blancs, jaunes ou roses, qui jaillissent de l'involucre d'un calice à paroi très mince et couverte de glandes qui sécrètent de la résine. Les fleurs femelles apparaissent par paires, à l'aisselle des feuilles. Leur calice, pas plus long que 3-6 mm, est complètement entouré d'un carpelle.

Les fleurs mâles possèdent un calice muni de 5 sépales de quelque 5 mm de longueur, de couleur jaune, blanche ou verte. Elles fleurissent inclinées vers le bas et possèdent 5 étamines longues d'environ 5 mm (Richard et Senon, 2010). La surface supérieure des sépales est couverte de trichomes (poils) glanduleux.

- **Ecologie de *Cannabis sativa***

Le Cannabis est une plante originaire d'Asie ayant une grande distribution géographique. C'est une plante de lumière adaptée aux sols moins humides, au pH basique à texture argileuse et riches en nutriments; elle est également non tolérante aux sols salés et adaptée à des températures assez élevées. Le cannabis est une plante annuelle susceptible d'être cultivée en extérieur comme en intérieur pourvu que les apports en eau et en chaleur soient suffisants. Extrêmement résistant, il est rarement sujet aux maladies cryptogamiques et est uniquement sensible à un excès d'humidité. La plus grande partie du Cannabis cultivé aujourd'hui dans les pays occidentaux provient de croisements effectués à partir de variétés dont le cycle végétatif est court : ces cultivars peuvent être produits en intérieur comme en extérieur, même dans des régions tempérées ou fraîches

I.11.4. Applications diverses de *Cannabis sativa*

Le *cannabis* est utilisé comme drogue depuis des temps immémoriaux. Il est prisé sous trois formes : la marijuana, le haschich et l'huile de haschich. Un de ses principaux composés, le Delta-9-Tétrahydrocannabinol a un effet psychotrope sur le cerveau (Hall *et al.*, 1994). Néanmoins, le cannabis est associé à plusieurs applications médicales. Ainsi, il est utilisé pour plusieurs aspects:

-chimiothérapie : des tests sur des animaux ont révélé que le cannabidiol (CBD) était bénéfique dans le traitement des nausées (Mechoulam *et al.*, 2002) ;

-le traitement du VIH : des patients ayant reçu un traitement antirétroviral ainsi que des gélules de dronabinol ou de la marijuana fumée pour atténuer les nausées et vomissements, ont vu diminuer considérablement leurs symptômes ; les nausées et vomissements étant des effets indésirables fréquents des antirétroviraux, l'observance du traitement est alors améliorée (De Jong *et al.*, 2005) ;

-traitement de la douleur : divers cannabinoïdes exerceraient une activité antalgique centrale reconnue (Manzanares *et al.*, 2006) qui serait liée à une inhibition de la transmission GABAergique induite par leur interaction avec les récepteurs CB1 (Hosking *et al.*, 2008) ;

-traitement de la sclérose en plaque (Hagenbach *et al.*, 2001), de la maladie d'Alzheimer (Milton, 2002), de la maladie de Parkinson (Snider et Consroe, 1985), du glaucome (Grotenhermen, 2004) de l'épilepsie (Cunha *et al.*, 1980), de l'asthme allergique (Tashking *et al.*, 1975) ;

-traitement anti-cancer : l'action anti proliférative des dérivés du *Cannabis* a été démontrée sur des modèles animaux (Galve-Roperh *et al.*, 2000) et en culture cellulaire (Jacobsson *et al.*, 2001).

I.11.5. Bioécologie de *Piper umbellatum*

Originaire d'Amérique tropicale, *Piper umbellatum* a été introduit et s'est largement naturalisé dans tous les tropiques, y compris l'Afrique tropicale continentale et les îles de l'océan Indien. Sur le continent africain, il est présent depuis la Guinée et la Sierra Leone jusqu'en Ethiopie, et vers le sud jusqu'en Angola et au Mozambique.

- Appareil reproducteur

Inflorescence : épi axillaire ou opposé aux feuilles de 5,5–15 cm de long, 2–8 groupés en fausses ombelles ; pédoncule de 3–12 cm de long ; bractées des pédoncules étroites, de 6–8 mm de long, blanches, caduques, bractées florales triangulaires à arrondies, atteignant 1 mm de large, à bords poilus, blanches, ivoire ou jaunes. Fleurs minuscules, bisexuées, sessiles ; périanthe absent ; étamines 2 ; ovaire supère, 1-loculaire, stigmates 3. Fruit : drupe charnue à 3 angles, de 0,5–1 mm × environ 0,5 mm, brunâtre, contenant 1 graine. Graines globuleuses, minuscules.

Piper umbellatum peut fleurir toute l'année lorsqu'il y a assez d'eau. *Piper umbellatum* se multiplie par graines. Les graines montrent une dormance qui peut être levée par le soleil direct.

- Ecologie de *Piper umbellatum*

Piper umbellatum se rencontre dans le sous-bois de la forêt pluviale sempervirente, mais également dans les clairières et sur les berges de rivière ; il est toujours présent dans des

endroits humides, jusqu'à 1800 (–2100) m d'altitude. C'est une adventice commune des plantations ; dans les cacaoyères du Ghana et les plantations de palmier à huile du Cameroun, il peut être gênant.

I.11.6. Applications diverses de *Piper umbellatum*

La plupart des espèces du genre *Piper* sont surtout utilisées comme épice, mais elles ont aussi des usages médicaux. *Piper umbellatum* est utilisé depuis des temps anciens dans l'art culinaire comme épice ; en médecine traditionnelle pour soigner les maux d'estomac. Cette plante est également utilisée comme répulsif contre les mouches domestiques, contre les abeilles afin de récolter du miel en journée. Les indigènes frottent les feuilles sur le corps afin de repousser les abeilles. L'extrait de *Piper umbellatum* apparaît efficace contre la phospholipase du venin myotoxique de serpent (Núñez *et al.*, 2005). *Piper umbellatum* est non toxique pour les petits Mammifères (Da Silva *et al.*, 2014) et a exhibé des effets protecteurs et cicatrisant contre les ulcères d'estomac à titre expérimentale chez les rats (I.F. da Silva Junior *et al.*, 2016) . L'extrait au dichlorométhane des feuilles de *Piper umbellatum* a exhibé des propriétés anti cancer et anti inflammatoire au Brésil (Hespporte Iwamoto *et al.*, 2015). *Piper umbellatum* est utilisé pour traiter des blessures au Cuba (Salehi *et al.*, 2019) et en Afrique de l'Ouest chez plusieurs tribus (Setzer *et al.* ;1999) ; pour traiter la fièvre au Pérou et l'onchocercose au Cameroun (Cho-Ngwa *et al.*, 2016). *Piper umbellatum* est aussi utilisé pour traiter les affections des reins, de la peau, des brûlures, la diarrhée, le rhumatisme, le paludisme et les parasitoses intestinales (Roersch, 2010).

I.12. Généralités sur les huiles essentielles

I.12.1. Aperçu historique

Les huiles essentielles sont des liquides aromatiques et volatils obtenus à partir de matières végétales, incluant les fleurs, les racines, l'écorce, les feuilles, les graines, les écorces, les fruits, le bois et les plantes entières (Hyldgaard *et al.*, 2012). Tout au long de l'histoire, ces huiles ont été considérées avec un grand intérêt, bien que bon nombre de leurs utilisations a disparu avec le temps, il est généralement admis que les êtres humains les ont extraites à partir de plantes aromatiques depuis l'aube de l'humanité. Les applications des huiles essentielles à des fins différentes sont variées et incluent non seulement leur utilisation en cuisine pour améliorer le goût et les bienfaits pour la santé des aliments, mais également leur application dans la fabrication de parfums et de cosmétiques.

Les anciens Égyptiens utilisaient les huiles essentielles en médecine, en parfumerie et dans l'art d'embaumer et de préparer les corps à l'enterrement par momification. Dans l'Asie antique, les Védas codifiaient les utilisations des parfums et des aromatiques à des fins liturgiques et thérapeutiques. En effet, au cours de l'histoire, de nombreuses civilisations ont utilisé des huiles essentielles et des parfums à des fins diverses, y compris pour des cérémonies religieuses, dans la production de parfums, ou comme agents thérapeutiques contre les infections. Les Phéniciens, les Juifs, les Grecs, les Romains et d'autres cultures situées autour du bassin méditerranéen ainsi que les Mayas et les Aztèques des Amériques possédaient tous une culture de parfum très raffinée (Sonwa, 2000).

Après la chute de l'Empire romain et avec l'avènement des civilisations chrétiennes et musulmane, l'art et la science du parfum ont été introduits dans le monde arabe, où il a atteint un haut niveau de sophistication. Au Moyen Âge, cette connaissance des parfums a été ramenée en Europe par les croisés revenant de Terre Sainte et a été développée par les alchimistes ainsi que dans les monastères. Les alchimistes ont cherché à créer «l'élixir de vie» afin de vivre indéfiniment tandis que les monastères utilisaient des huiles essentielles pour obtenir divers médicaments pour soigner différentes maladies ou pour rendre aromatiques des dérivés tels que le savon et le parfum. À la Renaissance, l'utilisation des huiles essentielles en parfumerie et cosmétique s'est étendue à travers le monde (Sonwa, 2000).

I.12.2. Concept et définition

Les huiles essentielles sont des substances odoriférantes et très volatiles présentes dans les plantes. En raison de leur volatilité, ces substances peuvent être isolées par distillation à la vapeur d'une plante aromatique d'une seule espèce botanique et peuvent être détectées à la fois par l'odeur et le goût. Les huiles essentielles individuelles sont connues sous le nom de la plante dont elles sont dérivées et l'odeur est similaire à celle de la partie de la plante dont elles sont issues, bien que l'arôme soit généralement plus intense.

Il existe différentes définitions des huiles essentielles, mais la plus précise est probablement celle proposée par Schilcher, Hegnauer et Cohn-Riechter, qui a été résumée par Sonwa (2000): «Les huiles essentielles sont des produits ou des mélanges de produits, qui se forment dans le cytoplasme et sont normalement présents sous forme de minuscules gouttelettes entre les cellules. Ils sont volatiles et aromatiques ». Ils sont composés de «mélanges de substances parfumées ou de mélanges de substances parfumées et inodores», où une substance parfumée

est définie comme «un composé chimiquement pur qui est volatil dans des conditions normales et qui, en raison de son odeur, peut être utile à la société».

L'Organisation Internationale de Normalisation (ISO) a défini les huiles essentielles comme «produit obtenu à partir de matières premières naturelles d'origine végétale, par distillation à la vapeur, par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des agrumes, ou par distillation sèche, après séparation de la phase aqueuse le cas échéant par des procédés physiques », en précisant que« l'huile essentielle peut subir des traitements physiques qui n'entraînent aucun changement significatif dans sa composition». D'autres groupes, sociétés et entreprises encore ont établi leurs propres critères de concept et de qualité. Par exemple, l'Association Française de Normalisation, la Fragrance Materials Association, l'International Fragrance Association, le Bundesinstitut für Risikobewertung, le Research Institute for Fragrance Materials et le Scientific Committee on Consumer Safety ont tous établi des normes pour réglementer les quantités maximales et les utilisations de certaines huiles ainsi que des composés uniques. (Sonwa, 2000; Turek et Stintzing, 2013). Néanmoins, les normes ISO sont généralement acceptées dans le monde entier.

Comme défini ci-dessus, les huiles essentielles sont des mélanges complexes, généralement formés de nombreux constituants, généralement liquides, mais parfois solides. À température ambiante, ces mélanges varient généralement de couleur incolore à légèrement jaunâtre lorsqu'ils sont fraîchement distillés, avec une odeur aromatique, très propre au toucher et facilement absorbés par la peau. Contrairement au légume gras, huiles animales ou minérales, une goutte d'huile essentielle sur papier disparaît rapidement, prenant entre quelques minutes et quelques jours, selon la température. De plus, les huiles essentielles ont généralement une faible densité, sauf dans des cas particuliers tels que les huiles de cannelle, de clou de girofle et de saffron, qui sont plus denses que l'eau. Ils ont une faible solubilité dans l'eau, mais sont solubles dans la plupart des solvants organiques courants, y compris l'éthanol et l'éther diéthylique, et se mélangent bien avec les huiles végétales, les graisses et les cires.

Les huiles essentielles ont un indice de réfraction et un pouvoir rotatoire élevés, ce qui pourrait être intéressant pour leur identification et leur contrôle qualité; cependant, cet indice de réfraction a tendance à être variable en raison des différents codes actuellement utilisés dans le monde.

I.12.3. Variabilité des huiles essentielles

Près de 3000 huiles essentielles différentes ont été décrites. Parmi elles, environ 300 sont utilisées commercialement sur le marché des arômes et des parfums (Burt, 2004). Cependant, la grande variabilité de la composition chimique des plantes aromatiques présente un problème potentiellement sérieux pour l'industrie de la fabrication de parfums. Pour cette raison, de nombreuses recherches se sont concentrées sur les facteurs contribuant à cette variété autres que strictement génétiques. Par exemple, les enquêteurs ont décrit des races distinctes de la même espèce, par exemple *Melaleuca bracteata*, qui sont riches en différents constituants principaux, chacun produisant une huile essentielle différente avec soit du méthyl eugenol, du méthyl isoeugenol et de l'élémicine. Autres plantes aromatiques, comme le pavillon doux (*Acorus calamus*), l'absinthe (*Artemisia absinthium*), le basilic doux (*Ocimum basilicum*), la mélisse (*Melissa officinalis*), le thym (*Thymus vulgaris*), le camphrier (*Cinnamomum camphora*), la menthe poivrée (*Mentha piperita*), ou tanaïsie (*Tanacetum vulgare*) ont été largement étudiées et différents chémotypes et races chimiques ont été décrits (Evans, 2009). Il a également été découvert que d'autres facteurs peuvent modifier la composition chimique des huiles essentielles, comme le climat, les précipitations ou l'origine géographique de la plante.

I.12.4. Présence et fonctions des huiles essentielles dans le règne végétal

Les huiles essentielles sont généralement formées comme métabolites secondaires. Dans de nombreux cas, ils sont stockés dans des cellules non différenciées (Lauracées) ou des organes sécréteurs, tels que les poils glandulaires (Lamiaceae et Asteraceae), les conduits sécrétoires (schizogènes chez les Myrtaceae et schizolysigénous chez les Rutaceae), ou les cavités (Conifères). Parfois, l'huile essentielle ne se forme pas dans la plante elle-même, mais elle est produite par hydrolyse de certains composés présents dans la plante, comme c'est le cas dans la valériane ou l'ail (Evans, 2009; Franz et Novak, 2010).

En ce qui concerne leur localisation, les huiles essentielles peuvent se former dans toutes les parties de la plante, y compris les parties aériennes, généralement constituées de fleurs, de feuilles et de tiges (camomille, menthe poivrée, lavande); écorce (cannelle); fruits (anis); graines (muscade); ainsi que dans le radix et les rhizomes (curcuma et gingembre).

Le rôle des huiles essentielles dans une plante donnée varie: dans certains cas, elles sont utilisées pour la pollinisation, dans d'autres cas, elles sont utilisées comme mécanisme de

défense, souvent comme répulsif ou irritant. De plus, il existe différentes théories sur leur rôle possible en tant qu'antioxydants dans la mesure où ils donnent de l'hydrogène dans les réactions oxydatives, en particulier en présence de lumière. On pense également qu'ils sont antifongiques et antibactériens, protégeant la plante d'une éventuelle attaque pathogène (Evans, 2009).

I.12.5- Contrôle et analyses

Différentes méthodes ont été utilisées pour contrôler et analyser les huiles essentielles (Zellner *et al.*, 2010). Actuellement, cependant, l'identification des composants des huiles essentielles est généralement effectuée à l'aide de la chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse (GC – MS) équipée d'un détecteur à ionisation de flamme (FID) et de détecteurs MS, d'une colonne capillaire (30 m × 0,25 mm, épaisseur du film 0,25 µm), et une fente. Les conditions de test peuvent varier en fonction de la colonne et de l'échantillon. Par exemple, les expériences GC – MS sont souvent effectuées avec des températures d'injecteur et de détecteur de 250 et 270 ° C, respectivement, avec le four initialement à 50 ° C pendant 2 à 3 min, puis en augmentant de 3 à 10 ° C / min jusqu'à ce qu'il atteigne 200–240 ° C, avec un débit de 0,7–1,0 µL / min. Normalement, l'hélium est utilisé comme gaz vecteur à un débit de 0,7 à 1,0 ml / min, les échantillons sont dilués (1/10, v / v) et le volume injecté est de 0,2 µL en mode fractionné (rapport de division 1:44). Les résultats sont généralement traités avec un programme de recherche spectrale de masse de la bibliothèque (Viuda-Martos *et al.*, 2007; Chamorro *et al.*, 2012).

Pourtant, l'évolution des techniques analytiques a augmenté à la fois la qualité et la capacité d'analyse. Par exemple, Filippi *et al.*, (2013) ont utilisé un GC bidimensionnel complet pour analyser les huiles essentielles de vétiver en utilisant un système GC – MS équipé d'un GC × GC avec un modulateur cryogénique à double jet / boucle et un four secondaire installé dans le four GC principal. Dans la même veine, Pellati *et al.*, (2013) ont utilisé les techniques GC – MS et GC – FID pour l'analyse phytochimique des huiles essentielles. Ainsi, la spectrométrie de masse par rapport élément isotope-analyseur (IRMS) et la combustion GC (C) -IRMS ont été utilisées pour déterminer la composition $\delta^{13}\text{C}$ des échantillons en vrac ainsi que certains composants spécifiques. La détermination de l'empreinte isotopique $\delta^{13}\text{C}$ au moyen du GC – C – IRMS représente une méthode efficace,

rapide et pratique pour l'évaluation de l'authenticité des composants cibles des huiles essentielles.

I.12.6. Composition chimique

Les huiles essentielles sont composées de métabolites végétaux secondaires lipophiles et très volatils, atteignant une masse inférieure à un poids moléculaire de 300. Dans les toutes premières définitions des huiles essentielles, celles-ci étaient fortement identifiées avec les terpènes, principalement les monoterpènes et sesquiterpènes. Cependant, avec l'identification d'autres types de composés, en particulier les phénols allyliques et isoallyliques, la définition originale a changé. Différents terpènes avec un plus grand nombre de carbones ont également été trouvés, principalement des diterpènes. D'autres substances ont également été identifiées dans les huiles volatiles obtenues par distillation. Cela est dû au fait que de nombreux autres métabolites végétaux tels que les graisses, les coumarines, les anthraquinones et certains alcaloïdes sont distillables, tandis que certains composés sont dérivés de glycosides, qui sont transformés au cours du processus de distillation. En général, les principaux composants des huiles essentielles sont formés par les monoterpènes et sesquiterpènes. Dans certains cas, les principaux dérivés sont des hydrocarbures (par exemple, la térébenthine, formée par l' α - et le β -pinène) tandis que dans d'autres, les principaux composants sont oxygénés (par exemple, les clous de girofle, formés par l'eugénol). Dans un nombre réduit d'espèces, les dérivés prédominants sont des principes aromatiques; il s'agit notamment du thym au thymol et du carvacrol, de la menthe poivrée au menthol et de l'anis à l'anéthol (Bakkali *et al.*, 2008; Sell, 2010; Chamorro *et al.*, 2012).

- Terpènes

Les huiles essentielles formées de composés et de dérivés terpéniques sont généralement constituées de monoterpènes et sesquiterpènes, qui peuvent être des hydrocarbures ou oxygénés, comme décrit ci-dessus. Cependant, ils peuvent également être dérivés des dérivés aliphatiques ou alicycliques et certains peuvent avoir des structures aromatiques. Des exemples d'huiles essentielles de ce groupe étendu comprennent la térébenthine (*Pinus* spp.) avec α et β -pinène, le géraniol de rose de Damas (*Rosa damascena*), l'huile d'arbre à thé (*Melaleuca alternifolia*) avec terpinène-4-ol, la coriandre (*Coriandrum sativum*) avec linalol, menthe poivrée (*Mentha piperita*) avec menthol, citron (*Citrus limon*) avec limonène, cumin (*Carum carvi*) avec carvone, absinthe (*Artemisia absinthium*) avec thuyone, eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) avec cinéol, et chenopodium (*Chenopodium*

ambrosioides) avec ascaridole comme exemples de monterpènes. Des exemples de sesquiterpènes comprennent le bois de santal (*Santalum album*) avec du santalol, la camomille allemande (*Matricaria recutita*) avec du bisabolol et le gingembre (*Zingiber officinale*) avec du zingiberol.

- **Phénols allyliques**

Certaines plantes aromatiques ont une huile essentielle formée principalement de dérivés aromatiques dérivés d'allyle ou d'isoallyl phénol. Les plantes contenant ces composés sont plus rares que celles contenant des terpènes, mais cela ne sert qu'à rendre ce type de composé sélectif. Certains exemples pertinents d'huiles essentielles avec ces types de composés sont ceux de l'anis (*Pimpinella anisum*), l'anis étoilé (*Illicium verum*) et le fenouil (*Foeniculum vulgare*), tous avec du trans-anethol; cannelle (*Cinnamomum verum*) avec aldéhyde trans-cinnamique; et le clou de girofle (*Syzygium aromaticum*) avec de l'eugénol.

- **Autres constituants**

D'autres composés volatils peuvent également être présents dans les huiles essentielles. Dans le cas particulier des huiles essentielles issues de procédures autres que la distillation, comme l'enfleurage, l'extraction avec des solvants ou le pressage, des composés non volatils peuvent être présents. Dans de nombreux cas, ce sont des précurseurs de dérivés connus, tels que les lactones sesquiterpéniques ou les glycosides, qui dans certains cas sont hydrolysés ou transformés en composés volatils au cours du processus de distillation alors qu'en cas d'extraction, ils peuvent être présents sous leur forme originale dans l'extrait. D'autres composés trouvés dans les huiles essentielles comprennent le ligustilide de livèche (*Ligusticum levisticum*) et les coumarines, qui bien que présents en faibles quantités peuvent être détectés dans certaines plantes ou espèces aromatiques pertinentes, telles que la lavande et le lavandin (*Lavandula* spp.) qui peuvent contenir jusqu'à 0,3 % de coumarine. D'autres exemples sont la furanocoumarine dans l'huile essentielle de bergamote (*Citrus bergamia*), qui contient souvent du bergaptène; sinalboside (glucosinolate) de moutarde blanche (*Brassica alba*); salicylates de gaulthérie (*Gaultheria procumbens*); et l'amygdaline de l'amande amère (*Prunus communis* var. *amara*), qui libère du benzaldéhyde et du cyanure d'hydrogène

I.12.7. Utilisation des huiles essentielles

L'utilisation d'huiles essentielles est extrêmement diversifiée selon la source, la qualité, la procédure d'extraction, etc... Les huiles essentielles ont des applications industrielles approuvées dans la fabrication de parfums, cosmétiques, savons, shampoings ou gels nettoyants. Un autre aspect intéressant de ces huiles est leur potentiel comme agents thérapeutiques en aromathérapie ou comme principes actifs ou excipients de médicaments. Une autre application importante des huiles essentielles est dans l'industrie agroalimentaire, à la fois pour la production de boissons et pour aromatiser les aliments.

- Produits de beauté

L'utilisation d'huiles essentielles dans l'industrie des cosmétiques, du savon, des détergents et des parfums présente un grand intérêt d'un point de vue économique. La production mondiale d'huiles essentielles pour la préparation de parfums a nettement augmenté, des groupes spécifiques de plantes aromatiques étant très recherchés sur le marché. Les chémotypes concrets de la salvia, de la lavande et du thym sont particulièrement prisés pour l'obtention de parfums fins et nouveaux. À cette fin, la technologie de production et une sélection adéquate de la matière première sont des éléments essentiels pour améliorer la qualité du produit final.

- Médecine et pharmacie

Les huiles essentielles sont utilisées en pharmacie pour leur potentiel en tant qu'agents médicinaux (Harris, 2010; Lis-Balchin, 2010). C'est notamment le cas des huiles essentielles d'eucalyptus (*E. globulus*), de menthe poivrée (*Mentha piperita*), d'anis (*Pimpinella anisum*), de sauge (*Salvia officinalis*), de clou de girofle (*Syzygium aromaticum*) et d'arbre à thé (*Melaleuca alternifolia*). Ces huiles sont utilisées comme expectorants pour traiter la toux et la bronchite (eucalyptus), comme agents antimicrobiens (sauge, arbre à thé et clou de girofle), comme décongestionnant des voies respiratoires (menthe poivrée), et comme carminatif (anis), entre autres utilisations. Ainsi, l'huile de clou de girofle est utilisée en dentisterie pour ses propriétés antiseptiques et analgésiques tandis que l'huile d'arbre à thé est utilisée en dermatologie comme agent antiacné en raison de son activité antimicrobienne contre les bactéries à Gram positif (Buchbauer, 2010). De plus, certaines huiles essentielles sont utilisées en pharmacie pour l'aromatisation des préparations pharmaceutiques et l'amélioration de leur goût. En effet, l'aromathérapie peut être la principale application des huiles essentielles comme agents médicinaux. L'administration d'huiles essentielles obtenues à

partir de différentes sources se fait à travers une variété de méthodes d'application. Le terme «aromathérapie» a été créé par Gattefossé dans les années 1920 et a été relancé par Maury dans les années 1960. Depuis les années 1980, sa popularité n'a cessé d'augmenter. Actuellement, il est assez bien implanté en Australie, au Canada, en France, en Allemagne, en Nouvelle-Zélande, en Suisse, au Royaume-Uni et aux États-Unis (Lis-Balchin, 2010; Boehm *et al.*, 2012).

La méthode d'application la plus courante des huiles essentielles est topique sous forme diluée, souvent avec une huile de support dans le cadre de la massothérapie (Boehm *et al.*, 2012). Elles peuvent également être inhalées après avoir ajouté quelques gouttes à l'eau fumante ou au moyen d'un atomiseur ou d'un humidificateur. De plus, elles peuvent être appliquées sous forme de pommades, de crèmes et de compresses (Boehm *et al.*, 2012). Cependant, l'application orale d'huiles essentielles par encapsulation ou par d'autres méthodes de libération programmée a été introduite comme méthode efficace pour obtenir les effets bénéfiques de ces substances (Karlsen, 2010). Elles peuvent être consommées sous forme de thé avec du sucre ou en capsules molles, ce qui permet un dosage plus précis tout en évitant plusieurs effets indésirables. Néanmoins, il est possible que la toxicité des huiles essentielles soit plus élevée lorsqu'elles sont administrées de cette manière.

- Agroalimentaire

Les huiles essentielles sont utilisées dans une grande variété de biens de consommation tels que les produits alimentaires de confiserie, les boissons gazeuses et la distillation de breuvages alcoolisés. En plus de leur utilisation répandue comme matériau aromatisant (Kettenring et Geeganage, 2010), ils sont utilisés dans les domaines nutritionnel et agricole pour leurs propriétés antibactériennes, antifongiques, antivirales, nématocides, insecticides et antioxydantes (Turek et Stintzing, 2013; Lopez-Reyes *et al.*, 2013). Pour cette raison, leur utilisation comme antioxydants et conservateurs dans les aliments a été suggérée (Tiwari *et al.*, 2009; Hyldgaard *et al.*, 2012), soit incorporée dans le matériau d'emballage des denrées alimentaires (Kuorwel *et al.*, 2011) ou comme protecteurs des plantes et des cultures (Adorjan et Buchbauer, 2010). De nombreuses huiles essentielles ont des propriétés antioxydantes (Dandlen *et al.*, 2010) et antimicrobiennes (Lang et Buchbauer, 2012), mais leur application comme conservateurs alimentaires nécessite une bonne connaissance de leurs propriétés, y compris la sensibilité des micro-organismes cibles, le mode spécifique de leur action antimicrobienne et l'effet des composants de la matrice alimentaire sur leurs propriétés antimicrobiennes (Hyldgaard *et al.*, 2012).

I.12.8. Techniques d'extraction des huiles essentielles

Une fois la matière première végétale identifiée, il convient d'utiliser une méthode d'extraction adaptée pour son obtention (Aziz *et al.*, 2018). La neuvième édition de la Pharmacopée européenne indique que les huiles essentielles sont obtenues par : hydrodistillation, distillation sèche (procédé mécanique sans chauffage). Il existe cependant d'autres méthodes destinées à des utilisations dans d'autres domaines que la santé. De ce fait, à partir d'une même matière première végétale, une multitude d'extraits différents peuvent être réalisés, parmi lesquels on retrouve les huiles essentielles. Il existe pour chacune de ces méthodes d'extraction de nombreuses variantes. À l'heure actuelle, la distillation reste la méthode de référence.

- Hydrodistillation

La distillation est un processus ancien puisque les premières traces connues remonteraient à 5000 ans dans la vallée de l'Indus (De Sousa, 2012). Cette technique d'extraction est connue depuis l'antiquité, a été transmise par les Arabes et a été perfectionnée par les industriels de Grasse (Alpes-Maritimes). Cette méthode, une des plus anciennes mais aussi une des plus simples, est depuis peu délaissée au profit de nouveaux procédés de distillation pour des raisons de qualité et de coût de production (Duval, 2012). Aujourd'hui, c'est une méthode normée, que ce soit pour l'extraction des huiles essentielles ou pour le contrôle de leur qualité (AFNOR, 1996). Le principe général de l'hydrodistillation est le suivant : on chauffe dans un alambic jusqu'à ébullition une suspension d'une matière première végétale dans l'eau de sorte que la vapeur d'eau entraîne les substances volatiles de la plante. Cette vapeur est récupérée et condensée. L'huile essentielle constituée de ces différentes substances volatiles se sépare par gravité de l'eau à laquelle elle n'est pas miscible. La chaleur qui s'applique sur la matière première végétale permet l'éclatement des cellules et la libération des molécules contenues. Il se forme un mélange azéotrope comprenant l'eau et les molécules volatiles dont la température d'ébullition est proche des 100°C alors que la température d'ébullition des molécules aromatiques seules est souvent très supérieure (Lucchesi, 2005). L'hydrodistillation permet donc de limiter le chauffage à appliquer sur la matière première.

La distillation peut se faire avec ou sans système de recyclage de la phase aqueuse (cohobage). Celle-ci est alors récupérée après séparation de l'huile essentielle et directement réintroduite dans le mélange eau/matière première. Ce système est intéressant puisqu'il

permet de s'assurer qu'il reste toujours de l'eau dans la chaudière, ce qui permet de limiter la montée en température synonyme de dégradation rapide de la matière première végétale. Un dispositif d'agitation peut également être ajouté pour éviter l'accumulation de matière solide au fond de la cuve (Tuley de Silva, 1995). La durée d'extraction est variable d'une plante à une autre et peut atteindre plusieurs heures, elle a une influence sur le rendement mais également la composition finale de l'huile essentielle. En effet, les essences riches en composés lourds nécessitent un temps de chauffage plus long pour permettre une extraction satisfaisante. Le travail peut se faire dans un circuit à pression réduite, notamment pour les molécules difficiles à entraîner. La température d'ébullition sera alors considérablement diminuée et les dégradations liées à la température diminuées d'autant. Cependant, le coût d'un tel équipement et de son fonctionnement limitent son utilisation (Lucchesi, 2005). Cette extraction peut être assistée par différentes technologies comme les micro-ondes ou les ultrasons, permettant de réduire le temps d'extraction tout en améliorant le rendement.

Ce procédé d'extraction présente plusieurs avantages. Outre sa relative simplicité de mise en œuvre, c'est son faible coût qui en fait une méthode d'intérêt. De plus, la matière végétale étant en suspension dans l'eau, on peut lui appliquer un brassage qui assure la pénétration de l'eau en son centre, là où la vapeur d'eau utilisée dans d'autres méthodes, ne peut pénétrer. C'est par exemple le cas pour les pétales de roses qui ont tendance à s'agglomérer, ce qui rend l'extraction de cette huile essentielle insatisfaisante par entraînement à la vapeur. Cependant, un certain nombre d'inconvénients ont fait que cette méthode soit peu à peu remplacée par d'autres. Cette méthode ne s'applique qu'à une plus petite échelle que d'autres techniques. C'est également un procédé beaucoup plus lent que l'entraînement à la vapeur et qui nécessite de ce fait un apport d'énergie plus important, ce qui relativise le faible coût de l'installation. Dans cette technique, la matière première baigne dans l'eau, à température élevée et pendant plusieurs heures, ce qui facilite la survenue d'un certain nombre de transformations au sein de l'essence. Les esters sont en partie hydrolysés, les hydrocarbures monoterpéniques acycliques et les aldéhydes ont tendance à polymériser. Certains composés oxygénés tels que les phénols se dissolvent en partie dans l'eau contenue dans l'alambic et ne sont donc pas extraits (Tuley de Silva, 1995 ; Handa *et al.*, 2008).

- Entraînement à la vapeur

L'entraînement à la vapeur d'eau est une variante plus récente de distillation dans laquelle il n'y a pas de contact direct entre la matière végétale et l'eau. Ici, de la vapeur d'eau est produite dans une chaudière séparée, puis injectée à la base de l'alambic dans lequel se

trouve la plante. La vapeur remonte dans l'alambic et traverse la plante. De la même façon que dans l'hydrodistillation, on assiste à un éclatement des cellules et à la formation d'un mélange azéotrope, récupéré en haut de la cuve et condensé (Lucchesi, 2005). L'un des principaux intérêts de cette méthode par rapport à l'hydrodistillation est la préservation de la qualité de l'essence. En effet, dans le cas présent, la plante ne macère pas dans l'eau, ce qui limite les phénomènes d'hydrolyse mais également de solubilisation de certains composés hydrosolubles (comme les phénols) qui sont donc mieux extraits. Le risque de dégradation par la chaleur est également mieux maîtrisé puisque le chauffage ne se fait pas directement sur la cuve contenant la matière première végétale (De Sousa, 2012). La génération de la vapeur dans une chaudière externe permet d'en contrôler la quantité, la pression ou encore la température à laquelle se fait l'extraction ; elle permet également de réduire le temps d'extraction et l'apport énergétique nécessaire. Enfin, l'entraînement à la vapeur permet généralement des extractions à plus grande échelle. Cependant, cette méthode trouve sa limite dans le coût des installations nécessaires à sa mise en œuvre, bien plus important que pour l'hydrodistillation. Cela pose un problème de rentabilité pour les huiles essentielles présentes en grande quantité et à faible prix sur le marché. Un problème d'accessibilité du matériel se présente également dans les zones pauvres ou particulièrement reculées (Handa *et al.*, 2008).

Il existe une variante à cette méthode appelée hydrodiffusion ou percolation. Dans ce cas, le flux de vapeur n'est plus orienté de bas en haut mais traverse la plante à partir du haut de la cuve et est récupérée à sa base. C'est une méthode encore plus économe en temps et en énergie car elle consomme moins de vapeur. Elle est cependant plus chère à employer et n'est utilisée que pour les matières premières fragiles et dont les huiles essentielles ont un prix plus élevé (De Baser et Buchbauer, 2009). Par le procédé d'extraction, il est possible de retrouver dans l'huile essentielle des composés non volatiles, qui n'auraient pas été extraits par une autre méthode, c'est pourquoi il est préférable de parler ici « d'essence de percolation » et non d'huile essentielle (Piochon, 2008).

- Vapo-hydrodistillation

Il s'agit d'une variante à mi-chemin entre l'hydrodistillation et l'entraînement à la vapeur dans laquelle la matière végétale et l'eau se trouvent dans la même enceinte mais ne sont pas en contact. L'eau est portée à ébullition par le chauffage de la cuve, se transforme en vapeur et passe au travers de la plante, posée sur une grille au-dessus de l'eau.

- **Distillation sèche**

La distillation sèche est une méthode d'extraction des huiles essentielles reconnue par la pharmacopée européenne mais on ne retrouve dans la pratique peu de documents s'y rapportant. Cette technique, très peu utilisée, consiste en un chauffage doux de la matière première, sans eau ni solvant organique. Les substances volatiles sont ensuite condensées et récupérées. La température est ici inférieure à 100°C, ce qui limite une nouvelle fois les phénomènes de dénaturation liés au chauffage. L'absence d'eau permet également de préserver les substances volatiles de l'hydrolyse. On obtient par ce procédé une huile essentielle de grande qualité, assez fidèle à l'essence présente dans la plante, mais avec un rendement très faible. C'est donc une méthode qui convient aux matières premières particulièrement fragiles (Duval, 2012 ; Lucchesi, 2005).

- **Expression à froid**

L'expression à froid correspond au troisième procédé d'extraction décrit par la pharmacopée européenne comme un « procédé mécanique sans chauffage ». Elle ne concerne que la production des huiles essentielles à partir de fruits frais du genre *Citrus*. C'est la méthode de production la plus simple.

On regroupe sous le terme « expression à froid » tout processus permettant par des moyens mécaniques et sans chauffage d'extraire les huiles essentielles des fruits des agrumes. En règle générale, c'est l'huile essentielle présente dans les glandes oléifères de l'épicarpe que l'on cherche à récupérer. Les moyens utilisés vont de la simple abrasion du zeste du fruit au broyage de la peau dans son intégralité. Cette méthode étant la plus respectueuse du produit de départ, le terme « essence » convient parfaitement pour désigner les huiles essentielles obtenues par ce procédé. En effet, aucune modification n'a lieu au cours de l'extraction. Les méthodes de productions ayant considérablement évolué, les essences de certains agrumes sont peu à peu devenues des sous-produits de la production de jus de fruits. S'il est de ce fait nécessaire de porter une attention particulière à la qualité des huiles essentielles obtenues, cela permet également d'en baisser considérablement le coût (Dugo et Di Giacomo, 2002). Ce procédé d'extraction s'est imposé car il est le seul à permettre l'obtention d'une huile essentielle de qualité satisfaisante. En effet, les procédés faisant appel à un chauffage et/ou à l'eau, comme la distillation, entraînent de trop grandes modifications de composition et de caractères organoleptiques de l'essence. Par exemple, certains aldéhydes aliphatiques présents dans le genre *Citrus* sont thermosensibles et donnent après distillation des composés

malodorants qui rendent l'huile essentielle difficilement exploitable (Baser et Buchbauer, 2009). L'expression à froid permet au contraire de conserver dans l'essence l'odeur caractéristique du fruit. Les méthodes mécaniques permettent également de conserver les molécules apolaires et non volatiles, habituellement absentes des huiles essentielles produites par distillation (flavonoïdes, stéroïdes, acides gras, furocoumarines substituées, etc...). Certaines d'entre-elles sont intéressantes comme les tocophérols, antioxydants naturels qui favoriseront la conservation de l'essence (Dugo et Di Giacomo, 2002). En entraînant les molécules apolaires non volatiles, il est malheureusement possible d'extraire également différents produits chimiques utilisés au cours de la culture ou pour la conservation des fruits (Dugo et Di Giacomo, 2002).

- Enfleurage et extraction par les graisses chaudes

L'enfleurage est une ancienne technique d'extraction des parfums des fleurs qui a principalement été utilisée dans la région de Grasse (Alpes-Maritimes) jusque dans les années 1930.

Il s'agit d'une extraction à froid par la graisse. Celle-ci est étalée sur une surface plate (tamis ou plateau), les fleurs sont déposées une à une et à la main à sa surface. Par son grand pouvoir d'absorption, la graisse fixe le parfum. On pratique des remplacements successifs des fleurs jusqu'à saturation de la graisse (Handa, 2008). La matière grasse est ensuite récupérée pour former une « pommade ». Cette pommade subit des traitements successifs à l'alcool qui permettent un passage progressif des substances odorantes de la graisse vers l'alcool, qui sera par la suite éliminé pour donner l'absolu d'enfleurage. L'enfleurage n'est donc pas une technique d'obtention des huiles essentielles, mais de bases parfumées utilisées dans le domaine de la parfumerie. Cette technique est particulièrement intéressante pour les fleurs qui continuent à dégager leur parfum après la cueillette, comme par exemple la fleur de jasmin (*Jasminum grandiflorum* L.). Dans le cas de cette espèce, les fleurs sont remplacées toutes les 24h pendant environ 70 jours (Garneau, 2005). L'enfleurage est une méthode pour laquelle le travail manuel nécessite une main-d'œuvre expérimentée et qualifiée, la rendant particulièrement longue et onéreuse.

L'extraction par les graisses chaudes suit le même principe : l'extraction des substances odorantes des fleurs par de la graisse, réutilisée jusqu'à saturation. Dans le cas de l'extraction à chaud, la matière végétale et la graisse sont chauffées à une température de quelques dizaines de degrés, pendant une à deux heures. Après filtration, la graisse est de nouveau

chauffée avec des fleurs fraîches jusqu'à saturation. Elle est ensuite traitée comme dans l'enfleurage mais donnera cette fois-ci l'absolue de macération (Handa, 2008). L'intérêt de la méthode réside dans la diminution du temps de contact fleur/graisse et le moindre besoin en main-d'œuvre.

- Extraction par les solvants

L'extraction par les solvants est un procédé inspiré de l'enfleurage qui utilise des solvants non aqueux. Il peut s'agir de l'hexane, d'éthers de pétrole, d'huiles, de gaz... Le solvant idéal devant répondre aux critères suivants (Garneau, 2005) :

- être sélectif : extraire les molécules aromatiques mais pas les molécules indésirables comme les pigments ;
- avoir une température d'ébullition basse, pour permettre une élimination simple ;
- être chimiquement inerte vis-à-vis des substances à extraire ;
- ne pas être miscible à l'eau, qui rendrait la purification de l'extrait plus délicate ;
- être peu coûteux ;
- ne pas présenter de contre-indication dans les domaines d'application de l'extrait obtenu ;
- ne pas être inflammable ;
- présenter la plus faible toxicité possible.

Aucun solvant ne remplit la totalité de ces conditions, mais le plus utilisé est l'hexane. L'intérêt de ces solvants est leur pouvoir d'extraction des parfums très supérieur à celui de l'eau. Cependant, ils n'entraînent pas seulement les composés volatiles.

Le point négatif des solvants organiques est leur toxicité. Ce qui réduit les champs d'application des extraits obtenus (appelés « concrètes »), notamment dans les domaines pharmaceutiques et agroalimentaires (Piochon, 2008)

- Extraction par le CO₂ supercritique

L'extraction par le CO₂ supercritique est un cas particulier d'utilisation d'un solvant, apparue dans les années 1980. La technique met à profit une propriété originale du CO₂ qui, au-delà du point critique (pression de 73,8 bars et température de 31,1°C), se trouve dans un état intermédiaire entre le liquide et le gaz lui conférant un important pouvoir d'extraction des molécules aromatiques. Le principe général de la méthode est le suivant : le CO₂, porté aux

conditions de température et de pression souhaitées, chemine au travers de la matière première végétale dont elle tire et volatilise les molécules aromatiques. Le mélange passe ensuite dans un séparateur, où le CO₂ est détendu et se vaporise. Il est soit éliminé, soit recyclé. L'extrait se condense et est récupéré (Fernandez et Chemat, 2012).

C'est une technique en plein développement et promise à un bel avenir en raison de ses nombreux avantages. En effet, le CO₂ répond à de nombreux critères évoqués plus haut relatifs au solvant « idéal ». Il est naturel, chimiquement inerte, non inflammable, peu toxique, sélectif, relativement peu coûteux car abondant et son élimination se fait facilement sans le moindre résidu. De plus, l'extraction se faisant sans eau et à une température peu élevée, il n'y a pas de transformations chimiques, ce qui rend la méthode encore plus attractive. Les inconvénients de cette méthode résident dans la complexité des installations qui les rendent chères et donc inaccessibles aux petits producteurs, d'autant que sa mise en œuvre nécessite une bonne maîtrise technique. La méthode demande plus d'énergie, ce qui gonfle encore plus les coûts de production (Fernandez et Chemat, 2012). Ce procédé est également intéressant par la possibilité de jouer sur sa sélectivité d'extraction en faisant varier les conditions de température et de pression. Il est donc possible de rapprocher la composition de l'extrait CO₂ de celle d'une huile essentielle ou au contraire de favoriser certaines molécules pour coller aux exigences d'une utilisation future (Piochon, 2008). Ces variations de conditions influent également beaucoup sur le rendement. Une fois de plus, on ne parle plus ici d'huile essentielle puisque la composition chimique de l'extrait peut se montrer très différente. Une étude a été menée sur la composition d'extraits de *Pimenta dioica* L. dont le composant principal est l'eugénol. Si leur extrait CO₂ en contient 77,9%, l'huile essentielle obtenue par hydrodistillation n'en contient que 45,4%. Une telle différence de composition aura donc un impact significatif sur l'activité des extraits, ce qui justifie de bien faire la distinction entre les deux (Périno-Issartier *et al.*, 2013). Gaspar et Leeke (2004) ont montré que pour certaines plantes au moins, un prétraitement (par exemple un broyage ou une division de la plante) de la matière végétale était nécessaire afin de garantir un rendement proche de celui de l'hydrodistillation.

La composition des extraits CO₂ diffère de celle des huiles essentielles par la concentration des composés principaux, mais également par le nombre de composés que l'on y trouve. En effet, le CO₂ supercritique permet d'extraire un nombre plus important de molécules (Thavanapong *et al.*, 2010). On sait également que le CO₂ favorise l'extraction des composés les plus volatiles en comparaison à l'hydrodistillation (Gaspar et Leeke, 2004).

L'extraction par le CO₂ en phase supercritique permet donc d'obtenir un produit de qualité intéressante pouvant être proche de l'huile essentielle et surtout de l'essence d'origine. Cette méthode trouve déjà des applications dans de nombreux domaines.

- Extractions assistées par les micro-ondes

L'utilisation des micro-ondes pour l'obtention des huiles essentielles est une méthode décrite au début des années 1990. Il s'agissait alors d'une hydrodistillation par les micro-ondes, sous vide. La matière végétale est placée dans une enceinte close et chauffée par les micro-ondes. Les molécules volatiles sont entraînées par la vapeur d'eau formée à partir de l'eau contenue dans le végétal. La vapeur est ensuite récupérée et traitée de la même façon que dans les méthodes traditionnelles. Le temps d'extraction, et par extension l'énergie nécessaire, a ainsi été diminué d'un facteur 5 à 10 selon les plantes ; Il faut par exemple quinze minutes pour traiter 2kg de menthe poivrée (*Mentha piperita* L) avec un rendement de 1%, contre deux heures pour un même résultat par hydrodistillation (Piochon, 2008).

Aujourd'hui, la tendance est plus à l'hybridation des techniques. On parle de méthodes d'extractions assistées par micro-ondes (Farhat, 2010) Dans le cas de l'hydrodistillation, c'est le ballon où est chauffé le mélange d'eau et de matière végétale qui se trouve dans l'enceinte de l'appareil micro-onde. On observe alors une importante réduction du temps d'extraction avec une légère augmentation du rendement d'extraction, sans différence significative dans la composition chimique de l'huile essentielle. La réduction du temps de contact avec l'eau et la réduction de la température de chauffage permettent de mieux préserver les composés oxygénés de l'essence (Kosar *et al.*, 2007 ; Glmakani et Razaei, 2008 ; Gavahian *et al.*, 2012)

L'utilisation des micro-ondes permet également de répondre à une exigence nouvelle dans l'extraction des huiles essentielles, celle de la recherche de technologies « vertes ». En effet, cette technique ne nécessite pas l'utilisation de solvants chimiques. Elle est économique en énergie, en temps et en investissement. La qualité de l'huile essentielle étant préservée, cela en fait une bonne alternative aux méthodes classiques (Lucchesi *et al.*, 2004).

CHAPITRE II : CADRE D'ETUDE ET METHODOLOGIE

II.1. CADRE D'ETUDE

L'étude a eu lieu dans la ville de Yaoundé, cité capitale du Cameroun située entre 3°43'00"- 3°58'00" de latitude Nord, 11°24'30"- 11°34'30" de longitude Est et à environ 750 m d'altitude. Sa superficie est de 183 km² et sa population est d'environ 4 millions d'habitants (BUCREP, 2021). Cette ville fait partie du domaine équatorial avec un climat de type guinéen, composé de deux saisons pluvieuses (septembre - mi-novembre et mi-mars - juin) qui alternent avec deux saisons sèches (mi-novembre - mi-mars et juillet - août). Ce climat est caractérisé par une abondance des pluies (1688mm/an), une température moyenne annuelle de 26,31°C contrastée entre 16°C et 31°C selon les saisons et une amplitude thermique annuelle de 32,8°C. L'hygrométrie moyenne, de 80%, varie dans la journée entre 35 et 98%. Les vents sont fréquents, humides et soufflent dans la direction Sud/Ouest tandis que les vents violents sont orientés Nord/Ouest (Suchel, 1987, Wéthé *et al.*, 2003). La végétation est caractérisée par des forêts semi-décidues et par une végétation dominée par les Sterculiaceae et les Ulmaceae (Letouzey, 1985). La ville de Yaoundé compte de nombreuses collines dont les amonts sont dominés par les sols ferralitiques, et les bas-fonds marécageux caractérisés par des sols hydromorphes (Suchel, 1987). Le réseau hydrographique est dense, formé de nombreux cours d'eau parmi lesquels le fleuve Mfoundi et la rivière Mefou. Ces caractéristiques sont propices au développement des vecteurs du paludisme et font de la ville de Yaoundé une zone d'endémie palustre.

II.2. METHODOLOGIE

II.2.1. Matériel

Le matériel utilisé dans ce travail est constitué de : sites de récolte de Culicidae, matériel biologique et matériel technique.

- Sites de récolte des Culicidae

Les stades aquatiques des Culicidae utilisées dans notre étude ont été récoltés respectivement aux abords de la rivière Ewoé et dans l'étang de Melen derrière la Faculté de Médecine et des Sciences Biomédicales de l'Université de Yaoundé I.



Figure 14 : Sites de récolte des stades aquatiques des Culicidae ; A : Rivière Ewoé encaissée ; B et C : lieux de récolte aux abords de la rivière Ewoé (N 03°51'34,9'' et E 011°31'3'') ; D : Etang de Melen ((N 03°85'63,1'' et E 011°49'49,4'') (échelle ; 1/250)

- **Matériel biologique**

* **Matériel végétal**

Il est constitué des feuilles de *Cannabis sativa* et de *Piper umbellatum*. Ce matériel a été récolté en matinée (avant le lever du soleil) respectivement dans un champ au village Salla (N 04°6'30'' et E 012°30'3'') (Ayos) et au Campus de l'Université de Yaoundé I (N 03°51'33,9912'' et E 011°29'47,60'') emballés dans des papiers journaux, enfermés dans des sacs en plastique et transportés directement au laboratoire pour l'extraction des huiles essentielles. Les plantes étaient à la floraison et non ravagées par les insectes.

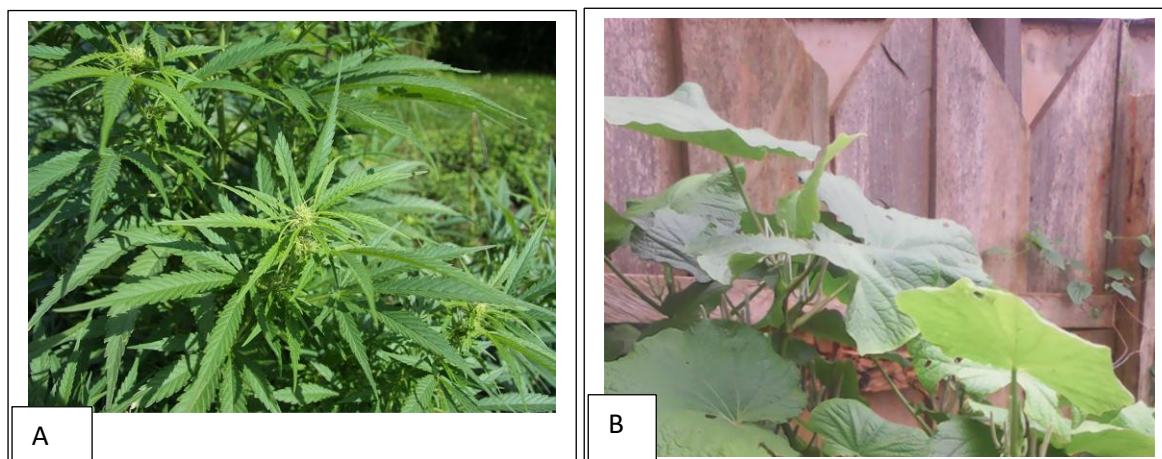


Figure 15 : Parties aériennes de A- *Cannabis sativa* et B- *Piper umbellatum*

*** Matériel animal**

Les œufs d'*Anopheles gambiae* s.s ‘souche de Yaoundé’ utilisée pour notre étude ont été obtenus de l’OCEAC (Organisation de Coordination pour la lutte contre les Endémies en Afrique Centrale) à Yaoundé. Les larves et les nymphes de la souche sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. et de *Culex* sp. ont été capturées aux bords de la rivière Ewoé au lieu-dit Nouvelle route Nkolndongo et dans l’étang de Melen, respectivement. Un lapin mâle en bonne santé âgé de six mois acquis dans un élevage de la station de recherche de l’IRAD (Institut de Recherche Agronomique pour le Développement) a été utilisé pour le gorgement des adultes femelles d’anophèles élevés au laboratoire.

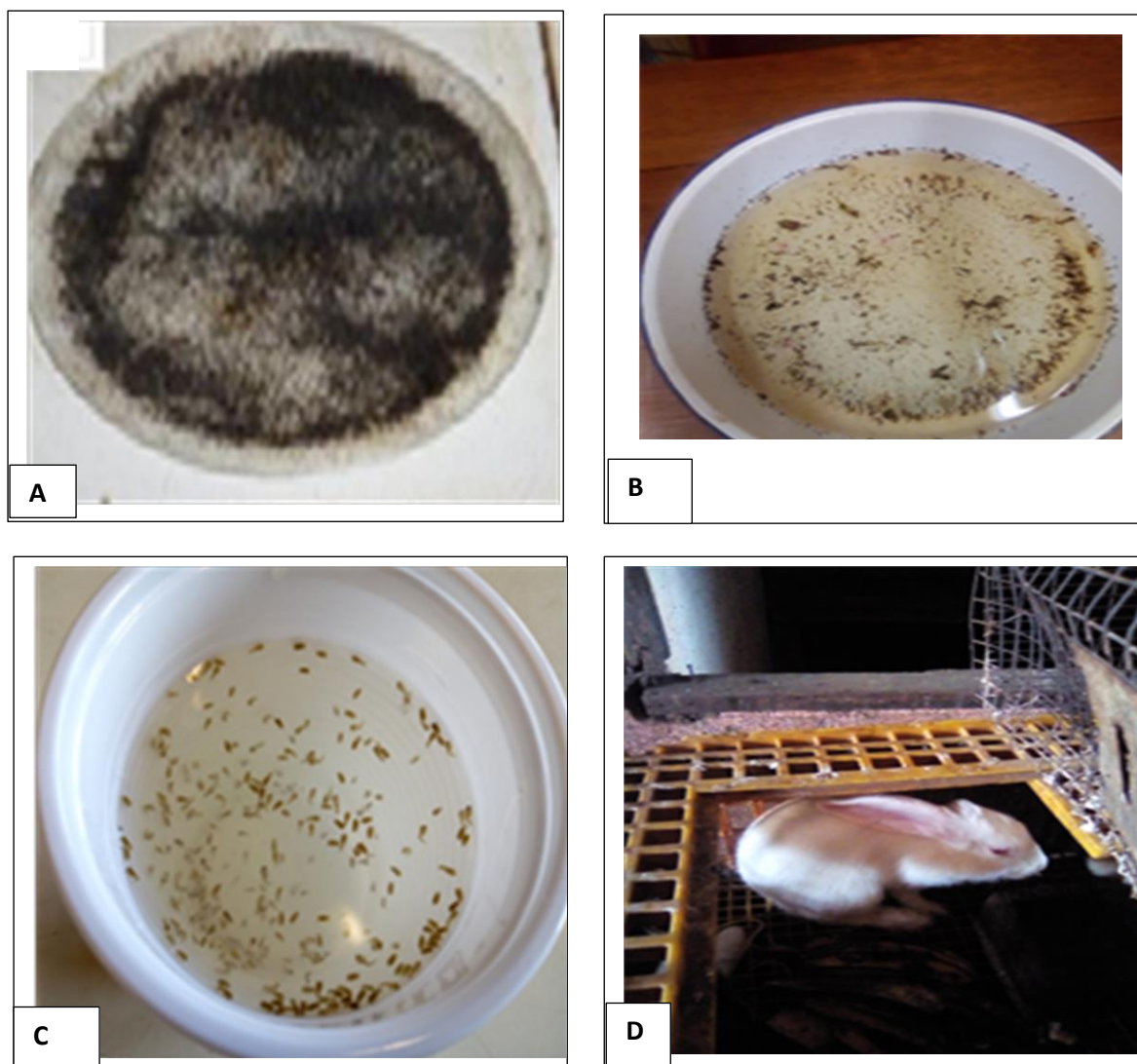


Figure 16 : Matériel animal ; A : œufs d'*Anopheles gambiae* s.s.(1/2) ; B: larves d'*Anopheles gambiae* s.s.(1/10) ; C : nymphes d'*Anopheles gambiae* s.s.(1/2). ; D : lapin mâle (1/50)

II.2.2. Récolte des larves de Culicidae

La récolte des larves d'*Anopheles gambiae* s.l. et de *Culex* sp. a été effectuée en matinée entre huit heures et dix heures (afin d'éviter les périodes très chaudes de la journée) respectivement aux bords de la rivière Ewoé (N 03°51'34,9'' et E 011°31'3'') en saison des pluies (d'août à mi-novembre 2016) et dans l'étang du quartier Melen (N 03°55'63,1'' et E 011°49'49,4'') derrière la Faculté de Médecine et des Sciences Biomédicales de l'Université de Yaoundé I, durant presque toute l'année (figure 15). La méthode de « Dipping » (Service, 1971) par pression d'un récipient à la surface de l'eau aux différents endroits du gîte, afin d'y laisser entrer une quantité d'eau contenant les stades aquatiques des Culicidae a été utilisée. En effet, la répartition des larves de Culicidae à la surface de l'eau d'un gîte n'étant pas

homogène (Service, 1971), la récolte s'est faite sur plusieurs points différents des gîtes larvaires. Les larves et les nymphes de moustique ont été récupérées à l'aide d'une pipette Pasteur et introduites dans un bidon de 30 dm³ avec l'eau du gîte pour le transport au laboratoire. Ce bidon reste ouvert pour l'aération.

Au cours des trois premières descentes dans les gîtes, les larves et les nymphes de Culicidae récoltés ont été élevés et les adultes ayant émergés ont été identifiés en utilisant les clés de Coetzee et De Meillon (1987), de Reuben (1994) et de Jupp (1996). Cette identification morphologique préalable a révélé que les moustiques des sites de récolte étaient constitués du complexe *gambiae* et majoritairement de *Culex quinquefasciatus*, respectivement pour les abords de la rivière Ewoé et pour l'étang de Melen.



Figure 17 : Différentes étapes de récolte des stades aquatiques de Culicidae par la méthode Dipping. A et B : pression du récipient dans l'eau ; C et D : remontée vers la rive ;E Pipettage des stades aquatiques de Culicidae ; F : introduction de Culicidae récoltés dans le bidon (1/250)

II-2.3. Elevage des larves de Culicidae et constitution de la souche au laboratoire

Pour élever les larves de Culicidae au laboratoire, nous avons introduit 100 larves par récipient de 4,5 dm³ contenant chacun 2 litres d'eau de source pour éviter le surpeuplement. La température était comprises entre 25°C et 28°C, une humidité relative de 78% et une photopériode de 12 :12 (Tchuinkam et *al.*, 2011). Toutes les larves de chaque espèce de moustique sauvage (*Culex* sp. et *Anopheles gambiae* s.l.) récoltées dans chacun des sites sus-cités ont été mises ensemble dans les récipients sans distinguer les stades de développement. Les nymphes ramenées du terrain ont été prélevées à l'aide d'une pipette Pasteur et transférées dans des gobelets en plastique et placées dans des cages pour émergence. Les larves ont été élevées avec l'eau de leur gîte respectif, riches en microorganismes animaux et végétaux. Au bout de trois jours, cette eau a été remplacée par l'eau de

source (du quartier Simbock) pour éviter la mortalité due à la pollution suite à la mort des microorganismes et à la fermentation de l'aliment. Nous les avons nourri ensuite à la Tetramin, à raison de 2,5mg pour 100 larves par jour (Price *et al.*, 2015, Vantaux *et al.*, 2016).

Les œufs d'*Anopheles gambiae* s.s. acquis auprès de l'OCEAC ont été trempés dans l'eau de source puisée au quartier Simbock (Quartier périphérique de la ville de Yaoundé). Trois jours après l'éclosion, les larves ont été réparties dans dix-huit récipients afin d'obtenir une densité moyenne de 100 larves par récipient. Elles ont été nourries à la Tetramin (Aliment conçu pour les alevins) à raison de 2,5mg pour 100 larves par jour (Price *et al.*, 2015, Vanitaux *et al.*, 2016)

Les nymphes obtenues ont été prélevées à l'aide d'une pipette Pasteur, introduites dans des gobelets en plastique et placées à l'intérieur des cages cubiques (30 cm de côté) enveloppées d'un tulle moustiquaire non imprégné (figure 17).



Figure 18 : Tri des nymphes de Culicidae ramenées du terrain. A : bassine contenant des larves et des nymphes ; B et C : transfert des nymphes dans des gobelets en plastique ; D : gobelet en plastique contenant des nymphes ; E : cage pour émergence des imagos de Culicidae

II.2.4. Gorgement des femelles d'anophèles

Un lapin mâle (*Oryctolagus cuniculus*) de six mois, en bonne santé, acquis auprès de la ferme d'élevage de l'IRAD à Nkolbisson (Yaoundé) a été utilisé pour le gorgement des femelles de la souche de laboratoire d'*Anopheles gambiae* s.s.(figure 18). La face ventrale du

lapin a été rasée à l'aide d'une tondeuse électrique. Sur une planche creusée en son centre, le lapin est placé en décubitus ventrale au-dessus de la cage et maintenu immobile au moyen des ficelles. Les adultes femelles d'anophèle de la souche de laboratoire vont ainsi prendre leur repas sanguin pendant 15 minutes. Cette opération a été répétée après deux jours, afin de stimuler le cycle gonotrophique et obtenir une ponte maximale (Mouchet et Carnevale, 1991). Cette prise de repas sanguin a eu lieu trois à quatre jours après l'émergence des imagos.

II.2.5. Entretien de la souche d'*Anopheles gambiae* s.s. au laboratoire

- Oeufs

Les œufs ont été recueillis sur un pondoir (formé d'une boîte de Petri contenant du coton imbibé d'eau de source du quartier Simbock et recouvert de papier filtre Watmann No I) le lendemain matin de leur ponte et conservés dans des boîtes de Pétri fermées pendant 24 heures à la température ambiante pour leur maturation. Le deuxième jour, (48 heures après la ponte), le papier filtre Watmann No I contenant ces œufs est subdivisé en 6 parcelles qui sont trempées dans des récipients de 4,5 dm³ remplis à moitié d'eau de source. Nous avons mis environ 300 œufs par assiette.

- Larves

Les larves ont été nourries au Tétramin, aliment conçu pour alevins d'aquarium. Grâce à une balance de précision, nous avons pesé et fourni aux larves 2,5 mg pour 100 larves par jour (Thuinkam *et al.*, 2011)..

- Nymphes

Les nymphes issues de la transformation des larves ont été prélevées à l'aide d'une pipette Pasteur et disposées par lots de 50 dans des gobelets en plastique placés dans des cages pour émergence.

- Adultes

Après l'émergence, les adultes d'*Anopheles gambiae* s.s ont été maintenus dans des cages et nourris au saccharose à 10% imbibé dans du coton hydrophile. Cette ration est renouvelée tous les deux jours. Un pondoir formé du coton imbibé d'eau dans une boîte de Pétri de 10 cm de diamètre et recouvert de papier filtre est déposé dans chacune des cages. Les femelles y pondent des œufs utilisés pour la prochaine génération.

Après chaque cycle, tous les récipients ont été lavés et séchés afin d'éviter la contamination du milieu d'élevage.

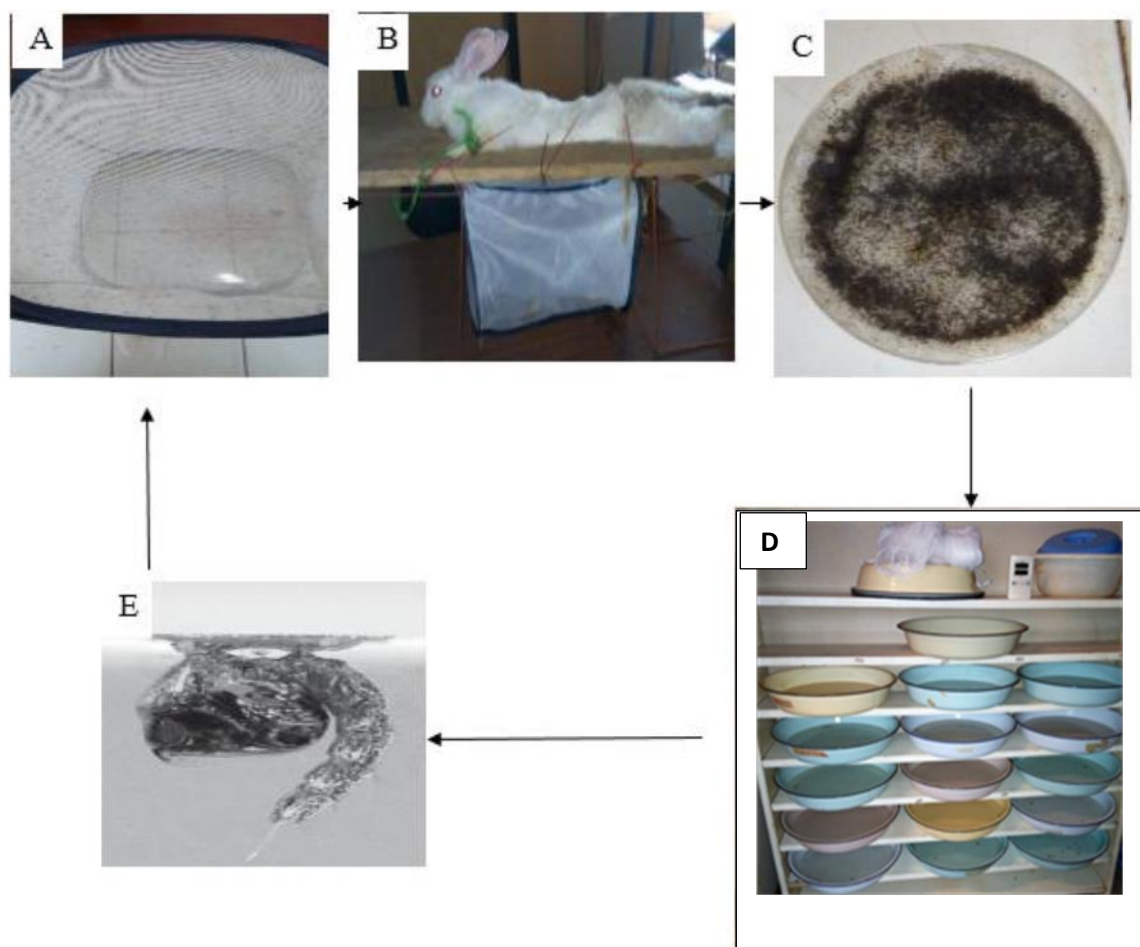


Figure 19 : Entretien de la souche d'*Anopheles gambiae* s.s. au laboratoire ; A: cage contenant des adultes de moustique ; B : dispositif de gorgement des femelles ; C : œufs sur un pondeur ; D : étagères avec des bassines contenant des larves et des nymphes; E : nymphe de Culicidae (Williams et Pinto, 2012).

II.2.6. Identification des plantes, extraction et caractérisation des huiles essentielles des feuilles de *Cannabis sativa* et de *Piper umbellatum*

- Identification de *Cannabis sativa* et de *Piper umbellatum*

Les parties aériennes de *Cannabis sativa* et de *Piper umbellatum* ont été identifiées le 10/12/2015 à l'Herbier National du Cameroun par comparaison avec les specimens des collecteurs comme suit :

- pour *Cannabis sativa*, M. Bihilong 258 de l'échantillon de la collection de l'Herbier No 25967SRF/Cam et classée comme appartenant à la Famille des Cannabaceae ;

- pour *Piper umbellatum*, R. Letouzey 2499 de l'échantillon de l'Herbier National No 3614SRFK et classée comme appartenant à la Famille des Piperaceae.

• **Extraction des huiles essentielles des feuilles de *Cannabis sativa* et de *Piper umbellatum***

Les huiles essentielles de nos plantes ont été extraites par la méthode classique d'hydrodistillation, au laboratoire de Microbiologie du département de Biochimie de l'Université de Yaoundé I. Les feuilles de *Cannabis sativa* et de *Piper umbellatum* ont été pesées et introduites dans l'alambic. Nous y avons ajouté de l'eau à volume équivalant à la masse de feuilles. L'alambic ainsi préparé a été ajusté au reste de l'appareillage de type Clavenger pour y être chauffé. Cette opération s'est déroulée pendant 5 heures, temps nécessaire pour une extraction complète. L'huile essentielle (de couleur jaunâtre pour *Cannabis sativa* et verdâtre pour *Piper umbellatum*) surnageant sur l'eau a été récupérée au niveau de l'essencier à l'aide d'une pipette et séchée grâce au sulfate de magnésium anhydre. Elle a été ensuite introduite dans un flacon sombre, pour la protéger des rayons ultra-violets, pesée et conservée à 4°C avant les tests.

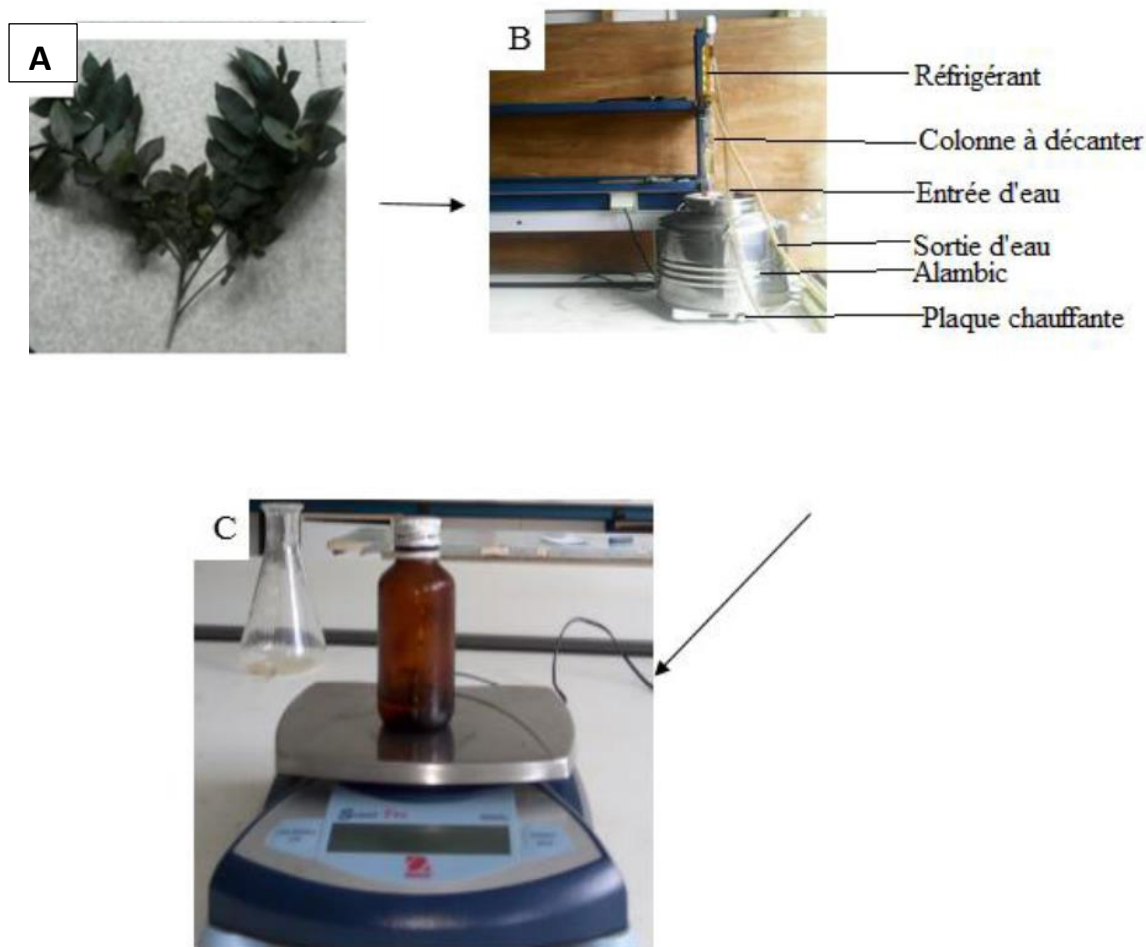


Figure 20. Quelques étapes de l'extraction de l'huile essentielle par hydrodistillation ; A : plante pour extraction ; B : appareillage de type Clavenger ; C : pesage de l'huile

II.2.7. Caractérisation des huiles essentielles de *Cannabis sativa* et de *Piper umbellatum*

Les huiles essentielles de *Cannabis sativa* et *Piper umbellatum* ont été analysées dans deux laboratoires différents en France.

Pour l'huile essentielle des feuilles de *Cannabis sativa*, la détermination des données de rétention et du pourcentage de surface des composés identifiés a été réalisée sur deux systèmes GC-FID à l'Institut des Sciences Analytiques de Paris :

-(A) un système Agilent 5890 équipé d'une colonne HP-1 (ref: 1909 1 Z-115) (50 x 320 μ m; épaisseur du film de 0,5 μ m) pour la CG-SM. La température du four de CG a été maintenue à 80 ° C pendant 8 minutes et programmée à 220 ° C à une vitesse de 2 ° C / min ;

-(B) un système Agilent 6890 équipé de HP-Innowax (réf: 1909 1 N-216, Agilent Technologies, Santa Clara, Californie 95051, USA), colonne (60 mx320 μ m, épaisseur du film de 0,5 μ m) a été maintenu à 60⁰C et programmé à 245 ° C à la vitesse de 2 ° C / min, puis constant à 250 ° C pendant 20 min.

Le ratio de division a été ajusté à 1/100. La température de l'injecteur était de 250 ° C et le détecteur FID a été maintenu à 250 ° C. Le gaz vecteur était de l'hélium (1,3 ml / min). La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse a été réalisée à l'aide du premier système Agilent 5890 équipé d'une colonne HP-1. Le spectre de masse a été enregistré en mode de choc électronique à 70 eV dans les conditions chromatographiques susmentionnées. Les composants individuels de l'huile essentielle de feuilles de *cannabis sativa* L ont été identifiés par leur indice de rétention décrit par Adams (2012) et leur masse, les spectres ont été interprétés à l'aide de la bibliothèque informatique WILEY L en ligne.

L'analyse de l'huile essentielle de *Piper umbellatum* a été réalisée au Laboratoire de Chimie et Physique (LCP-A2MC) à l'Université de Lorraine –ICPM, avec deux appareils Perkin Elmer, un chromatographe en phase gazeuse GC Clarus 500 couplé à un spectromètre de masse MS Clarus 500.

La colonne utilisée en chromatographie était une Elite 5MS (phase stationnaire 5 % Diphenyl / 95 % DimethylPolysiloxane) de longueur 30 m, de diamètre intérieur 0,25 mm et d'épaisseur de film de la phase stationnaire 0,25 μ m.

Le gaz vecteur était de l'hélium avec un débit de 0,75 mL/min.

L'injecteur a été amené à 300 °C. Le programme débute par un palier de 3 min à 60 °C puis la température augmente de 10 °C/min jusqu'à 300°C où un palier de 3 min a été effectué.

L'acquisition du spectre de masse a été effectuée sur une gamme m/Z compris entre 20 et 400 avec 0,1 scan/s et une énergie d'ionisation des électrons de 70 eV. La température de la source et de la ligne de transfert était de 250 °C.

L'échantillon à analyser a été solubilisé dans un faible volume de dichlorométhane.

Le logiciel de traitement des données était Turbomass 6.1 et la base de données permettant la comparaison des spectres de masse était NIST MS Search 2.0. Les indices de Kovat des composants de l'huile essentielle ont été calculés grâce à la littérature d'Adams (2012).

II.2.8. Préparation des solutions mères et des concentrations tests

Pour chaque huile essentielle, nous avons préparé des solutions mères à 1% (10mg/mL) selon la méthodologie de l'OMS (2005) en pesant grâce à une balance de précision une masse d'huile essentielle de 200 mg et en diluant cette masse dans 20 ml d'éthanol à 95%. Ce mélange a été agité vigoureusement (figure20). Pour obtenir les différentes solutions à des concentrations sollicitées pour les essais, nous avons procédé à des dilutions en série dans plusieurs tubes à essai (chaque tube à essai était protégé à son extrémité par du coton hydrophile pour éviter l'évaporation de l'alcool) selon le tableau II ci-dessous.

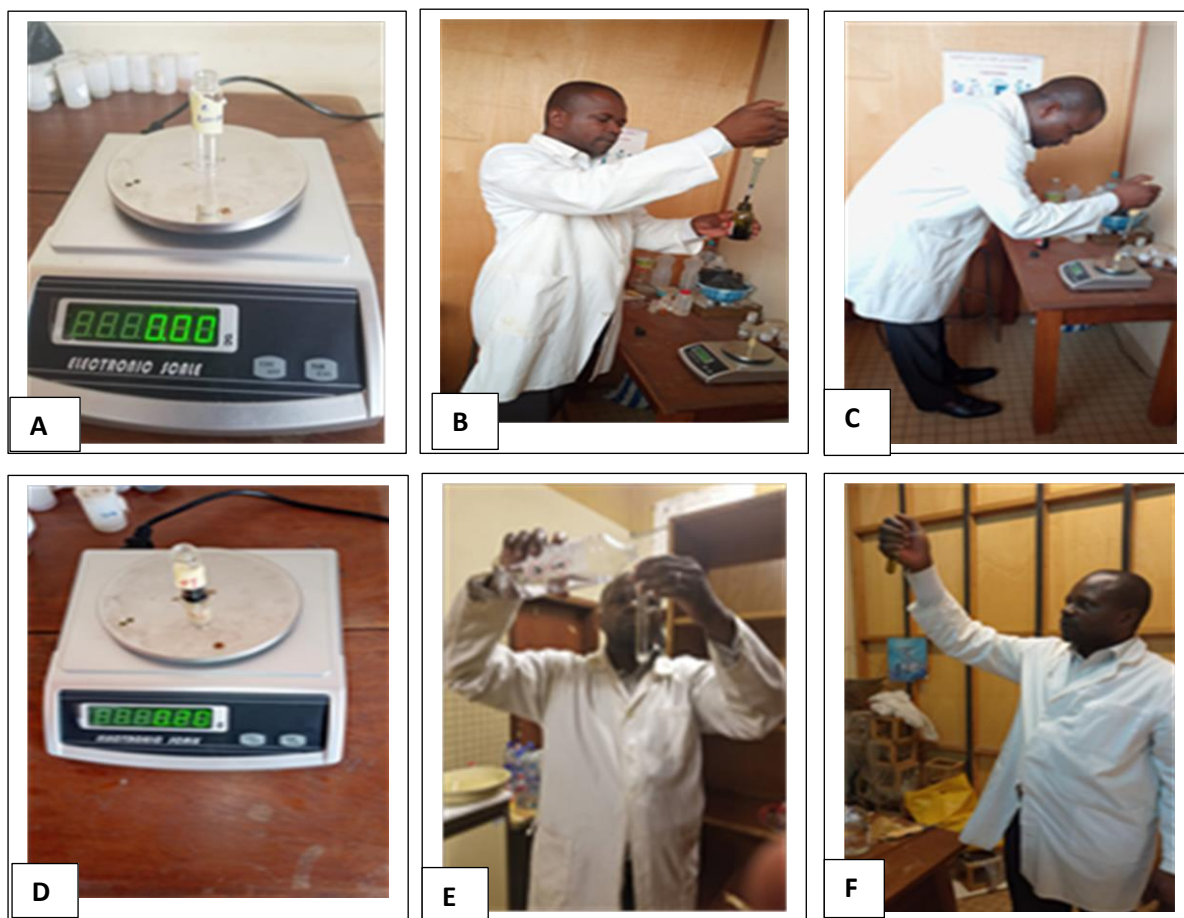


Figure 21. Différentes étapes de préparation des solutions mères et des concentrations tests. A : étalonnage de la balance ; B : pipetage de l'huile essentielle ; C : pesage de l'huile essentielle ; D : balance montrant 200 mg d'huile essentielle ; E : mélange de l'éthanol à 95% avec l'huile essentielle ; F : agitation vigoureuse du mélange (1/250).

Tableau II : Dilutions en série des huiles essentielles de *Cannabis sativa* et de *Piper umbellatum* à partir des solutions mères à 1% suivant le protocole de l'O.M.S, 2005

Volume de solution mère prélevée (µL)	Volume d'éthanol ajouté (µL)	Volume final (µL)	Dilutions	Concentration (%)	Concentrations (mg/mL)
18000	2000	20000	9/10	0,9%	9mg/mL

16000	4000	20000	8/10	0,8%	8mg/mL
14000	6000	20000	7/10	0,7%	7mg/mL
12000	8000	20000	6/10	0,6%	6mg/mL
10000	10000	20000	5/10	0,5%	5mg/mL
8000	12000	20000	4/10	0,4%	4mg/mL
6000	14000	20000	3/10	0,3%	3mg/mL
4000	16000	20000	2/10	0,2%	2mg/mL
2000	18000	20000	1/10	0,1%	1mg/mL
1000	19000	20000	1/20	0,05%	0,5mg/mL
500	19500	20000	1/40	0,025%	0,25mg/mL
250	19750	20000	1/80	0,0125%	0,125mg/mL

Les dilutions en série réalisées telles qu'indiquées dans le tableau II ont permis d'avoir des solutions avec des concentrations d'huile essentielle nécessaires pour évaluer l'activité insecticide de chaque plante prise individuellement.

Pour évaluer l'effet adjuvant des d'huiles essentielles des feuilles de *Cannabis sativa* et de *Piper umbellatum* sur la souche sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. et sur *Culex* sp, nous avons mélangé différentes concentrations de ces huiles avec deux insecticides de synthèse recommandés par l'OMS, la perméthrine et le témephos (Zaim *et al.*, 2002) tel qu'indiqué dans les tableaux III et IV. Nous avons au préalable préparé des solutions mères à 1% pour chaque insecticide de synthèse et obtenu les concentrations critiques de chacun (0,75% et 1,2% (soit 7,5 mg/ml et 12 mg/ml) respectivement pour la perméthrine et le témephos) rapportées dans la littérature (OMS, 2013 ; OMS, 2016 et CDC, 2013).

Tableau III : Mélanges des huiles essentielles des feuilles de *Cannabis sativa* et de *Piper umbellatum* avec le téméphos pour les tests larvicides

Concentrations d'huile essentielle (%)	Concentration de téméphos (%)	Volume d'huile essentielle à prélever (µL)	Volume de téméphos à prélever en (µL)	Volum e final (µL)	Concentration finale de chaque composé dans la solution mixte (%)	
					H.E	Tem.
0,8	0,6	3000	3000	6000	0,4	0,3
0,6	0,6	3000	3000	6000	0,3	0,3
0,4	0,6	3000	3000	6000	0,2	0,3
0,2	0,6	3000	3000	6000	0,1	0,3
0,1	0,6	3000	3000	6000	0,05	0,3
0,05	0,6	3000	3000	6000	0,025	0,3
0,025	0,6	3000	3000	6000	0,0125	0,3
0,0125	0,6	3000	3000	6000	0,00625	0,3
0,00625	0,6	3000	3000	6000	0,00312	0,3
0,00312	0,6	3000	3000	6000	0,00156	0,3

Dose critique du téméphos : 1,2% (OMS, 2016), seule la concentration d'huile essentielle varie. H.E : huile essentielle ; Tem : téméphos

Tableau IV : Mélanges des huiles essentielles des feuilles de *Cannabis sativa* et de *Piper umbellatum* avec la perméthrine pour les tests adulticides

Concentrations d'huile essentielle(%)	Concentration de permethrine(%)	Volume d'huile essentielle à prélever (µL)	Volume de permethrine à prélever (µL)	Volume final (µL)	Concentration finale de chaque composé dans la solution mixte(%)	
					H.E	Perm
0,8	0,375	3000	3000	6000	0,4	0,187
0,6	0,375	3000	3000	6000	0,3	0,187
0,4	0,375	3000	3000	6000	0,2	0,187

0,2	0,375	3000	3000	6000	0,1	0,187
0,1	0,375	3000	3000	6000	0,05	0,187
0,5	0,375	3000	3000	6000	0,025	0,187
0,25	0,375	3000	3000	6000	0,012 5	0,187

Dose critique de la permethrine : 0,75% (OMS, 2013), la concentration de la permethrine est fixe, seule la concentration d'huile essentielle varie. H.E : huile essentielle ; Perm: permethrine.

II.2.9. Tests biologiques de toxicité

Tous les tests biologiques ont été effectués au Laboratoire de Zoologie de l'Ecole Normale Supérieure de l'Université de Yaoundé I, à des températures comprises entre 25°C et 28°C, une humidité relative de 78% et une photopériode de 12 :12 (Tchuinkam et *al.*, 2011). La température était conservée dans l'intervalle 25°C-28°C grâce au radiateur qui chauffait la salle. La température et l'hygrométrie ont été mesurées grâce à un thermohygromètre.

● Tests larvicides

A l'aide d'une éprouvette, on a introduit 99 mL d'eau de source dans des gobelets en plastique auxquels on a ajouté 1mL de solution d'huile essentielle appropriée, tandis que dans les gobelets témoins on a ajouté uniquement 1 mL d'éthanol à 95%. On a ensuite trempé des lots de 25 larves de moustiques de stade 3 préalablement triées des récipients d'élevage à l'aide d'une pipette Pasteur une heure auparavant (OMS, 2005)(figure 21). On a utilisé 4 répliques par concentration d'huile essentielle et le test a été répété trois fois à des jours différents, afin d'avoir des résultats appréciables et de minimiser les erreurs. Pour évaluer l'effet adjuvant des huiles essentielles, on a fait varier les concentrations de ces dernières tandis que la concentration létale du témephos (LC₅₀) est restée inchangée.

Les larves ont séjourné dans des milieux tests ainsi préparés pendant 48 heures. Le nombre de larves mortes a été compté après 24 heures et 48 heures d'exposition.



Figure 22. Etapes du test larvicide. A : mesure du volume d'eau dans une éprouvette ; B : mesure d'eau dans des gobelets en plastique ; C, D : prélèvement et introduction de 1ml d'une solution tests dans un gobelet ; E, F : sélection des larves L3 et L4 ; G introduction des larves dans les gobelets traités ; H : gobelets protégés par des morceaux de tulles moustiquaires non imprégnés (1/250)

• Tests adulticides

Une moustiquaire non imprégnée acquise auprès du Ministère de la Santé Publique a été découpée en fragments de 11,5 cm de diamètre (soit 0,5 cm de plus par rapport au diamètre de la base inférieure des cônes OMS). Chaque fragment a été imprégné avec 3mL (volume nécessaire) d'une solution appropriée d'huile essentielle pendant trois heures. Au terme des trois heures d'imprégnation, chaque morceau de tulle moustiquaire est retiré à l'aide de pinces et séché sur une boîte de Petri en verre à la température ambiante pendant 15min à cause de l'extrême volatilité des huiles essentielles (Wanng *et al.*, 2014 ; Faraone *et al.*, 2015). Le fragment de tulle moustiquaire ainsi préparé est ajusté sur le cône et maintenu à l'aide de ruban adhésif. Quatre cônes ainsi préparés ont été introduits dans les quatre orifices du plexiglas et le tout recouvert d'une autre plaque en plexiglas plus fine. Le dispositif ainsi monté est maintenu par des pinces et déposé sur un support en bois incliné à un angle d'environ 45°. Une vingtaine de moustiques femelles est mise en contact avec les tulles imprégnés, avec cinq moustiques par cône. Les femelles adultes à tester âgées de 2 à 5 jours n'ayant pas pris de repas sanguin sont d'abord transférées à l'aide d'un aspirateur à bouche dans des gobelets en carton recouverts de tulle moustiquaire non imprégné. Ces femelles ont passé une heure dans ces gobelets avant d'être mises en contact avec le tulle imprégné. Ce temps d'acclimatation permet de retirer les moustiques endommagés inaptes au test. Ensuite, ces moustiques sélectionnés sont transférés dans des cônes OMS à l'aide d'un aspirateur à bouche en soufflant avec précaution. Le cône est fermé au sommet par du coton hydrophile pour empêcher aux moustiques de s'échapper (figure 22). Les moustiques restent en contact avec le tulle traité pendant 1 heure (OMS, 2013 ; CDC, 2013). Durant ce temps d'exposition, on a compté le nombre de moustiques assommés (knock down) à intervalle de dix minutes. Les moustiques sont ensuite transférés dans des gobelets en carton au terme de l'exposition pour leur restauration. Pendant cette période, les moustiques sont nourris au saccharose à 10% imbibée dans du coton hydrophile. Les moustiques morts sont comptés 24 heures après l'exposition. L'expérience a été renouvelée 03 fois afin de minimiser les erreurs et d'avoir des données statistiquement fiables. Pour chaque concentration, un témoin est associé avec 25 moustiques qui sont mis au contact des morceaux de tulle moustiquaire imprégnés uniquement d'éthanol à 95% ou de perméthrine à 0,375% et observés dans les mêmes conditions que celles décrites plus haut. Pour évaluer l'effet adjuvant des huiles essentielles, nous avons gardé à une valeur fixe les concentrations de perméthrine (LC₅₀) et nous avons fait varier les concentrations d'huiles essentielles (Pennetier *et al.*, 2008). Les observations ont été faites comme décrit plus haut.



Figure 23. Quelques étapes du test adulticide. A : séchage des morceaux de moustiquaires imprégnés à différentes concentrations ; B : montage des morceaux de moustiquaire imprégnés avec des cônes sur support incliné à 45° ; C : collecte des femelles adultes ; D, E : comptage et introduction des femelle adultes dans le gobelet en carton ; F,G : retrait et introduction des moustiques femelles dans les cônes ; H : observation (1/250)

II.2.10. Identification des moustiques adultes

• Identification morphologique

A la fin des tests biologiques, les moustiques adultes morts des individus récoltés sur le terrain ont été conservés dans les tubes d'Eppendorf pour leur identification ultérieure. Les adultes femelles d'*Anopheles gambiae* s.l récoltés aux abords de la rivière Ewoé ont été morphologiquement identifiés en utilisant la Clé d'identification de Giles et Coetzee (1987). Afin de mieux distinguer les différents individus du complexe *gambiae*, une caractérisation moléculaire a été effectuée selon le protocole de Santolamazza (2008) grâce à l'ADN extraite suivant la méthode de Morlais Poncon *et al.*, (2004) au Laboratoire de Recherche sur le Paludisme à l'OCEAC à Yaoundé. Pour les individus adultes des moustiques récoltés dans l'étang de Melen, seule l'identification morphologique a été réalisée (car le matériel à disposition à l'OCEAC ne permet pas la caractérisation moléculaire des *Culex* sp.) grâce aux Clés d'identification de Reuben (1994) et de Gupp (1996).

• Caractérisation moléculaire des espèces du complexe *Anopheles gambiae*

L'identification moléculaire des espèces du complexe *gambiae* s'est faite à l'aide d'une réaction de polymérisation en chaines (PCR) SINE200 (Santolamazza *et al.*, 2008). Cette identification moléculaire débute par l'extraction de l'ADN génomique du moustique selon la méthode de Morlais Poncon *et al.*, (2004), suivie de son amplification et sa révélation électrophorétique sur un gel d'agarose à 1,5%.

- Extraction de l'ADN

L'ADN a été extrait sur les carcasses des moustiques en utilisant la technique d'extraction au CTAB 2% (Cytidyl Trimethyl Ammonium Bromide) (Morlais Poncon *et al.*, 2004). Chaque carcasse de moustique est broyée dans 200µL de CTAB 2% pour libérer l'ADN contenue dans les cellules. Le broyat ainsi obtenu est incubé dans un bain-marie à 65°C pendant 5 minutes pour inhiber l'activité des DNAses (enzymes qui découpent les chaines d'acides désoxyribonucléiques en nucléotides ou polynucléotides). En suite, 200µL de chloroforme sont ajoutés au broyat, puis l'ensemble est mélangé délicatement par inversion. Le mélange obtenu est ensuite centrifugé pendant 5 minutes à 12 000 tours/min à température ambiante pour précipiter les débris cellulaires et les protéines dénaturées, et la phase supérieure (sumageant) est prélevée et introduite dans un autre tube stérile préalablement étiqueté, dans lequel 200µL d'isopropanol sont ajoutés. Après avoir mélangé par inversion, le tube est centrifugé à 12 000 tours/min pendant 15 minutes à température

ambiante pour précipiter l'ADN sous forme d'un culot peu visible au fond du tube. L'isopropanol est vidé puis 200 µL d'éthanol à 70% sont ajoutés au culot pour purifier l'ADN, et le mélange ainsi obtenu est centrifugé pendant 5 minutes à 12 000 tours/min. L'éthanol est vidé et le culot séché sous vide (Speed-Vac) pendant 5 minutes. L'ADN ainsi extrait est reconstitué dans 20 µL d'eau stérile, puis incubé à 55°C pendant 5 minutes pour suspendre le culot, et conservé à -20°C pour des manipulations ultérieures

- **Amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction)**

La réaction de polymérisation en chaîne a été conçue sur le principe de la réplication de l'ADN dans les cellules vivantes avant la mitose. Elle permet d'amplifier des séquences d'ADN in vitro, en présence de l'ADN à amplifier, de l'ADN polymérase (enzyme), du MgCl₂, des amorces, des nucléotides et un tampon. On a en quelques heures des millions de copies du fragment d'ADN compris entre les amorces. Suite à l'amplification, les différents allèles sont identifiés par électrophorèse. Le principe de la PCR est basé sur la répétition de trois processus dont l'ensemble constitue un cycle d'amplification :

- **la dénaturation**, au cours de laquelle les fragments d'ADN bicaténares sont dénaturés en brins monocaténares par l'augmentation de la température entre 90 et 95°C; cette phase dure 15 à 30 secondes en fonction de la taille de la molécule d'ADN.
- **l'hybridation**, phase de refroidissement, pendant laquelle il y a appariement des amorces aux séquences complémentaires de l'ADN simple brin. La température pendant cette période varie de 50 à 72°C. Le temps varie de 15 à 45 secondes.
- **l'élongation**, au cours de laquelle l'ADN polymérase va allonger les amorces en ajoutant des nucléotides à partir de l'extrémité 3'. La température pendant cette phase est à 72°C, température optimale pour l'activité de l'ADN polymérase. Le temps varie de 30 secondes à une minute. Au cours d'une PCR, ces étapes sont répétées 35 à 40 fois afin de multiplier considérablement la quantité d'ADN produite.

Pour *Anopheles gambiae* s.l, des amorces ou « primers » ont été utilisées pour amplifier les séquences d'ADN de chaque spécimen du complexe *An. gambiae* s.l (Santolamazza et al., 2008) (tableau V).

Tableau V : Amorces des séquences d'ADN d'*Anopheles gambiae* s.l.

Nom des amorces	Séquences	Espèce identifiée	Taille du fragment
UV (SINE F et R)	5'-GTGCCCCTTCCTCGATGGC G CAACGAACC ATCTTGGTCTG-3'	<i>An. gambiae</i> s.s.	249
UV (SINE F et R)	5'-GTGCCCCTTCCTCGATGGC A TAACGAACC ATCTTGGTCTG-3'	<i>An. coluzzii</i>	479
-	5'-GTGCCCCTTCCTCG T TGGCG T AAC T AACC ATCTTGGTCTG-3'	<i>An. arabiensis</i>	223

UV : amorce universelle (SINE Forwad et SINE Reverse).

L'amplification de la molécule d'ADN a lieu chacun dans un volume total de 15µL.

La composition du milieu réactionnel est présentée dans le Tableau VI .

Tableau VI : Milieu réactionnel pour la PCR SINE200 pour l'identification d'*Anopheles gambiae* s.l.

Réactifs	Pour 1 réaction à 15µl
ddH ₂ O	10,49µL
dNTPs 10Mm	0,12µL
MgCl ₂	0,75µL
SINE-F (S200F)	0,51µL
SINE-R (S200R)	0,51µL
Taq A	0,12µL
Buffer A (10X)	1,5µL
ADN	1,0µL
Total	15,0µL

ddH₂O : eau bi distillée, **dNTP** : désoxyribonucléotides triphosphates, **MgCl₂** : chlorure de magnésium, **Taq** : *Thermus aquaticus*, **ADN** : acide désoxyribonucleique, **Mm** : millimolaire, **µL** : microlitre, **U** : unité, **SINE200** : nom des locus, **F** : Forwad, **R** : Reverse.

Les réactions d'amplification se sont déroulées dans un thermocycleur « Genetouch Thermal Cycler », dont les cycles de températures sont présentés et dont la programmation est résumée dans le tableau VII. :

Tableau VII : Profil thermique de la PCR-SINE200 pour l'identification d'*Anopheles gambiae* s.l.

Etapes du cycle	Température du thermocycleur	Temps
Dénaturation initiale	95°C	5 minutes
35 cycles d'amplification		
- dénaturation	94°C	30 secondes
- hybridation	54°C	30 secondes
- élongation	72°C	1 minute
1 cycle élongation finale	72°C	10 minutes

°C : degrés Celsius.

- **Préparation du gel d'agarose, distribution des échantillons, migration et révélation**

- **Préparation du gel d'agarose**

Le gel d'agarose est préparé à 1,5% dans du tampon tris-acétate-EDTA (TAE 1X). Le mélange agarose et TAE 1X dans l'erlenmeyer est ensuite chauffé dans un four à micro-ondes pendant 2 à 3 minutes à 250°C en fonction du grammage de l'agarose. Le mélange est ensuite tiédi pendant quelques minutes en remuant le contenant dans de l'eau. Lorsque la température du mélange atteint environ 50°C, du bromure d'éthidium dit Midori green, à 1µg/mL est ajouté à la solution. La solution est ensuite versée dans un moule contenant un ou des peignes. Le gel est polymérisé à température ambiante pendant 15 à 30 minutes.

- **Distribution des échantillons**

Après la polymérisation totale du gel, le peigne est retiré, à l'aide d'une pipette de 10 µL, on a introduit dans chaque puits environ 10 µL de solution composée d'environ 3µL d'ADN amplifié et 7µL de bleu de bromophénol. Dans un ou deux puits, on a introduit le marqueur de poids moléculaire mélangé avec du bleu de bromophénol.

- **Migration et révélation**

La migration s'effectue de la cathode vers l'anode. Elle a une durée d'environ 30 à 45 minutes à température ambiante. Le moule est placé dans une cuve à électrophorèse reliée grâce aux électrodes aux bornes d'un générateur à courant continu qui produit une puissance

d'environ 120W. A la fin de la migration, le gel est observé sous UV. Chaque extrait d'ADN ayant migré se présente sous forme de bandes sur le gel. Suivant leur poids moléculaire, les bandes d'ADN ont des positions différentes sur le gel ce qui permet d'identifier précisément chaque espèce. Une photo du gel a été ensuite réalisée.

II.2.11. Analyse des données

Pour évaluer les effets insecticide et adjuvant des huiles essentielles des feuilles de *Cannabis sativa* et de *Piper umbellatum* sur *Anopheles gambiae* s.l. et *Culex quinquefasciatus*, nous avons noté les paramètres suivants :

- pour les stades aquatiques, uniquement la mortalité après 24 heures et 48 heures d'exposition ;
- pour les imagos :
 - * le nombre de moustiques assommés à intervalle de 10 minutes pendant 1 heure;
 - * le taux de mortalité, 24 heures après l'exposition aux doses croissantes d'huile essentielle.

Le classement des moyennes a été réalisé par le test de Kruskal-wallis au seuil de 5%. A partir du taux de knock down, une droite de régression a été tracée afin d'estimer les TKD₅₀ (temps au cours duquel 50% de moustiques sont assommés) et TKD₉₅ (temps au cours duquel 95% de moustiques sont assommés). Nous avons également obtenu pour les effets larvicide et adulticide, les LC₅₀ et LC₉₅ (Doses ou concentrations létales nécessaires pour 50% et 95% de mortalité respectivement) grâce au logiciel WinDL-CIRAD-CA version 2.0. Pour tracer les courbes et réaliser les analyses statistiques, nous avons utilisé le logiciel : Statistica Version 6.0.

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. RESULTATS

III.1.1. Rendements d'extraction des huiles essentielles des feuilles de *Cannabis sativa* et de *Piper umbellatum*

Les rendements d'extraction par hydrodistillation des huiles essentielles des feuilles des plantes étudiées (*Cannabis sativa* et *Piper umbellatum*) sont très faibles ; soit 0,044% et 0,012% respectivement pour *Cannabis sativa* et pour *Piper umbellatum* (tableau VIII).

Tableau VIII: Rendement d'extraction des huiles essentielles de *Cannabis sativa* et de *Piper umbellatum* (récolées au village salla et au Campus de l'Université de Yaoundé I)

Famille	Espèce	Numéro d'identification	Poids des feuilles	Poids de l'huile essentielle	Rendement (%)
Cannabaceae	<i>Cannabis sativa</i>	25967SRF/Cam	3375g	1,5g	0,044
Pieperaceae	<i>Piper umbellatum</i>	3614SRFK	7390,8g	0,9g	0,012

$$\text{Rendement} = \frac{\text{masse d'H.E}}{\text{Masse de feuilles}} \times 100$$

III.1.2. Résultats de l'analyse chimique des huiles essentielles des feuilles de *Cannabis sativa* et de *Piper umbellatum*

L'analyse chimique de l'huile essentielle des feuilles de *Cannabis sativa* a donné le résultat illustré par le profil chromatographique de la figure 23 et les données du tableau IX.

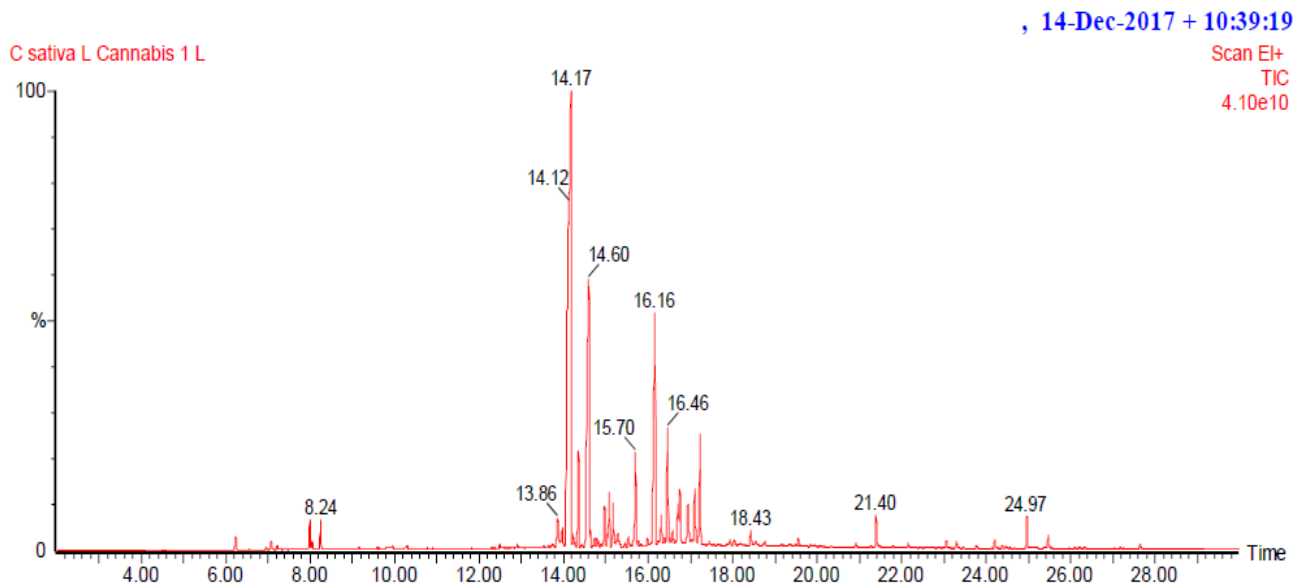


Figure 24. Profil chromatographique de l'analyse chimique de l'huile essentielle des feuilles de *Cannabis sativa* par GC-SM et GC-FID

Tableau IX : Composition chimique de l'huile essentielle des feuilles de *Cannabis sativa*

Ordre d'élution	Composés	Pourcentage	Indices de Kovat	
			HP-1	Innowax
1.	Z-3-Hexenol	0,03	842	1380
2.	E-2--Hexenol	0,02	852	1408
3.	Heptanone-2	0,03	864	1182
4.	Hexenol	0,03	869	1351
5.	Heptanal	0,03	880	1185
6.	2-Amyl furan	0,01	884	1124
7.	α -Thujène	0,12	923	1032
8.	α -Pinène	8,12	931	1035
9.	Camphène	0,013	944	1063
10.	Octène-1-ol-3	0,03	961	1427
11.	6-Méthyl-5-heptenone-2	0,005	964	1116
12.	Sabinène	0,12	967	1118
13.	β -Pinène	3,64	971	1132
14.	6- Méthyl-5-hepten-2-ol	0,02	974	1163
15.	Myrcène	31,75	981	1159
16.	Δ -3-Carène	0,92	997	1011
17.	α -Phellandrène	0,42	998	1175
18.	α -Terpinène	0,31	1010	1188
19.	Hexyl acétate	0,02	1010	1272
20.	P-Cymène	0,11	1014	1200

21.	Limonène	1,3	1022	1203
22.	1,8-Cinéole+β-phellandrène	1,29	1022	1213
23.	Z-β-Ocimène	1,10	1025	1242
24.	E-β-Ocimène	9,65	1037	1247
25.	γ-Terpinène	0,23	1049	1255
26.	E-Thujan-4-ol	0,03	1053	1463
27.	Fenchone+méthyl benzoate	0,02	1072	-
28.	p-Cymenène	0,09	1072	1437
29.	Terpinolène	14,76	1079	1290
30.	Nonanal	0,03	1083	1391
31.	Linalol	0,09	1086	1533
32.	Z-Thujan-4-ol	0,03	1092	-
33.	Perillène	0,02	1098	1429
34.	α-Fenchol	0,07	1100	1570
35.	Z-p- Menth-2-èn-1-ol	0,03	1114	1570
36.	E-p- Menth-2-èn-1-ol	0,07	1114	1571
37.	4E, 6Z- Allo-ocymène	0,01	1119	1375
38.	Ipsdiénol	0,03	1125	-
39.	Epoxy terpinolène	0,05	1130	-
40.	Menthone	0,04	1136	1465
41.	Bornéol	0,04	1153	1719
42.	P-Cymèn-8-ol	0,12	1161	1864
43.	Terpinèn-4-ol	0,07	1163	1611
44.	α-Terpinéol	0,04	1175	1682
45.	Citronellol	0,02	1212	1764
46.	Hexyl butyrate +méthylchavicol	0,06	1224	-
47.	E-Anethole	0,10	1264	1826
48.	α-Ylangène	0,20	1370	1490
49.	α-Copaène	0,01	1375	1491
50.	β-Elemène	0,02	1386	1577
51.	Isocaryophyllène	0,23	1408	-
52.	Z-α-Bergamotène	0,11	1410	1559
53.	α-Santalène	0,14	1415	1582
54.	E-β-Caryophyllène	1,72	1419	1612
55.	E-α-Bergamotène	0,85	1435	1575
56.	Allo-Aromadendrène	0,30	1439	1620
57.	α-Guaiène +composé indéterminé	0,04	1442	-
58.	E-β-Farnesène	1,23	1449	1663
59.	γ-Elemène+composé indéterminé	0,04	1449	-
60.	α-Humulène	3,28	1452	1654
61.	γ- Muurolène	0,08	1473	1689
62.	Selina-4,11-diène	0,22	1475	1674
63.	Selina-4,7(11)diène+E-α-Bisabolène	0,36	1475	1688
64.	β-Selinène	0,58	1480	1700
65.	α-Selinène	0,41	1491	1707
66.	E,E-α-Farnesène	0,20	1496	1744
67.	β-Bisabolène	0,21	1499	1727
68.	7-Epi-α-Selinène	0,21	1507	1764

69.	Y-Cadinène	0,05	1513	1740
70.	X-Cadinène	0,09	1513	1765
71.	12-Nor-caryophyll-5-èn-2-one	0,02	1515	-
72.	Y-Selinène	0,24	1526	-
73.	Germacrène B	0,14	1535	1823
74.	Selina-3,7(11)-diène	0,37	1537	1783
75.	E-Nerolidol	0,15	1550	2036
76.	Spathulenol	0,03	1565	2107
77.	Epoxy Caryophyllène	0,08	1563	-
78.	Caryophyllène Oxyde	1,25	1567	2001
79.	Humulène Oxyde	0,30	1597	2047
80.	Composé non identifié	0,14	-	-
81.	Composé non identifié	0,18	-	-
	TOTAL	98,27		

Analyse effectuée par chromatographie en phase gazeuse avec détection FID sur 2 colonnes de polarité différente: HP1 et INNOWAX. Les composants individuels sont identifiés par leur indice de rétention décrit par Adams (2012) et leurs spectres de masse sont interprétés à l'aide de la bibliothèque informatique WILEY L. Les constituants sont présentés dans l'ordre d'élution à partir des colonnes.

L'huile essentielle des feuilles de *Cannabis sativa* est riche en monoterpènes hydrocarbonés tels que : α -pinène (8,12%), β -pinène (3,64%), myrcène (31,75%), terpinolène (14,76%) ; en sesquiterpènes hydrocarbonés et oxygénés : E- β -Caryophyllène (1,75%), caryophyllène oxyde (1,25%) et α -humulène (3,28%). D'autres composés n'ont pas été déterminés du fait des logiciels utilisés dans cette analyse.

L'analyse chimique de l'huile essentielle des feuilles de *Piper umbellatum* a donné le résultat illustré par le profil chromatographique ci-dessous (Figure 24) et les données du tableau X.

P. umbellatum

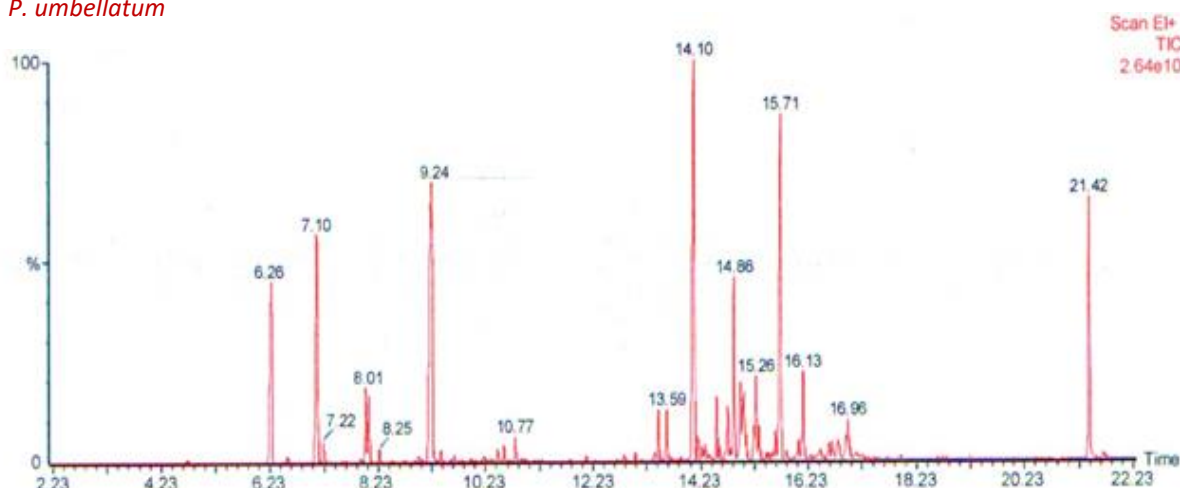


Figure 25. Profil chromatographique de l'analyse de l'huile essentielle des feuilles de *Piper umbellatum* par GC-SM

L'exploitation du profil chromatographique a permis l'élaboration du tableau X repertoriant les composés de l'huile essentielle de *Piper umbellatum*

Tableau X : Composition chimique de l'huile essentielle des feuilles de *Piper umbellatum*

Ordre d'élution	Composés	Pourcentage	Indice de retention de Kovat	
			Apo.	Po.
1.	α -pinène	6,23	931	1035
2.	camphène	1,83	944	1063
3.	β -pinène	1,83	971	1132
4.	β -myrcène	4,60	981	1161
5.	limonène	1,56	1022	1203
6.	Z- β -ocimène	1,33	1025	1242
7.	E- β -ocimène	2,63	1037	1247
8.	linalol	1,27	1086	1533
9.	L-bornéol	2,45	1153	1719
10.	terpinène-4-ol	2,96	1163	1611
11.	p-menth-1-en-8-ol	5,32	1280	-
12.	copaène	9,63	1375	1491
13.	β -elemène	10,56	1386	1577
14.	caryophyllène	1,37	1419	1612
15.	α -caryophyllène	1,18	1453	-
16.	γ -muurolène	11,37	1473	1689
17.	germacrène D	3,92	1480	1708
18.	α -farnesène	1,90	1496	1744
19.	δ -cadinène	2,30	1513	1765
20.	calamenène	1,14	1532	-
21.	z-nerolidol	4,56	1550	2036
22.	caryophyllène oxyde	1,95	1567	2001
23.	α -eudesnol	1,6	1652	2227
24.	phytol	6,1	2116	2613
	Total	89.6%	-	-

Analyse réalisée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse avec 2 colonnes de polarité différente ; Apo= Indices apolaires ; Po= indices polaires. Les composés sont individuellement identifiés par leur indice de rétention selon Adams (2012) . Les composés sont présentés par ordre d'élution dans les deux colonnes.

Pour ce résultat d'analyse de l'huile essentielle des feuilles de *Piper umbellatum*, il apparait également des monoterpènes hydrocarbonés : α -pinène (6,23%), myrcène (4,60%) ; oxygénés : linalol (1,29%), p-menth-1-en-8-ol (5,32%) ; des sesquiterpènes hydrocarbonés : copaène (9,63%), β -elemène (10,63%) et oxygénés : z-nerolidol (4,56%), phytol (6,10%) et γ -muurolène (11,37%)

. III.1.3. Composition spécifique des moustiques sauvages récoltés à l'étang de Melen et aux abords de la rivière Ewoé

La photographie du gel d'agarose réalisée sous rayons Ultraviolets après migration des amplicons obtenus à partir de l'ADN extraite sur 71 individus adultes du complexe *gambiae* récoltés aux abords de la rivière Ewoé a révélé deux espèces (figure 25).

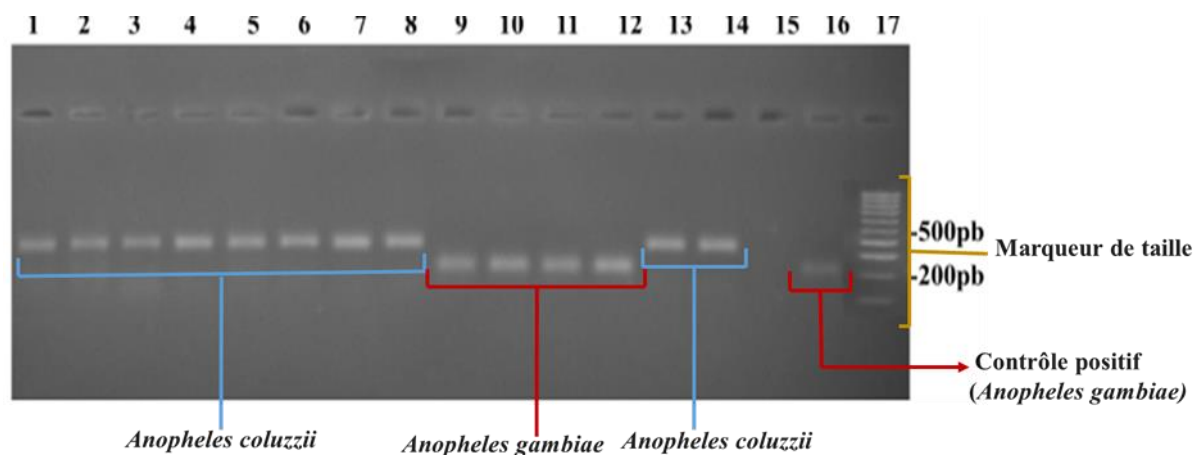


Figure 26 : Photographie d'observation sous UV d'un gel d'agarose après migration des amplicons d'ADN pour l'identification des espèces du complexe *Anopheles gambiae* s.l.

Légende : 1 à 8, 13, 14 = *Anopheles coluzzii* qui migre à 479 pb ; 9 à 12 = *Anopheles gambiae* s.s. qui migre à 249 pb ; 15 = Contrôle négatif ; 16 = Contrôle positif pour l'espèce *Anopheles gambiae* ; 17 = Marqueur de taille 100 paires de bases (pb)

Le résultat de la caractérisation moléculaire et de la détermination morphologique des adultes des individus de *Anopheles gambiae* s.l. et de *Culex* sp. récoltés aux abords de la rivière Ewoé et dans l'étang de Melen (respectivement) a révélé la composition spécifique des moustiques consignée dans le tableau tableau XI.

Tableau XI : Composition spécifique des moustiques adultes récoltés à l'étang de Melen et aux abords de la rivière Ewoé (les moustiques ont été récoltés durant toute l'année pour l'étang de Melen et pour les abords de la rivière Ewoé, d'avril à juin et de septembre à mi-novembre 2016)

Site de récolte	Genre	Espèce	Nombre d'individus	Pourcentage (%)
Etang de Melen	<i>Anopheles</i>	<i>An. gambiae</i> s.l.	4	2
	<i>Culex</i>	<i>Cx. perfuscus</i>	14	7
		<i>Cx. quinquefasciatus</i>	182	91
	Total	-	200	100
Rivière Ewoé	<i>Anopheles</i>	<i>An. gambiae</i> s.s.	3	4,23
		<i>An. coluzzii</i>	68	95,77
	Total	-	71	100

L'identification morphologique des adultes de Culicidés récoltés à l'étang de Melen a révélé la composition spécifique suivante : *An. gambiae* s.l. (2%), *Cx. perfuscus* (7%) et *Cx. quinquefasciatus* (91%) ; tandis que la caractérisation moléculaire des individus sauvages d'*An. gambiae* s.l. récoltés aux abords de la rivière Ewoé a révélé : *An. gambiae* s.s. (4,23%) et *An. coluzzii* (95,77%).

Les photographies de la figure 26 montrent les espèces dominantes de l'étang de Melen et des abords de la rivière Ewoé.

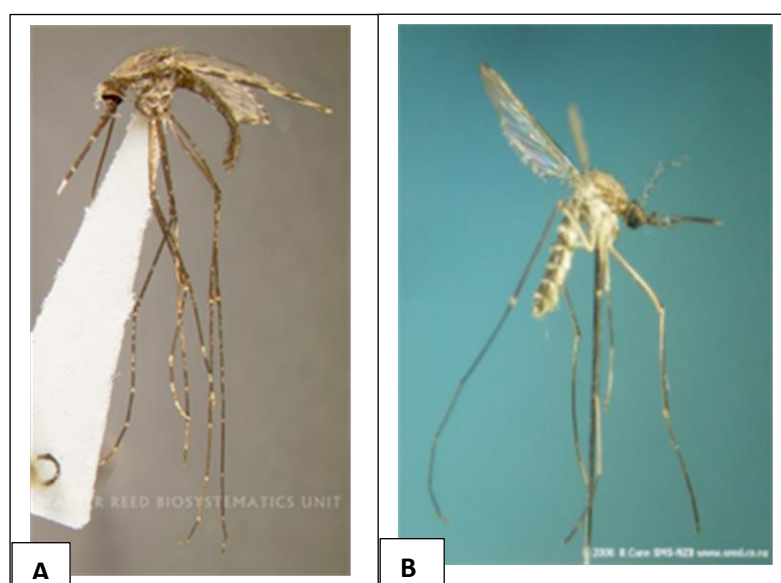


Figure 27. Moustiques récoltés dans les abords de la rivière Ewoé et à l'étang de Melen ; A : *Anopheles gambiae* s.l. B : *Culex quinquefasciatus* (x50)

III.1.4. Activités insecticide et adjuvant des huiles essentielles des feuilles de *Cannabis sativa* et de *Piper umbellatum* sur *Anopheles gambiae* s.l. et *Culex quinquefasciatus*

Des tests biologiques de toxicité des huiles essentielles des feuilles de *Cannabis sativa*, de *Piper umbellatum* et de la combinaison de ces dernières avec deux insecticides de synthèse (témephos et perméthrine) ont été réalisés sur des moustiques suivant les recommandations de l'OMS (2005, 2013 et 2016) et de la CDC (2013). Les résultats montrent une variation de sensibilité selon les espèces et le stade de développement du moustique considéré. Les tests ont été effectués sur 8100 larves et 6200 femelles adultes de Culicidés.

- Activité larvicide de l'huile essentielle des feuilles de *Cannabis sativa* sur *Anopheles gambiae* s.l. et *Culex quinquefasciatus*

Les tests larvicides de l'huile essentielle des feuilles de *C. sativa* ont été effectués sur les larves de troisième stade des souches de laboratoire d'*An.gambiae* s.s. sauvage d'*An.gambiae* s.l. et sur *Culex quinquefasciatus*. Les observations se sont étalées sur 48 heures et les larves mortes ont été comptées. Le test a été effectué sur un total de 2200 larves de Culicidés (700 larves de la souche de laboratoire d'*Anopheles gambiae* s.s., 700 larves de la souche sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. et 800 larves de *Culex quinquefasciatus*). Il n'a pas été constaté de mortalité dans les gobelets témoins pendant toute la période d'observation. Les résultats sont consignés dans le tableau XII.

Tableau XII : Activité larvicide de l'huile essentielle des feuilles de *Cannabis sativa* sur *Anopheles gambiae* s.l. et *Culex quinquefasciatus*.

Concentration (%)	Mortalité larvaire (%)					
	Après 24 heures			Après 48 heures		
	<i>An. gambiae</i> s.s.	<i>An. gambiae</i> s.l.	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	<i>An. gambiae</i> s.s.	<i>An. gambiae</i> s.l.	<i>Cx.quinquefasciatus</i>
0,00625	0	0	8±0,4	0	0	21±0,47
0,0156	0	0	37±0,4	0	0	73±0,25
0,025	0	0	60±0,57	0	0	80±0,4
0,05	0	0	77±0,47	0	0	90±0,7
0,1	10±0,28	2±0,28	86±0,47	34±0,47	31±1,28	97±0,25
0,2	15±0,4	5±0,4	90±0,62	43±0,4	45±2,1	100
0,3	22±0,5	18±0,5	100	55±0,9	51±1,6	100
0,5	48±0,5	22±0,6	-	83±0,2	70±2	-
0,7	64±0,6	34±0,4	-	94±0,4	92±0,7	-
0,9	78±0,28	41±1,5	-	100	98±0,4	-

H	H=3,34	H=3,22	H=4,64	H=6	H=5,73	H=6,5
P	P=0,018	P=0,023	P=0,05	P=0,01	P=0,001	0,001
(probabilité)						

A partir des données du tableau XII ci-dessus, la courbe de mortalité des larves en fonction des concentrations d'huile essentielle a été tracée après 24 heures d'observation (figure 27).

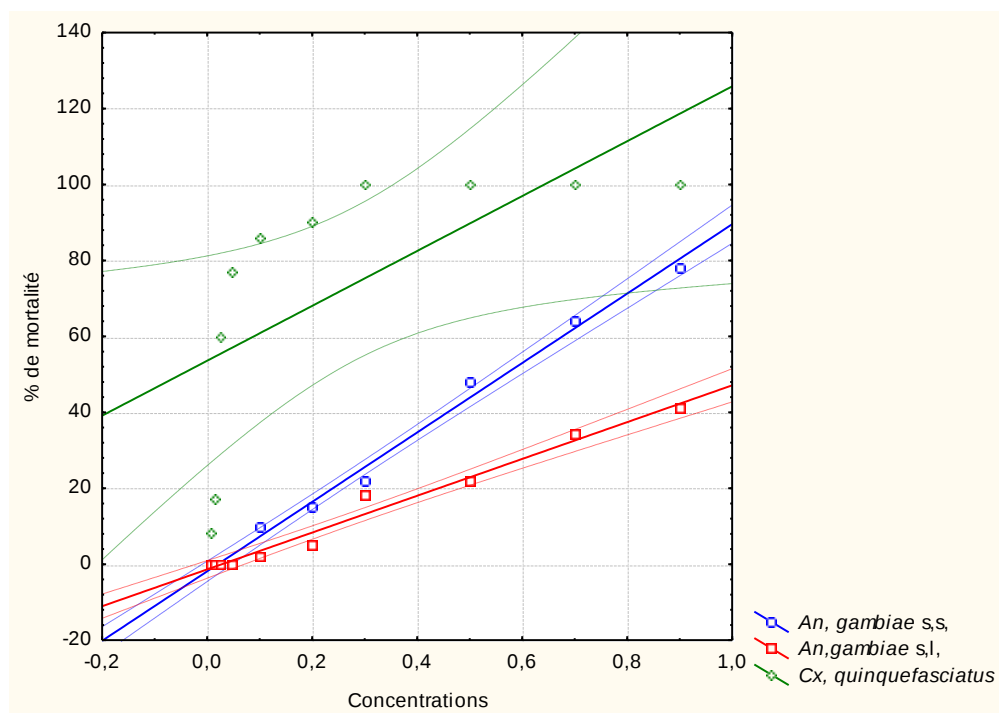


Figure 28. Activité larvicide de l'huile essentielle des feuilles de *Cannabis sativa* sur *Anopheles gambiae* s.l. et *Cx. quinquefasciatus* après 24 heures

Après 24 heures d'exposition, les larves de *Culex quinquefasciatus* apparaissent plus sensibles que celles de la souche sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. ($H=5,27$; $p=0,003$) qui, supportent plus la toxicité de l'huile essentielle des feuilles de *Cannabis sativa* que les larves de la souche de laboratoire d'*An.gambiae* s.s. ($H=3,46$; $p=0,01$). La comparaison des moyennes des taux de mortalité des souches de maboratoire d'*An.gambiae* s.s, d'*An. gambiae* s.l. et de *Cx. quinquefasciatus* réalisée avec un intervalle de confiance à 95% ($H=4,64$; $p=0,005$) montre une différence significative.

Les équations des droites de régression associées aux courbes de mortalité de chaque espèce après 24 heures d'exposition sont :

$Y_{gl} = -0,746 + 89,71X$ ($H=3,45$; $p=0,018$) ; $Y_{gt} = -1,152 + 48,171X$ ($H=3,22$; $p=0,023$) et $Y_{Cx} = 38,41 + 328,86X$ ($H=4,57$; $p=0,005$) respectivement pour les souches de laboratoire d'*Anopheles gambiae* s.s., sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. et pour *Culex quinquefasciatus*. Les concentrations létales nécessaires pour 50% de mortalité (CL_{50}) larvaire après 24 heures d'exposition sont : 0,501% ; 1,168% et 0,03% respectivement pour les souches de laboratoire d'*Anopheles gambiae* s.s., sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. et pour *Culex quinquefasciatus*. Tandis que les concentrations nécessaires pour 95% de mortalité larvaire (CL_{95}) après 24 heures d'exposition sont : 0,95% ; 2,21% et 0,17% respectivement.

Lorsque le temps d'exposition s'est étendu sur 48 heures, il n'est plus apparue de différence significative de sensibilité entre les deux souches d'*Anopheles gambiae* s.s. ($H=1,89$ $p=0,11$) et entre la souche sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. et *Culex quinquefasciatus* ($H=1,73$ $p=0,14$). Cependant, la mortalité a continué d'augmenter avec la concentration d'huile essentielle des feuilles de *Cannabis sativa* pour chaque espèce de moustique traitée.

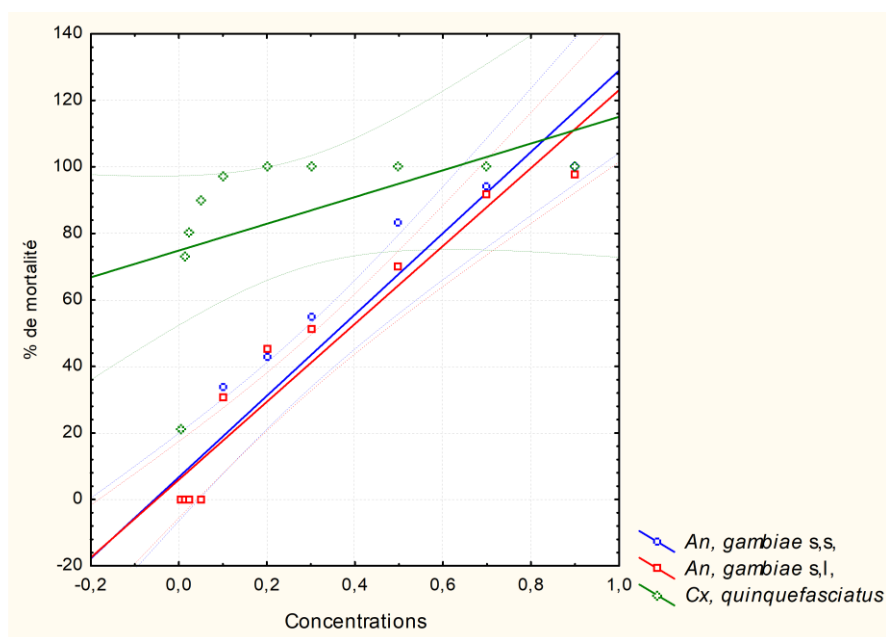


Figure 29: Activité larvicide de l'huile essentielle des feuilles de *Cannabis sativa* sur *Anopheles gambiae* s.l. et *Culex quinquefasciatus* après 48 heures

Les équations des droites de régression après 48 heures d'exposition sont : $Y_{gl}=18,334+104,31X$ (H=6 ; $p=0,001$); $Y_{gt}=16,359+100,55X$ (H=5,73 ; $p=0,002$) et $Y_{Cx}=60,30+258,88X$ (H=6,4 ; $p=0,0013$) respectivement pour les souches de laboratoire d'*Anopheles gambiae* s.s., sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. et pour *Culex quinquefasciatus*. Les doses létales nécessaires pour 50% de mortalité larvaire après 48 heures d'exposition sont : 0,201% ; 0,217% et 0,005% respectivement pour les souches de laboratoire d'*Anopheles gambiae* s.s, sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. et pour *Culex quinquefasciatus*. Alors que les concentrations nécessaires pour 95% de mortalité larvaire après 48 heures sont : 0,381% ; 0,412% et 0,110% respectivement pour les souches de laboratoire d'*Anopheles gambiae* s.s., sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. et pour *Culex quinquefasciatus*.

- Activité larvicide de l'huile essentielle des feuilles de *Piper umbellatum* sur *Anopheles gambiae* s.l. et *Culex quinquefasciatus*

Les larves de troisième stade des souches de laboratoire d'*Anopheles gambiae* s.s., sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. et de *Culex quinquefasciatus* ont été exposées aux doses croissantes de l'huile essentielle des feuilles de *Piper umbellatum* pendant 48 heures à raison de 100 larves par concentration. On a compté les larves mortes au terme de 24 heures et de 48 heures d'exposition. Le test s'est effectué sur un total de 2100 larves de Culicidés (700 larves de la souche de laboratoire d'*Anopheles gambiae* s.s, 700 larves de la souche sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. et 700 larves de *Culex quinquefasciatus*). Il n'est pas apparu de mortalité dans les gobelets témoins pendant la période d'observation. Les résultats sont consignés dans le tableau XIII.

Tableau XIII: Activité larvicide de l'huile essentielle des feuilles de *Piper umbellatum* sur *Anopheles gambiae* s.l. et *Culex quinquefasciatus*

Concentration(%)	Mortalité larvaire(%)					
	Après 24 heures			Après 48 heures		
	<i>An.gambiae</i> s.s.	<i>An. gambiae</i> s.l.	Cx.	<i>An. gambiae</i> s.s.	<i>An. gambiae</i> s.l.	Cx.
0,00625	0	0	12±0,4	0	0	17±0,47
0,0125	0	0	30±0,2	0	0	43±0,4
0,025	0	0	50±0,8	0	0	66±0,6
0,05	0	0	63±0,6	0	0	84±0,4
0,1	3±0,28	1±0,3	76±0,47	5±0,2	2±0,28	100
0,2	9±0,2	6±0,2	100	19±0,7	10±0,2,	100

0,4	28±0,7	15±0,4	-	39±2	29±0,4	-
0,6	58±2,4	44±1,4	-	83±1,1	57±0,8	-
0,8	82±0,6	64±0,4	-	100	80±0,2	-
0,9	100	90±0,8	-	100	98±0,28	-
H (Chi2)	H=2,34	H=2,16	H=4,03	H=2,68	H=2,33	H=4,2
P (probabilité)	P=0,04	P=0,06	P=0,015	P=0,03	P=0,04	0,01

Cx. : *Culex quinquefasciatus*

A partir des données du tableau XIII, on a tracé les courbes de mortalité des larves en fonction des concentrations d'huile essentielle de *Piper umbellatum*.

Après 24 heures d'exposition des larves de troisième stade des souches de laboratoire d'*Anopheles gambiae* s.s., d'*Anopheles gambiae* s.l. et de *Culex quinquefasciatus* aux concentrations croissantes d'huile essentielle des feuilles de *Piper umbellatum*, le nombre de larves mortes a été répertorié et les courbes de mortalité larvaire en fonction de la concentration de l'huile essentielle des feuilles de *Piper umbellatum* ont été tracées (figure 29).

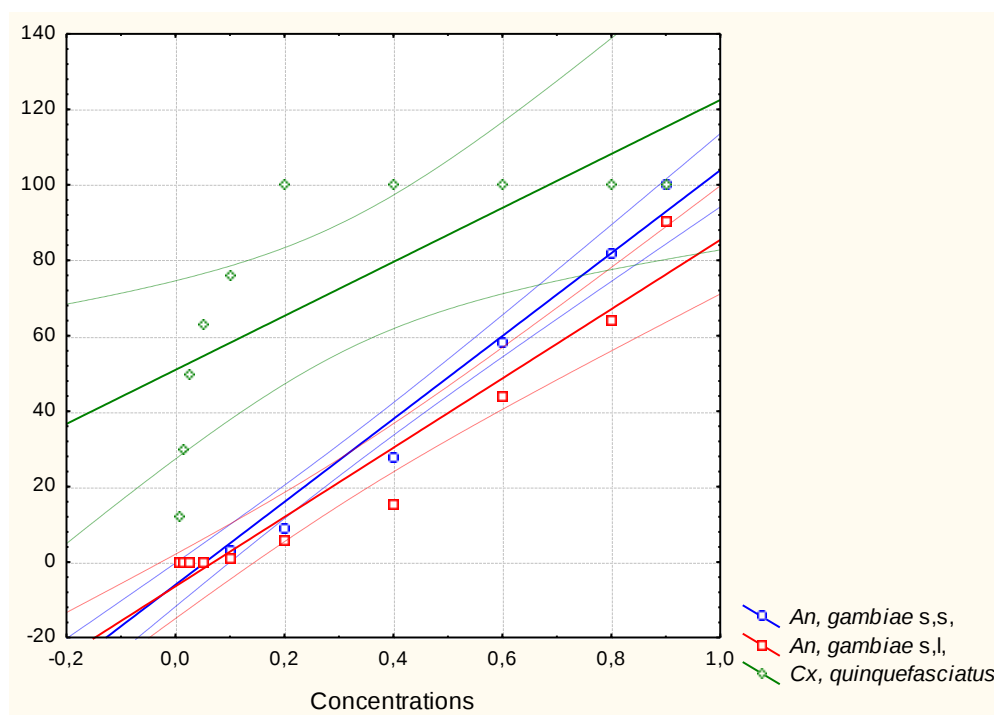


Figure 30. Activité larvicide de l'huile essentielle des feuilles de *Piper umbellatum* sur *Anopheles gambiae* s.l. et *Culex quinquefasciatus* après 24 heures

Le taux de mortalité de chaque espèce augmente avec la concentration d'huile essentielle des feuilles de *Piper umbellatum*. Les différentes équations des droites de régression générées au terme de 24 heures d'exposition sont : $Y_{gl} = -7,41 + 112,09X$ ($H=2,80$; $p=0,03$) ; $Y_{gt} = -7,62 + 93,54X$ ($H=2,52$; $p=0,05$) et $Y_{Cx} = 19 + 328X$ ($H=4,26$; $p=0,008$) respectivement pour les

souches de laboratoire d'*Anopheles gambiae* s.s., sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. et pour *Culex quinquefasciatus*. Après 24 heures d'exposition, les concentrations létales pour 50% de mortalité larvaire sont : 0,51% ; 0,61% et 0,09% respectivement pour les souches de laboratoire d'*Anopheles gambiae* s.s., sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. et pour *Culex quinquefasciatus*. Alors que pour 95% de mortalité larvaire, ces concentrations sont : 0,91% ; 1,09% et 0,23% respectivement. Il apparait une différence significative de sensibilité à l'huile essentielle des feuilles de *Piper umbellatum* entre les larves de la souche de laboratoire d'*Anopheles gambiae* s.s. et la souche sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. ($H=3,83$; $p=0,012$) et entre *Culex quinquefasciatus* et la souche sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. ($H=4,65$; $p=0,005$) après 24 heures d'exposition. Les larves de la souche sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. sont plus tolérantes à l'action de l'huile essentielle des feuilles de *Piper umbellatum* que celles de la souche laboratoire d'*Anopheles gambiae* s.s. ($0,51\% < 0,61\%$) et celles de *Culex quinquefasciatus* ($0,61\% > 0,09\%$).

Après 48 heures de contact avec différentes concentrations croissantes de l'huile essentielle des feuilles de *Piper umbellatum*, nous avons exploité les données du tableau XIII pour tracer les courbes de mortalité (figure 30).

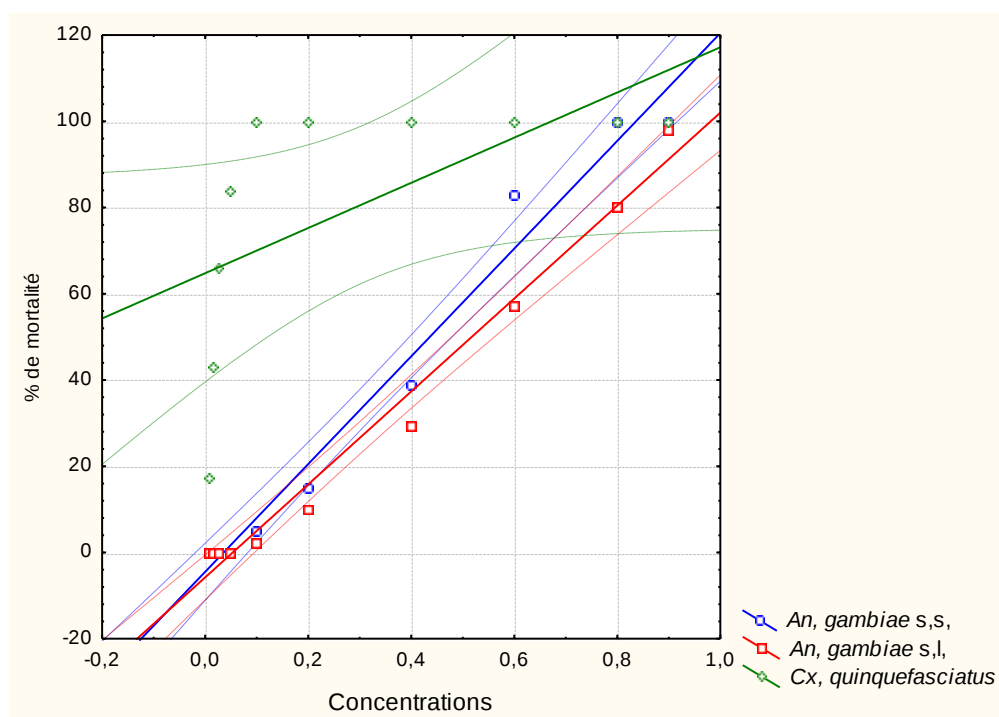


Figure 31. Activité larvicide de l'huile essentielle des feuilles de *Piper umbellatum* sur *Anopheles gambiae* s.l. et *Culex quinquefasciatus* après 48 heures

Les équations des droites de régression générées après 48 heures d'exposition des larves des souches de laboratoire d'*Anopheles gambiae* s.s., sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. et de *Culex quinquefasciatus* à l'huile essentielle des feuilles de *Piper umbellatum* sont :

$Y_{gl} = -5,02 + 125,9X$ ($H=3,35$; $p=0,02$) $Y_{gt} = -5,43 + 95,25X$ ($H=2,9$; $p=0,03$) et $Y_{Cx} = 26,2 + 432X$ ($H=5$; $p=0,003$) respectivement pour les souches de laboratoire d'*Anopheles gambiae* s.s., sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. et pour *Culex quinquefasciatus*. Après 48 heures de contact, les concentrations létales d'huile essentielle des feuilles de *Piper umbellatum* nécessaires pour 50% de mortalité larvaire sont : 0,43% ; 0,58% et 0,05% respectivement pour les souches de laboratoire d'*Anopheles gambiae* s.s., sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. et pour *Culex quinquefasciatus*. Pour une mortalité de 95% après 48 heures d'exposition ces concentrations sont : 0,79% ; 1,05% et 0,16% respectivement. Les différences entre les taux de mortalité des larves des souches de laboratoire d'*Anopheles gambiae* s.s., sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. ($H=3$; $p=0,03$) et entre *Culex quinquefasciatus* et la souche sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. ($H=4,26$; $p=0,007$) sont toujours significatives. La mortalité de chaque espèce a augmenté en fonction des concentrations d'huile essentielle des feuilles de *Piper umbellatum*.

III.1.5. Effet adjuvant des huiles essentielles des feuille de *Cannabis sativa* et de *Piper umbellatum* pour l'efficacité du témephos sur les larves d'*Anopheles gambiae* s.l. et de *Culex quinquefasciatus*

L'efficacité des combinaisons des huiles essentielles des feuilles de *Cannabis sativa* et de *Piper umbellatum* avec le témephos (Abate, ALM International France) a été évaluée sur des larves de troisième stade d'*Anopheles gambiae* s.l. et de *Culex quinquefasciatus* pour 48 heures d'exposition. Les résultats obtenus varient en fonction des espèces de moustique.

- **Effet adjuvant de l'huile essentielle des feuilles de *Cannabis sativa* pour l'efficacité du témephos sur les larves d'*Anopheles gambiae* s.l. et de *Culex quinquefasciatus***

Au terme de 24 heures et de 48 heures d'exposition des larves d'*Anopheles gambiae* s.l. et de *Culex quinquefasciatus* à l'effet du mélange de l'huile essentielle des feuilles de *Cannabis sativa* avec le témephos, les larves mortes ont été dénombrées (tableaux XIV). Le test s'est effectué sur un total de 1800 larves de Culicidés (dont 900 larves d'*Anopheles gambiae* s.l. et 900 larves de *Culex quinquefasciatus*).

Tableau XIV : Effet adjuvant de l'huile essentielle des feuilles de *Cannabis sativa* pour l'activité larvicide du témephos sur *Anopheles gambiae* s.l. et *Culex quinquefasciatus*

Concentration d'huile essentielle dans le mélange (%)	Mortalité larvaire (%)			
	Après 24 heures		Après 48 heures	
	<i>An. gambiae</i> s.l.	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	<i>An.gambiae</i> s.l.	<i>Cx. quinquefasciatus</i>
0 (Tem. Seul, 0,6%)	46±0,2	50±0,6	65±0,4	63±0,5
0,00156	46±0,2	44±0,4	46±0,2	53±0,5
0,0031	46±0,2	55±0,6	46±0,2	72±0,4
0,0062	45±0,7	66±0,6	46±0,2	81±0,2
0,0125	37±0,2	80±0,4	56±0,4	91±1,1
0,025	41±0,7	90±1	63±0,8	100
0,05	45±0,2	100	68±0,4	100
0,1	49±0,2	100	74±0,2	100
0,2	53±0,2	100	100	100
H (Chi2)	H=3,34	H=10,17	H=3,23	H=15,25
P (probabilité)	P=0,012	p<0,05	P=0,014	p<0,05

Tem. : témephos

La différence de sensibilité des larves de la souche sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. et de *Culex quinquefasciatus* au mélange témephos-huile essentielle de *Cannabis sativa* est significative après 24 heures (H=7,45 ; p=0,006 et CL₅₀ : 0,14%>0,002% respectivement) et 48 heures (H=5,33 ; p=0,02 et CL₅₀ : 0,011%>0,0013%) d'exposition. Les larves de *Culex quinquefasciatus* sont plus sensibles que celles d'*Anopheles gambiae* s.l.

A partir des données du tableau XIV montrant le taux de mortalité des larves de chacune des deux espèces de moustiques au terme d'un séjour de 24 heures dans le mélange de l'huile essentielle des feuilles de *Cannabis sativa* avec le témephos, les courbes de mortalité en fonction des concentrations d'huile essentielle dans le mélange ont été tracées (figure 31).

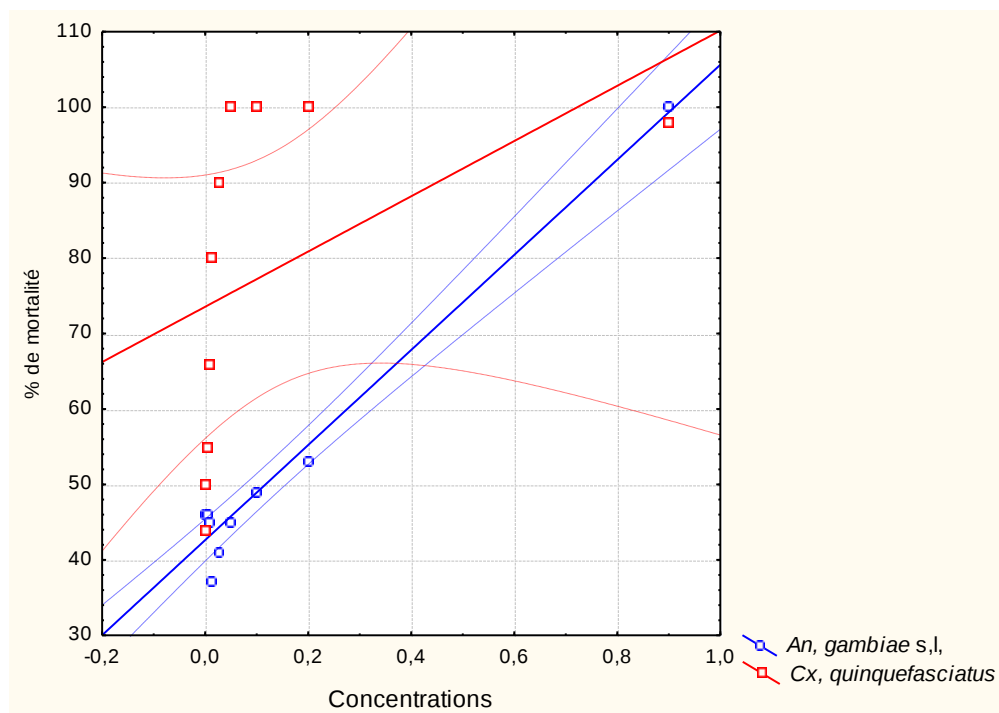


Figure 32. Effet adjuvant de l'huile essentielle des feuilles de *Cannabis sativa* pour l'efficacité du témephos sur les larves d'*Anopheles gambiae* s.l. et de *Culex quinquefasciatus* après 24 heures

Les différentes équations des droites de régression de l'effet adjuvant de l'huile essentielle des feuilles de *Cannabis sativa* pour l'efficacité du témephos sur les larves d'*Anopheles gambiae* s.l. et *Culex quinquefasciatus* après 24 heures générées sont: $Y_{An}=42,71+50,91X$ ($H=3,34$; $p=0,012$) et $Y_{Cx}=68,55+217,30X$ ($H=10,17$; $p<0,05$) respectivement pour la souche sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. et pour *Culex quinquefasciatus*. Les concentrations d'huile essentielle des feuilles de *C. sativa* dans le mélange avec le témephos nécessaires pour tuer 50% de larves exposées sont : 0,14% ; 0,002% respectivement ; tandis que les concentrations nécessaires pour 95% de mortalité sont de : 0,35% et 0,026% respectivement pour la souche sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. et pour *Culex quinquefasciatus*. Bien que les larves des deux espèces soient sensibles au mélange de l'huile essentielles des feuilles de *Cannabis sativa* avec le témephos, les larves de la souche sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. sont moins sensibles que celles de *Culex quinquefasciatus* ($H=7,45$; $p=0,006$) à l'effet du mélange du témephos avec l'huile essentielle des feuilles de *Cannabis sativa* après 24 heures d'exposition. La différence de sensibilité des larves de la souche sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. et de *Culex quinquefasciatus* au mélange témephos-huile essentielle de *Cannabis sativa* est significative après 24 heures ($H=7,45$; $p=0,006$) et 48 heures ($H=5,33$; $p=0,02$) d'exposition ; les larves de *Culex quinquefasciatus* sont plus sensibles que celles d'*Anopheles gambiae* s.l.

Après une période d'observation de 48 heures des larves de moustiques dans des gobelets traités avec le mélange du témephos avec l'huile essentielle des feuilles de *Cannabis sativa*, nous avons compté les larves mortes et les courbes de mortalité en fonction de la concentration d'huile essentielle dans le mélange ont été tracées (figure 32).

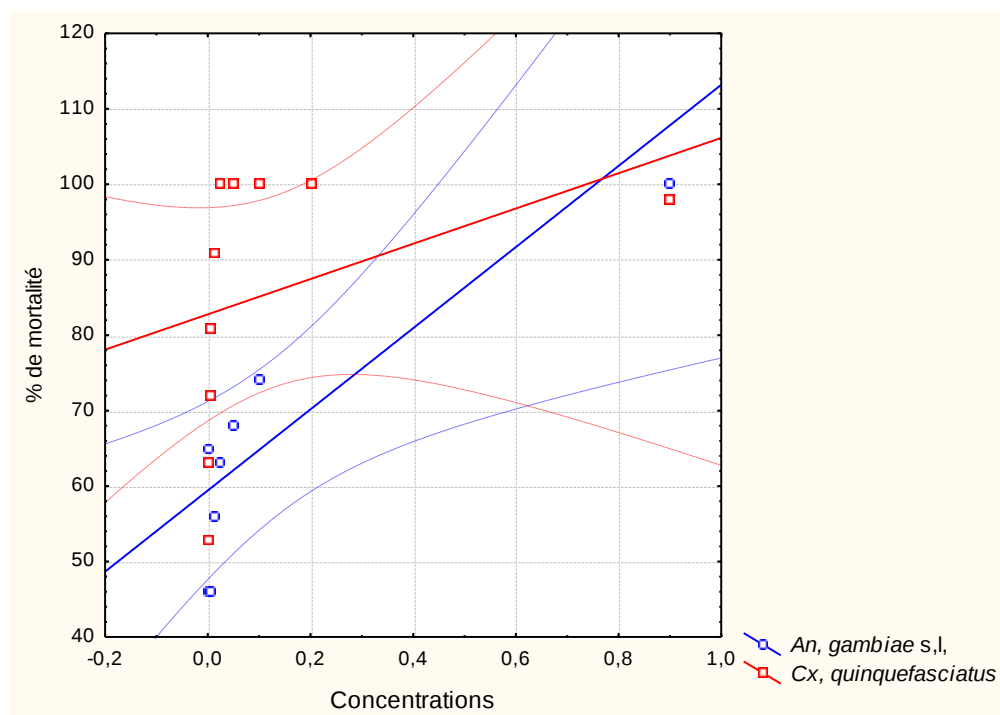


Figure 33: Effet adjuvant de l'huile essentielle des feuilles de *Cannabis sativa* pour l'activité larvicide du témephos sur *Anopheles gambiae* s.l. et *Culex quinquefasciatus* après 48 heures

Les équations des droites de régression de l'effet adjuvant de l'huile essentielle des feuilles de *Cannabis sativa* après 48 heures sont : $Y_{An}=49,39+260,55X$ ($H=3,23$; $p=0,014$) et $Y_{Cx}=81,06+134,27X$ ($H=15,52$; $p<0,05$) respectivement pour les larves d'*Anopheles gambiae* s.l. et pour les larves *Culex quinquefasciatus*. Les doses létales d'huile essentielle des feuilles de *Cannabis sativa* dans le mélange nécessaires pour tuer 50% et 95% de larves sont : 0,011% ; 0,0013% et 0,17% ; 0,013% respectivement pour la souche sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. et pour *Culex quiquaefasciatus*. Les concentrations d'huile essentielle des feuilles de *Cannabis sativa* efficaces après 48 heures d'exposition sont inférieures à celles nécessaires pour la mortalité après 24 heures, aussi bien pour les larves de la souche sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. que pour celles de *Culex quinquefasciatus*. La différence de sensibilité des larves de la souche sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. et de *Culex*

quinquefasciatus au mélange témephos-huile essentielle de *Cannabis sativa* est significative après 48 heures ($H=5,33$; $p=0,02$) d'exposition, les larves de *Culex quinquefasciatus* étant plus sensibles que celles d'*Anopheles gambiae* s.l.

- Effet adjuvant de l'huile essentielle des feuilles de *Piper umbellatum* pour l'activité larvicide du témephos sur *Anopheles gambiae* s.l. et *Culex quinquefasciatus*

Les larves de la souche sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. et celles de *Culex quinquefasciatus* ont été trempées dans le mélange de l'huile essentielle des feuilles de *Piper umbellatum* avec le témephos pendant 48 heures. Un effectif de 2000 larves de Culivides a été testé (1000 larves d'*Anopheles gambiae* s.l. et 1000 larves de *Culex quinquefasciatus*) et les larves mortes ont été dénombrées après 24 heures et 48 heures (tableau XV).

Tableau XV: Effet adjuvant de l'huile essentielle des feuilles de *Piper umbellatum* pour l'activité larvicide du témephos sur *Anopheles gambiae* s.l. et *Culex quinquefasciatus*

Concentration d'huile essentielle dans le mélange (%)	Mortalité larvaire(%)			
	Après 24 heures		Après 48 heures	
	An. <i>gambiae</i> s.l.	Cx. <i>quinquefasciatus</i>	An. <i>gambiae</i> s.l.	Cx. <i>quinquefasciatus</i>
0 (Tem. Seul, 0,6%)	46±0,2	50±0,6	65±0,4	63±0,5
0,00156	52±1,2	68±0,7	65±0,7	77±0,4
0,0031	51±0,4	80±0,4	64±1,2	86±0,6
0,0062	51±0,7	82±0,6	63±0,7	93±0,4
0,0125	52±0,2	89±0,8	65±0,2	99±0,2
0,025	38±1	97±0,4	54±0,2	100
0,05	40±0,7	100	59±0,4	100
0,1	42±1,2	100	69±0,2	100
0,2	45±0,7	100	76±0,4	100
0,4	51±0,4	100	100	100
H (Chi2)	H=3,12	H=23,2	H=3	H=34
P (probabilité)	P=0,014	p<0,05	P=0,017	p<0,05

Te. : Témephos

A partir des résultats d'observations consignés dans le tableau XV ci-dessus, nous avons tracé les courbes de mortalité des larves en fonctions des concentrations d'huile essentielle des feuilles de *Piper umbellatum* dans le mélange avec le témephos.

Au terme de 24 heures d'exposition, l'effet adjuvant de l'huile essentielle des feuilles de *Piper umbellatum* pour la toxicité du témephos sur les larves de la souche sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. et de *Culex quinquefasciatus* a été évalué. Les larves mortes ont été comptées et les courbes dose-mortalité ont été tracées (figure 33).

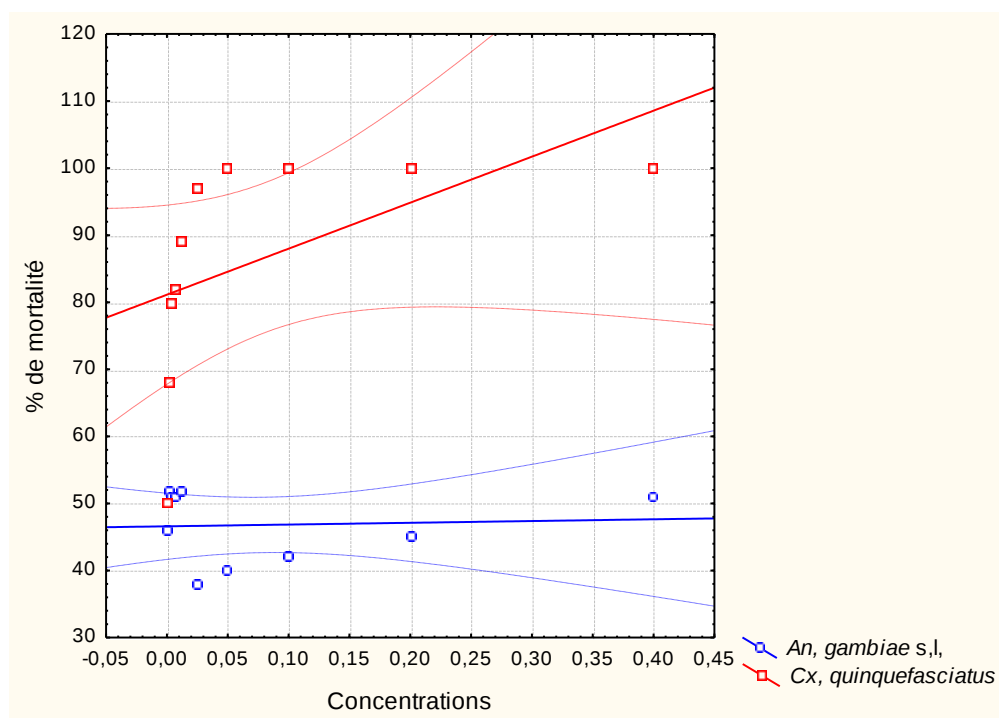


Figure 34: Effet adjuvant de l'huile essentielle des feuilles de *Piper umbellatum* pour l'efficacité du témephos sur les larves d'*Anopheles gambiae* s.l. et de *Culex quinquefasciatus* après 24 heures

Les équations des droites de régression de l'efficacité de la combinaison de l'huile essentielle des feuilles de *Piper umbellatum* avec le témephos sur les larves de la souche sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. et de *Culex quinquefasciatus* après 24 heures d'exposition sont : $Y_{An}=9,91+132,58X$ ($H=3,12$; $p=0,014$) et $Y_{Cx}=54,42+2071,32X$ ($H=23,2$; $p<0,05$) respectivement. Les concentrations létales de l'huile essentielle des feuilles de *P.umbellatum* dans le mélange avec le témephos nécessaires pour 50% de mortalité larvaire sont : 0,30% et 0,0011% respectivement, tandis que les concentrations nécessaires pour tuer 95 % de larves en 24 heures sont de : 0,64% et 0,024% respectivement pour la souche sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. et pour *Culex quinquefasciatus*.

La comparaison des moyennes des taux de mortalité entre les larves de la souche sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. et celles de *Culex quinquefasciatus* montre une différence significative ; les larves de *Culex quinquefasciatus* étant plus sensibles à la toxicité du

mélange de l'huile essentielle des feuilles de *Piper umbellatum* avec le témephos que celles de la souche sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. ($H=12,79$; $p=0,0003$).

Après 48 heures d'exposition, la mortalité a augmenté en fonction des concentrations d'huile essentielle dans le mélange avec le témephos (figure 34).

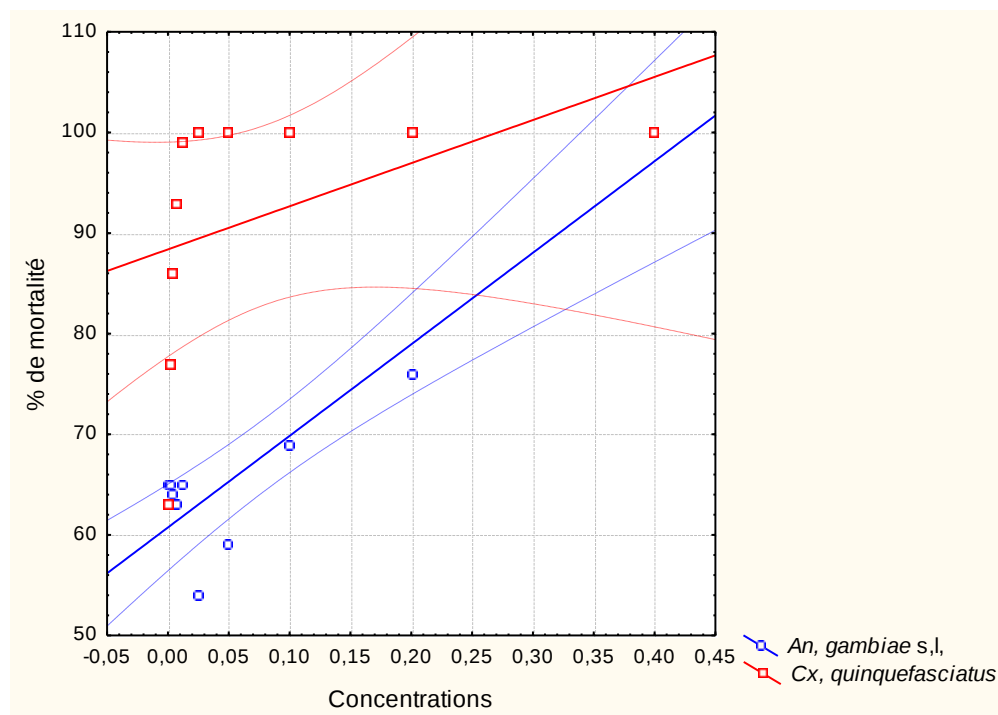


Figure 35. Effet adjuvant de l'huile essentielle des feuilles de *Piper umbellatum* pour l'efficacité du témephos sur les larves d'*Anopheles gambiae* s.l. et de *Culex quinquefasciatus* après 48 heures

Les équations des droites de régression de l'effet adjuvant de l'huile essentielle des feuilles de *Piper umbellatum* pour l'efficacité du témephos sur les larves de la souche sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. et de *Culex quinquefasciatus* sont : $Y_{An}=89,39+90,75X$ et $Y_{Cx}=73,75+1412,28X$ respectivement. Ainsi, les concentrations d'huile essentielle des feuilles de *P. umbellatum* mélangées au témephos nécessaires pour 50% de mortalité larvaire après 48 heures d'exposition sont : 0,023% et 0,001% respectivement pour la souche sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. et pour *Culex quinquefasciatus*. Les concentrations létales nécessaires pour 95% de mortalité sont : 0,38% et 0,015% respectivement. Les larves de *Culex quinquefasciatus* apparaissent plus susceptibles à l'effet du mélange de l'huile essentielle des feuilles de *Piper umbellatum* avec le témephos que celles de la souche sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. ($H=10,96$; $p=0,001$).

Même après 48 heures d'exposition, la différence entre les moyennes des taux de mortalité des larves de la souche sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. et celles de *Culex quinquefasciatus* demeure significative ($H=10,96$; $p=0,001$) ; les larves de la souche sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. sont plus tolérantes à la toxicité du mélange de l'huile essentielle des feuilles de *Piper umbellatum* avec le témephos que celles de *Culex quinquefasciatus*.

III.1.6. Activités Knock Down et adulticide des huiles essentielles des feuilles de *Cannabis sativa* et de *Piper umbellatum* sur *Anopheles gambiae* s.l. et *Culex quinquefasciatus*

Au cours d'une heure de contact des adultes femelles de moustiques avec le tulle moustiquaire imprégné à différentes concentrations d'huile essentielle, on a noté à intervalle de 10 minutes, le nombre de moustiques assommés (knock down) c'est-à-dire tombés sur le dos ou sur le côté et les individus morts après 24 heures. Les données récoltées ont permis de dresser les tableaux XVI et XVII et de tracer les différentes courbes illustrant la variation des taux de mortalité. Les tests se sont effectués sur 6200 adultes de Culicidae.

- Activités Knock Down et adulticide de l'huile essentielle des feuilles de *Cannabis sativa* sur *Anopheles gambiae* s.l. et *Culex quinquefasciatus*

On a évalué l'activité de l'huile essentielle des feuilles de *C.sativa* sur les adultes des souches de laboratoire d'*Anopheles gambiae* s.s., d'*Anopheles gambiae* s.l. et sur *Culex quinquefasciatus* après avoir compté les moustiques assommés au terme d'une heure de temps de contact avec le tulle moustiquaire imprégné de doses croissantes d'huile essentielle des feuilles de *C.sativa* et dénombré les moustiques morts 24 heures après. Un total de 2000 moustiques femelles adultes a été utilisé pour les tests (dont 700 *Anopheles gambiae* s.s., 600 *Anopheles gambiae* s.l. et 700 *Culex* sp.). Il n'a pas été trouvé de moustiques assommés ou mort dans les gobelets témoins en carton. Grâce aux données ainsi récoltées, le tableau XVI ci-dessous a été élaboré.

Tableau XVI : Activité Knock down et adulticide de l'huile essentielle des feuilles de *Cannabis sativa* sur *Anopheles gambiae* s.l. et *Culex quinquefasciatus*

Espèce	Nb d'adultes exposés	Conc. (%)	Knock down à 10 minutes d'intervalle						Mort. 24h	IC à 95%
	-	-	10 min	20 min	30 min	40 min	50 min	60 min	-	-
<i>An. gambiae</i> s.s.	100	0,025	02 ±0,3	07 ±0,2	08 ±0,4	10 ±0,3	16 ±0,4	16 ±0,4	8±0,4	2-11
<i>An. gambiae</i> s.s.	100	0,05	05 ±0,2	10 ±0,3	14 ±0,3	14 ±0,3	15 ±0,5	20 ±0,2	15±0,5	12-18
<i>An. gambiae</i> s.l.	100		03 ±0,2	04 ±0,4	05 ±0,2	05 ±0,2	07 ±0,2	07 ±0,2	10 ±0,3	8-14
<i>An. gambiae</i> s.s.	100	0,1	05 ±0,2	12 ±0,4	18 ±0,6	23 ±0,2	24 ±0,6	37 ±0,5	54 ±0,6	52-88
<i>An. gambiae</i> s.l.	100		3 ±0,2	08 ±0,4	12 ±0,4	17 ±0,5	20 ±0,4	30 ±0,5	24 ±0,4	21-27
<i>An. gambiae</i> s.s.	100	0,2	8 ±0,4	15 ±0,6	35 ±0,5	48 ±0,7	60 ±0,8	75 ±0,7	68 ±0,6	64-73
<i>An. gambiae</i> s.l.	100		5 ±0,2	11 ±0,2	25 ±0,8	36 ±0,6	50 ±0,3	68 ±0,7	60 ±0,4	55-64
<i>An. gambiae</i> s.s.	100	0,3	12 ±0,4	25 ±0,2	52 ±0,4	71 ±0,2	80 ±0,4	91 ±0,2	84 ±0,5	79-88
<i>An. gambiae</i> s.l.	100		9 ±0,2	20 ±0,4	42 ±0,3	60 ±0,4	75 ±0,5	87 ±0,5	86 ±0,67	82-90
<i>An. gambiae</i> s.s.	100	0,5	20 ±0,2	40 ±0,20	80 ±1	88 ±0,4	96 ±0,5	100	100	100-100
<i>An. gambiae</i> s.l.	100		18 ±0,5	32 ±0,8	58 ±1,6	84 ±0,7	89 ±1	99 ±0,5	98 ±0,65	96-102
<i>Cx. quinquefasciatus</i>	100	0,025	00	1 ±0	04 ±0,47	07 ±0,47	10 ±0,28	15 ±0,47	12 ±0,41	9-15
	100	0,05	04 ±0,4	8 ±0,4	17 ±0,47	19 ±0,62	20 ±0,7	22 ±0,5	15 ±1,03	12-18
	100	0,1	9 ±0,47	17 ±1,03	28 ±1,08	35 ±0,85	44 ±0,91	52 ±0,8	48 ±0,81	46-50
	100	0,2	15 ±0,47	28 ±0,4	61 ±0,62	81 ±0,47	89 ±0,47	93 ±0,62	65 ±0,85	62-68
	100	0,3	31 ±0,47	38 ±0,64	70 ±0,64	86 ±0,64	92 ±0,4	98 ±0,28	80 ±0,4	78-84
	100	0,5	46 ±0,64	62 ±0,64	87 ±0,47	96 ±0,4	97 ±0,47	99 ±0,47	99 ±0,25	96-101

Lab : souche de laboratoire d'*Anopheles gambiae* s.s., $KDT_{50}=23\pm0.7$ min, $KDT_{95}=45\pm0.91$ min ; Ter : souche sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. ; $KDT_{50}=28\pm1.52$ min, $KDT_{95}=55.5\pm0.95$ min. Ces calculs des taux de Knock down prennent en compte uniquement la plus grande concentration d'huile essentielle des feuilles de *Cannabis sativa* (0,5%).

Grâce à l'exploitation des résultats d'observations consignés dans le tableau XVI , nous avons tracé les courbes de l'activité Knock down et de la mortalité des adultes des souches de laboratoire d'*Anopheles gambiae* s.s., sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. et de *Culex quinquefasciatus* en fonction de différentes concentrations d'huile essentielle des feuilles de *Cannabis sativa*.

*** Activité knock down de l'huile essentielle des feuilles de *Cannabis sativa* sur *Anopheles gambiae* s.l. et *Culex quinquefasciatus***

En considérant uniquement la dose d'huile essentielle des feuilles de *Cannabis sativa* la plus élevée (0,5%), on a tracé la courbe de l'effet de paralysie temporaire de l'huile essentielle des feuilles de *Cannabis sativa* sur les souches de laboratoire d'*Anopheles gambiae* s.s., sauvage *Anopheles gambiae* s.l. et *Culex quinquefasciatus* à intervalle de dix minutes pendant une heure.

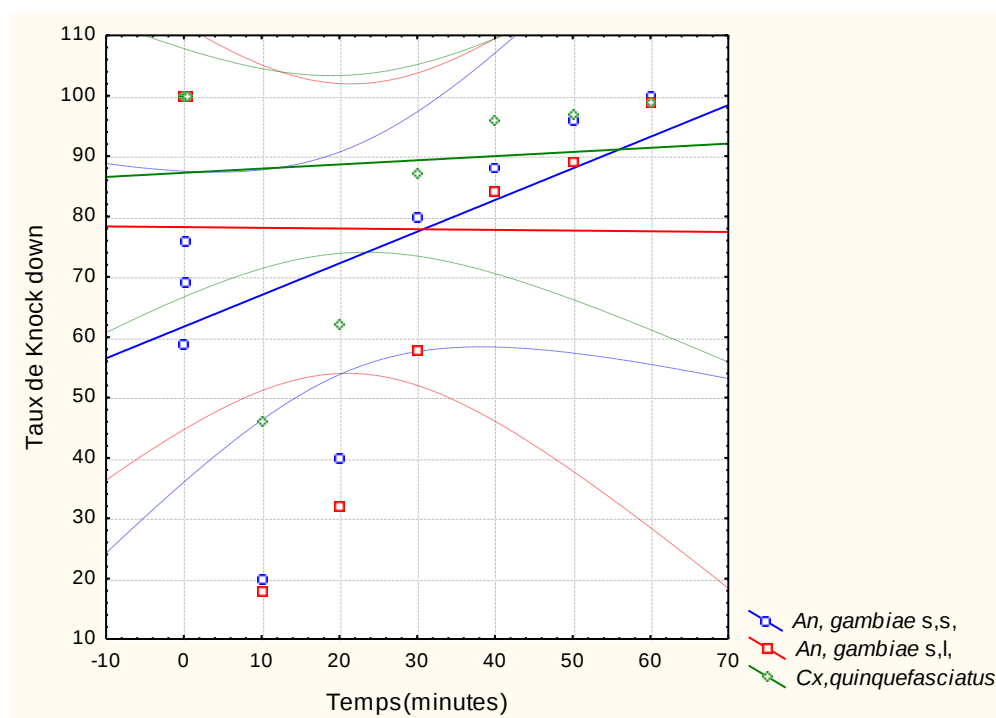


Figure 36 : Effet knock down de l'huile essentielle des feuilles de *Cannabis sativa* sur *Anopheles gambiae* s.l. et *Culex quinquefasciatus*

Les différentes équations des droites de régression de cette activité knock down de l'huile essentielle des feuilles de *Cannabis sativa* sur les souches de laboratoire d'*Anopheles gambiae* s.s., sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. et *Culex quinquefasciatus* sont: $Y_{gl}=13,066+1,64X$ ($H=5,25$; $p=0,003$); $Y_{gt}=3,133+1,72X$ ($H=4,79$; $p=0,005$) et $Y_{Cx}=43,26+1,08X$ ($H=9,07$; $p=0,0002$), respectivement pour les souches de laboratoire d'*Anopheles gambiae* s.s., sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. et pour *Culex quinquefasciatus*.

Ainsi, les temps nécessaires pour assommer 50% de femelles de moustiques exposées sont : $23 \pm 0,7$ min ; $28 \pm 1,55$ min et $6 \pm 0,24$ min respectivement. Alors que pour assommer 95% de moustiques exposées les temps de knock down sont : $45 \pm 0,91$ min ; $55 \pm 0,95$ min et $47 \pm 0,90$ min respectivement pour les souches de laboratoire d'*Anopheles gambiae* s.s., sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. et pour *Culex quinquefasciatus*. Après une heure de contact des moustiques adultes avec les tulles imprégnés de doses croissantes d'huile essentielle des feuilles de *Cannabis sativa*, il apparaît une différence significative des moyennes des taux de moustiques assommés entre les différentes espèces. Ainsi, la souche de laboratoire d'*Anopheles gambiae* s.s. succombe plus vite que la souche sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. ($H=4,3$; $p=0,027$), tandis que *Culex quinquefasciatus* succombe plus vite que la souche sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. ($H=3,4$; $p=0,04$).

*** Activité adulticide de l'huile essentielle des feuilles de *Cannabis sativa* sur les adultes d'*Anopheles gambiae* s.l. et de *Culex quinquefasciatus***

Vingt-quatre heures après le contact des adultes femelles de moustiques avec des tulles moustiquaires imprégnés de concentrations croissantes d'huile essentielle des feuilles de *Cannabis sativa*, les adultes morts (y compris ceux ayant des pattes ou des ailes endommagées et incapables de voler : car ceci peut être considéré comme l'effet du produit testé) ont été dénombrés et les courbes de mortalité tracées (figure 36).

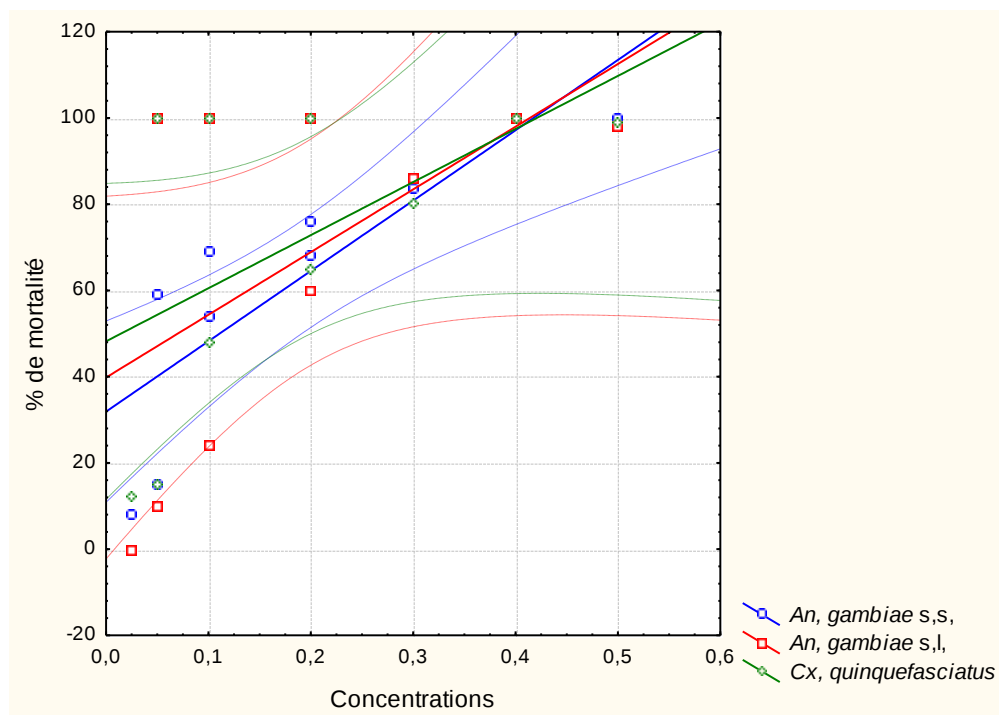


Figure 37 : Activité adulticide de l'huile essentielle des feuilles de *Cannabis sativa* sur *Anopheles gambiae* s.l. et *Culex quinquefasciatus*

Les différentes équations des droites de régression de l'activité adulticide de l'huile essentielle des feuilles de *Cannabis sativa* sur les souches de laboratoire d'*Anopheles gambiae* s.s., sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. et *Culex quinquefasciatus* sont : $Y_{gl}=12,789+203,81X$ (H=3,63 ; p=0,015) ; $Y_{gt}=2,837+219,69X$ (H=3,26 ; p=0,031) et $Y_{Cx}=17,27+183,28X$ (H=3,71 ; p=0,013) respectivement pour les souches de laboratoire d'*Anopheles gambiae* s.s., sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. et pour *Culex quinquefasciatus*. Les concentrations létales d'huile essentielle des feuilles de *C. sativa* entraînant 50% de mortalité sont: 0,107% ; 0,150% et 0,17 % respectivement pour les souches de laboratoire d'*Anopheles gambiae* s.s., sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. et pour *Culex quinquefasciatus*. Les concentrations d'huile essentielle des feuilles de *Cannabis sativa* nécessaires pour 95% de mortalité sont : 0,339% ; 0,369% et 0,42% respectivement.

La comparaison des moyennes des taux de mortalité des différentes espèces de moustiques 24 heures après le contact avec des morceaux de tulle moustiquaire imprégnés des concentrations croissantes d'huile essentielle des feuilles de *Cannabis sativa* , montre que les individus de la souche sauvage d'*An.gambiae* s.l. tolèrent l'effet de l'huile essentielle des feuilles de *Cannabis sativa* plus que ceux de la souche de laboratoire d'*Anopheles gambiae* s.s. (H=3,5 ; p=0,04). Bien que les individus adultes de *Culex quinquefasciatus* soient plus vite assommés que ceux de la souche sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l., *Culex quinquefasciatus* est plus tolérante à l'effet de l'huile essentielle des feuilles de *Cannabis sativa* (H=3 ; p=0,03).

- Activités Knock down et adulticide de l'huile essentielle des feuilles de *Piper umbellatum* sur *Anopheles gambiae* s.l. et *Culex quinquefasciatus*

Des adultes femelles d'*Anopheles gambiae* s.l. et de *Culex quinquefasciatus* âgés de deux à cinq jours et n'ayant pas pris de repas sanguin, ont été mis au contact de morceaux de tulle moustiquaire imprégnés de concentrations croissantes d'huile essentielle des feuilles de *Piper umbellatum* pendant une heure et les individus assommés ont été répertoriés ainsi que les individus morts après 24 heures. Il n'a pas été constaté de mortalité dans les gobelets témoins en carton. Les résultats de ces observations sont consignés dans le tableau XVII. Pour ce test, nous avons utilisé 1800 femelles adultes de Culicidés (600 *Anopheles gambiae* s.s., 600 *Anopheles gambiae* s.l. et 600 *Culex quinquefasciatus* sp.)

Tableau XVII: Activité Knock down et adulticide de l'huile essentielle des feuilles de *Piper umbellatum* sur *Anopheles gambiae* s.l et *Culex quinquefasciatus*

Espèce	Nb. d'adulte exposé	Conc. (%)	Knock down à 10 minutes d'intervalle						Mort. 24h	IC à 95%
			10 min	20 min	30 min	40 min	50 min	60 min	-	-
<i>An. gambiae</i> s.s.	100	0,1	4±0,6	6±0,2	10±0,2	17±0,2	19 0,2	20 0,4	8±0,4	5-11
<i>An. gambiae</i> s.l.	100		0	1±0,2	3±0,2	7±0,4	9 0,2	10 0,2	3±0,47	0-6
<i>An. gambiae</i> s.s.	100	0,2	90, ±25	22±0,5	11±1,1	44±0,4	46 0,2	48 0,2	30±0,2	28-32
<i>An. gambiae</i> s.l.	100		8±0,4	11±0,4	17±0,6	24±1	29±1,3	37±1,3	17±0,2	15-18
<i>An. gambiae</i> s.s.	100	0,4	280±5	42±0,2	59±0,4	67±0,2	69±0,4	68±0,4	42±0,4	40-44
<i>An. gambiae</i> s.l.	100		18±0,8	27±09	45±0,2	67±0,4	69±0,2	69±0,2	39±0,4	36-42
<i>An. gambiae</i> s.s.	100	0,6	40±0,4	55±0,6	79±0,6	85±0,4	91±0,6	95±0,6	84±0,2	81-87
<i>An. gambiae</i> s.l.	100		30±0,2	42±0,2	73±0,4	83±0,4	87±0,2	89±0,4	78±0,2	76-80
<i>An. gambiae</i> s.s.	100	0,8	43±0,9	69±0,4	89±0,4	96±0,4	99±0,2	100	100	100-100
<i>An. gambiae</i> s.l.	100		36±0,4	68±0,4	88±0,4	93±0,2	98±0,2	99±0,2	99±0,2	98-101
<i>Cx. quinquefasciatus</i>	100	0,05	0	0	1±0,2	5±0,4	6±0,2	8±0,4	7±0,2	6-9
	100	0,1	6±0,2	12±0,4	21±0,4	27±0,4	31±0,6	31±0,6	22±0,8	15-27
	100	0,2	16±0,4	26±0,2	37±0,4	60±0,4	70±0,2	71±0,2	66±0,2	64-68
	100	0,4	24±0,7	41±0,2	59±0,4	70±0,2	83±0,4	90±0,2	80±04	77-83
	100	0,6	32±0,4	50±0,8	72±0,6	87±0,4	97±0,2	99±0,2	99±02	98-101

Lab. :souche de laboratoire d'*Anopheles gambiae* s.s. (TKD₅₀ et TKD₉₅ 05±0,4min et 40±0,32min); ter. : souche sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. (TKD₅₀ et TKD₉₅ 09±0,2min et 47 ± 0,54 min) *Cx. quinquefasciatus*(TKD50: 19 ± 0,57min et TKD95: 51 ± 0,4min) IC : intervalle de confiance(CL₅₀ et CL₉₅ :0,40% ; 0,43% ; 0,24% et 0,73% ; 0,76% 0,52% respectivement pour les souches de laboratoire d'*Anopheles gambiae* s.s., sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. et *Culex quinquefasciatus*)

*** Activité knock down de l'huile essentielle des feuilles de *Piper umbellatum* sur *Anopheles gambiae* s.l. et *Culex quinquefasciatus***

Pendant une heure et à intervalle de dix minutes, le nombre de femelles adultes des souches de laboratoire d'*Anopheles gambiae* s.s., sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. et de *Culex quinquefasciatus* assommés, (tombés sur le dos ou sur le côté) a été compté. En considérant uniquement la plus forte concentration d'huile essentielle (0,8% et 0,6% respectivement pour les souches de laboratoire d'*Anopheles gambiae* s.s., d'*An.gambiae* s.l. et pour *Cx. quinquefasciatus*), nous avons ainsi tracé les courbes de l'activité knock down de l'huile essentielle des feuilles de *Piper umbellatum* sur les souches de laboratoire d'*Anopheles gambiae* s.s., d'*Anopheles gambiae* s.l. et *Culex quinquefasciatus* en fonction du temps.

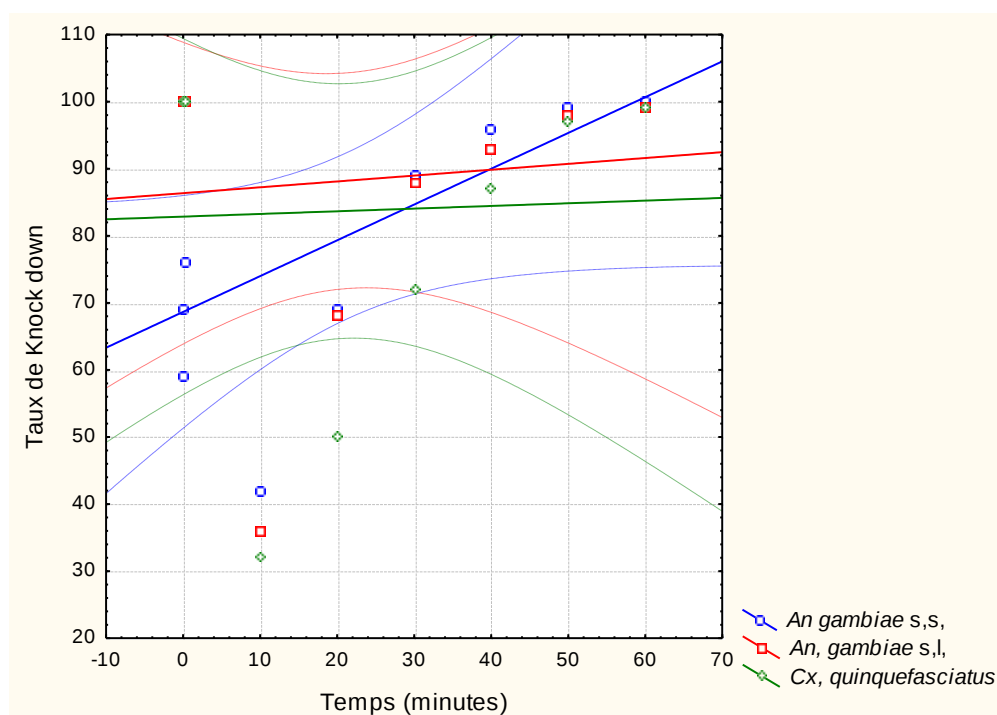


Figure 38. Activité knock down de l'huile essentielle des feuilles de *Piper umbellatum* sur *Anopheles gambiae* s.l. et *Culex quinquefasciatus*

Le nombre de moustiques assommés de chaque espèce augmente au cours du temps. Les équations des droites de régressions de l'activité knock down de l'huile essentielle des feuilles de *P.umbellatum* sur les souches de laboratoire d'*Anopheles gambiae* s.s., sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. et *Culex quinquefasciatus* au terme d'une heure de contact ont été élaborées : $Y_{gl} = 44,46 + 1,0914X$ ($H=8,9$; $p=0,0002$) ; $Y_{gt} = 39,33 + 1,171X$ ($H=8$; $p=0,0004$) et $Y_{Cx} = 21,36 + 1,43X$ ($H=6,59$; $p=0,001$) respectivement pour les souches de laboratoire et sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. et pour *Culex quinquefasciatus*.

Les temps nécessaires pour assommer 50% et 95% de moustiques exposés (TKD₅₀ et TKD₉₅) ont été estimés (avec un intervalle de confiance de 95%). Ainsi pour assommer 50% de moustiques, il faut : $05 \pm 0,4 \text{ min}$; $09 \pm 0,2 \text{ min}$ et $19 \pm 0,57 \text{ min}$ respectivement pour les souches de laboratoire d'*Anopheles gambiae* s.s., sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. et pour *Culex quinquefasciatus* ; alors que pour assommer 95% de moustiques il faut : $40 \pm 0,32 \text{ min}$; $47 \pm 0,54 \text{ min}$ et $51 \pm 0,4 \text{ min}$ respectivement. La comparaison de ces temps de Knock down montre que les adultes de *Culex quinquefasciatus* semblent plus tolérants vis-à-vis de l'huile essentielle des feuilles de *Piper umbellatum* que ceux d'*Anopheles gambiae* s.l. (H=2,5 ; p=0,05).

*** Activité adulticide de l'huile essentielle des feuilles de *Piper umbellatum* sur *Anopheles gambiae* s.l. et *Culex quinquefasciatus***

Vingt-quatre heures après le contact des adultes femelles des souche de laboratoire d'*Anopheles gambiae* s.s., sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. et *Culex quinquefasciatus* avec les tulles moustiquaires imprégnés de doses croissantes d'huile essentielle des feuilles de *Piper umbellatum*, nous avons compté les moustiques adultes morts (y compris des individus incapables de voler ou ayant des pattes et des ailes cassées : ceci étant considéré comme l'effet du produit) et nous avons tracé les courbes de mortalité en fonction des doses d'huile essentielle (figure 38).

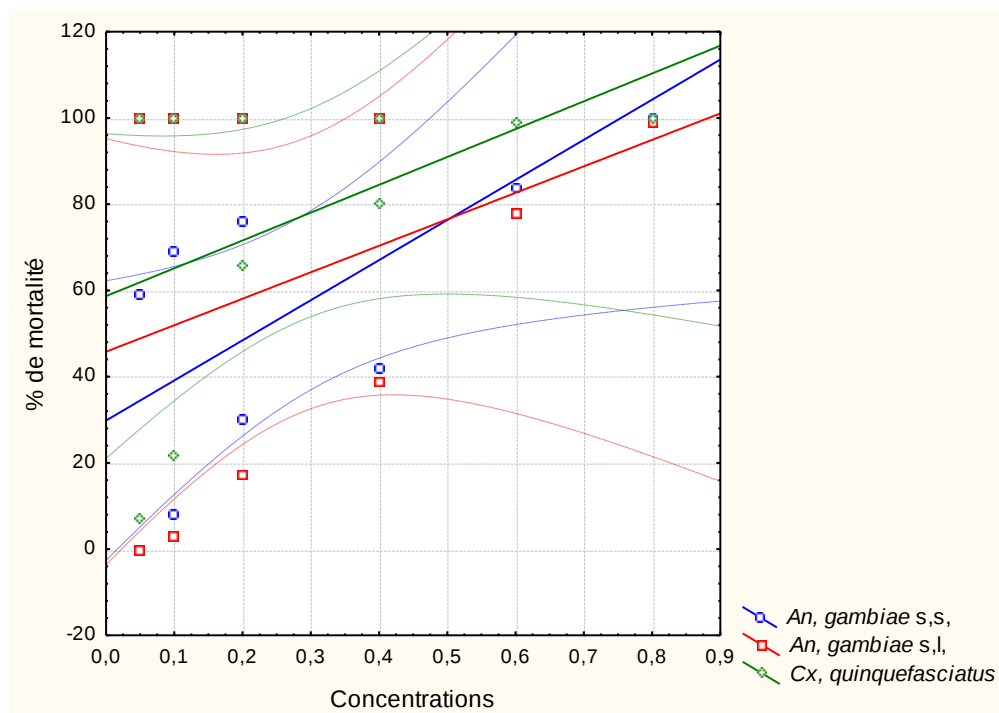


Figure 39. Activité adulticide de l'huile essentielle des feuilles de *Piper umbellatum* sur *Anopheles gambiae* s.l. et *Culex quinquefasciatus*.

Les équations des droites de régression de l'activité adulticide de l'huile essentielle des feuilles de *Piper umbellatum* sur les adultes des souches de laboratoire d'*Anopheles gambiae* s.s., d'*Anopheles gambiae* s.l. et de *Culex quinquefasciatus* sont :

$Y_{gl} = -4,147 + 134,36X$ ($H=3,08$; $p=0,03$); $Y_{gt} = -8,228 + 134,59X$ ($H=2,6$; $p=0,05$) et $Y_{Cx} = 11,742 + 159,47X$ ($H=3,14$; $p=0,03$) respectivement pour les souches de laboratoire d'*Anopheles gambiae* s.s., sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. et pour *Culex quinquefasciatus*. Les concentrations létales d'huile essentielle des feuilles de *Piper umbellatum* entraînant 50% et 95% de mortalité (CL_{50} et CL_{95}) ont été estimées. Ainsi, pour 50% de mortalité il faut des concentrations de : 0,40%; 0,43% et 0,24% respectivement pour les souches de laboratoire d'*Anopheles gambiae* s.s., sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. et pour *Culex quinquefasciatus*; alors que pour 95% de mortalité il faut: 0,73%; 0,76% et 0,52% respectivement pour les souches de laboratoire d'*Anopheles gambiae* s.s., sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. et pour *Culex quinquefasciatus*. Les adultes de la souche de laboratoire d'*Anopheles gambiae* s.s. sont plus sensibles à l'huile essentielle des feuilles de *Piper umbellatum* que ceux de la souche sauvage ($H=2,7$; $p=0,05$). Cependant il n'apparaît pas de différence significative entre les moyennes des taux de mortalité des adultes de *Culex quinquefasciatus* et ceux de la souche sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. ($H=1,54$; $p=0,19$).

III.1.7. Effet adjuvant des huiles essentielles des feuilles de *Cannabis sativa* et de *Piper umbellatum* pour l'efficacité de la perméthrine sur les adultes femelles d'*Anopheles gambiae* s.l. et de *Culex quinquefasciatus*

Pendant une heure et à intervalle de 10 minutes, nous avons compté les moustiques femelles assommés sous l'effet de la combinaison de chacune des huiles essentielles des feuilles de *Cannabis sativa* et de *Piper umbellatum* avec la perméthrine. Les moustiques adultes morts ont été comptés 24 heures après le contact avec des morceaux de tulle moustiquaire traités.

- **Effet adjuvant de L'huile essentielle des feuilles de *Cannabis sativa* pour l'efficacité de la perméthrine sur les adultes d'*Anopheles gambiae* s.l. et de *Culex quinquefasciatus***

Au cours d'une heure de contact des adultes sauvages d'*Anopheles gambiae* s.l et de *Culex quinquefasciatus* avec des tulles moustiquaires imprégnés de concentrations croissantes du mélange de l'huile essentielle des feuilles de *Cannabis sativa* avec la perméthrine, les individus assommés ont été dénombrés et les individus morts 24 heures après le contact (Tableau XVIII). On a utilisé pour ce test, 1200 femelles adultes de Culicidés (600 *Anopheles gambiae* s.l et 600 *Culex* sp.)

Tableau XVIII : Effet adjuvant de l'huile essentielle des feuilles *Cannabis sativa* pour l'efficacité de la perméthrine sur *Anopheles gambiae* s.l et *Culex quinquefasciatus*

Espèces	Nb. exposé	Doses(%)	Knock down à 10 minutes d'intervalle						Mortalité	IC à 95%
<i>An. gambiae</i> s.l.			10 min	20 min	30 min	40 min	50 min	60 min	-	-
	100	0	12±0,4	18±0,3	30±0,6	44±0,2	47±0,5	50±0,7	49±0,6	44-53
	100	0,0125	6±0,2	15±0,4	29±0,4	29±0,6	49±0,2	66±0,2	38±0,6	34-42
	100	0,025	14±0,6	22±0,2	40±0,4	49±0,4	58±0,2	72±0,4	48±1,4	40-58
	100	0,05	28±0,4	36±0,4	49±0,6	57±0,2	69±0,4	80±0,4	66±2,1	58-80
	100	0,1	40±0,4	44±0,5	56±0,4	68±0,4	80±0,4	90±1,2	73±0,4	70-76
	100	0,2	44±0,5	54±1	68±0,7	80±0,8	92±0,9	100	98±0,2	96-100
<i>Cx. quinquefasciatus</i>	100	0	10±0,3	18±0,4	40±0,7	45±0,4	46±0,5	48±0,4	47±0,2	46-49
	100	0,0125	10±0,2	18±0,5	27±0,7	37±0,4	54±0,2	56±0,4	54±0,2	52-56
	100	0,025	14±0,2	27±0,4	41±0,2	49±0,2	61±0,4	69±0,4	57±0,4	54-60
	100	0,05	24±0,4	38±0,6	52±1,2	60±0,7	71±0,6	76±0,7	76±0,4	73-79
	100	0,1	41±0,2	51±0,4	68±1,2	75±0,7	81±0,8	88±1,4	90±0,2	88-92
	100	0,2	47±0,6	63±1,1	76±1	84±0,5	89±0,4	100	100	100-100

Perm. : Perméthrine

Les temps nécessaires pour assommer 50% et 95% de moustiques exposés au mélange sont : 16±0,75min ; 8±0,15min et 53±0,94min ; 53±0,6min respectivement pour la souche sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. et pour *Culex quinquefasciatus*. Les concentrations d'huile essentielle des feuilles de *Cannabis sativa* dans le mélange nécessaires pour 50% et 95% de mortalité des adultes exposés sont : 0,027% ; 0,011% et 0,18% ; 0,15% respectivement pour *Anopheles gambiae* s.l. et pour *Culex quinquefasciatus*. Il faut noter que la concentration de 0% dans le mélange est celle de l'huile essentielle de *Cannabis sativa*, la perméthrine agit seul.

*** Effet adjuvant de l'huile essentielle des feuilles de *Cannabis sativa* pour l'activité Knock Down de la permethrine sur les adultes d'*Anopheles gambiae* s.l. et de *Culex quinquefasciatus***

A intervalle de 10 minutes et pendant une heure, nous avons compté les moustiques adultes tombés sur le dos ou sur le côté. Les données récoltées ont permis la construction des courbes ci-dessous (figure 39).

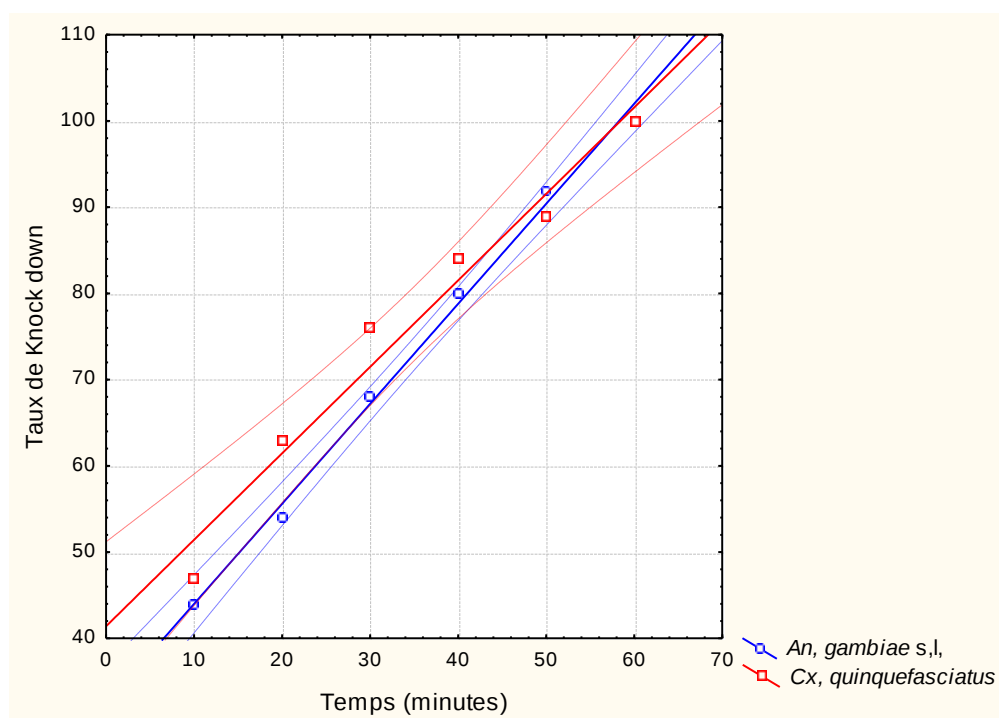


Figure 40: Effet adjuvant de l'huile essentielle des feuilles de *Cannabis sativa* pour l'activité knock down de la permethrine sur *Anopheles gambiae* s.l. et *Culex quinquefasciatus*.

Les équations des droites de régression de cette activité de la combinaison de l'huile essentielle de *Cannabis sativa* avec la permethrine par rapport à l'activité Knock down sur *Anopheles gambiae* s.l. et *Culex quinquefasciatus* sont : $Y_{An}=29,73+1,21X$ ($H=8,22$; $p=0,0004$) et $Y_{Cx}=41,93+0,99X$ ($H=9,82$; $p=0,0002$) respectivement pour la souche sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. et pour *Culex quinquefasciatus*. Ainsi, pour assommer 50% et 95% de moustiques il faut : $16\pm0,75\text{min}$; $8\pm0,15\text{min}$ et $53\pm0,94\text{min}$; $53\pm0,6\text{min}$ respectivement pour la souche sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. et pour *Culex quinquefasciatus*. La comparaison des taux de knock down en fonction du temps entre les deux espèces de

moustiques ne montre pas une différence significative ($H=1,88$; $p=0,12$) entre *Culex quinquefasciatus* et la souche sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l..

*** Effet adjuvant de l'huile essentielle des feuilles de *Cannabis sativa* pour l'activité adulticide de la perméthrine sur les adultes d'*Anopheles gambiae* s.l. et de *Culex quinquefasciatus***

Vingt-quatre heures après le contact des moustiques adultes avec des tulles moustiquaires imprégnés des concentrations croissantes du mélange d'huile essentielle des feuilles de *Cannabis sativa* avec la perméthrine, les individus morts ont été comptés et les courbes de mortalité en fonction des concentrations d'huile essentielle dans le mélange ont été tracées (figure 40).

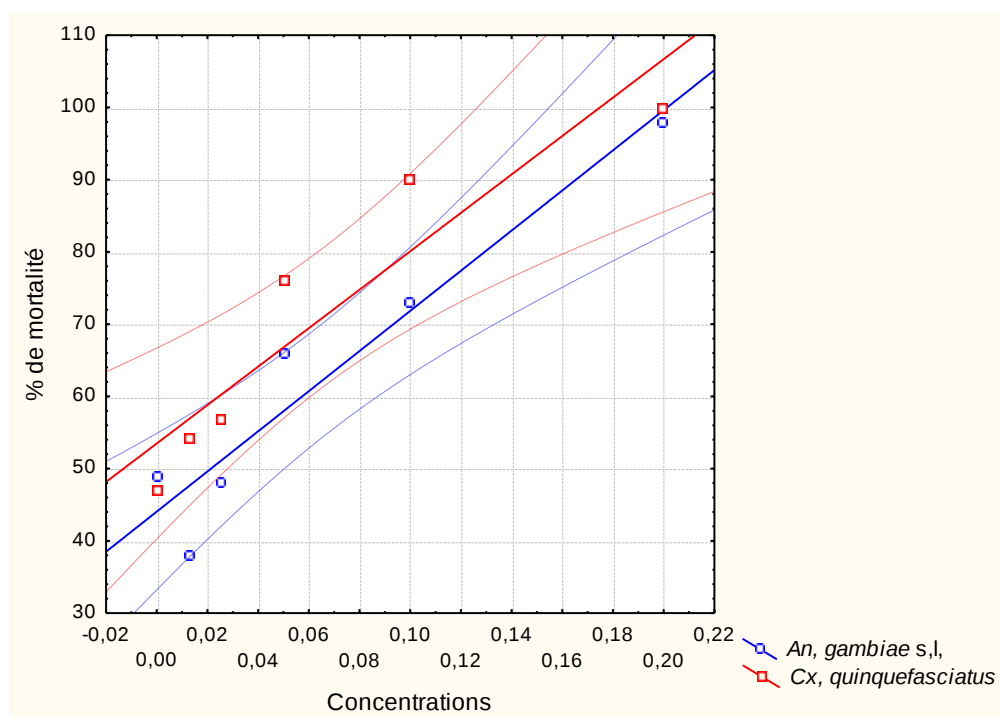


Figure 41. Effet adjuvant de l'huile essentielle des feuilles de *Cannabis sativa* pour l'efficacité de la perméthrine sur les adultes d'*Anopheles gambiae* s.l. et de *Culex quinquefasciatus*

Les différentes équations des droites de régression de cette activité de la combinaison de l'huile essentielle des feuilles de *Cannabis sativa* avec la perméthrine par rapport à la mortalité des moustiques adultes sont : $Y_{An}=41,79+294,3X$ ($H=6,2$; $p=0,003$) et $Y_{Cx}=56,45+244,4X$ ($H=8,4$; $p=0,001$) respectivement pour la souche sauvage d'*Anopheles*

gambiae s.l. et pour *Culex quinquefasciatus*. Le taux de mortalité croît avec les concentrations d'huile essentielle dans le mélange. Les concentrations d'huile essentielle des feuilles de *Cannabis sativa* mélangées à la perméthrine nécessaires pour 50% et 95% de mortalité des adultes exposés sont : 0,027% ; 0,011% et 0,18% ; 0,15% respectivement pour la souche sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. et pour *Culex quinquefasciatus*. La comparaison des moyennes des taux de mortalité en fonction des doses d'huile essentielle des feuilles de *Cannabis sativa* dans le mélange avec la perméthrine montre que les adultes de *Culex quinquefasciatus* sont plus sensibles que ceux de la souche sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. ($H=3,9$, $p=0,016$).

- Effet adjuvant de l'huile essentielle des feuilles de *Piper umbellatum* pour l'efficacité de la perméthrine sur les adultes d'*Anopheles gambiae* s.l. et de *Culex quinquefasciatus*

Pour évaluer l'effet adjuvant de l'huile essentielle des feuilles de *Piper umbellatum* pour l'efficacité de la perméthrine sur les adultes d'*Anopheles gambiae* s.l. et de *Culex quinquefasciatus*, nous avons considéré deux paramètres : le knock down au terme d'une heure et la mortalité 24 heures après l'exposition aux doses croissantes d'huiles essentielles des feuilles de *Piper umbellatum* mélangées à la perméthrine (Tableau XIX). On a utilisé pour ce test 1200 adultes femelles de culicidés (600 *Anopheles gambiae* s.l. et 600 *Culex* sp.)

Tableau XIX: Effet adjuvant de l'huile essentielle des feuilles de *Piper umbellatum* pour l'activité adulticide de la permethrine sur *Anopheles gambiae* s.l. et *Culex quinquefasciatus*

Espèces	Nb. exposé	Doses(%)	Knock down à intervalle de 10 min						Mortalité (24 h)	IC à 95%
			10 min	20 min	30 min	40 min	50 min	60 min		
<i>An. gambiae</i> s.l.			10 min	20 min	30 min	40 min	50 min	60 min	-	-
	100	0	12±0,4	18±0,3	30±0,6	44±0,2	47±0,5	50±0,7	49±0,6	44-53
	100	0,0125	7±0,4	15±0,2	22±0,2	37±0,4	43±0,8	48±0,4	46±1	42-50
	100	0,025	15±0,4	22±0,2	28±0,7	53±0,4	61±0,2	66±0,6	52±0,4	49-55
	100	0,05	17±0,8	25±0,4	36±0,4	62±0,2	66±0,6	77±0,4	64±0,4	61-37
	100	0,1	21±0,4	30±0,7	43±0,4	71±0,2	71±0,4	89±0,4	79±0,4	76-82
	100	0,2	22±0,6	36±0,4	58±0,6	80±0,4	92±0,4	100	99±0,2	99-101
<i>Cx. quinquefasciatus</i>	100	0	10±0,3	18±0,4	40±0,7	45±0,4	46±0,5	48±0,4	47±0,2	46-49
	100	0,0125	12±0,4	16±0,4	36±1	43±0,7	47±0,2	52±0,4	56±0,4	53-59
	100	0,025	18±0,5	27±0,7	45±0,4	51±0,4	54±0,2	60±0,4	69±0,4	66-72
	100	0,5	23±0,2	32±0,4	60±0,4	64±0,7	69±0,6	75±0,4	82±0,6	78-86
	100	0,1	32±0,4	44±0,7	64±1	75±0,4	81±0,8	88±0,7	88±0,4	85-91
	100	0,2	39±0,2	60±0,5	71±1,3	83±0,4	95±0,4	100	98±0,2	96-100

. Les temps nécessaires pour assommer 50% et 95% de moustiques exposés au mélange sont 27±0,4min ; 14±0,8min et 53±0,6min ; 52±0,11min respectivement pour la souche sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. et pour *Culex quinquefasciatus*. Les concentrations d'huile essentielle des feuilles de *Piper umbellatum* dans le mélange nécessaires pour 50% et 95% de mortalité des adultes exposés sont : 0,024% ; 0,011% et 0,18% ; 0,17%, respectivement pour la souche sauvage *Anopheles agmbiae* s.l. et pour *Culex quinquefasciatus*. La mortalité chez *Culex quinquefasciatus* croît d'emblée avec les concentrations d'huile essentielle dans le mélange.

*** Effet adjuvant de l'huile essentielle des feuilles de *Piper umbellatum* pour l'activité knock down de la permethrine sur *Anopheles gambiae* s.l. et *Culex quinquefasciatus***

Pendant une heure de contact des adultes femelles de la souche sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. et de *Culex quinquefasciatus* avec des concentrations croissantes de l'huile essentielle des feuilles de *Piper umbellatum* dans le mélange avec la permethrine, nous avons compté à intervalle de 10 minutes les adultes de moustiques assommés et tracé les courbes de l'effet knock down ci-dessous (figure 41).

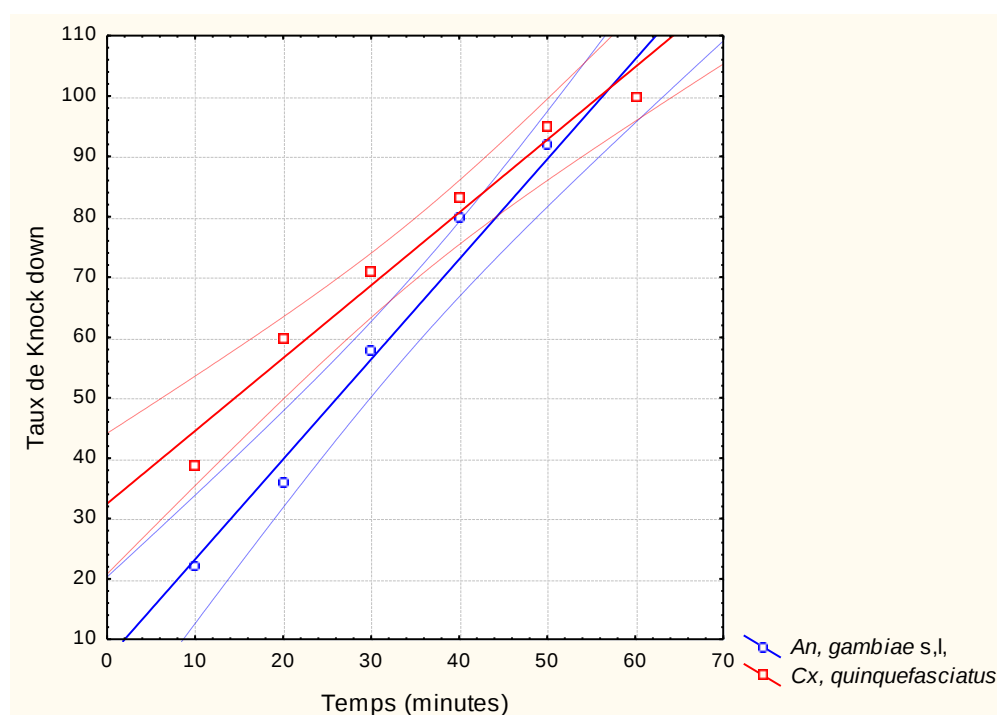


Figure 42. Effet adjuvant de l'huile essentielle des feuilles de *Piper umbellatum* pour l'activité knock down de la permethrine sur les adultes d'*Anopheles gambiae* s.l. et de *Culex quinquefasciatus*

Les équations des droites de régression de cette activité sont : $Y_{An}=2,66+1,74X$ ($H=5,051$; $p=0,003$) et $Y_{Cx}=32,46+1,20X$ ($H=7,98$; $p=0,0005$) respectivement pour la souche sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. et pour *Culex quinquefasciatus*. Les temps nécessaires pour assommer 50% sont de : $27\pm0,4\text{min}$; $14\pm0,8\text{min}$ et pour 95% : $53\pm0,6\text{min}$; $52\pm0,11\text{min}$ respectivement pour la souche sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. et pour *Culex quinquefasciatus*.

La comparaison des taux de moustiques assommés montre une différence significative ($H=15$; $p=0,042$) entre la souche sauvage *Anopheles gambiae* s.l. et *Culex quinquefasciatus*.

Ainsi, les adultes de la souche sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. succombent moins vite à l'effet toxique du mélange de l'huile essentielle des feuilles de *Piper umbellatum* avec la perméthrine que ceux de *Culex quinquefasciatus*.

*** Effet adjuvant de l'huile essentielle des feuilles de *Piper umbellatum* pour l'activité adulticide de la perméthrine sur *Anopheles gambiae* s.l. et *Culex quinquefasciatus***

Vingt-quatre heures après le contact des moustiques adultes avec des tulles traités avec des concentrations croissantes du mélange de l'huile essentielle des feuilles de *Piper umbellatum* avec la perméthrine, nous avons compté les individus morts et les courbes de mortalité en fonction de la concentration d'huile essentielle dans le mélange ont été tracées (figure 42).

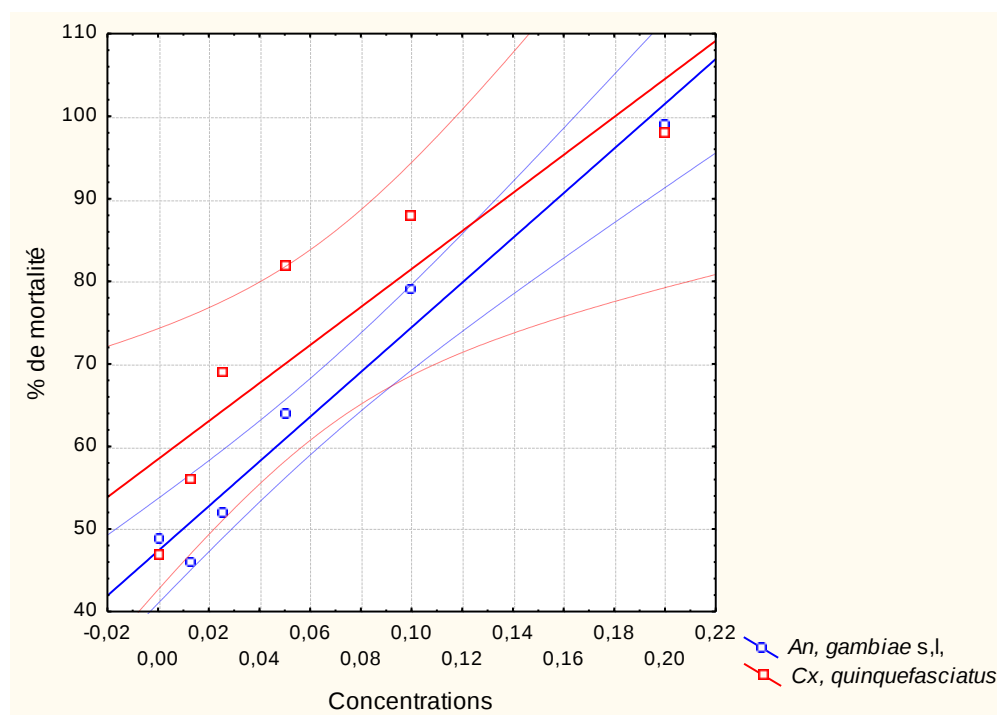


Figure 43. Effet adjuvant de l'huile essentielle des feuilles de *Piper umbellatum* pour l'activité adulticide de la perméthrine sur *Anopheles gambiae* s.l. et *Culex quinquefasciatus*

Les équations des droites de régression de l'efficacité du mélange perméthrine-huile essentielle des feuilles de *Piper umbellatum* par rapport à la mortalité des moustiques traités sont : $Y_{An}=55,40+211,64X$ ($H=8,14$; $p=0,0012$) et $Y_{Cx}=69,76+141,76X$ ($H=11,22$; $p=0,00035$). Les concentrations d'huile essentielle des feuilles de *P.umbellatum* mélangées à la perméthrine nécessaires pour entraîner 50% et 95% de mortalité sont : 0,024% ; 0,011% et 0,18% ; 0,17%, respectivement pour la souche sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. et pour

Culex quinquefasciatus. La comparaison des moyennes des taux de mortalité (avec un intervalle de confiance à 95%) montre que les adultes de la souche sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. sont moins sensibles à la toxicité du mélange de l'huile essentielle des feuilles de *Piper umbellatum* avec la perméthrine que ceux de *Culex quinquefasciatus* (H=4 ; p=0,03).

III.2. DISCUSSION

Les rendements d'extraction des huiles essentielles des feuilles de *Cannabis sativa* et de *Piper umbellatum* ont été très faibles (de l'ordre de 0,044% et 0,012% respectivement pour *Cannabis sativa* et pour *Piper umbellatum*) comparés à ceux des autres plantes telles que *Clausena anisata* (0,24%) (Foko *et al.*, 2018), *Cymbopogon citratus* (1,7%) et *Cymbopogon giganteus* (1,4%) (Bossu *et al.*, 2013), *Piper capense* (0,30%), *Piper guineense* (0,47%) *Piper nigrum* (0,24%) (Tchoumboungang *et al.*, 2009), *Ocimum canum* S (0,44%) et *Ocimum basilicum* L (0,11%) (Akono Ntonga *et al.*, 2012) traitées dans les mêmes conditions. Cependant le rendement de *Piper umbellatum* (0,012%) dans cette étude est presque le même (0,01%) que celui trouvé par Tchoumboungang *et al.* (2009). Ces faibles rendements pourraient s'expliquer par la spécificité de chaque plante, la période de récolte, les facteurs édaphiques, climatiques et la méthode d'extraction.

L'analyse chimique des huiles essentielles des feuilles des deux plantes a révélé 81 composés pour *Cannabis sativa* et 24 composés pour *Piper umbellatum*. Ces composés constituent 98,27% et 89,6% de la masse d'huile essentielle analysée (respectivement pour *Cannabis sativa* et pour *Piper umbellatum*) et sont pour la plupart des terpènes. La caractérisation de l'huile essentielle des feuilles de *Piper umbellatum* par Tchoumboungang *et al.* (2009) a révélé 38 composés. Cette différence s'expliquerait par les appareillages utilisés lors de l'analyse chimique des huiles essentielles. Car Tchoumboungang *et al.* (2009) ont utilisé un dispositif ayant un détecteur à ionisation de flamme (FID), tandis que dans notre étude on a procédé simplement avec un appareillage à chromatographie en phase gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (GC-MS). Par ailleurs, au cours de cette analyse chimique des huiles essentielles, plusieurs composés sont restés indéterminés. Des appareillages et des logiciels plus sophistiqués pourront permettre leur détermination ultérieure. En comparant les tableaux de résultats d'analyse chimique des huiles essentielles des feuilles des deux plantes, il y a plus de composés chez *Cannabis sativa* que chez *Piper umbellatum*. Cette différence dépendrait surtout de la spécificité botanique de chacune des deux plantes (Djibo, 2000).

L'identification morphologique et la caractérisation moléculaire (PCR) des moustiques adultes des individus de la souche sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. récoltés aux abords de la rivière Ewoé a révélé une composition de 95,77% d'*Anopheles coluzzi* et de 4,23% d'*Anopheles gambiae* s.s.. Pour ces moustiques du complexe *gambiae*, ce résultat est conforme à celui d'Ayala *et al.* (2009) et d'Antonio *et al.* (2019) qui ont montré que les individus d'*Anopheles coluzzii* du complexe *gambiae* sont plus abondants dans les centres

urbains par rapport à ceux d'*Anopheles gambiae* s.s. qui préfèrent des zones périurbaines moins pollués. De même, l'identification morphologique des moustiques adultes de l'étang de Melen a révélé : 2% d'*Anopheles gambiae* s.l. ; 7% de *Culex perfuscus* et 91% de *Culex quinquefasciatus*. Ces résultats sont en accord avec les travaux de certains auteurs (Bhattacharya et Basu., 2016 ; Nchoutpouen *et al.*, 2019) qui ont souligné que *Culex quinquefasciatus* est un moustique cosmopolite et le plus abondant des espèces du complexe *Culex pipiens* en milieux urbains. Ainsi, selon la CDC(2013), les résultats des tests biologiques de toxicité effectués sur les moustiques des abords de la rivière Ewoé et ceux de l'étang de Melen sont attribués à *Anopheles coluzzii* (*Anopheles gambiae* s.l.) et à *Culex quinquefasciatus* respectivement du fait qu'ils sont majoritaires dans les échantillons.

Pour l'activité larvicide sur les souches de laboratoire d'*Anopheles gambiae* s.s. et sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l., après 24 heures d'exposition, les concentrations d'huile essentielle de feuilles de *C. sativa* nécessaires pour 50% (CL₅₀) de mortalité sont : 0,501% et 1,168% respectivement pour les souches de laboratoire d'*Anopheles gambiae* s.s. et sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. Pour la souche de laboratoire d'*Anopheles gambiae* s.s. la concentration d'huile essentielle de *C. sativa* nécessaire pour 50% de mortalité est moins élevée (0,501%) que celle de *Clausena anisatta* utilisée (0,68%) dans les travaux de Foko *et al.* (2018) après 24 heures d'expositions des larves d'*Anopheles coluzzii*. Les résultats des tests biologiques de toxicité sur la souche sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. montrent que les concentrations d'huile essentielle des feuilles de *C. sativa* nécessaires pour 50%(CL₅₀) et 95% (CL₉₅) de mortalité larvaire après 24 heures d'exposition sont de : 1,168% et 2,21%. Ces concentrations sont largement supérieures à celles utilisées dans les travaux de Tchoumboungang *et al.* (2009) sur les larves de la souche sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. récoltée à Douala ; elles sont de 0,0018% ; 0,02 ; 0,018% et 0,011% pour 50% de mortalité et de 0,01% ; 0,02% ; 0,025% et 0,04% pour 100% de mortalité larvaire, respectivement pour les huiles essentielles de *Cymbopogon citratus*, *Ocinum canum*, *Ocinum gratissimum* et *Thymus vulgaris*.

Contrairement aux larves des souches de laboratoire d'*Anopheles gambiae* s.s. et sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l., les larves de *Culex quinquefasciatus* sont plus sensibles à l'huile essentielle des feuilles de *C. sativa*. Ainsi, les concentrations létales nécessaires pour 50% et 95% de mortalité après 24 heures d'exposition sont : 0,03% et 0,17%. Ces résultats sont en accord avec les travaux d'autres auteurs qui ont trouvé des concentrations létales pour 50% de mortalité larvaire de 0,0023% ; 0,0027% ; 0,0038% et 0,0051% respectivement pour les

huiles essentielles de *Cymbopogon schoenanthus*, *Lippia multiflora*, *Lantana camara*, *Lippia chevalieri* (Wangrawa *et al.*, 2022) et de : 0,0064%, 0,0067% et 0,0063% pour 50% de mortalité et 0,03%, 0,029% et 0,021% pour 90% de mortalité respectivement pour les huiles essentielles de *Eucalyptus globulus*, *Cinnamomum veerum* et *Citrus sinensis* (Manimaran *et al.*, 2012). Après 48 heures d'exposition des larves d'*Anopheles gambiae* s.s aux doses croissantes d'huile essentielle des feuilles de *C. sativa*, les concentrations nécessaires pour 50% et 95% de mortalité larvaire sont de 0,201% et 0,381%. Ces concentrations sont inférieures à celles de l'huile essentielle des feuilles de *Clausena anisata* de l'ordre de 0,83% pour une mortalité de 100% des larves d'*Anopheles coluzzii* (Foko *et al.*, 2018).

L'étude de l'effet adjuvant de l'huile essentielle des feuilles de *Cannabis sativa* pour l'efficacité du téméphos sur les larves de la souche sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. après 24 heures, a montré un taux de mortalité ($46 \pm 0,2\%$) presque constant entre les concentrations d'huile essentielle de 0,00156% à 0,0062% et semblable au taux de mortalité larvaire pour le téméphos agissant seul. Mais à partir d'une concentration de 0,0125% d'huile essentielle des feuilles de *Cannabis sativa* dans le mélange, il y a une baisse de la mortalité larvaire de $46 \pm 0,2\%$ à $37 \pm 0,2\%$. D'autres auteurs (Cloyd et Raudenbush, 2014) ont également observé un effet stationnaire et même une baisse de mortalité en exposant un ravageur de plantes horticoles cultivées dans des enceintes fermées, *Franklinella occidentalis* à des concentrations de mixture de tolfepryrate ou de spirotetramate avec le diméthyl-didécyldichlorate d'ammonium. D'autres encore ont observé des baisses considérables de mortalité allant jusqu'à l'annulation de l'effet toxique lors des tests larvicides sur *Aedes aegypti* (Sarma *et al.*, 2019) faisant passer ces taux de mortalité de 67,9% à 50% et de 71,5% à 0% respectivement pour les combinaisons Eucalyptol-téméphos et Eugenol-téméphos. Contrairement aux larves d'*Anopheles gambiae* s.l. cette baisse de mortalité larvaire chez *Culex quinquefasciatus* de $50 \pm 0,6\%$ à $44 \pm 0,4\%$ est observée uniquement à la concentration de 0,00156% d'huile essentielle des feuilles de *Cannabis sativa* dans le mélange avec le téméphos. La mortalité larvaire croît en suite pour chacune des espèces de moustiques avec la concentration d'huile essentielle des feuilles de *Cannabis sativa* dans le mélange avec le téméphos.

Pour l'activité de l'huile essentielle des feuilles de *C. sativa* sur les adultes des souches de laboratoires d'*Anopheles gambiae* s.s., sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. et de *Culex quinquefasciatus*, s'agissant de l'activité Knock Down, en considérant uniquement la concentration la plus élevée (0,5%), pour assommer 50% d'adultes d'*Anopheles gambiae* s.l. il faut : $23 \pm 0,7$ min et $28 \pm 1,55$ min, respectivement pour les souches de laboratoire et sauvage

d'*Anopheles gambiae* s.l.. Pour assommer 95% d'individus adultes, il faut : $45 \pm 0,91$ min et $55 \pm 0,95$ min pour l'huile essentielle des feuilles de *C. sativa*, respectivement pour les souches de laboratoire d'*Anopheles gambiae* s.s. et sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l.. Ainsi, il apparaît aussi que les adultes d'*Anopheles gambiae* s.l. de la souche de laboratoire sont assommés plus rapidement que ceux de la souche sauvage. Ces résultats ne sont pas en accord avec les travaux d'autres auteurs qui ont souligné un faible niveau de tolérance à la β -cyfluthrine, à la deltaméthrine et au méthyl-chlorpyrifos des souches sauvages de *Tribolium castaneum*, *Oryzaephilus Surinamensis* et *Rhyzopertha dominica* (Sehgal et al., 2014). Tout comme leurs larves, les adultes de *Culex quinquefasciatus* succombent plus vite que les adultes sauvages d'*Anopheles gambiae* s.l. sous l'effet de l'huile essentielle des feuilles de *C. sativa*. Ce résultat est en accord avec les travaux d'autres auteurs qui ont montré une susceptibilité élevée des adultes de *Culex quinquefasciatus* aux huiles essentielles de *Melaleuca leucadendra*, *Callistemon citrinus* et d'*Aegle marmelos* (Athira and Pushpalatha. 2021). Ainsi, les temps nécessaires pour assommer 50% et 95% d'adulte sont de $6 \pm 0,24$ min et $47 \pm 0,90$ min. De même, le taux de 100% de Knock Down avait été observé lors des travaux de Foko et al. (2018) avec la concentration d'huile essentielle des feuilles de *Clausena anisata* la plus élevée (2%) au terme d'une heure d'exposition des adultes d'*Anopheles coluzzii*.

Pour la mortalité des adultes des souches de laboratoire d'*Anopheles gambiae* s.s., sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. et *Culex quinquefasciatus*, les concentrations létales d'huile essentielle des feuilles de *Cannabis sativa* nécessaires pour 50% et 95% de mortalité des adultes sont de : 0,107% ; 0,15% ; 0,17% et de 0,339% ; 0,369% et 0,42% respectivement. Pour 95% de mortalité, ces concentrations sont faibles comparées à celle de l'huile essentielle des feuilles de *Clausena anisata* (2%) utilisée sur les adultes d'une souche de laboratoire d'*Anopheles coluzzii* (Foko et al., 2018) et très faibles comparées aux concentrations critiques contre une souche sauvage d'*Anopheles gambiae* au Bénin (0,77% : 2,8% ; 4,26% et 5,48%) respectivement pour les huiles essentielles de *Cymbopogon citratus*, *Eucalyptus tereticornis*, *Chenopodium ambrosioides* et *Cymbopogon schoenanthus* (Bossou et al., 2013). Cette plus grande efficacité de l'huile essentielle des feuilles de *Cannabis sativa* sur les adultes des souches de laboratoire d'*Anopheles gambiae* s.s., sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. et de *Culex quinquefasciatus* s'expliquerait par son plus grand nombre de composés chimiques par rapports aux autres plantes étudiées par d'autres auteurs. Il apparaît que la souche de laboratoire d'*Anopheles gambiae* s.s. est moins tolérante à l'effet toxique de l'huile essentielle des feuilles de *Cannabis sativa* que la souche sauvage d'*Anopheles*

gambiae s.l.. Ces résultats sont en accord avec les tests de tolérance à la perméthrine réalisés sur deux souches d'*Aedes aegypti* (souches de laboratoire et sauvage) en Malaisie (Rasli *et al.*, 2018) qui ont souligné deux mécanismes de résistance chez la souche sauvage par rapport à celle de laboratoire : une expression élevée des oxydases et une modification des sites d'action de la perméthrine.

Pour l'activité du mélange de l'huile essentielle des feuilles de *Cannabis sativa* avec la perméthrine sur les adultes sauvages d'*Anopheles gambiae* s.l. et de *Culex quinquefasciatus*, en considérant uniquement la concentration d'huile essentielle la plus élevée (0,2%) dans la combinaison, le temps nécessaire pour assommer 50% de moustiques adultes exposés est de : $16 \pm 0,75$ min et $08 \pm 0,15$ min et pour assommer 95% d'individus il faut : $53 \pm 0,9$ min et $53 \pm 0,6$ min respectivement pour la souche sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. et pour *Culex quinquefasciatus*. Ces résultats sont en accord avec les travaux d'autres auteurs sur les tests des combinaisons des composés d'huile essentielle de *Cinnamomum* sp. (.5% *C. verum* + 2.5% *C. cassia* +1% cinnamaldehyde) sur les adultes femelles d'*Aedes atgypti* et d'*Aedes albopictus* (Aungtikun *et al.*, 2021). Les concentrations d'huile essentielle de *Cannabis sativa* dans la combinaison avec la perméthrine nécessaires pour 50% et 95% de mortalité sont : 0,027%, 0,011% et 0,18%, 0,15% respectivement pour la souche sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. et pour *Culex quinquefasciatus*. Ainsi, la comparaison des moyennes des taux de mortalité de ces deux espèces de moustiques montre que les adultes de *Culex quinquefasciatus* sont plus sensibles à l'effet du mélange que ceux de la souche sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l.. Il y a par ailleurs une baisse du taux de mortalité des adultes de la souche sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. par rapport au témoin dans les plus petites concentrations d'huile essentielle dans les mélanges perméthrine-huile essentielle des feuilles de *Cannabis sativa*. Ces taux passent ainsi de $49 \pm 0,6\%$ pour la perméthrine comme témoin à $38 \pm 0,6\%$ pour le mélange de la perméthrine avec 0,0125% d'huile essentielle des feuilles de *Cannabis sativa*. Ce phénomène qualifié d'antagonisme a été aussi observé par d'autres auteurs lors des tests adulticides de combinaison de Limonène-malathion sur *Aedes aegypti* (Sarma *et al.*, 2019) faisant passer les taux de mortalité de 68,31% à 3,3% . Cette baisse du taux de mortalité au contraire n'est pas observée chez *Culex quinquefasciatus* ; leur taux de mortalité croit d'emblée avec les concentrations d'huile essentielle dans le mélange. Ce dernier résultat est en accord avec les observations de l'activité adulticide des combinaisons à proportion égale (1/1) d'Eudesmol et le malathion sur *Aedes aegypti* (Sarma *et al.*, 2019).

Les concentrations d'huile essentielle des feuilles de *Pipier umbellatum* nécessaires pour 50% de mortalité larvaire après 24 heures d'exposition sont : 0,51%, 0,61% ; 0,09% et pour 95% de mortalité : 0,91%, 1,09% et 0,23% respectivement pour les souches de laboratoire d'*Anopheles gambiae* s.s., sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. et pour *Culex quinquefasciatus*. Par rapport à la souche sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l., ces concentrations sont supérieures à celles des huiles essentielles d'autres plantes utilisées (Nkouandou *et al.*, 2020) sur des larves sauvages d'*Anopheles gambiae* collectées à Ayos qui, pour 50% de mortalité sont de : 0,0092%, 0,022% et 0,035% et pour 95% de mortalité sont de : 0,012%, 0,065% et 0,052% respectivement pour les huiles essentielles de *Curcuma longa*, *Aframomum polyanthum* et *Aframomum daniellii*. Ces concentrations sont inférieures celles de l'huile essentielle de deux espèces de *Laggera* (Dantanko and Malann, 2021) qui, pour 50% de mortalité des larves sauvages d'*Anopheles gambiae* sont de 0,41% et 0,68% respectivement pour *Laggera pterodonta* et *Laggera aurita*. De même pour *Culex quinquefasciatus*, la concentration d'huile essentielle des feuilles de *Piper umbellatum* nécessaire pour 95% de mortalité est supérieure à celle trouvée dans les travaux de Lee (2006) qui ont nécessité 0,01% pour 100% de mortalité larvaire après 24 heures d'exposition des larves de *Culex pipiens* aux huiles essentielles de *Citrus bergamia* et de *Cuminum myrrha*. Les travaux de Pavela *et al.*, (2014) ont également révélé des concentrations inférieures à celles de l'huile essentielle des feuilles de *Piper umbellatum* de l'ordre de 0,017% et 0,11% pour 50% de mortalité et pour 95% de mortalité des larves de *Culex quinquefasciatus*, elles sont de 0,02% et 0,29% respectivement pour les huiles essentielles de *Mentha suaveolens* et *Mentha aquatica*. Après 48 heures d'exposition, les concentrations nécessaires pour 50% de mortalité sont : 0,43%, 0,58% et 0,05% respectivement pour les souches de laboratoire d'*Anopheles gambiae* s.s, sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. et pour *Culex quinquefasciatus*. Pour la souche sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l, la concentration d'huile essentielle des feuille de *Piper umbellatum* pour 50% de mortalité (0,58%) est inférieure à celle de l'huile essentielle de *Laggera aurita* (0,64%) dans les travaux de Dantanko *et al.* (2021) après 48 heures d'exposition.

Le mélange du témephos avec l'huile essentielle des feuilles de *P.umbellatum* présente d'abord une augmentation des taux de mortalité larvaires de la souche sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. passant de $46 \pm 0,2\%$ pour le témoin à $52 \pm 1,2\%$ pour les concentrations d'huile essentielle de 0,00156 à 0,0125 dans le mélange avec le témephos. Mais à partir d'une concentration d'huile essentielle des feuilles de *P.umbellatum* de 0,025%, il y a une baisse de la mortalité larvaire de la souche sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. de $52 \pm 1,2\%$ à $38 \pm 1\%$. Par

la suite, l'efficacité de la combinaison contre les larves de la souche sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. croît avec les concentrations d'huile essentielle des feuilles de *Piper umbellatum* dans le mélange avec le témephos. Pour les larves de *Culex quinquefasciatus*, le taux de mortalité croît immédiatement avec la concentration d'huile essentielle dans le mélange. Il apparaît ainsi, un effet de neutralisation partielle de la toxicité du témephos par l'huile essentielle des feuilles de *Piper umbellatum*. Ce résultat est en accord avec les travaux de Hamza *et al.*(2018) sur un ravageur de blé *Rhizopertha dominica* qui ont mis en évidence la réduction de l'efficacité de l'alpha-cypermethrine en le mélangeant avec le malathion.

Par rapport à l'activité knock down, en considérant uniquement la concentration d'huile essentielle des feuilles de *Piper umbellatum* la plus élevée (0,6%), pour assommer 50% de moustiques adultes exposés, il faut : $05 \pm 0,7$ min, $09 \pm 0,2$ min et $19 \pm 0,54$ min respectivement pour les souches de laboratoire d'*Anopheles gambiae* s.s., sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. et pour *Culex quinquefasciatus*. Pour assommer 95% de moustiques adultes exposés, il faut ; $40 \pm 0,32$ min, $47 \pm 0,54$ et $51 \pm 0,4$ min respectivement pour les souches de laboratoire d'*Anopheles gambiae* s.s., sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. et pour *Culex quinquefasciatus*. Pour les adultes de *Culex quinquefasciatus*, les travaux d'autres auteurs (Ramar *et al.*, 2014) ont mis en évidence des temps de knock down moins élevés pour 50% d'adultes assommés de l'ordre de $09 \pm 0,1$ min, $11,4 \pm 0,1$ min et $11,4 \pm 0,4$ min respectivement pour les huiles essentielles de *Myrtus caryophyllus*, *Cymbopogon nardus* et d'*Eucalyptus globulus*.

Les concentrations d'huile essentielle des feuilles de *Piper umbellatum* nécessaires pour 50% de mortalité des adultes de moustiques exposés sont : 0,40%, 0,43% et 0,24% et pour 95% il faut 0,73%, 0,76% et 0,52% respectivement pour les souches de laboratoire d'*Anopheles gambiae* s.s., sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. et pour *Culex quinquefasciatus*. Les travaux d'autres auteurs sur l'huile essentielle de *Lantana canara* ont montré des concentrations moins élevées avec 0,05% et 0,06% pour 50% de mortalité et pour 95% de mortalité 0,1% et 0,11% respectivement pour *Culex quinquefasciatus* et *Anophles stephensi* (Dua *et al.*, 2010).

En considérant uniquement la concentration d'huile essentielle des feuilles de *Piper umbellatum* la plus élevée (0,2%) dans le mélange avec la permethrine, le temps nécessaire pour assommer 50% de moustiques adultes exposés est de $27 \pm 0,4$ min et $14 \pm 0,8$ min et pour assommer 95% d'individus est de $53 \pm 0,6$ min et $52 \pm 0,11$ min respectivement pour la souche sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. et pour *Culex quinquefasciatus*. D'autres auteurs (Aungtikun et Soonwera, 2021) ont observé des délais plus courts de l'ordre de 0,7 min et 2,1

min pour assommer respectivement 50% d'individu d'*Aedes aegypti* et d'*Aedes albopictus* en combinant des concentrations très élevées des huiles essentielle d'écorce de *Cinnamomum* spp. avec le cinnamaldéhyde (2,5% de *Cinnamomum verum*+2,5% de *Cinnamomum cassia*+1% de cinnamaldéhyde). Les concentrations d'huile essentielle des feuille de *Piper umbellatum* nécessaires pour 50% de mortalité sont 0,024%, 0,011% et pour 95% de mortalité des adultes de moustiques exposés il faut : 0,18% et 0,17% respectivement pour la souche sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. et pour *Culex quinquefasciatus*. Ce résultat est en accord avec les observations antérieures sur l'efficacité des combinaisons des huiles essentielles *Cyperus rotundus*-permethrine et *Alpinia galanga*-permethrine qui ont mis en évidence des concentrations de 0,42% et 0,003% pour 50% de mortalité des adultes d'*Aedes aegypti* (Chansang *et al.*, 2018).

La comparaison des niveaux de sensibilité des moustiques exposés aux huiles essentielles montre que les individus de la souche sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. sont moins sensibles que ceux de la souche de laboratoire d'*Anopheles gambiae* s.s. et ceux de *Culex quinquefasciatus*. En effet, la plus grande sensibilité des individus de la souche de laboratoire d'*Anopheles gambiae* s.s. peut s'expliquer par le fait que ces derniers n'ont plus été exposés à divers xénobiotiques des gîtes naturels pendant plusieurs générations et se sont ainsi accommodés aux conditions de laboratoire, contrairement aux individus sauvages d'*Anopheles gambiae* s.l. qui sont exposés en permanence à divers polluants (Rasli *et al.*, 2018). La survie de ces individus sauvages suppose une expression prononcée d'un certain nombre de mécanismes d'adaptation impliquant la détoxification (Li *et al.*, 2007). Il est à noter d'ailleurs que les collections d'eaux des milieux urbains et péri-urbains sont assez riches en métaux lourds et en divers autres polluants (Shimod *et al.*, 2022 ; Xia *et al.*, 2020). Les larves de *Culex quinquefasciatus* semblent inféodées à leur gîte naturel (Kudom *et al.*, 2018). Car en effet, ces larves sont plus susceptibles aux huiles essentielles de *C. sativa* et de *P. umbellatum* que celles de la souche de laboratoire d'*Anopheles gambiae* s.s.. Ainsi, après une exposition de 24 heures aux concentrations croissantes d'huiles essentielles des feuilles de chacune des deux plantes, les concentrations létales pour 50% de mortalité sont de : 0,501% et 0,03% pour *C.sativa* et de 0,51% et 0,09% pour *P.umbellatum*, respectivement pour les larves de la souche de laboratoire d'*Anopheles gambiae* s.s. et celles de *Culex quinquefasciatus*. De ce fait, bien que *Culex quinquefasciatus* soit considéré comme anthropophile et lié à des milieux urbains très pollués grâce à sa grande capacité d'adaptation

(Nchoutpouen *et al.*, 2019 ; Bhattacharya et Basu, 2016), ses larves semblent être strictement liées aux conditions de leur gîte naturel.

L'efficacité des huiles essentielles sur les larves de moustiques suppose des mécanismes complexes. L'un de ces mécanismes consisterait en des dommages sur l'exosquelette des larves par inhibition de la synthèse de la chitine et de ce fait réduirait le dépôt des couches de cuticules (Pratti *et al.*, 2015) ou d'autres effets allant jusqu'à l'altération des organes internes des insectes (Fiaz *et al.*, 2019).

La présence des terpènes, des sesquiterpènes et d'autres composés rapportés par plusieurs auteurs comme des biocides (Brochot *et al.*, 2017) dans la composition chimique des huiles essentielles des feuilles de *Cannabis sativa* et de *Piper umbellatum*, explique leur activité insecticide sur les souches de laboratoire d'*Anopheles gambiae* s.s., sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. et *Culex quinquefasciatus*. Ainsi, les composés tels que : α -pinène, β -pinène, myrcène, limonène, linalol et bornéol ont été rapportés comme efficaces contre les larves de troisième stade d'*Anopheles gambiae* s.l. (Kweka *et al.*, 2016), de *Culex pipiens pallens*, d'*Aedes aegypti*, d'*Ochlerotatus togoi* (Perumalsamy *et al.*, 2009) et d'*Aedes albopictus* (Liu *et al.*, 2015). Le menthone et le E, Z-P-menthen-2-en-1-ol sont connus pour leur activité larvicide sur *Culex quinquefasciatus* (Pavela *et al.*, 2014). De plus, les sesquiterpènes tels que : β -caryophyllène, β -elemène sont rapportés comme efficaces contre les larves d'*Anopheles subpictus*, d'*Aedes aegypti*, de *Culex tritaeniarhynchus* (Govindaradjan *et al.*, 2013) ; l'oxyde de caryophyllène et la germacrène D contre *Anopheles anthropophagus* (Zhu et Tian, 2013). Ces composés terpéniques sont également efficaces contre les Protozoaires et les Bactéries. De ce fait, la β -pinène, le myrcène et la limonène sont toxiques contre *Trypanosoma brucei brucei* (Kpoviessi *et al.*, 2013), le linalol et le limonène ont un effet bactéricide contre *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis* et *Escherichia coli* (Soković *et al.*, 2010). De même, les composés tels que : linalol, p-cymène, 1,8- cinéol, terpinolène et Thujène sont reconnus pour leur activité biocide en induisant une mortalité ou une inhibition des fonctions vitales chez des Bactéries telles que *Shigella* (Bagamboula *et al.*, 2004) et sur plusieurs autres classes de Bactéries (Rodriguez *et al.*, 2014 ; Swamy *et al.*, 2016).

L'effet knock down qui se manifeste quelques instants après le contact des moustiques adultes avec les morceaux de moustiquaires imprégnés, traduit l'action des huiles essentielles des feuilles de *Cannabis sativa* et de *Piper umbellatum* sur le système nerveux des moustiques. Concernant l'huile essentielle de *Cannabis sativa*, son activité sur le système

nerveux des moustiques adultes pourrait s'expliquer à partir des études réalisées sur des souris qui ont montré que les récepteurs des cannabinoïdes sont situés sur des ganglions du cervelet et de l'hippocampe, organes responsables de la coordination des mouvements (Kendall *et al.*, 2017). Sur des sujets humains, il a été démontré que les cannabinoïdes ont des effets physiologique et psychologique, du fait qu'il agissent sur le système nerveux (Skaper *et al.*, 2012). Sur les Vertébrés et les Invertébrés, il a également été démontré que les cannabinoïdes, une fois dans l'organisme se fixent sur leur récepteur, ce qui diminue l'activité de l'adényl cyclase inhibant les transporteurs des ions sodiums et potassium responsables de la transmission de l'influx nerveux (Kendall *et al.*, 2017). La rapidité de l'effet knock down croît avec la concentration d'huile essentielle. Cette paralysie temporaire chez les adultes des souches de laboratoire et sauvages d'*Anopheles gambiae* s.l. et de *Culex quinquefasciatus* exposés se termine par une mortalité 24 heures après le contact avec le tulle imprégné d'huile essentielle des feuilles de *Cannabis sativa* ou de *Piper umbellatum*. Plusieurs auteurs ont démontré l'efficacité des composés trouvés dans l'huile essentielle des feuilles de *Cannabis sativa* et de *Piper umbellatum* sur des insectes adultes. Ainsi, les composés suivants ont été associés à une toxicité : linalol, gémacrène D contre *An. subpictus* (Govindarajan *et al.*, 2013) et contre *An. gambiae* (Thomas *et al.*, 2017) ; α -pinène ; limonène et β -ocimène contre *An. stephensi* (Dharmagadda *et al.*, 2005) ; terpinen-4-ol, gémacrène D contre *An. anthropophagus* ; myrcène contre *An. gambiae* (Tchoumboungang *et al.*, 2009) et *Anopheles funestus* (Ntonga *et al.*, 2014) ; l'oxyde de caryophyllène contre *An. gambiae* (Bossou *et al.*, 2013). Le terpinène-4-ol, α -pinène et β -pinène sont efficaces contre des charançons tels que *Sitophilus zeamais* et *Tribolium castaneum* (Suthisut *et al.*, 2011).

Etant donné que la majorité des insecticides utilisés dans la lutte anti vectorielle ont pour cible les canaux à sodium ou l'acétylcholinestérase (Ranson *et al.*, 2011), l'efficacité des huiles essentielles sur les adultes de moustiques pourrait aussi s'expliquer à la lumière des travaux antérieurs qui ont mis en évidence l'action inhibitrice de α -pinène et β -pinène sur l'acétylcholinestérase (Kim *et al.*, 2013). Il serait possible que certains composés des huiles essentielles de *Cannabis sativa* et de *Piper umbellatum* agissent en synergie sur les moustiques ; car l'aromadendène et le 1-8-cinéol présents dans l'huile essentielle de *Cannabis sativa* ont été rapportés synergistes sur des bactéries pathogènes (Mulyaningsih *et al.*, 2010).

La combinaison des huiles essentielles des feuilles de *Cannabis sativa* et *Piper umbellatum* avec le teméphos et la perméthrine, bien efficace sur les larves et les adultes de la

souche sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. et *Culex quinquefasciatus*, montre un effet d'atténuation partielle de la toxicité de ces insecticides de synthèse dans les faibles concentrations. Cet effet de neutralisation ou d'atténuation partielle de la toxicité du témephos et de la permethrine par les huiles essentielle des feuilles de *Cannabis sativa* et de *Piper umbellatum* pourrait être dû à un antagonisme ou à une inhibition partielle des principes actifs du témephos et de la permethrine. Cet antagonisme partiel a été observé par certains auteurs lors de la combinaison du linalol - thymol avec le spirotetramat contre *Myzus persicae* (Faraone *et al.*, 2015) ou de la combinaison de plusieurs huiles essentielles avec la permethrine contre les adultes d'*Aedes aegypti* et d'*Anopheles gambiae* (Gross *et al.*, 2017). Cette activité d'inhibition partielle des principes actifs du témephos et de la permethrine sans pour autant altérer leur efficacité de façon définitive, offrirait un avantage pour la lutte contre les vecteurs des maladies tropicales et les autres insectes nuisibles. Car l'impact des insecticides de référence sur les organismes non cibles pourrait ainsi être limité. Par ailleurs, l'effet rebond observé pour l'activité du témephos et de la permethrine par la suite avec les doses croissantes d'huiles essentielles, permettrait une amélioration l'efficacité de ces deux principaux insecticides de synthèse par rapport aux insectes résistants. Les travaux conduits par plusieurs auteurs pour évaluer l'efficacité de la combinaison des huiles essentielles avec les insecticides de synthèse ont montré une efficacité des combinaisons huile essentielle-permethrine contre les adultes d'*Aedes aegypti* (Chansang *et al.*, 2018) et les mouches domestiques (Joffe *et al.*, 2011). Dans les travaux de ces auteurs, en effectuant des mélanges avec les huiles essentielles, on a réduit les concentrations des insecticides de synthèse en préservant leur efficacité grâce aux faibles concentrations d'huile essentielle. Les résultats observés au cours de nos travaux sur l'efficacité du mélange des huiles essentielles des feuilles de *Cannabis sativa* et de *Piper umbellatum* avec le témephos et la permethrine montrent une augmentation de l'efficacité de ces insecticides de synthèse sur les larves et les adultes d'*Anopheles gambiae* s.l. et de *Culex quinquefasciatus*. De même, des études menées au Ghana sur une souche d'*Anopheles gambiae* s.l. résistante à la deltaméthrine et à la permethrine (Dadzie *et al.*, 2017) et en Iran sur l'efficacité de la combinaison des huiles essentielles d'*Eucalyptus globulus* et *Rosmarinus officinalis* sur les blattes, *Culex pipiens*, *Anopheles stephensi* et les mouches domestiques (Zibae et Khorram, 2015) ont montré l'efficacité des combinaisons des huiles essentielles avec des insecticides de référence.

Les huiles essentielles seules ou en combinaison avec les insecticides de synthèse constitueraient ainsi une alternative efficace contre le développement et l'expansion rapide de

la résistance des vecteurs aux insecticides conventionnels (Antonio-Nkondjio *et al.*, 2015 ; Nwane *et al.*, 2013 ; Antonio- Nkondjio *et al.*, 2016 ; Muller *et al.*, 2008) ; car elles ont plusieurs composés actifs et certainement plusieurs modes d'action.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'extraction par hyfrodillation des huiles essentielles des feuilles de *Cannabis sativa* et de *Piper umbellatum* a donné des rendements très faibles de l'ordre de : 0,044% et 0,012% respectivement pour *Cannabis sativa* et pour *Piper umbellatum*. Les analyses chimiques de ces huiles essentielles ont révélé 81 composés pour *Cannabis sativa* dont les principaux sont : myrcène (31,75%), terpinolène (14,76%), α -pinène (8,12%), β -pinène (3,64%), α -humulène (3,28%), E- β -caryophyllène (1,75%), caryophyllène oxyde (1,25%) et 24 composés pour *Piper umbellatum* dont les principaux sont : α -pinène (6,23%), p-menth-1-en-8-ol (5,23%), myrcène (4,60%), Z-nerolidol (4,56%), linalol (1,29%). Plusieurs composés au cours de ces analyses n'ont pas été déterminés. Cette différence en termes de nombre de composés d'huile essentielle entre les deux plantes serait due à la spécificité botanique de chacune de ces plantes.

L'identification morphologique des moustiques adultes issus de l'élevage des stades aquatiques récoltés dans l'étang de Melen a révélé une faune culicidienne constituée de *Culex quinquefasciatus* (91%), de *Culex perfuscus* (7%) et d'*Anopheles gambiae* s.l. (2%) ; tandis que l'identification morphologique et moléculaire des individus adultes issus de l'élevage des larves récoltées aux abords de la rivière Ewoé a révélé une diversité culicidienne constituée d'*Anopheles coluzzi* (95,77%) et d'*Anopheles gambiae* s.s. (4,23%).

Les tests biologiques de toxicité réalisés sur les larves et les adultes de moustiques ont montré une efficacité des huiles essentielles des feuilles de *Cannabis sativa* sur les souches de laboratoire d'*Anopheles gambiae* s.s., sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. et sur *Culex quinquefasciatus* avec une susceptibilité plus élevée de *Culex quinquefasciatus*. Après 24 heures d'exposition des larves de moustique, les concentrations létales pour 50% de mortalité sont de : 0,501% ; 1,168% ; 0,03% et pour 95% de mortalité : 0,95% ; 2,21% et 0,61%, respectivement pour les souches de laboratoire d'*Anopheles gambiae* s.s., sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. et pour *Culex quinquefasciatus*. Pour l'activité adulticide, les concentrations létales pour 50% de mortalité sont de : 0,107% ; 0,15% ; 0,17% et pour 95% de mortalité : 0,33% ; 0,36% et 0,42%, respectivement pour les souches de laboratoire d'*Anopheles gambiae* s.s., sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. et pour *Culex quinquefasciatus*. Pour l'effet adjuvant, l'huile essentielle des feuilles de *Cannabis sativa* augmente l'efficacité des insecticides de synthèse (teméphos et permethrine) sur la souche sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. et *Culex quinquefasciatus*. Les concentrations létales d'huile essentielle de *Cannabis sativa* dans le mélange avec le teméphos nécessaires pour 50% de mortalité larvaires sont : 0,14% ; 0,002% et pour 95% de mortalité : 0,35% et 0,026%,

respectivement pour la souche sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. et pour *Culex quinquefasciatus*. Pour l'efficacité de la perméthrine sur les adultes de moustiques, les concentrations létales d'huile essentielle dans le mélange pour 50% de mortalité sont : 0,027% ; 0,011% et pour 95% de mortalité : 0,18% et 0,15%, respectivement pour la souche sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l et pour *Culex quinquefasciatus*. Cependant, les faibles concentrations de cette huile essentielle réduisent partiellement l'efficacité de ces insecticides.

L'huile essentielle des feuilles de *Piper umbellatum* s'est révélée efficace aussi bien sur les souches de laboratoire d'*Anopheles gambiae* s.s., sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. que sur *Culex quinquefasciatus*. Son efficacité est plus élevée sur *Culex quinquefasciatus*. Après 24 heures d'exposition des larves, les concentrations létales pour 50% de mortalité sont de : 0,51% ; 0,61% ; 0,09% et pour 95% de mortalité : 0,91% ; 1,09% et 0,23%, respectivement pour les souches de laboratoire d'*Anopheles gambiae* s.s., sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. et pour *Culex quinquefasciatus*. Pour l'activité adulticide, les concentrations létales pour 50% de mortalité sont de : 0,40% ; 0,43% ; 0,24% et pour 95% de mortalité: 0,73% ; 0,76% et 0,52%, respectivement pour les souches de laboratoire et sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. et pour *Culex quinquefasciatus*. La combinaison de cette huile essentielle avec les insecticides de références (téméphos et perméthrine) a augmenté l'efficacité de ces derniers sur les moustiques exposés. Pour l'efficacité du téméphos sur les larves de moustiques, les concentrations létales d'huile essentielle des feuilles de *Piper umbellatum* dans la combinaison nécessaires pour 50% de mortalité sont : 0,30% : 0,0011% et pour 95% de mortalité : 0,64% et 0,024%, respectivement pour la souche sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. et pour *Culex quinquefasciatus*. Pour l'efficacité de la perméthrine sur les adultes de moustique traités, les concentrations létales d'huile essentielle dans la combinaison nécessaires pour 50% de mortalité sont : 0,024 : 0,011 et pour 95% de mortalité: 0,18% et 0,017%, respectivement pour la souche sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. et pour *Culex quinquefasciatus*. Il apparaît également dans ces combinaisons un antagonisme partiel dans les faibles concentrations d'huile essentielle.

En perspective, pour bien établir les effets insecticide et adjuvant des huiles essentielles des feuilles de *Cannabis sativa* et de *Piper umbellatum* sur la souche sauvage d'*Anopheles gambiae* s.l. et *Culex quinquefasciatus*, des essais doivent être menés sur le terrain. D'autres études pourront permettre de déterminer les composés des huiles essentielles des feuilles de *Cannabis sativa* et de *Piper umbellatum* responsables de l'inhibition partielle de la toxicité du téméphos et de la perméthrine ainsi que les mécanismes y afférents.

Nous recommandons l'utilisation des huiles essentielles des feuilles de *Cannabis sativa* et de *Piper umbellatum* dans la fabrication des produits cosmétiques et dans la lutte contre les larves de moustiques dans les gîtes temporaires.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abdelgaleil S.A.M, Mohamed M.I.E, Shawir M, Abou-Taleb H.K. *Chemical composition, insecticidal and biochemical effects of essential oils of different plant species from Northern Egypt on the rice weevil, Sitophilus oryzae L.* Journal of Pest Science. 1-11(2015).

Adams R.P *Identification of essential oils by gas chromatography quadrupole mass spectroscopy.* Allured Publishing Corporation. 4 (9): 698 (2012).

Adorjan, B., Buchbauer, G. *Biological properties of essential oils: an updated review.* Flavour and Fragrance Journal. 25, 407–426(2010).

AFNOR (Association Française de Normalisation). *Huiles essentielles, recueil de normes françaises.* AFNOR, 5ème éd. 473p (1996)

Agossa F.R, Gnanguenon V, Anagonou R, Azondekon R, Aïzoun N, Sovi A, Oké-Agbo F, Sézonlin M, Akogbéto M.C. *Impact of Insecticide Resistance on the Effectiveness of Pyrethroid-Based Malaria Vectors Control Tools in Benin: Decreased Toxicity and Repellent Effect.* PLoS ONE. 10(12): 1-13 (2015).

Akono Ntonga P, Belong P, Tchoumboungang F, Bakwo Fils E.M, Fankem H. *Composition chimique et effets insecticides des huiles essentielles des feuilles fraîches d’Ocimum canum Sims et d’Ocimum basilicum L. sur les adultes d’Anopheles funestus s.s, vecteur du paludisme au Cameroun.* Journal of Applied Biosciences 59: 4340– 4348 (2012)..

Alavia Y , Araia M, Mendoza J, Tufet-Bayona M , Sinha R , Fowler K , Billkera O , Franke-Fayard B , Janse C.J , Waters A , Sinden R.E. *Corrigendum to “The dynamics of interactions between Plasmodium and the mosquito: a study of the infectivity of Plasmodium berghei and Plasmodium gallinaceum and their transmission by Anopheles stephensi, Anopheles gambiae and Aedes aegypti.* International Journal for Parasitology. 34: 245–247 (2004)

Alout H, Djogbénou L , Berticat C , Chandre F , Weill M. *Comparison of Anopheles gambiae and Culex pipiens acetylcholinesterase 1 biochemical properties.* Comparative Biochemistry and Physiology, Part B. 150: 271–277 (2008).

Ambroise-Thomas P, Guiguen C, Rpoux J. *Parasitologie-Mycologie: Maladies infectieuses et fongiques* ANN O ‘FEL par l’association française des professeurs de parasitologie. 437-444 (1992).

Antonio-Nkondjio C, Defo-Talom B, Tagne-Fotso R, Tene-Fossog B, Ndo C, Lehman L.G, Tchuinkam T, Kengne P and Awono-Ambene P. *High mosquito burden and malaria transmission in a district of the city of Douala, Cameroon*. BMC Infectious Diseases. 12:275-283 (2012).

Antonio-Nkondjio C, Defo-Talom B, Tagne-Fotso R, Tene-Fossog B, Ndo C, Lehman LG, Tchuinkam T, Kengne P & Awono-Ambene P. *High mosquito burden and malaria transmission in a district of the city of Douala, Cameroon*. BMC Infectious Diseases, 12(1), 275 (2012).

Antonio-Nkondjio C, Fossog B, Ndo C, Djantio B, Zebaze Togouet S, Awono-Ambene P, Constantini C, Wondji C.S, and Rnason H. *Anopheles gambiae distribution and insecticide resistance in the cities of Douala and Yaounde (Cameroon): influence of urban agriculture and pollution*. Malaria Journal. 10:154-167 (2016).

Antonio-Nkondjio C, Ndo C, Njiokou F, Bigoga J.D, Awono-Ambene P, Etang J, Same Ekobo A and Wondji C.S. *Review of malaria situation in Cameroon: technical viewpoint on challenges and prospects for disease elimination*. Parasites and Vectors. 12:501-524 (2019).

Antonio-Nkondjio C, Poupardin R, Fossog Tene B, Kopya E, Costantini C, Awono-Ambene P, Wondji C.S. *Investigation of mechanisms of bendiocarb resistance in Anopheles gambiae populations from the city of Yaoundé, Cameroon*. Malaria Journal. 15:424-435 (2016).

Antonio-Nkondjio C, Tene Fossog B, Kopya E, Poumachu Y, Menze Djantio M, Ndo C, Tchuinkam T, Awono Ambene P and Wondli C.S. *Rapid evolution of pyrethroid resistance prevalence in Anopheles gambiae populations from the cities of Douala and Yaoundé (Cameroon)*. Malaria Journal. 14:155-164 (2015).

Aspen S & Savage HM. *Polymerase chain reaction assay identifies North American members of the Culex pipiens complex based on nucleotide sequence differences in the acetylcholinesterase gene Ace.2*. The Journal of American Mosquito Control Association, 19, 323-328 (2003).

Athira A and Pushpalatha E. *Knockdown, repellent and adulticidal activity of essential oils derived from selected aromatic plants against the filarial vector mosquito, Culex quinquefasciatus Say (Diptera: Culicidae)*. International Journal of Entomology Research. 6(1): 133-137 (2021)

Aubry P, Gaüzère B.A. *Filarioses lymphatiques. Centre René Labusquière*, Institut de Médecine Tropicale, Université de Bordeaux. 7p (2019).

Aungtikun J and Soonwera M. 2021. *Improved adulticidal activity against Aedes aegypti (L.) and Aedes albopictus (Skuse) from synergy between Cinnamomum spp. essential oils. Scientific Reports.* 11p (2021).

Ayala D, Costantini C, Ose K, Kamdem G.C, Antonio-Nkondjio C, Agbor JP, Awono-Ambene P, Fontenille D and Simard F. *Habitat suitability and ecological niche profile of major malaria vectors in Cameroon.* Malaria Journal. 8:307-322 (2009).

Aziz Z.A.A, Ahmad A, Setapar S.H.M, Karakucuk A, Azim M.M, Lokhat D, Rafatullah M, Ganash M, Kamal M.A, Ashraf G.M. *Essential Oils: Extraction Techniques, Pharmaceutical and Therapeutic Potential - A Review.* Current Drug Metabolism. 19(13):1100-1110 (2018).

Bagamboula C.F, Uyttendaele M and Debevere J. *Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards Shigella sonnei and S. flexneri.* Food Microbiology. 21: 33–42 (2004).

Bahnk CM et Fonseca DM. *Rapid assay to identify the two genetic forms of Culex (Culex) pipiens L. (Diptera: Culicidae) and hybrid populations.* American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 75, 251-255 (2006).

Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D and Idaomar M. *Biological effects of essential oils – A review.* Food Chemistry Toxicology. 46(2): 446–475 (2008).

Baser K.H.C., Buchbauer G. *Handbook of essential oils: science, technology and applications.* CRC Press. 991p (2009).

Belkin JN. *Mosquito studies (Diptera, Culicidae). VII. The Culicidae of New Zealand.* Contributions of the American Entomological Institute, 3(1), 1-182 (1968).

Bejon P, Williams T.N, Nyundo C, Hay S.I, Benz D, Gething P.W, Otiende M, Peshu J, Bashraheil M, Greenhouse B, Bousema T, Bauni E, Marsh K, Smith DL, Borrmann S. *A microepidemiological analysis of febrile malaria in Coastal Kenya showing hotspots within hotspots.* E Life. 3:1-13 (2014)

Bhattacharya S, Basu P. *The Southern House Mosquito, Culex quinquefasciatus: profile of a smart vector.* Journal of Entomology and Zoology Studies. 4(2): 73-81 (2016).

Boehm K., Büssing A., Ostermann T. *Aromatherapy as an adjuvant treatment in cancer care - a descriptive systematic review*. African Journal of Traditional and Complement Alternative Medecine. 9(4):503-518 (2012).

Bolzonella C, Lucchetta M, Teo G, Boatto V, Zanella A. *Is there a way to rate insecticides that is less detrimental to human and environmental health?* Global Ecology and Conservation. 699:1-28 (2019).

Bonizzoni M , Ochomo E , Dunn WA , Britton M , Afrane Y , Zhou G , Hartsel J , Lee MC , Xu J , Githeko A , Fass J and Yan G. *RNA-seq analyses of changes in the Anopheles gambiae transcriptome associated with resistance to pyrethroids in Kenya: identification of candidate resistance genes and candidate-resistance SNPs*. Parasites and Vectors. 8:474-487 (2015).

Bossou A.D, Mangelinckx S, Yedomonhan H, Boko P.M, Akogbéto M.C, De Kimpe N, Avlassi F, Sohounhloue D.C.K. *Chemical composition and insecticidal activity of plant essential oils from Benin against Anopheles gambiae (Giles)*. Parasites and Vectors. 6:337-354 (2013).

Botineau M. *Botanique systématique et appliquée des plantes à fleur*. Ed. Tec et Doc, Paris, 1335 p (2010).

Boué H, Chanton R. *La classe des insectes (Embranchement des arthropodes)*. Biologie : biologie animale ; les invertébrés. Masson et cie. Paris. 482p (1962).

Brochot A, Guilbot A, Haddioui L, Roques C. *Antibacterial, antifungal, and antiviral effects of three essential oil blends*. MicrobiologyOpen. 6(4):1-6 (2017).

Brustolin M, Pujhari S, Henderson C.A, Rasgon J.L. *Anopheles mosquitoes may drive invasion and transmission of Mayaro virus across geographically diverse regions*. PLoS Neglected Tropical Diseases. 12(11): 1-11 (2018).

Buchbauer G. *Biological activities of essential oils*. In: Baser, K.H.C., Buchbauer, G. (Eds.), Handbook of Essential Oils. Science, Technology and Applications. CRC Press, Boca Raton. 235–280 (2010).

BUCREP. *Central de Recensements et d'Etudes de la Population au Cameroun* ((2021).

Burt S. *Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review*. International Journal of Food and Microbiology. 9: 223–253 (2004).

Čabanová V, Miterpáková M, Valentová D, Blažejová H, Rudolf I, Stloukal E, Hurníková Z and Dzidová M. *Urbanization impact on mosquito community and the transmission potential of filarial infection in central Europe*. Parasites and Vectors. 11:261-271 (2018).

Caissard J.C, Joly C., Bergougnot V., Hugueney P., Mauriat M., Baudino S. *Secretion mechanisms of volatile organic compounds in specialized cells of aromatic plants*. Recent Research Developments in Cell Biology.2:1-15 (2004).

Carrasco D, Lefe`vre T, Moiroux N , Pennetier C , Chandre F and Cohuet A. *Behavioural adaptations of mosquito vectors to insecticide control*. Current Opinion in Insect Science. 34:48–54 (2019).

Catteruccia F, Godfray H, Crisanti A. *Impact of genetic manipulation on the fitness of Anopheles stephensi mosquitoes*. Science. 299 (5610):1225-1227 (2003).

CDC: United States Centre for Disease Control. *Guideline for Evaluating Insecticide Resistance in Vectors Using the CDC Bottle*. 18p (2013).

Chamorro E.R, Zambón S.N, Morales, W.G, Sequeira A.F, Velasco G.A. *Study of the chemical composition of essential oils by gas chromatography*. In: Salih, B., Çelikbıçak, Ö. (Eds.), *Gas Chromatography in Plant Science, Wine Technology, Toxicology and Some Specific Applications*. National Technological University, Regional Faculty Resistance, UTN QUIMOBİ Group, Argentina.15: 307-326 (2012).

Chandra G. *Nature limits filarial transmission*. Parasites and Vectors. 1:13-19 (2008)

Chansang A, Champakaew D, Junkum A, Jitpakdi A, Amornlerdpison D, Aldred A K, Riyong D, Wannasan A, Intirach J, Muangmoon R and Pitasawat B. *Synergy in the adulticidal efficacy of essential oils for the improvement of permethrin toxicity against Aedes aegypti L. (Diptera: Culicidae)*. Parasites and Vectors. 11:417-433 (2018).

Cho-Ngwa F, Monya E, Azantsa B.K, Manfo F.P.T, Babiaka S.B, Mbah J.A and Samje M. *Filaricidal activities on Onchocerca ochengi and Loa loa, toxicity and phytochemical screening of extracts of Tragia benthami and Piper umbellatum*. Complementary and Alternative Medicine. 16:326-335 (2016).

Chouaïbou M.S, Fodjo B.K, Fokou G, Allassane O.F, Koudou B.G, David J.P, Antonio-Nkondjio C, Ranson H and Bonfoh B. *Influence of the agrochemicals used for rice*

and vegetable cultivation on insecticide resistance in malaria vectors in southern Côte d'Ivoire. *Malaria Journal*. 15:426-438 (2016).

Cloyd R.A and Raudenbush A.L. *Efficacy of Binary Pesticide Mixtures Against Western Flower Thrips*. *HorlTechnology*. 24(4): 449-456 (2014).

Coetzee M, Hunt R.H, Wilkerson R, Della Torre A, Coulibaly M.B and Besanky N.J..2013. *Anopheles coluzzii* and *Anopheles amharicus*, new members of the *Anopheles gambiae* complex. *Zootaxa*. 3619 (3): 246–274 (

Cunha J.M, Carlini E.A, Pereira A.E, Ramos O.I, Pimentel C, Galgardi R, Sanvito W.L, Lander N and Mechoulam R. *Chronic administration of cannabidiol to healthy volunteers and epileptic patients*. *Pharmacology*. 2: 175-185 (1980).

Cvijovi I, Good B.H, Jerison E.R, and Desa M.M. *Fate of a mutation in a fluctuating environment*. *PNAS*. 24:21-28 (2015).

Cywinka A, Hunter F, Herbert P.D. *Identifying Canadian mosquitos' species through DNA*. *Medical and Veterinary Entomology*. 63: 413-424 (2006).

Da Cruz D.L, Paiva M.H.S, Guedes D.R.D, Alves J, Gómez L.F and Ayres C.F.J. *Detection of alleles associated with resistance to chemical insecticide in the malaria vector Anopheles arabiensis in Santiago, Cabo Verde*. *Malaiaria Journal*. 18:120-131 (2019).

Da Silva I.F.J, De Oliveira R.G, Soares I.M, Da Costa Alvim T, Ascêncio S.D, De Oliveira Martins D.T. *Evaluation of acute toxicity, antibacterial activity, and mode of action of the hydroethanolic extract of Piper umbellatum L.* *Journal of Ethnopharmacology*. 151:137-143 (2014).

Da Silva Junior I.F, Balogun S.O, Godinho de Oliveira R, Damazo A.S, Tabajara de Oliveira Martins D. *Piper umbellatum L.: A medicinal plant with gastric-ulcerprotective and ulcerhealing effects in experimental rodent models*. *Journal of Ethnopharmacology*. 196:123–131 (2016).

Dadzie S.K, Chabi J, Asafu Adjaye A, Owusu Akrofi O, Baffoe Wilmot A, Malm K, Bart-Plange C, Coleman S, Appawu M.A and Boakye D.A. *Evaluation of piperonyl butoxide in enhancing the efficacy of pyrethroid insecticides against resistant Anopheles gambiae s.l. in Ghana*. *Malaria Journal*. 15:342-353 (2017).

Dandlen S.A, Lima A.S, Mendes M.D, Miguel M.G, Faleiro M.L, Sousa M.J, Pedro L.G, Barroso J.G, Figueiredo A.C. *Antioxidant activity of six Portuguese thyme species essential oils*. Flavour and Fragrance Journal. 25:150–155 (2010).

Dantanko F and MalannY.D. *Bioactivity of Essential Oils of Laggera pterodonta and Laggera aurita against Larvae of Anopheles gambiae, Malaria Vector*. Biology and Life Science Forum. 4 (93):1-7 (2021).

David J.P, Ismail H.M, Chandor-Proust A and Paine M.J.I, *Role of cytochrome P450s in insecticide resistance: impact on the control of mosquito-borne diseases and use of insecticides on Earth*. Philosophical Transactionsof Royal Society B. 368:1-12 (2012).

De Carvalho G.A, Alves L.C, Maia R.T, De Andrade C.F.S, Do Nascimento R.A, Da Glória Faustino M.A. *Vector competence of Culex quinquefasciatus (Say, 1823) exposed to different densities of microfilariae of Dirofilaria immitis (Leidy, 1856)*. Revista Brasileira de Entomologia. 52(4): 658-662 (2008).

De Jong B.C, Printiss D, Mcfarland W, Machekano R and Isrealiski D.M. *Marijuana use and its association with adherence to antiretroviral therapy among HIV-infected persons with moderate to severe nausea*. Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrom. 38:1-4 (2005).

De Sousa D.P. *Medicinal Essential Oils: Chemical, Pharmacological and Therapeutic Aspects*. Nova Science Publishers. 236p (2012).

Deletre E , Chandre F, Williams L, Duménil C, Menut C and Martin T. *Electrophysiological and behavioural characterization of bioactive compounds of the Thymus vulgaris, Cymbopogon winterianus, Cuminum cyminum and Cinnamomum zeylanicum essential oils against Anopheles gambiae and prospects for their use as bednet treatments*. Parasites and Vectors. 8:316-330 (2015).

Des Abbayes H, Chadeaud M, De Ferre Y, Feldmemam, Gaussere H, Grasse P.P, Lerrede M.C, Ozenda P, Prevot A.R. *Botanique Anatomie-Cycle Evolutif, Sytématique*. Masson et Cie. 722-842 (1963).

Dharmagadda V.S.S, Naik S.N, Mittal P.K, Vasudevan P. *Larvicidal activity of Tagetes patula essential oil against three mosquito species*. Bioresources Technology. 96(11):1235-1240 (2005).

Dias C.N, Lima Alves L.P, Rodrigues K.A.F, Aranha Brito M.C, Rosa C.S, Mendonça do Amaral F, Dos Santos Monteiro O, de Aguiar Andrade E.H, Soares Maia J.G, Coutinho Moraes D.F. *Chemical Composition and Larvicidal Activity of Essential Oils Extracted from Brazilian Legal Amazon Plants against Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 1-:8 (2015).

Diniz D.F.A, Varjal de Melo-Santos M.A, de Mendonça Santos E.M, Beserra E.B, Helvecio E, de Carvalho-Leandro D, dos Santos B.S, de Menezes Lima V.L, Junqueira Ayres C.F. Fitness cost in field and laboratory *Aedes aegypti* populations associated with resistance to the insecticide temephos. *Parasites and Vectors*. 8:662-677 (2015).

Di Tomaso J.M. *Barriers to foliar penetration and uptake of herbicides*. Proceedings of the California Weed Science Society 51: 150-155 (1999).

Djibo A.K. *Analyse desn guiles essentielles de quelques plantes de la flore su Burkina Faso appartenant aux Familles des Lamiaceae (Hyptis spicigera Lam., Hyptis suaveolens Port., Ocimum americanum L.) et des Poaceae (Cymbopogon schoenanthus (L) Spreng., Cymbopogon giganteus Chiov. et Cymbopogon citratus(DC) Stapf.)*. Thèse de Doctrat du Troisième Cycle de l'Unoiversité de Ouagadougou. 168 p (2000).

Djogbénou L, Dabire´ R, Diabate´A, Kengne P, Akogbéto M, Hougard J.M and Chandre F. *Identification and Geographic Distribution of the ACE-1R Mutation in the Malari Vector Anopheles gambiae in South-Western Burkina Faso, West Africa*. American Journal of Tropical Medecine and Hygien. 78(2):298-302 (2008).

Dua V.K, Pandey AC, Dash AP. *Adulticidal activity of essential oil of Lantana camara leaves against mosquitoes*. Indian Journal of Medical Research. 131:424-433 (2010).

Dudareva N., Pichersky E. *Metabolic engeenering of plant volatiles*. Current opinion in biotechnology. 19:181-189 (2008).

Dugo G, Di Giacomo A. *Citrus, the genus Citrus*. Taylor and Francis. 565p (2002).

Duke J.A, Bogenschutz-Godwin M.J. Ottesen A.R. *Duke's Handbook of Medicinal Plants of Latin America*; CRC Press: Boca Raton F.L, USA.139-253 (2009).

Dusfour I, Vontas J, David J-P, Weetman D, Fonseca D.M, Corbel V, Raghavendra K, . Coulibaly M.B, Martins A.J, Kasai S, Chandre F. *Management of insecticide resistance in the*

major Aedes vectors of arboviruses: Advances and challenges. PLoS Neglected Tropical Diseases. 13(10): 1-22 (2019).

Duval L. *Les huiles essentielles à l'officine*. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en Pharmacie. Université de Rouen.155p (2012).

Edi C.V, Djogbé'nou L, Jenkins A.M, Regna K, Muskavitch M.A.T, Poupardin R Jones C.M, Essandoh J, Kétoh G.K, Paine M.J.I, Koudou B.G, Donnelly M.j, Ranson H, Weetman D. *CYP6 P450 Enzymes and ACE-1 Duplication Produce Extreme and Multiple Insecticide Resistance in the Malaria Mosquito Anopheles gambiae*. PLOS Genetics. 10(3):1-12 (2014).

Enayati A.A, Ranson H and Hemingway J. *Insect glutathione transferases and insecticide resistance*. Insect Molecular Biology. 14(1): 3–8 (2005).

Etang J, Manga L, Toto J.C, Guillet P, Fondjo E, Chandre F. *Spectrum of metabolic-based resistance to DDT and pyrethroids in Anopheles gambiae s.l. populations from Cameroon*. Journal of Vector Ecology. 32(1):123-133 (2007).

Etang J, Pennetier C, Piaméu M, Bouraima A, Chandre F, Awono-Ambene P, Marc C and Corbel V. *When intensity of deltamethrin resistance in Anopheles gambiae S.L. leads to loss of Long Lasting Insecticidal Nets bio- efficacy: a case study in north Cameroon*. Parasites and Vectors. 9:132-142 (2016).

Evans W.C. *Trease and Evans Pharmacognosy*. Saunders – Elsevier, Edinburgh, 16 éd.: 106–116 (2009).

Evergetis E, Michaelakis A, Papachristos D.P, Badieritakis E, Kapsaski-Kanelli V.N, Haroutounian S.A. *Seasonal variation and bioactivity of the essential oils of two Juniperus species against Aedes (Stegomyia) albopictus (Skuse, 1894)*. Parasitology Research. 1-9 (2016).

Faran M.E, Linthicum K.L. *Mosquito's systematic*. 13(1):1-9 (1981).

Faraone N, Hillier N.K, Cutler G.C. *Plant Essential Oils Synergize and Antagonize Toxicity of Different Conventional Insecticides against Myzus persicae (Hemiptera: Aphididae)*. PLoSONE. 10(5):1-12 (2015).

Farhat A. *Vapo-Diffusion assistée par Micro-ondes : Conception, Optimisation et Application*. Thèse pour le diplôme de docteur en sciences (sciences des procédés, sciences

des aliments). Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse et L'Ecole Nationale d'Ingénieurs de Gabès. 137p (2010).

Faucon M. *Traité d'aromathérapie scientifique et médicale*. Sang de la terre. 880p (2012).

Fernandez X., Chemat F. *La chimie des huiles essentielles*. Editions Vuibert. 288p (2012).

Ffrench-Constant R.H, Daborn P.J and Le Goff G. *The genetics and genomics of insecticide resistance*. TRENDS in Genetics. 20(3): 163-170 (2004).

Fiaz M, Martínez L.C, Plata-Rueda A, Gonçalves W.G, de Souza D.L.L, Cossolin JFS, Carvalho PEGR, Martins G.F, Serrão J.E. *Pyriproxyfen, a juvenile hormone analogy, damages midgut cells and interferes with behaviors of Aedes aegypti larvae*. PeerJournal. 1-21 (2019).

Figueredo G. *Étude chimique et statistique de la composition d'huiles essentielles d'origans (Lamiaceae) cultivés issus de graines d'origine méditerranéenne*. Thèse pour le diplôme de docteur d'université (chimie organique) Ecole Doctorale des Sciences Fondamentales, Université Blaise Pascal - Clermont- Ferrand II. 427p (2007).

Filippi J.J, Belhassen E, Baldovini N, Brevard H, Meierhenrich U.J. *Qualitative and quantitative analysis of vetiver essential oils by comprehensive two-dimensional gas chromatography and comprehensive two-dimensional gas chromatography/mass spectrometry*. Journal of Chromatography 1288: 127–148 (2013).

Foko Dadji G.A, Bobo Ngowe M.P, Nyegue M.A and Tamesse J.L. *Chemical composition and biocide properties of Clausena anisata (Rutacea) essential oil against the development stages of the malaria vector Anopheles coluzzii*. American Journal of Essential oils and Natural Products. 6(1): 9-15 (2018).

Foko Dadji G.A, Tamesse J.L, Fekem Boyom F. *Adulticidal effect of essential extracts from Capsicum annum (Solanaceae) Piper nigrum (Piperaceae) and Zingiber officinale (Zingiberaceae) on Anopheles gambiae (Diptera-Culicidae) vector of malaria*. Journal of Entomology. 8(2). 152- 163 (2007).

Fonseca DM, Smith JL, Kim HC & Mogi M. *Population genetics of the mosquito Culex pipiens pallens reveals sex-linked asymmetric introgression by Culex quinquefasciatus*. Infection, Genetics and Evolution, 9(6), 1197-1203 (2009).

Fonseca DM, Smith JL, Wilkerson RC & Fleischer RC *Pathways of expansion and multiple introductions illustrated by large genetic differentiation among worldwide populations of the southern house mosquito*. The American journal of tropical medicine and hygiene, 74(2), 284-289. (2006).

Fontenille D. *Écosystèmes, entomologie et lutte anti- vectorielle. Responsabilité Environnement*. 51:55-63 (2008).

Fournet F, Jourdain F, Bonnet E, Degroote S and Ridde V. *Effective surveillance systems for vectorborne diseases in urban settings and translation of the data into action: a scoping review*. Infectious Diseases of Poverty. 7:99-113 (2018).

Franz C., Novak J. *Sources of essential oils*. In: Baser, K.H.C., Buchbauer G. (Eds.), *Handbook of Essential Oils. Science, Technology and Applications*. CRC Press, Boca Raton. 39–82 (2010).

Galve-Roperh I, Sanchez C, Cortés M.L, Gomez Del PulgarT, Izquierdo M and Guzman M. *Anti-tumoral action of cannabinoids: involvement of sustained ceramide-accumulation and extracellular signal-regulated kinase activation*. Natural Medecine. 6: 313-331 (2000).

Garneau F.X. *Huiles essentielles: de la plante à la commercialisation - Manuel pratique*. Corporation Laseve, Université du Québec à Chicoutimi. 185p (2005).

Gaspar F., Leeke G. *Comparison Between Compressed CO₂ Extracts and Hydrodistilled Essential Oil*. Journal of essential oil research. 16:64-68 (2004).

Gavahian M, Farahnaky A, Javidnia K, Majzoobi M. *Comparison of ohmic-assisted hydrodistillation with traditional hydrodistillation for the extraction of essential oils from Thymus vulgaris L*. Innovative food science and emerging technologies. 14: 85-9 (2012).

Giles M.T and Coetzee M. *A supplement to the Anophelinae of Africa South of the Sahara*. South African Institute for Medical Research. 55:1-146 (1987).

Gillies M.I., De Meillon B. *The anophelinae of Africa south of the Sahara (Ethiopian Zoogeographical Region)*. South African Institute for Research. 54, (2): 25-34 (1968).

Gillott C. *Entomology*. 3 rd. ed. Netherlands. 243-264 (2005).

Gnankiné O, Bassolé I.H.N. *Essential Oils as an Alternative to Pyrethroids' Resistance against Anopheles Species Complex Giles (Diptera: Culicidae)*. Molecules. 1-23 (2017).

Gnankiné O, Bassolé I.H.N, Chandre F, Glitho I, Akogbeto M, Dabiré R.K, Martin T. *Insecticide resistance in Bemisia tabaci Gennadius (Homoptera: Aleyrodidae) and Anopheles gambiae Giles (Diptera: Culicidae) could compromise the sustainability of malaria vector control strategies in West Africa.* Acta Tropica. 128(1):7-17 (2013).

Golmakani M.T., Rezaei K. *Comparison of microwave-assisted hydrodistillation with the traditional hydrodistillation method in the extraction of essential oils from Thymus vulgaris L.* Food chemistry. 109: 925–930 (2008).

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. 134:7-11 (2003).

Grasse P.P. *Zoologie I : Les invertébrés.* Masson et Cie. Paris. 919p (1961).

Grasse P.P. *Anatomie-Systématique-Biologie des insectes supérieurs et Hémiptéroïdes.* Tome X. Masson. 755p (1979).

Green J.M. Herbicide adjuvants. In: *UC Davis WRIC Weed Science School, September 26-28, 2001*, Woodland, and CA.1-2 (.2001).

Gross A.D, Norris E.J, Kimber M.J, Bartholomay L.C and Coast J.R. *Essential oils enhance the toxicity of permethrin against Aedes aegypti and Anopheles gambiae.* Medical and Veterinary Entomology. 31:55–62 (2017).

Grotenhermen F. *Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cannabinoids.* Clinical Pharmacokinetics. 42: 327-60 (2003).

Hagenbach U, Ghafoor N, Brenneisen R, Luz S and Mader M. *The treatment of spasticity with delta-9-tetrahydrocannabinol in patients with spinal cord injury.* International Spinal Cord Society. 45: 551–56 (2006).

Hagenbach U, Ghafoor N, Brenneisen R, Luz S and Mader M. *Clinical investigation of delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) as an alternative therapy for overactive bladders in spinal cord injury (SCI) patients?* Congress on Cannabis and the Cannabinoids, Cologne, Germany: International Association for Cannabis as Medicine. 45p (2010).

Hall W, Solowij N and Lemon L. *The health and psychological consequences of cannabis use. Monograph series.* Department of human services and health, Australia, 153 p (1994).

Hamza1 A and Hamza A. *Toxicity and combined action of some insecticides and clove oil against Rhyzopertha dominica in wheat grain*. Journal of Plant Protection Research. 58(2):192–201 (2018).

Hancock P.A, Wiebe A , Gleave K.A , Bhatt S , Cameron E , Trett A , Weetmanb D , Smith D.L , Hemingway J, Coleman M , Gethinga P.W , and Moyes C.L. *Associated patterns of insecticide resistance in field populations of malaria vectors across Africa*. PNAS. 115(23): 5938–5943 (2018).

Handa S.S., Khanuja S.P.S., Longo G., Rakesh D.D. *Extraction technologies for aromatic and medicinal plants*. United Nations Industrial Development Organization and the International Centre for Science and High Technology. 260p (2008).

Harbach RE, Dahl C & White GB. (1985). *Culex (Culex) pipiens Linnaeus (Diptera, Culicidae) : concepts, type designations, and description*. Proceedings of the Entomological Society of Washington, 87, 1-24. (1985)

Harris, B. *Phytotherapeutic uses of essential oils*. In: Baser K.H.C., Buchbauer G. (Eds.), *Handbook of Essential Oils. Science, Technology and Applications*. CRC Press, Boca Raton. 315–352 (2010).

Hawley W.A. *The biology of Aedes albopictus*. Journal of the American Mosquito Control Association. 40p (1998).

Hemingway J, Hawkes N.J, McCarrolln L, Ranson H. *The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes*. Insect Biochemistry and Molecular Biology. 34: 653–665 (2004).

Herzi N., Bouajila J., Camy S., Cazaux S., Romdhane M., Condoret J.S. *Comparison between supercritical CO₂ extraction and hydrodistillation for two species of eucalyptus: yield, chemical composition, and antioxidant activity*. Journal of Food Science. 78(5): 667–672 (2013).

Hess F.D. and Foy C.L *Interaction of surfactants with plant cuticles*. Weed Technology 14:807-813 (2000).

Hinton H.E. *Structure and protective device of the egg of mosquito Culex pipiens*. Journal of insect physiology 14:145-161(1967).

Holstein M. *Guide pratique de L'Anophelisme en A.O.F éd. gouvernement général de l'Afrique Occidentale Française, Direction générale de la santé publique. Dakar-Sénégal.* 55p (1959).

Hoskin R.D and Zajicek J.P. *Therapeutic potential of cannabis in pain medicine.* Oxford Journals. 101: 59-68(2008).

Huang Y, Guo Q, Sun X, Zhang C, Xu N, Xu Y, Zhou D, Sun Y, Ma L, Zhu C and Shen B. *Culex pipiens pallens cuticular protein CPLCG5 participates in pyrethroid resistance by forming a rigid matrix.* Parasites and Vectors. 11:6-16 (2018).

Hull, H.M., Davis, D.G. and G.E. Stolzenberg. *Action of adjuvants on plant surfaces.* In: Adjuvants for Herbicides, WSSA, Champaign, IL. 26-67(1982).

Hyldgaard M, Mygind T, Meyer R.L *Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components.* Frontiers in Microbiology. 3(12):1-24(2012).

Ibrahim S.S, Riveron J.M, Stott R, Irving H, Wondji C.S. *The cytochrome P450 CYP6P4 is responsible for the high pyrethroid resistance in knockdown resistance-free Anopheles arabiensis.* Insect Biochemistry and Molecular Biology. 68: 23-32 (2016).

Imwong M, Madmanee W, Suwannasin K, Kunasol C, Peto T.J, Tripura R, Seidlein L, Nguon C, Davoeung C, Day N.P.J, Dondorp A.M and White N.J. *Asymptomatic Natural Human Infections with the Simian Malaria Parasites Plasmodium cynomolgi and Plasmodium knowlesi.* Journal of Infectious Diseases. 219(5): 695–702 (2019).

Ingabire C.M, Rulisa A, Kempen L.V , Muvunyi C , Koenraadt C.J.M , Van Vugt M , Mutesa L, Van Den Borne B and Alaii J. *Factors impeding the acceptability and use of malaria preventive measures: implications for malaria elimination in eastern Rwanda.* Malaria Journal. 14:136-147 (2015).

Ingham V.A, Wagstaff S and Ranson H. *Transcriptomic meta-signatures identified in Anopheles gambiae populations reveal previously undetected insecticide resistance mechanisms.* Nature Communications. 9: 1-11 (2018).

International Organization for Standardization (ISO). *Aromatic natural raw materials - Vocabulary.* ISO 9235:2013. Published 09-10. 5p (2014).

IRAC *Prévention et gestion de la résistance aux insecticides: vecteurs, jouant un rôle dans la santé publique*. 32p (2011).

IRAC. Insecticides classification schema. 138p. (2014).

Iwamoto L.H, Vendramini-Costa D.B, Monteiro P.A, Tasca Gois Ruiz A.L, de Oliveira Sousa I.M, Foglio M.A, de Carvalho J.E and Ferreira Rodrigues R.A. *Anticancer and Anti-Inflammatory Activities of a Standardized Dichloromethane Extract from Piper umbellatum L. Leaves*. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 1-8 (2015).

Jacobsson S.O, Wallin T and Fowler C.J. *Inhibition of rat C6 glioma cell proliferation by endogenous and synthetic cannabinoids. Relative involvement of cannabinoid and vanilloid receptors*. Journal of Pharmacology, Experimental. Therapy. 299: 951-959 (2001).

Janko M.M, Irish S.R, Reich B.J, Peterson M, Doctor S.M, Kashamuka Mwandagalirwa M, Likwela J.L, Tshefu A.K, Meshnick S.R, Emch M.E. *The links between agriculture, Anopheles mosquitoes, and malaria risk in children younger than 5 years in the Democratic Republic of the Congo: a population-based, cross-sectional, spatial study*. Lancet Planet Health. 2:74–82 (2018).

Joan H; Bryan B.A. *Southgate. Factors affecting transmission of Wuchereria bancrofti by anopheline mosquitoes. 2. Damage to ingested microfilariae by mosquito foregut armatures and development of filarial larvae in mosquitoes*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 82(1):138–145 (1988).

Joffe T, Gunning R.V, Allen G.R, Kristensen M, Alptekin S, Field L.M and Moores G.D. *Investigating the potential of selected natural compounds to increase the potency of pyrethrum against houseflies Musca domestica (Diptera: Muscidae)*. Pest Management Science. 68:178-184 (2012).

Jones J, Ngasala B, Derua Y.A, Tarimo D, Reimer L, Bockarie M and Melacela M.N. *Lymphatic filariasis transmission in Rufiji District, southeastern Tanzania: infection status of the human population and mosquito vectors after twelve rounds of mass drug administration*. Parasites and Vectors. 11:588-596 (2018).

Jonesa C.M, Liyanapathiranaa M, Agossab F.R, Weetmana D, Ransona H , Donnellya M.J , and Wilding G.R. *Footprints of positive selection associated with a mutation (N1575Y) in the voltage-gated sodium channel of Anopheles gambiae*. PNAS. 109 (17): 6614–6619 (2012).

Karlsen J. *Encapsulation and other programmed release techniques for essential oils and volatile terpenes*. In: Baser, K.H.C., Buchbauer, G. (Eds.), *Handbook of Essential Oils. Science, Technology and Applications*. CRC Press, Boca Raton, 855–862 (2010).

Kasai S, Komagata O, Tomita T, Sawabe K, Tsuda Y, Kurahashi H, Ishikawa T, Motoki M, Takahashi T, Tanikawa T, Yoshida M, Shinjo G, Hashimoto T, Higa Y & Kobayashi M. . *PCR-based identification of Culex pipiens complex collected in Japan*. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 61, 184-191(2008).

Kendall D.A and Yudowski G.A. *Cannabinoid Receptors in the Central Nervous System: Their Signaling and Roles in Disease*. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 10(294):1-10 (2017).

Kettenring, M.M., Geeganage, M.V. *Aroma-vital cuisine*. In: Baser, K.H.C., Buchbauer, G. (Eds.), *Handbook of Essential Oils. Science, Technology and Applications*. CRC Press, Boca Raton, 863–880 (2010).

Kim S.W, Kang J, Park I.I.K. *Fumigant toxicity of Apiaceae essential oils and their constituents against Sitophilus oryzae and their acetylcholinesterase inhibitory activity*. *Journal of Asia-Pacific Entomology*. 16:443- 448 (2013).

Kisiza W.N, Nkya T.E, Kabula B, Overgaard H.J, Massue D.J, Mageni Z , Greer G , Kaspar N , Mohamed M , Reithinger R, Moore S, Lorenz L.M and Magesa S. *Multiple insecticide resistance in Anopheles gambiae from Tanzania: a major concern for malaria vector control*. *Malaria Journal*. 16:439-449 (2017).

Kosar M., Ozek T., Kurkcuoglu M., Baser K.H.C. *Comparison of Microwave-Assisted hydrodistillation and hydrodistillation methods for the fruit essential oils on Foeniculum vulgare*. *Journal of essential oil research*. 19: 426-429 (2007).

Kpoviessi S, Bero J, Agbani P, Gbaguidi F, Kpadonou- Kpoviessi B, Sinsin B, Accrombessi G, Trédérich M, Moudachirou M, Quetin-Leclercq. *Chemical composition, cytotoxicity and in vitro antitrypanosomal and antiplasmodial activity of essential oils from Cymbopogon species from Benin*. *Journal Ethnopharmacology*. 151(1): 652-659 (2013).

Kuorwel, K.K., Cran, M.J., Sonneveld, K., Miltz, J., Bigger, S.W. *Essential oils and their principal constituents as antimicrobial agents for synthetic packaging films*. *Journal of Food Science*. 76: 164–177 (2011).

Kweka EJ, Lima T.C, Marciale C.M, Pergentino de Sousa D. *Larvicidal efficacy of monoterpenes against the larvae of Anopheles gambiae*. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedecine. 6(4):290-294 (2016).

Lang G, Buchbauer G. *A review on recent research results (2008–2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review*. Flavour and Fragrance Journal. 27: 13-39 (2012).

Lawrence B.M. *Essential oils*. Allured Pub Corp. 9(9). 284p (2012).

Lee H.S. *Mosquito larvicidal activity of aromatic medicinal Plant oils against Aedes aegypti and Culex pipiens pallens*. Journal of the American Mosquito Control Association. 22(2):292–295 (2006).

Letouzey R. *Notice de la carte phytogéographique du Cameroun au 1/500 000*. Institut de la carte internationale de la végétation. 3-4 : 79 (1985).

Li X, Schuler M, Berenbaum M. *Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics*. Annual Review of Entomology. 52:231-253 (2007).

Lis-Balchin M. *Aromatherapy with essential oils*. In: Baser, K.H.C., Buchbauer, G. (Eds.), *Handbook of Essential Oils. Science, Technology and Applications*. CRC Press, Boca Raton. 549–584 (2010).

Liu X.C, Liu Q.Y, Zhou L, Liu Z.L. *Larvicidal Activity of Essential Oil Derived from Illicium henryi Diels (Illiciaceae) Leaf*. Tropical Journal of Pharmaceutical Research. 14(1):111-116 (2015).

Livak K.J. *Organization and mapping of sequence of Drosophila melanogaster X-chromosome and Y- chromosome that is transcribed during spermatogenesis*. Genetics. 107:611-634 (1984).

Lopez-Reyes, J.G., Spadaro, D., Prella, A., Garibaldi, A., Gullino, M.L. *Efficacy of plant essential oils on postharvest control of rots caused by fungi on different stone fruits in vivo*. Journal of Food Protection. 76: 631–639 (2013).

Lucchesi M.E. *Extraction sans solvant assistée par les micro-ondes*. Thèse pour le diplôme de docteur en sciences (chimie). Université de la Réunion Faculté des Sciences et Technologies. 147p (2005).

Lucchesi M.E., Chemat F., Smadja J. *Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation*. Journal of chromatography A, 1043: 323-327 (2004).

Lucia A, Audino P, Seccacini E, Licastro S, Zebra E, and Masuh E. *Larvicidal effect of Eucalyptus grandis essential oil and turpentine and their major components on Aedes aegypti larvae*. Journal of American Mosquito Control Association. 23(3):299-303 (2007).

Lynd A , Oruni A , van't Hof A.E , Morgan J.C , Naego L.B , Pipini D , O'Kines K.A , Bobanga T.L , Donnelly M.J and Weetman D. *Insecticide resistance in Anopheles gambiae from the northern Democratic Republic of Congo, with extreme knockdown resistance (kdr) mutation frequencies revealed by a new diagnostic assay*. Malaria Journal. 17:412-420 (2018).

Manimaran A, Mary Jee Jee Cruz M, Muthu C, Vincent S, Ignacimuthu S. *Larvicidal and knockdown effects of some essential oils against Culex quinquefasciatus Say, Aedes aegypti (L.) and Anopheles stephensi (Liston)*. Advances in Bioscience and Biotechnology. 3: 855-862 (2012).

Manzanares J, Julian M.D and Carrascosa A. *Role of the Cannabinoid System in Pain Control and Therapeutic Implications for the Management of Acute and Chronic Pain Episodes*. Current Neuropharmacology. 4: 239–296 (2006).

Marcombe S, Poupardin R, Darriet F, Reynaud S, Bonnet J, Strode C, Brengues C, Yébakima A, Ranson H, Corbel V and David J.P. *Exploring the molecular basis of insecticide resistance in the dengue vector Aedes aegypti: a case study in Martinique Island (French West Indies)*. BMC Genomics. 10:494-508 (2009).

Mastrantonio V, Crasta G, Puggioli A, Bellini R, Urbanelli S and Porretta D. *Cannibalism in temporary waters: Simulations and laboratory experiments revealed the role of spatial shape in the mosquito Aedes albopictus*. PLoS ONE. 13(5):1-12 (2018).

Matasyoh J.C, Wathuta E.M, Kariuki S.T, Chepkorir R. *Chemical composition and larvicidal activity of Piper capense essential oil against the malaria vector, Anopheles gambiae*. Journal of Asia-Pacific Entomology. 14: 26–28 (2011).

Mbida Mbida A, Etang J, Akono-Ntonga P, Talipouo A, Awono-Ambene P, Oke-Agbo F, Eboumbou C, Akogbéto M, Ossé R, Lehman G, Ekoko W, Binyang J, Tagne D, Tchoffo R,

Dongmo A & Mimpfoundi R. *Preliminary investigation on aggressive culicidae fauna and malaria transmission in two wetlands of the Wouri river estuary, Littoral-Cameroon.*

Journal of Entomology and Zoology Studies, 4, 105-110 (2016)

Mechoulam R, Parker L.A and Gallil Y.R. *Cannabidiol: an overview of some pharmacological aspects by. Department of Medicinal Chemistry and Natural Products, Hebrew University of Jerusalem, Israel.* Journal of Clinical Pharmacology. 42:11-19 (2002).

Menze B.D, Riveron J.M, Ibrahim S.S, Irving H, Antonio-Nkondjio C, Awono-Ambene P.H and Wondji C.S. *Multiple Insecticide Resistance in the Malaria Vector Anopheles funestus from Northern Cameroon Is Mediated by Metabolic Resistance Alongside Potential Target Site Insensitivity Mutations.* PLoS ONE. 11(10): 1-14 (2016).

Milton N.G. *Anandamide and noladin ether prevent neurotoxicity of the human amyloid-beta peptide.* Neuroscience Letter. 332: 127-157 (2002).

Mitchell C.J, Tyler A, Churchward-Venne, West D.W.D, Burd N.A, Breen L, Baker S.K and Phillips S.M. *Resistance exercise load does not determine training-mediated hypertrophic gains in young men.* Journal of Applied Physiology. 114 (1): 81-89 (2012).

Moirangthem B.D, Noren Singh S and Singh D.C. *Lutzia tigripes (Diptera: Culicidae, Metalutzia) for the mosquito larval control: A new prospect of mosquito control.* International Journal of Mosquito Research. 5(6):1-4 (2018).

Moiroux N, Gomez M.B, Pennetier C, Elanga E, Djèfontin A, Chandre F, Djègbé I, Guis H and Corbel V. *Changes in Anopheles funestus Biting Behavior Following Universal Coverage of Long-Lasting Insecticidal Nets in Benin.* Journal of Infectious Diseases.15:1-8 (2012).

Mouchet J, Carnevalet P. *Moyens de lutte et stratégie.* Paludisme, éd. Danis, Ellipse / UREF.35-58 (1991).

Muller P, Chouaibou M, Pignatelli P, Etang J, Walker E.D, Donnelly M.J, Simard F, Ranson H. *Pyrethroid tolerance is associated with elevated expression of antioxidants and agricultural practice in Anopheles arabiensis sampled from an area of cotton fields in Northern Cameroon.* Molecular Ecology. 17(4): 1145-1155 (2007).

Mulyaningsih S, Sporera F, Zimmermann S, Reichling J, Wink M. *Synergistic properties of the terpenoids aromadendrene and 1,8-cineole from the essential oil of Eucalyptus globulus*

against antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant pathogens. *Phytomedicine*. 17:1061-1066 (2010).

Nannan N, Timaeus I.M, Laubscher R, Bradshaw D. *Levels and differentials in childhood mortality in South Africa, 1977-1998*. *Journal of biosocial science*. 39 (4):613-632 (2007).

Nathan S.S. *The use of Eucalyptus tereticornis Sm. (Myrtaceae) oil (leaf extract) as a natural larvicidal agent against the malaria vector Anopheles stephensi Liston (Diptera: Culicidae)*. *Bioresource Technology*. 98:1856–1860 (2007).

Nchoutpouen E, Talipouo A, Djiappi-Tchamen B, Djamouko- Djonkam L, Kopya E, Ngadjieu C.S, Doumbe-Belisse P, Awono-Ambene P, Kekeunou S, Wondji C.S, Antonio-Nkondjio C. *Culex species diversity, susceptibility to insecticides and role as potential vector of Lymphatic filariasis in the city of Yaounde, Cameroon*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 13(4):1-16 (2019).

Ndo C, Kopya E, Donbou M.A, Njiokou F, Awono- Ambene P, Wondji C. *Elevated Plasmodium infection rates and high pyrethroid resistance in major malaria vectors in a forested area of Cameroon highlight challenges of malaria control*. *Parasites and Vectors*. 11:157-164 (2018)

Nkouandou P.M, Akono Ntonga P, Awansi Djeukam C, Jazet Dongmo P.M, Menut C. *Evaluation des propriétés insecticides des huiles essentielles de quelques Zingiberaceae contre les larves d'Anopheles gambiae s. l. collectées à Ayos (sud-Cameroun)*. *Journal of Animal and Plant Sciences*. 43 (3): 7469-7482 (2020).

Nkya T.E, Akhouayri I, Kisinza W, David J.P. *Impact of environment on mosquito response to pyrethroid insecticides: Facts, evidences and prospects*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 43:407-416 (2013).

Nkya T.E, Poupardin R, Laporte F, Akhouayri I, Mosha F, Magesa S, Kisinza W and David J.P. *Impact of agriculture on the selection of insecticide resistance in the malaria vector Anopheles gambiae: a multigenerational study in controlled conditions*. *Parasites and Vectors*. 7:480-492 (2014).

Ntonga P.A, Baldovini N, Mouray E, Mambu L, Belong P, Grellier P. *Activity of Ocimum basilicum, Ocimum canum and Cymbopogon citratus essential oils against Plasmodium falciparum and mature-stage larvae of Anopheles funestus s.s*. *Parasite*. 21(33):1-8 (2014).

Núñez V, Castro V, Murillo R, Ponce-Soto LA, Merfort I, Lomonte B. *Inhibitory effects of Piper umbellatum and Piper peltatum extracts towards myotoxic phospholipases A2 from Bothrops snake venoms: Isolation of 4-nerolidylcatechol as active principle*. Journal of Phytochemistry. 66(9):1017-1025 (2005).

Nwane P, Etang J, Chouaïbou M, Toto J.C, Koffi A, Mimpfoundi R. *Multiple insecticide resistance mechanisms in Anopheles gambiae s.l populations from Cameroon, Central Africa*. Parasites and Vectors. 6:41-55 (2013).

Okia M, Ndyomugenyi R, Kirunda J, Byaruhanga A, Adibaku S, Lwamafa D.K and Kironde F. *Bioefficacy of long-lasting insecticidal nets against pyrethroid-resistant populations of Anopheles gambiae s.s from different malaria transmission zones in Uganda*. Parasites and Vectors. 6:130-140 (2013).

Oladejo O, Tona G.O, Oshiname F.O, Titiloye M.A. *Malaria knowledge and agricultural practices that promote mosquito breeding in two rural farming communities in Oyo State, Nigeria*. Malaria Journal. 9:91 (2010).

OMS : Organisation Mondiale de la Santé. *La lutte anti-vectorielle ; Stratégies recommandées contre les maladies transmissibles*. 39-42 (2006).

OMS : Organisation Mondiale de la Santé. *Rapport sur le Paludisme*. 24-29 (2023).

Pakpour N, Wai Cheung K and Luckhart S. *Enhanced transmission of malaria parasites to mosquitoes in a murine model of type 2 diabetes*. Malaria Journal. 15:231-235 (2016).

Parr J.F. *Toxicology of adjuvants*. In: *Adjuvants for Herbicides*, WSSA, Champaign, and IL 93-114 (1982).

Pavela R, KAFFKOVÁ K and KUMŠTA M. *Chemical Composition and Larvicidal Activity of Essential Oils from Different Mentha L. and Pulegium Species against Culex quinquefasciatus Say (Diptera: Culicidae)*. Plant Protection Science. 50(1):36-42 (2014).

Pavela R. *Essential oils for the development of eco- friendly mosquito larvicides*. Industrial Crops and products. 76:174-187 (2015).

Pellati, F., Orlandini, G., van Leeuwen, K.A., Anesin, G., Bertelli, D., Paolini, M., Benvenuti, S., Camin, F. *Gas chromatography combined with mass spectrometry, flame ionization detection and elemental analyzer/isotope ratio mass spectrometry for characterizing and*

detecting the authenticity of commercial essential oils of Rosa damascena Mill. Rapid Commun. Mass Spectrom. 27: 591–602 (2013).

Penner D. *Introductory statement on adjuvants*. In: Young, B. *Compendium of Herbicide Adjuvants*, 5th edition. Southern Illinois University, Carbondale.14:785-791 (2000).

Pennetier C, Costantini C, Corbel V, Licciardi S, Dabiré R.K, Lapied B, Chandre F and Hougard J.M. *Mixture for Controlling Insecticide Resistant Malaria Vectors*. Emerging Infectious Diseases. 14 (11):1707-1714 (2008).

Périno-Issartier S., Ginies C., Cravotto G., Chemata F. *A comparison of essential oils obtained from lavandin via different extraction processes: Ultrasound, microwave, turbohydrodistillation, steam and hydrodistillation*. Journal of chromatography A, 1305: 41-47 (2013).

Perumalsamy H, Kim N.J, Ahn Y.I. *Larvicidal Activity of Compounds Isolated from Asarum heterotropoides Against Culex pipiens pallens, Aedes aegypti, and Ochlerotatus togoi (Diptera: Culicidae)*. Journal of Medical Entomology. 46(6):1420-1423 (2009).

Peter G.J. *Mosquitoes of Southern Africa: Culicinae and Toxorhynchitinae*. Ekogilde Publishers, Hartebeespoort, Republic of South Africa, 155p (1996).

Pi-Bansa S, Osei J.H.N, Kartey-Attipoe W.D, Elhassan E, Agyemang D, Otoo S, Dadzie S.K, Appawu M.A, Wilson M.D, Koudou B.J, de Souza D.K, Utzinger J and Boakye D.A. *Assessing the Presence of Wuchereria bancrofti Infections in Vectors Using Xenomonitoring in Lymphatic Filariasis Endemic Districts in Ghana*. Tropical Medecine and Infectious Diseases. 4(49):1-13 (2019).

Pimnon S and Bhumiratana A. *Adaptation of Anopheles Vectors to Anthropogenic Malaria-Associated Rubber Plantations and Indoor Residual Spraying: Establishing Population Dynamics and Insecticide Susceptibility*. Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology. 2018:1-17 (2018).

Piochon M. *Étude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore laurentienne : composition chimique, activités pharmacologiques et hémi-synthèse*. Mémoire pour la maîtrise en ressources renouvelables. Université du Québec à Chicouti. 213p (2008).

Pratti D.L.A, Ramos A.C, Scherer R, Cruz Z.M.A, Silva A.G. *Mechanistic basis for morphological damage induced by essential oil from Brazilian pepper tree, Schinus*

terebenthifolia, on larvae of *Stegomyia aegypti*, the dengue vector. *Parasites and Vectors*. 8:136-1346 (2015).

Price D.P, Schilkey F.D, Ulanov A, Hansen I.A. *Small mosquitoes, large implications: crowding and starvation affects gene expression and nutrient accumulation in Aedes aegypti*. *Parasites and Vectors*. 8:252-266 (2015).

Pringnitz B. *Clearing up confusion on adjuvants and additives*. Iowa State University Extension Agronomy. 25p (1998).

Programme National de Lutte contre le Paludisme. Rapport Annuel, 52p (2016).

Programme National de Lutte contre le Paludisme. Rapport d'activité 193p (2021).

Pruck-Ngern M, Pattaradilokrat S, Chumpolbanchorn K, Pimnon S, Narkpinit S, Harnyuttanakorn P, Buddhirakkaul P, Saiwichai T. *Effects of artesunate treatment on Plasmodium gallinaceum transmission in the vectors Aedes aegypti and Culex quinquefasciatus*. *Veterinary Parasitology*. 207:161-165 (2015).

Qi Zhang, Gang Hua, Adang M. *Effects and Mechanisms of Bacillus Thuringiensis Crystal Toxins for Mosquito Larvae*. *Insect Science*. 24 (5):714-729 (2017).

Ramar M, Ignacimuthu S and Gabriel Paulraj M. *Mosquito knock-down and adulticidal activities of essential oils by vaporizer, impregnated filter paper and aerosol methods*. *International Journal of Mosquito Research*. 1 (3): 26-32 (2014).

Ranson H, N'Guessan R, Lines J, Moiroux N, and Nkuni Z, Corbel V. *Pyrethroid resistance in African anopheline mosquitoes: what are the implications for malaria control?* *Trends in Parasitology*. 27(2):1-8 (2011).

Rasli R, Lee H.L, Ahmad N.W, Farahininajua Fikri S.F, Ali R, Muhamed K.A, Hadi A.A, Qi-yong Liu and Xia Meng F. *Susceptibility Status and Resistance Mechanisms in Permethrin-Selected, Laboratory Susceptible and Field-Collected Aedes aegypti from Malaysia*. *Insects*. 9 (43):1-17 (2018).

Regnault-Roger C, Vincent C and Arnason J.T. *Essential Oils in Insect Control: Low-Risk Products in a High-Stakes World*. *Annual Review Entomology*. 57: 405-424 (2012).

Reisen W.K, Fang Y, and Martinez V. *Is Nonviremic Transmission of West Nile Virus by Culex Mosquitoes (Diptera: Culicidae) Nonviremic?* Journal of Medical Entomology. 44(2):299-302 (2007).

Reuben R, Tewari S.C, Hiriyan J, Akiyama J. *Illustrated Keys to species Culex (Culex) associated with Japanese encephalitis in Southeast Asia (Diptera: Culicidae).* Mosquitoes Systematic. 26(2):75-96 (1994).

Richard D., Senon J.L. *Que sais-je? Le Cannabis.* Ed. Presses universitaires de France, Paris. 128p (2010).

Riveron J.M, Chiumia M, Menze B.D, Barnes K.G, Irving H, Ibrahim S.S, Weedall G.D, Mzilahowa T, Wondji C.S. *Rise of multiple insecticide resistance in Anopheles funestus in Malawi: A major concern for malaria vector control.* Malaria Journal. 14:344-353 (2015).

Robert V, Macintyre K, Keating J, Trape J.F, Duchemin J.B, McWilson W and Beier J.C. *Malaria Transmission In urban Sub-Saharan Africa. The American Society of Tropical Medicine and Hygiene.* 68:69-176 (2003).

Robin Deschepper. *Variabilite de la composition des huiles essentielles et intérêt de la notion de chémotype en Aromathérapie.* 39p (2017).

Rodhain F, Perez. *Précis d'entomologie médicale et vétérinaire.* Ed. Maloine Paris : 158p (1985).

Rodriguez Flores C, Pennec A, Nugier-Chauvin C, Daniellou R, Herrera-Estrella L and Chauvina A.L. *Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oils Extracted from Plants Cultivated in Mexico.* Journal of the Mexican Chemical Society. 58(4): 452-455 (2014).

Roersch C.M.F.B. *Piper umbellatum L.: A comparative cross-cultural analysis of its medicinal uses and an ethnopharmacological evaluation.* Journal of Ethnopharmacology. 131, 522–537 (2010).

Saavedra M.P , Conn J.E, Alava F , Carrasco-Escobar G , Prussing C , Bickersmith S A , Sangama JL , Fernandez-Miño C , Guzman M , Tong C , Valderrama C , Vinetz JM, Gamboa D and Moreno M. *Higher risk of malaria transmission outdoors than indoors by Nyssorhynchus darlingi in riverine communities in the Peruvian Amazon.* Parasites and vectors. 12:374-389 (2019).

Salehi B, Zakaria Z.A, Gyawali R, Ibrahim S.A, Rajkovic J, Shinwari Z.K, Khan T, Sharifi-Rad J, Ozleyen A, Turkdonmez E, Valussi M, Tumer T.B, Fidalgo L.M, Martorell M and Setze W.N. *Piper Species: A Comprehensive Review on Their Phytochemistry, Biological Activities and Applications*. Molecules. 24:1364-1482 (2019).

Samuel M, Oliver S.V, Coetzee M, Brooke B.D. *The larvicidal effects of black pepper (Piper nigrum L.) and piperine against insecticide resistant and susceptible strains of Anopheles malaria vector mosquitoes*. Parasites and Vectors. 9:238-247 (2016).

Sarma R, Adhikari K, Mahanta S and Khanikor B. *Combinations of Plant Essential Oil Based Terpene Compounds as Larvicidal and Adulticidal Agent against Aedes aegypti (Diptera: Culicidae)*. Scientific Reports. 9:1-12 (2019).

Sangba Olé M.L, Deketramete T, Wango S.P, Kazanji M, Akogbeto M and Ndiath M.O. *Insecticide resistance status of the Anopheles funestus population in Central African Republic: a challenge in the war*. Parasites and Vectors. 9:230-238 (2016).

Santalamazza F, Mancini E, Simard F, Qi Y, Tu Z, Della Torre A. *Insertion polymorphism of SINE200 retrotransposons within speciation island of Anopheles gambiae molecular forms*. Malaria Journal. 7:163-173 (2008).

Schoener E.R, Harl J, Himmel T, Fragner K, Weissenböck H, Fuehrer H.P. *Protozoan parasites in Culex pipiens mosquitoes in Vienna*. Parasitology Research. 118:1261–1269 (2019).

Sehgal B, Subramanyam B, Arthur F. H, and Gill B. S. *Variation in susceptibility of laboratory and field strains of three stored-grain insect species to β -cyfluthrin and chlorpyrifos-methyl plus deltamethrin applied to concrete surfaces*. Pest Management Science. 70(4):576-587 (2014).

Sell C. *Chemistry of essential oils*. In: Baser, K.H.C., Buchbauer, G. (Eds.), *Handbook of Essential Oils. Science, Technology and Applications*. CRC Press, Boca Raton. 121–150 (2010).

Service M.W. *Studies on Sampling Larval population of the Anopheles gambiae*. Bulletin: Organisation Mondiale de la Santé. 169-180 (1971).

Setzer W.N, Setzer M.C, Bates R.B, Nakkiew P, Jackes B.R, Chen L, McFerrin M.B, Meehan E.J. *Antibacterial hydroxycinnamic esters from Piper caninum from Paluma, North*

Queensland, Australia. *The crystal and molecular structure of (+)-bornyl coumarate*. *Planta Medecine*. 65: 747–749 (1999).

Shaikevich EV. *PCR-RFLP of the COI gene reliably differentiates Cx. pipiens, Cx. pipiens f. molestus and Cx. torrentium of the Pipiens Complex*. *European Mosquito Bulletin*, 23, 25-30 (2007).

Sherrard-Smith E, Skarpa J.E , Beale A.D, Fornadel C , Norris L.C , Moore S.G, Mihreteab S , Charlwood J.D , Bhatta S , Winskill P , Griffina J.T, and Church T. *Mosquito feeding behavior and how it influences residual malaria transmission across Africa*. *PNAS*.116 (30): 15086–15095 (2019).

Shimod K.P, Vineethkumar V, Prasad Y.K and Jayapal G. *Effect of urbanization on heavy metal contamination: a study on major townships of Kannur District in Kerala, India*. *Bulletin of the National Research Centre*. 4(46):1-14 (2022).

Sinka M. E., Bangs M. J., Manguin S., Rubio-Palis Y., Chareonviriyaphap T., Coetzee M., Mbogo C. M., Hemingway J., Patil A. P., Temperley W. H., Gething P. W., Kabaria C. W., Burkot T. R., Harbach R. E., Hay S. I. *A global map of dominant malaria vectors*. *Parasit Vectors*. 5: 69-79 (2012).

Skaper S.D and Di Marzo V. *Endocannabinoids in nervous system health and Disease: the big picture in a nutshell*. *Philosophical Transactions of Royal Society B*. 367: 3193–3200 (2012).

Smartt C.T, Shin D, Kang S, Tabachnick W.J. *Culex quinquefasciatus (Diptera: Culicidae) From Florida Transmitted Zika Virus*. *Frontiers in Microbiology*. 9:768-772 (2018).

Smith JL & Fonseca DM. *Rapid assays for identification of members of the Culex (Culex) pipiens complex, their hybrids, and other sibling species (Diptera: Culicidae)*. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 70(4):339-45. (2004).

Snider S.R and Consroe P. *Beneficial and adverse effects of cannabidiol in a Parkinson patient with sinemet-induced dystonic dyskinesia*. *Neurology*. 35: 201-220 (1985).

Soković M, Glamočlija J, Marin P.D, Brkić D and van Griensven L.J.L.D. *Antibacterial Effects of the Essential Oils of Commonly Consumed Medicinal Herbs Using an In Vitro Model*. *Molecules*. 15:7532-7546 (2014).

Sonwa M.M. *Isolation and Structure Elucidation of Essential Oil Constituents. Comparative Study of the Oils of Cyperus alopecuroides, Cyperus papyrus, and Cyperus rotundus.* Ph.D. degree, University of Hamburg, Germany. 172p (2000).

Strode C, Donegan S, Garner P, Enayati A.A and Hemingway J. *The Impact of Pyrethroid Resistance on the Efficacy of Insecticide-Treated Bed Nets against African Anopheline Mosquitoes: Systematic Review and Meta-Analysis.* PLoS Medecine. 11(3): 1-12 (2014).

Subra R. *Biology and control of Culex pipiens quinquefasciatus Say, 1823 (Diptera, Culicidae) with special reference to Africa.* International Journal of Tropical Insect Science, 1(4), 319-338 (1981).

Suchel J. *Les climats du Cameroun.* Thèse de Doctorat d'Etat. Université de Bordeaux III.1186 (1987).

Suthisut D, Fields P.G, Chandrapatya A. *Fumigant toxicity of essential oils from three Thai plants (Zingiberaceae) and their major compounds against Sitophilus zeamais, Tribolium castaneum and two parasitoids.* Journal of Stored Products Research. 47:222-230 (2011).

Swamy M.K, Akhtar M.S and Sinniah U.R. *Antimicrobial Properties of Plant Essential Oils against Human Pathogens and Their Mode of Action: An Updated Review.* Evidence-Based Complementay and Alternative Medecine.1-21 (2016).

Talipouo A, Akono-Ntonga P, Tagne Darus, Mbida Mbida A, Etang J, Tchoffo-Fobasso R, Ekoko W, Binyang J & Dongmo A. *Comparative study of Culicidae biodiversity of Manoka island and Youpwe mainland area, Littoral, Cameroon.* International Journal of Biosciences, 10 (4), 9-18 (2017).

Tashkin D.P, Shapiro B.J, Lee Y.E and Harper C.E. *Effects of smoked marijuana in experimentally induced asthma.* American Review of Respiratory Disease. 112: 377-86 (1975).

Tchoumboungang F, Jazet Dongmo P.M, Sameza M.L, Fombotioh Ndifor, Wouatsa Nangue A.V, Amvam Zollo P.H and Menut C. *Comparative essential oils composition and insecticidal effect of different tissues of Piper capense L., Piper guineense Schum. et Thonn., Piper nigrum L. and Piper umbellatum L. grown in Cameroon.* African Journal of Biotechnology. 8 (3): 424-431 (2009).

Tchoumboungang F, Jazet Dongmo P.M, Sameza M.L, Nkouaya Mbanjo E.G, Tiako Fotso G.B, Amvam Zollo P.H, Menut C. *Activité larvicide sur Anopheles gambiae Giles et composition chimique des huiles essentielles extraites de quatre plantes cultivées au Cameroun*. Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement.13(1) : 77-84 (2009).

Tchuinkam T, Mpoame M, Make-Mveinhya B, Simard F, Lélé-Defo E, Zébazé-Togouet S, Tateng-Ngouateu A, Awono-Ambéné H .P, Antonio-Nkondjio C, Njiné T and Fontenille D. *Optimization of breeding output for larval stage of Anopheles gambiae (Diptera:-Culicidae): prospects for the creation and maintenance of laboratory colony from wild isolates*. Bulletin of Entomological Research 101: 259–269 (2011).

Tene Fossog B, Poupardin R, Costantini C, Awono-Ambene H, Wondji C, Ranson H, Antonio-Nkondjio C. *Resistance to DDT in an urban setting: Common mechanisms implicated in both M and S forms of Anopheles gambiae in the city of Yaoundé Cameroon*. PLoS One. 8:1-9 (2013).

Thavanapong N., Wetwitayaklung P., Charoenteeraboon J. *Comparison of Essential Oils Compositions of Citrus maxima Merr. Peel Obtained by Cold Press and Vacuum Steam Distillation Methods and of Its Peel and Flower Extract Obtained by Supercritical Carbon Dioxide Extraction Method and Their Antimicrobial Activity*. Journal of essential oil research. 22: 71-77 (2010).

Thomas A, Mazigo H.D, Manjurano A, Morona D and Kweka E.J. *Evaluation of active ingredients and larvicidal activity of clove and cinnamon essential oils against Anopheles gambiae (sensu lato)*. Parasites and Vectors.10:411-419 (2017).

Tisgratog R , Tananchai C , Juntarajumnong W , Tuntakom S , Bangs M.J , Corbel V and Chareonviriyaphap T. *Host feeding patterns and preference of Anopheles minimus (Diptera: Culicidae) in a malaria endemic area of western Thailand: baseline site description*. Parasites and Vectors. 5:114-124 (2012).

Tiwari, B.K., Valdramidis, V.P., O'Donnell, C.P., Muthukumarappan, K., Bourke, P., Cullen, P.J. *Application of natural antimicrobials for food preservation*. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 57: 5987–6000 (2009).

Toé K.H, N'Falé S, Dabiré K, Ranson H and Jones C.M. *The recent escalation in strength of pyrethroid resistance in Anopheles coluzzi in West Africa is linked to increased expression of multiple gene families*. BMC Genomics. 16:146-157 (2015).

Tuley de Silva K. *A manual on the essential oil industry*. United Nations Industrial Development Organization. 232p (1995).

Turek, C., Stintzing, F.C. *Stability of essential oils: a review*. Compr. Rev. Food Science and Food Safety. 12(1): 40–53 (2013).

Turell M.J, Lee J.S, Richarson J.H, Sang R.C, Kioko E.N, Agawo M.O, Pecor J, O’Guinn M.L. *Vector competence of Kenyan Culex zombaensis and Culex quinquefasciatus mosquitoes for Rift Valley Fever Virus*. Journal of American Mosquito Control Association. 23(4):378-382 (2007).

Valkiūnas G, IlgūnasM, Bukauskaitė D, Fragner K, Weissenböck H, Atkinson K.T and Iezhova T.A. *Characterization of Plasmodium relictum, a cosmopolitan agent of avian malaria*. Malaria Journal. 17:184-205 (2018).

Vantaux A, Ouattara I, Lefèvre T and Dabiré K.R. *Effects of larvicidal and larval nutritional stresses on Anopheles gambiae development, survival and competence for Plasmodium falciparum*. Parasites and Vectors. 9:226-237 (2016)

Vinogradova EB. *Culex pipiens pipiens mosquitoes: taxonomy, distribution, ecology, physiology, genetics, applied importance and control*. Pensoft Publishers, 205 p. (2000).

Vinogradova EB. *Ecophysiological and morphological variations in mosquitoes of the Culex pipiens complex (Diptera: Culicidae)*. Acta Societatis Zoologicae Bohemicae, 67, 41-50 (2003).

Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernández-López J, Pérez-Álvarez J.A. *Chemical composition of the essential oils obtained from some spices widely used in Mediterranean region*. Acta Chimica Slovenica. 54:921–926 (2007).

Wang J , Zheng W , Liu F , WangY , He Y , Zheng L , Fan Q , Luo E , Cao Y and Cui L. *Characterization of Pb51 in Plasmodium berghei as a malaria vaccine candidate targeting both asexual erythrocytic proliferation and transmission*. Malria Journal. 16:458-468 (2017).

Wang J, Hou J, Wu Y, Guo S, Liu Q, Li T and Gong Z. *Resistance of House Fly, Musca domestica L. (Diptera: Muscidae), to Five Insecticides in Zhejiang Province, China: The Situation in 2017*. Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology.1-10 (2019).

Wang X, Li O, Shen L, Yang J , Cheng H , Jiang S, Jiang C, Wang H. *Fumigant, contact, and repellent activities of essential oils against the darkling beetle, Alphitobius diaperinus*. Journal of Insect science. 14(75):1-11 (2014).

Wangrawa D.W; Kosgei J; Machani M; Opala J; Agumba S, Yaméogo F; Borovsky D and Ochomo E *Larvicidal Activities and Synergistic Effects of Essential Oils against Anopheles funestus and Culex quinquefasciatus (Diptera: Culicidae) from Kisumu, Kenya*. A Journal of Entomology. 1-13 (2022).

Wanjala C.L, Zhou G, Mbugi J, Simbauni J, Afrane Y.A, Ednah Ototo E, Gesuge M, Atieli H, Githeko A.K and Yan G. *Insecticidal decay effects of long-lasting insecticide nets and indoor residual spraying on Anopheles gambiae and Anopheles arabiensis in Western Kenya*. Parasites and Vectors. 8:588-598 (2015).

Weetman D, Steen K, Rippon E.J, Mawejje H.D, Donnelly M.J, Wilding C.S. *Contemporary gene flow between wild Anopheles gambiae s.s. and Anopheles Arabiensis*. Parasites and Vectors. 7:345-353 (2014).

Wethé J., Radoux M., Tanawa E. *Assainissement des eaux usées et risques socio - sanitaires et environnementaux en zones d'habitat planifié de Yaoundé (Cameroun)*. Vertigo– la revue électronique en sciences de l'environnement. 4 (1) (2003).

WHO. *Guidelines for Laboratory and Field Testing of Mosquito Larvicides*. Geneva: World Health Organization.39p (2005).

WHO. *Monitoring and managing insecticide resistance in Aedes mosquito populations*. Geneva: World Health Organization.11p (2016).

WHO. *Test procedures for insecticide resistance in malaria vector Mosquitoes*. Geneva: World Health Organization. 40p (2013).

WHO. *World malaria report*. Geneva: World Health Organization, 67p (2016).

Williams J. et Pinto J. *Manuel de Formation à l'Entomologie du Paludisme. A l'intention des techniciens en entomologie et lutte anti-vectorielle*. RTI International. 86 p (2012).

Wondji C.S, Dabire K.R, Tukur Z, Irving H, Djouaka R, Morgan J.C. *Identification and distribution of a GABA receptor mutation conferring dieltrin resistance in the malaria vector Anopheles funestus in Africa*. Insect Biochemistry and Molecular Biology. 41:484-491 (2011).

Wondji C.S, Coleman M, Kleinschmid I, Mzilahowac T, Irvinga H, Ndulaa , Rehman A, Morgan J, Barnes K.G, Hemingway J. *Impact of pyrethroid resistance on operational malaria control in Malawi*.109 (47):1-8 (2012).

Wood O, Hanrahan S, Coetzee M, Koekemoer L.L, Brooken B.D. *Cuticle thickening associated with pyrethroid resistance in the major malaria vector Anopheles funestus*. Parasites and Vectors. 3:67-74 (2010).

WSSA. *Adjuvants for Herbicides*. Weed Science Society of America, Champaign. 144 p (1982).

Xia W, Wang R, Zhu B , Rudstam L.G , Liu Y , Xu Y , Xin W and Chen Y. *Heavy metal gradients from rural to urban lakes in central China*. Ecological Processes. 9(47):1-11 (2020).

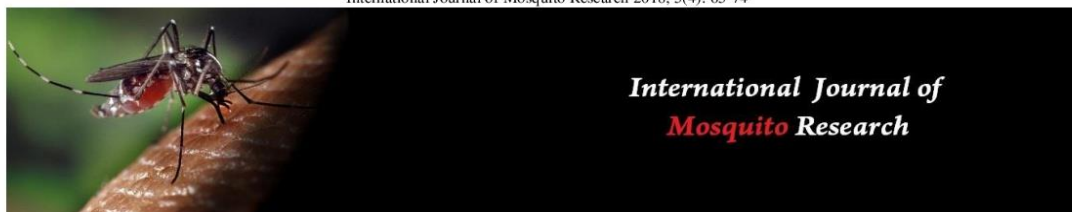
Zaim M, Aitio A, Nakashima N. *Safety of pyrethroid- treated mosquito nets*. Medical and Veterinary Entomology. 14:1-5 (2000).

Zellner B.A., Dugo P., Dugo G., Mondello L. *Analysis of essential oils*. In: Baser, K.H.C., Buchbauer, G. (Eds.), *Handbook of Essential Oils. Science, Technology and Applications*. CRC Press, Boca Raton: 151–184 (2010).

Zhu J, Zeng X, Ma Y, Liu T, Qian K, Han Y. *Adult Repellency and Larvicidal Activity of Five Plant Essential Oils Against Mosquitoes*. Journal of American Mosquito Control Association. 22(3):515-522 (2006).

Zhu L, Tian Y. *Chemical composition and larvicidal activity of essential oil of Artemisia gilvescens against Anopheles anthropophagus*. Parasitology Research. 112:1137-1142 (2013).

Zibae I and Khorram P. *Synergistic effect of some essential oils on toxicity and knockdown effects, against mosquitos, cockroaches and housefly*. Arthropods. 4(4): 107-123 (2015).



ISSN: 2348-5906
CODEN: IJMRK2
IJMR 2018; 5(4): 65-74
© 2018 IJMR
Received: 11-05-2018
Accepted: 15-06-2018

Henri Abé

(1) Department of Animal
Biology and Physiology, Faculty
of Science, University of
Yaoundé I, Cameroon
(2) Higher Teachers' Training
College of the University of
Yaoundé I, Cameroon

Gisèle Aurélie Foko Dadi

Higher Teachers' Training
College of the University of
Yaoundé I, Cameroon

Christophe Antonio- Nkondjio

Malaria Research Laboratory
Organisation de Coordination
Pour la Lutte Contre Les
Endémies en Afrique
Centrale (OCEAC) P O Box 288
Yaoundé Cameroon

Parfait Herman Awono-Ambene

Malaria Research Laboratory
Organisation de Coordination
Pour La Lutte Contre Les
Endémies en Afrique
Centrale (OCEAC) P O Box 288
Yaoundé Cameroon

Joseph Lebel Tamesse

Higher Teachers' Training
College of the University of
Yaoundé I, Cameroon

Correspondence

Henri Abé

(1) Department of Animal
Biology and Physiology, Faculty
of Science, University of
Yaoundé I, Cameroon
(2) Higher Teachers' Training
College of the University of
Yaoundé I, Cameroon

Insecticidal activity of *Cannabis sativa* L leaf essential oil on the malaria vector *Anopheles gambiae* s.l (Giles)

**Henri Abé, Gisèle Aurélie Foko Dadi, Christophe Antonio- Nkondjio,
Parfait Herman Awono-Ambene and Joseph Lebel Tamesse**

Abstract

Malaria prevention in sub-Sahara Africa rely on the use insecticide based vector control tools. Because of the rapid development of insecticide resistance in vector populations, essential oils could be a serious alternative to insecticides. The study presents the insecticidal activity of *Cannabis sativa* L leaf essential oil on *Anopheles gambiae* s.l. Characterization of *Cannabis sativa* L leaf essential oil showed the presence of terpenes and aliphatic compounds known to have an insecticidal activity. Bioassay conducted with *An. gambiae* s.l larvae indicated that, lethal concentrations causing 50% and 95% mortality were 0.501%; 1.168% and 0.951%; 2.219% after 24hours; 0.201%; 0.217% and 0.381%; 0.412% after 48 hours exposure (respectively for laboratory and field population). Bioassays conducted with adults indicated knock down times for 50% and 95% of 23±0.7min; 28±1.52 min and 45±0.91min; 55.5±0.95min, respectively for the laboratory and field strains. The lethal concentrations killing 50% and 95% of adult mosquitoes were 0.107%; 0.150% and 0.339%; 0.369%, 24 hours post exposure, for the laboratory and field populations respectively. The essential oil of *Cannabis sativa* L leaf proved to be effective against *Anopheles gambiae* s.l larvae and adults.

Keywords: *Anopheles gambiae* s.l, *Cannabis sativa* L, essential oil, insecticide, bioassay

1. Introduction

In most tropical regions and particularly in Sub-Saharan Africa, vector-borne diseases are serious public health threats that cause hindrance to the socio-economic development of communities. Malaria is one of the most important vector-borne disease affecting 3.3 billion people worldwide. Over 90% of malaria cases are estimated to occur in sub-Saharan Africa ^[1]. Of those concerned, children under five years old and pregnant women are the most affected ^[1]. The fight against malaria vectors rely mainly on the use of synthetic insecticides for impregnating bed nets or indoor residual spraying ^[2]. The overreliance on insecticide based interventions has had as immediate consequence the development of insecticide resistance which now affects all vector species across Africa ^[3,4]. Many African countries are affected by this threat and there is fear that this could stop the current momentum of decrease in malaria morbidity and mortality following the increase large scale implementation of LLINs and/or IRS across the continent ^[5,6]. The rapid expansion of insecticide resistance could derive from many factors including the massive use of insecticide in public health during the last decade for malaria control, the modification of the environment (urbanisation and pollution) ^[7-9], the use of similar compounds in both public health and in agriculture, the practice of intensive agriculture over large surface areas and in urban settings with massive and uncontrolled used of pesticides ^[10-12]. Resistance mechanisms develop by mosquitoes could be either mediated by target sites mutations, cuticle resistance or metabolic resistance ^[13].

In Cameroon insecticide resistance is largely sprayed in major vector species *An. gambiae* s.l and *An. funestus* ^[5, 19]. Because of the increasing occurrence of insecticide resistance in the main malaria vectors, the search for new compounds or new integrated strategies for managing insecticide resistance is urgently required ^[20, 21]. In this context, plant- derived extract or essential oils could be potential alternative for controlling malaria vectors or mosquito- borne diseases ^[22]. These compounds could offer several advantages: they could increase the number

of compounds available for vector control they are biodegradable less toxic for the environment and could be affordable and easy to use. They could be a source of income for local communities. In Cameroun as in many countries across tropical regions, several studies on essential oils insecticidal activities have been conducted over recent years and proved high potential of plant extracts in the control of pests and mosquitoes^[23-26].

In Cameroon, *Cannabis sativa* L is found in forest and savannah areas. It use has been tamed for many years because of it negative effects on human health when it is smoked or inhale. It is used by local communities for many purposes. Flowering leaves and somite are rubbed on the skin to fight worms or to repel bees to collect honey. Aerial parts of *Cannabis sativa* L are burned at night to repel mosquitoes. Yet there is no scientific evidence of it impact in killing mosquitoes. The present study was undertaken to investigate the chemical composition and insecticidal activity of *Cannabis sativa* L leaf essential oil on *Anopheles gambiae* s.l larval and adults' stages.

2. Materials and Methods

2.1 Plant Material

Cannabis sativa L leaves were harvested in the village of Salla in the district of Ayos. The specimen was identified under the number 3614SRFK and classified as belonging to Cannabaceae family at the National Herbarium.

2.2 Essential oil

The essential oil of the leaves of *Cannabis sativa* L was extracted by hydro distillation using a Clevenger apparatus. The essential oil was dried using anhydrous magnesium sulphate and stored at 4 °C, away from UV rays, before use.

2.3 Chemical analysis of *Cannabis sativa* L leaves essential oil using Gas chromatography coupled with mass spectrometry

The determination of retention data and the area percentage of the identified compounds were carried out on a two GC-FID systems.

- (A) An Agilent 5890 system equipped with HP-1 (ref: 1909 1 Z-115) column (50m x 320µm; 0.5 µm film thickness). GC oven temperature was kept at 80 °C for 8 minutes and programmed to 220 °C at the rate of 2 °C/min.
- (B) An Agilent 6890 system equipped with HP-Innowax (ref: 1909 1 N-216, Agilent Technologies, Santa Clara, CA 95051, USA) column (60 m x 320µm, 0.5µm film thickness). GC temperature was kept at 60 °C and programmed to 245 °C at the rate of 2 °C/min, then constant at 250 °C for 20 min.

The split ratio was adjusted to 1/100. The injector temperature was 250 °C and the FID detector was kept at 250 °C. The carrier gas was Helium (1.3ml/min).

Gas chromatography- Mass spectrometry was carried out using the first system Agilent 5890 equipped with HP-1 column. The mass spectra was recorded in the electron impact mode at 70 eV using the aforementioned chromatographic conditions. Individual components of *Cannabis sativa* L leaves essential oil were identified by their retention index as described in Adams^[27] and their mass

spectra were interpreted using the WILEY L computer library.

2.4 Mosquito's collection

The laboratory strain of *Anopheles gambiae* s.l used for our experiment is the "Yaoundé strain" from the Organisation de Coordination pour la lutte contre les Endémies en Afrique Centrale (OCEAC). A field strain collected at the larval stage in Yaoundé near river Ewoé (N 03°51'34.9'' and E 011°31'3'') was also used. Laboratory strain and field population were reared in the insectary of the Higher Teachers' Training College of the University of Yaoundé I. Larvae were fed with Tetramin Baby Fish Food at a rate of 2.5mg per 100 larvae per day^[28, 29]. The pupae were collected in plastic cups and placed in emergence cages. Adults emerging from pupae were fed using a 10% glucose solution. The colony of the laboratory strain were maintained continuously at 25-27 °C and 75-78% relative humidity under photoperiod 12L: 12D. *Anopheles gambiae* s.l third and early four instars larvae and female aged 2-5 days old were used to carry out bioassays.

2.5 Bioassay

2.5.1 Bioassay with larvae

Larvae of third and early four instars were used to assess the larvicidal activity of *Cannabis sativa* L leaf essential oil following WHO Guidelines for Laboratory and Field Testing of Mosquito Larvicides^[30]. Mosquitoes were maintained during one hour in distilled water for observation before running the test. Tests concentrations were prepared by adding 1mL of appropriate concentration of essential oil to disposable test cups containing 99 ml of spring water. Batches of 25 larvae of third and early four instars were transferred from observation cups to test cups. Four replicates were run for each concentration and an equal number of controls were run as well. The control was prepared by adding 1ml of absolute alcohol to 99 ml of spring water. Six different concentrations were used (0.1%; 0.2%; 0.3%; 0.5%; 0.7% and 0.9%). Each test was conducted three times on different days. No food was added to cups during the exposure period. Larvae were considered dead when they were incapable of any movement or not swimming actively when touch. The mortality rate was recorded after 24 and 48 hours of exposure. LC₅₀ and LC₉₅ were calculated using a log probit approach with WINDL CIRAD-CA version 2.0 software.

2.5.2 Bioassay with adults

Adult bioassays were performed with 2-5 days- old non-blood- fed females following the WHO Guidelines^[31] with cone using impregnated bed net with the essential oil at the following concentrations: 0.025%, 0.05%, 0.1%, 0.2%, 0.3% and 0.5%. Absolute alcohol was used to dilute the essential oil at the various concentrations and 3ml of each concentration was used to impregnate a portion of bed net (98.47cm²). Due to the high volatility of essential oils, pieces of net prepared as indicated above were dried at room temperature away from sun light for 15 minutes before carrying susceptibility assays^[32, 33]. Before each test, female mosquitoes were transferred from the cages to the plastic cup for one hour and specimens with broken legs or unable to fly were discarded and replaced. Twenty replicates of batches of 5 mosquitoes per tube were exposed to each concentration for 1hour. Five replicates were

run as control using a portion of net impregnated only with a solution of absolute alcohol. The number of knock down (KD) mosquitoes was recorded at 10 minutes intervals during 1 hour exposure period and KDT₅₀ and KDT₉₅ (time required for knocking down 50% and 95% of the individuals respectively) estimated with 95% of confident interval. After the exposure period, mosquitoes were transferred back to recovery cups and provided with 10% of glucose solution soaked on cotton pad. Mosquito mortality was recorded 24 hours post- exposure. After the tests, adult mosquitoes from field populations were kept in Eppendorf tubes at -4 °C for identification.

2.6 Identification of mosquitoes

Adults of the field population were morphologically identified using the Gillies and Coetzee key [34]. Genomic DNA was extracted according to the Livak protocol [35]. Molecular identification of females was conducted according to Santolamazza *et al.* protocol [36].

2.7 Data analysis for bioassay

The lethal concentrations inducing 50% and 95% (LC₅₀ and LC₉₅) mortality was calculated using log probit approach with WINDL CIRAD-CA version 2.0 and STATISTICA software version 6.0 to plot the graphs. The relation between the exposure time, the mortality and the doses was assessed using probit regression.

For the adulticidal effect, the time at which 50% and 95% of adult mosquitoes were knocked down (Knock down time, KTD₅₀ and KDT₉₅) was calculated using WINDL CIRAD-CA software version 2.0. The relation between the knock down time, mortality and the doses were assessed using probit regression.

3. Results

3.1 Yield of *Cannabis sativa* L leaf essential oil (table 1)

The table 1 provide general characteristics of the plant and the essential oil.

Table 1: The oil yield of *Cannabis sativa* L

Plant name	Family	Certification number	Leaves weight	Oil weight	Yield
<i>Cannabis sativa</i> L	Cannabaceae	25967SRF/Cam	3,375g	1.5g	0.044%

The essential oil yield of *Cannabis sativa* L expressed as weigh/weight (w/w) is very low compared to the oil yield of many aromatic plants. Further studies are requested to assess the influence of the soil, climate, water stress, the collection period, extraction method on the yield.

3.2 Chemical composition of *Cannabis sativa* L leaf essential oil

Up to 81 different constituents were identified during analysis (Table 2). The main constituents of *Cannabis sativa* L leaf

essential oil are sesquiterpenes (E-β-Caryophyllene (10.72%); Caryophyllene oxide (1.25%); E-β-Farnesene (1.25%) and monoterpenes (Myrcene (31.75%); terpinolene (14.76%); α-pinene (8.12%); β-pinene (3.64%); limonene (1.30%) and E-β-Ocimene (1.10%). Among these compounds: α-pinene; β-pinene; Z-β-ocimene; menthone; E,Z-P-menthen-2-en-1-ol; 1,8-cineol; sabinene; terpinen-4-ol; β-phellandrene; α-phellandrene; Terpinolene; Thujene and linalool are reported to have an inhibitory or biocide activity against several species of bacteria and insects.

Table 2: Chemical composition of *Cannabis sativa* L leaf essential oil

Elution order	Compound	Percentage	Kovat indices	
			HP-1	Innowax
1.	Z-3-Hexenol	0.03	842	1380
2.	E-2-Hexenol	0.02	852	1408
3.	Heptanone-2	0.03	864	1182
4.	Hexenol	0.03	869	1351
5.	Heptanal	0.03	880	1185
6.	2-Amyl furan	0.01	884	1124
7.	α-Thujene	0.12	923	1032
8.	α-Pinene	8.12	931	1035
9.	Camphene	0.013	944	1063
10.	Octene-1-ol-3	0.03	961	1427
11.	6-Methyl-5-heptenone-2	0.005	964	1116
12.	Sabinene	0.12	967	1118
13.	β-Pinene	3.64	971	1132
14.	6-Methyl-5-hepten-2-ol	0.02	974	1163
15.	Myrcene	31.75	981	1159
16.	α-3-Carene	0.92	997	1011
17.	α-Phellandrene	0.42	998	1175
18.	α-Terpinene	0.31	1010	1188
19.	Hexylacetate	0.02	1010	1272
20.	P-Cymene	0.11	1014	1200
21.	Limonene	1.3	1022	1203
22.	1,8-Cineole+β-phellandrene	1.29	1022	1213
23.	Z-β-Ocimene	1.10	1025	1242
24.	E-β-Ocimene	9.65	1037	1247

25.	Y-Terpinene	0.23	1049	1255
26.	E-Thujan-4-ol	0.03	1053	1463
27.	Fenchone+methyl benzoate	0.02	1072	-
28.	p-Cymenene	0.09	1072	1437
29.	Terpinolene	14.76	1079	1290
30.	Nonanal	0.03	1083	1391
31.	Linalool	0.09	1086	1533
32.	Z-Thujan-4-ol	0.03	1092	-
33.	Perillen	0.02	1098	1429
34.	α -Fenchol	0.07	1100	1570
35.	Z-p- Menth-2-en-1-ol	0.03	1114	1570
36.	E-p- Menth-2-en-1-ol	0.07	1114	1571
37.	4E, 6Z- Allo-ocymene	0.01	1119	1375
38.	Ipsdienol	0.03	1125	-
39.	Epoxy terpinolene	0.05	1130	-
40.	Menthone	0.04	1136	1465
41.	Borneol	0.04	1153	1719
42.	P-Cymen-8-ol	0.12	1161	1864
43.	Terpinen-4-ol	0.07	1163	1611
44.	α -Terpineol	0.04	1175	1682
45.	Citronellol	0.02	1212	1764
46.	Hexyl butyrate +methylchavicol	0.06	1224	-
47.	E-Anethole	0.10	1264	1826
48.	α -Ylangene	0.20	1370	1490
49.	α -Copaene	0.01	1375	1491
50.	β -Elemene	0.02	1386	1577
51.	Isocaryophyllene	0.23	1408	-
52.	Z- α -Bergamotene	0.11	1410	1559
53.	α -Santalene	0.14	1415	1582
54.	E- β -Caryophyllene	10.72	1419	1612
55.	E- α -Bergamotene	0.85	1435	1575
56.	Allo-Aromadendrene	0.30	1439	1620
57.	α -Guaiene +unidentified compound	0.04	1442	-
58.	E- β -Farnesene	1.23	1449	1663
59.	Y'-Elemene+unidentified compound	0.04	1449	-
60.	α -Humulene	3.28	1452	1654
61.	Y'- Muurolene	0.08	1473	1689
62.	Selina-4,11-diene	0.22	1475	1674
63.	Selina-4,7(11)diene+E- α -Bisabolene	0.36	1475	1688
64.	β -Selinene	0.58	1480	1700
65.	α -Selinene	0.41	1491	1707
66.	E,E- α -Farnesene	0.20	1496	1744
67.	β -Bisabolene	0.21	1499	1727
68.	7-Epi- α -Selinene	0.21	1507	1764
69.	Y'-Cadinene	0.05	1513	1740
70.	X'-Cadinene	0.09	1513	1765
71.	12-Nor-caryophyll-5-en-2-one	0.02	1515	-
72.	Y'-Selinene	0.24	1526	-
73.	Germacrene B	0.14	1535	1823
74.	Selina-3,7(11)-diene	0.37	1537	1783
75.	E-Nerolidol	0.15	1550	2036
76.	Spathulenol	0.03	1565	2107
77.	Epoxy Caryophyllene	0.08	1563	-
78.	CaryophylleneOxide	1.25	1567	2001
79.	HumuleneOxide	0.30	1597	2047
80.	Not identified compound	0.14	-	-
81.	Not identified compound	0.18	-	-
TOTAL		98.27		

Analysis performed by gas chromatography with FID detection on 2 columns of different polarity: HP1 and INNOWAX. Individual components are identified by their retention index as described in Adams (2012) and their mass spectra are interpreted using the WILEY L computer library. Constituents are presented in the order of elution from the columns.

3.3 Larvicidal activity of *Cannabis sativa* L. leaf essential oil on *Anopheles gambiae* s.l after 24 and 48 hours exposure

A total of 3600 *An. gambiae* s.l larvae were exposed to different essential oil concentrations (0.1%; 0.2%; 0.3%; 0.5%; 0.7% and 0.9%) and mortality was recorded 24 and 48 hours after exposure. The dose response curve generated after 24 hours exposure to *Cannabis sativa* L. leaf essential oil showed important differences between the laboratory and field strain (figure 1). The laboratory strain was found to be more susceptible to the essential oil. The average dilution of essential oil causing 50% and 95% mortality (LC_{50} and LC_{95}) were 0.501% and 1.16% respectively for the laboratory strain. For the field strain, doses causing 50% and 95% mortality were 0.951% and 2.219% respectively. The level of susceptibility of the two strains to the essential oil was found to be statistically different ($H=3.46$; $p=0.018$).

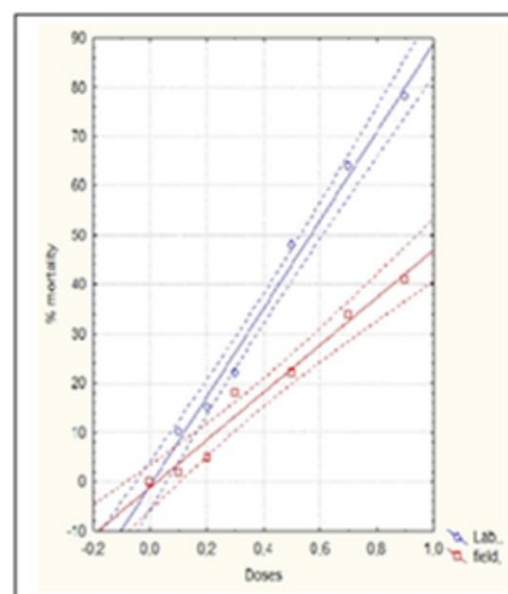


Fig 1: Doses-response curve of larvicidal activity of *C. sativa* L. leaf E.O on *An. gambiae* s.l after 24 hours

The larvicidal activity of *C. sativa* L. leaf essential oil was also assessed on *An. gambiae* s.l larvae after 48 hours exposure (figure 2). From the experiments it appeared that the level of mortality increased with the concentration of essential oils in both the laboratory and field strain. LC_{50} and LC_{95} doses of 0.201%; 0.217% and 0.381%; 0.412% respectively for the laboratory strain and field population were recorded. Laboratory populations were again found to be more susceptible than field population to the essential oil. The tolerance level of larvae after 24 hours exposure was less

important than the level after 48 hours exposure and were significantly different for the field population ($H=6.56$; $p=0.013$). The different equations of regression lines generated (1; 2) following the dose response analysis were respectively (for 24 hours exposure period):

$$Y_{lab} = -0.746 + 89.71x \quad (1)$$

$$Y_{field} = -1.152 + 48.171x \quad (2)$$

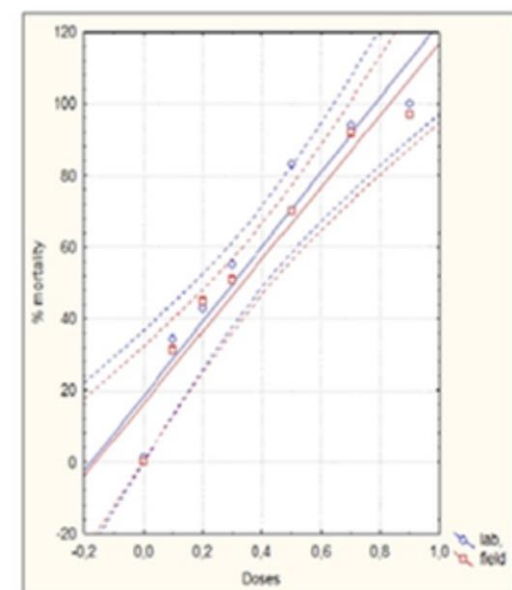


Fig 2: Dose-response curve of larvicidal activity of *C. sativa* L. leaf E.O on *An. gambiae* s.l after 48 hours

After 48 hours of exposure, the different equations of the regression lines generated were (3; 4):

$$Y_{lab} = 18.334 + 104.31x \quad (3)$$

$$Y_{field} = 16.359 + 100.55x \quad (4)$$

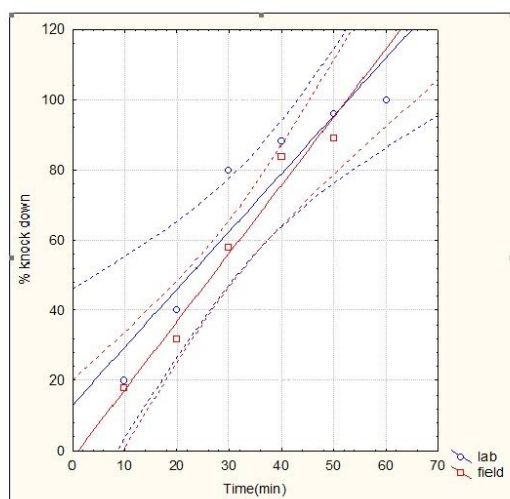
3.4 Knock down activity of *Cannabis sativa* L. leaf essential oil on adult of *Anopheles gambiae* s.l

During 1 hour, 100 adult female *An. gambiae* s.l were exposed to each concentration of the *C. sativa* L. leaf essential oil. At 10 minutes interval, the number of mosquito knock down were counted and recorded. It appeared from the assay that the number of mosquito knocked down increases with essential oil concentration and with the length of exposure (table 3).

Table 3: Activity of *C. sativa* L leaf essential oil on adult of *An. gambiae* s.l

Colonies	Nb of mosquitoes exposed	Nb of replicates	Concentration of essential oil (%)	Mortality after 24H	95% CI
Laboratory	100	20	0.5	100±0.4	100-100
	100	20	0.3	84±0.5	79-88
	100	20	0.2	68±0.6	64-73
	100	20	0.1	54±0.6	52-58
	100	20	0.05	15±0.5	12-18
	100	20	0.025	08±0.4	2-11
Field	100	20	0.5	98±0.6	96-102
	100	20	0.3	86±0.6	82-90
	100	20	0.2	60±0.4	55-64
	100	20	0.1	24±0.4	21-27
	100	20	0.05	10±0.3	8-14
	100	20	0.025	-	-

Considering only the highest concentration of essential oil (0.50%), the KDT₅₀ and KDT₉₅ calculated with 95% confidence limits ($t=5.268$; $p=0.003$ and $t=4.710$; $p=0.005$) are 23 ± 0.7 min; 28 ± 1.52 min and 45 ± 0.91 min; 55.5 ± 0.95 min respectively for the laboratory strain and field population. The knock down response curve is shown in Figure 3 below.

**Fig 3:** Knock down response curve of the activity of *C. sativa* L leaf E.O on *An. gambiae* s.l

Knock down times were different between the two populations of *An. gambiae* s.l. Female adult from the field were less susceptible compare to laboratory strain to *Cannabis sativa* L essential oil ($t=5.26$; $p=0.003$ and $t=4.71$; $p=0.005$). The different equations generated from the regression analysis are presented below (5;6).

$$Y_{lab} = 13.066 + 1.64x \quad (5)$$

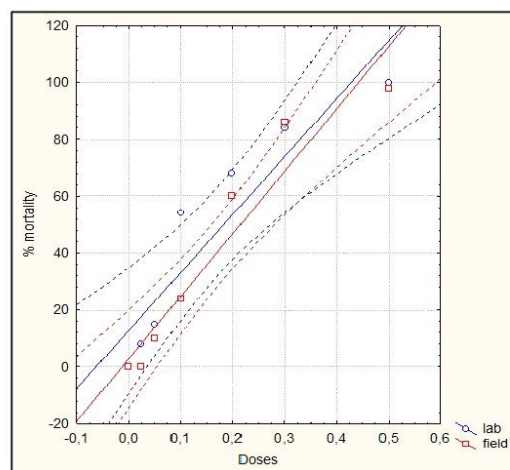
$$Y_{field} = 3.133 + 1.72x \quad (6)$$

3.5 Determination of sublethal concentration of essential oils inducing adult mortality

The analysis of the trend of mortality 24 hours post exposure

showed an increase in mortality according to essential oils concentration. With dilution of 0.5% mortality rate of 100% was recorded for the laboratory strain whereas mortality rate of 98% were recorded for the field population. The lethal concentration inducing 50% of mortality (LC₅₀) and 95% of mortality (LC₉₅) for the laboratory strain were 0.107% and 0.150% ($t=3.13$ $p=0.020$); for the field strain 0.339% and 0.369% ($t=2.54$; $P=0.043$).

The diagnostic dose defined as twice the lethal concentration for 99% of mortality^[31] is above 0.50% for the field population. The dose-mortality response curve is shown on the Figure 4.

**Fig 4:** Dose response curves of *C. sativa* L leaf essential oil on adult *An. gambiae* s.l females

The essential oil of the leaves of *Cannabis sativa* L is effective both for the laboratory strain as for the wild population of *An. gambiae* s.l ($t=3.138$, $p=0.020$; $t=2.544$; $p=0.043$).

The level of susceptibility of the two populations appeared significantly different ($H=3.40$; $P=0.027$), and consequently the doses response curve of individuals in the wild population is below that of the laboratory strain in low concentrations. This reveals that these wild individuals are more tolerant to *Cannabis sativa* L essential activity oil than the laboratory

strain. The different equations of the regression lines of the adulticidal activity (7; 8) are respectively:

$$Y_{lab}=12.789+203.81x \quad (7)$$

$$Y_{field}=2.837+219.69x \quad (8).$$

3.6 Identification of field population of *Anopheles gambiae* s.l

Mosquitoes from the laboratory strain are all *An. coluzzii*. A total of 71 adult females from the field population were further processed to identify members of the *An. gambiae* complex. From the analysis, it appeared that 3 (4.23%) were *An. gambiae* s.s and 68 (95.77%) were *An. coluzzii*.

4. Discussion

Our study objective was to characterize the chemical composition of *Cannabis sativa* L leaf essential oil and to evaluate its insecticidal properties on the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.l. High mortality rate was recorded after exposing both *An. gambiae* s.l larvae and adults to *C. sativa* leaf essential oil. The following supporting the insecticidal activity of the essential oil.

The extraction of essential oil of *Cannabis sativa* L yielded very low concentration 0.044% (w/w). This yield was far less than those reported for the essential oils of *Cymbopogon citratus* (1.7%); *Cymbopogon giganteus* (1.4%)^[3] and *Clausena anisata* (0.24%)^[37]. The low yield recorded, could result from the harvesting period of the leaves, the method of growing the plant or the method of extraction. The characterization of essential oil of *Cannabis sativa* L revealed the presence of up to 81 different compounds. Among compounds identified, several with known insecticidal activities on mosquito larval stages were recorded such as α -Pinene; β -pinene; 1,8-cineol and Z- β -ocimene which have been reported to induce high mortality to *Aedes aegypti*^[38,39], *Aedes albopictus*^[40,41], *Anopheles stephensi*^[40,42] and *Anopheles gambiae*^[43] larvae. In addition, menthone and E, Z-P-menthen-2-en-1-ol known for their larvicidal activity on *Culex quinquefasciatus* larvae were also recorded^[44]. Some of the compounds characterized such as linalool, p-Cymene, 1,8- Cineol, Terpinolene and Thujene were also reported to induce a biocidal or inhibitory activities on several pathogenic Bacteria: Bacteria *Shigella*^[45] and different bacteria classes^[46,47]. Yet a certain number of compounds could not be identified further characterization is still required. Although high lethality of larvae was detected 24 hours and 48 hours after exposure, it is not sure that such level of lethality could be recorded in the nature. Further studies are required to assess the residual effect of this compound in the environment. Analysis conducted with adult mosquitoes also showed high lethality of mosquitoes exposed to impregnated net with *C. sativa* L leaf essential oil. It is possible that the induce lethality recorded could have been driven by compounds such as E-p-Menth-2-en-1-ol, 1, 8-Cineol; p-Cymene; α -Pinene and β -Pinene which were reported to have an insecticidal activity against adults *Anopheles stephensi*^[42] and *Anopheles gambiae*^[3,43]. Compounds such as Limonene, α -Pinene, 1,8-Cineol, sabinene, terpinen-4-ol, β -phellandrene and α -phellandrene were all reported to have a significant inhibitory activities on acetylcholinesterase and adenosine

triphosphatase on *Sitophilus oryzae*^[48]. It is likely that the effect of the essential oil of *Cannabis sativa* L leaf could be amplified by the presence or the synergist effect of different sets of compounds with as major components, Myrcene, Terpinolene, E- β -Caryophyllene, E- β -Ocimenene, α -Pinene, β -Pinene, α -humulene, limonene, E- β -Farnesene^[49]. The following needs to be further investigated through both field and laboratory analysis. *Cannabis sativa* L leaf essential was found to induce a rapid knock down effect when adults were exposed to impregnated net. This suggests that, the essential oils which is a cannabinoid substance may affect directly the insect nervous system. Studies conducted in the brain suggested that cannabinoids receptors are mainly located in the basal ganglia, cerebellum and hippocampus all associated with body movement control and coordination and this could rather explain the rapid knock down effect recorded during the study^[50].

In human subjects cannabinoids were reported to have various psychological and physiological effects due to their direct effect on the nervous system^[51]. Studies conducted on both vertebrate and invertebrates indicated that once in the body, cannabinoids bind to cannabinoid receptors and decrease adenylyl cyclase activity, inhibiting calcium N channels and disinhibiting K⁺ channel which all affect the transmission of nerve impulse^[50]. Most of insecticides used in vector control have as target the sodium channel or acetylcholine esterase^[13].

Because of the rapid spread of insecticide resistance affecting major malaria vectors^[52,19,53,54] and different mode of action of cannabinoids they could be good alternative for the control of resistant mosquitoes.

Comparing the level of susceptibility between field and laboratory populations it appeared that field populations were more tolerant to *C. sativa* L leaf essential oil than the laboratory colony. The following could come from the fact that field mosquito populations are always exposed to different sets of pollutants in the environment which increase overexpression of a certain number of metabolic mechanisms involved with detoxification^[55]. Although no investigation of specific mechanisms involved with mosquito tolerance was undertaken. Yet studies conducted in Yaoundé indicated the presence of kdr allele and the overexpression of several detoxification enzymes involved with mosquitoes tolerance to pyrethroids and xenobiotics^[56,57].

5. Conclusion

Our study demonstrated high insecticidal effect of *C. sativa* L leaf essential oil against both larvae and adult *An. gambiae* s.l and support the use of this plant for vector control. With the rapid expansion of insecticide resistance to almost all existing insecticides the search for new compounds capable of replacing existing one could be particularly beneficial for the control of a large range of insects vectors responsible for the transmission of diseases across sub-Saharan Africa. Yet for *C. sativa* L further studies are needed for cultivation and extraction process to improve the yield. Also, further field trials and laboratory analysis are required to establish the efficacy of *C. sativa* L leaf essential oil under different conditions and also its efficiency in the control of mosquitoes in the nature.

6. Acknowledgments

We thank OCEAC for providing mosquitos' eggs; Pr M. Nyegue for hydro distillation of essential oil; H. Casabianca of the Institute of Analytic Science for chemical analysis of essential oil and F. Zeukeng for his advices.

7. References

- WHO. World malaria report, Geneva: World Health Organization, 2016
- Zaim M, Aitio A, Nakashima N. Safety of pyrethroid-treated mosquito nets. *Med Vet. Ent.* 2000; 14:1-5.
- Bossou AD, Mangelinckx S, Yedomonhan H, Boko PM, Akogbeto MC, De Kimpe N *et al.* Chemical composition and insecticidal activity of plant essential oils from Benin against *Anopheles gambiae* (Giles). *Paras Vectors.* 2013; 6:337-354.
- Wanjala CL, Zhou G, Mbugi J, Simbauni J, Afrane YA, Ednah Ototo E *et al.* Insecticidal decay effects of long-lasting insecticide nets and indoor residual spraying on *Anopheles gambiae* and *Anopheles arabiensis* in Western Kenya. *Paras Vectors.* 2015; 8:588-598.
- Etang J, Manga L, Toto JC, Guillet P, Fondjo E, Chandre F. Spectrum of metabolic-based resistance to DDT and pyrethroids in *Anopheles gambiae* s.l. populations from Cameroon. *J Vect. Eco.* 2007; 32(1):123-133.
- Okia M, Ndyomugenyi R, Kirunda J, Byaruhanga A, Adibaku S, Lwamafa DK *et al.* Bioefficacy of long-lasting insecticidal nets against pyrethroid-resistant populations of *Anopheles gambiae* s.s. from different malaria transmission zones in Uganda. *Paras Vectors.* 2013; 6:130-140.
- Chouaïbou MS, Fodjo BK, Fokou G, Allassane OF, Koudou BG, David JP *et al.* Influence of the agrochemicals used for rice and vegetable cultivation on insecticide resistance in malaria vectors in southern Côte d'Ivoire. *Malar J.* 2016; 15:426-438.
- Nkya TE, Akhouayri I, Kisinza W, David JP. Impact of environment on mosquito response to pyrethroid insecticides: Facts, evidences and prospects. *Insect Biochem. Mol. Bio.* www.elsevier.com/locate/ibmb. 2013; 43:407-416.
- Nkya TE, Poupardin R, Laporte F, Akhouayri I, Mosha F, Magesa S *et al.* Impact of agriculture on the selection of insecticide resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae*: a multigenerational study in controlled conditions. *Paras Vectors.* 2014; 7:480-492.
- David JP, Ismail HM, Chandor-Proust A, Paine MJ. Role of cytochrome P450s in insecticide resistance: impact on the control of mosquito-borne diseases and use of insecticides on Earth. *Phil Trans R Soc B* 368:20120429; 2013, 1-12.
- Antonio-Nkondjio C, Defo-Talom B, Tagne-Fotso R, Tene-Fossog B, Ndo C, Lehman LG *et al.* High mosquito burden and malaria transmission in a district of the city of Douala, Cameroon. *BMC Infect. Dis.* 2012; 12:275-283.
- Diniz DFA, Varjal de Melo-Santos MA, de Mendonça Santos EM, Beserra EB, Helvecio E, de Carvalho-Leandro D *et al.* Fitness cost in field and laboratory *Aedes aegypti* populations associated with resistance to the insecticide temephos. *Paras Vectors.* 2015; 8:662-677.
- Ranson H, N'Guessan R, Lines J, Moiroux N, Nkuni Z, Corbel V. Pyrethroid resistance in African anopheline mosquitoes: what are the implications for malaria control? *Trends in Paras.* 2011; 27(2):1-8.
- Djogbénou L, Dabire R, Diabate A, Kengne P, Akogbeto M, Hougard JM *et al.* Identification and Geographic Distribution of the ACE-1R Mutation in the Malaria Vector *Anopheles gambiae* in South-Western Burkina Faso, West Africa. *Am. J Trop. Med. Hyg.* 2008; 78(2):298-302.
- Edi CV, Djogbénou L, Jenkins AM, Regna K, Muskavitch MAT, Poupardin R *et al.* CYP6 P450 Enzymes and ACE-1 Duplication Produce Extreme and Multiple Insecticide Resistance in the Malaria Mosquito *Anopheles gambiae*. *PLOS Genetics.* 2014; 10(3):e1004236:1-12.
- Weetman D, Steen K, Rippon EJ, Mawejje HD, Donnelly MJ, Wilding CS. Contemporary gene flow between wild *An. gambiae* s.s. and *An. arabiensis*. *Paras. Vect.* 2014; 7:345-353.
- Wondji CS, Coleman M, Kleinschmidt I, Mzilahowac T, Irvinga H, Ndulaa M *et al.* Impact of pyrethroid resistance on operational malaria control in Malawi. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1217229109 2012; 109(47):1-8.
- Riveron JM, Chiumia M, Menze BD, Barnes KG, Irving H, Ibrahim SS *et al.* Rise of multiple insecticide resistance in *Anopheles funestus* in Malawi: A major concern for malaria vector control. *Malar J.* 2015; 14:344-353.
- Antonio-Nkondjio C, Tene Fossog B, Kopya E, Poumachu Y, Menze Djantio M, Ndo C *et al.* Rapid evolution of pyrethroid resistance prevalence in *Anopheles gambiae* populations from the cities of Douala and Yaoundé (Cameroon). *Malar. J.* 2015; 14:155-16319.
- Samuel M, Oliver SV, Coetzee M, Brooke BD. The larvicidal effects of black pepper (*Piper nigrum* L.) and piperine against insecticide resistant and susceptible strains of *Anopheles* malaria vector mosquitoes. *Paras Vectors* 2016; 9:238-247.
- Fontenille D. Écosystèmes, entomologie et lutte anti-vectorielle. *RESP. ENV.* 2008; (51):55-63.
- Deletre E, Chandre F, Williams L, Duménil C, Menut C, Martin T. Electrophysiological and behavioural characterization of bioactive compounds of the *Thymus vulgaris*, *Cymbopogon winterianus*, *Cuminum cyminum* and *Cinnamomum zeylanicum* essential oils against *Anopheles gambiae* and prospects for their use as bednet treatments. *Paras Vectors.* 2015; 8:316-330.
- Foko Dadji GA, Tamesse JL, Fankem Boyom F. Adulticidal effect of essential extracts from *Capsicum annuum* (Solanaceae), *Piper nigrum* (Piperaceae) and *Zingiber officinale* (Zingiberaceae) on *Anopheles gambiae* (Diptera-Culicidae) vector of malaria. *J Nama.* 2007, 1-12.
- Tchoumboungang F, Jazet Dongmo PM, Sameza ML, Nkouaya Mbanjo EG, Tiako Fotso GB, Amvam Zollo PH *et al.* Activité larvicide sur *Anopheles gambiae* Giles et composition chimique des huiles essentielles extraites de quatre plantes cultivées au Cameroun. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 2009; 13(1):77-84.

25. Akono P, Belong P, Tchoumboungang F, Bakwo EM, Fankem H. Composition chimique et effets insecticides des huiles essentielles des feuilles fraîches d'*Ocimum canum* Sims et d'*Ocimum basilicum* L. sur les adultes d'*Anopheles funestus* s.s. vecteur du paludisme au Cameroun. J Appl. Biosci. 2012; 59:4340-4348.
26. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils – A review. Food Chem. Tox. www.elsevier.com/locate/foodchemtox 2008; 46:446-475
27. Adams RP. Identification of essential oils by gas chromatography quadrupole mass spectroscopy. Allured Publishing Corporation, 4th Edition, Carol Stream 9. 2012, 698
28. Price DP, Schilkey FD, Ulanov A, Hansen IA. Small mosquitoes, large implications: crowding and starvation affects gene expression and nutrient accumulation in *Aedes aegypti*. Paras Vectors. 2015; 8:252-266.
29. Vantaux A, Ouattara I, Lefèvre T, Dabiré KR. Effects of larvicidal and larval nutritional stresses on *Anopheles gambiae* development, survival and competence for *Plasmodium falciparum*. Paras Vectors. 2016; 9:226-237.
30. WHO. Guidelines for Laboratory and Field Testing of Mosquito Larvicides. Geneva: World Health Organization, 2005
31. WHO. Test procedures for insecticide resistance in malaria vector Mosquitoes. Geneva: World Health Organization, 2013, 1-40
32. Wang X, Li O, Shen L, Yang J, Cheng H, Jiang S *et al.* Fumigant, contact, and repellent activities of essential oils against the darkling beetle, *Alphitobius diaperinus*. J Insect science. 2014; 14(75)
33. Faraone N, Hillier NK, Cutler GC. Plant Essential Oils Synergize and Antagonize Toxicity of Different Conventional Insecticides against *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). PLoS ONE. 2015; 10(5):e0127774
34. Giles MT, Coetzee M. A supplement to the Anophelinae of Africa South of the Sahara. South Af. Inst. Med. Res. 1987; 55:146
35. Livak KJ. Organization and mapping of sequence of *Drosophila melanogaster* X-chromosome and Y-chromosome that is transcribed during spermatogenesis. Genetics. 1984; 107:611-634
36. Santalamazza F, Mancini E, Simard F, Qi Y, Tu Z, Della Torre A. Insertion polymorphism of SINE200 retrotransposons within speciation island of *Anopheles gambiae* molecular forms. Malar J. 2008; 7:163
37. Foko Dadjji GA, Bobo Ngowe MP, Nyegue MA, Tamesse JL. Chemical composition and biocidal properties of *Clausena anisata* (Rutacea) essential oil against the development stages of the malaria vector *Anopheles coluzzii*. AJEONP 2018; 6(1):09-15
38. Lucia A, Audino P, Seccacini E, Licastro S, Zebra E, Masuh E. Larvicidal effect of *Eucalyptus grandis* essential oil and turpentine and their major components on *Aedes aegypti* larvae. J Am. Mosq. Cont. As. 2007; 23(3):299-303
39. Dias CN, Lima Alves LP, Rodrigues KAF, Aranha Brito MC, Rosa CS, Mendonça do Amaral F *et al.* Chemical Composition and Larvicidal Activity of Essential Oils Extracted from Brazilian Legal Amazon Plants against *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). Evidence-Based Comp. Alter. Med. 2015; 1-9
40. Zhu J, Zeng X, Ma Y, Liu T, Qian K, Han Y *et al.* Adult Repellency and Larvicidal Activity of Five Plant Essential Oils Against Mosquitoes. J Am Mosq Cont. Assoc. 2006; 22(3):515-522.
41. Evergetis E, Michaelakis A, Papachristos DP, Badieritakis E, Kapsaski-Kanelli VN, Haroutounian SA. Seasonal variation and bioactivity of the essential oils of two *Juniperus* species against *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Skuse, 1894). Parasitol Res. 2016, 1-9
42. Nathan SS. The use of *Eucalyptus tereticornis* Sm. (Myrtaceae) oil (leaf extract) as a natural larvicidal agent against the malaria vector *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae). Biores. Tech. 2007; 98:1856-1860
43. Kweka EJ, Lima TC, Marciale CM, Pergentino de Sousa D. Larvicidal efficacy of monoterpenes against the larvae of *Anopheles gambiae*. Asian Pac J Top Biomed 2016; 6(4):290-294.
44. Pavela R, KAFFKOVÁ K, KUMŠTA M. Chemical Composition and Larvicidal Activity of Essential Oils from Different *Mentha* L. and *Pulegium* Species against *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). Plant Protect. Sci. 2014; 50(1):36-42
45. Bagamboula CF, Uyttendaele M, Debevere J. Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. Food Microbio. 2004; 21:33-42
46. Rodriguez Flores C, Pennec A, Nugier-Chauvin C, Daniellou R, Herrera-Estrella L, Chauvina AL. Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oils Extracted from Plants Cultivated in Mexico. J Mex. Chem. Soc. 2014; 58(4):452-455
47. Swamy MK, Akhtar MS, Sinniah UR. Antimicrobial Properties of Plant Essential Oils against Human Pathogens and Their Mode of Action: An Updated Review. Evidence-Based Comp. Alt. Med. 2016, 1-21.
48. Abdelgaleil SAM, Mohamed MIE, Shawir M, Abou-Taleb HK. Chemical composition, insecticidal and biochemical effects of essential oils of different plant species from Northern Egypt on the rice weevil, *Sitophilus oryzae* L. J Pest Sci. 2015, 1-11
49. Mulyaningsih S, Sporera F, Zimmermann S, Reichling J, Wink M. Synergistic properties of the terpenoids aromadendrene and 1,8-cineole from the essential oil of *Eucalyptus globulus* against antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant pathogens. Phytomed. 2010; 17:1061-1066
50. Kendall DA, Yudowski GA. Cannabinoid Receptors in the Central Nervous System: Their Signaling and Roles in Disease. Front. Cell. Neurosci. 2017; 10:294
51. Skaper SD, Di Marzo V. Endocannabinoids in nervous system health and Disease: the big picture in a nutshell. Phil. Trans. R. Soc. B. 2012; 367:3193-3200
52. Nwane P, Etang J, Chouaibou M, Toto JC, Koffi A, Mimpfoundi R *et al.* Multiple insecticide resistance mechanisms in *Anopheles gambiae* s.l populations from Cameroon, Central Africa. Paras Vect. 2013; 6:41-55.
53. Antonio- Nkondjio C, Poupardin R, Fossog Tene B, Kopya E, Costantini C, Awono- Ambene P *et al.*

- Investigation of mechanisms of bendiocarb resistance in *Anopheles gambiae* populations from the city of Yaoundé, Cameroon. *Malar J.* 2016; 15:424-435
54. Muller P, Chouaibou M, Pignatelli P, Etang J, Walker ED, Donnelly MJ *et al.* Pyrethroid tolerance is associated with elevated expression of antioxidants and agricultural practice in *Anopheles arabiensis* sampled from an area of cotton fields in Northern Cameroon. *Mol. Ecol.* 2007, 1-11
55. Li X, Schuler M, Berenbaum M. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annu Rev Entomol* 2007; 52:231-253
56. Tene Fossog B, Poupardin R, Costantini C, Awono-Ambene H, Wondji C, Ranson H *et al.* Resistance to DDT in an urban setting: Common mechanisms implicated in both M and S forms of *Anopheles gambiae* in the city of Yaoundé Cameroon. *PLoS One* 2013; 8:e61408
57. Antonio-Nkondjio C, Fossog B, Ndo C, Djantio B, Togouet S, Awono-Ambene P *et al.* *Anopheles gambiae* distribution and insecticide resistance in the cities of Douala and Yaounde (Cameroon): influence of urban agriculture and pollution. *Malar J.* 2016, 10:154.



Chemical composition and Insecticidal Activity of *Piper umbellatum* leaf essential oil on the major malaria vector *Anopheles gambiae* S.L and *Culex quinquefasciatus*

Henri Abé^{1*}, Gisèle Aurélie Foko Dadji², Joseph Lebel Tamesse³

¹ Department of Animal biology and physiology, Faculty of Science, University of Yaounde I, Cameroon

^{2,3} Higher Teachers' Training College of the University of Yaounde I, Cameroon

Abstract

The prevention of Arthropod borne diseases is based on the use of synthetic insecticides. Because of the development of vector resistance to the advocated insecticides, plant essential oils could be an eco-friendly alternative against vector resistance. The study present dealt with the chemical composition and insecticidal property of *Piper umbellatum* leaf essential oil on *Anopheles gambiae* S.L and *Culex quinquefasciatus*.

Piper umbellatum leaf essential oil was extracted by hydro distillation with a Clevenger type apparatus and analysed by GC-MS. Bioassays were performed on third instar larvae and 2-5 days old non-blood fed female adults of the laboratory and field strain of *Anopheles gambiae* S.L and *Culex quinquefasciatus*.

Chemical analysis of *Piper umbellatum* leaf essential oil revealed the presence of terpenes compounds reported effective on insects and various pest. For larvicidal tests, the lethal concentrations killing 50% and 95% of the larvae were 0.51%; 0.61%; 0.09% and 0.91%; 1.09%; 0.23% for 24 h exposure respectively for *Anopheles gambiae* S.L and *Culex quinquefasciatus*. These concentrations were 0.43%; 0.58%; 0.05% and 0.79%; 1.05% and 0.16% for 48h exposure respectively. Knockdown time for 50% and 95% of knocked down mosquitoes were: 05±0.4min; 09±0.2min; 19±0.57min and 40±0.32min; 47±0.54min; 51±0.49min respectively. Concentrations killing 50% and 95% of adult females were: 0.40%; 0.43%; 0.24% and 0.73%; 0.76%; 0.52% respectively.

Piper umbellatum leaf essential oil was effective against the third instar larvae and adult females of *Anopheles gambiae* S.L and *Culex quinquefasciatus*.

Keywords: *Piper umbellatum*, essential oil, insecticide, *Anopheles gambiae* S.L., *Culex quinquefasciatus*

1. Introduction

Malaria remains the most common parasitic disease and the most lethal vector born disease in Sub-Saharan Africa. It is the leading cause of death and among its victims, children under five and pregnant women are its target of choice [1]. This condition is for most families the primary source of expenditure and a hindrance for a socio-economic development. The fight against this endemic disease is made difficult by several factors: the development and rapid expansion of vector resistance on Anopheline species to recommended synthetic insecticides [2, 3, 4], the resistance of *plasmodium* strains to chloroquine, the lack of vaccines against *plasmodium* [5] and the poverty of the countries concerned. The vector activity of *Culex quinquefasciatus* remains significant. This vector transmits virus such as West Nile virus [6], Rift Valley fever virus [7], Zika virus [8], Protozoa such as *Plasmodium cathemerium* [9], *Plasmodium relictum* [10] to vertebrates; Nematodes such as *Wuchereria bancrofti* [11], *Dirofilaria immitis* [12] and *Brugia malayi* [13].

Vector resistance is generated by several environmental factors that exert a constant selective pressure on vector populations: the release of detergents and pollutants resulting from industrial activity and other anthropogenic activities related to urbanization [14, 15], application of agricultural inputs and herbicides [16] a large scale indoor residual spraying and insecticidal treated nets intervention [17]. Studies conducted elsewhere in Africa and particularly in Cameroon have reported resistance in Anopheline

population [18] and highlighted various mechanisms of resistance: metabolic resistance, cuticle resistance and target sites mutations. These resistance mechanisms are largely distributed across Africa [19] and seem to compromise the efficacy of synthetic insecticides [20]. From these unfortunate findings, it is urgent to search new and effective insecticides. Thus, several authors have suggested the use of plant derived extracts and essential oils as natural insecticides [21, 22]. Tests undertaken in this direction have demonstrated not only the effectiveness of the essential oils but also many advantages that could be offered by their use in the field [23]. Because unlike synthetic insecticides with ecological consequences [24], plant derivatives are biodegradable and made of several active ingredients. Therefore our study aimed to investigate the chemical composition and insecticidal activity of *P.umbellatum* leaf essential oil against *Anopheles gambiae* S.L and *Culex quinquefasciatus* in the laboratory conditions. Yet exploratory studies had been carried in Cameroun [25, 26]. *Piper umbellatum* has been used since ancient time by natives for many purposes: in folk medicine to heal the stomach-ache, in the culinary arts as spice, as a repellent for house flies. Leaves of this plant are rubbed on the body to allow picking honey during the day. *Piper umbellatum* extract has the inhibitory effects towards the myotoxic phospholipase of the snake venoms [27]. *Piper umbellatum* hydroethanolic extract does not exhibited toxicity on mice [28].

2. Materials and Methods

2.1 Plant material

The leaves of *Piper umbellatum* were harvested in the morning at the University of Yaoundé I campus. Before hydro distillation, this plant was identified at National Herbarium in comparison with the number of the collector R. Letouzey 2499 of the specimen number 3614SRFK. The specimen was classified as belonging to *Piperaceae* family.

2.2 Essential oil extraction

The extraction of *Piper umbellatum* leaf essential oil took place in the laboratory of the department of Microbiology of the University of Yaoundé I using a Clevenger type apparatus. This extraction was performed in several sessions, each session during 6 hours in order to allow a maximum extraction. The essential oil was collected in a dark bottle, dried using anhydrous magnesium sulphate and stored at 4°C, away from UV rays before use. The mass of plant used and extraction yield are presented in table 1.

2.3 Chemical analysis of *Piper umbellatum* leaf essential oil

The chemical analysis of *Piper umbellatum* leaf essential oil was performed by Gas Chromatography, coupled with Mass Spectrometry. The analysis was performed with two Perkin Elmer instruments, a Clarus 500 GC gas chromatograph coupled to an MS Clarus 500 mass spectrometer.

The column used in chromatography is an Elite 5MS (5% Diphenyl / 95% Dimethyl Polysiloxane stationary phase) 30 m long, with an internal diameter of 0.25 mm and a film thickness of the 0.25 µm stationary phase.

The carrier gas was helium with a flow rate of 0.75 mL / min.

The injector was brought to 300 ° C, the program begins with a step of 3 min at 60 ° C and the temperature increases from 10 ° C / min to 300 ° C where a step of 3 min is performed.

The acquisition of the mass spectrum was carried out on an m / Z range of between 20 and 400 with 0.1 scan / s and an electron ionization energy of 70 eV. The temperature of the source and the transfer line were 250 ° C.

The sample to be analysed was solubilized in a small volume of dichloromethane.

The data processing software was Turbomass 6.1 and the database for the comparison of mass spectra were NIST MS Search 2.0.

2.4 Mosquito's collection

We used for our experiment two strains of *Anopheles gambiae* S.L and *Culex quinquefasciatus*. The laboratory strain of *Anopheles gambiae* S.L is the "Yaounde strain" from the Organisation de Coordination pour la lutte contre les Endémies en Afrique Centrale (OCEAC) and the aquatic stages of the wild population were collected in Yaoundé down town, near river Ewoé (N 03°51'34.9'' and E 011°31'3''). *Culex quinquefasciatus* were sampled at Melen pound behind the Faculty of medicine and Biomedical Sciences of the University of Yaoundé I (N 03°85'63.1'' and E 011°48'49.4''). Mosquitoes were reared in the insectary of the Teachers' Training College of the University of Yaoundé I. Larvae were fed with Tetramin Baby Fish Food at a rate of 2.5mg for 100 larvae per day^[29, 30]. The pupae were collected in plastic cups and placed in emergence cages. Adult from the pupae were fed using a

10% glucose solution. The colony of the laboratory strain were maintained continuously at 25-27°C and 75-78% relative humidity under photoperiod 12L: 12D. *Anopheles gambiae* S.L and *Culex quinquefasciatus* third and early four instars larvae and female aged of 2-5 days old were used to carry out tests.

2.5 Bioassays

2.5.1 Bioassay with larvae

Larvae of third and early four instars were used to assess the larvicidal activity of *Piper umbellatum* leaf essential oil following WHO Guidelines for Laboratory and Field Testing of Mosquito Larvicides^[31]. Before running the test, larvae were maintained during one hour in distilled water for observation. Tests concentrations were prepared by adding 1ml of appropriate concentration of essential oil to disposable test cups containing 99 ml of spring water. Batches of 25 larvae of third and early four instars were transferred from observation cups to test cups. Four replicates were run for each concentration and an equal number of controls were run as well. The negative control was prepared by adding 1ml of absolute alcohol to 99 ml of spring water. Six different concentrations were used (0.1%; 0.2%; 0.4%; 0.6%; 0.8% and 0.9%) for *Anopheles gambiae* S.L and five (0.0125%; 0.025%; 0.05%; 0.1% and 0.2%) for *Culex quinquefasciatus*. Each test was conducted three times on different days. No food was added to cups during the exposure period. Larvae were considered dead, when they were incapable of any movement or not swimming actively when touch. The mortality rate was recorded after 24 and 48 hours of exposure. The lethal concentrations killing 50% and 95% of the larvae (LC₅₀ and LC₉₅) were calculated using a log probit approach with WINDL CIRAD-CA software version 2.0.

2.5.2 Bioassay with adult

Adult bioassays were performed with 2-5 days- old non-blood-fed females following the WHO Guidelines^[32] with cone using impregnated bed net with the essential oil at the following concentrations: 0.1%, 0.2%, 0.4%, 0.6% and 0.8% for *Anopheles gambiae* S.L and 0.05%; 0.1%; 0.2%; 0.4%; and 0.6% for *Culex quinquefasciatus*. Absolute alcohol was used to dilute the essential oil at the various concentrations and 3ml of each concentration was used to impregnate a portion of bed net (98.47cm²). Due to the high volatility of essential oils, pieces of net prepared as indicated above were dried at room temperature away from sun light for 15 minutes before carrying susceptibility assays^[33, 34]. Before each test, females mosquitoes were transferred from the cages to the plastic cup for one hour and specimens with broken legs or unable to fly were discarded and replaced. Twenty replicates of batches of 5 female mosquitoes per cone were exposed to each concentration for 1 hour. Five replicates were run as control using a portion of net impregnated only with absolute alcohol. The number of knock down (KD) mosquitoes was recorded at 10 minutes intervals during 1 hour exposure period and KDT₅₀ and KDT₉₅ (time required for knocking down 50% and 95% of the individuals respectively) estimated with 95% of confident interval. After the exposure period, mosquitoes were transferred back to recovery cups and provided with 10% of glucose solution soaked on cotton pad. Individual with legs broken or not able to fly were considered dead. Mosquito mortality was recorded 24 hours

post-exposure. After the tests, adult mosquitoes of *Anopheles gambiae* S.L from field population and *Culex quinquefasciatus* were kept in Eppendorf tubes at -4°C for identification.

2.6 Mosquito identification

Adult females of the field population of *Anopheles gambiae* S.L were morphologically identified using the Gillies and Coetzee key^[35] while *Culex* mosquito were identified using Reuben key^[36]. Genomic DNA of *An.gambiae* S.L was extracted according to the Livak protocol^[37] and molecular identification of females was conducted according to Santolamazza *et al* protocol^[38].

2.7 Data analysis for Bioassays

The lethal concentrations inducing 50% and 95% (LC₅₀ and

LC₉₅) larval mortality were calculated using log probit approach with WINDL CIRAD-CA software version 2.0 and STATISTICA software version 6.0 to plot the graphs. The relation between the exposure time, the mortality and the doses was assessed using probit regression.

For the adulticidal activity, the time at which 50% and 95% of adult mosquitoes were knocked down (Knock down time, KTD₅₀ and KDT₉₅) and the LC₅₀ and LC₉₅ were calculated using WINDL CIRAD-CA software version 2.0. The relation between the knock down time, mortality and the doses was assessed using probit regression.

3. Results

3.1 Yield of *Piper umbellatum* Essential oil

The table 1 below provides characteristics of *Piper umbellatum* and his greenish essential oil.

Table 1: The oil yield of *Piper umbellatum*

Plant name	Family	Certification number	Leaves weight(g)	Essential oil weight(g)	Extraction yield
<i>Piper umbellatum</i>	<i>Piperaceae</i>	3614SRFK	7390.8g	0.9g	0.012%

The extraction yield of *Piper umbellatum* leaf essential oil is very low and therefore requires a huge mass of plant to obtain a volume of essential oil sufficient for biological assays. A better method of extraction, the judicious choice of the period of harvesting and the control of some edaphic factors could allow a good yield.

3.2 Chemical composition of *Piper umbellatum* leaf essential oil

The chemical analysis of *Piper umbellatum* leaf essential oil revealed up to 24 different compounds comprising 89.60% of the essential oil. Major compounds are sesquiterpenes: copaene (9.63%) β -elemene (10.56%) and γ muurolene (11.37%). Unidentified components comprise 10.40 % of the essential oil.

Table 2: Chemical composition of *Piper umbellatum* leaf essential oil

Elution order	Compounds	Percentage	Kovat retention index	
			Npo.	Po.
1.	α -pinene	6.23	931	1035
2.	camphene	1.83	944	1063
3.	β -pinene	1.83	971	1132
4.	β -myrcene	4.60	981	1161
5.	limonene	1.56	1022	1203
6.	Z- β -ocimene	1.33	1025	1242
7.	E- β -ocimene	2.63	1037	1247
8.	linalool	1.27	1086	1533
9.	L-borneol	2.45	1153	1719
10.	terpinen-4-ol	2.96	1163	1611
11.	p-menth-1-en-8-ol	5.32	1280	-
12.	copaene	9.63	1375	1491
13.	β -elemene	10.56	1386	1577
14.	caryophyllene	1.37	1419	1612
15.	α -caryophyllene	1.18	1453	-
16.	γ -muurolene	11.37	1473	1689
17.	germacrene D	3.92	1480	1708
18.	α -farnesene	1.90	1496	1744
19.	δ -cadinene	2.30	1513	1765
20.	calamenene	1.14	1532	-
21.	z-nerolidol	4.56	1550	2036
22.	caryophyllene oxyde	1.95	1567	2001
23.	α -eudesmol	1.6	1652	2227
24.	phytol	6.1	2116	2613
	Total	89.6%	-	-

Analysis performed by gas chromatography with two Perkin Elmer instruments, a Clarus 500 GC gas chromatograph coupled to an MS Clarus 500 mass spectrometer. Individual

components were identified by the data processing software Turbomass 6.1 and the database for the comparison of mass spectra NIST MS Search 2.0.

Among these 24 identified compounds, α -pinene; β -pinene; β -myrcene; linalool and α -caryophyllene are reported effective on various insects and pest.

3.3 Larvicidal activity of *Piper umbellatum* leaf essential oil

The larvicidal potential of *P.umbellatum* leaf essential oil was assessed on mosquito larvae for 24 hours and 48 hours exposure period.

3.3.1 Larvicidal activity of *Piper umbellatum* leaf essential oil on 24 hours

During 24 hours exposure period, larvae of *Anopheles gambiae* S.L and *Culex quinquefasciatus* were facing each concentration of *Piper umbellatum* leaf essential oil. The table 3 presents the number of dead larvae recorded (with confident interval limit of 95.5%) corresponding to each concentration of essential oil.

Table 3: Larvicidal activity of *Piper umbellatum* leaf essential oil on *Anopheles gambiae* S.L and *Culex quinquefasciatus* on 24 hours

Populations		Nb of Larvae exposed	Nb of replicates	Essential oil concentration (%)	Mortality after 25 H	95% CI
<i>An.gambiae</i> S.L	Lab. strain	100	4	0.8	82+0.6	78-86
		100	4	0.6	59+2.224	43-74
		100	4	0.4	28+0.7	23-37
		100	4	0.2	9+0.25	7-10
		100	4	0.1	3+0.4	0.7-1.35
	Field strain	100	4	0.9	90+0.8	85-97
		100	4	0.8	64+0.4	61-67
		100	4	0.6	44+1.4	33-53
		100	4	0.4	15+0.4	12-18
		100	4	0.2	6+0.28	4-8
<i>Culex quinquefasciatus</i>		100	4	0.1	1+0.25	1-2
		100	4	0.2	76+0.4	73-79
		100	4	0.1	63+0.6	59-68
		100	4	0.05	50+0.8	45-57
		100	4	0.025	30+0.2	28-37
		100	4	0.0125	12+0.2	9-15

Lab: laboratory After 24 hours exposure, dead larvae were recorded and figure 1 was plotted.

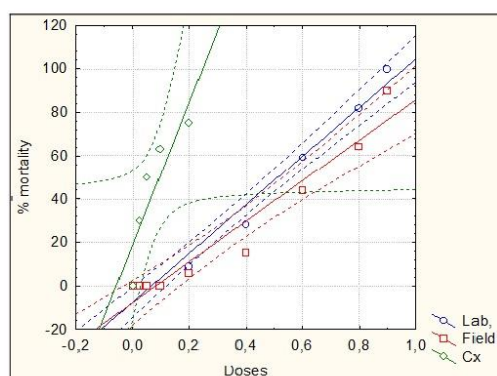


Fig 1: Larvicidal activity of *Piper umbellatum* leaf essential oil on *Anopheles gambiae* S.L and *Culex quinquefasciatus* after 24 hours

The regressions lines equations of the larval mortality after 24 hours exposure period corresponding respectively to

laboratory strain, field population of *An.gambiae* S.L and *Cx. quinquefasciatus* are:

$$Y_{lab} = -7.4117 + 112.0994X; Y_{field} = -7.6287 + 93.5476X \text{ and } Y_{Cx} = 19 + 328X.$$

The dose-response analysis showed that the larval mortality increases with essential oil concentration for each population ($H=3.25$; $p=0.02$). The lethal concentration killing 50 % (LC_{50}) of mosquitoes larvae after 24 hours exposure are: 0.51%; 0.61% and 0.09% respectively for laboratory strain, field population of *An. gambiae* S.L and *Culex quinquefasciatus*. While concentrations killing 95% (LC_{95}) of larvae are: 0.91%; 1.09% and 0.23% respectively.

3.3.2 Larvicidal activity of *Piper umbellatum* leaf essential oil on 48 hours

When the exposure is extended to 48 hours, mortality still increasing but the lethal concentrations killing 50% and 95% decrease respectively ($H=3.3$; $p=0.03$). The table 4 shows the mortality depending on essential oil concentration.

Table 4: Larvicidal activity of *Piper umbellatum* leaf essential oil on *Anopheles gambiae* S.L and *Culex quinquefasciatus* on 48 hours

Populations		Number of larvae exposed	Number of replicates	Essential oil concentration (%)	Mortality after 48H	95% CI
<i>An.gambiae</i> S.L	Laboratory strain	100	4	0.8	100	100-100
		100	4	0.6	83+1.1	74-89
		100	4	0.4	39+1.9	26-52
		100	4	0.2	19+0.7	14-24
		100	4	0.1	5+0.2	3-6
	Field population	100	4	0.9	98+0.2	96-100
		100	4	0.8	80+0.4	77-83

<i>Cx. quinquefasciatus</i>	100	4	0.6	99±0.28	98-101
	100	4	0.4	80±0.4	77-83
	100	4	0.2	66±0.28	64-68
	100	4	0.1	22±0.86	15-27
	100	4	0.05	7±0.25	6-9

Adult of *Culex quinquefasciatus* are more susceptible to *Piper umbellatum* leaf essential oil than adult of *Anopheles gambiae* S.L. However, adults of the field population of *An. gambiae* S.L. appear more tolerant to the essential oil activity ($H=6.93$, $p=0.012$) than the laboratory strain.

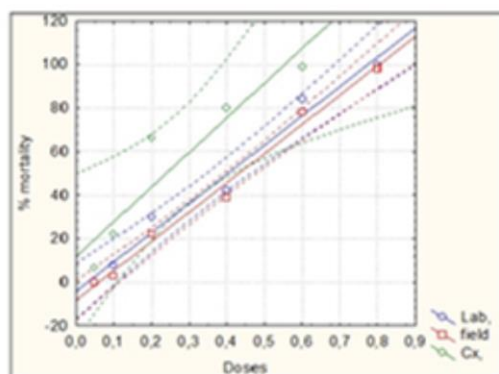


Fig 4: Adulticidal activity of *Piper umbellatum* leaf essential oil on *Anopheles gambiae* S.L. and *Culex quinquefasciatus*

The different regression lines equation of mortality managed for the adulticidal activity of *P. umbellatum* leaf essential oil are:

$$Y_{lab} = -4.147 + 134.36X; \quad Y_{field} = -8.228 + 134.59X \quad \text{and} \\ Y_{Cx} = 11.742 + 159.47X \text{ respectively}$$

The lethal concentrations killing 50% (LC_{50}) of adult mosquitoes are: 0.40%; 0.43% and 0.24% respectively for the laboratory strain, field population of *An. gambiae* S.L. and *Cx. quinquefasciatus*; while the lethal concentrations killing 95% (LC_{95}) of adult mosquitoes are: 0.73%; 0.76% and 0.52% respectively.

3.6-Identification of the field population of *Anopheles gambiae* S.L. and *Culex quinquefasciatus*

Mosquitoes from the laboratory strain are all *An. coluzzii*. Further analysis was performed with 71 adult females of the field population to identify the members of *An. gambiae* complex. The analysis reveals that 3 (4.23%) were *An. gambiae* s.s. and 68 (95.77%) were *An. coluzzii*. The morphological analysis of 200 adult mosquitoes from the breeding site of *Cx. quinquefasciatus* showed that 4 (2%) were *An. coluzzii*; 14 (7%) were *Cx. perfunctorius* and 182 (92%) were *Cx. quinquefasciatus*.

4. Discussion

The extraction yield of *P. umbellatum* leaf essential oil is very low (0.012%) in comparison with the yield of others plants treated under the same conditions. The study conducted with plant cultivated in Cameroon exhibited a yield of 0.59% to 0.95% [39]. Many factors could be advocated to explain this result: botanical specificity,

harvesting period and the method of extraction. Further study might elucidated this result and improve the extraction yield.

The chemical analysis of the essential oil revealed a mixture of many components of which up to 24 different compounds were identified. Others components comprising 10.4% of the essential oil remain undetermined. More sophisticated apparatus for analysis could allow the determination of these compounds. The chemical composition of *P. umbellatum* leaf essential oil shows the presence of monoterpenes and sesquiterpenes reported effective against insects and bacteria. These findings explain the effectiveness of *P. umbellatum* leaf essential oil on *An. gambiae* S.L. and *Cx. quinquefasciatus*. Thus, many studies demonstrated the efficacy of monoterpenes: α -pinene, β -pinene, myrcene, limonene, linalool and borneol against the third instar larvae of *An. gambiae* S.L. [40], *Culex pipiens pallens*, *Aedes aegypti*, *Ochlerotatus togoi* [41] *Aedes albopictus* [42]. In addition, sesquiterpenes: β -caryophyllene and β -elemene are reported toxic against the third instar larvae of *An. subpictus*, *Ae. aegypti* and *Cx. tritaeniarhynchus* [43], caryophyllene oxide and germacrene D against *An. anthropophagus* [44]. These compounds are also known to be effective against Protozoa and Bacteria. Therefore β -pinene, myrcene and limonene are reported effective against *Trypanosoma brucei brucei* [45]. Monoterpenes linalool and limonene are effective against *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Escherichia coli* [46]. The efficacy of *P. umbellatum* leaf essential oil on mosquito larvae suppose many pathway. One of the actions might consist on the morphological damages on the larvae exoskeleton by inhibition of chitin synthesis and thus reduce the deposition of cuticle layers [47]. The knockdown activity on adult mosquitoes that occurs shortly after contact with the impregnated mosquito net reflects the action of the essential oil compounds on adult mosquitoes. Indeed the sudden paralysis that occurs, involves a direct action on the insect nervous system. This effect increases with the dose of essential oil and the exposure time. The mortality that follows 24 hours post exposure shows the toxicity of the essential oil of *P. umbellatum*. Several authors have demonstrated the effectiveness of the compounds found in *P. umbellatum* leaf essential oil on adult mosquitoes. Thus, compounds such as linalool, germacrene D are effective against *An. subpictus* [43], *An. gambiae* [48]; α -pinene, limonene, β -ocimene against *An. stephensi*, [49]; terpinen-4-ol, germacrene D against *An. anthropophagus*; myrcene against *An. gambiae* [39] and *An. funestus* [50]; caryophyllene oxide against *An. gambiae* [51]. Terpinen-4-ol, α -pinene and β -pinene are effective against the stored product insects *Sitophilus zeamais* and *Tribolium castaneum* [52]. *Piper umbellatum* leaf essential oil compounds, α -pinene and β -pinene inhibit the Acetylcholinesterase activity [53]. Other studies have shown the repulsive properties of Phytol, one of the important compounds of the essential oil of *P. umbellatum* on *An. gambiae* major vector of malaria. Further studies could focus on field trials in order to well establish the efficacy of

<i>Cx. quinquefasciatus</i>	100	4	0.6	57±0.8	52-63
	100	4	0.4	29±0.4	26-32
	100	4	0.2	10±0.2	8-12
	100	4	0.1	2±0.2	0-4
	100	4	0.2	100	100-100
	100	4	0.1	84±0.4	81-87
	100	4	0.05	66±0.6	62-70
	100	4	0.025	43±0.4	40-46
	100	4	0.0125	17±0.4	14-20
	100	4			

The regression lines equations of the larval mortality after 48 hours exposure are respectively:

$$Y_{lab} = -5.0201 + 125.9126X; Y_{field} = -5.4336 + 95.2528X \text{ and}$$

evolves with the duration of exposure for each population ($H=3.41$; $p=0.02$).



19. Edi CV, Djogbe'nou L, Jenkins AM, Regna K, Muskavitch MAT, Poupardin R et al. CYP6 P450 Enzymes and ACE-1 Duplication Produce Extreme and Multiple Insecticide Resistance in the Malaria Mosquito *Anopheles gambiae*. PLOS Genetics. 2014; 10(3):e1004236:1-12
20. Wondji CS, Colemana M, Kleinschmidt I, Mzilahowac T, Irvinga H, Ndulaa M, et al. Impact of pyrethroid resistance on operational malaria control in Malawi. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1217229109 2012; 109(47):1-8.
21. Sharififard M, Safdari F, Siahpoush A, Kassiri H. Evaluation of Some Plant Essential Oils against the Brown-Banded Cockroach, *Supella longipalpa* (Blattaria: Ectobiidae): A Mechanical Vector of Human Pathogens. J Arthropod-Borne Dis. 2016; 10(4): 528–537
22. Gnankiné O, Bassolé I H N. Essential Oils as an Alternative to Pyrethroids' Resistance against *Anopheles* Species Complex Giles (Diptera: Culicidae). Molecules. 2017; 22, 1321
23. Pavela R. Essential oils for the development of eco-friendly mosquito larvicides. Ind. Crops products. 2015; 76:174-187
24. Ahmad S, Shafiq Ansari M. Acute toxicity and sub-lethal effects of a pyrethroid (cypermethrin) on survival, development and fitness of *Helicoverpa armigera*. Arch. Phytopathol. Plant Protect. 2013; 46(14):1726-1739.
25. Foko Dadjé GA, Bobo Ngowe MP, Nyegue MA, Tamesse JL. Chemical composition and biocide properties of *Clausena anisata* (Rutacea) essential oil against the development stages of the malaria vector *Anopheles coluzzii*. AJEONP. 2018; 6(1):09-15.
26. Akono P, Belong P, Tchoumboungang F, Bakwo EM, Fankem H. Composition chimique et effets insecticides des huiles essentielles des feuilles fraîches d'*Ocimum canum* Sims et d'*Ocimum basilicum* L. sur les adultes d'*Anopheles funestus* s.s., vecteur du paludisme au Cameroun. J Appl. Biosci. 2012; 59:4340-4348.
27. Núñez V, Castro V, Murillo R, Ponce-Soto LA, Merfort I, Lomonte B. Inhibitory effects of *Piper umbellatum* and *Piper peltatum* extracts towards myotoxic phospholipases A2 from Bothrops snake venoms: Isolation of 4-nerolidylcatechol as active principle. J Phytochem. 2005; 66(9):1017-1025.
28. Da Silva IFJ, De Oliveira RG, Soares IM, Da Costa Alvim T, Ascêncio SD, De Oliveira Martins DT. Evaluation of acute toxicity, antibacterial activity, and mode of action of the hydroethanolic extract of *Piper umbellatum* L. J Ethnopharmacol. 2014; 151:137-143.
29. Price DP, Schilkey FD, Ulanov A, Hansen IA. Small mosquitoes, large implications: crowding and starvation affects gene expression and nutrient accumulation in *Aedes aegypti*. Paras Vectors. 2015; 8:252-266.
30. Vantaux A, Ouattara I, Lefèvre T, Dabiré KR. Effects of larvicidal and larval nutritional stresses on *Anopheles gambiae* development, survival and competence for *Plasmodium falciparum*. Paras Vectors. 2016; 9:226-237.
31. WHO. Guidelines for Laboratory and Field Testing of Mosquito Larvicides. Geneva: World Health Organization, 2005.
32. WHO. Test procedures for insecticide resistance in malaria vector Mosquitoes. Geneva: World Health Organization, 2013, 1-40.
33. Wang X, Li O, Shen L, Yang J, Cheng H, Jiang S, et al. Fumigant, contact, and repellent activities of essential oils against the darkling beetle, *Alphitobius diaperinus*. J. Insect science. 2014; 14:75.
34. Faraone N, Hillier NK, Cutler GC. Plant Essential Oils Synergize and Antagonize Toxicity of Different Conventional Insecticides against *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). PLoS ONE. 2015; 10(5):e0127774.
35. Giles MT, Coetzee MA. Supplement to the Anophelinae of Africa South of the Sahara. South Af. Inst. Med. Res. 1987; 55:146.
36. Reuben R, Tewari SC, Hiriyani J, Akiyama J. Illustrated Keys to species *Culex* (*Culex*) associated with Japanese encephalitis in Southeast Asia (Diptera: Culicidae). Mosq Syst. 1994, 26(2):75-96.
37. Livak KJ. Organization and mapping of sequence of *Drosophila melanogaster* X-chromosome and Y-chromosome that is transcribed during spermatogenesis. Genetics. 1984; 107:611-634.
38. Santalamazza F, Mancini E, Simard F, Qi Y, Tu Z, Della Torre A. Insertion polymorphism of SINE200 retrotransposons within speciation island of *Anopheles gambiae* molecular forms. Malar J. 2008; 7:163.
39. Tchoumboungang F, Jazet Dongmo PM, Sameza ML, Nkouaya Mbanjo EG, Tiako Fotso GB, Amvam Zollo PH, et al. Activité larvicide sur *Anopheles gambiae* Giles et composition chimique des huiles essentielles extraites de quatre plantes cultivées au Cameroun. Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 2009; 13(1):77-84.
40. Kweka EL, Lima TC, Marciale CM, De Souza DP. Larvicidal efficacy of monoterpenes against the larvae of *Anopheles gambiae*. Asian Pac. J Trop Biomed. 2016; 6(4):290-294.
41. Perumalsamy H, Kim NJ, Ahn YI. Larvicidal Activity of Compounds Isolated from *Asarum heterotropoides* Against *Culex pipiens pallens*, *Aedes aegypti*, and *Ochlerotatus togai* (Diptera: Culicidae). J. Med. Entomol. 2009; 46(6):1420-1423.
42. Liu XC, Liu QY, Zhou L, Liu ZL. Larvicidal Activity of Essential Oil Derived from *Illicium henryi* Diels (Illiciaceae) Leaf. Trop J Pharm Res. 2015; 14(1):112.
43. 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). Exp. Parasitol. 2013(134):7-11.
44. Zhu L, Tian Y. Chemical composition and larvicidal activity of essential oil of *Artemisia gilvescens* against *Anopheles anthropophagus*. Parasitol Res. 2013; 112:1137-1142.
45. Kpoviessi S, Bero J, Agbani P, Gbaguidi F, Kpadonou-Kpoviessi B, Sinsin B, et al. Chemical composition, cytotoxicity and *in vitro* antitrypanosomal and antiplasmodial activity of essential oils from *Cymbopogon* species from Benin. J. Ethnopharm. 2013; http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2013.11.027
46. Soković M, Glamočlija J, Marin PD, Brkić D and van Griensven LJLD. Antibacterial Effects of the Essential Oils of Commonly Consumed Medicinal Herbs Using an In Vitro Model. Molecules. 2010(15):7532-7546.

47. Pratti DLA, Ramos AC, Scherer R, Cruz ZMA, Silva AG. Mechanistic basis for morphological damage induced by essential oil from Brazilian pepper tree, *Schinus terebinthifolia*, on larvae of *Stegomyia aegypti*, the dengue vector. *Paras. Vect.* 2015; 8:136.
48. Matasyoh JC, Wathuta EM, Kariuki ST, Chepkorir R. Chemical composition and larvicidal activity of *Piper capense* essential oil against the malaria vector, *Anopheles gambiae*. *J. Asia Pac. Entomol.* 2011; 14:26-28.
49. Dharmagadda VSS, Naik SN, Mittal PK, Vasudevan P. Larvicidal activity of *Tagetes patula* essential oil against three mosquito species. *Bioresour. Technol.* 2005; 96:1235-1240.
50. Ntonga PA, Baldovini N, Mouray E, Mambu L, Belong P, Grellier P. Activity of *Ocimum basilicum*, *Ocimum canum* and *Cymbopogon citratus* essential oils against *Plasmodium falciparum* and mature-stage larvae of *Anopheles funestus* s.s. *Paras Vect.* 2014; 21:33.
51. Bossou AD, Manginckx S, Yedomonhan H, Boko PM, Akogbeto MC, De Kimpe N, *et al.* Chemical composition and insecticidal activity of plant essential oils from Benin against *Anopheles gambiae* (Giles). *Paras Vect.* 2013; 6:337.
52. Suthisut D, Fields PG, Chandrapatya A. Fumigant toxicity of essential oils from three Thai plants (*Zingiberaceae*) and their major compounds against *Sitophilus zeamais*, *Tribolium castaneum* and two parasitoids. *J Stored Prod Res.* 2011; 47:222-230.
53. Kim SW, Kang J, Park IJK. Fumigant toxicity of Apiaceae essential oils and their constituents against *Sitophilus oryzae* and their acetylcholinesterase inhibitory activity. *J Asia-Pacific Ent.* 2013; 16:443-448.



Effectiveness of the mixture of *Cannabis sativa* L and *piper umbellatum* leaves essential oils with temephos and permethrin on major vectors *Anopheles gambiae* S.L and *Culex quinquefasciatus*

Henri Abé^{1,2*}, Gisèle Aurélie Foko Dadji², Elie Baudelaire Ndjantou^{3,4}, Dicko Amadou⁴, Joseph Lebel Tamesse²

¹ Department of Animal Biology and Physiology, Faculty of Science, University of Yaounde I, Cameroon

² Higher Teachers' Training College of the University of Yaounde I, Cameroon

³ National School of AgroIndustrial Sciences (ENSAI), University of Ngaoundere, Adamawa, Cameroon

⁴ Laboratory of Physic and chemistry, Jean Baritot Institute, University of Lorraine Metz, France

Abstract

Most of Arthropods borne diseases are endemic in tropical regions and especially in Sub-Sahara Africa. Synthetic insecticides use for vector control remain the first line of defence but they are associated with high toxicity, vector resistance, environmental adverse and limited alternative. The mixture of conventional insecticide with plant essential oil can be an alternative. Our study was undertaken to evaluate the efficacy of the mixture of *Cannabis sativa* L and *Piper umbellatum* leaves essential oil with permethrin and temephos on two major vectors *Anopheles gambiae* S.L and *Culex quinquefasciatus* under laboratory conditions.

Cannabis sativa L and *Piper umbellatum* Leaves essential oils were extracted by hydro distillation with Clavenger type apparatus. The chemical analysis of essential oils was carried out by GC-FID and GC-MS respectively for *Cannabis sativa* L and *Piper umbellatum*. Based on literature the LC₅₀ for permethrin and temephos were found by serial dilution. These constant concentrations were mixed with increasing sublethal concentrations of *Cannabis sativa* L and *Piper umbellatum* leaves essential oil. Bioassays were performed on the larvae and female adults of field population of *Anopheles gambiae* S.L and *Culex quinquefasciatus* according to the WHO and CDC guidelines. Probit regression was used to calculate the LC₅₀ and LC₉₅ of each mixture. The Kruskal Wallis test was used to assess the significance of difference on the mortality rate between treatments.

The mixture of temephos with essential oils is effective on larvae while the mixture of essential oils with permethrin is toxic for adult female of *Anopheles gambiae* S.L and *Culex quinquefasciatus*. The mortality is essential oil dose-dependent. For larvicidal activity, the LC₅₀ and LC₉₅ after 24 hours exposure for the mixture of *Cannabis sativa* L leaf essential oil with temephos were: 0.14%; 0.002% and 0.35%; 0.026% respectively for *Anopheles gambiae* S.L and *Culex quinquefasciatus*; while these values for the mixture of *Piper umbellatum* leaf essential oil with temephos were: 0.30%; 0.0011% and 0.64%; 0.024% respectively for *Anopheles gambiae* S.L and *Culex quinquefasciatus*. After 48 hours exposure the LC₅₀ and LC₉₅ for the mixture of *Cannabis sativa* L leaf essential oil with temephos were: 0.011%; 0.0013% and 0.17%; 0.013% while for the mixture of *Piper umbellatum* leaf essential oil with temephos these values were: 0.023%; 0.001% and 0.38%; 0.015% respectively for *Anopheles gambiae* S.L and *Culex quinquefasciatus*. For the knock down activity of the mixture of *Piper umbellatum* leaf essential oil with permethrin, time necessary for knocking down 50% and 95% of exposed mosquito are: 27±0.4min; 14±0.8min and 53±0.6min; 52±0.14min respectively for *Anopheles gambiae* S.L and *Culex quinquefasciatus*. For *Cannabis sativa* L leaf essential oil mixture, time necessary for knocking down 50% and 95% of exposed mosquitoes are: 16±0.75min; 8±0.15min and 53±0.94min; 53±0.6min respectively for *Anopheles gambiae* S.L and *Culex quinquefasciatus*. For adulticidal activity, the LC₅₀ and LC₉₅ for the mixture of *Piper umbellatum* leaf essential oil with permethrin were: 0.024%; 0.011% and 0.18%; 0.17% respectively for *Anopheles gambiae* S.L and *Culex quinquefasciatus*; while for the mixture of *Cannabis sativa* L leaf essential oil these values were: 0.027%; 0.011% and 0.18%; 0.15% respectively for *Anopheles gambiae* S.L and *Culex quinquefasciatus*.

Conclusion: The mixtures of *Cannabis sativa* L and *Piper umbellatum* leaves essential oils with temephos and permethrin showed the efficacy with low concentrations against larvae and adult female of field population of *Anopheles gambiae* S.L and *Culex quinquefasciatus*.

Keywords: *Anopheles gambiae* S.L, *Culex quinquefasciatus*, *Cannabis sativa* L, *Piper umbellatum*, temephos, permethrin, essential oils mixture, insecticide

Introduction

Arthropod borne diseases and particularly malaria remain a serious public health issue in Africa. The prevention of these vector-borne diseases is based on the use of synthetic insecticides (Zaim *et al.*, 2002) [1]. However, all efforts made to eradicate these diseases, although making progress in recent years, are limited. Indeed, the modification of the

environment by anthropic activities such as agriculture (Nkya *et al.*, 2014; Janko *et al.*, 2018) [2, 3] urbanization (Oladejo *et al.*, 2010; Pimmon *et al.*, 2018) [4, 5] industries are at the origin of vectors resistance to conventional insecticides. Other factors also contribute to the development of vector resistance: the application of the same insecticides in a locality where resistance to these

insecticides is proven, and the under dosage of insecticides (Diniz *et al.*, 2015) [6]. This resistance is expressed in various ways in target insects: avoidance behaviour of the insecticide (Agossa *et al.*, 2015; Carasso *et al.*, 2019), rapid degradation of the insecticide by detoxification (Ibrahim *et al.*, 2016) [9], modification of the site of fixation of the insecticide (Lynd *et al.*, 2018; Alout *et al.*, 2008) [11, 12], cuticular structures that prevent the penetration of insecticides (Wang *et al.*, 2019; Ingham *et al.*, 2018) [13, 14]. Based on the findings on the hazardous effects of synthetic insecticides on the environment and resistance of vectors, several authors have proposed alternatives including the use of bio pesticides (Gnaniké *et al.*, 2017; Bolzonella *et al.*, 2019) [15, 16] because they are non-toxic for non-target organisms, biodegradable and offer the advantage of being composed of several active ingredients. Unfortunately, all the tests proposed in this way remain limited to the tests carried out in the laboratory. Thus, the essential oils although effective are very volatile. A combination of raw plant extracts or essential oils with synthetic insecticides can be an alternative to the vector resistance and the adverse effect of synthetic insecticides.

In the present study, we evaluated the effectiveness of the combination of *Cannabis sativa* L and *Piper umbellatum* leaves essential oils with temephos and permethrin on two major vectors, *Anopheles gambiae* S.L and *Culex quinquefasciatus* under laboratory conditions. In our previous work, the essential oils from the leaves of the two plants were found to be effective on the larvae and adults of *Anopheles gambiae* S.L and *Culex quinquefasciatus* under laboratory conditions (Abé *et al.*, 2018; Abé *et al.*, 2019) [17, 18]. Besides, these two plants are used worldwide for several purposes. *Cannabis sativa* L is known not only for its psychotropic effects on human subjects, but also in chemotherapy against nausea, to improve the treatment of HIV / AIDS (Mechoulam *et al.*, 2002) [9], the treatment of pain (Manzanares *et al.*, 2006) [20], treatment of multiple sclerosis (Hagenbach *et al.*, 2001) [21] and Alzheimer's disease (Milton, 2002) [22], the treatment of cancer due to its antiproliferative effect (Galve-Roperh *et al.*, 2000). The crude extract of *Piper umbellatum* non-toxic for small mammals (Da Silva *et al.*, 2014) [24] appears to be effective against phospholipase of myotoxic venom of snake (Núñez *et al.*, 2005) [25], exhibits protective and healing properties against stomach ulcers on an experimental basis in rodents (IF da Silva Junior *et al.*, 2016) [26], anti-cancer and anti-inflammatory in Brazil (Hesportre Iwamoto *et al.*, 2015); is effective in treating injuries in Cuba (Salehi *et al.*, 2019) [27] and in West Africa in several tribes (Setzer *et al.*, 1999) [28]; to treat fever in Peru and onchocerciasis in Cameroon (Chon-Ngwa *et al.*, 2016) [29]. *Piper umbellatum* is also used to treat kidney diseases, skin, burns, diarrhea, rheumatism, malaria and intestinal parasites (Roersch, 2010) [30].

Materials and Methods

Plant material

The leaves of *Piper umbellatum* were harvested in the morning at the University of Yaounde I campus while the *Cannabis sativa* L leaves were harvested in the village of Salla in the district of Ayos. Before hydro distillation, plants were identified at National Herbarium in comparison with the numbers of the collectors. For *Piper umbellatum*: R. Letouzey 2499 of the specimen number 3614SRFK, the specimen was classified as belonging to *Piperaceae* family

and for *Cannabis sativa* L the specimen was identified under the number 3614SRFK and classified as belonging to *Cannabaceae* family.

Essential oil extraction and synthetic insecticide collection

The plant leaves essential oil extraction took place in the laboratory of the department of Microbiology of the University of Yaounde I using a Clavenger type apparatus. This extraction was performed in several sessions, each session during 6 hours in order to allow a maximum extraction. The essential oils were collected in a dark bottle, dried using anhydrous magnesium sulphate and stored at 4°C, away from UV rays before use. The mass of plants used and extraction yield are presented in table 2. The synthetic insecticides for our bioassays (permethrin and temephos) were provided by OCEAC (Organisation de Coordination pour la lutte Contre les Endémies en Afrique Centrale) with reference of AL International industry (France).

Chemical analysis of *Piper umbellatum* and *Cannabis sativa* L leaves essential oils

The chemical analysis took place at two different laboratories: At Lorraine University, France, for *P. umbellatum* and at the National Institute of the Analytic Science of Paris for *C. sativa* L. The chemical analysis of *Piper umbellatum* leaf essential oil was performed by Gas Chromatography, coupled with Mass Spectrometry. The analysis was performed with two Perkin Elmer instruments, a Clarus 500 GC gas chromatograph coupled to an MS Clarus 500 mass spectrometer.

The column used in chromatography was an Elite 5MS (5% Diphenyl / 95% DimethylPolysiloxane stationary phase) 30 m long, with an internal diameter of 0.25 mm and a film thickness of the 0.25 µm stationary phase. The carrier gas was helium with a flow rate of 0.75 mL / min.

The injector was brought to 300 °C, the program begins with a step of 3 min at 60 °C and the temperature increases from 10 °C / min to 300 °C where a step of 3 min is performed.

The acquisition of the mass spectrum was carried out on an m / z range of between 20 and 400 with 0.1 scan / s and an electron ionization energy of 70 eV. The temperature of the source and the transfer line were 250 °C.

The sample to be analysed was solubilized in a small volume of dichloromethane.

The data processing software was Turbomass 6.1 and the database for the comparison of mass spectra were NIST MS Search 2.0.

For *Cannabis sativa* L leaf essential oil, the determination of retention data and the area percentage of the identified compounds were carried out on a two GC-FID systems:

1- An Agilent 5890 system equipped with HP-1 (ref: 1909 1 Z-115) column (50m x 320µm; 0.5 µm film thickness). GC oven temperature was kept at 80 °C for 8 minutes and programmed to 220 °C at the rate of 2 °C/min;

2- An Agilent 6890 system equipped with HP-Innowax (ref: 1909 1 N-216, Agilent Technologies, Santa Clara, CA 95051, USA) column (60 m x320µm,0.5µm film thickness).GC temperature was kept at 60 °C and programmed to 245 °C at the rate of 2 °C/min, then constant at 250 °C for 20 min.

The split ratio was adjusted to 1/100. The injector

temperature was 250 °C and the FID detector was kept at 250 °C. The carrier gas was Helium (1.3ml/min). Gas chromatography- Mass spectrometry was carried out using the first system Agilent 5890 equipped with HP-1column. The mass spectra was recorded in the electron impact mode at 70 eV using the aforementioned chromatographic conditions. Individual components of *Cannabis sativa* L leaves essential oil were identified by their retention index as described in Adams (2012) and their mass spectra were interpreted using the WILEY L computer library

Mosquito's collection

For our bioassays, we used the larvae and adult female of wild population of *Anopheles gambiae* S.L and *Culex quinquefasciatus*. The aquatic stages of *Anopheles gambiae* S.L were collected in Yaounde down town, near river Ewoé (N 03°51'34.9'' and E 011°31'3''). *Culex quinquefasciatus* were sampled at Melen pound behind the Faculty of medicine and Biomedical Sciences of the University of Yaounde I (N 03°85'63.1'' and E 011°48'49.4''). Mosquitoes collected were reared in the insectary of the

Higher Teachers' Training College of the University of Yaounde I at 25-27°C and 75-78% relative humidity under photoperiod 12L: 12D. Larvae were fed with Tetramin Baby Fish Food at a rate of 2.5mg for 100 larvae per day (Price *et al.*, 2015, Vantaux *et al.*, 2016). The pupae were collected in plastic cups and placed in emergence cages. Adults from the pupae were fed using a 10% glucose solution. *Anopheles gambiae* S.L and *Culex quinquefasciatus* third and early four instars larvae and female aged of 2-5 days old were used to carry out bioassays.

Preparation of tests solutions

Base on literature, we have previously determined the discriminatory doses of temephos (WHO, 2016) and permethrin (WHO, 2013) causing less than 98% of larval and adult mortality respectively. Absolute alcohol has been used for a serial dilution of synthetic insecticides and essential oils according to the WHO Protocol, (2005). We then mixed the given concentrations of essential oils with constant concentrations (CL₅₀) of temephos (0.6%) and permethrin (0.375%) according to Pennetier Protocol (Pennetier *et al.*, 2008) (table 1).

Table 1: Protocol of mixing essential oils with temephos and permethrin (synthetic insecticides)

Concentration of synthetic insecticide (%)	Essential oil concentration (%)	Volume of synthetic insecticide (ml)	Volume of essential oil (ml)	Final volume (ml)	Final concentration of essential oil (%)
Temephos	<i>C.sativa</i> L				
0.6	0.4	3	3	6	0.2
0.6	0.2	3	3	6	0.1
0.6	0.1	3	3	6	0.05
0.6	0.05	3	3	6	0.025
0.6	0.025	3	3	6	0.0125
0.6	0.0125	3	3	6	0.00625
0.6	0.00625	3	3	6	0.003125
0.6	0.003125	3	3	6	0.0015625
Temephos	<i>P.umbellatum</i>				
0.6	0.8	3	3	6	0.4
0.6	0.4	3	3	6	0.2
0.6	0.2	3	3	6	0.1
0.6	0.1	3	3	6	0.05
0.6	0.05	3	3	6	0.025
0.6	0.025	3	3	6	0.0125
0.6	0.0125	3	3	6	0.00625
0.6	0.00625	3	3	6	0.003125
0.6	0.003125	3	3	6	0.0015625
Permethrin	<i>C.sativa</i> L				
0.375	0.4	3	3	6	0.2
0.375	0.2	3	3	6	0.1
0.375	0.1	3	3	6	0.05
0.375	0.05	3	3	6	0.025
0.375	0.025	3	3	6	0.0125
permethrin	<i>P.umbellatum</i>				
0.375	0.4	3	3	6	0.2
0.375	0.2	3	3	6	0.1
0.375	0.1	3	3	6	0.05
0.375	0.05	3	3	6	0.025
0.375	0.025	3	3	6	0.0125

Temephos and permethrin provided by AI International industry (France)

Bioassays

Bioassay with larvae

The larvicidal potential of the essential oil mixture of each plant with temephos was evaluated on field mosquito larvae for 24 hours and 48 hours exposure period.

Larvae of third and early four instars were used to assess the

larvicidal activity of the mixture of *Piper umbellatum* and *Cannabis sativa* L leaves essential oil with temephos, following WHO Guidelines for Laboratory and Field Testing of Mosquito Larvicides (WHO, 2005). Before running the test, larvae were maintained during one hour in distilled water for observation. Tests concentrations were

prepared by adding 1ml of appropriate concentration of the mixture to disposable test cups containing 99 ml of spring water. Batches of 25 larvae of third and early four instars were transferred from observation cups to test cups. Four replicates were run for each concentration and an equal number of controls were run as well. The positive control was prepared by adding 1ml of temephos (0.6%) to 99 ml of spring water. Maintaining the constant concentration of temephos(0.6%) for the mixture, eight different concentrations of *Cannabis sativa* L leaf essential oils were used (0.2%; 0.1%; 0.05%; 0.025%; 0.0125%; 0.00625%; 0.003125% and 0.00156%). For *Piper umbellatum* leaf essential oil, nine different concentrations (0.4%; 0.2%; 0.1%; 0.05%; 0.025%; 0.0125%; 0.00625%; 0.00325% and 0.00125%) were also used against the larvae of *Anopheles gambiae* S.L and *Culex quinquefasciatus*. Each test was conducted three times on different days. No food was added to cups during the exposure period. Larvae were considered dead, when they were incapable of any movement or not swimming actively when touch. The mortality rate was recorded after 24 and 48 hours of exposure. The lethal concentrations of essential oil killing 50% and 95% of exposed larvae (LC₅₀ and LC₉₅) to the mixture were calculated using a log probit approach with STATISTICA software version 6.0.

Bioassay with adult

Adult bioassays were performed with 2-5 days- old non-blood- fed females following the WHO(2013) and CDC(2013) Guidelines with cone using impregnated bed net with the mixture at the following concentrations of essential oils: 0.0125%, 0.025%, 0.05%; 0.1% and 0.2% for *Anopheles gambiae* S.L and *Culex quinquefasciatus*. The concentration of permethrin was constant in the mixture (0.375%). Absolute alcohol was used to dilute the essential oil at the various concentrations before mixing and 3ml of each concentration was used to impregnate a portion of bed net (98.47cm²). Due to the high volatility of essential oils, pieces of net prepared as indicated above were dried at room temperature away from sun light for 15 minutes before carrying susceptibility assays (Wanng *et al.*, 2014, Faraone *et al.*, 2015) [39]. Before each test, female mosquitoes were transferred from the cages to the cup for one hour and specimens with broken legs or unable to fly were discarded and replaced. Twenty replicates of batches of 5 female mosquitoes per cone were exposed to each concentration of the mixture for 1hour. Five replicates were run as control using a portion of net impregnated only with permethrin at

0.375%. Considering only the higher concentration of each essential oil, the number of knock down (KD) mosquitoes was recorded at 10 minutes intervals during 1 hour exposure period and the time required for knocking down 50% and 95% of the individuals(KDT₅₀ and KDT₉₅) estimated with 95% of confident interval. After the exposure period, mosquitoes were transferred back to recovery cups and provided with 10% of glucose solution soaked on cotton pad. Mosquito mortality was recorded 24 hours post-exposure; individuals with broken legs or not able to fly were also considered as dead. After the tests, adult mosquitoes of *Anopheles gambiae* S.L from field population and *Culex quinquefasciatus* were kept in Eppendorf tubes at -4°C for identification.

Adult mosquito identification

Adults female of the field population of *Anopheles gambiae* S.L were morphologically identified using the Gillies and Coetzee key (1987) while *Culex quinquefasciatus* mosquito were identified using Peter Gupp (1996) and Reuben (1994) keys. Genomic DNA of *An.gambiae* S.L was extracted according to the Livak protocol (1984) and molecular identification of females was conducted according to Santolamazza *et al* protocol (2008). As for the adult females of *Culex quinquefasciatus*, their molecular identification was not possible because the TAG MANN device used did not allow it.

Data analysis for Bioassays

The lethal concentrations inducing 50% and 95% (LC₅₀ and LC₉₅) larval mortality were calculated using log probit approach with WINDL CIRAD-CA software version 2.0 and STATISTICA software version 6.0 to plot the graphs. The relation between the exposure time, the mortality and the doses was assessed using probit regression.

For the adulticidal activity, the time at which 50% and 95% of adult mosquitoes were knocked down (Knock down time, KTD₅₀ and KDT₉₅) and the LC₅₀ and LC₉₅ were calculated using WINDL CIRAD-CA software version 2.0. The relation between the knock down time, mortality and the doses were assessed using probit regression.

Results

Yield of *Piper umbellatum* and *Cannabis sativa* L Essential oil

The table 2 below provides characteristics of *Piper umbellatum* and *Cannabis sativa* L leaves

Table 2: The oil yield of *Piper umbellatum* and *Cannabis sativa* L

Plant name	Family	Certification number	Leaves weight(g)	Essential oil weight(g)	Extraction yield
<i>Piper umbellatum</i>	<i>Piperacea</i>	3614SRFK	7390.8g	0.9g	0.012%
<i>Cannabis sativa</i> L	<i>Cannabaceae</i>	25967SRF/Cam	3,375g	1.5g	0.044%

The extraction yield of *Piper umbellatum* and *Cannabis sativa* L leaves essential oils were very low and therefore require a huge mass of plant to obtain a volume of essential oils sufficient for biological assays. A better method of extraction, the judicious choice of the period of harvesting and the control of some edaphic factors could allow a good yield.

Chemical composition of *Piper umbellatum* and *Cannabis sativa* L leaves essential oils

The chemical analysis of *Piper umbellatum* leaf essential oil revealed up to 24 different compounds comprising 89.60% of the essential oil. Major compounds were sesquiterpenes: copaene (9.63%) β-elemene (10.56%) and γ-murolene (11.37%). Unidentified components comprise 10.40 % of the essential oil.

Table 3: Chemical composition of *Piper umbellatum* leaf essential oil (Abé *et al.*, 2019)

Elution order	Compounds	Percentage	Kovat retention index	
			Npo.	Po.
1.	α -pinene	6.23	931	1035
2.	camphene	1.83	944	1063
3.	β -pinene	1.83	971	1132
4.	β -myrcene	4.60	981	1161
5.	limonene	1.56	1022	1203
6.	Z- β -ocimene	1.33	1025	1242
7.	E- β -ocimene	2.63	1037	1247
8.	linalool	1.27	1086	1533
9.	L-borneol	2.45	1153	1719
10.	terpinen-4-ol	2.96	1163	1611
11.	p-menth-1-en-8-ol	5.32	1280	-
12.	copaene	9.63	1375	1491
13.	β -elemene	10.56	1386	1577
14.	caryophyllene	1.37	1419	1612
15.	α -caryophyllene	1.18	1453	-
16.	γ -muurolene	11.37	1473	1689
17.	germacrene D	3.92	1480	1708
18.	α -farnesene	1.90	1496	1744
19.	δ -cadinene	2.30	1513	1765
20.	calamenene	1.14	1532	-
21.	z-nerolidol	4.56	1550	2036
22.	caryophyllene oxide	1.95	1567	2001
23.	α -eudesmol	1.6	1652	2227
24.	phytol	6.1	2116	2613
	Total	89.6%	-	-

Analysis performed by gas chromatography with two Perkin Elmer instruments, a Clarus 500 GC gas chromatograph coupled to an MS Clarus 500 mass spectrometer. Individual components were identified by their retention index as described in Adams (2012) and their mass spectra are interpreted using the WILEY L computer library. Constituents are presented in the order of elution from the columns. Npo: non polar; Po: polar

Among these 24 identified compounds of *P.umbellatum*, α -

pinene; β -pinene; β -myrcene; linalool and α -caryophyllene were reported effective on various insects and pest.

The chemical analysis of *Cannabis sativa* L leaf essential oil revealed up to 81 components unlike that of *Piper umbellatum* (table 4). The essential oil of *Cannabis sativa* L is also composed of monoterpenes and sesquiterpenes, the most abundant of which were α -pinene, β -pinene, myrcene, E- β -Ocimene, terpinolene, E- β -Caryophyllene and α -Humulene.

Table 4: The chemical composition of *Cannabis sativa* L leaf essential oil (Abé *et al.*, 2018)

Elution order	Compound	Percentage	Kovat indices	
			HP-1	Innowax
1.	Z-3-Hexenol	0.03	842	1380
2.	E-2--Hexenol	0.02	852	1408
3.	Heptanone-2	0.03	864	1182
4.	Hexenol	0.03	869	1351
5.	Heptanal	0.03	880	1185
6.	2-Amyl furan	0.01	884	1124
7.	α -Thujene	0.12	923	1032
8.	α -Pinene	8.12	931	1035
9.	Camphene	0.013	944	1063
10.	Octene-1-ol-3	0.03	961	1427
11.	6-Methyl-5-heptenone-2	0.005	964	1116
12.	Sabinene	0.12	967	1118
13.	β -Pinene	3.64	971	1132
14.	6- Methyl-5-hepten-2-ol	0.02	974	1163
15.	Myrcene	31.75	981	1159
16.	α -3-Carene	0.92	997	1011
17.	α -Phellandrene	0.42	998	1175
18.	α -Terpinene	0.31	1010	1188
19.	Hexylacetate	0.02	1010	1272
20.	P-Cymene	0.11	1014	1200
21.	Limonene	1.3	1022	1203
22.	1,8-Cineole+ β -phellandrene	1.29	1022	1213
23.	Z- β -Ocimene	1.10	1025	1242
24.	E- β -Ocimene	9.65	1037	1247
25.	γ -Terpinene	0.23	1049	1255
26.	E-Thujan-4-ol	0.03	1053	1463

27.	Fenchone+methyl benzoate	0.02	1072	-
28.	p-Cymene	0.09	1072	1437
29.	Terpinolene	14.76	1079	1290
30.	Nonanal	0.03	1083	1391
31.	Linalool	0.09	1086	1533
32.	Z-Thujan-4-ol	0.03	1092	-
33.	Perillen	0.02	1098	1429
34.	α -Fenchol	0.07	1100	1570
35.	Z-p- Menth-2-en-1-ol	0.03	1114	1570
36.	E-p- Menth-2-en-1-ol	0.07	1114	1571
37.	4E, 6Z- Allo-ocymene	0.01	1119	1375
38.	Ipsdienol	0.03	1125	-
39.	Epoxy terpinolene	0.05	1130	-
40.	Menthone	0.04	1136	1465
41.	Borneol	0.04	1153	1719
42.	P-Cymen-8-ol	0.12	1161	1864
43.	Terpinen-4-ol	0.07	1163	1611
44.	α -Terpineol	0.04	1175	1682
45.	Citronellol	0.02	1212	1764
46.	Hexyl butyrate +methylchavicol	0.06	1224	-
47.	E-Anethole	0.10	1264	1826
48.	α -Ylangene	0.20	1370	1490
49.	α -Copaene	0.01	1375	1491
50.	β -Elemene	0.02	1386	1577
51.	Isocaryophyllene	0.23	1408	-
52.	Z- α -Bergamotene	0.11	1410	1559
53.	α -Santalene	0.14	1415	1582
54.	E- β -Caryophyllene	10.72	1419	1612
55.	E- α -Bergamotene	0.85	1435	1575
56.	Allo-Aromadendrene	0.30	1439	1620
57.	α -Guaiene +unidentified compound	0.04	1442	-
58.	E- β -Farnesene	1.23	1449	1663
59.	Y- β -Elemene+unidentified compound	0.04	1449	-
60.	α -Humulene	3.28	1452	1654
61.	Y- Muurolene	0.08	1473	1689
62.	Selina-4,11-diene	0.22	1475	1674
63.	Selina-4,7(11)diene+E- α -Bisabolene	0.36	1475	1688
64.	β -Selinene	0.58	1480	1700
65.	α -Selinene	0.41	1491	1707
66.	E,E- α -Farnesene	0.20	1496	1744
67.	β -Bisabolene	0.21	1499	1727
68.	7-Epi- α -Selinene	0.21	1507	1764
69.	Y-Cadinene	0.05	1513	1740
70.	X-Cadinene	0.09	1513	1765
71.	12-Nor-caryophyll-5-en-2-one	0.02	1515	-
72.	Y-Selinene	0.24	1526	-
73.	Germaene B	0.14	1535	1823
74.	Selina-3,7(11)-diene	0.37	1537	1783
75.	E-Nerolidol	0.15	1550	2036
76.	Spathulenol	0.03	1565	2107
77.	Epoxy Caryophyllene	0.08	1563	-
78.	CaryophylleneOxide	1.25	1567	2001
79.	HumuleneOxide	0.30	1597	2047
80.	Not identified compound	0.14	-	-
81.	Not identified compound	0.18	-	-
	TOTAL	98.27		

Analysis performed by gas chromatography with FID detection on 2 columns of different polarity: HP1 and INNOWAX Individual components are identified by their retention index as described in Adams (2012) and their mass spectra are interpreted using the WILEY L computer library. Constituents are presented in the order of elution from the columns.

Larvicidal activity of the mixture of *Piper umbellatum* and *Cannabis sativa* L leaves essential oil with temephos
Larvicidal activity of the mixture of *Piper umbellatum* with temephos on *Anopheles gambiae* s.l and *Culex quinquefasciatus* in 24 hours

Anopheles gambiae S.L and *Culex quinquefasciatus* larvae were exposed to the mixture of *Piper umbellatum* leaf essential oil with temephos for 48 hours exposure period. Dead larvae were recorded after 24 hours and 48 hours.

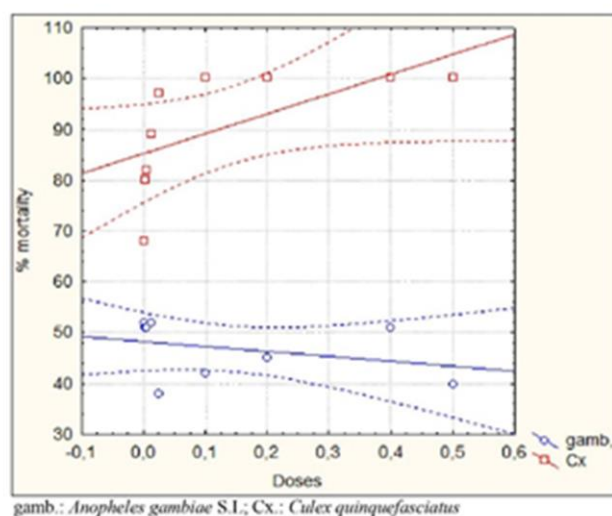


Fig 1: Larvicidal activity of the mixture of *Piper umbellatum* leaf essential oil with temephos on *Anopheles gambiae* S.L and *Culex quinquefasciatus* after 24 h

The different regression line equations of the effect of the mixture of *Piper umbellatum* leaf essential oil with temephos on *Anopheles gambiae* s.l and *Culex quinquefasciatus* for 24 hours exposure are: $Y_g = 9.91 + 132.58X$ ($H = 3.12$; $p = 0.014$) and $Y_{Cx} = 54.42 + 2071.32X$ ($H = 23.2$; $p < 0.05$) respectively. Lethal concentrations for 50% and 95% mortality (LC_{50} and LC_{95}) are: 0.30%; 0.0011% and 0.64%; 0.024% respectively for *Anopheles gambiae* S.L and *Culex quinquefasciatus*.

Larvicidal activity of *Piper umbellatum* mixture on *Anopheles gambiae* S.L and *Culex quinquefasciatus* in 48 hours

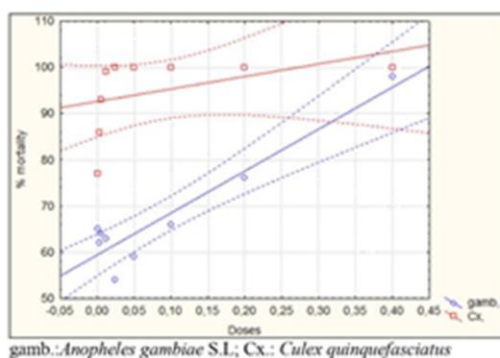


Fig 2: Larvicidal activity of the mixture of *P.umbellatum* leaf essential oil with temephos on *Anopheles gambiae* S.L and *Culex quinquefasciatus* after 48 h

The observation was extended to 48 hours. The efficacy increases with the duration of the exposure and the concentrations of the essential oil. The regression line equations generated are: $Y_g = 89.39 + 90.75X$ ($H = 9$; $p = 0.0008$) and $Y_{Cx} = 73.75 + 1412.28X$ ($H = 10$; $p < 0.05$) respectively for *Anopheles gambiae* S.L and *Culex*

quinquefasciatus. Thus, lethal concentrations for killing 50% and 95% of the exposed larvae (CL_{50}) after 48 hours are: 0.023% and 0.001% respectively for *Anopheles gambiae* S.L and for *Culex quinquefasciatus*. While the lethal concentrations for 95% (LC_{95}) mortality are: 0.38% and 0.015% respectively.

Larvicidal activity of *Cannabis sativa* L leaf essential oil mixture on *Anopheles gambiae* S.L and *Culex quinquefasciatus*

Larvicidal activity of *Cannabis sativa* L leaf essential oil mixture on *Anopheles gambiae* S.L and *Culex quinquefasciatus* in 24h

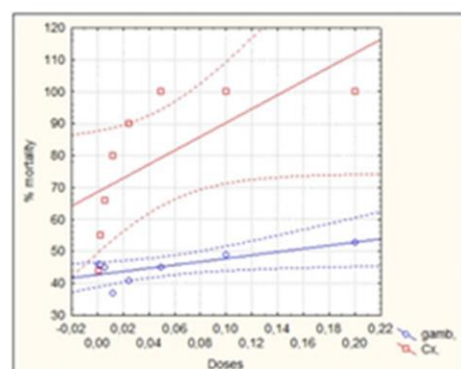


Fig 3: Larvicidal activity of the mixture of *Cannabis sativa* L leaf essential oil with temephos on *Anopheles gambiae* S.L and *Culex quinquefasciatus* after 24 h

The regression line equations for larvicidal activity of the mixture of *Cannabis sativa* L leaf essential oil with temephos generated are: $Y_g = 42.71 + 50.91X$ ($H = 3.34$; $p = 0.012$) and $Y_{Cx} = 68.55 + 217.30X$ ($H = 10.17$; $p < 0.05$) respectively for *Anopheles gambiae* S.L and *Culex quinquefasciatus*. Lethal

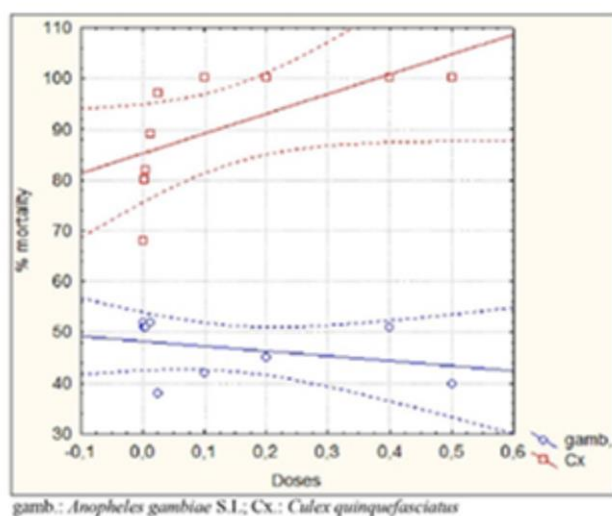


Fig 1: Larvicidal activity of the mixture of *Piper umbellatum* leaf essential oil with temephos on *Anopheles gambiae* S.L. and *Culex quinquefasciatus* after 24 h

The different regression line equations of the effect of the mixture of *Piper umbellatum* leaf essential oil with temephos on *Anopheles gambiae* S.L. and *Culex quinquefasciatus* for 24 hours exposure are: $Y_g = 9.91 + 132.58X$ ($H = 3.12$; $p = 0.014$) and $Y_{Cx} = 54.42 + 2071.32X$ ($H = 23.2$; $p < 0.05$) respectively. Lethal concentrations for 50% and 95% mortality (LC_{50} and LC_{95}) are: 0.30%; 0.0011% and 0.64%; 0.024% respectively for *Anopheles gambiae* S.L. and *Culex quinquefasciatus*.

Larvicidal activity of *Piper umbellatum* mixture on *Anopheles gambiae* S.L. and *Culex quinquefasciatus* in 48 hours

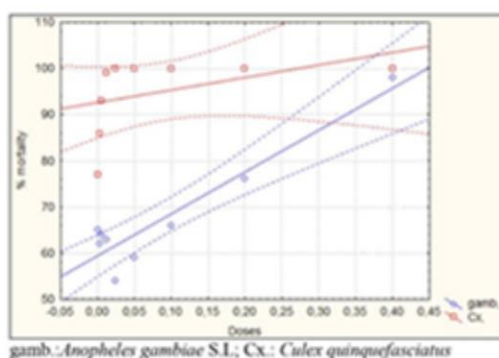


Fig 2: Larvicidal activity of the mixture of *P.umbellatum* leaf essential oil with temephos on *Anopheles gambiae* S.L. and *Culex quinquefasciatus* after 48 h

The observation was extended to 48 hours. The efficacy increases with the duration of the exposure and the concentrations of the essential oil. The regression line equations generated are: $Y_g = 89.39 + 90.75X$ ($H = 9$; $p = 0.0008$) and $Y_{Cx} = 73.75 + 1412.28X$ ($H = 10$; $p < 0.05$) respectively for *Anopheles gambiae* S.L. and *Culex*

quinquefasciatus. Thus, lethal concentrations for killing 50% and 95% of the exposed larvae (CL_{50}) after 48 hours are: 0.023% and 0.001% respectively for *Anopheles gambiae* S.L. and for *Culex quinquefasciatus*. While the lethal concentrations for 95% (LC_{95}) mortality are: 0.38% and 0.015% respectively.

Larvicidal activity of *Cannabis sativa* L leaf essential oil mixture on *Anopheles gambiae* S.L. and *Culex quinquefasciatus*

Larvicidal activity of *Cannabis sativa* L leaf essential oil mixture on *Anopheles gambiae* S.L. and *Culex quinquefasciatus* in 24h

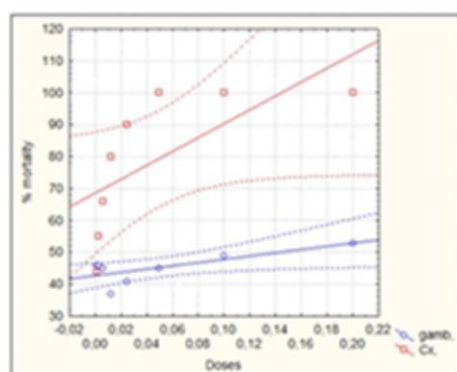


Fig 3: Larvicidal activity of the mixture of *Cannabis sativa* L leaf essential oil with temephos on *Anopheles gambiae* S.L. and *Culex quinquefasciatus* after 24 h

The regression line equations for larvicidal activity of the mixture of *Cannabis sativa* L leaf essential oil with temephos generated are: $Y_g = 42.71 + 50.91X$ ($H = 3.34$; $p = 0.012$) and $Y_{Cx} = 68.55 + 217.30X$ ($H = 10.17$; $p < 0.05$) respectively for *Anopheles gambiae* S.L. and *Culex quinquefasciatus*. Lethal

concentrations for 50% and 95% mortality of the larvae are: 0.14%; 0.002% and 0.35% and 0.026% respectively for *Anopheles gambiae* s.l and *Culex quinquefasciatus*. *Culex quinquefasciatus* larvae are more susceptible to the mixture of *Cannabis sativa* L leaf essential oil with temephos than those of *Anopheles gambiae* S.L.

Larvicidal activity of *Cannabis sativa* L leaf essential oil mixture with temephos on *Anopheles gambiae* S.L and *Culex quinquefasciatus* after 48h

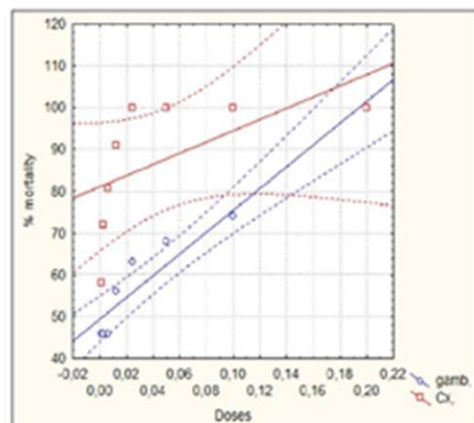


Fig 4: Larvicidal activity of the mixture of *C. sativa* L leaf essential oil with temephos on *An. gambiae* S.L and *Cx. quinquefasciatus* after 48h

Larvicidal activity of the mixture increases with dose and the duration of exposure. The regression line equations of the adjuvant effect of *Cannabis sativa* Leaf essential oil for effectiveness of temephos on the larvae of *Anopheles gambiae* S.L and *Culex quinquefasciatus* after 48 hours exposure are: $Y_g = 49.39 + 260.55X$ ($H=3.2$; $p=0.014$) and $Y_{Cx} = 81.06 + 134.27X$ ($H=15.52$; $p<0.05$) respectively for *Anopheles gambiae* S.L and *Culex quinquefasciatus*. The lethal concentrations for 50% and 95% mortality of the exposed larvae are: 0.011%; 0.0013% and 0.17%; 0.013% respectively for *Anopheles gambiae* S.L and for *Culex quinquefasciatus*.

Lethal concentrations of the mixture efficient after 48 hours exposure are tenfold lower than those necessary for 24 hours exposure, both for the larvae of *Anopheles gambiae* S.L and *Culex quinquefasciatus*.

Adjuvant property of *Cannabis sativa* L and *Piper umbellatum* leaves essential oil for effectiveness of permethrin on adult female of *Anopheles gambiae* S.L and *Culex quinquefasciatus*

Knock down activity of the mixture of *Piper umbellatum* leaf essential oil with permethrin on *Anopheles gambiae* S.L and *Culex quinquefasciatus*

According to WHO(2013) and CDC(2013) procedures, adult female of *Anopheles gambiae* S.L and *Culex quinquefasciatus* were exposed to the impregnated material for 1 hour; at 10 minutes interval, individuals felled on their back or on the side were recorded.

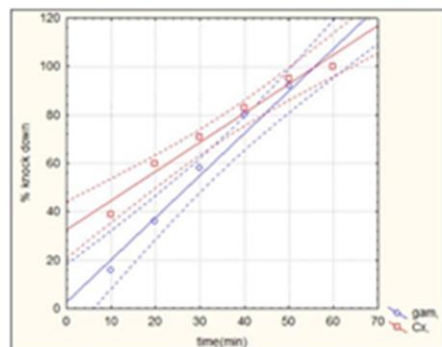


Fig 5: Knock down activity of the mixture of *Piper umbellatum* leaf essential oil with permethrin on *Anopheles gambiae* S.L and *Culex quinquefasciatus*

For 1 hour exposure, the mixture of *Piper umbellatum* leaf essential oil with permethrin knock down activity on adult female of mosquito was assessed with 95% confident interval. The regression equations generated for each mosquito are:

$Y_g = 2.66 + 1.74X$ ($H=5.051$; $p=0.003$) and $Y_{Cx} = 32.46 + 1.20X$ ($H=7.98$; $p=0.0005$) respectively for *Anopheles gambiae* S.L and *Culex quinquefasciatus*. Time necessary for knocking down 50% and 95% (KDT_{50} and KDT_{95}) of exposed mosquito are: 27 ± 0.4 min; 14 ± 0.8 min and 53 ± 0.6 min; 52 ± 0.11 min respectively for *Anopheles gambiae* S.L and *Culex quinquefasciatus*. The females of *Culex quinquefasciatus* succumb more quickly to the toxic effect of the mixture compared to those of *Anopheles gambiae* S.L.

Knock down activity of the mixture of *Cannabis sativa* L leaf essential oil with permethrin on *Anopheles gambiae* S.L and *Culex quinquefasciatus*

Considering only the higher concentration of the mixture, adult female of *Anopheles gambiae* S.L and *Culex quinquefasciatus* were exposed to the mixture of *Cannabis sativa* L leaf essential oil with permethrin for 1 hour. At 10 minutes interval, individuals knocked down were recorded.

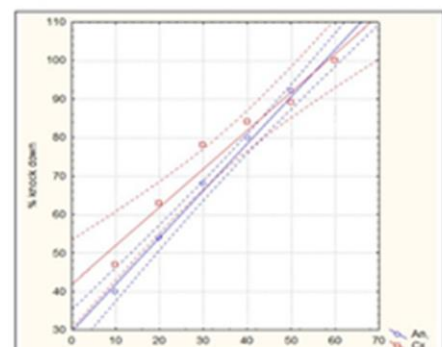


Fig 6: Knock down activity of *Cannabis sativa* L leaf essential oil mixture with permethrin on adult female of *Anopheles gambiae* S.L and *Culex quinquefasciatus*

The regression line equations generated are: $Y_g = 29.73 + 1.21X$ ($H=8.22$; $p=0.0004$) and $Y_{Cx} = 41.93 + 0.99X$ ($H=9.52$; $p=0.0002$) respectively for *Anopheles gambiae* S.L and *Culex quinquefasciatus*. Thus, time necessary for knocking down 50% and 95% of exposed mosquitoes are: 16 ± 0.75 min; 8 ± 0.15 min and 53 ± 0.94 min; 53 ± 0.6 min respectively for *Anopheles gambiae* S.L and *Culex quinquefasciatus*. After one hour of contact no difference of

susceptibility appears between the two mosquitoes species ($H=1.88$; $p=0.82$).

Adulticidal activity of the mixture of *Piper umbellatum* leaf essential oil with permethrin on *Anopheles gambiae* S.L and *Culex quinquefasciatus*

After the exposure, 24h late, dead mosquito were recorded and the curve below was plotted.

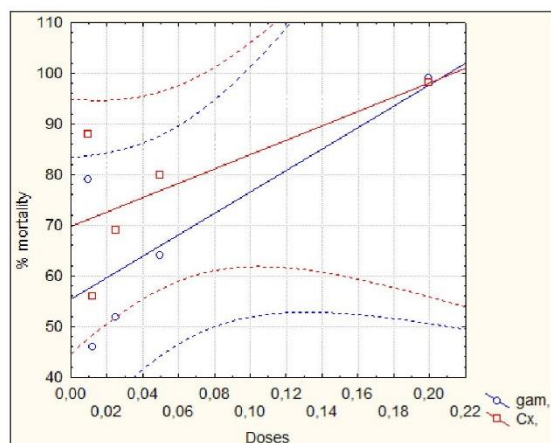


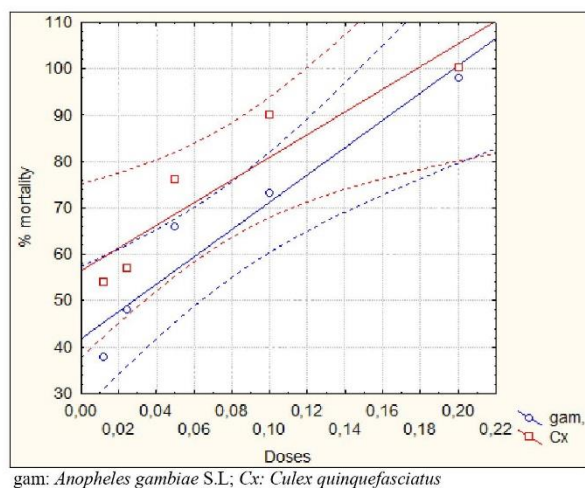
Fig 7: Adulticidal property of the mixture of *Piper umbellatum* leaf essential oil with permethrin on *Anopheles gambiae* S.L and *Culex quinquefasciatus*

The regression line equations generated are: $Y_g = 55.40 + 211.64X$ ($H=8.14$; $p=0.0012$) and $Y_{Cx} = 69.76 + 141.76X$ ($H=11.22$; $p=0.0003$). From these equations, lethal doses for 50% and 95% mortality (LC_{50} and LC_{95}) are: 0.024%; 0.011% and 0.18%; 0.17% respectively for *Anopheles gambiae* S.L and *Culex quinquefasciatus*. Adult of *Anopheles gambiae* S.L seem to be less susceptible to the toxicity of the mixture of permethrin with *Piper umbellatum* leaf essential oil than

those of *Culex quinquefasciatus* ($H=4$; $p=0.03$).

Adulticidal activity of the mixture of *Cannabis sativa* L leaf essential oil with permethrin on *Anopheles gambiae* S.L and *Culex quinquefasciatus*

After the contact of adult mosquitoes with increasing concentrations of the mixture and 24 hours post exposure, dead individuals were counted and the curve below was plotted with 95% confident interval.



gam: *Anopheles gambiae* S.L; Cx: *Culex quinquefasciatus*

Fig 8: Adulticidal activity of the mixture of *Cannabis sativa* L leaf essential oil with permethrin on *Anopheles gambiae* S.L and *Culex quinquefasciatus*

The different regression line equations of the activity of the mixture of permethrin and *Cannabis sativa* L leaf essential oil are: $Y_{An}=41.79+294.3X$ ($H=6.2$; $p=0.003$) and $Y_{Cx}=56.45+244.4X$ ($H=8.4$; $p=0.001$) respectively for *Anopheles gambiae* S.L and *Culex quinquefasciatus*. Lethal concentrations for 50% and 95% (LC_{50} and LC_{95}) mortality are: 0.027%; 0.01% and 0.18%; 0.15% respectively for *Anopheles gambiae* S.L and *Culex quinquefasciatus*. Adult of *Anopheles gambiae* S.L seem to be less susceptible the toxicity of the mixture of *Cannabis sativa* L leaf essential oil than those of *Culex quinquefasciatus* ($H=3.9$; $p=0.016$).

Identification of adult mosquitoes

Molecular analysis carried out with DNA extracted from 71 adult individuals of the *gambiae* complex collected near the Ewoé River and the morphological determination of individuals collected from Melen pond revealed the results given in the table 5 below.

Table 5: Specific composition of adult mosquitoes collected at Melen pond and on the banks of the Ewoé River (Abé *et al.*, 2019)

Harvest site	gender	Species	Number	%
Melen Pond	<i>Anopheles</i>	<i>An. gambiae s.l</i>	4	2%
		<i>Cx.perfuscus</i>	14	7%
		<i>Cx.quinquefasciatus</i>	182	91%
	Total	-	200	100%
Ewoe river	<i>Anopheles</i>	<i>An. gambiae s.s</i>	3	4.23%
		<i>An. coluzzii</i>	68	95.77%
	Total	-	71	100%

Discussion

The aim of our study was to evaluate the effectiveness of the combination of *Piper umbellatum* and *Cannabis sativa* L leaves with temephos and permethrin on *Anopheles gambiae* S.L and *Culex quinquefasciatus*, two major vectors under Laboratory conditions.

The chemical analysis of essential oils revealed 81 compounds for *Cannabis sativa* L and 24 compounds for *Piper umbellatum*. These compounds constitute 98.27% and 89.6% of the mass of essential oil analysed (respectively for *Cannabis sativa* L and for *Piper umbellatum*) and are mostly terpenes. In addition, during this chemical analysis of essential oils, several compounds remained undetermined. More sophisticated equipment and software will allow their subsequent determination.

Comparing the results of chemical analysis, there are more compounds in *Cannabis sativa* L than in *Piper umbellatum* leaf essential oil. This difference would depend on the specificity of each plant and also on the type of equipment used for the chemical analysis of essential oils. Terpenic compounds such as pinenes, terpinolene, 1-8 cineol found in these plants have been reported to have insecticidal, bactericidal, acaricidal, antiviral and fungicidal activity by several authors (Brochot *et al.*, 2017).

The morphological and molecular identification of adult mosquitoes from wild individuals of *Anopheles gambiae* S.L collected near Ewoe River revealed a composition of 95.77% of *Anopheles coluzzii* and 4.23% of *Anopheles gambiae* S.L; while the only morphological identification of adult mosquitoes from Melen's pond revealed: 2% of *Anopheles coluzzii*; 7% *Culex perfuscus* and 91% *Culex quinquefasciatus*. Thus, according to the CDC (2013), the results of biological assays carried out on mosquitoes from Ewoé River and Melen pond are attributed to *Anopheles*

coluzzii (*Anopheles gambiae* S.L) and *Culex quinquefasciatus* respectively.

Regarding the adjuvant effect of the essential oil of the leaves of *Cannabis sativa* L for the effectiveness of temephos on the larvae of the wild strain of *Anopheles gambiae* S.L after 24 hours, the mortality rate ($46 \pm 0.2\%$) is almost constant between essential oil concentrations from 0.00156% to 0.0062% and similar to the larval mortality rate for temephos acting alone. But from a concentration of 0.0125% of *Cannabis sativa* L leaf essential oil in the mixture, there is a drop in larval mortality from $46 \pm 0.2\%$ to $37 \pm 0.2\%$. Unlike the larvae of *Anopheles gambiae* S.L, this drop in larval motility in *Culex quinquefasciatus* ($44 \pm 0.4\%$) is immediately observed from a concentration of 0.00125% from *Cannabis sativa* L leaf essential oil in the mixture with temephos. Larvae mortality then increases for each of the species with the concentration of *Cannabis sativa* L leaf essential oil in the mixture with temephos. Likewise, mixing temephos with *Piper umbellatum* leaf essential oil gives almost similar larval mortality rates for *Anopheles gambiae* S.L ($52 \pm 1.2\%$) between the essential oil concentrations of 0.00125% to 0.0125% in the mixture with temephos. But from a concentration of 0.025% of *P.umbellatum* leaf essential oil, there is a drop in larval mortality of the field strain of *Anopheles gambiae* S.L from $52 \pm 1.2\%$ to $38 \pm 1\%$. Subsequently, the effectiveness of the combination against the larvae of the field strain of *Anopheles gambiae* S.L increases with the doses of *Piper umbellatum* leaf essential oil in the mixture with temephos. For *Culex quinquefasciatus* larvae, the mortality rate ($68 \pm 0.7\%$) immediately increases with the concentration of essential oil in the mixture. It thus appears, an effect of partial neutralization of the toxicity of temephos by the essential oils of *Cannabis sativa* L and *Piper umbellatum* leaves essential oil.

As for the activity of mixing the essential oils each plant leaf, *Cannabis sativa* L and *Piper umbellatum* with permethrin on wild adults of *Anopheles gambiae* S.L and *Culex quinquefasciatus*, the comparison of the average knock down rates on the effect of the mixture of *Cannabis sativa* L leaf with permethrin does not show a significant difference between adults of the two species ($H = 1.88$; $p = 0.12$). For the permethrin-essential oil combination of *Piper umbellatum* leaf essential oil on the contrary, the comparison of the means of the Knock down rates of the two species shows a significant difference ($H = 4$; $p = 0.042$). *Culex quinquefasciatus* succumbing faster than *Anopheles gambiae* S.L Knock down although being a preliminary phase of mortality does not lead to mortality with the same proportions for the mixture permethrin-essential of *Cannabis sativa* L leaf. Thus, comparison of the average mortality rates of the two species shows that adults of *Culex quinquefasciatus* are more susceptible to the mixture than those of the field strain of *Anopheles gambiae* S.L. Comparison of average mortality rates of adults of the field strain of *Anopheles gambiae* S.L and of *Culex quinquefasciatus* shows that the individuals of *Culex quinquefasciatus* are more sensitive as well for the mixture permethrin-essential oil of *Cannabis sativa* L leaf ($H = 3.9$; $p = 0.016$) than for the permethrin – essential oil mixture of *Piper umbellatum* leaf ($H = 4$; $p = 0.03$). This behavior would be linked to the specificity of each of the two species. There is also a drop in the mortality rate of adults of the field strain of *Anopheles gambiae* S.L compared to the

control in the lowest concentrations of essential oil in the permethrin-essential oil mixtures. These rates thus go from $49 \pm 0.5\%$ for permethrin acting alone to $38 \pm 0.6\%$ in the mixture of permethrin with 0.0125% from *Cannabis sativa* L leaf essential oil and from $51 \pm 0.7\%$ for permethrin acting alone to $46 \pm 1\%$ in the mixture of permethrin with a concentration of 0.0125% from *Piper umbellatum* leaf essential oil. This drop in the mortality rate, on the contrary, is not observed in *Culex quinquefasciatus*; their mortality rate immediately increases with the concentrations of essential oil in the mixture.

Indeed, whether for the larvicidal or adulticidal activity of mixtures of synthetic insecticides with essential oils on *Anopheles gambiae* S.L and *Culex quinquefasciatus*, there appears to be a partial attenuation of the toxicity of synthetic insecticides used in this work (temephos and permethrin). This partial neutralization or attenuation of the toxicity of temephos and permethrin by *Cannabis sativa* L and of *Piper umbellatum* leaves essential oil could be due to a blocking or partial inhibition of the active principles of temephos and permethrin. This partial antagonism has been observed by some authors when combining linalol-thymol with spirotetramat against *Myzus persicae* (Faraone *et al.*, 2015) [39] or when combining several essential oils with permethrin against adults of *Aedes aegypti* and of *Anopheles gambiae* (Gross *et al.*, 2017) [46]. This activity of partial inhibition of some of the active ingredients of temephos and permethrin without permanently altering their effectiveness, would offer an advantage in the fight against vectors and other harmful insects. Because the impact of reference insecticides on non-target organisms could thus be limited. In addition, the rebound effect observed for the activity of temephos and permethrin thereafter with increasing doses of essential oils would allow their effectiveness to be improved compared to resistant insects. The work carried out by several authors to assess the effectiveness of the combination of essential oils with reference insecticides has shown the effectiveness of the essential oil-permethrin combinations against adults of *Aedes aegypti* (Chansang *et al.*, 2018) [47] and flies domestic (Joffe *et al.*, 2011) [48]. In the work of these authors, by mixing with essential oils, the concentrations of synthetic insecticides are reduced while preserving their effectiveness due to the low concentrations of essential oils. This is the case in this work; the essential oils from *Cannabis sativa* L and *Piper umbellatum* leaves increase the effectiveness of temephos and permethrin, just like studies carried out in Ghana on a strain of *Anopheles gambiae* S.L resistant to deltamethrin and permethrin (Dadzie *et al.*, 2017) [49] and in Iran on the effectiveness of the combination of the essential oils of *Eucalyptus globulus* and *Rosmarinus officinalis* on cockroaches, *Culex pipiens*, *Anopheles stephensi* and house flies (Zibae and Khorram, 2015) [50].

Conclusion

From this study, it appears that low concentrations of essential oil from *Cannabis sativa* L and *Piper umbellatum* partially inhibits the effectiveness of temephos and permethrin on adult and larvae of *Anopheles gambiae* S.L and *Culex quinquefasciatus*. The effectiveness of the mixture then increases with the concentrations of essential oil.

To properly establish the effectiveness of the mixture of *Cannabis sativa* L and *Piper umbellatum* leaves essential oil

with synthetic insecticides on *Anopheles gambiae* S.L and *Culex quinquefasciatus*, trials must be carried out in the field. More appropriate apparatus and methods will allow an improvement in the extraction yields of essential oils and the identification of the compounds which have hitherto been unknown. Other in-depth studies may explore how to resolve the problem of the extreme volatility of essential oils; determine the essential oil responsible for the partial inhibition of the toxicity of temephos and permethrin and the mechanisms involved. The exploration of the adjuvant property of local plants essential oil must continue, in view of the fact that the combination of essential oil with synthetic insecticides would reduce their hazardous effect to non-target organisms and enhance their effectiveness against resistant insects.

Authors Declaration

The authors declare no competing interests.

Authors' participation

All authors participated equality in this work.

Acknowledgments

We thank Dr. Antonio Christopher –Nkondjio and Dr. Parfait Awono Ambene for their support and councils; Dr. Catherine Rupp Jacques and Hervé Casabianca for Chemical analysis of plant essential oil; Dr. Elysée Nchoutpouen for morphological identification of adult mosquitoes.

References

- 1- Zaim M, Aitio A, Nakashima N. Safety of pyrethroid-treated mosquito nets. Medical and Veterinary Entomology, 2000;14:1-5
- 2- Nkya TE, Poupardin R, Laporte F, Akhouayri I, Mosha F, Magesa S *et al.* Impact of agriculture on the selection of insecticide resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae*: a multigenerational study in controlled conditions. Parasites and Vectors, 2014;7:480
- 3- Janko MM, Irish SR, Reich BJ, Peterson M, Doctor SM, Kashamuka Mwandagaliwa M *et al.* The links between agriculture, *Anopheles* mosquitoes, and malaria risk in children younger than 5 years in the Democratic Republic of the Congo: a population-based, cross-sectional, spatial study. Lancet Planet Health, 2018;2:e74-82
- 4- Oladepo O, Tona GO, Oshiname FO, Titiloye MA. Malaria knowledge and agricultural practices that promote mosquito breeding in two rural farming communities in Oyo State, Nigeria. Malaria Journal, 2010;9:91
- 5- Pimmon S, Bhumiratana A. Adaptation of *Anopheles* Vectors to Anthropogenic Malaria- Associated Rubber Plantations and Indoor Residual Spraying: Establishing Population Dynamics and Insecticide Susceptibility. Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology, 2018. ID 9853409
- 6- Diniz DFA, Varjal de Melo-Santos MA, de Mendonça Santos EM, Beserra EB, Helvecio E, de Carvalho-Leandro D *et al.* Fitness cost in field and laboratory *Aedes aegypti* populations associated with resistance to the insecticide temephos. Parasites and Vectors, 2015;8:662
- 7- Oké-Agbo F, Sazonlin M, Akogbéto MC. Impact of

- Insecticide Resistance on the Effectiveness of Pyrethroid-Based Malaria Vectors Control Tools in Benin: Decreased Toxicity and Repellent Effect. *PLoS ONE*,2015;10(12):e0145207
8. Carrasco D, Lefe'vre T, Moiroux N, Pennetier C, Chandre F, Cohuet A. Behavioural adaptations of mosquito vectors to insecticide control. *Current Opinion in Insect Science*,2019;34:48-54
 9. Ibrahim SS, Riveron JM, Stott R, Irving H, Wondji CS. The cytochrome P450 CYP6P4 is responsible for the high pyrethroid resistance in knockdown resistance-free *Anopheles arabiensis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*,2016;68:23c32.
 10. Enayati AA, Ranson H, Hemingway J. Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect Molecular Biology*,2005;14(1):3-8.
 11. Lynd A, Oruni A, van't Hof AE, Morgan JC, Naego LB, Pipini D *et al*. Insecticide resistance in *Anopheles gambiae* from the northern Democratic Republic of Congo, with extreme knockdown resistance (kdr) mutation frequencies revealed by a new diagnostic assay. *Malaria Journal*,2018;17:412
 12. Alout H, Djogbénou L, Berticat C, Chandre F, Weill M. Comparison of *Anopheles gambiae* and *Culex pipiens* acetylcholinesterase I biochemical properties. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*,2008;150:271-277
 13. Wang J, Hou J, Wu Y, Guo S, Liu Q, Li T *et al*. Resistance of House Fly, *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae), to Five Insecticides in Zhejiang Province, China: The Situation in Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology. 2019, ID 4851914, 2017, 10.
 14. Ingham VA, Wagstaff S, Ranson H. Transcriptomic meta-signatures identified in *Anopheles gambiae* populations reveal previously undetected insecticide resistance mechanisms. *Nature Communications*,2018;9:5282
 15. Gnankiné O, Bassolé IHN. Essential Oils as an Alternative to Pyrethroids' Resistance against *Anopheles* Species Complex Giles (Diptera: Culicidae). *Molecules*,2017;22:1321
 16. Bolzonella C, Lucchetta M, Teo G, Boatto V, Zanella A. Is there a way to rate insecticides that is less detrimental to human and environmental health? *Global Ecology and Conservation*,2019;20:e00699.
 17. Abé H, Foko Dadji GA, Antonio- Nkondjio C, Awono-Ambene PH, Tamesse JL. Insecticidal activity of *Cannabis sativa* L leaf essential oil on the malaria vector *Anopheles gambiae* s.l (Giles). *International Journal of Mosquito Research*,2018;5(4):65-74.
 18. Abé H, Foko Dadji GA, Tamesse JL. Chemical composition and Insecticidal Activity of *Piper umbellatum* leaf essential oil on the major malaria vector *Anopheles gambiae* S.L and *Culex quinquefasciatus*. *International Journal of Entomology Research*,2019;4(2):59-67.
 19. Mechoulam R, Parker LA, Gallil YR. Cannabidiol: an overview of some pharmacological aspects by. Department of Medicinal Chemistry and Natural Products, Hebrew University of Jerusalem, Israel. *Journal of Clinical Pharmacology*,2002;42:11S-19S.
 20. Manzanares J, Julian MD, Carrascosa A. Role of the Cannabinoid System in Pain Control and Therapeutic Implications for the Management of Acute and Chronic Pain Episodes. *Current Neuropharmacology*,2006;4:239-57.
 21. Hagenbach U, Ghafoor N, Brenneisen R, Luz S, Mader M. Clinical investigation of delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) as an alternative therapy for overactive bladders in spinal cord injury (SCI) patients? Congress on Cannabis and the Cannabinoids, Cologne, Germany: International Association for Cannabis as Medicine, 2001, 10.
 22. Milton NG. Anandamide and noladin ether prevent neurotoxicity of the human amyloid-beta peptide. *Neuroscience Lett*,2002;332:127-30.
 23. Galve-Roperh I, Sanchez C, Cortés ML, Gomez Del Pulgar T, Izquierdo M, Guzman M. Anti-tumoral action of cannabinoids: involvement of sustained ceramide-accumulation and extracellular signal-regulated kinase activation. *Natural Medicine*,2000;6:313-19.
 24. Da Silva IFJ, De Oliveira RG, Soares IM, Da Costa Alvim T, Ascêncio SD, De Oliveira Martins DT. Evaluation of acute toxicity, antibacterial activity, and mode of action of the hydroethanolic extract of *Piper umbellatum* L. *Journal of Ethnopharmacology*,2014;151:137-143
 25. Núñez V, Castro V, Murillo R, Ponce-Soto LA, Merfort I, Lomonte B. Inhibitory effects of *Piper umbellatum* and *Piper peltatum* extracts towards myotoxic phospholipases A2 from *Bothrops* snake venoms: Isolation of 4-nerolidylcatechol as active principle. *Journal of Phytochemistry*,2005;66(9):1017-1025.
 26. da Silva Junior IF, Balogun SO, Godinho de Oliveira R, Damazo AS, Tabajara de Oliveira Martins D. *Piper umbellatum* L.: A medicinal plant with gastric-ulcerprotective and ulcer healing effects in experimental rodent models. *Journal of Ethnopharmacology*,2016;196:123-131.
 27. Salehi B, Zakaria ZA, Gyawali R, Ibrahim SA, Rajkovic J, Shinwari ZK *et al*. *Piper* Species: A Comprehensive Review on Their Phytochemistry, Biological Activities and Applications. *Molecules*,2019;24:1364
 28. Setzer WN, Setzer MC, Bates RB, Nakkiw P, Jackes BR, Chen L *et al*. Antibacterial hydroxycinnamic esters from *Piper caninum* from Paluma, North Queensland, Australia. The crystal and molecular structure of (+)-bornyl coumarate. *Planta Med*,1999;65:747-749.
 29. Cho-Ngwa F, Monya E, Azantsa BK, Manfo FPT, Babiaka SB, Mbah JA *et al*. Filaricidal activities on *Onchocerca ochengi* and *Loa loa*, toxicity and phytochemical screening of extracts of *Tragia benthami* and *Piper umbellatum*. *Complementary and Alternative Medicine*,2016;16:326
 30. Roersch CMFB. *Piper umbellatum* L.: A comparative cross-cultural analysis of its medicinal uses and an ethnopharmacological evaluation. *Journal of Ethnopharmacology*,2010;131:522-537.
 31. Adams RP. Identification of essential oils by gas chromatography quadrupole mass spectroscopy. Allured Publishing Corporation,2012;4(9):698.
 32. Price DP, Schilkey FD, Ulanov A, Hansen IA. Small mosquitoes, large implications: crowding and starvation affects gene expression and nutrient accumulation in *Aedes aegypti*. *Parasites and Vectors*,2015;8:252-266.
 33. Vantaux A, Ouattara I, Lefèvre T, Dabiré KR. Effects

- of larvicidal and larval nutritional stresses on *Anopheles gambiae* development, survival and competence for *Plasmodium falciparum*. *Parasites and Vectors*, 2016;9:226
34. WHO. Monitoring and managing insecticide resistance in *Aedes* mosquito populations. Geneva: World Health Organization, 2016.
 35. WHO. Test procedures for insecticide resistance in malaria vector Mosquitoes. Geneva: World Health Organization, 2013, 1-40.
 36. WHO. Guidelines for Laboratory and Field Testing of Mosquito Larvicides. Geneva: World Health Organization, 2005.
 37. Penner C, Costantini C, Corbel V, Licciardi S, Dabiré RK, Lapied B *et al.* Mixture for Controlling Insecticide Resistant Malaria Vectors. *Emerging Infectious Diseases*, 2008;14(11):1707-1714.
 38. CDC. Guideline for Evaluating Insecticide Resistance in Vectors Using the CDC Bottle Bioassay. Centre for Diseases Control, 2013, 1-28.
 39. Faraone N, Hillier NK, Cutler GC. Plant Essential Oils Synergize and Antagonize Toxicity of Different Conventional Insecticides against *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). *PLoS ONE*, 2015;10(5):e0127774. doi:10.1371/journal.pone.0127774
 40. Wang X, Li O, Shen L, Yang J, Cheng H, Jiang S. *et al.* Fumigant, contact, and repellent activities of essential oils against the darkling beetle, *Alphitobius diaperinus*. *Journal of Insect science*, 2014, 14(75).
 41. Giles MT, Coetzee M. A supplement to the Anophelinae of Africa South of the Sahara. South African Institute for Medical Research, 1987;55:146.
 42. Reuben R, Tewari SC, Hiriyan J, Akiyama J. Illustrated Keys to species *Culex* (*Culex*) associated with Japanese encephalitis in Southeast Asia (Diptera: Culicidae). *Mosquitoes Systematic*, 1994;26(2):75-96
 43. Livak KJ. Organization and mapping of sequence of *Drosophila melanogaster* X-chromosome and Y-chromosome that is transcribed during spermatogenesis. *Genetics*, 1984;107:611-634
 44. Santalamazza F, Mancini E, Simard F, Qi Y, Tu Z, Della Torre A. Insertion polymorphism of SINE200 retrotransposons within speciation island of *Anopheles gambiae* molecular forms. *Malaria Journal*, 2008;7:163.
 45. Brochot A, Guilbot A, Haddioui L, Roques C. Antibacterial, antifungal, and antiviral effects of three essential oil blends. *Microbiology Open*, 2017, e459.
 46. Gross AD, Norris EJ, Kimber MJ, Bartholomay LC, Coast JR. Essential oils enhance the toxicity of permethrin against *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae*. *Medical and Veterinary Entomology*, 2017;31:55-62
 47. Chansang A, Champakaew D, Junkum A, Jitpakdi A, Amornlerdpison D, Aldred AK *et al.* Synergy in the adulticidal efficacy of essential oils for the improvement of permethrin toxicity against *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). *Parasites and Vectors*, 2018;11:417
 48. Joffe T, Gunning RV, Allen GR, Kristensen M, Alptekin S, Field LM *et al.* Investigating the potential of selected natural compounds to increase the potency of pyrethrum against houseflies *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Pest Management Science*, 2012;68:178-184
 49. Dadzie SK, Chabi J, Asafu-Adjaye A, Owusu-Akrofi O, Baffoe-Wilmot A, Malm K *et al.* Evaluation of piperonyl butoxide in enhancing the efficacy of pyrethroid insecticides against resistant *Anopheles gambiae* s.l. in Ghana. *Malaria Journal*, 2017;(16):342.
 50. Zibae I, Khorram P. Synergistic effect of some essential oils on toxicity and knockdown effects, against mosquitos, cockroaches and housefly. *Arthropods*, 2015;4(4):107-123.