

Journal Algérien des Régions Arides

JARA

Potentiel bio-insecticide de l'extrait brut de la plante saharienne *Artemisia judaica* en lutte anti-vectorielle: cas du moustique commun *Culiseta longiareolata*

Fatma Acheuk, Khemais Abdellaoui, Wassima Lakhdari, Abderrahmene Dehliz, Malika Ramdani, Fethia Barika et Rabea Allouane

Corresponding author

Fatma Acheuk

E-mail: fatma.acheuk@yahoo.fr



Journal Algérien des Régions Arides
(JARA)

N° 14 (2017)

Centre de recherche scientifique et technique sur les régions arides, Omar El-Barnaoui (CRSTRA)

Campus Universitaire, BP no 1682, RP 07000 Biskra.

<http://www.crstra.dz>

RESEARCH PAPER

Potentiel bio-insecticide de l'extrait brut de la plante saharienne *Artemisia judaica* en lutte anti-vectorielle: cas du moustique commun *Culiseta longiareolata*

Bioinsecticidal potential of the crude extract of the Saharian plant Artemisia judaica in vector control: case of the common mosquito Culiseta longiareolata

Fatma Acheuk^{1*}, Khemais Abdellaoui², Wassima Lakhdari³, Abderrahmene Dehliz³, Malika Ramdani¹, Fethia Barika¹ et Rabea Allouane¹

1: Laboratoire de Valorisation et Conservation des Ressources Biologiques, Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université de Boumerdes, 35000, Algérie

2: Département des Sciences Biologiques et de la Protection des Végétaux, Institut Supérieur Agronomique de Chott-Mariem, Université de Sousse, Tunisie

3: Institut National de Recherche Agronomique, Station de Sidi Mehdi, Touggourt, Algérie

Received 22 December 2016; Revised 05 January 2017; Accepted 11 January 2017

Résumé

Certaines plantes sont connues pour leur capacité à synthétiser des métabolites secondaires à propriétés insecticides. Ces métabolites pourront être exploités dans le domaine de la lutte contre les insectes ravageurs ou vecteurs d'agents infectieux. La présente étude a pour objectif la mise en évidence des propriétés insecticides d'une plante spontanée collectée du Sahara Algérien (région de Tamanrasset): *Artemisia judaica*. L'extrait éthanolique brut a été préparé par macération. Les bio-essais ont été effectués sur les œufs et les larves du I, II et III stade du moustique commun *Culiseta longiareolata*. Une série de trois doses pour les œufs et 4 doses pour les larves a été testée. Les résultats obtenus montrent qu'à forte dose, l'extrait inhibe complètement l'éclosion des œufs. Sur les larves, l'extrait testé présente une bonne activité insecticide. La dose létale médiane (La DL50) a été atteinte après deux heures du début du traitement, ce qui traduit l'excellent effet insecticide de cet extrait.

Les résultats obtenus sont encourageants et suggèrent la possibilité d'utiliser les métabolites secondaires de *Artemisia judaica* comme bio-insecticide dans le cadre d'une lutte anti-vectorielle.

Mots-clés: *Artemisia judaica*, extrait brut, moustique, activité insecticide.

Abstract

Some plants are known for their ability to synthesize secondary metabolites with insecticidal properties. These metabolites can be used in control of insect pests or vectors of infectious agents. The aim of this study is to explore the insecticidal properties of an Algerian spontaneous plant collected from the Algerian Sahara (Tamanrasset region): *Artemisia judaica*. The crude ethanolic extract was prepared by maceration. The bioassay were carried out on the eggs and the first, second and third instars larvae of common mosquito, *Culiseta longiareolata*, by testing a series of three doses for the eggs and four doses for the larvae. The obtained results showed that the tested extract has an inhibitory effect of embryogenesis for the eggs and a good insecticidal activity on the larvae. The lethal dose 50 (LD50) was reached two hours after treatment for larvae; this finding reflects the excellent insecticidal effect of the test extract.

The obtained results are encouraging and suggest the possibility of using the secondary metabolites of *Artemisia judaica* as bio-insecticide.

Keywords: *Artemisia judaica*, crude extract, mosquito, insecticidal activity.

Corresponding author

Fatma Acheuk

E-mail: fatma.acheuk@yahoo.fr

Introduction

Les moustiques ont toujours été considérés comme source de nuisance pour l'homme, principalement en raison du fait qu'ils peuvent être des vecteurs de maladies. Les femelles en période de reproduction ont besoin de sang pour le développement des œufs et certaines espèces ont une préférence marquée pour le sang humain. Parmi les espèces connues dans la transmission des maladies à l'homme, celles appartenant aux genres *Culex*, *Aedes* et *Anopheles* étant les plus citées. Les espèces du genre *Culex* transmettent des maladies parasitaires telles la filariose et la fièvre jaune alors que les espèces du genre *Anopheles* transmettent le paludisme (Alaoui Slimani et al., 1999).

Dans les campagnes de lutte anti-moustique, les matières actives des insecticides utilisés appartiennent aux organophosphorés, pyréthriinoïdes et carbamates de synthèse. Ces préparations, bien qu'elles se soient révélées très efficaces sur les moustiques culicidés, présentent plusieurs inconvénients. En effet, en plus de leur coût élevé, elles peuvent être à l'origine de divers problèmes environnementaux. Pour Barbouche et al. (2001), l'accumulation significative de matières actives dans les écosystèmes traités, aquatiques et terrestres est un problème de pollution. Par ailleurs, les substances actives des produits utilisés présentent un large spectre d'action et n'épargnent pas les organismes non cibles. A tous ces inconvénients s'ajoute aussi un grand problème de développement de résistance aux insecticides chimiques, chez les insectes traités (Sinegre et al., 1977). Pour assurer une meilleure intervention, tout en préservant au maximum le milieu naturel, de nouvelles méthodes préventives ainsi que de nouveaux produits sont constamment recherchés. Ainsi, pour contribuer à une gestion durable de l'environnement, la mise en place de nouvelles alternatives de contrôle des moustiques est davantage encouragée. Les substances naturelles qui présentent un large spectre d'action en pharmacologie, comme bactéricides, fongicides, acaricides, etc., peuvent aussi être utilisées comme insecticides de remplacement.

L'utilisation des extraits de plantes comme insecticides est connue depuis longtemps. En effet, le pyrèthre, la nicotine et la roténone sont déjà connus comme agents de lutte contre les insectes (Crosby et al., 1966). D'après Jacobson (1989), plus de 2000 espèces végétales possédant une activité insecticide sont déjà identifiées. Récemment, la litière de l'aulne, plante riche en polyphénols s'est révélée être douée de propriétés toxiques importantes vis-à-vis des larves des moustiques *Culex pipiens* (David et al., 2000).

Dans des travaux plus récents, les propriétés insecticides de certaines plantes ont été démontrées sur les larves d'insectes. Les travaux de Jang et al (2002) sur *A. aegypti* et *C. pipiens* testant l'activité larvicide de certaines légumineuses, et ceux d'Alaoui-Slimani (2002) avec *Mentha pulegium* (Labiée) et de Jang et al. (2002) avec les extraits de plantes médicinales aromatiques ont confirmé l'efficacité insecticide des extraits de ces plantes sur des larves de culicidés.

L'Algérie possède une des flores les plus diversifiées et les plus originale du bassin méditerranéen. Cette flore comporte 3139 espèces, parmi lesquelles 653 sont endémiques (Kazi-Tani et al., 2011). Le Sahara regroupe environ 500 taxons de plantes supérieures (Ozenda, 1983) dont une partie reste de nos jours utilisée par les autochtones comme plantes médicinales (Maire, 1933). L'espèce *Artemisia judaica*, de la famille d'Asteraceae qui a fait l'objet de cette étude, connue sous le nom arabe « Shih » est considérée comme une herbe médicinale (Tackholm, 1974). Les Composés isolés à partir cette espèce ont démontré leur pouvoir anti-paludéen, anti-bactérien et anti-inflammatoire (Saban et al., 2005). L'objectif de cette étude est l'évaluation du pouvoir insecticide de l'extrait brut de la plante *A. judaica* vis-à-vis de l'une des espèces de moustiques communes en Algérie : *Culiseta longiareolata*.

I. Matériel et méthodes

I.1. La plante *Artemisia judaica*

La plante testée a été récoltée de la région de Tamanrasset en septembre 2012. La partie aérienne de la plante a été séchée à l'ombre dans un endroit sec et aéré à une température ambiante de 25°C pendant deux semaines. La plante séchée est broyée dans un broyeur électrique type Waring : Commercial-Blender pour réduire la plante en poudre qui été passée par la suite sur un tamis d'une maille de 0,5 mm de diamètre, afin d'obtenir une poudre fine et de granulométrie homogène. La poudre a été conservée dans des flacons en verre hermétiquement fermés à l'abri de la lumière et de l'humidité.

I.2. Le moustique *Culiseta longiareolata*

Les barquettes de *C. longiareolata* ont été prélevées d'un gîte de ponte au niveau d'un bassin d'eau à la faculté des Sciences de l'Université de Boumerdes. L'incubation des œufs et l'élevage des différents stades larvaires ont été réalisés au niveau du laboratoire à une température de 28-30°C et un éclairage discontinu dans des bacs en plastique. Les larves ont été

alimentées de biscuits et de levure (3/1 : P/P).

1.3. Préparation de l'extrait éthanolique brut

Une quantité de 5 g de poudre de la plante a été laissée macérer dans 80 mL d'éthanol pendant 3 jours sous agitation. Après filtration, le résidu a été extrait une deuxième fois avec 40 mL d'éthanol pendant 48h et une troisième macération a été faite avec 20 mL d'éthanol pendant 24h. Les extraits ont été ensuite combinés et filtrés.

L'extrait éthanolique a été soumis à une évaporation sous vide à 40°C. L'extrait brut a été récupéré dans un pilulier en verre puis séché jusqu'à l'évaporation totale de l'éthanol.

1.4. Activité insecticide

1.4.1. Activité ovicide

Trois doses de l'extrait brut de *A. judaica* ont été testées sur les œufs du moustique *C. longiareolata*: 5 ; 7,5 et 10 g/L d'eau. 20 mL de chacune des trois solutions sont mises dans des gobelets en plastique. Les barquettes sont ensuite déposées à la surface de ces solutions d'extraits à raison d'une barquette par gobelet. Pour chaque dose, l'incubation se fait à température ambiante. L'éclosion des œufs est surveillée et le nombre de larves mortes juste après émergence est compté toutes les 24h pendant 2 jours. Un essai témoin a été conduit en utilisant une eau sans extrait. L'ensemble des essais a été réalisé en quatre répétitions.

1.4.2. Activité larvicide

À partir des résultats des essais ovicides, une gamme de concentrations variables allant de 0,31 à 5 g/L d'eau a été préparée. Les essais larvicides ont été réalisés sur les trois premiers stades larvaires : L1, L2 et L3. Un nombre de 20 larves d'un même stade et de même âge sont prélevées à l'aide d'une pipette à poire et sont introduites dans un gobelet contenant 20 mL de chacune des solutions insecticides préalablement préparées. Pour le témoin, les larves étaient déposées dans les gobelets contenant uniquement 20 ml d'eau. Les mortalités ont été calculées après un temps d'exposition de 2h, 4h, 24h, et 48h. Quatre répétitions ont été effectuées pour chacune des doses testées.

Le pourcentage de mortalité observé pour chaque répétition chez les larves témoins et traitées a été calculé selon la formule suivante :

$$\text{Taux de mortalité } (\%) = (\text{Nombre de mort} / \text{nombre}$$

$$\text{total d'individu}) \times 100$$

Les mortalités observées ont été corrigées à l'aide de la formule d'Abbott (1925) en tenant compte des mortalités naturelles observées dans les lots témoins.

$$M_c = ((M_2 - M_1) / (1 - M_1))$$

Avec :

M_1 : pourcentage de mortalité dans le lot témoin.

M_2 : pourcentage de mortalité dans le lot traité.

M_c : pourcentage de mortalité corrigée.

La DL50 est calculée à partir des droites de régression probits = $f(\log \text{ dose})$.

I.5. Analyse statistique

Les tests de significativité de l'influence des différents traitements ont été réalisés par le biais d'une analyse de variance en utilisant le logiciel XLSTAT 7.5.2. Les comparaisons des moyennes ont été effectuées à un degré de signification de 5 % par le test de Tukey.

II. Résultats

II.1. Effet ovicide de l'extrait brut de *A. judaica* sur les œufs de *C. longiareolata*

L'extrait brut de *A. judaica* a été testé sur les œufs de *C. longiareolata* à trois différentes doses : 5 ; 7,5 et 10 g/L. Les résultats obtenus (Fig. 1) montrent que l'extrait de la plante testée présente une bonne activité ovicide. Cette action évolue avec l'augmentation des doses de l'extrait testé : La plus forte dose testée (D3 : 10 g/L) a inhibé complètement l'éclosion, seu-

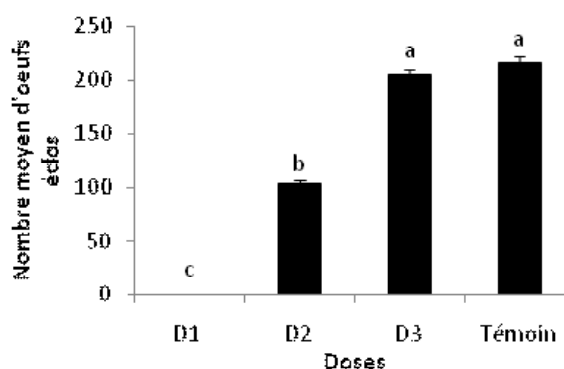


Figure 1. Evolution de la mortalité des larves L1 après éclosion des œufs de *C. longiareolata* en fonction des doses d'extrait éthanolique brut de *A. judaica* testées (D1=5 g/L, D2=7,5 g/L et D3=10 g/L). (moyenne ± écart-type, n=20). a b et c : moyennes significativement différentes (test de Tukey, $p < 0,05$).

les deux larves L1 ont émergées. L'effet inhibiteur est moins accentué pour la dose moyenne 7,5 g/L. Pour la plus faible dose (5 g/L), l'extrait n'a eu aucun effet sur l'embryogenèse et l'éclosion des œufs était totale ; 205 larves L1 ont émergées, puis immédiatement tués par l'extrait.

II.2. Effet larvicide de l'extrait de *A. judaica* à l'égard des larves L1, L2 et L3 de *C. longiareolata*

Les résultats des tests de toxicité de l'extrait brut de *A. judaica* réalisés sur les larves du premier stade de *C. longiareolata* nouvellement émergées (Fig. 2) montrent une relation dose-effet. En effet, la plus

forte dose (D4 : 5 g/L) a entraîné une mortalité de 88,47% après deux heures d'exposition. 100 % de mortalité ont été obtenues après quatre heures d'exposition. La faible dose testée n'a entraîné 100 % de mortalité qu'après 96h.

Tout comme pour les larves L1, une augmentation du pourcentage de mortalité des larves L2 traitées a été notée avec l'augmentation des doses de l'extrait testé. Les 100 % de mortalité sont obtenues après 24 h d'exposition pour les deux fortes doses : D4 et D3 (1,25 et 2,5 g/L).

La figure 4 illustrant l'évolution des pourcentages de mortalité cumulée des larves L3 en fonction du

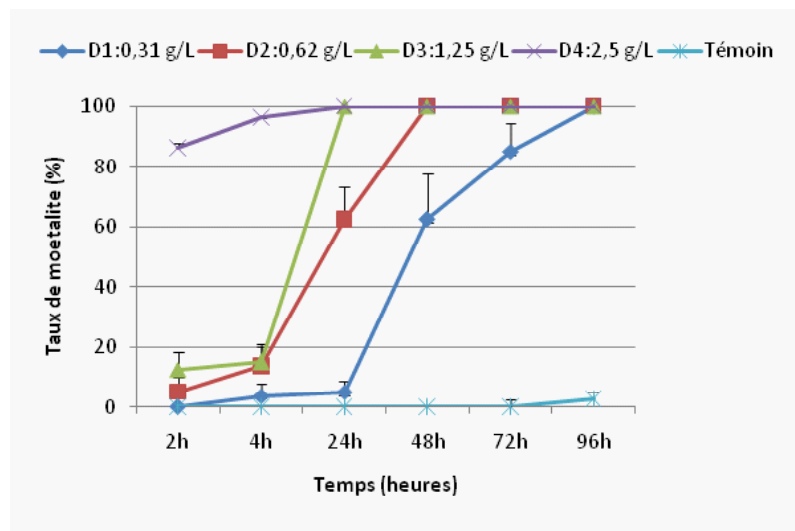


Figure 3. Cinétique de mortalité des larves L2 de *C. longiareolata* témoins et traitées à l'extrait éthanolique brut de *A. judaica*. Différence significative $p < 0,05$ (Anova à 5 %).

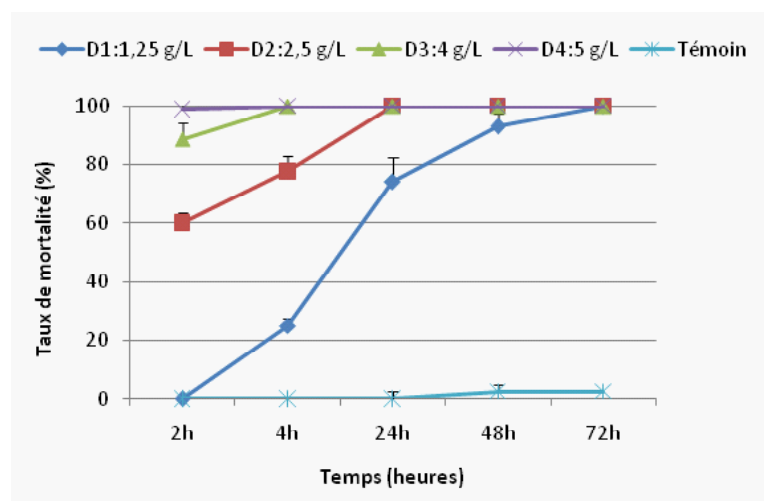


Figure 4. Cinétique de mortalité des larves L3 de *C. longiareolata* témoins et traitées à l'extrait éthanolique brut de *A. judaica*. Différence significative $p < 0,05$ (Anova à 5 %).

Figure 5. Droites de régression : Probits en fonction du log doses des larves L1de *C. longiareolata* traitées à l'extrait éthanolique brut de *A. judaica*.

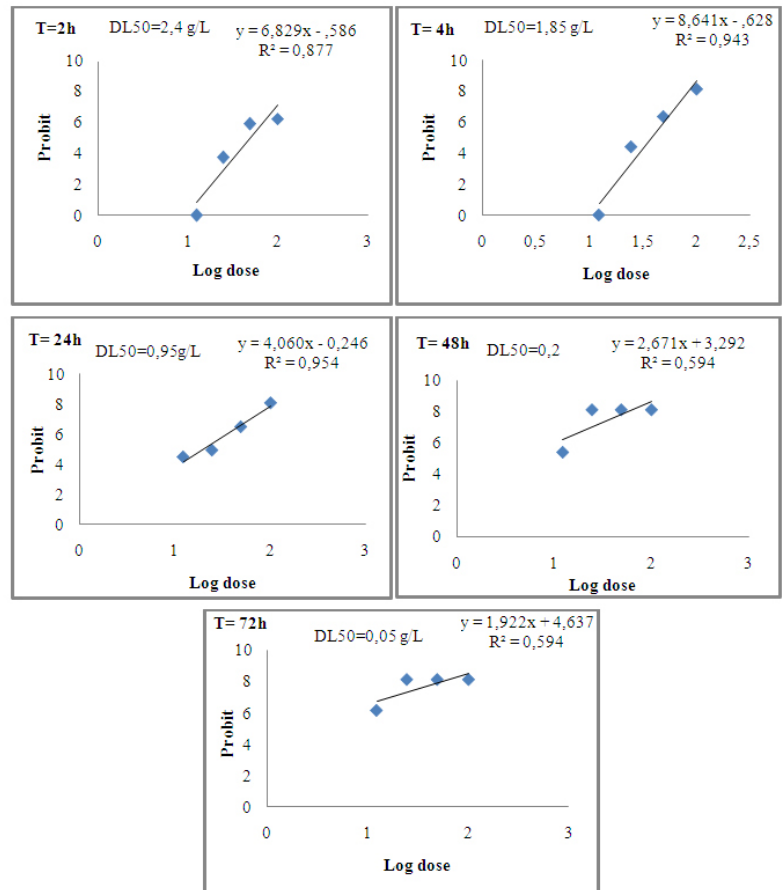
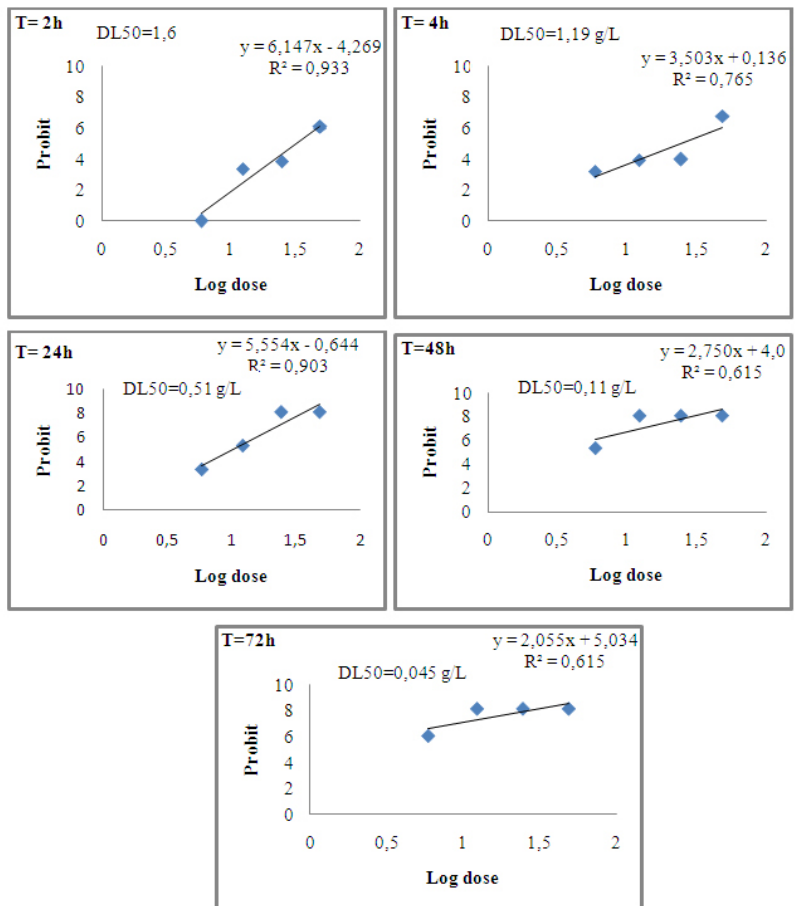


Figure 6. Droites de régression : Probits en fonction du log doses des larves L2 de *C. longiareolata* traitées à l'extrait éthanolique brut de *A. judaica*



temps, montre que les larves de *C. longiareolata* sont sensibles à l'extrait testé. Les 100 % de mortalité sont observés 2 heures après traitement avec la dose D3 : 4 g/L.

II.3. Evaluation de la DL50

Le traçage des droites de régression des probits en fonction des logarithmes des doses à différents temps d'observation, a permis de calculer les DL50 pour les différents stades larvaires L1, L2 et L3 et qui sont représentées par les figures 6,7 et 8.

Ces figures montrent que l'effet toxique de l'extrait analysé est clairement apparent à travers les valeurs de la DL50 trouvées. Ces valeurs diminuent dans le temps, ce qui traduit la bonne efficacité des extraits testés.

Pour les larves L1, la DL50 la plus élevée a été obtenue après 2h d'exposition et elle est de 2,4 g/L. La faible valeur de DL50 était de 1,54 g/L, elle a été obtenue après trois jours d'exposition.

Pour les larves L2, la DL50 calculée après 2 heures d'exposition était de 1,6 g/L. Ce résultat explique la grande résistance des larves L1 comparativement aux

larves L2.

La DL50 obtenue après deux heures d'exposition pour les L3 est de 2,28 g/L.

III. Discussion et conclusion

Dans cette étude, une évaluation de l'effet insecticide de l'extrait éthanolique brut de la partie aérienne de la plante *A. judaica* (Asteracea) connue pour son activité insecticide a été réalisée. Les résultats des essais de toxicité de l'extrait brut de la plante ont révélé un bon effet ovicide et larvicide avec une relation dose-réponse. En effet, à forte dose, l'extrait a inhibé complètement l'éclosion des œufs. Sur les larves, une progression de la mortalité en fonction des doses a été observée. Les 100 % de mortalité ont été obtenus après quatre (04) heures d'exposition pour les L1 et les L3 et ce avec la plus forte dose. Pour les L2, la mortalité de 100 % a été obtenue après 24 h d'exposition. Le fort pouvoir insecticide de cette plante est lié à la richesse de cette plante en métabolites secondaires (Acheuk et al, 2017 in press). Comme nos résultats, Masotti et al. (2012) ont rapporté que des extraits éthanoliques de *A. molinieri* et de *A. campestris* Var *glutinosa* ont montré une activité larvicide contre

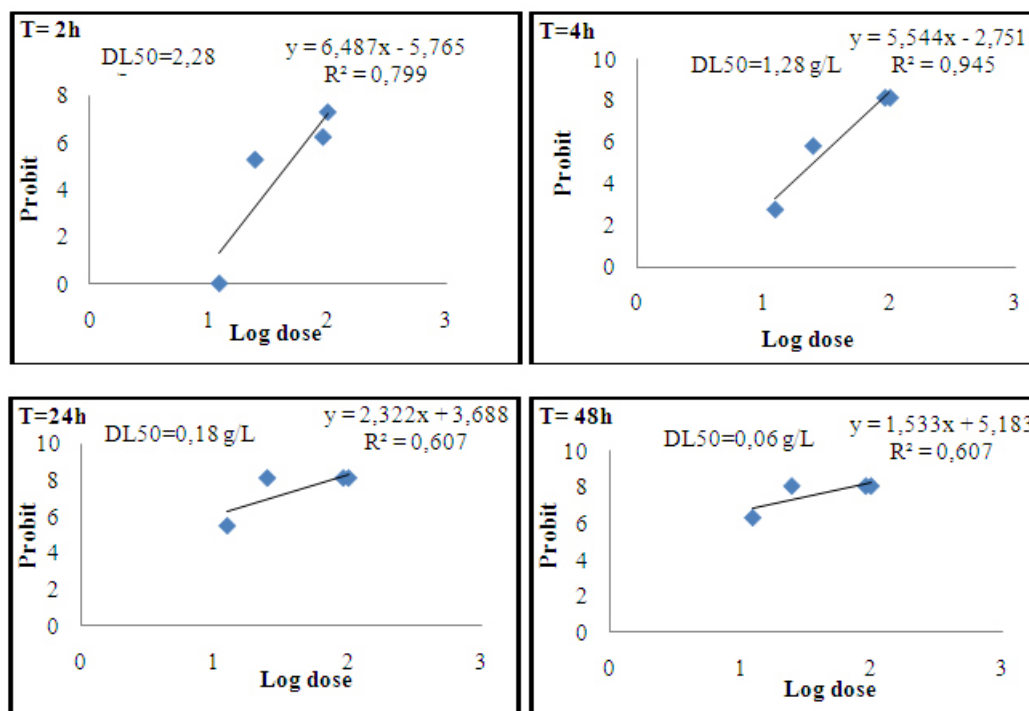


Figure 7. Droites de régression : Probits en fonction du log doses des larves L3 de *C. longiareolata* traitées à l'extrait éthanolique brut de *A. judaica*

le moustique *C. pipiens*. Cependant, des extraits de *A. molinieri* ont révélé une activité larvicide plus élevée que celle de *A. campestris*. Les différences de l'effet biocide trouvé de ces extraits testés pourraient être expliquées par leur composition chimique différente.

Les travaux de Macedo et al. (1997) sur l'activité larvicide des extraits brut de *Tagetes minuta*, recueillie du Brésil, contre les larves du quatrième stade du moustique *Aedes ochlerotatus fluviatilis* (Diptera: Culicidae) ont montré une CL90 et une CL50 respectivement de 1,5 et de 1,0 mg/L. Cette plante a entraîné une mortalité de 100 % à 10 mg/L après 48h d'exposition. Cette plante se montre très toxique, son effet insecticide est lié à la présence d'un composé : le 5- E-ociménone qui a été décrit comme le principe actif de la plante *Tagetes minuta* (Maradufu et al., 1978).

Les travaux d'Arivoli et al. (2011) ayant évalué les effets de différents extraits de *A. Vernonia cinerea* collectées en Inde contre les L3 de *Culex quinquefasciatus*, ont mis en évidence une bonne activité insecticide des extraits testés avec une relation mortalité-concentration. Parmi les quatre extraits testés, l'extrait d'acétate d'éthyle a été le plus efficace suivi par l'extrait chloroformique et acétonique. La CL50 et 90 pour l'extrait d'acétate d'éthyle étaient évaluées respectivement à 1,63 et 4,25 mg/ml après 24 h de contact.

L'étude phytochimique des extraits des espèces du genre *Artemisia* a mis en évidence la présence de nombreux métabolites secondaires principalement les monoterpénoïdes comme le vulgare, le spathulenole, le vulgare, le triterpénoïde : α -amryne et α -amryne acétate et le fernenole (Glasby, 2005 ; Ciulei, 1993). Les propriétés insecticides d'*Artemisia vulgaris* et d'autres espèces du genre *Artemisia* ont été attribuées à la présence de ces métabolites secondaires.

L'extrait éthanolique brut de la plante *A. judaica* a présenté des propriétés insecticides importantes sur les œufs et les larves de moustique au stade I, II et III.

Les résultats obtenus sont donc encourageants et laissent suggérer la possibilité d'utiliser les métabolites secondaires de cette plante des régions arides comme bioinsecticide, vu son bon pouvoir larvicide.

Références bibliographiques

- Acheuk F. Lakhdari W. Abdellaoui K. Belaid M. Allouane R., Halouane F. Phytochemical study and bioinsecticidal effect of the crude ethonolic extract of the algerian plant *Artemisia judaica* L. (Asteraceae) against the black bean aphid, *Aphis fabae* Scop. Article in press, J. Agri. Fores 2017.
- Alaoui Slimani N, Joud N, Benhoussa A, Hajji K. Typologie des habitats d'Anopheles dans une zone urbaine (Diptera Culicidae). Entomologiste 1999 ; 55 ; 5 ; 181-190.
- Allal-Benfekih L. Recherches quantitatives sur le criquet migrateur *Locusta migratoria* (Orth. Oedipodinae) dans le Sahara algérien, perspectives de lutte biologique à l'aide de microorganismes pathogènes et de peptides synthétiques. Thèse de doctorat, Université de LIMOGES. 2006 ; 150 p.
- Arivoli S. Samuel T. Jesudoss J.M. Larvicidal efficacy of *Vernonia cinerea* (L.) (Asteraceae) leaf extracts against the filarial vector *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). J. of Biopesticides 2011; 4 ; 1 ; 37 - 42,
- Barbouche N. Hajjem B. Lognay G. Ammar M. (2011). Contribution à l'étude de l'activité biologique d'extraits de feuilles de *Cestrum parqui* L'Hérit. (Solonaceae) sur le criquet pèlerin *Schistocerca gregaria* (Forskal). Biotechnol. Agron. Soc. Environ 2011 ; 5 ; 2 ; 85-90.
- Ciulei I. Methodology for analysis of vegetable drugs. UNIDO, Romania, 1983.
- Crosby DG. Natural pest control agents. In Gould, R.F. Natural Pest Control Agents. Adv. Chem. Ser. American Chem. Society: Washington ; 1966.
- David JP. Rey D. Pautou MP. Meyran JC. Differential toxicity of leaf litter to dipteran larvae of mosquito developmental sites. J. Invertebr. Patho 2000. 75; 9-18.
- Glasby JS. Dictionary of plants containing secondary metabolites: Taylor and Francis e-Library: Philadelphia, 2005.
- Isman MB. Les insecticides botaniques, la dissuasion et répulsifs dans l'agriculture moderne et de plus en plus réglementé monde. Ann Review of Entom 2006; 51; 45-66.
- Jang YS. Baek BR. Yang YC. Kim MK. Lee HS. Larvicidal activity of leguminous seeds and grains against *Aedes aegypti* and *Culex pipiens pallens*. J. Am. Mosq. Control. Assoc 2002 ; 18 ; 3 ; 210-213.

- Kazi-Tani C. Le Bourgeois T. Munoz F. Contribution à l'étude des communautés d'adventices des cultures du secteur phytogéographique oranais (Nod-Ouest algérien) : aspects botanique, agronomique et phytocologique. Association Française de Protection des Plantes. AFPP- 21ème Conférence du COUMA- Journée internationale sur la lutte contre les mauvaises herbes, Dec 2010, Dijon, France.
- Maire R. Études sur la flore et la végétation du Sahara central. Mémoire de la société d'histoire naturelle de l'Afrique du nord, 1933, 3, Mission du Hoggar II, Alger, 361 p.
- Masotti V. De Jong L. Moreau X. Rabier J. Laffont Schwob I. Thierry A. Larvicidal activity of extracts from *Artemisia* species against *Culex pipiens* L. mosquito: Comparing endemic versus ubiquitous species for effectiveness. *Comptes Rendus Biologies* 2012; 335; 19-25.
- Maradufu AR. Lubega R. Dorn F. Isolation of (5E)-Ocimenone, mosquito larvicide from *Tagetes minuta*. *Lloydia* 1978 ;41 ; 181-183.
- Ozenda P. La flore du Sahara septentrional et central, CNRS, France, 1958.
- Saban K. Recep K. Ahmet M. Ahmet CAA. Ali Y. Determination of the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Artemisia dracunculus* and of the antifungal and antibacterial activities of Turkish *Artemisiaabsinthium*, *Artemisia dracunculus*, *Artemisiaantonium*, and *Artemisia-picigera essential oils*. *J Agric Food Chem*. 2005 ; 53 ; 9452-9458.
- Sinegre G. Jilien JL. Gaven B. Acquisition progressive de la résistance au chlorpyrifos chez les larves de *Culex pipiens* (L.) dans le Midi de la France. *Parasitologia* 1977; 19 ; 79-94.
- Tackholm V. Flora étudiants de l'Égypte. Caire University Press, Coopérative d'impression Co, Beirrut, Liban, 1974.
- Tonk SR. Bartarya R. Maharaj KK. Bhatnagar VP. Srivastava SS. Effective method for extraction of larvicidal component from leaves of *Azadirachta indica* and *Artemisia annua* Linn, *J of Envi Biol* 2006 ; 27 ; 103-105.