

Efficacité insecticide *in vitro* et *in vivo* de l'huile essentielle de *Ocimum gratissimum* (Lamiaceae) sur les poux *Goniodes gigas*, parasites des volailles

Abdoulaye Nouhoum ALASSANE^{1*}, Soumanou SALIFOU¹, Sabbas ATTINDEHOU^{1,2}
et Sahidou SALIFOU¹

¹ Université d'Abomey-Calavi, Ecole Polytechnique d'Abomey-Calavi, Laboratoire de Recherche en Biologie Appliquée, 01 BP 2009, Cotonou, Bénin

² Université d'Agriculture, Ecole de Gestion et Exploitation des Systèmes d'Élevage, BP 43, Kétou, Bénin

(Reçu le 18 Mars 2022 ; Accepté le 05 Juillet 2022)

* Correspondance, courriel : alassane.abdoulaye@yahoo.fr

Résumé

De plus en plus, les plantes sont considérées comme une riche source de composés bioactifs et agent alternatif pour le contrôle des insectes. Parmi elles, les représentants de la famille des Lamiaceae sont les plus connus pour ce potentiel. L'objectif du présent travail est d'évaluer le potentiel insecticide de l'huile essentielle des feuilles de *O. gratissimum* (Lamiaceae) contre les poux (*Goniodes gigas*) ectoparasites des volailles. Pour cela, la composition chimique de l'huile essentielle extraite par hydrodistillation a été caractérisée chimiquement au moyen d'un chromatographe en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse (GC/MS), testée par contact *in vitro* et *in vivo* à la température ambiante sur les formes adultes de *G. gigas*, parasite des volailles. Les résultats ont montré que l'huile essentielle de *O. gratissimum* possède des propriétés insecticides très significatives. *In vitro*, elle a induit une mortalité de plus de 50% des poux adultes à la concentration de 0,07 µL/cm² après 2 heures d'exposition. Cet effet insecticide *in vitro* a été confirmé *in vivo*, avec une disparition totale (100 %) des poux neuf jours après application de cette huile essentielle sur les volailles naturellement infestés. Cette propriété peut être liée à la composition de l'huile, puisqu'elle comportait 20 principaux composés caractérisés par une prédominance de Para-cymène (26,17 %), Thymol (25,47 %), Gamma-Terpinène (11,52 %) et Alpha-Thujène (5,68 %) qui agiraient probablement en synergie. L'extrait volatile de *O. gratissimum* constitue donc une alternative prometteuse dans les systèmes de soins aux animaux, même si des essais complémentaires sont nécessaires pour confirmer l'intérêt pratique de ces résultats dans l'élaboration d'un antiparasitaire ethno-vétérinaire contre ces ectoparasites.

Mots-clés : huile essentielle, *O. gratissimum*, insecticide, poux, volailles.

Abstract

***In vitro* and *in vivo* insecticidal efficacy of the essential oil of *Ocimum gratissimum* (Lamiaceae) on *Goniodes gigas* lice, a parasite of poultry**

More and more, plants are considered as a rich source of bioactive compounds and alternative agent for insects control. Among them, the representatives of the family Lamiaceae are the most known for this

potential. The objective of the present work is to evaluate the insecticidal potential of the essential oil of the leaves of *O. gratissimum* (Lamiaceae) against lice (*Goniodes gigas*) ectoparasites of poultry. For this purpose, the chemical composition of the essential oil extracted by hydrodistillation was chemically characterized by means of a gas chromatograph coupled to a mass spectrometer (GC/MS) and tested by contact in vitro and in vivo at room temperature on adult forms of *G. gigas*, a poultry parasite. The results showed that the essential oil of *O. gratissimum* has very significant insecticidal properties. In vitro, it induced a mortality of more than 50 % of adult lice at the concentration of 0.07 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ after 2 hours of exposure. This in vitro insecticidal effect was confirmed in vivo, with a total disappearance (100 %) of lice nine days after application of this essential oil on naturally infested poultry. This property may be related to the composition of the oil, since it had 20 main compounds characterized by a predominance of Para-cymene (26.17 %), Thymol (25.47 %), Gamma-Terpinene (11.52 %) and Alpha-Thujene (5.68 %) which would probably act in synergy. The volatile extract of *O. gratissimum* is therefore a promising alternative in animal care systems, although further testing is needed to confirm the practical relevance of these results in the development of an ethnoveterinary antiparasitic against these ectoparasites.

Keywords : *essential oil, O. gratissimum, insecticide, lice, rabies.*

1. Introduction

Dans de nombreux pays ouest africains, l'avènement de la médecine moderne et ses progrès avaient conduit les populations à se détourner quelque peu de la médecine traditionnelle, essentiellement basée sur la phytothérapie [1]. Cependant, depuis ces dernières décennies, l'usage des plantes médicinales connaît un regain d'intérêt. Selon les estimations de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) [2], plus de 80 % de la population africaine utilisent encore la médecine traditionnelle pour répondre à leurs besoins de soins de santé et à ceux des animaux. Ceci est lié à la toxicité des produits de synthèse, au coût élevé de ces médicaments, à la malfaçon et la contrefaçon de ces médicaments, à l'éloignement et/ou l'insuffisance de cliniques vétérinaires surtout en zone rurale, qui limitent une prise en charge véritable des problèmes de santé animale [3]. Aussi, les éleveurs ne confient leurs animaux aux vétérinaires qu'en cas d'insuccès [4]. Or, les affections parasitaires évoluent très souvent de façon insidieuse, altérant dangereusement la santé et la productivité des animaux. Les ectoparasites en général et des poux en particulier sont d'importants parasites externes de la volaille [5]. Leur mode d'action est à la fois direct et indirect. De façon direct, ils se nourrissent des tissus et des sécrétions de l'hôte. Leurs morsures sont généralement irritantes et douloureuses et les volailles deviennent agitées, ce qui entraîne une diminution de la prise alimentaire et l'affaiblissement des sujets les prédisposant à diverses pathologies [6]. Les poux (*Goniodes gigas*), peuvent percer la pulpe des plumes ou la peau, ce qui peut s'avérer extrêmement dangereux, surtout pour les jeunes volailles [7]. L'invasion des volailles par ces poux est devenue très fréquente dans de nombreux pays, dont le Bénin. Pour réduire le seuil de nuisibilité de ces ectoparasites d'importance vétérinaire, les insecticides et ou acaricides synthétiques ont joué un rôle majeur. Cependant, l'utilisation fréquente et irrationnelle a progressivement mise à mal cette lutte à cause de leurs effets résiduels sur les aliments et l'environnement et la sélection accrue d'individu résistant aux produits conventionnels couramment utilisés. De nombreux cas de parasites résistants sont rapportés dans le monde et ont pris une importance considérable dans les pays tropicaux [8]. Ce phénomène est particulièrement évident dans la lutte contre les poux [9, 10], acariens [11] et des tiques [12]. Face à ces problèmes les recherches d'approches alternatives de gestion des ectoparasites ont connu un regain d'intérêt. Les alternatives botaniques, telles que les huiles essentielles, font l'objet d'une attention particulière. En effet, les huiles essentielles ont été largement étudiées et utilisées contre certains

insectes et acariens [13, 14]. Les huiles essentielles de plantes du clou de girofle, de la cannelle, du curcuma, de l'anis étoilé, du pipier noir, de la citronnelle et de la citronnelle ont été précédemment signalées comme ayant un fort potentiel contre les insectes et les acariens nuisibles [15]. La présente étude dont l'objectif est d'évaluer *in vitro et in vivo* l'effet insecticide de l'huile essentielle des feuilles de *Ocimum gratissimum* sur *Goniodes gigas*, ectoparasite des volailles, s'inscrit donc dans cette dynamique de recherche de solution aux problèmes de santé animale adaptée aux moyens financiers et à l'environnement socioculturel des populations.

2. Matériel et méthodes

2-1. Matériel animal

Les poulets naturellement infestés par les poux et les poux adultes du genre *Goniodes gigas* prélevés sur ces poulets ont servi pour les tests biologiques. Après une enquête préliminaire dans les élevages dans la commune d'Abomey-calavi pour cibler les animaux infestés par les poux, des poulets infestés ont été achetés auprès des éleveurs et ramenés au laboratoire pour les expérimentations.

2-2. Matériel végétal

Les feuilles de *O. gratissimum* ont été récoltées au stade floraison dans leurs milieux naturels pendant les mois de Juin - Juillet 2021 dans la commune d'Abomey-Calavi au Bénin. Un échantillon fut porté à l'herbier National du Bénin pour identification et certification grâce à la flore analytique de Akoègninou [16].

2-3. Extraction et caractérisation chimique de l'huile essentielle

L'extraction de l'huile essentielle a été réalisée sur la matière végétale séchée sous abris à la température du laboratoire 28 °C, par la méthode d'hydrodistillation pendant deux à trois heures dans un essencier de type Clevenger [17]. L'analyse et l'identification des constituants de l'huile essentielle obtenue ainsi que la détermination de sa composition centésimale relative ont été effectuées par chromatographie en phase gazeuse (CPG) équipée d'un détecteur à ionisation de flamme (CPG-FID) et par chromatographie en phase gazeuse couplée et à la spectrométrie de masse (CPG-SM) au Laboratoire d'analyses des extraits végétaux et des arômes (LEXVA-Analytique) de Clermont-Limagne (France).

2-3-1. Analyse CPG/FID

Les analyses par CPG-FID ont été effectuées à l'aide d'un chromatographe de type HP 7890, équipé d'une Colonne Apolaire : DB-5 MS : 40 m x 0,18 mm ; épaisseur du film : 0,18 µm. La programmation de température est la suivante :

- Colonne DB-5 : 50 °C pendant 5 min, de 5 °C/min °C jusqu'à 300 °C ;
- L'injecteur est à 280 °C avec diviseur 1/100 ;
- Le gaz vecteur est l'hélium avec un débit de 1 ml/min .

Un volume de 2 µL d'huile essentielle diluée dans l'hexane avec un facteur de dilution de 4 % a été injecté manuellement.

2-3-2. Analyse CPG/SM

L'analyse en chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse a été faite sur un chromatographe de type HP 7890, couplé à un détecteur de masse de type HP 5975 C. La colonne apolaire était de type : DB-5 MS : 40 m x 0,18 mm ; épaisseur du film : 0,18 μm . Gamme de masse : 33 à 550. L'injection a été effectuée dans les mêmes conditions analytiques qu'en CPG-FID à savoir 2 μL d'échantillon d'huile essentielle dilué au 20^{ème} dans l'hexane.

2-3-3. Identification des composés

Chaque constituant de l'huile essentielle a été identifié par son indice de rétention calculé à partir de son temps de rétention. L'indice de rétention est ensuite comparé avec ceux des composés existant dans la banque de données (bibliothèque du laboratoire), et aussi en utilisant la base de données de masse spectrale (librairie NIST 225 000 spectres). Le chromatographe en phase gazeuse étant relié à un système informatique gérant une bibliothèque de spectres de masse.

2-4. Tests biologiques

2-4-1. Test *in vitro*

Le test *in vitro* a été réalisé dans les conditions de laboratoire suivant un dispositif complètement aléatoire. Six concentrations de l'huile essentielle ont été préparées en diluant chaque fois dans 1ml de solvant (acétone) les volumes successifs de 0,5 ; 1 ; 1,5 ; 2 ; 2,5 et 3 μL de l'huile essentielle. Chaque concentration était uniformément répandue à l'aide d'une micropipette sur une rondelle de papier Whatman N° 1 de 7 cm de diamètre (38,46 cm^2). Après évaporation complète du solvant (temps nécessaire:20 mn) [18], des doses respectives de 0,01 ; 0,03; 0,04 ; 0,05 ; 0,07 et 0,08 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ ont été retenues sur chaque papier filtre. Le papier Whatman, imprégné uniquement du solvant acétone et laissé durant le même temps d'évaporation, a servi de témoin négatif. Chaque papier imprégné a été ensuite placé dans une boîte transparente dans laquelle un lot de cinq (05) poux est déposé. L'unité expérimentale est constituée d'une boîte en plastique contenant 5 insectes adultes libérés dans la boîte contenant le papier traité. Chaque traitement a été répété trois fois. Le décompte des mortalités est fait 30 mn après l'introduction des poux puis chaque 1h jusqu'à 24 h.

2-4-2. Test *in vivo*

Des poulets naturellement infestés par les poux et achetés auprès des éleveurs dans la commune d'Abomey-calavi ont servi à la réalisation du test *in vivo*. Neuf (09) poulets ont été disposés séparément dans trois cages artisanales en trois lots de trois sujets chacun à raison de deux lots (L_1 et L_2) pour l'huile essentielle et d'un lot (L_3) comme témoin négatif. Des tubes à bout aspergeant de contenance 30 mL ont été utilisés pour préparer une solution à 3,4 %, en diluant 1 mL de l'huile essentielle dans 29 mL d'eau distillée auquel deux à trois gouttes de Tween 80 (émulsifiant non toxique pour l'insecte) ont été ajoutés pour homogénéiser le mélange. La solution ainsi préparée a été directement appliquée sur la peau à la base des plumes des oiseaux des lots L_1 et L_2 , tandis que le lot L_3 a été traité uniquement avec le solvant (eau distillée additionnée du tween 80). L'application des solutions (test et contrôle) est répétée tous les 3 jours. Tous les sujets des trois lots constitués ont été examinés quotidiennement pour apprécier par une estimation visuelle, la diminution de la charge parasitaire jusqu'à disparition totale des parasites des plumes et du corps des animaux. Il est à souligner que tous les poulets sélectionnés présentaient au départ une charge parasitaire importante.

2-5. Analyse statistique des données

Les résultats sont soumis aux tests de l'analyse de la variance à deux critères de classification, utile pour l'étude de l'action de deux facteurs [19]. Ce type d'analyse a été utilisé pour tester l'effet de la dose et la durée d'exposition de l'huile essentielle sur la mortalité des poux.

3. Résultats

3-1. Certification des feuilles de *O. gratissimum*

L'échantillon de feuilles de *Ocimum gratissimum* est identifié et certifié à l'Herbier National sous le numéro YH 637/HBN.

3-2. Composition chimique de l'huile essentielle

L'huile essentielle obtenue à partir des feuilles sèches de *O. gratissimum* est jaune clair dégageant une forte odeur. L'analyse chromatographique en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse a permis d'identifier vingt principaux composés représentant 91,85 % de la fraction totale de l'huile essentielle. Cette composition est caractérisée par une prédominance de Para-cymène (26,17 %), Thymol (25,47 %), Gamma-Terpinène (11,52 %) et Alpha-Thujène (5,68 %) (**Tableau 1**). L'huile essentielle de *O. gratissimum* est constituée principalement d'hydrocarbures monoterpéniques (55,05 %), de Phénols (29,35 %), d'hydrocarbures sesquiterpéniques (6,85 %) et de sesquiterpéniques oxygénés (0,59 %).

Tableau 1 : Principaux composés identifiés par chromatographie

Tr	Composés	% Fid
10,74	Alpha-Thujène	5,679
11	Alpha-Pinène	1,571
12,66	Béta-Pinène	0,505
13,08	Myrcène	4,61
14,09	Alpha-Terpinène	2,69
14,56	Para-Cymène	26,175
15,62	Gamma-Terpinène	11,522
16,03	Cis-Hydrate de Sabinène (IPP vs OH)	0,47
19,67	Terpinen-4-ol	1,829
23,17	Thymol	25,475
23,29	Carvacrol	0,728
24,73	Eugénol	3,149
26,42	Béta-Caryophyllène	2,451
27,33	Alpha-Humulène	0,318
27,97	Gamma-Muuroolène	0,242
28,24	Béta-Sélinène	2,438
28,37	Alpha-Sélinène	0,754
28,81	Acétate d'Eugényle	0,414
28,96	7-Epi-Alpha-Sélinène	0,233
30,57	Oxyde de Caryophyllène	0,597

Tr	Composés	% Fid
	<i>Hydrocarbures monoterpéniques</i>	55,05
	<i>Phénols</i>	29,35
	<i>Hydrocarbures sesquiterpéniques</i>	06,85
	<i>Sesquiterpéniques oxygénés</i>	0,59
	Total d'identification	91,85

Tr : temps de rétention

3-3. Test *in vitro*

Le **Tableau 2** montre l'évolution des mortalités par rapport au témoin des adultes de *G. gigas* en fonction du temps et des concentrations de l'huile essentielle des feuilles de *O. gratissimum*.

Tableau 2 : Taux de mortalité de *G. gigas* en fonction du temps à différentes concentrations

Concentration ($\mu\text{L}/\text{cm}^2$) et Control	Temps d'exposition (heure)									
	1h	2h	3h	4h	5h	6h	7h	8h	9h	10h
Témoin Négatif	0 ^a	0 ^c	0 ^d	0 ^d	0 ^d	0 ^c	0 ^c	0 ^c	0 ^c	20 ^b
0,01	0 ^a	0 ^c	13,33 ^{cd}	26,67 ^c	33,33 ^c	60 ^b	66,67 ^b	66,67 ^b	73,33 ^b	86,67 ^a
0,03	0 ^a	0 ^c	20 ^{cd}	66,67 ^b	73,33 ^b	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a
0,04	0 ^a	33,33 ^b	40 ^{bc}	73,33 ^b	73,33 ^b	86,67 ^{ab}	86,67 ^{ab}	86,67 ^{ab}	86,67 ^{ab}	86,67 ^a
0,05	0 ^a	26,67 ^b	60 ^b	66,67 ^b	73,33 ^b	73,33 ^b	73,33 ^b	73,33 ^b	73,33 ^b	80 ^a
0,07	0 ^a	60 ^{ab}	93,33 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a
0,08	0 ^a	86,67 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a

^{a,b,c} les pourcentages sur une même colonne suivis de lettres différentes, diffèrent significativement au seuil de 5 %

L'analyse de ce tableau montre que, le taux de mortalité des poux soumis aux différentes concentrations de l'huile essentielle a augmenté numériquement de façon linéaire suivant les périodes d'observation. Des mortalités supérieures à 50 % ont été enregistrées dès la deuxième heure d'exposition dans les lots d'insectes exposés aux concentrations de 0,07 et 0,08 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$. A la plus forte concentration (0,08 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$) de l'huile essentielle, 100 % des poux mis en contact sont mort après seulement 3h de temps, tandis que, le lot control n'a enregistré que 20 % de mortalité qu'a parti de 10h de temps. L'analyse de la variance au seuil de 5 % confirme l'évolution positive bien marquée des taux moyens de mortalité avec l'augmentation de la concentration de l'huile essentielle de *O. gratissimum* quelle que soit la durée d'exposition des poux à l'huile essentielle.

3-4. Test *in vivo*

Les observations quotidiennes des poulets ont montré une diminution progressive de la charge parasitaire des sujets des lots L₁ et L₂ pendant les 3 jours suivants la première application de la solution d'huile essentielle d'*O. gratissimum*. A la deuxième application, le nombre de parasites présents sur les volailles a nettement diminué sans être total, ce qui a nécessité une troisième application avant de constater une disparition totale des poux des plumes.

4. Discussion

Dans les conditions de cette étude, l'huile essentielle des feuilles de *O. gratissimum* a montré une activité insecticide aux doses testées vis-à-vis des adultes de *G. gigas* aussi bien *in vitro* qu'en *in vivo*. Ce qui nous amène à penser que l'effet insecticide de *O. gratissimum* pourraient dépendre de sa composition chimique et du niveau de sensibilité des insectes. En effet, plusieurs études ont révélé que les constituants des huiles essentielles ont un effet nocif sur le système nerveux des ectoparasites. Le terpinen-4-ol, par exemple, présent dans l'huile essentielle de *O. gratissimum* (1,82 %) inhibe la libération de l'acétylcholinestérase qui est indispensable aux insectes pour leur activité et la transmission synaptique [20, 21]. De même, Enan et Isman [22, 23] ont fait le lien entre l'eugénol, constituant chimique identifié à un taux de 3,15 % dans cette huile essentielle et le blocage des sites accepteurs de l'octopamine, un neuromodulateur spécifique des invertébrés ayant un effet régulateur sur les battements du cœur, la motricité, la ventilation, le vol et le métabolisme, dont la perturbation entraîne une dégradation complète du système nerveux chez les insectes [24]. Alors que, pour [25], la nature hydrophobe les huiles essentielles provoqueraient un stress hydrique chez les insectes en bloquant les spiracles, ce qui entraîne la suffocation et la dégradation des cires cuticulaires. De toutes les façons, l'activité acaricide et insecticide des huiles essentielles est largement associée à la présence de constituants bioactifs qui agissent probablement en synergie [26]. Ceci s'explique par le fait que certains composants de l'huile favorisent l'accumulation et l'absorption cellulaires d'autres toxiques [27, 28]. Mais, ce mécanisme n'a pas été entièrement élucidé jusqu'à présent. L'activité synergique a longtemps été supposée être obtenue par des effets complexes d'après plusieurs auteurs en raison des multiples modes d'action des différents composants [29]. Cependant, malgré la complexité de leurs modes d'action, l'activité synergique ou antagoniste des insecticides à base d'huiles essentielles semblent dépendre de la concentration des principaux constituants d'une huile essentielle particulière [30]. Ce qui confirme d'ailleurs, les fortes mortalités enregistrées après seulement quelques heures d'expositions des parasites aux concentrations élevées de l'huile essentielle de *O. gratissimum*. Par contre, l'effet tardif obtenu dans l'application *in vivo* de l'huile essentielle pourrait être lié au solvant (eau distillée) utilisée. L'utilisation d'un solvant apolaire pourrait augmenter la rémanence du produit testé. Néanmoins, les risques d'une toxicité pour les volailles sont tout de même faibles parce que, les huiles essentielles sont connues comme des neurotoxiques à effets aigus interférant avec les transmetteurs octopaminergiques des arthropodes donc peu toxiques pour les animaux à sang chaud [23]. La plupart de ces constituants sont métabolisés et éliminés par les reins sous forme de composés polaires [31].

5. Conclusion

De l'ensemble des résultats de cette étude, il apparaît que l'huile essentielle des feuilles de *O. gratissimum* riche en Para-cymène (26,17 %), Thymol (25,47 %), Gamma-Terpinène (11,52 %) et Alpha-Thujène (5,68 %) a un effet insecticide sur les poux *G. gigas*, ectoparasites des volailles. Le pourcentage des mortalités cumulées observé *in vitro* avec l'huile essentielle des feuilles de cette plante croît avec la dose et le temps d'exposition. Cependant, les essais en milieu réel restent à effectuer pour évaluer l'efficacité pratique du produit. De même, l'adaptation des techniques d'extraction et du mode de conditionnement au contexte villageois est fondamentale pour rendre le produit accessible aux plus démunis que sont les petits éleveurs. Il en est de même des tests de l'activité de cette huile essentielle sur les autres ectoparasites des volailles si l'on veut généraliser l'utilisation de ce produit.

Références

- [1] - S. DRAMANE, K. M. WITABOUNA, K. KAGOYIRE, "Eur. J. Sci. Res", 40 (2010) 307 - 317
- [2] - ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE (OMS), "Pharmacopée européenne. 2011". 7.0-Tom1 (2002) (2.8.14) EDQM
- [3] - A. K. FAJIMI, A. A TAIWO, "African Journal of Biotechnology", 4 (2005) 303 - 307
- [4] - J. A HAMMOND, D. FEILING, S. C. BISHOP, "Vet. Res. Comm", 21 (1997) 213 - 228
- [5] - M. N. KHAN, M. NADEEM, IQBAL, ZAFAR, M. S. SAJID, and R. Z. ABBAS, "International Journal of Agriculture & Biology", 2 (2003) 213 - 216
- [6] - M. K. ISLAM, M. M. H. MONDAL, M. M. RAHMAN, A. K. M. F. HAQUE, and M. A. A. CHOWDHURY, "Veterinary Review Kathmandu", 14 (1999) 32 - 33
- [7] - S. AL-QURAI SHY, F. ABDEL-GHAFFAR, K. A. S. AL-RASHEID, J. MEHLHORN, and H. MEHLHORN, "Parasitology Research", 110 (2011) 617 - 622
- [8] - T. FIRAOL, A. DAGMAWIT, G. ASKALE, S. SOLOMON, D. MORKA, and T. WAKTOLE, *Journal of Veterinary Science and Technology*, 5(4) (2014). Doi:10.4172/2157-7579.1000189
- [9] - G. W. LEVOT, *International Journal for Parasitology*, 25 (1995) 1355 - 1362
- [10] - L. ELLSE, F. BURDEN, & R. WALL, "Veterinary Parasitology", 188 (2012) 134 - 139
- [11] - F. BEUGNET, C. CHAUVE, M. GAUTHEY, & L. BEERT, "Veterinary Record", 140 (1997) 577 - 579
- [12] - L. D. FOIL, P. COLEMAN, M. EISLER, et al. "Veterinary Parasitology", 125 (2004) 163 - 181
- [13] - A. AYVAZ, O. SAGDIC, S. KARABORKLU, and I. OZTURK, "Journal of Insect Science", 10 (21) (2008) 1 - 10
- [14] - J. PUMNUAN, and A. INSUNG, "Journal of Entomological Research", 40 (1) (2016) 1 - 10
- [15] - J. PUMNUAN, A. INSUNG, and A. CHANDRAPATYA, "Systematic & Applied Acarology", 13 (1) (2008) 33 - 38
- [16] - A. AKOËGNINOÛ, W. J. VAN DER BURG, L. J. G. VAN DER MAESEN, "Backhuys Publishers", (2006) 1043 p.
- [17] - J. F. CLEVENGER, "J. Am. Pharm. Assoc" 17 (4) (1928) 346 - 351
- [18] - E. TEDONKENG PAMO, L. TAPONDJOU, G. TENEKEU & F. TENDONKENG, "TROPICULTURA", 20 (3) (2002) 10
- [19] - P. DAGNELIE, "Les presses agronomiques de Gembloux, Belgique" 2 (1975) 245 - 249
- [20] - F. BAKKALI, S. AVERBECK, D. AVERBECK & M. IDAOMAR, "Food and Chemical Toxicology", 46 (2008) 446 - 475
- [21] - M. D. LOPEZ, & M. J. PASCUAL-VILLALOBOS, *Industrial Crops and Products*, 31 (2010) 284 - 288
- [22] - E. ENAN, "Toxicology & Pharmacology". Vol. 130 (3) (Nov 2001) 325 - 337
- [23] - ISMAN, "Crop Protection" 19 (2000) 603 - 608
- [24] - R. M. HOLLINGWORTH, E. M. JOHNSTONE and N. WRIGHT, "ACS Symposium" Series No. 255, American Chemical Society, Washington DC, USA, (1984)
- [25] - I. F. BURGESS, "BMC Pharmacol" 9 (2009) 1 - 8
- [26] - D. BOLDBAATAR, H. R. EL-SEEDI, M. FINDAKLY, S. JABRI, B. JAVZAN, B. CHOIDASH, U. GORANSSON B. HELLMAN, "J Ethnopharmacol" 155 (2014) 599 - 606
- [27] - Y. C. YANG, S. H. LEE, W. J. LEE, D. H. Y. J. CHOI, AHN, "J Agric Food Chem" 51 (2003) 4884 - 4888
- [28] - K. CAL, "Planta Med" 72 (2006) 311 - 316
- [29] - J. H. TAK, M. B. ISMAN, "Sci Rep" 7 (2017) 1 - 11
- [30] - F. TONG, et J. R. COATS, "Pest Manag Sci" 68 (2012) 1122 - 1129
- [31] - C. KOHLERT, I. VAN RENSEN, R. MARZ, G. SCHINDLER, E. U. GRAEFE, M. VEIT, "Planta Medica" 66 (2000) 495 - 505