

## Activité biologique d'un agoniste non stéroïdien de l'hormone de mue sur *Culiseta longiareolata*: analyses morphométrique, biochimique et énergétique

Fouzia Tine-Djebar et Noureddine Soltani

Laboratoire de Biologie Animale Appliquée, Faculté des Sciences, Département de Biologie, Université d'Annaba, 23000-Annaba, Algérie.

Accepté le 12/06/2008

الهالوفينوزيد، مجموعة جديدة من معدلات نمو الحشرات تم تقييمه على نوع من البعوض *Culiseta longiareolata* 24 ساعة على يرقات الطور الثالث و الرابع حديثة الانسلاخ. المركب يسبب نقص معنوي في الوزن الجسمي و في كمية اليبيدات، السكريات و البروتينات. كما انه يؤدي الى اضطراب في النمو و

الكلمات المفتاحية: دراسة قياسية بيوكيميا *Culiseta longiareolata*.

### Résumé

Le halofenozide (RH-0345), un régulateur de croissance des insectes mimétique de l'hormone de mue, a été évalué sur une espèce de moustique ayant un intérêt vétérinaire, *Culiseta longiareolata* (Diptera: Culicidae). Les traitements ont été réalisés en conditions de laboratoire sur des larves nouvellement exuvées des troisième et quatrième stades avec une durée d'exposition à l'insecticide de 24h conformément aux recommandations de l'Organisation Mondiale de la Santé relatives aux tests d'efficacité des régulateurs de croissance des insectes sur les moustiques. L'insecticide est additionné dans l'eau d'élevage à deux concentrations finales (12,58 µg/L and 28,58 µg/L). Les résultats montrent que le composé affecte le volume corporel, le contenu en lipides, glucides et protéines, et les indices caloriques. Ces modifications morphométriques et biochimiques suggèrent des effets dépressifs du traitement insecticide sur la fécondité et le pouvoir pathogène de l'espèce utilisée.

**Mots clés :** régulateurs de croissance des insectes; halofenozide; toxicologie; biochimie; moustiques; *Culiseta longiareolata*.

### Abstract

The halofenozide, an insect growth regulator (IGR) belonging to the ecdysteroid agonists class, has been evaluated on *Culiseta longiareolata* (Diptera: Culicidae). The insecticidal bioassays were conducted on newly ecdysed 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> instar larvae under laboratory conditions. The insecticide was added to the rearing water at two final concentrations (12,58 µg/L and 28,58 µg/L). The larvae were exposed to the insecticide for 24h according to instructions of World Health Organization guidelines concerning the insecticidal bioassays using IGRs against mosquitos. The compound affected the body volume as well as contents on lipids, carbohydrates and proteins, and the caloric indexes. These morphometric and biochemical modifications could be indicative of negative effects of this insecticidal treatment on the fecundity and pathogeny of the species used.

**Key words:** insect growth regulators; halofenozide; toxicology; biochemistry; mosquitos; *Culiseta longiareolata*.

## 1. INTRODUCTION

Le contrôle des moustiques devient de plus en plus difficile en raison de la résistance aux insecticides conventionnels et à un moment où les demandes publiques réclament la diminution de leur

usage dans l'environnement [1]. Les recherches en agrochimie ont permis de découvrir une nouvelle classe de régulateur de croissance des insectes (RCIs), les agonistes de l'hormone de mue

(ecdystéroïdes) dès 1988 [2]. Ce sont des dérivés de la benzoylhydrazine qui miment l'activité biologique de l'hormone de mue naturelle, la 20-hydroxyecdysone, en induisant des mues létales précoces et incomplètes chez différents ordres de la classe des insectes [3]. Ces insecticides de la troisième génération de, par leur spécificité et leur faible toxicité, offrent de grands avantages pour la préservation de l'environnement [4] et présentent un intérêt évident dans la lutte intégrée. Précédemment, nous avons testé l'efficacité et précisé le mode d'action de représentants de diverses classes de RCIs sur plusieurs organismes visés à intérêt agricole ou médical [5-12], ou non ciblés comme les crustacés, les mollusques bivalves et les poissons [6, 13-15].

Ce travail complète donc les travaux antérieurs réalisés dans notre laboratoire et vise à évaluer les différents effets d'un agoniste de l'hormone de mue le halofenozide sur *Culiseta longiareolata* (Diptera: Culicidae), espèce à intérêt vétérinaire puisqu'elle est un agent vecteur du paludisme chez les oiseaux [16]. Des relations métaboliques entre le volume corporel, les réserves nutritives et la fécondité ont été rapportées chez les moustiques [17]. C'est pourquoi, l'activité de l'insecticide a été examinée au niveau morphométrique (longueur des ailes, largeur du thorax, volume corporel), biochimique (dosage des protéines, lipides et glucides) et calorique (contenu calorique et contenu calorique spécifique à la taille).

Ces données renseignent sur le potentiel vecteur de l'espèce via les réserves énergétiques mobilisables durant la reproduction (pullulation du moustique) et le vol (dissémination et transmission du parasite).

## 2. MATERIEL ET METHODES

### 2.1 Technique d'élevage

Un élevage de masse est réalisé en laboratoire à partir des oeufs de *Culiseta longiareolata* récoltés dans la région de Tébessa où elle est très répandue [18]. Après éclosion, les larves sont élevées dans des récipients contenant 200 mL d'eau déchlorurée et maintenue à une température de 25°C et une photopériode de 14h de lumière. La nourriture, composée d'un mélange de biscuit (75%) et de levure sèche (25%), est fournie quotidiennement [5].

### 2.2 Insecticide et traitement

Le halofenozide (nom de code : RH-0345) est le nom commun du N- tert-butyl-N'-(4 chlorobenzoyl) benzoyldrazide ; sa formule empirique est:  $C_{18}H_{19}Cl N_2 O_2$  et son poids moléculaire est de 330,81 g. Il a été développé par la firme Rohm & Haas (Spring House, PA, USA). Une formulation commerciale de l'halofenozide (MACH : 23 % EC, émulsion concentrée) a été utilisée et diluée dans l'eau d'élevage à deux concentrations finales (12,58 et 28,58 µg/L) correspondant respectivement aux CL50 et CL90 [7].

Les larves nouvellement exuviées des troisième et quatrième stades ont été exposées à l'insecticide pendant 24h selon les indications de l'Organisation Mondiale de la Santé relatives aux tests d'efficacité des régulateurs de croissance des insectes sur les moustiques [19]. Après exposition, les larves traitées sont rincées et placées dans de l'eau propre. Les larves témoins sont placées dans les mêmes conditions dans de l'eau non traitée. Les essais ont été effectués avec 3 répétitions chacune contenant 25 larves.

### 2.3. Etude morphométrique

Le volume corporel des larves et des pupes des séries, témoins et traitées, a été déterminé à partir de la valeur cubique de la largeur du thorax et celui des adultes mâles et femelles calculé à partir de la valeur cubique de la longueur des ailes [20]. Le volume corporel a une influence sur le volume du repas sanguin et le nombre d'œufs matures produits [21]

### 2.4 Analyse biochimique

L'extraction des principaux constituants (lipides, glucides et protéines) a été réalisée selon Shibko *et al.* [22]. Un pool de 25 larves nouvellement exuviées (âge < 3 h) de chaque stade (larves, pupes et adultes mâles et femelles) de *C. longiareolata* est homogénéisé dans un 1 ml d'acide trichloracétique (20 %). Après une première centrifugation (5000 trs/min, 10 min), le surnageant obtenu sert au dosage des glucides totaux [23], tandis que le culot 1 est additionné au mélange d'éther et de chloroforme (1V/1V). Une seconde centrifugation donne un autre surnageant destiné au dosage des lipides totaux [24], tandis que le culot 2 sera dissout dans de la soude (0,1 N) et utilisé pour le dosage des protéines [25]

### 2.5 Indices caloriques

Deux indices caloriques, le contenu calorique (C.C) et le contenu calorique spécifique à la taille (C.C.S.T), ont été déterminés [26]. Pour le C.C, les valeurs absolues des différents métabolites sont converties en calories sachant qu'une calorie correspond à 0,004 µg de glucides ou de protéines, et à 0,009 µg de lipides. Le contenu calorique spécifique à la taille est déterminé d'après la formule (1)

$$CCST (\text{Cal}/\text{mm}^3) = \frac{C.C.}{(\text{Larg. thorax})^3 (\text{Long. ailes})^3} \quad (1)$$

### 2.6 Analyse Statistique

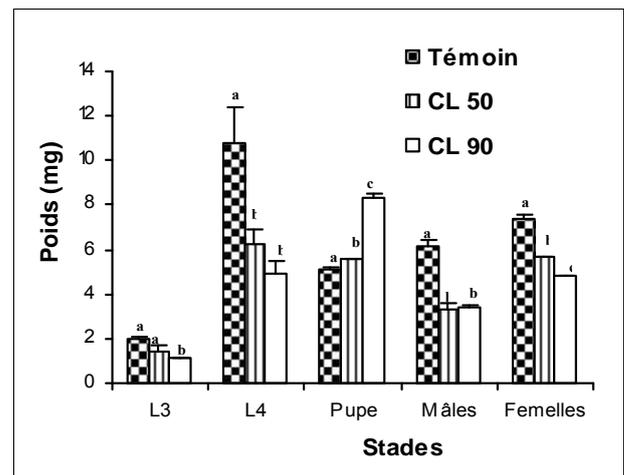
Les résultats des dosages biochimiques et des indices caloriques ont fait l'objet d'une analyse de la variance à un ou deux critères de classification à l'aide du logiciel MINITAB, version 13.31 (PA State Collège, USA).

## 3. RESULTATS

### 3.1 Effet sur la morphométrie

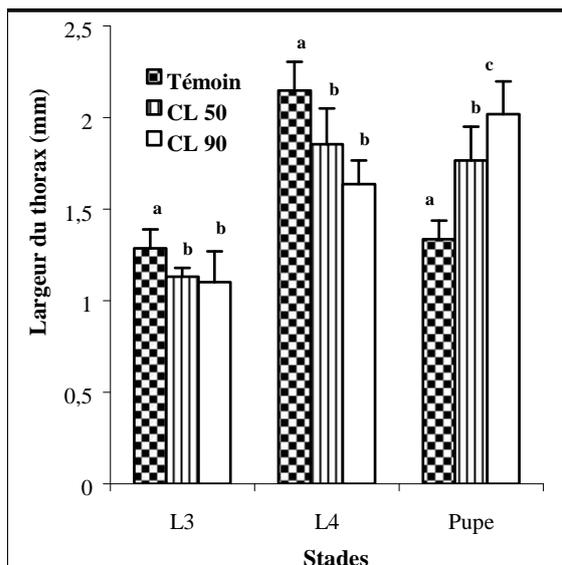
Chez les séries témoins et traitées à la concentration I (CL50), le poids corporel des individus augmente de façon significative du stade larvaire 3 au stade 4 puis chute au stade nymphal et au stade adulte. Cependant, à la concentration II (CL90), le poids augmente au cours des stades immatures (larvaire et nymphal) puis une diminution au stade adulte. Les fortes valeurs sont observées chez les femelles par rapport aux mâles pour les deux séries (p= 0,000).

La comparaison des séries témoins et traitées révèle que le mimétique des ecdystéroïdes affecte significativement (p= 0,000) le poids corporel des individus des différents stades étudiés (fig.1).



**Figure 1.** Poids corporel (mg) des individus témoins et traités de *C. longiareolata* ( $m \pm s$ ;  $n = 3$  répétitions contenant chacune 25 individus/stade; les moyennes d'une même série affectées d'une même lettre ne sont pas significativement différentes).

De plus, la largeur du thorax et le volume corporel des séries témoins augmentent du troisième stade au quatrième stade et diminuent par la suite au stade nymphal (fig.2). Pour le stade adulte, la longueur des ailes des femelles témoins et traitées présente des valeurs significativement ( $p = 0,000$ ) supérieures à celles observées chez les mâles. Enfin, la longueur des ailes des adultes et le volume corporel des individus des stades testés sont affectés par le traitement puisque la comparaison des moyennes montre des différences significatives entre les séries témoins et traitées ( $p= 0,000$  et  $0,001$  respectivement) (fig.3 et 4). La largeur du thorax n'est pas affectée par le traitement ( $p= 0,985$ ). Par ailleurs, on note une augmentation significative ( $p= 0,000$ ) des paramètres examinés chez la pupa.



**Figure 2.** Largeur du thorax (mm) chez les individus témoins et traités de *C. longiareolata* ( $m \pm s$ ;  $n=3$  répétitions contenant chacune 25 individus/stade; les moyennes d'une même série affectées d'une même lettre ne sont pas significativement différentes).

### 3.2 Effet sur la composition biochimique

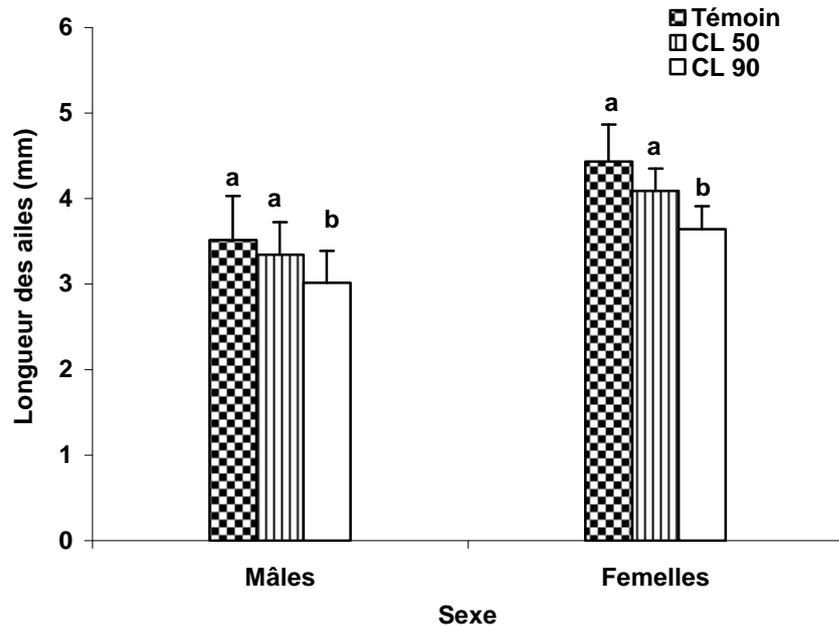
Chez les séries témoins, le contenu ( $\mu\text{g}/\text{individu}$ ) en lipides et protéines augmente significativement du stade

larvaire 3 au stade nymphal passant par le stade L4 puis diminue au stade adulte (fig.5). Pour les glucides, le contenu diminue chez la nymphe et augmente par la suite chez l'adulte. Pour les séries traitées, on note une augmentation du contenu en divers métabolites du troisième stade larvaire au stade nymphal puis une diminution au stade adulte pour les glucides et les lipides chez la série traitée avec la CL90 et une augmentation pour les protéines et les lipides chez la série traitée avec la CL50. Les contenus en protéines et glucides chez les femelles sont significativement élevés par rapport à ceux des mâles sauf les lipides ou cette différence n'est pas significative ( $p=0,481$ ). La comparaison entre les séries témoins et traitées montre que le halofenozide affecte avec une relation dose-réponse le contenu en protéines ( $p=0,000$ ), glucides ( $p= 0,000$ ) et lipides ( $p=0,007$ ).

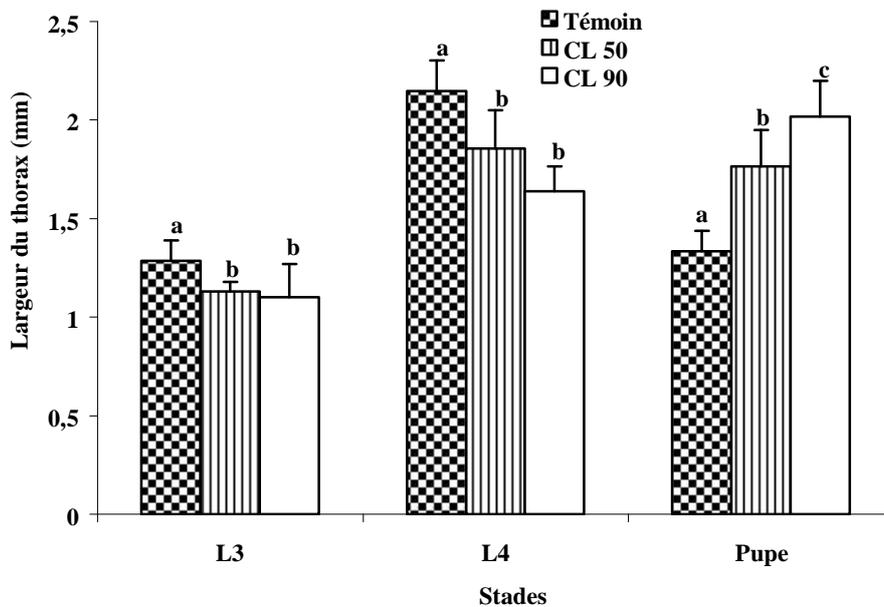
L'analyse biochimique montre par ailleurs que les glucides représentent le constituant relativement le plus abondant dans le corps des moustiques; ils sont suivis des lipides et des protéines.

### 3.3 Effet sur les indices caloriques

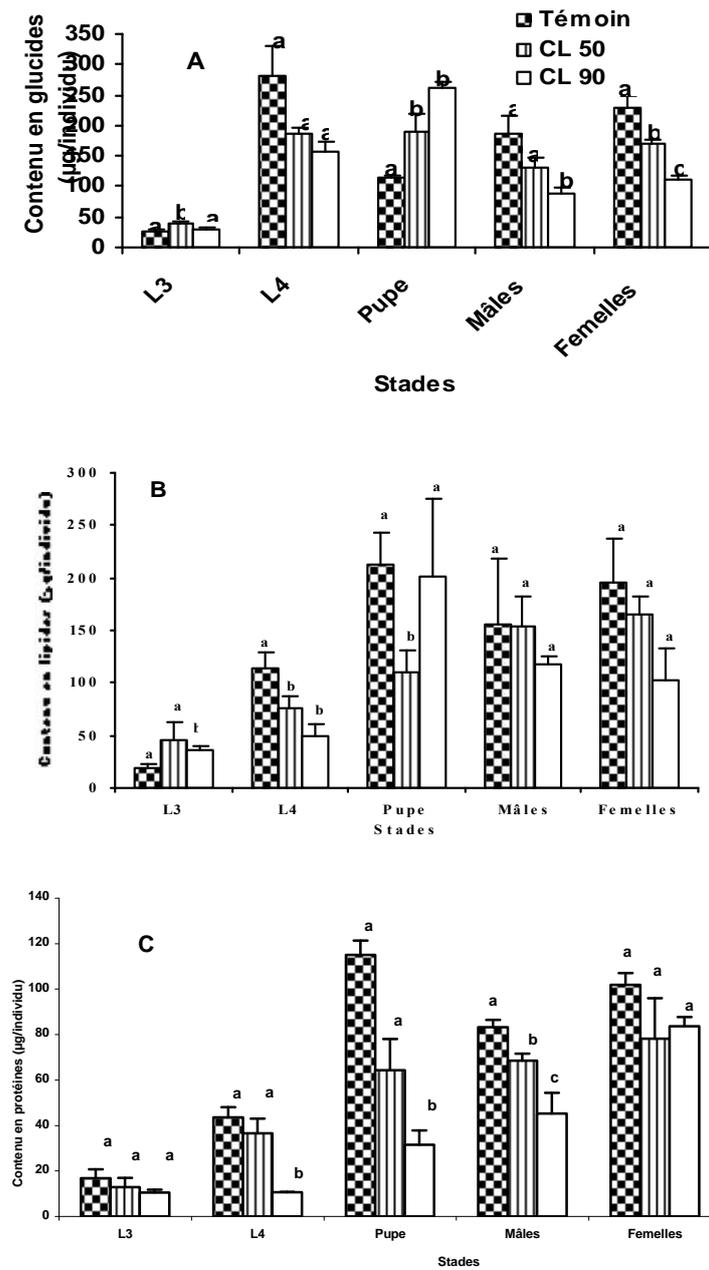
Les résultats sont représentés dans les figures 6 et 7. Chez les séries témoins et traitées, le contenu calorique des protéines augmente progressivement durant les stades L3, L4 et pupa, et diminue par la suite chez les adultes. Les plus fortes valeurs sont observées chez les femelles. La comparaison entre les séries témoin et traitée montre que l'insecticide réduit significativement le contenu calorique des protéines avec un effet concentration. Le contenu calorique des glucides et des lipides chez les deux séries augmente au cours du développement. De plus, le contenu calorique des glucides et des lipides des séries témoins est significativement supérieur à celui des



**Figure 3:** Longueur des ailes (mm) chez les adultes mâles et femelles de *C. longiareolata* ( $m \pm s$ ;  $n = 3$  répétitions contenant chacune 25 individus/stade; les moyennes d'une même série affectées d'une même lettre ne sont pas significativement différentes).



**Figure 4:** Volume corporel ( $mm^3$ ) chez les individus témoins et traités de *C. longiareolata* ( $m \pm s$ ;  $n = 3$  répétitions contenant chacune 25 individus/stade; les moyennes d'une même série affectées d'une même lettre ne sont pas significativement différentes).

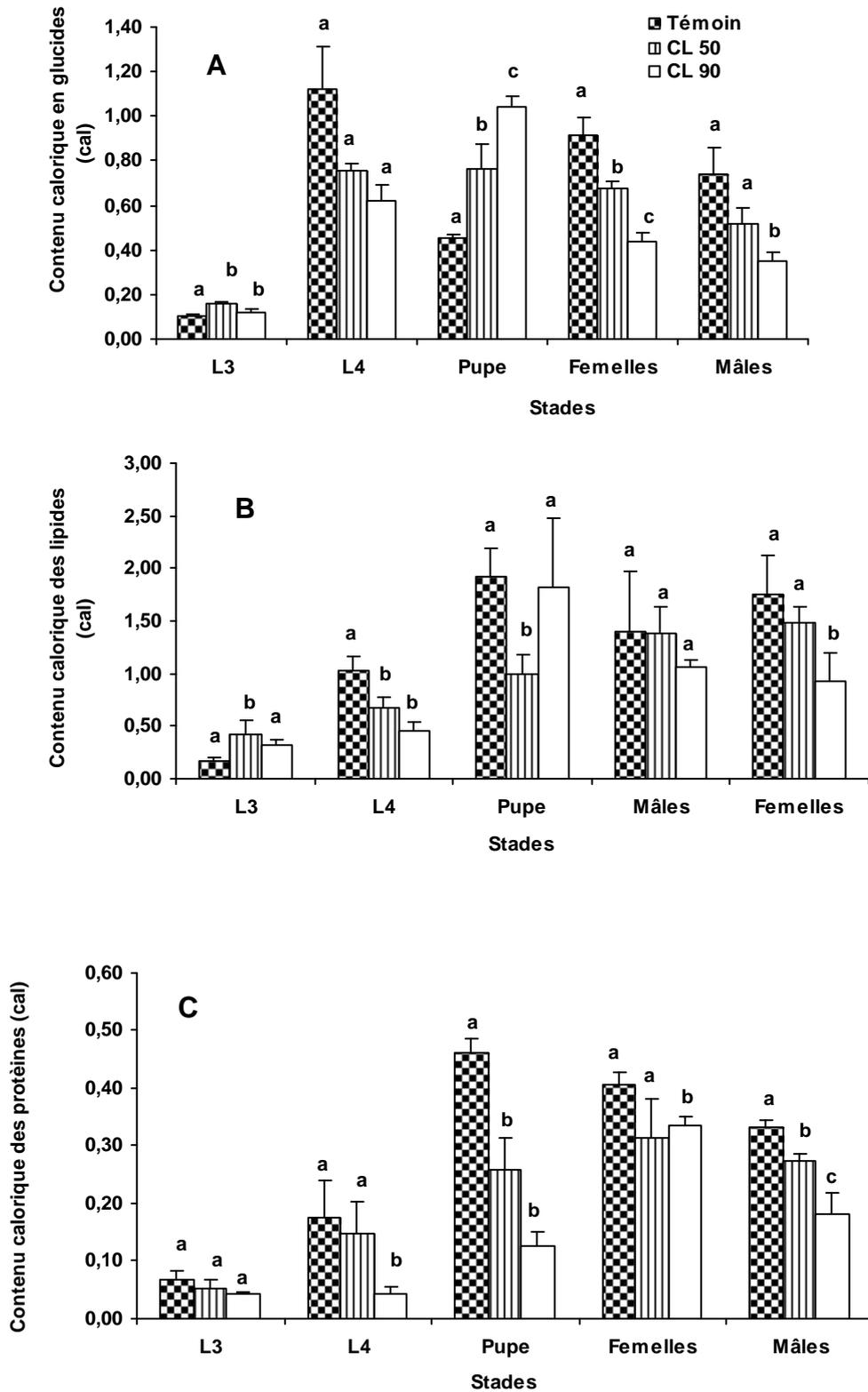


**Figure 5:** Contenu en glucides (A), lipides (B) et protéines (C) (µg/individu) chez les individus témoins et traités de *C. longiareolata* ( $m \pm s$ ;  $n = 3$  répétitions contenant chacune 25 individus/stade; les moyennes d'une même série affectées d'une même lettre ne sont pas significativement différentes).

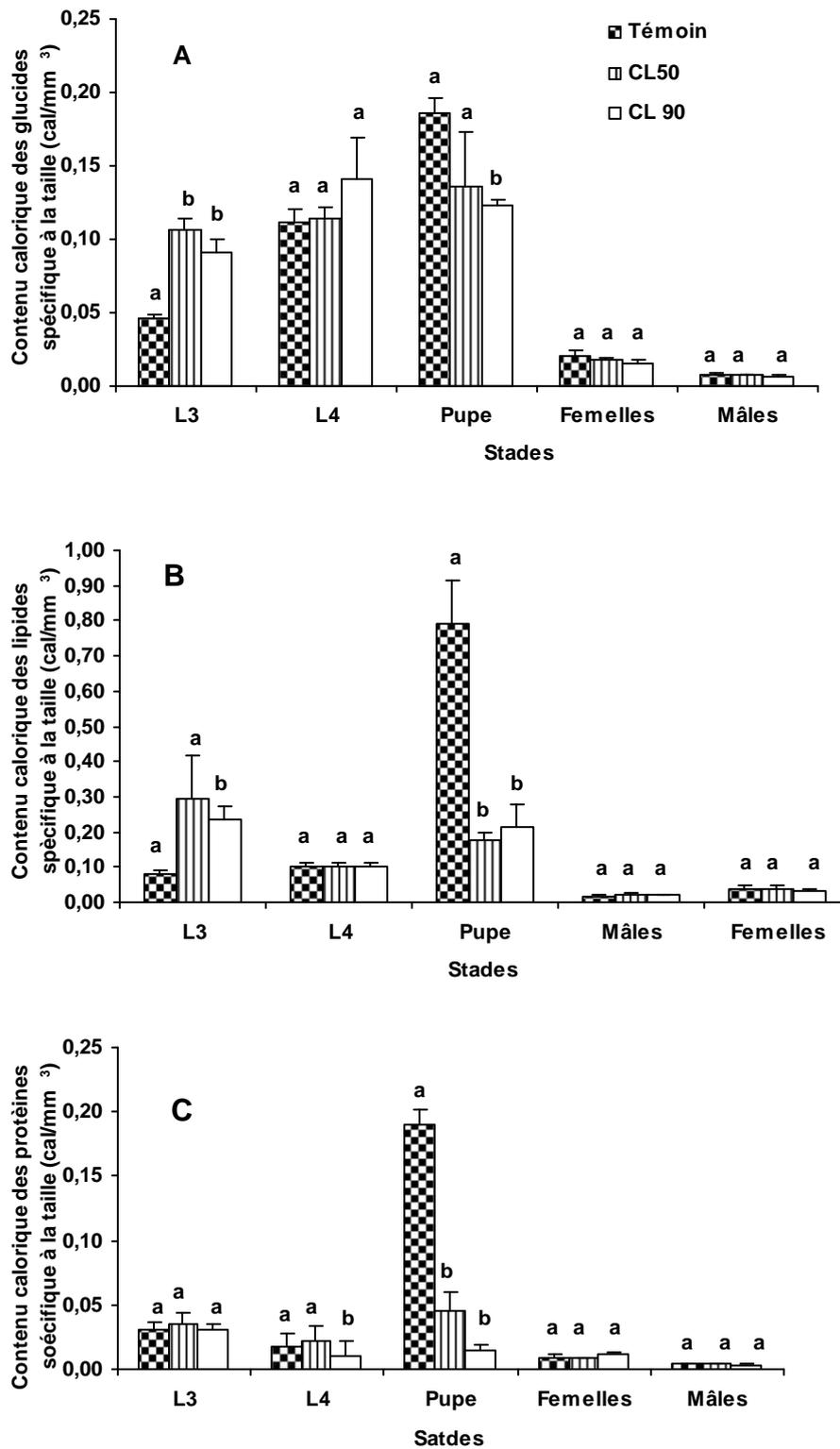
séries traitées et cela, pour les stade L4 et adulte mâle et femelle.

Le contenu calorifique spécifique à la taille des glucides, lipides et protéines, montre des variations au cours des divers stades post-embryonnaires chez les deux

séries (Fig. 7). Cependant, il n'y pas de différence significative entre les séries témoins et traitées. Enfin, le contenu calorifique spécifique à la taille des glucides, lipides et protéines, est relativement élevé chez les adultes femelles par rapport aux adultes mâles.



**Figure 6.:** Contenu calorifique (en calories) en glucides (A), lipides (B) et protéines (C), chez les individus témoins et traités de *C. longiareolata* ( $m \pm s$ ;  $n = 3$  répétitions contenant chacune 25 individus/stade; les moyennes d'une même série affectées d'une même lettre ne sont pas significativement différentes).



**Figure 7.:** Contenu calorifique spécifique à la taille (C.C.S.T.) (Cal/mm<sup>3</sup>), des glucides (A), lipides (B) et protéines (C), chez les individus témoins et traités de *C. longioareolata* ( $m \pm s$ ;  $n = 3$  répétitions contenant chacune 25 individus/stade; les moyennes d'une même série affectées d'une même lettre ne sont pas significativement différentes).

#### 4. DISCUSSION

Le développement des insectes est caractérisé principalement par des mues et des métamorphoses qui sont contrôlées par les différents taux de l'hormone de mue (20E) en présence ou en l'absence de l'hormone juvénile [27]. Toute interférence dans l'homéostasie de ces hormones peut conduire à une perturbation dans le développement des insectes cibles [28]. Ceci explique les différents désordres physiologiques observés chez *C. longiareolata* après traitement des larves L3 et L4 avec l'halofenozide, un nouvel agoniste des ecdystéroïdes, confirmant les travaux antérieurs. En effet, ce composé provoque des mues létales précoces chez *Culex pipiens* [7] et induit une apolyse prématurée dans les explants tégumentaires nymphaux de *T. molitor* [12].

Le traitement des individus avec les concentrations létales 12,58 µg/L et 28,58 µg/L provoque une réduction dans le poids corporel, la largeur du thorax, la longueur des ailes et le volume corporel, respectivement. Ces perturbations qui affectent la morphométrie des moustiques sont également observées au niveau des ovaires [29].

L'évolution des contenus en métabolites corporels au cours du développement post-embryonnaire de *C. longiareolata* est perturbée par l'analogue de l'hormone de mue; Des résultats similaires ont été rapportés chez d'autres espèces comme *B. germanica* [30].

Les glucides en tant qu'éléments énergétiques, jouent un rôle essentiel dans la physiologie des insectes et les taux de glycogène et de tréhalose dans les tissus et l'hémolymph sont étroitement liés aux événements physiologiques comme la mue et la reproduction [31]. Le traitement avec l'agoniste des ecdystéroïdes (RH-

0345), affecte les concentrations des glucides hémolymphatiques chez *C. longiareolata* comme l'administration de 20E chez *T. molitor* [32] ou de l'halofenozide chez *B. germanica* [30].

Les lipides, principale source d'énergie chez les insectes sont transportés du corps gras site de leur synthèse et stockage vers les organes utilisateurs notamment les ovaires *via* l'hémolymph pour être utilisés lors de la vitellogénèse [33]. Le RH-0345 réduit également les concentrations des lipides avec un effet doses au cours de la maturation sexuelle chez *B. germanica* [30].

La réduction des contenus en divers métabolites après traitement, peut avoir plusieurs causes telles que la diminution de leur synthèse ou de leur libération dans l'hémolymph par le corps gras. Le contenu calorique des principaux constituants (protéines, glucides et lipides) augmente au cours de divers stades post-embryonnaires de *C. longiareolata*. Ceci concorde avec les résultats obtenus chez *Culex pipiens pipiens* et *Cx pipiens molestus* [34], et *A. aegypti*, *Cx. pipiens*, *A. gambiae* et *A. albimanus* [35]. Il a été rapporté que le poids corporel influence le volume du repas sanguin et la fécondité chez les femelles d'*A. aegypti* [35]. Chez la même espèce, les grosses femelles avec un grand stock énergétique à l'éclosion ont un potentiel de vol très grand leur permettant de contacter plusieurs hôtes et devenir un meilleur vecteur [36]. Une corrélation positive entre le volume corporel et les réserves nutritives tels que le glycogène et les lipides a été observée [36]. De même, une corrélation positive entre ce volume et la fécondité a été décrite chez plusieurs autres espèces [17,36]. Chez *A. taeniorhynchus* la malnutrition larvaire, provoque une diminution de la longueur des ailes et des réserves nutritives réduisant l'autogénéité [37].

## CONCLUSION

L'étude menée sur *C. longiareolata* révèle que l'insecticide testé affecte le volume corporal et les réserves énergétiques. Ceci suggère un effet dépressif de l'insecticide sur la reproduction qui est un facteur de pullulation des moustiques. De plus, les réserves énergétiques mobilisées essentiellement durant le vol ont une incidence sur la nuisance de cette espèce, agent vecteur du paludisme chez les oiseaux.

## Références

- [1] M.J. Perich, C. Wells, W. Bertsh and K.E. Tredway, *Toxicity of extracts from three targets against adults and larvae of yellow fever mosquito and Anopheles stephensi (Diptera: Culicidae)*. J. Med. Entomol., Vol. 31, 1994, p. 833-837.
- [2] K.D. Wing, (1988). RH-5849, a nonsteroidal ecdysone agonist: effects on *Drosophila* cell line. *Science*, 241, 467-469.
- [3] G. Smagghe, D. Degheele, *Action of a novel nonsteroidal mimic, tebufenozide (RH-5992) on insects of different orders*. Pestic. Sci., Vol. 42, 1994, p. 85-92.
- [4] T.S. Dhadialla, A. Retnakaran, G. Smagghe, *Insect growth- and developmental-disturbing insecticides*, in: L.I. Gilbert, K. Iatrou, S.K. Gill (Eds.), *Comprehensive Molecular Insect Science*, vol. 6, Elsevier, Oxford, 2005, p. 55-116.
- [5] N. Rehim, N. Soltani, *Laboratory evaluation of Alsystin, a chitin synthesis inhibitor, against Culex pipiens pipiens (Diptera: Culicidae): effects on development and cuticle secretion*. J. Appl. Ent., Vol. 123, 1999, p. 437-441.
- [6] N. Soltani, N. Rehim, H. Drardja, F. Bendali, *Activité du triflumuron à l'égard de Culex pipiens et impacts sur deux espèces larvivoires non visées*. Ann. Soc. Entomol. Fr. (N.S.), Vol. 35, 1999, p. 59-64.
- [7] H. Boudjelida, A. Bouaziz, T. Soïn, G. Smagghe, N. Soltani, *Effects of ecdysone agonist halofenozide against Culex pipiens*. Pestic. Biochem. Physiol., Vol. 83, 2005, p. 115-123.
- [8] N. Soltani, N. Rehim, *Laboratory evaluation of Andalin, a new insecticide interfering with cuticle deposition, against Culex pipiens*. Journal Algérien de Medecine, 1 (Vol. XI), 2001, p. 28-33.
- [9] N. Soltani, N. Aribi, H. Berghiche, C. Lakbar, G. Smagghe, *Activity of RH-0345 on ecdysteroid production and cuticle secretion in Tenebrio molitor pupae in vivo and in vitro*. Pestic. Biochem. Physiol., Vol. 72, 2002, p. 83-90.
- [10] F. Taïbi, G. Smagghe, L. Amrani, N. Soltani-Mazouni, *Effect of ecdysone agonist RH-0345 on reproduction of mealworm, Tenebrio molitor*. Comp. Biochem. Physiol., Vol. 135C, 2003, p. 257-267.
- [11] S. Chebira, N. Soltani, S. Muylle, G. Smagghe, *Uptake and distribution of three insect growth regulators-diflubenzuron, flucycloxuron and halofenozide- in pupae and adults of Tenebrio molitor*. Phytoparasitica., Vol. 34 (2), 2006, p. 187-196.
- [12] H. Berghiche, G. Smagghe, S. Van De Velde, N. Soltani, *In vitro cultures of pupal integumental explants to bioassay insect growth regulators with ecdysteroid activity for ecdysteroid amounts and cuticle secretion*. African Journal of Agricultural Research., Vol. 2 (5), 2007, p. 208-213.

- [13] M.S. Morsli, N. Soltani, *Effets d'un insecticide inhibiteur de la synthèse de la chitine, le diflubenzuron, sur la cuticule de la crevette Penaeus kerathurus*. Journal de Recherche Océanographique, Vol. 28, Fasc.1/2, 2003, p. 85-88.
- [14] H. Drardja-Beldi, N. Soltani, *Laboratory evaluation of dimilin on growth and glutathion activity in mosquito fish and target species*. Comm. Agric. Appl. Bio. Sci., Vol. 68 / 4a, 2003, p. 299-305.
- [15] N. Zaïdi, J.P. Farine, N. Soltani, *Analyse des résidus d'un insecticide (Dimilin) dans l'eau et les différents compartiments d'un poisson non ciblé*. Algerian Journal of Technology 1 : 2005, p. 483-486.
- [16] J. Macquart, *Diptères exotiques nouveaux ou peu connus*. Mémoires de la société des sciences de l'agriculture et des arts de Lille., Vol. 2: 9-225.
- [17] H. Briegel, *Metabolic relationship between femal body size, reserves, and fecundity of Aedes aegypti*. J. Insect. Physiol., Vol. 36, 1990, p.165-172.
- [18] H. Salmi-Bouabida, *Bioécologie des espèces de moustique de la region de Tebessa: inventaire, repartition, indices écologiques et caractérisation morphométriques et biochimiques*. Mémoire de magister en Physiologie Animale et Humaine, option Santé et Environnement, Centre Universitaire de Tébessa, 87 p.
- [19] Anonym, *Informal consultation on insect growth regulators*. WHO/VBC/83, 1983.
- [20] S. E. Timmermann, H. Briegel, *Molting and metamorphosis in mosquito larvae: a morphometric analysis*. Mitteilngender Schweizewchen Entomologischen Gesellschaft., Vol. 71, 1998, p. 373-387.
- [21] M.J. Van Den Heuvel, *The effect of rearing temperature on the wing length, thorax lenght, leg length and avariole number of the adult mosquito, Aedes aegypti (L.)*. Trans. R. Ent. Soc. Lond., Vol. 115, 1963, p.197-216.
- [22] S. Shibko, P. koivistoinen, C. Tratyneck, A. New Hall, L. Freidman, *A method for the sequential quantitative separation and determination of protein, RNA, DNA, lipid and glycogen from a single rat liver homogenate or from a subcellular fraction*. Analyt. Biochem., Vol. 19, 1966, p. 415-528.
- [23] G. Duchateau, M.A. Florin, *A survey of amino acidemias with special reference to the high concentration of free amino acids in insect haemolymph*. Arch. Int. Physiol. Biochem., Vol. 66, 1958, p. 573-591.
- [24] G.J. Goldsworthy, W. Mordue, J. Guthkelch, *Studies on Insect adipokinetic Hormones*. Gen. Comp. Endocr. Vol. 18, 1972, p. 545-551.
- [25] M.M. Bradford, *A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein, utilizing the principle dye binding*. Analytic. Biochem., Vol. 72, 1976, p. 248-254.
- [26] S.E. Timmermann, H. Briegel, *Molting and metamorphosis in mosquito larvae: a morphometric analysis*. Mitteilngender Schweizewchen Entomologischen Gesellschaft., Vol. 71, 1998, p. 373-387.
- [27] G. Gäde, K.H. Hoffman, J.H. Spring, *Hormonal regulation in insects: Facts, gaps, and future directions*. Physiol. Rev., Vol. 77, 1997, p. 963-1032.

- [28] S.P. Jenkins, M.R. Brown, A.O. Lea, *Inactive prothoracic glands in larvae and pupae of Aedes aegypti. Ecdysteroid release by tissues in the thorax and abdomen.* Insect Biochem. Molec. Biol., Vol. 22(6), 1992, p. 553-559.
- [29] G.P. Farinos, G. Smaghe, L. Tirry, P. Castanero, *Action and pharmacokinetics of a novel insect growth regulator, halofenozide, in Adult beetles of Aubeonymus mariaefrancisciae and Leptinotarsa decemlineata.* Arch. Insect. Biochem. Physiol. Vol. 41, 1999, p. 201-213.
- [30] A. Maiza, S. Kilani, J. P. Farine, G. Smaghe, N. Aribi, N. Soltani, *Reproductive effects in german cockroaches by ecdysteroid agonist RH-0345, juvenile hormone analogue methoprene and carbamate benfuracarb.* Comm. Appl. Biol. Sci., Ghent University, Vol. 69 (3), 2005, p. 257-266.
- [31] A.W. Wiens, T. Gilbert, *Regulation of carbohydrate mobilization and utilization in Leucophaea maderae.* J. Insect. Physiol., Vol. 13, 1968, p. 779-794.
- [32] N. Soltani, *Action du diflubenzuron et de la 20-hydroxyecdysone sur les glucides et les protéines hemolymphatiques chez les nymphes de Tenebrio molitor (L.).* Ann. Soc. Entomol. Fr. (n.s.), Vol. 26 (4), 1990, p. 575-261.
- [33] L.L. Keeley, *Physiology and biochemistry of fat body, In: G.A kerkut et L.I. Gilbert (eds).* Comp. Insect. Biochem. Physiol. Pharmacol., Vol. 3, 1985, p. 211-248. Pergamon Press, oxford.
- [34] F. Bendali, F. Djebbar, N. Soltani, *Efficacité comparée de quelques espèces de poissons à l'égard de divers stades de Culex pipiens L. dans des conditions de laboratoire.* Parasitica, Vol. 57, 2001, p. 255-265.
- [35] D.H. Colless, W.T. Chellapah, *Effects of body weight and size of blood meal upon Egg production in Aedes aegypti L. (Diptera: Culicidae).* Ann. Trop. Med. Parasitol., Vol. 54, 1960, p. 475-482.
- [36] R. Nasci, *The size of emerging and hot-seeking Aedes aegypti and the relation of size to blood-feeding success in the field.* J. Am. Mosq. Contr. Ass., Vol. 2, 1986, p. 61-62.
- [37] A.O. Lea, *Studies on the dietary and endocrine regulation of autogenous reproduction in Aedes teaniorhynchus,* J. Med. Ent., Vol. 1, 1964, p.40-44.