

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Écologie, Evolution, Ressources Génétiques, Paléobiologie
École doctorale Biodiversité, Agriculture, Alimentation, Environnement, Terre, Eau (GAIA)

Unité de recherche ASTRE - Animal, Santé, Territoires, Risques et Ecosystèmes

Développement de méthodes innovantes de sexage pour l'application de la Technique de l'Insecte Stérile chez les moustiques du genre *Aedes*

Présentée par Célia LUTRAT
Le 16 décembre 2021

Sous la direction de Jérémie BOUYER
et Eric MAROIS

Devant le jury composé de

Mme Isabelle MORLAIS, Directrice de recherche, IRD Montpellier
M. Abdoulaye DIABATE, Directeur de recherche, IRSS, Bobo-Dioulasso (Burkina Faso)
M. Louis LAMBRECHTS, Cadre scientifique, Institut Pasteur Paris
Mme Catherine BOURGOUIN, Cadre scientifique, Institut Pasteur Paris
M. Frédéric SIMARD, Directeur de recherche, IRD Montpellier
M. Romeo BELLINI, full Professor, CAA, Crevalcore (Italie)
M. Thierry BALDET, Cadre scientifique, CIRAD La Réunion
M. Jérémie BOUYER, Cadre scientifique, CIRAD Montpellier
M. Eric MAROIS, Chargé de recherche, INSERM Strasbourg / Université de Strasbourg

Présidente du jury
Rapporteur
Rapporteur
Examinatrice
Examineur
Examineur
Invité
Directeur de thèse
Co-Directeur de thèse

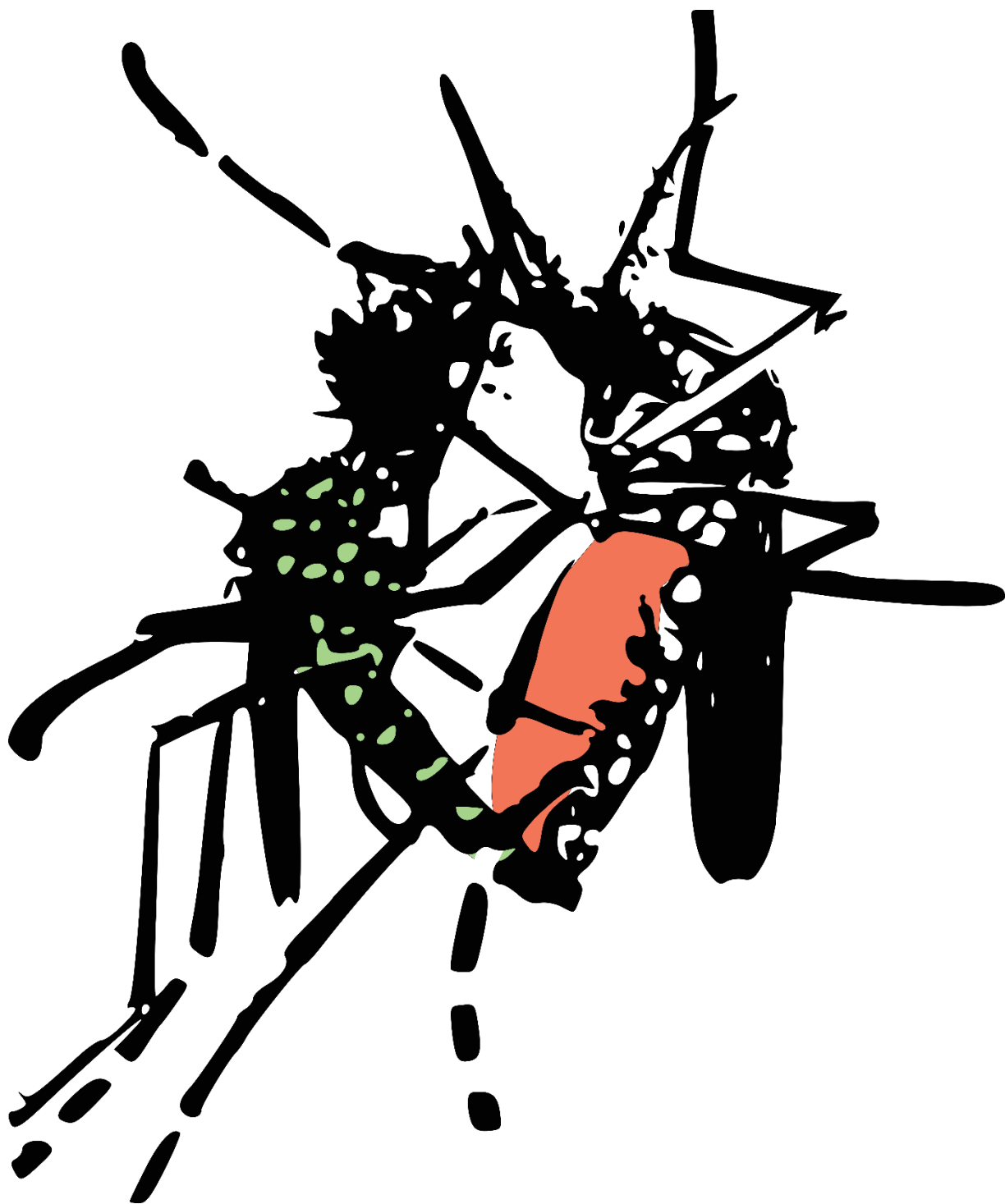


UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

**Développement
de méthodes innovantes de sexage
pour l'application de
la Technique de l'Insecte Stérile
chez les moustiques du genre *Aedes***

Célia Lutrati

16 décembre 2021



Résumé

Aedes albopictus et *Aedes aegypti* sont deux espèces de moustiques invasives, vectrices de nombreux pathogènes et contre lesquelles les méthodes de lutte antivectorielle classiques sont peu efficaces. La Technique de l’Insecte Stérile en est une alternative durable et efficace reposant sur des lâchers répétés de grands nombres de moustiques mâles stérilisés par irradiation. Pour cela une méthode de séparation des sexes est nécessaire. Actuellement, les méthodes employées exploitent le dimorphisme de taille entre nymphes mâles et femelles, conduisant à un rendement faible, à un taux d’erreur élevé et à un gaspillage de ressources lié à l’élevage des larves femelles.

Dans cette thèse, je me suis attachée à proposer une méthode de sexage résolvant ces problèmes. Pour ce faire, j’ai, dans un premier temps, inventorié les différentes méthodes de sexage développées au cours des 15 dernières années chez les Diptères. Parmi les approches prometteuses identifiées, j’ai retenu le développement de souches de sexage génétique basées sur l’intégration d’un transgène de fluorescence au sein des loci sexuels. Aussi, dans un deuxième temps, j’ai étudié chez *Aedes albopictus* le rôle et le fonctionnement de *Nix*, le gène de la masculinisation situé au cœur du locus M. Pour ce faire, j’ai construit des plasmides et généré des lignées de moustiques transgéniques exprimant les quatre isoformes principales de *Nix*, associées à des marqueurs fluorescents. J’ai ainsi pu démontrer que *Nix* était suffisant à conférer une masculinisation complète, produisant des pseudo-mâles fertiles, capables de voler et exprimant différenciellement les gènes *myo-sex* et *myo-fem* de façon similaire aux mâles naturels, malgré une certaine réduction de leur compétitivité. Par ailleurs, j’ai également observé une intégration préférentielle des constructions transgéniques à proximité du locus M par un phénomène de « transposon homing ». Ainsi, dans un troisième chapitre, je présente deux souches de sexage génétiques pour *Aedes albopictus* et deux pour *Aedes aegypti* obtenues par « transposon homing », par transgénèse aléatoire et par transgénèse ciblée. Ces souches permettent de séparer les mâles des femelles au stade de larve néonate à l’aide d’un cytomètre en flux adapté. Elles peuvent être utilisées pour trier des mâles transgéniques directement, ou combinées pour obtenir des mâles non-transgéniques. Elles permettent en outre de diminuer la contamination par des femelles et d’augmenter le rendement en mâles.

Ainsi, au cours de cette thèse j’ai construit des souches de sexage génétique pour deux vecteurs d’importance médicale, *Aedes albopictus* et *Aedes aegypti*. Ces travaux devraient contribuer à améliorer le rapport coût-efficacité de la Technique de l’Insecte Stérile, et ainsi rendre cette méthode plus accessible.

Mots clés

Lutte antivectorielle, Technique de l’Insecte Stérile, *Aedes albopictus*, *Aedes aegypti*, élevage de masse, moustique

Abstract

Aedes albopictus and *Aedes aegypti* are invasive mosquito species, vectors of numerous pathogens and against which conventional vector control methods are not very effective. The Sterile Insect Technique is a sustainable and powerful alternative based on repeated releases of large populations of male mosquitoes. For this, a sex separation method is required. Currently employed methods exploit the size dimorphism between male and female pupae, leading to low efficiency, high error rates and a waste of resources spent on rearing also the female larvae.

The aim of my thesis, was to propose a sexing method addressing these problems. For this purpose, I first compared the different sexing methods developed during the past 15 years for Diptera. Among the promising approaches identified, I selected the development of genetic sexing strains based on the integration of a fluorescence transgene within the sex loci. In the second chapter, I studied the role and function of *Nix*, the masculinization gene located at the core of the M locus, in *Aedes albopictus*. To this end, I constructed plasmids and generated transgenic mosquito lines expressing the four main isoforms of the gene, labelled with fluorescence markers. I demonstrated that *Nix* is sufficient for complete masculinization, producing fertile and flight-capable pseudo-males that expressed the sex-specific *myo-sex* and *myo-fem* genes similarly to wild-type males, albeit their mating competitiveness was somewhat reduced. Furthermore, I also observed preferential integration of transposons near the M locus by transposon homing. Thus, in the third chapter, I present two genetic sexing strains for *Aedes albopictus* and two for *Aedes aegypti* obtained by transposon homing, random transgenesis and targeted transgenesis. These allow the separation of males from females at the neonate larval stage using a suitable flow cytometer. These strains can be used directly to sort transgenic males, or combined to obtain non-transgenic males. They also enable a reduction of the female contamination rate and increase the male recovery rate.

Thus, during this thesis I have developed genetic sexing strains for two vectors of medical importance, *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. This work will contribute to improve the cost-effectiveness of the Sterile Insect Technique, and thus make this method more accessible.

Key words

Vector control, Sterile Insect Technique, *Aedes albopictus*, *Aedes aegypti*, mass rearing, mosquito

Table des matières

RESUME	5
ABSTRACT	7
TABLE DES MATIÈRES	8
TABLE DES FIGURES.....	11
TABLE DES TABLEAUX	12
LISTE DES ABREVIATIONS	14
GLOSSAIRE.....	15
1 CONTEXTE GENERAL DE LA THESE	17
1.1 <i>Aedes albopictus</i> et <i>Aedes aegypti</i>, des espèces invasives	17
1.1.1 Répartition mondiale d' <i>Aedes albopictus</i> et d' <i>Aedes aegypti</i>	17
1.1.2 Prédiction de la répartition mondiale des deux espèces d'ici 2050.....	20
1.2 <i>Aedes albopictus</i> et <i>Aedes aegypti</i>, des menaces de santé publique pour le monde et pour l'Europe.....	23
1.2.1 <i>Aedes albopictus</i> et <i>Aedes aegypti</i> , vecteurs d'arbovirus.....	23
1.2.2 Cas particulier des départements et régions d'outre-mer français : exemple de La Réunion	25
1.2.3 Coût économique et social des épidémies dues aux arbovirus transmis par les <i>Aedes</i>	26
1.3 La lutte antivectorielle, seule mesure efficace pour freiner la transmission virale. 28	
1.3.1 La lutte antivectorielle contre les <i>Aedes</i> actuellement mise en place et ses limites	29
1.3.2 Méthodes innovantes de lutte antivectorielle contre les <i>Aedes</i>	33
1.3.3 Couplage de contrôle aux stades pré-imaginal et imaginal : la Technique de l'Insecte Stérile renforcée (TIS renforcée ou <i>boosted SIT</i>).....	40
1.4 Le sexage, obstacle majeur à l'application de la TIS chez les <i>Aedes</i>	43
1.4.1 Le sexage, une opération coûteuse et peu efficace.....	43

1.4.2 Objectif de cette thèse : faciliter la séparation des sexes pour les moustiques du genre *Aedes* 45

2 CHAPITRE 1 : COMPARAISON DES METHODES DE SEPARATION DES SEXES EXISTANT CHEZ LES DIPTERES..... 47

2.1	Introduction au chapitre 1.....	47
2.2	Revue de la littérature : “Sex sorting for pest control: it’s raining men!”	51
2.3	Conclusion du chapitre 1	75
2.3.1	Récentes avancées quant au sexage des <i>Aedes</i>	75
2.3.2	Perspectives	75
2.3.3	Stratégies adoptées	77

3 CHAPITRE 2 : ETUDE DU GENE DE MASCULINISATION, NIX, CHEZ AEDES ALBOPICTUS ET DEVELOPPEMENT D’UNE SOUCHE DE SEXAGE..... 87

3.1	Introduction au chapitre 2.....	87
3.1.1	Détermination du sexe chez la drosophile.....	87
3.1.2	DSX et FRU, des effecteurs conservés de la détermination du sexe chez les diptères	89
3.1.3	Absence de <i>transformer</i> et rôle incertain de <i>transformer-2</i> dans la détermination du sexe chez les <i>Aedes</i>	91
3.1.4	<i>Nix</i> , gène du locus M, initiateur masculin de la cascade de détermination du sexe.....	92
3.2	Article : “Transgenic expression of <i>Nix</i> converts genetic females into males and allows automated sex sorting in <i>Aedes albopictus</i> ”	97
3.3	Conclusion du chapitre 2	123

4 CHAPITRE 3 : DEVELOPPEMENT DE SOUCHES DE SEXAGE LIANT UN GENE DE FLUORESCENCE AUX LOCI SEXUELS CHEZ AEDES AEGYPTI ET AEDES ALBOPICTUS AINSI QUE D’UN PROTOCOLE PERMETTANT LE TRI AUTOMATISE DE MALES NON-TRANSGENIQUES 127

4.1	Introduction au chapitre 3.....	127
4.2	Article : « Combining two Genetic Sexing Strains allows sorting of non-transgenic males for <i>Aedes</i> genetic control”	131

4.3 Conclusion du chapitre 3	159

<u>5 DISCUSSION GENERALE</u>	<u>163</u>

5.1 Synthèse des résultats principaux	163

5.2 Perspectives	166

5.2.1 Travaux prometteurs inachevés.....	166

5.2.2 Pistes d'amélioration des souches de sexage génétique construites.....	168

5.2.3 Applicabilité des souches de sexage génétique en contrôle génétique	170

5.3 Conclusion	175

<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	<u>177</u>

<u>REMERCIEMENTS</u>	<u>195</u>

<u>ANNEXES</u>	<u>I</u>

Annexe 1 : Informations supplémentaires au contexte de la thèse	iii

Annexe 2 : Informations supplémentaires au Chapitre 1	xxv

Annexe 3 : Informations supplémentaires au Chapitre 2	xxxi

Annexe 4 : Informations supplémentaires au Chapitre 3	lxix

Annexe 5 : Informations supplémentaires à la discussion générale	ccvii

Table des figures

Figure 1: Probabilité (de 0, en bleu, à 1, rouge) de la répartition d' <i>Aedes aegypti</i> (a) et <i>Aedes albopictus</i> (b) dans le monde en 2015, à une résolution spatiale de 5km x 5km (adapté d'après Kraemer et al. 2015).	18
Figure 2: Répartition potentielle d' <i>Aedes aegypti</i> et <i>Aedes albopictus</i> dans le monde.	19
Figure 3: Modélisation de la répartition mondiale d' <i>Aedes aegypti</i> (a) et d' <i>Aedes albopictus</i> (b) en 2050 sous le scénario climatique moyen RCP 6.0.	20
Figure 4: Répartition d' <i>Aedes albopictus</i> en Europe en mars 2021.	22
Figure 5: Evolution de la répartition d' <i>Aedes albopictus</i> en Europe entre 2020 et 2050.	22
Figure 6 : Cycle de vie des <i>Aedes</i> et méthodes de lutte conventionnelle associées.	29
Figure 7 : Méthodes de lutte antivectorielle innovantes contre les <i>Aedes</i>	34
Figure 8 : Fréquence de distribution de la taille des nymphes de différentes espèces et souches de moustiques élevées en laboratoire.	44
Figure 9 : Cascade de détermination du sexe chez la drosophile.	88
Figure 10 : Comparaison de la structure génomique et de l'épissage sexe-spécifique du gène <i>doublesex</i> chez <i>Drosophila melanogaster</i> et <i>Aedes aegypti</i>	90
Figure 11 : Comparaison de la structure génomique et de l'épissage sexe-spécifique de la partie conservée du gène <i>fruitless</i> chez <i>Drosophila melanogaster</i> et <i>Aedes aegypti</i>	90
Figure 12 : Isoformes et profil transcriptionnel de <i>Nix</i> chez <i>Aedes albopictus</i>	93
Figure 13 : Comparaison des cascades de détermination du sexe chez les Drosophiles et chez les <i>Aedes</i>	94
Figure 14: Estimation des coûts initiaux et de fonctionnement d'usines d'élevage de masse et de lâchers de moustiques mâles selon le mode de sexage choisi dans le cadre d'un programme de lutte génétique contre <i>Aedes albopictus</i>	174

Table des tableaux

Tableau 1 : Comparaison des méthodes de lutte génétique auto-limitées vs. auto-entretenu.	39
Tableau 2 : Niveau d'expression des gènes sélectionnés après exposition des larves d' <i>Aedes albopictus</i> à l'eau et à la molécule d'intérêt mesuré par RNAseq.	78
Tableau 3: Quantification relative du niveau d'expression des gènes d'intérêt dans les échantillons exposés à l'eau (49, 50, 54), à l'alcool (49a, 50a, 54a) ou au bleu de méthylène (49b, 50b, 54b).	80
Tableau 4 : Taux de survie chez <i>Aedes albopictus</i> et <i>Aedes aegypti</i> suite au traitement par dsRNA ciblant les gènes <i>fez2</i> , <i>lrc</i> et différents gènes codant des nucléases.	82
Tableau 5 : Sex-ratio et taux de survie chez <i>Aedes albopictus</i> traité par dsRNA contre des isoformes femelle-spécifiques de <i>doublesex</i> .	84
Tableau 6: Problèmes potentiels liés à l'utilisation des souches de sexage génétique et solutions recommandées.	161

Liste des abréviations

ARS : Agence Régionale de Santé

AVCI : années de vie corrigées du facteur invalidité, en anglais DALY pour *Disability Adjusted Life Years*

Bti : *Bacillus thuringiensis var. israelensis*

Cas9 : CRISPR-associated protein 9 (protéine 9 associée aux CRISPR)

CHIKV : virus du chikungunya

CRISPR : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, Courtes répétitions palindromiques groupées et régulièrement espacées

CX : carbamates

DDT : dichlorodiphényltrichloroéthane

DENV : virus de la dengue

DMSO : diméthylsulfoxyde

DROM : départements et régions d'outre-mer

ECDC : European Centre for Disease Prevention and Control

EFSA : Autorité européenne de sécurité des aliments

EID : Entente Interdépartementale pour la démoustication

GFP : Green Fluorescent Protein, protéine fluorescente verte

GMM : Genetically Modified Mosquitoes, moustiques génétiquement modifiés

GSS : Genetic Sexing Strain, souche de sexage génétique

IP : Interférence avec le Pathogène

OC : organochlorés

OGM : Organisme Génétiquement Modifié

OMS : Organisation mondiale de la santé

OP : organophosphorés

PYR : pyréthriinoïdes

RIDL : Release of Insects carrying a Dominant Lethal

RRM : *RNA recognition motif*, site de reconnaissance de l'ARN

SNC : système nerveux central

TII : Technique de l'Insecte Incompatible

TIS : Technique de l'Insecte Stérile

WNV : virus de West Nile

YFP : Yellow Fluorescent Protein, protéine fluorescente jaune

YFV : virus de la fièvre jaune

ZIKV : virus Zika

Glossaire

Auto-entretenu : *self-sustaining*, c'est-à-dire étendu dans l'espace et qui dure dans le temps

Auto-limité : *self-limited*, c'est-à-dire confiné dans le temps et dans l'espace

Fitness (vigueur) : en biologie évolutive, la fitness d'un individu ou d'un gène décrit son aptitude relative à se reproduire, définie par le changement de fréquence du génotype d'un individu (ou d'un gène) d'une génération à l'autre. Souvent estimée en tant que succès reproductif sur toute une vie (nombre de descendants d'un individu ou nombre de copies d'un gène) ¹

Forçage génétique : *gene drive*, augmentation de l'hérédité d'un élément génétique par rapport à l'hérédité naturelle décrite par les lois de Mendel, conduisant à l'accroissement de la fréquence de cet élément génétique dans une population. ¹

Incompatibilité cytoplasmique : phénomène qui résulte du fait que le sperme de certains individus est incapable de former des zygotes viables avec les ovocytes d'autres individus ; incapacité d'un embryon à se développer suite à l'accouplement entre un mâle infecté avec Wolbachia et une femelle non infectée ¹

Indel : désigne une insertion ou une délétion de séquence

Knock-in : introduction d'une séquence d'intérêt à un locus cible

Knockout : "invalidation génétique", inactivation totale d'un gène

Lutte génétique : lutte antivectorielle consistant à relâcher des moustiques modifiés parmi leurs congénères afin qu'ils s'accouplent avec ces derniers. Selon les caractéristiques des mâles relâchés (stériles, transinfectés par des bactéries Wolbachia, porteurs d'un gène létal etc.), ces accouplements ont pour conséquence une réduction des populations cibles ou une modification des populations afin de les rendre résistantes à l'infection par des pathogènes.

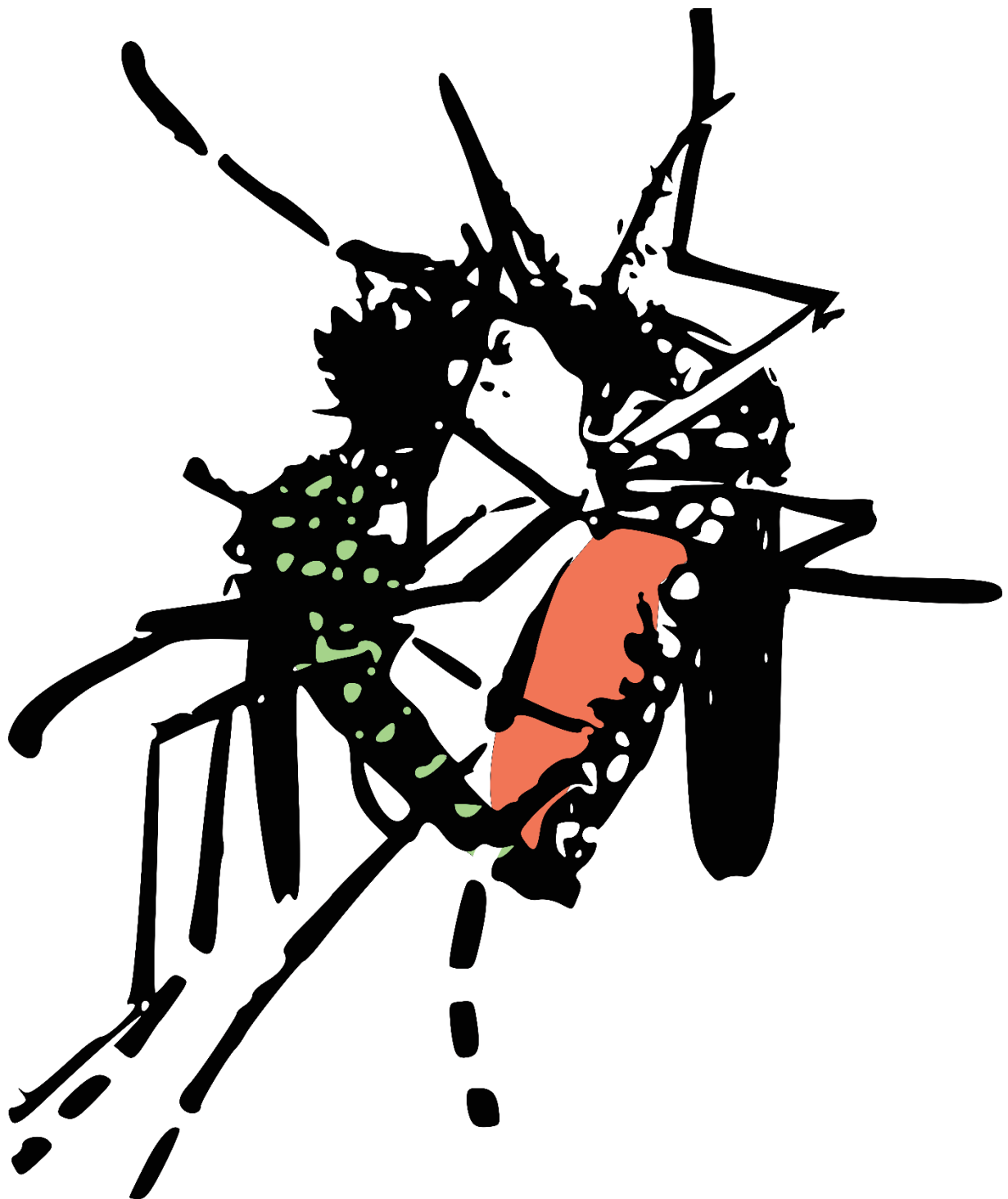
Recombinaison : brassages intra et interchromosomiques conduisant à l'apparition, dans une cellule ou dans un individu, de gènes ou de caractères héréditaires dans une association différente de celle observée chez les cellules ou individus parentaux

Sexage : tri des individus en fonction de leur sexe.

Transposon : élément génétique mobile qui a la capacité de se répliquer et de se recopier dans un génome ¹

Transposon homing : intégration préférentielle d'un transposon

¹ Définition issue du rapport du Haut Conseil aux Biotechnologies : Comité scientifique du HCB 2017.



1 Contexte général de la thèse

1.1 *Aedes albopictus* et *Aedes aegypti*, des espèces invasives

1.1.1 Répartition mondiale d'*Aedes albopictus* et d'*Aedes aegypti*

Aedes (*Stegomyia*) *aegypti* (Linné, 1762), également appelé moustique de la fièvre jaune (Wilkerson et al. 2015), est, contrairement à ce qui était communément admis jusqu'à récemment, originaire des îles du sud-ouest de l'Océan Indien (Soghigian et al. 2020). Il s'est déplacé il y a moins de 85 000 ans en Afrique continentale où il a dérivé il y a moins de mille ans sous la forme de deux sous espèces, sa forme sylvatique *Aedes aegypti formosus* (Aaf), et sa forme domestiquée, au sens d'adaptée à l'humain, *Aedes aegypti aegypti* (Aaa) (revu dans Powell et Tabachnick 2013; et réactualisé par Soghigian et al. 2020). Aaf persiste aujourd'hui presque exclusivement sur le continent africain en zone rurale ou forestière, tandis qu'Aaa est la forme que l'on retrouve actuellement dans les régions urbaines d'Afrique ainsi que sur les autres continents (Gloria-Soria et al. 2016). Afin d'alléger la lecture, lorsque nous ferons mention d'« *Aedes aegypti* » dans cette thèse, nous nous référerons, sauf indication contraire, à ses formes anthropophiles : la forme antérieure à la séparation des deux sous-espèces, laquelle est retrouvée dans les îles du Sud-Ouest de l'Océan Indien ainsi qu'en Europe, et la forme domestiquée *Aedes aegypti aegypti*. *Aedes aegypti* a envahi l'Europe et l'Amérique autour du 15^{ème} siècle, via le trafic maritime lié à l'esclavage (Cloudsley-Thompson 1976; Powell et Tabachnick 2013). A la fin du 19^{ème} siècle, le moustique de la fièvre jaune a rejoint l'Asie et l'Océanie depuis l'Amérique (Powell et Tabachnick 2013).

Aedes (*Stegomyia*) *albopictus* (Skuze, 1894), plus connu sous le nom de moustique tigre asiatique (Wilkerson et al. 2015), est un moustique originaire d'Asie du Sud Est qui a envahi les autres continents à la faveur de l'intensification globale des échanges commerciaux, notamment à travers le commerce des pneus usés au 20^{ème} siècle (Reiter 1998). En Océanie, *Ae. albopictus* s'est établi au début du 20^{ème} siècle sur certaines îles telles que la Nouvelle-Guinée (voir par ex. Pratt Jr. et al. 1946). Sur le continent Américain, plusieurs introductions ont été rapportées aux Etats-Unis dès 1946, mais *Ae. albopictus* n'y a été déclaré établi qu'en 1985 (Moore et al. 1988), tandis que sur l'île d'Hawaï, son établissement datait d'avant 1970 (Tempelis et al. 1970). Ce moustique a été détecté sur le continent Européen pour la première fois au milieu des années 1970 en Albanie, et son établissement y a été déclaré en 1979 (Adhami et Reiter 1998). En Afrique, le premier établissement déclaré pour l'espèce fut au

Nigéria en 1991 (Savage et al. 1992), alors que le moustique était présent sur les îles voisines de l'Océan Indien depuis la fin du 19ème siècle (rapporté dans Delatte et al. 2008). A partir des rapports disponibles sur la présence d'*Ae. aegypti* et d'*Ae. albopictus*, deux études ont prédit l'état actuel de leurs distributions mondiales, tel que présenté sur les **Figure 1** (Kraemer et al. 2015) et **Figure 2** (Kamal et al. 2018).

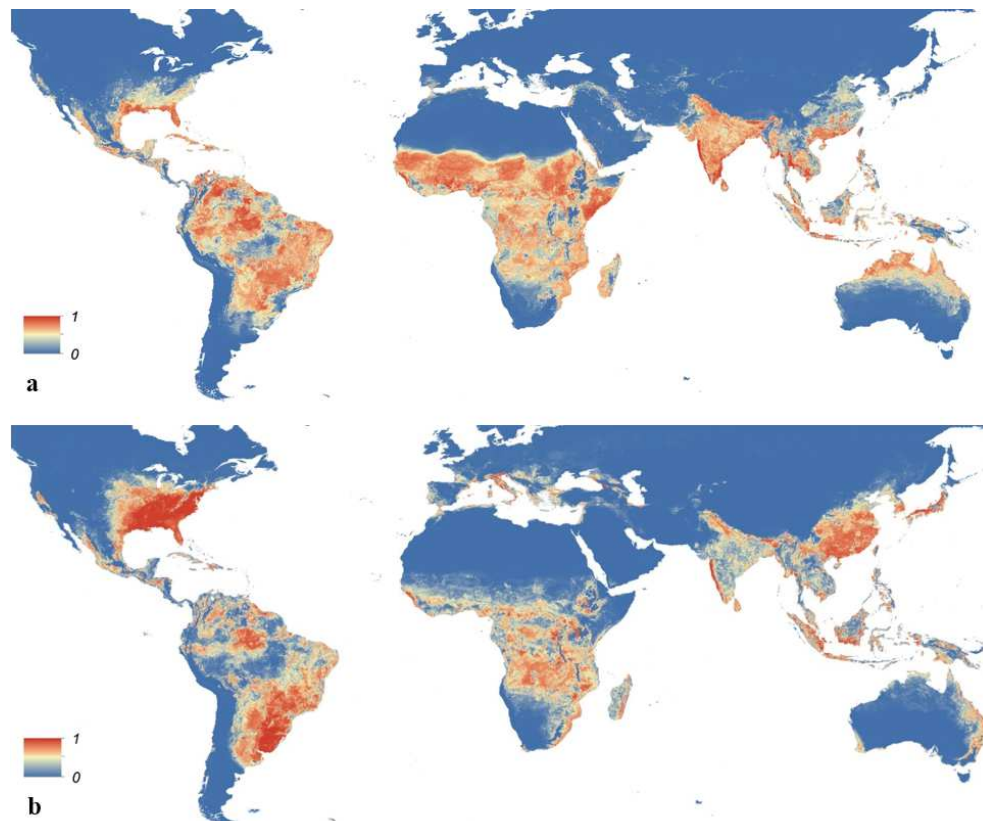


Figure 1: Probabilité (de 0, en bleu, à 1, rouge) de la répartition d'*Aedes aegypti* (a) et *Aedes albopictus* (b) dans le monde en 2015, à une résolution spatiale de 5km x 5km (adapté d'après Kraemer et al. 2015).

Les deux modélisations s'accordent sur la présence sympatrique d'*Ae. aegypti* et d'*Ae. albopictus* dans les régions tropicales et subtropicales du monde, ainsi qu'en Asie du Sud et du Sud-Est, en Amérique centrale, et à l'Est des Etats Unis. *Ae. aegypti* s'étend en revanche plus au Nord et au Sud qu'*Ae. albopictus* sur le continent africain. De même, il colonise plus largement la moitié Nord de l'Amérique du Sud, le Nord de l'Australie et l'Inde qu'*Ae. albopictus*. A contrario, *Ae. albopictus* est plus présent à l'Est de l'Argentine et en Uruguay, ainsi que dans toute la moitié Est des Etats Unis et en Europe méditerranéenne. Les prédictions

des deux modèles divergent notablement quant à la présence d'*Ae. albopictus* dans les régions plus tempérées d'Europe, au Maghreb, au Sud et au centre de l'Australie et à la pointe australe de l'Amérique du Sud. De même, elles diffèrent quant à la présence d'*Ae. aegypti* sur la côte Atlantique et au Nord de l'Europe, ainsi qu'à la présence des deux espèces le long de la côte de l'Alaska. Pour l'ensemble de ces prédictions, l'équipe de Kamal (2018) prédit un envahissement plus large que celle de Kraemer (2015). De telles différences peuvent s'expliquer en partie par la progression des moustiques dans le temps écoulé entre les deux publications (~3 ans), mais c'est probablement la différence de résolution entre les deux approches qui explique la majeure partie de ces divergences. En effet, alors que la prédiction de Kraemer comporte une échelle de probabilité allant de 0 à 1 (**Figure 1**), Kamal présente une carte binaire de présence (1) vs. absence (0) (**Figure 2**), produisant un résultat moins nuancé. On remarque, par exemple, que la prédiction de l'équipe de Kraemer correspond mieux à la réalité en Australie, où *Ae. albopictus* fait l'objet d'un contrôle renforcé, limitant sa propagation (cf. Muzari et al. 2017).

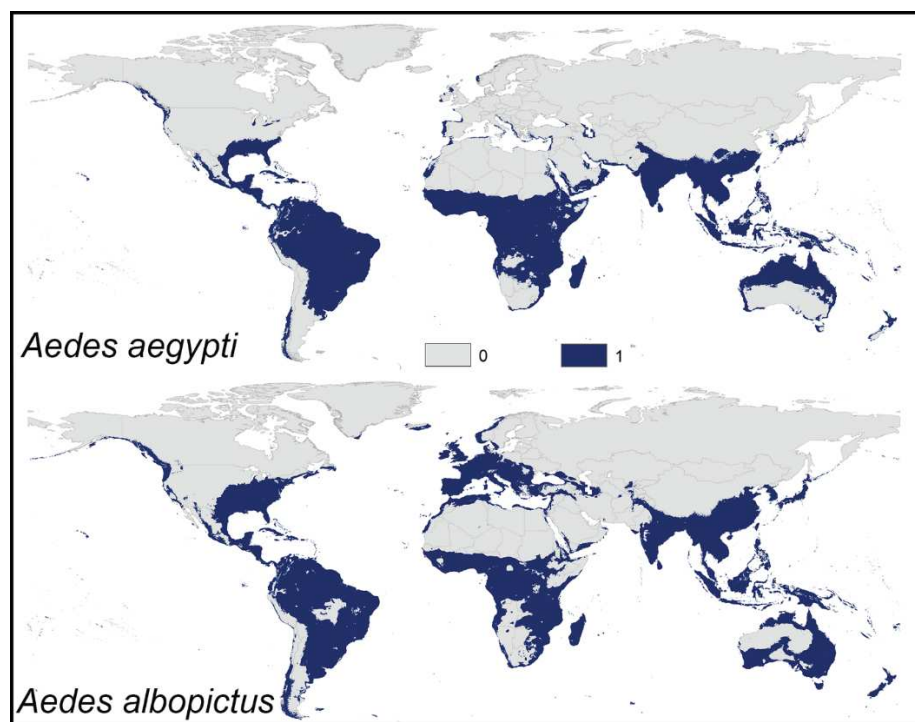


Figure 2: Répartition potentielle d'*Aedes aegypti* et *Aedes albopictus* dans le monde.

Les régions dans lesquelles le moustique est prédit être établi ($p=1$) sont en bleu foncé, celles où il ne l'est pas ($p=0$) sont en gris. Adapté depuis Kamal et al. 2018 .

1.1.2 Prédiction de la répartition mondiale des deux espèces d'ici 2050

Des prédictions des répartitions futures d'*Ae. albopictus* et *Ae. aegypti*, d'ici 2050 et 2080, ont été réalisées récemment sous différents scénarios climatiques RCP (pour « Representative Concentration Pathways », scénarios de la concentration de gaz à effet de serre) par l'équipe de Kraemer (2019, **Figure 3**). Les chercheurs se sont basés sur les caractéristiques de l'habitat et sur le climat pour modéliser les futures niches écologiques. Afin de calculer la vitesse de dispersion de chaque espèce dans un environnement donné, ils ont également intégré les mouvements humains à leur modèle.

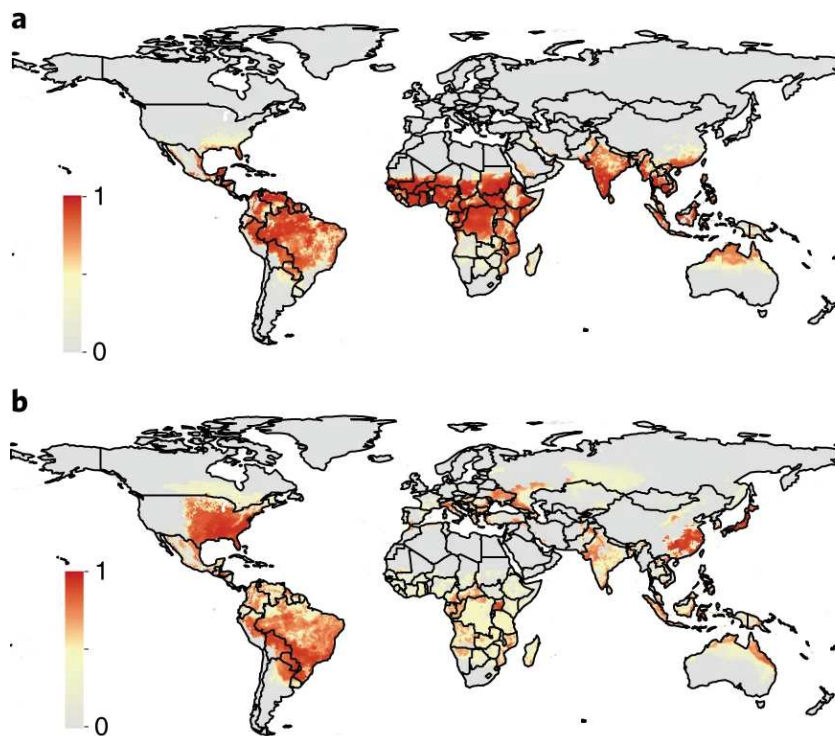


Figure 3: Modélisation de la répartition mondiale d'*Aedes aegypti* (a) et d'*Aedes albopictus* (b) en 2050 sous le scénario climatique moyen RCP 6.0.

Adapté depuis Kraemer et al. 2019.

D'ici 2050, les deux espèces sont globalement prédites s'étendre légèrement au-delà de leurs aires de répartitions actuelles (**Figure 3**). Notamment, *Ae. aegypti* est prédit reculer en Amérique du Nord tandis qu'*Ae. albopictus* devrait s'étendre de l'Est vers le centre des Etats-Unis ainsi qu'autour de la frontière avec le Canada.

Kraemer et al. (2019) estiment qu'*Ae. albopictus* aura conquis sa pleine niche écologique d'ici 2050 et que, au-delà de cette date, son expansion sera principalement dirigée par les variations climatiques et environnementales qui rendront de nouveaux habitats plus favorables, tandis que d'autres le seront moins. D'ici 2080, ils prévoient que 197 pays auront rapporté la présence du moustique tigre.

● *Cas particulier de l'Europe continentale*

Si l'on s'intéresse plus particulièrement à l'Europe continentale, alors qu'*Ae. aegypti* y était installé jusqu'au début du 20^{ème} siècle, il en a été éliminé dans les années 1950 lors des campagnes d'application de DDT réalisées essentiellement dans le cadre des campagnes d'élimination du paludisme (revu dans Medlock et al. 2012; Medlock et al. 2015). Récemment, cette espèce a reconquis plusieurs pays du pourtour de la Mer Noire (Akiner et al. 2016; Ganushkina et al. 2016) et l'île portugaise de Madère (Seixas et al. 2019). Contrairement à *Ae. albopictus*, *Ae. aegypti* ne diapause pas pour passer l'hiver. Toutefois, il profite, en zone urbaine, de l'abri que peuvent constituer les habitations humaines pour échapper à la rudesse des hivers tempérés.

Ae. albopictus n'est arrivé en Europe que beaucoup plus récemment. Sa première installation date de 1979 en Albanie. L'espèce ne s'est installée en Italie que 11 ans plus tard (Sabatini et al. 1990; Dalla Pozza et Majori 1992). En Espagne, la présence de populations permanentes a été rapportée en 2004 (Aranda, Eritja et Roiz 2006), en France en 2005 (Scholte et Schaffner 2007) et en Allemagne en 2007 (Pluskota et al. 2008). Lors de la rédaction de cette thèse en Septembre 2021, 20 pays européens ont fait état de l'installation du moustique tigre sur une partie de leur territoire tandis que 5 autres ont rapporté son introduction mais pas encore son installation (cf. **Figure 4** et European Centre for Disease Prevention and Control 2021). Entre 2014 et 2019, la vitesse d'expansion d'*Ae. albopictus* en Europe était estimée à 150 km par an (Kraemer et al. 2019).

D'ici 2050, il est prédit qu'*Ae. albopictus* s'étende plus au nord en France et en Allemagne (**Figure 5**). La majeure partie du Portugal, et du sud-est de l'Europe devrait le rapporter, ainsi que quelques régions du nord de l'Europe et de la Scandinavie. Au contraire, l'Est européen est prédit devenir trop aride pour permettre l'installation de cette espèce (Kraemer et al. 2019).

Pour ce qui est d'*Ae. aegypti*, les prédictions de Kraemer et collègues indiquent que, même sous le scénario climatique le plus extrême, *Ae. aegypti* ne devrait pas s'installer au-delà de quelques régions isolées au Sud de l'Italie et de la Turquie (Kraemer et al. 2019). Ces estimations

semblent toutefois optimistes au regard de la progression récente du moustique de la fièvre jaune au sud de l'Europe et de la compatibilité croissante de l'habitat du fait du réchauffement climatique.

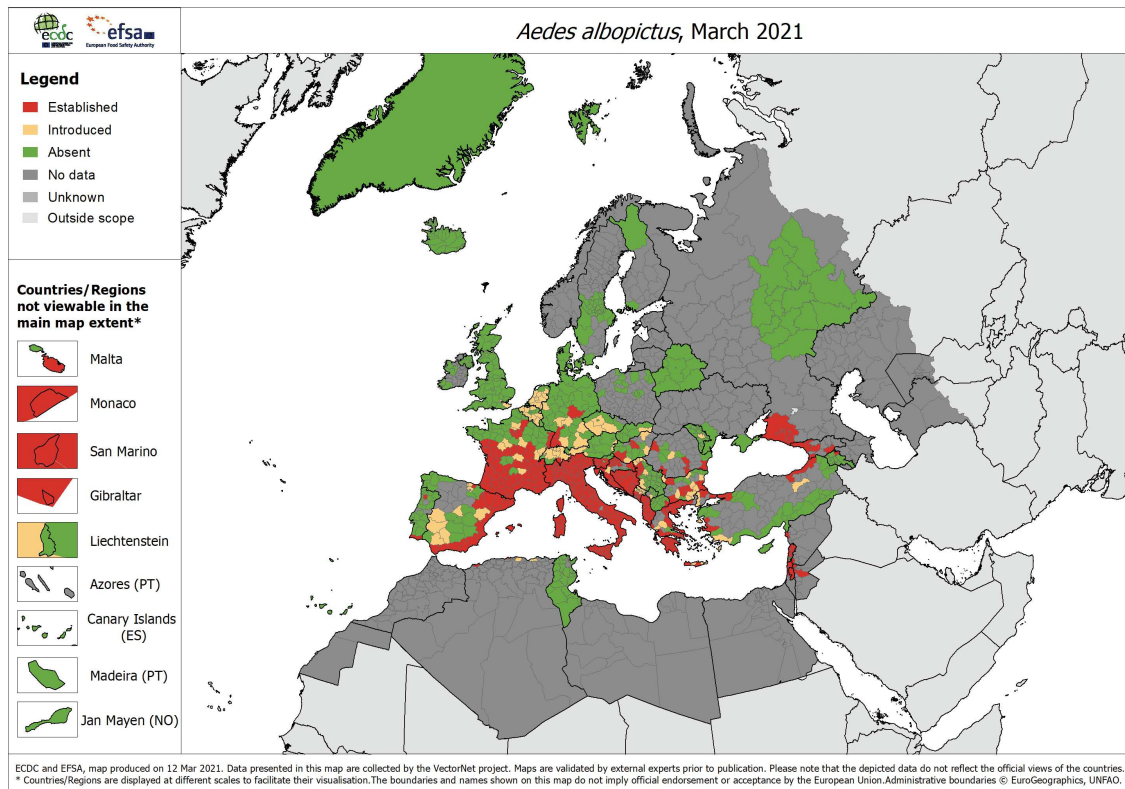


Figure 4: Répartition d'*Aedes albopictus* en Europe en mars 2021.

Adapté d'après European Centre for Disease Prevention and Control 2021.

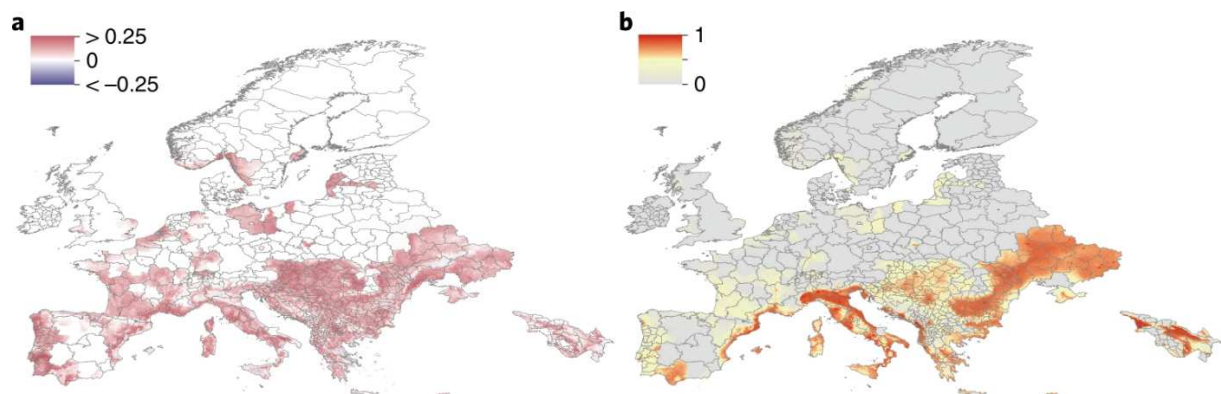


Figure 5: Evolution de la répartition d'*Aedes albopictus* en Europe entre 2020 et 2050.

(a) Expansion (en rouge) et recul (en bleu) d'*Aedes albopictus* sous le scénario climatique moyen RCP 6.0. (b) Adéquation de l'habitat pour la présence du moustique tigre en 2050. Adapté depuis (Kraemer et al. 2019).

1.2 *Aedes albopictus* et *Aedes aegypti*, des menaces de santé publique pour le monde et pour l'Europe

1.2.1 *Aedes albopictus* et *Aedes aegypti*, vecteurs d'arbovirus

En plus d'être une importante source de nuisance de par leur densité et leur agressivité envers l'homme, *Ae. albopictus* et *Ae. aegypti* sont des vecteurs compétents –c'est-à-dire capables d'être infectés et de transmettre (Hardy et al. 1983)- pour de nombreux virus tels que le virus de la dengue (DENV), du chikungunya (CHIKV), de Zika (ZIKV), de la fièvre jaune (YFV) et de West Nile (WNV) (Vanlandingham, Higgs et Huang 2016; Souza-Neto, Powell et Bonizzoni 2019). Au-delà de leur compétence théorique, ces virus ont également été isolés au sein de populations naturelles au cours d'épidémies, rendant probable leur implication (par ex. Ibáñez-Bernal et al. 1997; Vincent et al. 2019; Pierre, V., Thiria, J. et al. 2005; van Bortel et al. 2014; Pagès et al. 2009; Metselaar et al. 1980; Ramalli et al. 2019; McKenzie, Wilson et Zohdy 2019; Kamgang et al. 2019; Epelboin et al. 2017; Soper 1967; Cevallos et al. 2018).

Sur le continent européen, où le moustique tigre est bien établi, la compétence vectorielle des populations locales a été évaluée par des infections expérimentales menées en laboratoire NSB3. Deux études ont démontré la compétence vectorielle des populations du sud de l'Europe pour le sérotype 1 du virus de la dengue (Brustolin et al. 2018; Mariconti et al. 2019). Des cas autochtones de dengue sérotype 2 ont également été rapportés dans le sud de la France en 2019, en fin d'été-début d'automne, au pic de densité des populations locales, démontrant une compétence pour ce sérotype également (Ministère des Solidarités et de la Santé 2019). Concernant le virus Zika, sa transmission par des populations européennes d'*Ae. albopictus* a été démontrée expérimentalement (Gutiérrez-López et al. 2019; Mariconti et al. 2019). Une certaine compétence de ces populations européennes a également été prouvée pour le virus de la fièvre jaune (Amraoui, Vazeille et Failloux 2016). Les populations européennes d'*Ae. albopictus* ont également démontré une très forte compétence pour le virus du chikungunya. En effet, suite à une mutation récente du virus du chikungunya, on estime que la compétence du moustique tigre vis-à-vis de ce virus a été multipliée par 100, en faisant un vecteur privilégié et très efficace sur le terrain de par ses densités et son agressivité pour l'homme (Tsetsarkin et al. 2007).

Ainsi, depuis son installation sur le continent européen, *Ae. albopictus* cause des événements sporadiques de transmission autochtone des virus de la dengue et du chikungunya, suite à

l'introduction de ces virus par des voyageurs virémiques revenant de régions affectées, en fin d'été/début d'automne au moment où la fraction âgée des femelles —les plus aptes à transmettre— est la plus importante au sein des populations locales. Entre 2007 et 2012, plus de 2000 cas locaux de dengue et de chikungunya ont été enregistrés en Europe (Tomasello et Schlagenhauf 2013). Depuis 2013, les rapports de l'ECDC (European Centre for Disease prevention and Control) indiquent 0 à 10 cas importés ou autochtones par an pour ces deux arboviroses (European Centre for Disease Prevention and Control and European Food Safety Authority 2020a, 2020b). La première grande épidémie européenne de chikungunya a éclaté en Italie en 2007, donnant lieu à plus de 200 contaminations (Rezza et al. 2007; Liunbruno et al. 2008). Depuis, plusieurs centaines de cas de dengue et de chikungunya ont été rapportés, en particulier en Italie et en France (Tomasello et Schlagenhauf 2013; Franke et al. 2019; Emmanouil et al. 2020). En 2019, trois cas de transmission locale du virus Zika ont été enregistrés pour la première fois sur le continent européen, dans le sud de la France (Giron et al. 2019).

Avant son éradication, *Ae. aegypti*, quant à lui, causait des événements de dengue sur le continent européen, dont une épidémie majeure en Grèce en 1927-1928, comptabilisant plus d'un million d'infections et environ 1 500 décès (Rosen 1986; Emmanouil et al. 2020). Les nouvelles populations européennes d'*Ae. aegypti*, à Madère notamment, ont également été testées compétentes à la dissémination des virus de la dengue (DENV) et du chikungunya (CHIKV) (Seixas et al. 2018). Par ailleurs, ces populations locales d'*Ae. aegypti* ont été impliquées dans la transmission du sérotype 1 de la dengue qui a entraîné une large épidémie à Madère en 2012-2013 (Auerswald et al. 2019).

En conclusion, le moustique tigre continue son expansion à travers le territoire européen où il est capable de transmettre de nombreux arbovirus tels que les virus de la dengue, du chikungunya et Zika. De plus, sa qualité de piqueur opportuniste, prenant des repas de sang aussi bien sur des animaux que sur l'humain selon la ressource disponible, en fait un vecteur pont idéal (*bridge vector*) pouvant assurer la transmission de virus zoonotiques à l'homme (Pereira Dos Santos 2019), comme cela été suggéré pour le virus West Nile en Italie (Fortuna et al. 2015). Depuis quelques années, *Ae. aegypti* regagne du terrain aux marges de l'Europe, où il pourrait constituer, de par son expansion, un vecteur majeur d'arbovirus. En outre, la croissance démographique mondiale engendre une concentration des populations en milieu

urbain et dans des régions tropicales et tempérées dans lesquelles les *Aedes* sont établis, ce qui, avec la mobilité des personnes, des animaux d'élevage et des biens matériels en des temps record, participe à l'augmentation de la part de la population à risque d'infections arbovirales (Kraemer et al. 2019).

1.2.2 Cas particulier des départements et régions d'outre-mer français : exemple de La Réunion

Dans les DROM (Départements et Régions d'Outre-Mer), les *Aedes* sont implantés depuis de nombreuses années. On trouve notamment *Aedes aegypti* et *Aedes albopictus* à La Réunion et à Mayotte ; *Ae. aegypti* seul aux Antilles françaises et en Guyane.

Dans le cadre de cette thèse et du projet ERC REVOLINC dans lequel elle s'inscrit, nous nous intéressons particulièrement à La Réunion. Les *Aedes* se sont implantés sur l'île de la Réunion bien avant la métropole. Le moustique de la fièvre jaune, *Ae. aegypti*, y a été rapporté pour la première fois en 1902, mais y était a priori présent avant, tandis que le moustique tigre, *Ae. albopictus*, y a été observé en 1913 (Edwards 1920). *Ae. albopictus* a rapidement remplacé *Ae. aegypti* en zones urbaines, ce dernier étant désormais enclavé dans des habitats naturels tels que certaines ravines du sud et de l'ouest de l'île (Bagny 2009; Bagny et al. 2009).

Dès le 19^{ème} siècle, plusieurs épidémies de dengue causées par *Ae. aegypti* ont été rapportées à La Réunion (Skottowe 1890). Depuis le milieu du 20^{ème} siècle, *Ae. albopictus* cause régulièrement des infections sporadiques de dengue, et occasionnellement des décès (Lassalle et al. 1998; Menudier et al. 2019). En 1977-1978, il a causé une épidémie majeure du sérotype 2 de la dengue ayant touché 30% de la population locale (Coulanges et al. 1979). Actuellement, l'île est en situation endémique de dengue depuis 2017 avec des épidémies saisonnières présentant une co-circulation de trois sérotypes et une augmentation du nombre de cas avec des formes sévères et des décès (Vincent et al. 2019).

Jusqu'alors absent de cette partie de l'Océan Indien, le virus du chikungunya et son vecteur *Ae. albopictus* ont causé une épidémie d'ampleur dans les Comores, à l'île Maurice et à La Réunion en 2005 et 2006 (Renault et al. 2007). Au cours de cette épidémie, un tiers de la population Réunionnaise a été infectée avec plus de 200 décès. Depuis, un certain nombre de personnes

infectées souffre de complications neurologiques et de douleurs articulaires chroniques (Gérardin et al. 2016; Duvignaud et al. 2018).

Ainsi, à La Réunion, le contrôle des *Aedes* est une problématique non seulement préventive mais qui relève aussi d'ores et déjà de la santé publique. En outre, si à l'heure actuelle *Ae. albopictus* assure l'essentiel de la transmission vectorielle de la dengue sur l'île, les populations locales d'*Ae. aegypti* sont également compétentes pour ce virus. Leur niche écologique étant similaire, elles risqueraient de remplacer *Ae. albopictus* en cas d'élimination de cette espèce. Par conséquent, un programme de lutte antivectorielle à La Réunion doit considérer les deux espèces *Ae. albopictus* et *Ae. aegypti* (Maïga et al. 2020).

A La Réunion e, 2021, dans le cadre du projet ERC REVOLINC, des essais pilotes de la TIS renforcée ont ciblé *Ae. aegypti* dans des ravines littorales de la commune de St Joseph où ces populations sont isolées ². En parallèle, notre partenaire IRD-MIVEGEC continue de mener son projet TIS « classique » contre *Ae. albopictus* sur la commune de Ste Marie (Gouagna et al. 2020).

1.2.3 Coût économique et social des épidémies dues aux arbovirus transmis par les *Aedes*

Au-delà de l'impact sanitaire direct, mesurable en terme de morbidité et de mortalité, les épidémies de dengue et de chikungunya, avec pour vecteurs principaux *Ae. aegypti* (en zones tropicales et subtropicales telles que le sud des Etats-Unis ou Madère) et/ou *Ae. albopictus* (en zones tropicales telles que Gabon, Brésil ou La Réunion ainsi que tempérées telles que l'Europe et le Japon), ont un coût économique et social non négligeable. Celui-ci peut être mesuré en nombre d'années de vie corrigées du facteur invalidité (AVCI), plus connu sous son acronyme anglais DALY pour *Disability Adjusted Life Years*. Cet indicateur représente la somme des années de vie en bonne santé perdues pour cause de handicap, de maladie ou de mort précoce (Murray et Lopez 1996). On peut estimer le coût économique et social dramatique qu'auraient de telles épidémies en Europe continentale en se basant sur les données de la littérature lors d'épidémies relevées ailleurs dans le monde.

² <https://www.cirad.fr/dans-le-monde/nos-directions-regionales/reunion-mayotte-et-ocean-indien/actualites/la-reunion-lutte-contre-les-moustiques-vecteurs-de-la-dengue-premiers-essais-pilotes-quels-resultats>

Le virus du chikungunya a causé 39,9 millions de cas entre 2013 et 2014 lors de son émergence sur le continent Américain et ses îles associées, pour un coût humain cumulé de 23,8 millions d'AVCI correspondant à un coût économique de 185 milliards de dollars (Bloch 2016). A Puerto Rico, les AVCI perdues annuellement sont estimées à 658 par million d'individus, tandis qu'en Amérique latine et dans les Caraïbes ce chiffre est de 127 AVCI (Ritchie et al. 2013). En Thaïlande, le chikungunya cause la perte de 465 AVCI par an en moyenne (Ritchie et al. 2013).

La dengue, dont l'incidence mondiale actuelle est de 390 millions d'infections par an (Bhatt et al. 2013; Guzman et Harris 2015), représentait un coût moyen de 465 AVCI par million de personnes et par an en 2007 (Anderson et al. 2007) pour un coût mondial estimé à 1 892 000 AVCI en 2015 (Kassebaum et al. 2016). En Asie du Sud-Est, le coût humain annuel de la dengue est de 372 AVCI par million de personnes (Shepard, Undurraga et Halasa 2013), ce qui représente un poids économique d'environ 950 millions de dollars par an (Guzman et Harris 2015). Aux Etats-Unis, le coût économique annuel de la dengue est estimé à 2,1 milliards de dollars, sans compter le coût lié aux comorbidités occasionnées et à la lutte antivectorielle (Guzman et Harris 2015).

1.3 La lutte antivectorielle, seule mesure efficace pour freiner la transmission virale

A l'heure actuelle, le seul vaccin efficace dont nous disposons contre les arboviroses transmises par les *Aedes* cible le virus de la fièvre jaune. Un vaccin contre la dengue, le Dengvaxia®, a été récemment autorisé mais il ne confère pas une protection complète et son usage est limité aux personnes ayant déjà été infectées par la dengue. En effet, il existe un risque accru d'hospitalisation et de dengue grave chez les personnes n'ayant jamais été infectées par la dengue après la première dose de vaccination. Un vaccin tétravalent contre la dengue, actuellement en phase 3 de tests, présente une efficacité préliminaire de 80.2% ³. D'autres vaccins contre la dengue mais aussi contre le chikungunya et Zika sont en cours de développement, toutefois, certains paramètres laissent penser que leur mise en place sera compliquée. En effet, il a été montré qu'après avoir été infecté par un sérotype du virus de la dengue, l'individu immunisé contre ce sérotype deviendrait à plus haut risque de développer une forme sévère lorsqu'exposé à un autre des quatre sérotypes (Alwis et al. 2014). De la même manière, l'immunité au virus de la dengue (quel que soit le sérotype) favoriserait la réplication du virus Zika, autre Flavivirus apparenté à la dengue, et les formes sévères de la maladie associée (Dejnirattisai et al. 2016). Réciproquement, l'immunité au virus Zika accroît le risque de développer une forme sévère de dengue-2 (Katzelnick et al. 2020). Ainsi, les réactions croisées entre les anticorps et les antigènes des différents arbovirus apparentés risquent de compliquer la mise au point de vaccins efficaces et sans effets secondaires ainsi que la mise en place de programmes de vaccination dans les régions où co-circulent ces arbovirus. Par conséquent, en l'absence de vaccins pour la prévention et de thérapies pour le traitement de ces arboviroses, les programmes de santé publique favorisent actuellement la lutte antivectorielle contre les *Aedes*, particulièrement *Ae. albopictus* et *Ae. aegypti*, afin de maîtriser le risque sanitaire mais également les nuisances occasionnées par ces moustiques particulièrement agressifs pour l'homme.

3 <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/results/NCT02747927?term=den-301&rank=1>

1.3.1 La lutte antivectorielle contre les *Aedes* actuellement mise en place et ses limites

Le contrôle vectoriel tel qu'actuellement mis en place est un contrôle intégré qui prend en considération la biologie et l'écologie du vecteur afin de cibler de manière la plus efficace possible les différents stades de développement du moustique (**Figure 6**).

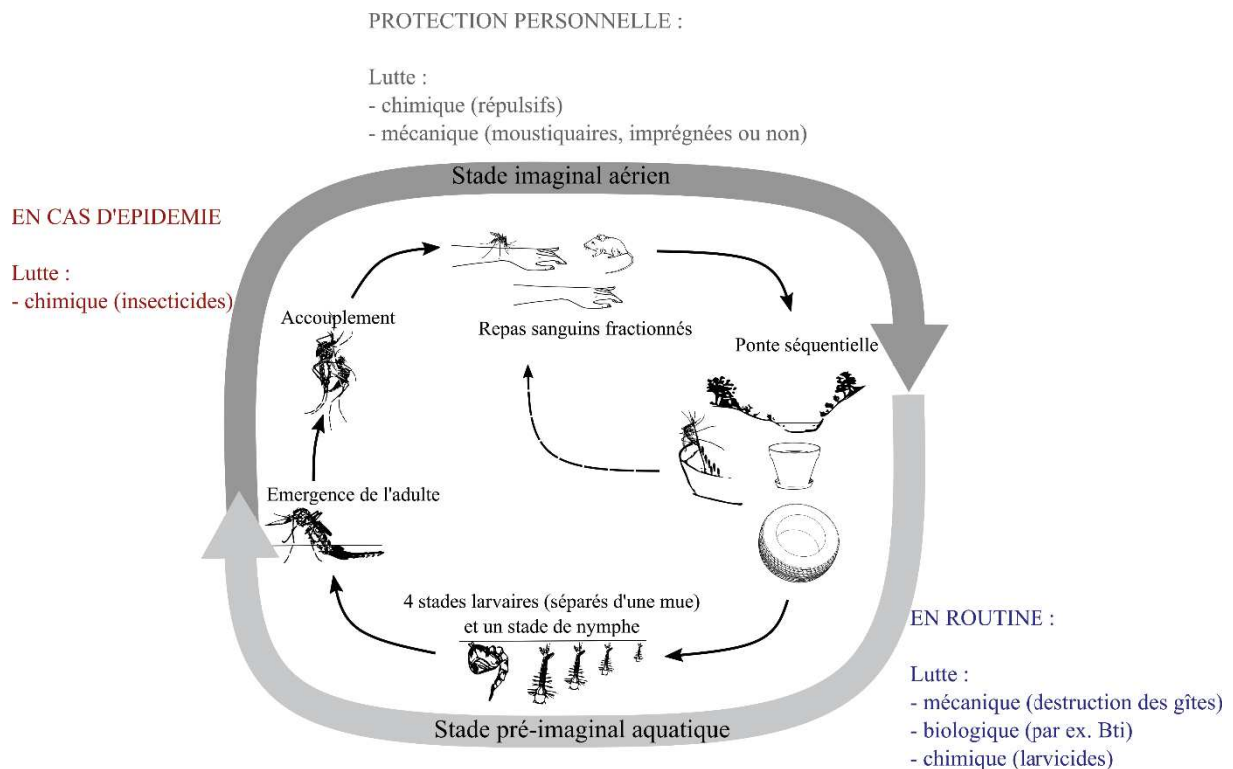


Figure 6 : Cycle de vie des *Aedes* et méthodes de lutte conventionnelle associées.

En bleu, la lutte de routine, en gris, les mesures de protection personnelle, et en rouge, la lutte en cas de circulation virale avérée.

1.3.1.1 Contrôle vectoriel contre les stades pré-imaginaux aquatiques

En routine, le contrôle vectoriel contre les *Aedes* cible les stades pré-imaginaux aquatiques soit les œufs, larves et pupes. La lutte contre les œufs consiste principalement en l'élimination mécanique des sites d'oviposition (vider les retenues d'eau ou les couvrir, par exemple). Les larves peuvent, quant à elles, être éliminées mécaniquement ou à l'aide de larvicides d'origine biologique produits par des bacilles (*Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, ou Bti, et *Lysinibacillus sphaericus*). Ceux-ci produisent des toxines se liant aux cellules épithéliales de l'intestin de la larve du moustique (Labbé et al. 2011). Cette méthode est spécifique et efficace à des doses peu toxiques pour l'environnement. En France, le Bti est le seul larvicide autorisé contre les moustiques. D'autres méthodes de lutte biologique contre les stades larvaires peuvent également être utilisées, telles que l'introduction de poissons larvivores (Walton 2007) ou

d'insectes ou crustacés prédateurs (Marten et al. 1997; Focks 2007) dans les gîtes larvaires. Dans certains pays, l'utilisation de larvicides chimiques est possible. Certains, de la famille des organophosphorés ciblent l'acétylcholinestérase des synapses (Labbé et al. 2011). D'autres, tels que le diflubenzuron, le pyriproxyfène et le S-methoprene, agissent comme des régulateurs de croissance (Grigoraki et al. 2017). Par mimétisme avec l'hormone de croissance juvénile, ils occupent ses récepteurs et bloquent la croissance des larves. Toutefois, ces larvicides chimiques à large spectre présentent un risque important pour l'environnement, que nous détaillerons dans la partie suivante.

Malgré l'efficacité de ces outils, il est difficile voire impossible d'éliminer ou de traiter tous les gîtes. En effet, chez les *Aedes*, la femelle répartit ses œufs entre plusieurs gîtes larvaires (oviposition séquentielle ou « skip oviposition » en anglais), naturels ou artificiels, visibles ou cryptiques (Reiter 2007). Cette caractéristique rend l'application de ces méthodes possible dans un rayon très restreint (autour de son habitation, par exemple), mais peu efficace à grande échelle (Bouyer et Vreysen 2019).

1.3.1.2 *Contrôle vectoriel contre le stade imaginal aérien*

En cas d'épidémie ou de circulation virale avérée, une importante partie du contrôle vectoriel s'effectue alors au stade adulte, tel que préconisé par l'OMS (**Figure 6**). Si les personnes peuvent se protéger individuellement à l'aide de répulsifs ou de moustiquaires (dont l'efficacité contre les *Aedes* est discutée, cf. Lenhart et al. 2020), la lutte antivectorielle globale est effectuée à l'aide d'insecticides chimiques à large spectre.

Il existe pour cela quatre classes principales d'insecticides chimiques : les organochlorés (OC), les organophosphorés (OP), les carbamates (CX) et les pyréthriinoïdes (PYR) (Labbé et al. 2011; Mulatier 2018). Les OP et les CX ciblent l'acétylcholinestérase des synapses, une enzyme essentielle du système nerveux ; les OP sont utilisés comme larvicide (temephos) et adulticide (malathion, fenitrothion) et les CX dans les aérosols adulticides. Les OC et les PYR, quant à eux, agissent sur les canaux sodium voltage-dépendants du système nerveux. Historiquement, l'insecticide le plus utilisé était le DDT (dichlorodiphényltrichloroéthane), un organochloré. Compte tenu de sa toxicité pour l'homme et pour l'environnement, il a été interdit dans les années 1970 dans les pays occidentaux (Labbé et al. 2011). Les OP ont également été abandonnés progressivement, laissant la place aux PYR -notamment la deltaméthrine- qui sont devenus les adulticides de référence et constituent aujourd'hui 80% des insecticides utilisés en Santé Publique dans le monde (Labbé et al. 2011).

Bien que moins toxiques que le DDT pour la santé humaine et l'environnement, les insecticides couramment utilisés en Europe en santé publique mais aussi en agriculture ont un impact néfaste sur l'environnement et les écosystèmes. En effet, outre les méfaits bien connus du grand public sur les populations d'abeilles (Decourtye et al. 2005; Maund et al. 2011; Baron, Raine et Brown 2014; Ingram et al. 2015), l'application d'insecticides, même à des doses considérées comme respectueuses de l'environnement, entraîne également une diminution des populations d'invertébrés non-cibles dans les cours d'eau (Beketov et al. 2013; Antwi et Reddy 2015). D'autres études ont mis en évidence les effets négatifs des insecticides sur les microorganismes et les invertébrés du sol impliqués dans la décomposition, le cycle des éléments nutritifs, et la respiration (Widenfalk, Svensson et Goedkoop 2004; Chagnon et al. 2015; Das, Das et Das 2016).

En outre, la similarité des modes d'actions des différents insecticides facilite la sélection de mutations de résistance, ce qui, à terme, rend les pulvérisations d'insecticides dirigés contre les *Aedes* adultes inefficaces (Vazquez-Prokopec et al. 2017). Alors que les populations européennes d'*Ae. albopictus* semblaient exemptes de résistances aux insecticides, depuis 2018, plusieurs mutations kdr (« knockdown resistance ») conférant une résistance aux pyréthrinoïdes ont été identifiées sur des populations italiennes du moustique tigre (Pichler et al. 2018; Kasai et al. 2019). Parmi elles, certaines mutations telles que l'allèle V1016G confèrent un haut niveau de résistance aux pyréthrinoïdes, ce qui amène les chercheurs à s'inquiéter de leur propagation chez *Ae. albopictus* en Europe (Pichler et al. 2018; Kasai et al. 2019).

En France métropolitaine et dans les DROM, l'utilisation de la deltaméthrine par les autorités sanitaires dans la lutte adulticide contre les *Aedes* est réservée aux cas de circulation virale ou d'épidémie avérée. Dans cette situation, la deltaméthrine est appliquée par pulvérisation spatiale dans les foyers de transmission établie et par pulvérisation intra ou péri-domiciliaire de jour autour des cas isolés ou des foyers émergents (ANSES 2020). Dans les espaces privés (maisons, résidences), les produits phytopharmaceutiques de synthèse sont interdits pour les utilisateurs non professionnels depuis le 1^{er} janvier 2019⁴. Sont disponibles à la vente des produits de biocontrôles, des produits à faible risque ou des produits utilisables en agriculture biologique. Toutefois, dans les espaces privés clos (un golf ou un terrain de camping par exemple), des opérateurs spécialisés peuvent appliquer tout produit phytopharmaceutique

4 Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation 2018.

autorisé en France⁵. Néanmoins, si les larvicides chimiques mentionnés précédemment sont autorisés à la vente dans l'Union Européenne, leur application est restreinte localement par la protection de nombreuses réserves naturelles (Comité scientifique du HCB 2017). En effet, leurs modes d'action induisent un impact non négligeable sur la faune associée. En milieu urbain, leur utilisation est moins limitée mais les opérateurs leur préfèrent généralement le Bti.

1.3.1.3 *La mobilisation sociale et la surveillance, leviers de la lutte intégrée*

La lutte antivectorielle est mise en place puis modulée en fonction des dynamiques spatiales et saisonnières des populations d'*Aedes*, et plus particulièrement d'*Ae. albopictus* qui représente le vecteur principal à l'heure actuelle en Europe. L'efficacité de cette lutte est évaluée par des outils de surveillance entomologique tels que des pièges pondoirs ciblant les femelles gravides (Bellini et al. 1996) et des pièges ciblant les femelles en recherche d'hôte (Lacroix et al. 2009; Roiz et al. 2016). En Europe, la surveillance du moustique tigre est réalisée par chaque état membre puis restituée au niveau continental par l'ECDC (*European Center for Disease prevention and Control*) qui, en partenariat avec l'EFSA (*European Food Safety Authority*) via le réseau VectorNet, dresse une cartographie dynamique de la présence d'*Ae. albopictus*⁶, ainsi que d'autres espèces d'arthropodes d'intérêt médical et vétérinaire. Localement, chaque pays organise en conséquence la lutte antivectorielle. En France métropolitaine, la surveillance de la présence d'*Ae. albopictus* s'appuie également sur des signalements citoyens via une plateforme en ligne dédiée⁷. Avant 2020, des organismes publics géraient surveillance et lutte antivectorielle au niveau départemental ou régional : L'Entente Interdépartementale pour la Démoustication du littoral méditerranéen (EID Méditerranée), l'Entente Interdépartementale Rhône-Alpes pour la Démoustication Rhône-Alpes (EIRAD), l'Etablissement public Interdépartemental pour la Démoustication du littoral atlantique (EID Atlantique), le Syndicat Intercommunal de lutte contre les moustiques (SLM) du Bas-Rhin, la Brigade Verte du Haut-Rhin, l'ARS de Corse, le Conseil départemental du Val-de-Marne, et les Conseils départementaux de l'Aveyron, des Landes, du Lot, du Lot et Garonne, et du Tarn-et-Garonne⁸. Depuis le 1^{er} janvier 2020, le marché de la lutte antivectorielle dans les espaces publics a été ouvert aux opérateurs privés, tels qu'Altopictus dans la région Occitanie.

⁵ Ecophyto PRO 2017.

⁶ vectornet.ecdc.europa.eu.

⁷ signalement-moustique.anses.fr/signalement_albopictus/.

⁸ solidarites-sante.gouv.fr/sante-et-environnement/risques-microbiologiques-physiques-et-chimiques/especes-nuisibles-et-parasites/moustiques.

Pour la lutte antivectorielle comme pour la surveillance, une mobilisation sociale massive et pérenne est un facteur clé du succès. En effet, nombre de gîtes larvaires sont à l'intérieur de propriétés privées. La mobilisation sociale vise donc à engager et sensibiliser les citoyens afin d'induire un changement de comportement pour une appropriation durable de l'ensemble des mesures de prévention, comme l'élimination des gîtes, l'aménagement de l'espace privé mais aussi la réduction du contact homme-vecteurs (répulsifs, moustiquaires, vêtements couvrants), afin de réduire et contrôler les risques vectoriels. Toutefois, certaines études indiquent qu'il peut être difficile d'impliquer les populations sans adopter une législation contraignante comprenant des contrôles et des amendes en cas de non-respect des règles (Bellini et al. 2020). Des approches plus pédagogiques comme des visites en porte à porte, plus innovantes en terme de communication comme l'utilisation des réseaux sociaux et plus intégratives comme la mise en place d'une plateforme de sciences participatives doivent être développées spécifiquement (Caputo et al. 2021).

1.3.2 Méthodes innovantes de lutte antivectorielle contre les *Aedes*

Ainsi, la lutte antivectorielle contre les *Aedes* telle qu'actuellement réalisée en Europe et ailleurs dans le monde est confrontée à de nombreuses limites que sont l'accessibilité et la multiplicité des gîtes larvaires, les risques sanitaires et environnementaux posés par les insecticides chimiques et l'émergence de résistance auxdits insecticides qui pourraient, à terme, rendre inefficace l'essentiel des actions de lutte pratiquées actuellement.

Cela a conduit l'Organisation Mondiale de la Santé à recommander le développement urgent de méthodes alternatives dans son plan de lutte mondial 2017-2030 contre les vecteurs (WHO et UNICEF). Face à ce constat, des alternatives plus durables ont été proposées (**Figure 7**).

1.3.2.1 *Alternatives pour le contrôle des stades pré-imaginaux*

L'utilisation de virus spécifiques d'insectes, tels que les densovirus, a été explorée pour lutter biologiquement contre les moustiques (Carlson, Suchman et Buchatsky 2006; Becnel et White 2007; Roekring et Smith 2010; Johnson et Rasgon 2018). En effet, les densovirus peuvent infecter l'ensemble des tissus et provoquer ainsi la mort des larves ou d'importantes déformations. La transmission des virus dans les populations peut se faire horizontalement, en traitant les gîtes larvaires, et/ou verticalement, de la femelle à sa descendance. Certains densovirus ont une forte spécificité pour la famille des Culicidae, c'est-à-dire les moustiques, et sont sans effet, a priori, sur les autres insectes. Le densovirus AalDV2 a montré récemment

au laboratoire des résultats prometteurs sur différentes populations d'*Ae. albopictus* et d'*Ae. aegypti* sensibles et résistantes aux insecticides (Perrin et al. 2020). Un composé d'origine biologique, le Spinosad, combinant deux toxines issues de la fermentation de bactéries du genre *Saccharopolyspora*, présente également un effet larvicide (Kirst 2010). Le Spinosad a une action de spectre moyen contre les larves de lépidoptères et les nymphes de diptères en excitant le système nerveux de l'insecte jusqu'à conduire à la paralysie. Similairement, a été testée la lutte biologique à l'aide de champignons entomopathogènes (Darbro et al. 2012).

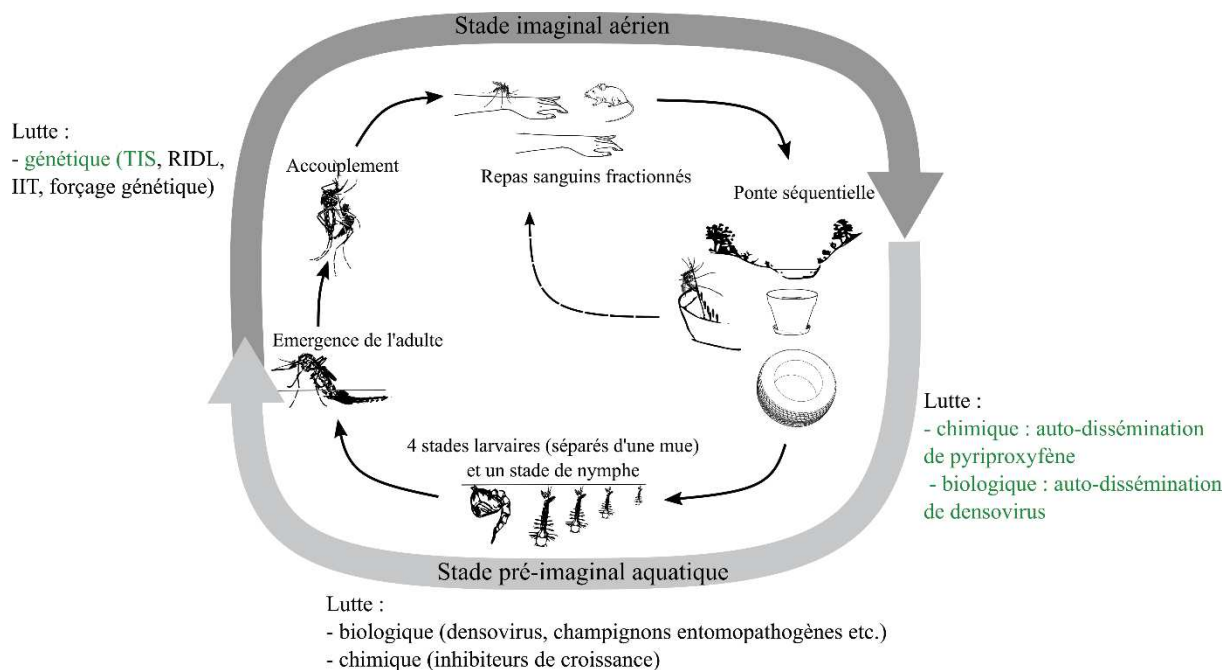


Figure 7 : Méthodes de lutte antivectorielle innovantes contre les *Aedes*.

Les méthodes en vert sont combinées dans le projet ERC REVOLINC dans lequel s'inscrit cette thèse.

En lutte chimique, il a été proposé de disperser dans les gîtes larvaires des régulateurs de croissance larvaire tels que le pyriproxifène. Son action consiste à bloquer la croissance des larves par mimétisme de l'hormone de croissance juvénile (Ishaaya et Horowitz 1995; Invest et Lucas 2008). Cette méthode a notamment été testée pour le traitement des bassins de rétention (Ocampo et al. 2014; Bellini et al. 2009).

Tous ces larvicides rencontrent néanmoins le même obstacle que les larvicides traditionnels : il est impossible d'identifier et, par conséquent, de traiter l'ensemble des gîtes larvaires. Aussi, des chercheurs ont proposé d'utiliser les moustiques adultes pour disséminer eux-mêmes le

larvicide dans les gîtes larvaires. Cette méthode, appelée « auto-dissémination », a été testée avec le pyriproxifène contre les *Aedes* et consiste à traiter des sites de repos artificiels avec du pyriproxifène qui va contaminer les femelles lors de leur visite (Devine et al. 2009). En déposant par la suite leurs œufs, et du fait de leur comportement de ponte séquentielle, les femelles disséminent le régulateur de croissance dans les gîtes larvaires. Cette technique contourne ainsi la problématique liée à la multiplicité des gîtes larvaires. Des essais d'auto-dissémination contre *Ae. albopictus* avec le pyriproxifène, menés sur le terrain à échelle réduite, ont donné des résultats intéressants (Caputo et al. 2012) mais plus récemment, des évaluations pluriannuelles et à grande échelle axées sur l'utilisation opérationnelle dans des conditions de terrain, ont donné des résultats plus décevants (Unlu et al. 2020). L'efficacité du traitement a été fortement impactée par des problèmes techniques et logistiques liés à l'étendue de la zone à traiter. Aussi, les auteurs soulignent que des recherches complémentaires sur la combinaison de cet outil à d'autres technologies sont nécessaires afin d'en faire une méthode opérationnelle de lutte intégrée. En outre, si le régulateur de croissance venait à être utilisé largement et dans la durée, on peut craindre la sélection de mutations de résistance au pyriproxifène dans les populations de moustiques exposées. En effet, chez la mouche blanche ravageur des cultures, *Bemisia tabaci*, un haut niveau de résistance à la molécule a été détecté dès 3 applications successives dans les serres et les champs de coton en Israël (Ishaaya et Horowitz 1995; Horowitz et al. 1999). Chez le moustique *Culex pipiens*, dont les gîtes larvaires font l'objet depuis plus de 10 ans de traitements par un autre régulateur de croissance larvaire, le diflubenzuron, une résistance a été détectée au Nord de l'Italie (Grigoraki et al. 2017). De plus, le pyriproxifène agit à spectre large sur de nombreuses espèces non-cibles, notamment d'insectes, d'invertébrés aquatiques et de poissons, en faisant une alternative peu respectueuse de l'environnement.

1.3.2.2 *Le contrôle génétique, alternative ciblant la reproduction des stades imaginaux*

Le fer de lance de l'innovation en lutte antivectorielle ciblant les moustiques adultes est le contrôle génétique. Celui-ci consiste à relâcher des moustiques modifiés parmi leurs congénères afin qu'ils s'accouplent avec ces derniers. Ainsi, ces méthodes sont spécifiques de l'espèce voire de la souche ciblée. En effet, l'espèce *Ae. albopictus* constitue *a priori* un groupe monophylétique à elle seule et il n'y a, à ma connaissance, pas d'introgressions connues avec d'autres espèces. Pour *Ae. aegypti*, en revanche, il a été rapporté que des échanges génétiques ont été observés avec l'espèce *Aedes mascarensis* à la Réunion (Soghigian et al. 2020). Aussi, il sera important d'étudier au cas par cas la méthode la plus appropriée dans le ciblage d'*Ae.*

aegypti mais, dans les régions où *Ae. mascarensis* est absente, son contrôle génétique restera particulièrement ciblé. De plus, outre des croisements rares et géographiquement limités entre *Ae. aegypti* et *Ae. mascarensis*, les espèces *Ae. aegypti* et *Ae. albopictus* possèdent une forte barrière reproductive entre elles (Maïga et al. 2020) et avec les autres espèces de moustiques.

La lutte génétique peut avoir deux objectifs distincts : la modification de la population afin de la rendre moins susceptible de transmettre des agents pathogènes ou la réduction de la taille de la population.

● *Modification de population*

Pour modifier efficacement une population afin de la rendre résistante à la réplication des pathogènes ciblés, il faut que cette résistance soit transmise de manière non-mendélienne à la majorité de la descendance, c'est-à-dire transmise par forçage génétique, ou *gene drive* (Sinkins et Gould 2006; Champer, Buchman et Akbari 2016). Une variante de forçage génétique consiste en l'utilisation de bactéries endosymbiotiques du genre *Wolbachia*. Ces bactéries, naturellement présentes chez *Ae. albopictus*, confèrent une incompatibilité cytoplasmique vis-à-vis des moustiques infectés par des souches de *Wolbachia* différentes (Dobson, Rattanadechakul et Marsland 2004; Xi et al. 2005). L'incompatibilité cytoplasmique se manifeste par le fait qu'un mâle infecté par une souche donnée s'accouplant avec une femelle non infectée par cette souche ne produira pas de descendance, tandis qu'une femelle infectée par ladite souche produira une descendance infectée par celle-ci quel que soit le statut infectieux du mâle. En 2008, deux équipes ont découvert que, chez la drosophile, ces bactéries réduisent également la réplication des virus à ARN en sur-activant les gènes impliqués dans l'immunité (Teixeira, Ferreira et Ashburner 2008; Hedges et al. 2008). Lorsqu'introduites chez *Ae. aegypti*, ces bactéries (appelées wMel) ont montré qu'elles pouvaient bloquer l'infection par le DENV et CHIKV (Moreira et al. 2009). Chez *Ae. albopictus*, wMel bloque également l'infection par le virus de la dengue (Blagrove et al. 2012). Ainsi, en l'introduisant en proportion initiale suffisante, l'infection par wMel peut s'étendre et rendre la population de moustique résistante aux virus. Cette méthode est appelée la propagation d'une Interférence avec le Pathogène (IP). Un essai récent en Indonésie a démontré l'efficacité protectrice de la méthode à 77.1% (Utarini et al. 2021), conduisant le Vector Control Advisory Group (groupe d'experts conseillant l'OMS sur la lutte antivectorielle) à reconnaître son utilité en Santé Publique.

Le forçage génétique peut également employer d'autres outils, tels que les éléments transposables, les endonucléases de ciblage (homing endonucleases, par ex. Windbichler et al.

2011), ou encore la technologie CRISPR Cas (Li et al. 2020). Bien que prometteuses, ces approches ne sont pas exemptes du risque de sélection ou de développement de résistance (Hammond et al. 2017; Unckless, Clark et Messer 2017; Hammond et al. 2021).

● *Réduction ou élimination de population*

Le second pan du contrôle génétique vise à réduire les populations d'insectes vecteurs. Ces méthodes comprennent : i) la Technique de l'Insecte Stérile (TIS, théorisée par Knippling 1955) visant à relâcher en masse des mâles stérilisés afin qu'ils entrent en compétition avec les mâles fertiles du terrain pour l'accouplement, ii) les lâchers de mâles fertiles transmettant un allèle létal dominant à la descendance (« Release of Insects Carrying a Dominant Lethal, RIDL », Alphey et Andreassen 2002), ou encore iii) la Technique de l'Insecte Incompatible (TII, Laven 1967; Bourtzis et al. 1996; Bourtzis 2008) reprenant l'incompatibilité cytoplasmique induite par les bactéries du genre *Wolbachia* pour relâcher des mâles transinfectés qui ne produiront pas de descendance. De tels programmes de lutte ont fait leurs preuves sur le long terme chez d'autres insectes (voir par exemple Bouyer et al. 2014 pour la mouche tsé-tsé ou Enkerlin 2005 chez les mouches des fruits, et le chapitre 6.2 de Dyck, Hendrichs et Robinson 2021) et lors d'essais de terrain chez le moustique tigre (voir par ex. Zheng et al. 2019). Le forçage génétique peut également être utilisé pour l'élimination de populations, en transmettant, par exemple, des mutations létales aux femelles ou en rendant celles-ci infertiles (Klein et al. 2012; Hammond et al. 2016; Kyrou et al. 2018; Papathanos et Windbichler 2018).

Une des limites de la réduction de population est que cela peut provoquer un déséquilibre écologique. En effet, la niche écologique occupée par le moustique ciblé devenant vide, les populations de proies et de prédateurs risquent d'en être affectées, à moins qu'une autre espèce de moustique vienne réoccuper cette niche.

En ce qui concerne les prédateurs des larves d'*Ae. albopictus* et d'*Ae. aegypti*, celles-ci se développant plutôt dans des milieux exempts de poissons et autres prédateurs aquatiques contrairement à d'autres espèces de moustiques (Sunahara, Ishizaka et Mogi 2002), les écosystèmes aquatiques ne devraient pas être perturbés. Quant aux prédateurs des moustiques adultes, plusieurs études ont comparé les populations d'insectes, d'araignées, de salamandres, de lézards, de grenouilles, d'oiseaux et de chauve-souris avant et après l'application d'insecticides, et ont démontré que la réduction de la population de moustiques pouvait faire perdre une source de nourriture significative à ces espèces (revu dans Bhattacharya, Pal et Acharyya 2016). Les larves de moustiques sont aussi considérées comme prédatrices régulant

les protozoaires en milieu aquatique. Leur élimination pourrait ainsi dérégler l'écosystème des gîtes larvaires, et notamment les communautés bactériennes (Cochran-Stafira et Ende 1998).

Toutefois, s'agissant des larves ou des adultes, puisque les techniques de lutte évoquées ici ciblent une espèce et une population de moustiques parmi toutes celles qui coexistent dans un environnement donné, la perturbation liée à la réduction de population est probablement moins significative dans des contextes dans lesquels de nombreuses espèces coexistent dans une même niche écologique. Pour s'en assurer, il convient ainsi de s'intéresser au biotope local avant de mettre en place une méthode de lutte. Une étude récente a montré, par exemple, que les moustiques représentaient une part négligeable de l'alimentation de la plupart des espèces de chauve-souris de la région néotropicale (Ingala et al. 2021).

De même, sauf dans quelques régions du Canada et de Russie, le rôle des moustiques dans la pollinisation est considéré très faible comparé à celui des abeilles et des papillons (revu dans Bhattacharya, Pal et Acharyya 2016). Toutefois, ceci est sujet à controverse, et il est possible que certains moustiques, dont certains *Aedes*, jouent un rôle dans la pollinisation des orchidées (Inouye 2010; Peach et Gries 2016; Lahondère et al. 2020), nous invitant là encore, à réaliser lors des essais pilotes de ces techniques des études d'impact sur l'environnement et la biodiversité. L'on peut toutefois souligner, que si l'une de ces méthodes venait, en zone urbaine, à remplacer l'utilisation d'insecticides à large spectre qui, eux, ont un impact néfaste général sur les pollinisateurs, la pollinisation locale devrait être améliorée.

Un autre risque soulevé par la suppression d'une espèce est celui du remplacement de niche écologique qui pourrait conduire au maintien de la transmission virale par une autre espèce. Dans des régions où les deux espèces coexistent, telles qu'à La Réunion, si l'on ciblait l'espèce majoritaire, *Ae. albopictus*, et que celle-ci venait à régresser voire à disparaître, il y aurait un risque de remplacement par *Ae. aegypti* car ils partagent des niches écologiques très proches (Beech et al. 2009; Kraemer et al. 2019). Malgré les prédictions de certains modèles (Kraemer et al. 2019), la réapparition d'*Ae. aegypti* depuis quelques années sur les pourtours de la mer Noire (Akiner et al. 2016) et à Madère (Seixas et al. 2019), invite à la prudence même en Europe. De plus, en 2016, il a été détecté pour la première fois aux abords d'un aéroport européen, aux Pays-Bas, probablement introduit par des vols commerciaux en provenance de zone endémique (Ibañez-Justicia et al. 2017). Si l'élimination du moustique tigre était visée dans une région voisine ou colonisée par le moustique de la fièvre jaune, il faudrait prendre ce risque en considération et prévoir de cibler également les populations d'*Ae. aegypti*.

L'élimination globale d'une espèce par quelque méthode que ce soit peut poser des questions éthiques. Toutefois, elle peut se justifier par une situation sanitaire spécifique à l'échelle locale (voir par exemple Bouyer et al. 2019 dans le cadre de la lutte contre la mouche tsé-tsé en Afrique) et par le caractère invasif des moustiques objets de cette thèse. La conclusion pourrait être différente si l'on s'intéressait à des espèces endémiques d'anophèles en Afrique. Ces questions importantes doivent être adressées préalablement à la mise en place d'une campagne d'élimination et prises en considération en regard du contexte local.

● *Contrôle génétique auto-entretenu vs. auto-limité*

Une autre caractéristique permettant de comparer les différentes approches de contrôle génétique entre elles est leur caractéristique auto-limitée (*self-limited*, c'est-à-dire confiné dans le temps et dans l'espace) ou auto-entretenu (*self-sustaining*, c'est-à-dire étendu dans l'espace et qui dure dans le temps). En effet, une méthode auto-entretenu nécessitera très peu de maintenance et de petites infrastructures mais elle présentera peu de flexibilité et ne sera pas ou difficilement réversible. *A contrario*, une méthode auto-limitée sera plus maîtrisable et adaptable mais également plus coûteuse et lourde à maintenir car elle nécessitera des interventions répétées dans le temps et dans l'espace.

La TIS, la TII et le RIDL sont des techniques de lutte génétique de type auto-limité qui ont un impact très local et limité dans le temps, avec recolonisation inéluctable des espaces traités par des moustiques extérieurs. Leurs risques potentiels pour l'environnement sont donc moindres que pour les techniques de type auto-entretenu (forçage génétique, IP, **Tableau 1**). La critique principale à l'égard des techniques auto-entretenu est leur potentielle irréversibilité (Committee on Gene Drive Research in Non-Human Organisms: Recommendations for Responsible Conduct et al. 2016). Aussi, les recherches récentes se concentrent davantage sur le développement de souches de forçage génétique réversible ou confinable (Li et al. 2020).

En conclusion, le contrôle génétique de type TIS et ses variantes auto-limitées est une alternative plus respectueuse de l'environnement, plus pérenne que l'application d'insecticides, et présentant, à l'heure actuelle, moins de risques que les techniques auto-entretenu. Certaines problématiques de compétition entre espèces et des considérations éthiques légitimes devront néanmoins faire l'objet d'études approfondies au cas par cas.

Tableau 1 : Comparaison des méthodes de lutte génétique auto-limitées vs. auto-entretenu.

Adapté depuis Comité scientifique du HCB (2017).

Auto-limité + : maîtrisable, adaptable - : coûteux, maintenance lourde			Auto-entretenu + : pas de maintenance, petites infrastructures - : peu flexible, peu/pas réversible		
Méthode	But	Phase de test	Méthode	But	Phase de test
TIS	Réduction / Elimination	III	IP	Modification	III - IV
TII	Réduction / Elimination	III	Forçage génétique (compétence vectorielle)	Modification	I
RIDL	Réduction / Elimination	III - IV	Forçage génétique (élimination)	Elimination / Eradication	I

1.3.3 Couplage de contrôle aux stades pré-imaginal et imaginal : la Technique de l’Insecte Stérile renforcée (TIS renforcée ou *boosted SIT*)

La Technique de l’Insecte Stérile (TIS), a été théorisée et expérimentée pour la première fois par Knippling au milieu des années 1950 (Knippling 1955). Dès ce premier essai, il dessinait les contours des conditions nécessaires au bon fonctionnement de cette méthode de lutte : cibler des insectes se dispersant facilement après lâcher et chez lesquels les femelles ne s’accouplent généralement qu’une seule fois, avoir une méthode de stérilisation n’affectant pas trop la compétitivité des mâles à relâcher, et une taille de population pas trop importante pour que la quantité de mâles à relâcher soit raisonnable (Knippling 1955). Enfin, il soulignait l’importance d’être en mesure d’élever des millions d’insectes, et en particulier des mâles, de façon économiquement viable.

Dans une première expérimentation contre la lucilie bouchère (*Cochliomyia hominivorax*) à Curaçao, les auteurs sont parvenus à éradiquer l’espèce en 3 mois en relâchant 2 à 4 fois plus de mouches mâles stérilisées que de mâles sauvages estimés (Knippling 1955, 1959). Cette même technique a prouvé par la suite son efficacité pour la même espèce dans d’autres contextes (résumé dans Scott et al. 2017) et pour d’autres insectes d’intérêt agronomique tels que les mouches des fruits (Orankanok et al. 2007; Fanson et al. 2014; Enkerlin 2005; Enkerlin et al. 2017; McInnis et al. 1994).

Chez les *Aedes*, les adultes se dispersent spontanément en volant et les femelles ne sont généralement inséminées que par le premier mâle avec lequel elles s'accouplent (Oliva et al. 2013; Hartberg 1971). La stérilisation par irradiation est efficace et les mâles irradiés sont compétitifs (Bellini, Balestrino et al. 2013; Bond et al. 2019; Bouyer et Vreysen 2020). Les populations d'*Aedes* peuvent, au besoin selon les régions, être préalablement réduites en combinaison avec d'autres méthodes de lutte. Les méthodes d'élevage de masse ont, quant à elles, été décrites et optimisées grâce à de nombreux travaux (Zhang et al. 2017; Zheng et al. 2015; FAO/IAEA 2019). Aussi, *Ae. albopictus* et *Ae. aegypti* sont des espèces chez lesquelles la TIS pourrait fonctionner. Cela a d'ailleurs été démontré lors d'essais de terrain (Bellini, Medici et al. 2013; Gato et al. 2021).

Une étude comparant le rapport coût-efficacité de la lutte antivectorielle actuellement réalisée en Italie à deux autres approches complémentaires, le porte à porte -consistant à sensibiliser les populations et à les aider à éliminer les gîtes larvaires à domicile- et la TIS, a conclu que quel que soit le scénario envisagé, la TIS avait le meilleur rapport coût-efficacité (WHO et IAEA 2020). En effet, si la lutte antivectorielle actuelle est peu coûteuse, l'étude en a évalué l'efficacité à seulement 1% de diminution des densités de moustiques, tandis que le porte à porte serait plus efficace mais extrêmement coûteux.

Forts de ces résultats, et de son expérience acquise sur la TIS contre les glossines, Jérémie Bouyer a proposé de renforcer la TIS en la couplant à l'auto-dissémination de pyriproxyfène (Bouyer et Lefrançois 2014) ou de densovirus spécifiques de l'espèce cible (Bouyer et al. 2016). Avant d'être relâchés, les mâles stérilisés seraient couverts de pyriproxyfène formulé en poudre ou de densovirus dont la formulation est à l'étude, qu'ils transmettraient aux femelles lors de l'accouplement, lesquelles déposeraient par la suite le régulateur de croissance ou le virus entomopathogène dans les gîtes larvaires qu'elles visiteraient lors de leurs pontes successives. Ainsi, il n'y aurait pas de descendance des femelles accouplées avec les mâles stériles relâchés, et les larves issues d'accouplement avec des mâles fertiles seraient tuées dans les sites d'oviposition par la substance active. Cette stratégie a été étudiée dans le cadre du projet ERC REVOLINC mené par Jérémie Bouyer de 2016 à 2021 et dans lequel s'inscrit cette thèse (CORDIS, European Commission, Grant agreement ID: 682387 2016).

Des approches de modélisation ont confirmé la valeur ajoutée de la TIS renforcée (avec du pyriproxyfène) par rapport à la TIS conventionnelle (Pleydell et Bouyer 2019). Des essais préliminaires réalisés au laboratoire à Montpellier ont permis de mettre au point des

formulations adaptées à base de pyriproxifène qui ont été testées en 2020 en essais confinés contre les *Aedes* à La Réunion avant de passer en 2021 à des essais pilotes sur le terrain, contre *Ae. aegypti* à St Joseph (La Réunion) et contre *Ae. albopictus* à Valence (Espagne).

1.4 Le sexage, obstacle majeur à l'application de la TIS chez les *Aedes*

Ainsi, le moustique tigre, *Ae. albopictus*, et le moustique de la fièvre jaune, *Ae. aegypti*, représentent des menaces sérieuses pour la santé publique en Europe par leur propriété de vecteurs biologiques particulièrement abondants et anthropophiles. Sur le continent européen, des cas de circulations virales autochtones de dengue, de chikungunya et de Zika dues à *Ae. albopictus* ont été enregistrés ces dernières années, rendant le risque épidémique réel. Dans certains départements d'outre-mer français tels que La Réunion, ce n'est plus une menace mais un problème avéré, avec une épidémie de dengue à plusieurs sérovariants en cours sur l'île depuis plusieurs années. Pour répondre à ces problématiques de manière durable, à la fois dans le temps et au sens écologique du terme, le projet ERC REVOLINC propose une approche de lutte génétique appelée TIS renforcée déjà décrite.

1.4.1 Le sexage, une opération coûteuse et peu efficace

Lors de l'application de la TIS chez les moustiques, seuls les mâles peuvent être relâchés, les femelles présentant un risque de transmission vectorielle et de nuisance trop important. Aussi, préalablement aux lâchers il est nécessaire de produire et trier de grandes quantités de moustiques pour ne garder finalement que les mâles. A l'heure actuelle, cette étape constitue l'un des principaux obstacles à l'utilisation plus large de la TIS chez les *Aedes*. En effet, la séparation en masse des mâles est effectuée au stade nymphal par des méthodes mécaniques exploitant le dimorphisme de taille existant entre les nymphes mâles, plus petites, et femelles, plus grosses, chez les *Aedes*.

Deux méthodes de référence existent, nommément l'utilisation de tamis métalliques de taille décroissante, et la méthode dites de Fay Morlan consistant à écouler l'échantillon entre deux plaques de verre verticales d'espacement décroissant (Fay et Morlan 1959). Toutefois, afin de limiter au maximum la quantité de femelles dans l'échantillon, seules les nymphes mâles de petite taille peuvent être récupérées. En effet, les plus petites femelles étant de même taille que les plus gros mâles (cf. **Figure 8** et Zacarés et al. 2018), ces derniers ne peuvent être collectés. Au total, ces méthodes mécaniques ne permettent de ne récupérer qu'environ 30% des mâles, lesquels sont contaminés par 1% de femelles en moyenne (Bellini, Medici et al. 2013). Ainsi, la séparation des sexes au stade nymphal implique d'élever mâles et femelles jusqu'à ce stade pour se débarrasser de plus de la moitié des mâles et de la quasi intégralité des femelles avant le lâcher. Le tri en lui-même est long et fastidieux, et est sujet à une importante variabilité selon les jours et les opérateurs (Mamai et al. 2020). En outre, le taux de contamination de 1% par

des femelles constitue la limite haute acceptable dans les programmes de TIS (WHO et IAEA 2020). Dans le cadre de la Technique de l’Insecte Incompatible (TII), ce taux de contamination de 1% n’est pas acceptable car la présence de femelles en quantité même faible peut induire un remplacement de population au lieu de la suppression attendue (Zheng et al. 2019). Notons toutefois que ce triage mécanique a été amélioré et partiellement automatisé très récemment pour atteindre un rendement de 100 000 nymphes par heure et un taux de contamination de 0,3% (Xi, Z., pers. com.). Néanmoins, ces résultats ont été obtenus lors du tri d’une souche porteuse de la bactérie *Wolbachia* isolée chez *Culex pipiens*, wPip, laquelle augmenterait le dimorphisme de taille et ainsi faciliterait la séparation des sexes en comparaison à une souche non porteuse (Puggioli et al. 2016). Aussi, ils ne peuvent pas être extrapolés à d’autres souches de moustiques à l’heure actuelle. Une autre méthode, ayant fait l’objet d’une utilisation opérationnelle sur le terrain et présentant un taux de contamination par des femelles très faible, repose sur la combinaison de plusieurs tris automatisés, le premier étant tri mécanique à l’aide de tamis métalliques, et les autres tris se faisant sur les adultes (Crawford et al. 2020). Ces deux méthodes présentent l’avantage de proposer une automatisation de l’étape de tri, mais celle-ci intervient néanmoins tard au cours du développement larvaire, engendrant les mêmes surcoûts que les tris manuels.

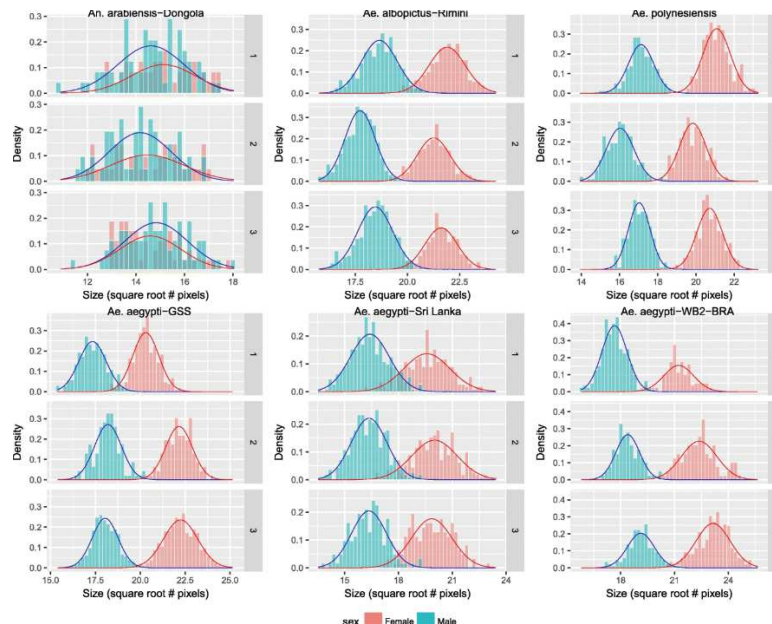


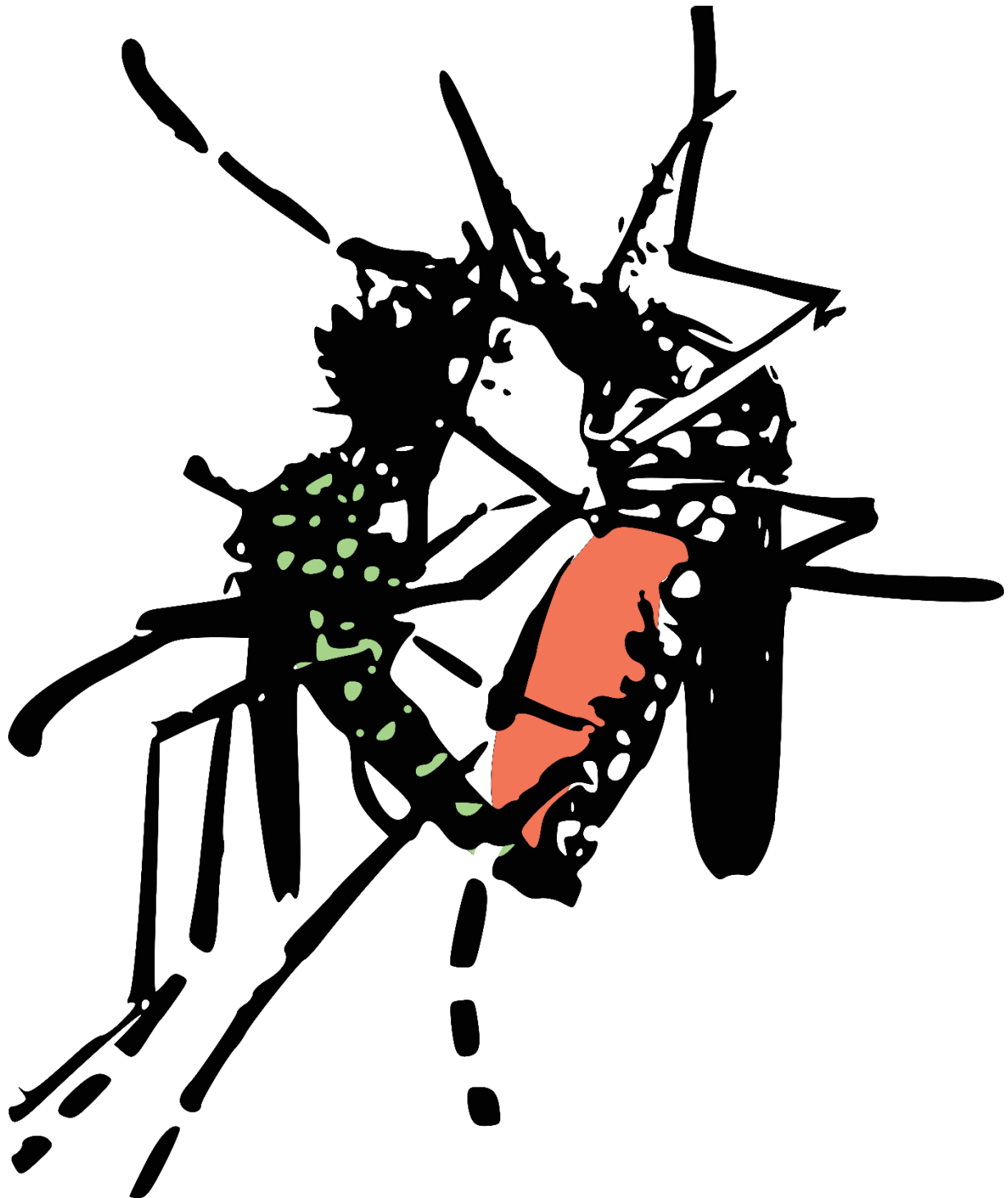
Figure 8 : Fréquence de distribution de la taille des nymphes de différentes espèces et souches de moustiques élevées en laboratoire.

Les mâles sont représentés en bleu et les femelles en rouge. Figure issue de Zacarés et al. 2018.

1.4.2 Objectif de cette thèse : faciliter la séparation des sexes pour les moustiques du genre *Aedes*

Dans le cadre de cette thèse, nous avons souhaité développer chez *Ae. albopictus* et *Ae. aegypti* des méthodes de sexage plus performantes que les méthodes actuelles afin de réduire au maximum le coût de l'élevage de masse. Pour ce faire, nous avons dans un premier temps réalisé une revue de la littérature listant et comparant les méthodes de sexage existant chez les Diptères afin d'identifier les approches nous semblant les plus prometteuses. A l'issue de cette revue, nous avons conclu qu'un sexage automatisé dès le premier stade larvaire afin d'éliminer le surcoût d'élevage des femelles qui ne seront pas conservées, serait idéal. Aussi, nous nous sommes intéressés aux souches de sexage génétique (GSS, pour *Genetic Sexing Strains* en anglais), lesquelles requièrent une bonne connaissance du génome de l'espèce à transformer. C'est pourquoi, nous avons cherché dans un second temps à mieux connaître le mécanisme de détermination du sexe et les loci sexuels chez *Ae. albopictus*, espèce pour laquelle nous ne disposons que de peu d'informations, contrairement à *Ae. aegypti*. Enfin, nous avons combiné différentes méthodes de biologie moléculaire et d'ingénierie génétique afin de concevoir quatre souches de sexage génétiques, deux pour *Ae. albopictus* et deux pour *Ae. aegypti*, permettant une séparation automatisée des sexes sur la base de leur fluorescence. Enfin, nous nous sommes efforcés de proposer une méthode permettant de trier des mâles transgéniques ou non transgéniques afin de répondre à la demande de contextes locaux aux contraintes, légales notamment, différentes ⁹.

9 Notons toutefois que, si la stérilité des mâles relâchés est totale, les mâles génétiquement modifiés ne sont pas considérés comme des organismes OGM aux yeux de la loi européenne puisque ne répondant pas à la définition d'« organismes » car ne pouvant pas se reproduire. Cf. directive 2001/18/CE du Parlement européen et du Conseil du 12 mars 2001 relative à la dissémination volontaire d'organismes génétiquement modifiés dans l'environnement et abrogeant la directive 90/220/CEE du Conseil - Déclaration de la Commission.



2 Chapitre 1 : Comparaison des méthodes de séparation des sexes existant chez les diptères

2.1 Introduction au chapitre 1

En débutant ce projet, nous avons identifié les caractéristiques que nous souhaitions pour une méthode de sexage efficace chez les *Aedes*.

La première caractéristique que nous avons retenue, était d'avoir une séparation des sexes effectuée sur les premiers stades larvaires. En effet, le sexage au stade de nymphe, tel que réalisé actuellement dans les programmes opérationnels, implique d'élever les 4 stades larvaires mâles et femelles durant une semaine, les femelles entrant alors en compétition avec les mâles pour la nourriture et l'espace (Agnew et al. 2002). De plus, le sexage au stade nymphal peut conduire à l'émergence d'une partie des femelles adultes, causant une nuisance importante pour le personnel des usines de production de masse.

La deuxième caractéristique est de récupérer une part plus importante des mâles totaux et des mâles élevés. Actuellement, les méthodes mécaniques appliquées à des souches sauvages ne permettent de récupérer que 30% des mâles totaux à l'issue du tri des nymphes. Un taux aussi faible de recouvrement des mâles engendre des surcoûts en matière de nourriture et d'espace qui viennent s'ajouter à ceux occasionnés par le tri tardif. Aussi, il s'agit de leviers importants quant à l'amélioration du rapport coût-efficacité de l'élevage de masse.

Afin d'être compatible avec une utilisation opérationnelle, l'échantillon trié doit comporter moins d'1% de taux de contamination par des femelles (WHO et IAEA 2020). En effet, celles-ci présentant un risque de transmission vectorielle venant s'ajouter à la nuisance causée par les piqûres, cette limite est considérée comme le taux acceptable de contamination pour la Technique de l'Insecte Stérile. Dans un souci de développement d'une méthode de sexage qui soit utilisable dans d'autres modes de contrôle génétique, particulièrement avec la technique de l'insecte incompatible, ce taux devrait idéalement être réduit au maximum.

Toujours dans un souci d'opérationnalisation, la méthode de tri, si elle fait intervenir un outil mécanique, devrait être automatisée et permettre une vitesse de séparation compatible avec les besoins de la production de masse. Il s'agira alors de trouver un équilibre entre rendement, précision et vitesse.

Une autre caractéristique importante à nos yeux est de proposer une méthode de sexage durable, la moins nocive possible pour l'environnement. En effet, si nous souhaitons promouvoir la TIS comme une approche ciblée de lutte antivectorielle ne comportant pas ou peu d'impact sur la faune non-cible, les effluents des usines de production de masse ne peuvent être chargés en substances nocives pour ladite faune (et flore) non cible, tels que la dieldrine (Yamada et al. 2013) ou indésirables dans l'environnement, comme la tétracycline dans le cas des moustiques RIDL.

Enfin, nous souhaiterions développer des méthodes de sexage accessibles au plus grand nombre, que ce soit par les coûts requis, ou vis-à-vis de l'acceptabilité sociale et réglementaire de la méthode. Aussi, même si la transgénèse est un outil puissant permettant de développer des souches de sexage génétique, nous sommes conscients que les lâchers de mâles transgéniques ne sont pas acceptés par tous ni autorisés partout. Nous avons donc cherché des méthodes de sexage répondant à ces différentes contraintes.

Ces critères établis, nous avons étudié la littérature scientifique en recherche d'approches prometteuses. Afin d'élargir le champ des possibles, nous avons souhaité établir une comparaison des méthodes de sexage développées chez les diptères (*Diptera*, ordre d'insectes comprenant notamment les mouches, les syrphes, les taons, les moucheron et les moustiques) de manière plus générale. Des rapports centrés sur les moustiques ont déjà été dressés de nombreuses fois mais ne permettent pas, à notre avis, une vision globale (Gilles et al. 2014; Bernardini et al. 2018; Häcker et Schetelig 2018). En effet, alors qu'elle n'est encore qu'au stade d'essais pilotes de terrain peu étendus chez les moustiques (Bellini, Medici et al. 2013; Balatsos et al. 2021), la TIS est utilisée en agriculture à grande échelle depuis plusieurs dizaines d'années contre les ravageurs des cultures et les insectes nuisibles au bétail (voir par exemple Fanson et al. 2014; Enkerlin et al. 2017). Aussi, des méthodes de sexage, en particulier des souches de sexage génétiques, sont développées et utilisées de manière opérationnelle chez de nombreuses espèces cibles telles que la mouche méditerranéenne des fruits, *Ceratitis capitata* (Caceres 2002; Franz 2005).

Dans ce premier article, nous avons dressé un état des lieux des méthodes de sexage développées et employées chez les Diptères, ainsi que des perspectives d'adaptation de celles-ci aux moustiques vecteurs. Nous sommes partis du constat que chez toutes les espèces de Diptères ciblées opérationnellement par la TIS, à l'exception de *C. capitata*, le sexage se fait à un stade tardif (nymphe). Dans notre revue, nous avons donc distingué d'une part, les méthodes

de sexage développées permettant l'élimination des femelles au cours des premiers stades larvaires et, d'autre part, les méthodes permettant l'élimination des femelles plus tardivement. Celles-ci ont été listées dans des tableaux thématiques que nous avons souhaité les plus exhaustifs possibles. Finalement, chez les diptères vecteurs d'intérêt médical et/ou vétérinaire (moustiques, mouches tsé-tsé), nous avons dressé une comparaison du rapport coût-efficacité desdites méthodes de sexage par rapport à celles faisant actuellement référence pour l'espèce en question sur la base de sept critères chiffrés ou factoriels : i) le stade de développement auquel le tri est effectué, ii) le taux de recouvrement des mâles, iii) le taux de contamination par des femelles, iv) le temps de tri nécessaire à l'obtention d'un million de mâles, v) l'investissement initial requis par la technologie éventuellement impliquée, vi) les coûts de traitement additionnels (consommables, traitement des eaux usées etc.) et vii) la nature des insectes qui seront relâchés, lesquelles sont directement liées à leur acceptabilité vis-à-vis du public. Sur ce dernier point nous avons insisté sur l'importance de la prise en compte à la fois du cadre réglementaire des pays pour lesquels les méthodes de sexage et les programmes de lutte génétique sont développés, mais également de l'acceptabilité sociale de ces méthodes et programmes par le grand public. En effet, les campagnes d'information et de sensibilisation sont coûteuses et d'efficacité variable, et un défaut d'information peut conduire à une telle opposition que des programmes de lutte génétique ont dû, par le passé, être avortés (Panjwani et Wilson 2016).

Cet article (en anglais) a été publié dans *Trends in parasitology* en 2019, DOI : 10.1016/j.pt.2019.06.001.

2.2 Revue de la littérature : “Sex sorting for pest control: it’s raining men!”

Article publié dans *Trends in Parasitology* en 2019

Sex sorting for pest control: it’s raining men!

Célia Lutrat^{1,2,3}, David Giesbrecht⁴, Eric Marois⁵, Steve Whyard⁴, Thierry Baldet^{1,2}, Jérémy Bouyer^{1,6*}

¹ CIRAD, UMR ASTRE, F-34398 Montpellier, France.

² ASTRE, CIRAD, INRA, Univ Montpellier, Montpellier, France.

³ Université de Montpellier, Montpellier, France.

⁴ Department of Biological Sciences, University of Manitoba, Winnipeg, MB, Canada

⁵ CNRS UPR9022, INSERM U963, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université de Strasbourg, Strasbourg, France

⁶ Insect Pest Control, Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, International Atomic Energy Agency (IAEA), Vienna, Austria

* Correspondence: jeremy.bouyer@cirad.fr (Jérémy Bouyer)

Key words: Diptera, sex sorting, genetic pest and vector control, mass rearing

Abstract

In the pursuit of better pest and vector control strategies, attention returns to an old proven technology, the Sterile Insect Technique (SIT) and related insect population suppression methods. A major obstacle for any of these approaches that involves the release of sterile males is the separation of males from females during the mass rearing stage, in order to improve the cost-efficiency of these methods and to prevent the release of biting and disease-vectoring females. This review describes recent sex sorting developments in dipteran flies with an emphasis on assessing the suitability of these methods for large-scale rearing of male vectors for mass release. As the sorting stage is of economic importance, we divided sex-sorting methods accordingly, including both dipteran vectors and plant pests to expand the scope of possibilities.

Sexing is an obstacle in genetic pest control programs

Disease-vectoring Diptera are responsible for millions of parasitic and viral infections in humans and livestock annually [1]. As a more environmentally-friendly alternative to broad-spectrum chemical insecticides, many researchers have been inspired by Knipling's proposal in 1955 [2] to develop methods of releasing sterile males to reduce pest insect populations. This so-called **Sterile Insect Technique** (SIT, see glossary) has proven effective for a variety of insects, but its implementation is slowed down by the necessity of removing females before release in the case of mosquitoes. In addition to minimizing the health and economic risks posed by released females, models and trials have also shown, that releasing only males was much more cost-efficient than releasing both sexes [2,3]. These cost savings may arise from either reduced cost in mass-rearing the insects and/or in field performance, where released males will not be distracted by co-released females.

Other genetic control methods, including **Release of Insects carrying a Dominant Lethal** (RIDL) and the *Wolbachia*-based **Incompatible Insect Technique** (IIT), also require consistent sexing methods. Models show that the release of only a small proportion of *Wolbachia*-infected females could lead to population replacement instead of eliminationⁱ. In mosquitoes, whose females cause nuisance and transmit pathogens very little female contamination can be tolerated in any genetic control strategy.

In these applications, sex sorting, or “sexing”, refers to the separation of males from females, and more specifically the removal of females. Sexing can rely on mechanical separation of the sexes based on natural or engineered sexually dimorphic differences, or sexing can use more complex technologies to modify gene expression and conditionally masculinize or kill females during development. Overall, sex-separation strategies need to meet several criteria, summarized as ‘the 7 Ses’ by Papathanos and colleagues [4]: small, simple, switchable, stable, stringent, sexy and sellable.

Sexing developments have been reviewed numerous times [5–8], focusing mostly on particular species or genera, as well as on the engineering methods employed. Here, we aim to review all sexing methods developed recently in Diptera. We have chosen not to focus solely on vector species, since there has been a number of interesting technical developments in other dipteran insects that could complement technologies for mosquitoes and other disease vectors. With an emphasis on an operational perspective of sexing methods, we explored advantages and disadvantages of each innovation in a mass-rearing context compared to what is currently being

done. Our survey starts in 2003, as the most recent comprehensive review of all available insect sexing strains was published in 2002 [9].

Current sex-sorting status in Diptera mass releases

Most current-day genetic control programs target pest flies for which sex-sorting is not always an option. For instance, the Australian and Thai *Bactrocera* mass-rearing facilities produce tens of millions of fruit flies per week without removing females [10,11]. Similarly, the screwworm *Cochliomyia hominivorax* has been targeted for years by weekly releases of 15 million sterile flies at the Panama-Colombia border (reviewed in [12]), without mass sex-separation strategy. With this scale of production, a sexing method at the pupal stage is being considered [13], with predicted savings of over USD 1 million per year. To the authors' knowledge, the Mediterranean fruit fly *Ceratitidis capitata* and the Mexican fruit fly *Anastrepha ludens* are amongst the only flies of agricultural importance for which sexing strains are used in mass-rearing plants around the world, improving greatly their release efficiencyⁱⁱ [14].

Where sex-sorting is mandatory, time-consuming approaches are often the only available option. *Culicinae* mosquitoes (including *Aedes* and *Culex* genera) exhibit size **sexual dimorphism** as pupae. Consequently, *Aedes* mosquitoes have been and are still mechanically separated based on pupal size [15]. In Italy, a SIT trial to control *Ae. albopictus* was initiated in 2005 [16]. Over a four-year period, 2 million males were sex-sorted with metal sieving plates before release. This method recovered only 26-29% of the males, and female contamination was still about 1.2%. In China, Fay-Morlan glass sorters also based on size enabled release of more than 197 million *Ae. albopictus* males in 2016 and 2017 for a combined IIT/SIT trial in two river island settings, with greater male recovery and female contamination about 0.3% [17]. Similar sexual dimorphism-based methods are being deployed for Dengue control on La Reunion Island in a trial against *Ae. albopictus*ⁱⁱⁱ and in French Polynesia against *Ae. aegypti* and *Ae. polynesiensis*^{iv,v}. In *Anopheles* mosquitoes, the current sex separation method is based on manual pupal identification, which allows sex-sorting of only 500 pupae per hour (reviewed in [15]). The working time is therefore very high, and the number of mosquitoes necessary for a program is difficult to reach. In tsetse flies, both sexes feed exclusively on blood and can vector of trypanosomes. Release of sterile trypanocide-treated males demands low-throughput manual separation of chilled adults or use of pupal **protogyny** [18,19]. During the elimination

Box 1. The sex determination pathways in Diptera

Sexual dimorphism in insects is controlled by diverse mechanisms to determine sex and differentiate sexual morphologies. **Figure I** (in Box 1) illustrates what is known about dipteran sex-determination pathways.

Sex determination mechanisms in Diptera range from what is familiar to many: dosage compensation of X and Y chromosomes in *Drosophila melanogaster* [83], to the homomorphic chromosomes of *Aedes aegypti*, in which transcription of the autosomal gene *nix* appears to be the maleness (M) factor initiating the determination of male mosquitoes [84]. Rapid evolution of these factors has produced a high degree of variation in the function of the genes involved, with marked differences described between closely related species [85].

What is common to all Diptera studied to date is the central regulator *doublesex* (*dsx*), a gene with female-specific exons and transcripts that have been targeted to induce female sterility or lethality [39,86,87]. *Dsx* is a transcription factor in the *doublesex/mab-3 related* gene family. Recently reviewed by Kopp [88], this gene family appears to be conserved in arthropods, but the diversity of roles that *dsx* plays in other lineages [89] suggests that it has been frequently coopted to new roles. Briefly, male or female *dsx* is expressed in tissues that require sexual identity. In *Drosophila melanogaster*, *dsx* is regulated by alternative splicing of *transformer* (*tra*), another conserved gene that has been successfully targeted for female lethality, which in turn is regulated by *sex-lethal* (*sxl*) [83]. In the muscids studied to date only *tra* is known to be an upstream regulator of *dsx* [85]. In the mosquito species studied so far, only the male determining factors *nix* (*Aedes aegypti*) [90], *yob* (*An. gambiae*) [40] and *guy1* (*An. stephensi*) [91], are known or presumed regulators of *dsx*, but there may be other upstream factors regulating *dsx*. A role for *tra-2* in mosquito sperm development has been shown, resulting in reduction of female offspring in the second generation after RNAi knockdown [38]. Intriguingly, putative *tra/tra2* orthologues appear to be highly conserved in mosquitoes [38], but *tra/tra2* has not been implicated as a regulator of *dsx* in any mosquito, although *tra-2* is involved in ovarian development in *Ae. albopictus* [92]. The M-factor in tephritid flies has recently been described and shown to regulate *tra*'s auto-regulatory positive-feedback loop [93]. Similarly, in two phlebotomine sandflies *tra* has been recently identified and shown to also be self-regulating [94]. There will likely be many new opportunities to distort sex ratios by discovering players in the diverse pathways that have evolved in Diptera.

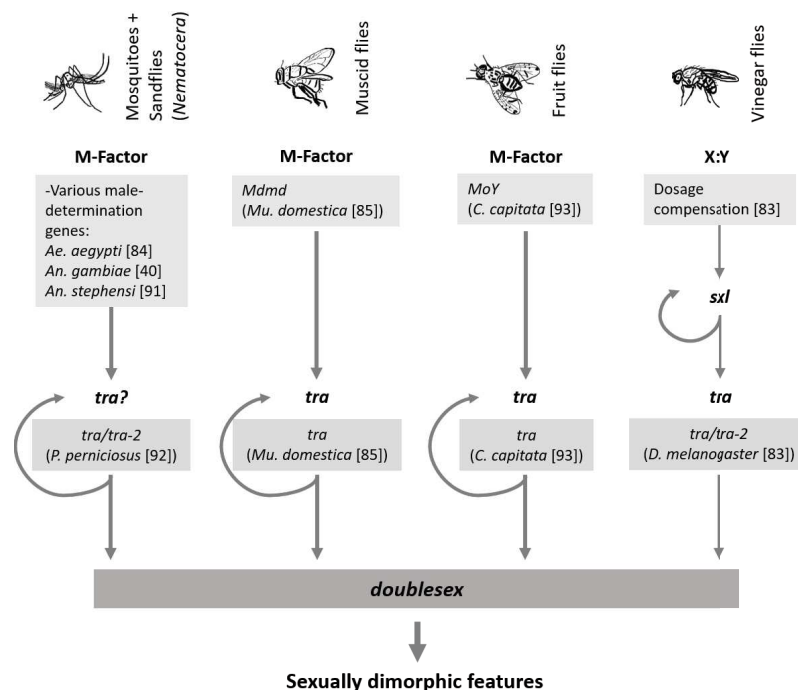


Figure I in Box 1. Sex determination pathways in Diptera.

program of *Glossina palpalis gambiensis* in Senegal, 5 million males were produced using a protogyny-based sorting method [19].

Sex-sorting at the pupal or adult stage requires rearing and feeding both male and female larvae, the latter being discarded to retain only males. Moreover, increasing densities of larvae would reduce fitness and slow down development [20]. Therefore, removal of females early in development is advantageous to avoid competition between males and females [21]. When rearing millions of flies, early sex-separation translates into major savings in time, labour and money and also decreases the risks of mosquito females feeding on workers in the mass-rearing facility.

For these reasons, we will review sex-sorting methods by distinguishing two categories: i) removal of females during the first larval stages and ii) removal of females later in development.

Sex separation methods in early larval stages

Disruption of the sex-determination pathway has been explored in many pest insects, with the goal of identifying genes that are essential for female development. The *Drosophila melanogaster* system has been used as a template for inquiry of other sex-determination cascades. However, even within closely related species, exploration of the primary signal and downstream factors has revealed major differences. **Box 1** reviews our current understanding of primary sex-determination signals and downstream factors in Diptera. These genes can be manipulated to produce male-biased populations early in the insect's development (**Table 1**). Although only a few of them have actually been applied to mass rearing conditions, we classified these innovations according to their outcome, as an indicator of their potential efficiency.

Achieving sex-ratio distortions

Theoretically, the most cost-efficient way of producing a male-only population is to produce male only eggs. This was achieved in *C. capitata*, with a **transgenic** strain expressing a double-stranded RNA targeting *transformer* (see **Figure S1** for an overview of the genetic methods discussed) under a heat-shock promoter. Following a transient heat-shock, it produced offspring composed of 95% males and 5% intersex individuals [22]. In this study, most genetic females

(XX) developed as phenotypic fertile males. Another promising sex-ratio distortion system is under development in *Anopheles* mosquitoes [23–25]. However, its expression has not yet been rendered conditional, a prerequisite for its use in making stable sexing strains.

Table 1- Early acting methods for sexing in Diptera since 2003

Outcome	Technique*	Sorting mechanism	Species	References
Sex ratio distortion	Interfering RNA	Silencing of transformer (tra) and transformer-2 (tra-2)	<i>C. capitata</i>	[22]
Sex tagging	transposase-mediated plasmid integration	RFP or GFP marker + COPAS	An. gambiae, An. arabiensis	[28–30]
		tTA system using <i>tra</i> intron and fluorescent marker	<i>L. cuprina</i>	[31]
Female lethality	transposase-mediated plasmid integration (piggybac)	tTA driving expression of pro-apoptotic transgene	<i>A. suspensa</i> , <i>C. capitata</i> , <i>L. cuprina</i>	[32–34]
	Interfering RNA	Silencing of <i>tra</i> and/or <i>tra-2</i>	<i>B. dorsalis</i> , <i>Ae. aegypti</i>	[37,38]
		Silencing of <i>dsx</i>	<i>Ae. aegypti</i>	[39]
	mRNA injection	Overexpression of <i>Yob</i> by injecting mRNA	An. gambiae, An. arabiensis	[40]
Intersex females	transposase-mediated plasmid integration (piggybac)	Plasmid injection causes overexpression of <i>Yob</i> under <i>vasa2</i> promoter	An. gambiae	[41]
	CRISPR-Cas9 knockdown	Double knockdown of <i>tra-2</i>	<i>A. suspensa</i>	[42]

*Techniques are detailed in Figure S1.

Automated sex-separation in early larval stages

The second most cost-efficient way to produce a male-only population would be to separate sexes early in development, either by conditionally killing the females or by removing them using sex-specific differential expression of fluorescent marker transgenes.

Catteruccia *et al.* [26] established that the sperm specific β 2-tubulin promoter driving the expression of enhanced green fluorescent protein (EGFP) allows the identification of male *An. gambiae* mosquitoes as 4th instar larvae, as well as the sorting of male vs. female larvae using a Complex Parametric Analyser and Sorter (COPAS) flow cytometry machine. While this strategy enabled automated sorting in late larval stages, Magnusson *et al.* [27] developed another sex sorting marker acting as early as the first instar stage. Males of this strain show strong EGFP expression from a reporter gene harboring a female-specific *dsx* intron. This strain allowed Marois and colleagues [28] to optimize sex-sorting at high flow rate by COPAS. This study showed that pure male populations of 20,000 neonate larvae could be generated in 30 minutes, a rate compatible still under the production scale required for mass rearing. Moreover, a GFP-expressing transgene inserted on the *An. gambiae* Y chromosome has been isolated, and additional strains were subsequently derived that expressed red fluorescence [29]. In this work, Bernardini and colleagues observed that the GFP strain enabled COPAS-based sorting of virtually 100% pure male mosquitoes. In locations where the release of transgenic **organisms** must be avoided, two sexing strains (one carrying a marked X chromosome, the other a marked Y) could be used in crossing-sorting schemes that generate a pure population of non-transgenic males (**Figure 1**). Of note, Bernardini *et al.* [30] were able to introgress one of their fluorescence-expressing Y chromosomes from *An. gambiae* to *An. arabiensis*, opening the possibility of automated sorting to other members of the *An. gambiae* species complex. This *An. arabiensis* strain is presently under testing in mass-rearing conditions at the FAO-IAEA Insect Pest Control Laboratory.

Sexing is equally important for livestock pests; in the sheep blowfly *Lucilia cuprina*, Li and colleagues developed a transgenic strain with a reporter fluorescent marker overexpressed in female larvae, enabling sex-sorting of early larvae [31]. The tetracycline-repressible marker expression was female specific due to the splicing of a *tra* intron, highlighting the fact that many sex determining genes may prove useful in the development of new sexing methods.

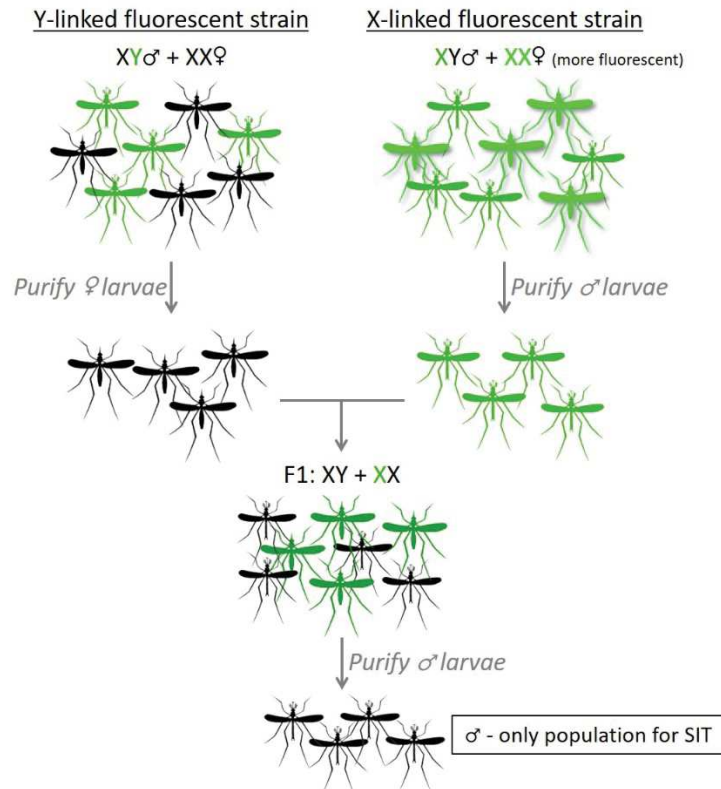


Figure 1. Principle of using two transgenic sexing strains to generate a population of non-transgenic males. Two transgenic strains are employed: one expresses a fluorescent marker from the Y chromosome (only males are transgenic), the other from the X chromosome (XX females are more fluorescent than XY males). Fluorescence-based automated sorting allows the production of a population of wild-type females from the first line and of hemizygous fluorescent males from the second. These are crossed together. In their F1 progeny, males are non-fluorescent as they inherited a wild-type Y chromosome from their fathers and a wild-type X chromosome from their mothers, whereas their sisters are fluorescent. A new round of automated selection allows the purification of a male-only, non-transgenic population.

Conditional female death early in development

Conditional female lethality is commonly used in order to generate sexing strains. Several of these methods are based on female-specific expression of a tetracycline transactivator (tTA) driving the expression of a pro-apoptotic transgene [32–34]. In these three studies, insects showed normal hatching rates and sex ratios when reared in media containing tetracycline, but a 50% hatching rate and male-only generations were obtained when tetracycline was absent. In *Anastrepha suspensa*, the Caribbean fruit fly, Schetelig and colleagues hatched 30,000

transgenic eggs and obtained 100% males, suggesting that a mass-rearing application would be possible [33]. Recently, the *C. capitata* transgenic strain, FSEL#32, was compared to the current reference VIENNA 8 [35] in a mass rearing context. FSEL#32 exhibited higher productivity and similar mating competitiveness, despite having lower pupal weights [36].

RNAi techniques have been tested to cause female lethality by silencing female-specific exons of sex-determination genes. In *B. dorsalis* embryos, RNAi against transformer and transformer-2 (*tra*, *tra-2*) resulted in 96% of males and 4% of sterile, non-mating, intersex individuals, though the hatching rate dropped to 15.6% [37]. A similar silencing of *tra-2* in *Ae. aegypti* larvae, either by soaking them in a dsRNA mixture or by feeding bacteria expressing dsRNA, led to a survival rate of about 50% and a sex bias towards males of 97.6% [38]. The female isoform of *doublesex* (*dsx*) has also been targeted in *Ae. aegypti*. Survivors were 97% males, the remaining females being sterile and mostly unwilling to blood-feed [39].

While most conditional female lethality approaches have focused on disrupting female-associated genes, Krzywinska *et al.* [40] experimented an alternative approach: by inducing ectopic expression of Yob, a gene that may facilitate male-specific splicing of *dsx* in *An. gambiae* and *An. arabiensis*, they observed that all Yob mRNA-injected individuals that survived were indeed male, as females injected with Yob mRNA died during development.

Generating males and intersex individuals

A less cost-effective approach to early and complete sex-sorting would be to generate a population comprised of males and partially masculinized females. Females produced by these methods are usually sterile and, in mosquitoes, non-biting. These females would still compete with males for food and space in the rearing facility, but the released population would be more efficient in the field.

Following their previous promising results with Yob-mediated female killing [40], Krzywinska and Krzywinski produced transgenic *An. gambiae* that overexpressed Yob in the germline [41]. This strain produced a male-biased population with 75% males and 25% masculinized females of decreased viability, complete infertility and various levels of intersexual morphological defects, indicating that transgenic construct optimisation may soon lead to the full conversion of genetic females into functional males. More recently, Li and Handler injected CRISPR-Cas9 components to knock down expression of *transformer-2* in *A. suspensa* eggs, producing 42%

males, 47% intersex individuals and 11% of females, of which only 13% survived to adulthood [42]. This opens the possibility to develop a transgenic conditional sexing system in this species.

Remarkably, conversion of genetic females into phenotypic males was recently achieved in *Ae. aegypti* [43] using the male factor *Nix*. A final step to convert these encouraging results into sexing strains producing only pure males would be to develop a system for conditional expression of the male factors.

Late-acting sex separation methods

Removal of females at late larval or pupal stage requires more space and maintenance in a factory setting, which can increase the cost of area-wide control programs. However, such methods are used in many SIT programs, and are still being developed (**Table 2**).

Automated sex-separation in late developmental stages

Automated sex separation of pupae has been achieved in several plant pests such as *Bactrocera dorsalis*, *B. carambolae*, *Zeugodacus cucurbitae* and *A. ludens* using Genetic Sexing strain (GSS) with pupal colour mutation [44–47]. Sorting by this method was nearly 100% efficient and these strains showed good competitiveness [45,48,49] in field trials. Because the mutations were associated with chromosomal translocations (see **Figure S1**), these strains are semi-sterile. Where colour mutations are difficult to find or manipulate, late-stage sexing can be achieved using fluorescent marker proteins under the control of sex-specific promoters. Markers linked to the β -2-tubulin gene promoter, allowed good sex separation in late larvae or pupae in different mosquito vectors like *An. stephensi*, *Ae. aegypti* and *An. arabiensis* [26,50,51] even though automation by COPAS was low in throughput, due to the relatively large size of half-grown larvae and their strong autofluorescence. In *C. capitata*, Alphey and colleagues produced two transgenic sexing lines with strong fluorescence at the late larval stage with correct sorting in 97.5% to 100% of pupae screened (n=396 and n=235 pupae, respectively) [52]. Developing automated sorting methods for each of these strains is an important pre-requisite for sex separation at operational scale.

Non-transgenic methods, based on imaging technologies are also in development, and could prove valuable in locations where genetic modification is rejected. In the tsetse flies *Glossina pallidipes* and *G. p. gambiensis*, near infrared (NIR) imaging allowed sex separation of wild-

type (WT) pupae based on sexual dimorphism with 80-100% accuracy [53,54]. Similarly, an automated pupal size estimator measuring lateral profile areas from Grupo Tragsa (Spain) has been tested on different *Anopheles* and *Aedes* species and strains [55]. Ensuring <1% female contamination, *An. arabiensis* could not be sorted efficiently, but *Aedes* sorting resulted in 65 and 98% of male recovery, surpassing the performance of sorting plates.

Bellini and colleagues tested a very different approach in *Ae. albopictus*: over several generations, they selected males and females to accentuate differences in pupation time. After ten generations, they produced a strain in which the 28% earliest pupae were 99% male [56], which is similar to sieving plates' efficiency. This method illustrates that other phenotypes could serve as future targets for genetic-based sexing approaches.

Conditional female death in late developmental stages

Female lethality in late larval to adult stages has also been considered in several species. A widely used conditional method involves the tetracycline transactivator (tTA) either controlling the expression of a lethal transgene or itself triggering lethality. Fu and colleagues successfully developed such a *C. capitata* strain yielding full female lethality by using sex-specific *tra* intron splicing to control the expression of the lethality construct [57]. The same system allowed establishing a *B. oleae* RIDL strain carrying sex-specific fluorescence, genetic sterility and conditional female-lethality [58]. In cage tests, this strain efficiently eliminated a WT population using weekly releases of transgenic males. Female-specific splicing of *transformer* was also used in *L. cuprina* [59] and in *C. hominivorax* [13] in combination with proapoptotic genes. One of the *C. hominivorax* strains is currently under evaluation for a mass-rearing program [12].

In several mosquito species, the female-specific expression of *actin-4* was exploited to conditionally express lethal effectors. As *actin-4* is expressed in female indirect flight muscles, the obtained phenotype is flightless females, not death. Such a system was developed in *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* and *An. stephensi* with full penetrance of the flightless phenotype in absence of tetracycline [60–62]. Although this system seems effective in laboratory studies, it has been suggested that tetracycline affects gut microbiota and impairs *An. stephensi* fitness, and may render inadvertently released females more susceptible to *Plasmodium falciparum* infection [63].

Table 2- Late acting methods for sexing in Diptera since 2003

Outcome	Technique*	Sorting mechanism	Species	References
Visual separation	Chromosomal translocation to Y-chromosome	Pupal colour dimorphism	<i>Z. cucurbitae</i> , <i>B. dorsalis</i> , <i>B. carambolae</i> , <i>A. ludens</i>	[44–46]
	transposase-mediated plasmid integration (<i>piggyBac</i>)	Fluorescent markers integration near <i>β-2-tubulin</i> gene	<i>An. stephensi</i> , <i>Ae. aegypti</i> , <i>An. arabiensis</i>	[26,50,51]
		Fluorescent markers on Y chromosome	<i>C. capitata</i>	[52]
	Near infrared photography	Pupal dimorphism	<i>G. palpalis</i> , <i>G. gambiensis</i> , <i>G. pallidipes</i>	[53,54]
	Computer vision analysis	Pupal dimorphism	<i>Ae. albopictus</i> , <i>Ae. aegypti</i> , <i>Ae. polynesiensis</i>	[55]
	Protandry selection	Collecting first pupations	<i>Ae. albopictus</i>	[56]
Female lethality	transposase-mediated plasmid integration (<i>piggyBac</i>)	Tetracycline-repressible system: Sex-specific splicing of <i>transformer</i> + lethality effector	<i>C. capitata</i> , <i>B. oleae</i> , <i>L. cuprina</i> , <i>C. hominivorax</i>	[13,57–59]
		Tetracycline-repressible system: Female specific <i>actin-4</i> regulatory region	<i>Ae. aegypti</i> , <i>Ae. albopictus</i> , <i>An. stephensi</i>	[60–62]
	Chromosomal translocation to Y chromosome	Dieldrin resistance	<i>An. arabiensis</i>	[64,69,70]
	Chromosomal translocation to male-locus	Dieldrin resistance	<i>Ae. albopictus</i>	[71]
	Infected blood meals	Ivermectin insecticide in blood meals	<i>An. arabiensis</i>	[72]
	Cas-9 and CRISPR guides in different lines	Simultaneous knockdown of <i>β-tubulin</i> and <i>sex lethal</i>	<i>D. melanogaster</i>	[73]

*Techniques are detailed in Figure S1.

In 2012, Yamada and colleagues developed the ANO IPCL1 strain, an *An. arabiensis* strain in which the dieldrin resistance allele was translocated to the Y chromosome so that males are resistant to dieldrin and females susceptible [64]. This strain presents low productivity, male recovery being 13% of the initial number of eggs [65–67] with a risk that released males spread highly toxic dieldrin into the environment [68]. However, this strain has been backcrossed into different *An. arabiensis* genetic backgrounds [69,70]. In 2018, Lebon and colleagues developed a similar strain in *Ae. albopictus*, TiCoq, with a sex-sorting efficiency of 98% [71].

Given that only female mosquitoes blood-feed, toxicant-infused blood meals have also proven effective for sexing [72]. With ivermectin provided at 7.5 ppm in blood meals, all *An. arabiensis* females died after 4 days without compromising the males. Ivermectin is however rejected in female feces which causes the contamination of all rearing equipment, a major shortage to use this system in mass-rearing conditions.

Recently, Kandul and colleagues described a system producing 100% sterile males in *D. melanogaster*, females dying mainly at the late larval stage [73]. The strategy involves crossing a strain expressing Cas9 enzyme with another expressing β -tubulin (β -*tub*) and sex lethal (*sxl*) CRISPR targets. This study sets a proof-of-principle that it is possible to get both sterilization and sex-sorting in the F1 generation, keeping mating efficiency similar to wild-type. However, this approach would require another perfect sexing method in the starting generation to sort males and females to establish the correct cross. Moreover, the researchers propose to release eggs so that the female larvae compete for food in density-dependent species but it is hardly possible in *Aedes* mosquitoes that have multiple small breeding sites and such strains cannot be used for pests whose larvae damage crops [74].

Elements for future successful sex-sorting

Acceptability of sex-sorting technologies by public and governments

While SIT has been used in pest control for 60 years, it is not widely understood by the public, especially with respect to its ability to control vector populations. On La Reunion island, where a trial is planned against *Ae. albopictus*, a poll showed that only 34% of the island inhabitants knew about the techniqueⁱ. However, when informed on the SIT principle, 61% supported the release of wild-type, irradiated sterile males. Releases of **genetically modified** (GM) mosquitoes has historically faced more opposition than using sexually dimorphic traits: some

had to be cancelled due to important public concerns, all related to lack of information and communication [75]. Antonelli and colleagues found that depending on the terminology used to present transgenic mosquitoes, public opinion varies [76]. Consequently, even though their genetic status is of less relevance when releasing sterile insects (see ‘organism’ in glossary), the release of strains obtained by classical mutagenesis might appear less worrisome than transgenic strains. Concerns have also been raised by the scientific community itself when Oxitec released transgenic mosquitoes for a field trial in the Caribbean [21,75,76]. Similarly, several governments are opposed to release of genetically modified insects on their territory. Scientists must take these concerns into account when developing a new technology.

A broad range of promises for sexing vector Diptera

For screwworm eradication programs, Concha and colleagues calculated that production expenses represent 20% of total program costs [13]. In **Figure 2**, we compare the proposed production methods to the current standard for seven key parameters that affect costs and feasibility: sorting stage, male recovery rate, female contamination rate, sorting speed, initial investment, treatment cost and strain characteristics. Sorting stage, male recovery rate and female contamination rate together influence the number of insects to be reared, and therefore the cost and space required to achieve the desired efficiency. Male quality (survival and competitiveness) could also affect efficiency. Here, we assume that it is equivalent in all methods. Sorting speed, whether manual or automated, can be decisive for feasibility in a mass-rearing context.

For instance, *Anopheles* mosquitoes are currently sorted manually at a speed of 500 insects/hour/trained worker. Sorting one million males would therefore take about 4,000 hours for a single operator. We also considered the initial investment of sorting device and the cost of sorting supplies, if any. For example, imaging and sorting devices represent a significant initial investment. Methods causing female lethality avoid initial costs but may involve daily costs of chemical treatment (dieldrin, tetracycline) as well as the treatment of contaminated rearing water. Finally, since strain characteristics can influence their social and legislation acceptability, we included this parameter by considering that wild-type strains would be preferable to conventional GSS and transgenic strains.

In mosquitoes, since females cause nuisance and transmit pathogens, scalable sex-sorting methods must achieve greater than 99% female removal. Accordingly, for mosquitoes, Figure 2 covers strategies with female contamination rate <1%.

Figure 2 shows that there is no perfect solution that could decrease all costs and avoid a large investment while being readily acceptable by the public and legislators. Most early sex-sorting methods and many late-acting ones rely on transgenic technologies. These are promising in terms of rearing cost-efficiency, but their upscaling might be restricted by negative public perception or regulatory prohibitions. Pupal sorters for *Aedes* mosquitoes [55] and NIR imaging for tsetse flies [54] also appear as promising approaches for these species, though their speed and cost being currently prohibitive. In *Anopheles* mosquitoes, not amenable to such approaches, the crossing scheme to obtain WT males as presented in **Figure 1** might help overcome this obstacle. Classical GSS similar to pupal colour traits in flies [44–46] might be useful for automated sorting based on known mutant alleles such as *stripe* [77] or *red-eye* [78], when transgenic approaches must be avoided. Recently, Ndo and colleagues isolated a temperature-lethal mutation [79] that could also be used for building a GSS in *Anopheles*. In situations where transgenesis is not a problem, use of tTA driving expression of a pro-apoptotic transgene was demonstrated to cause female death in early larval stages in several plant and livestock pests [32–34] and could be investigated for sexing vector species.

Here, late sex-sorting was penalized, while for approaches such as RIDL, it is a desired characteristic so that released female larvae compete for food and space with wild larvae before dying. Moreover, RIDL systems would be more efficient than conventional SIT for the same number of released insects if the same competitiveness could be achieved [80]. Similarly, sex ratio distortion strains carrying X chromosome-shredding systems [24,25] were not extensively discussed in this review since they result in non-conditionally male biased populations. However, such systems have proven to be very efficient for genetic control in large cage trials [81]. Provided the strains can be maintained in a mass-rearing facility, repeated releases could be 16-3,000 times more efficient than SIT and 2-70 times than RIDL [82].

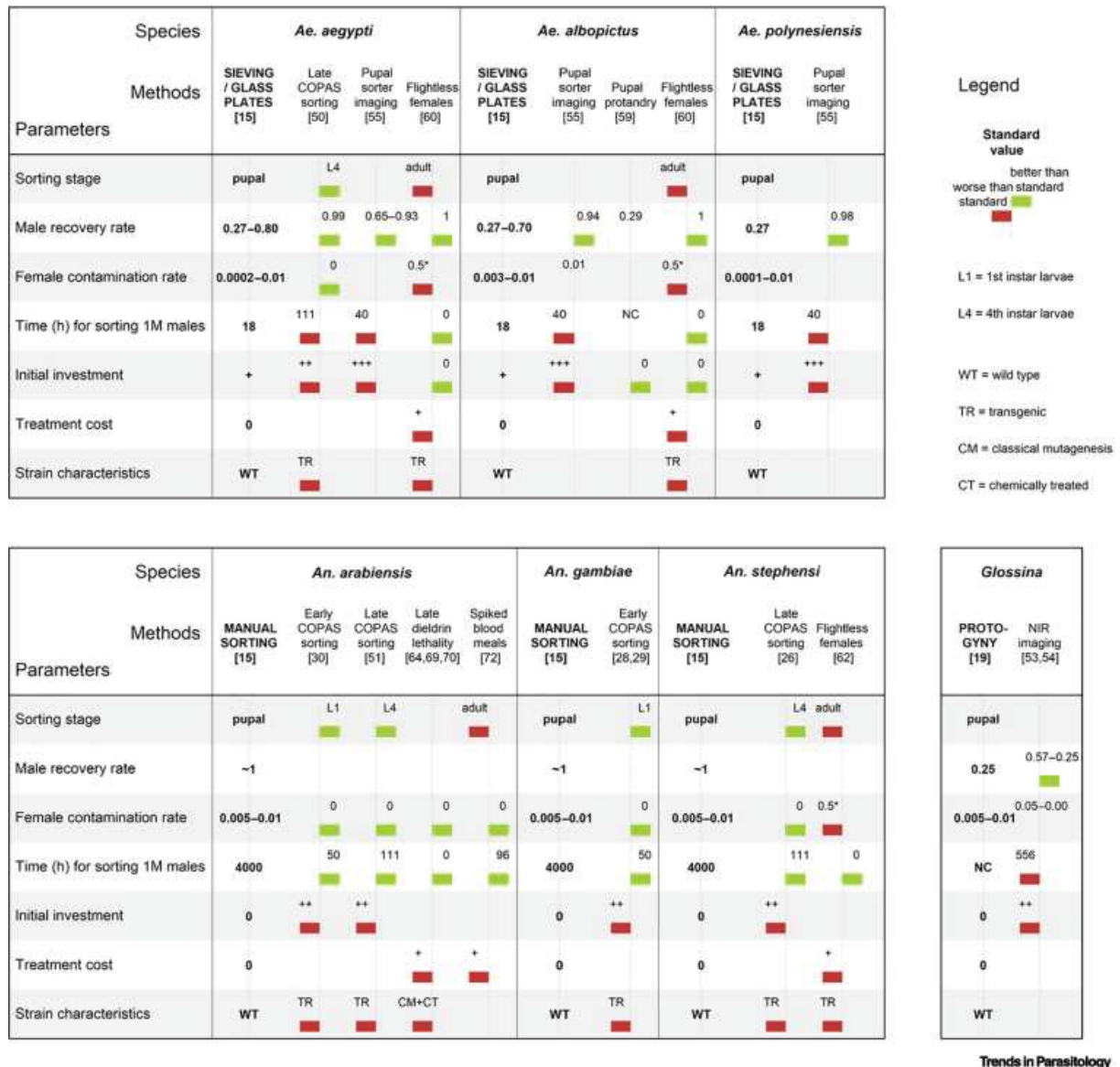


Figure 2. Efficiency and cost of the reviewed sexing methods compared to the currently used ones in vectors. For each species, the method indicated in bold and its parameter values is the current standard. Other methods developed for the same species are compared point to point to the standard with green rectangles when performance is improved, or red rectangles when it is decreased. No rectangle means that the value is comparable to the reference. Values are indicated above the rectangle or on the middle line when they differ from the reference. All values are from the literature. Time in hours is calculated for one device or one operator sex-sorting 2 million insects for 1 million males. Investment is given in orders of magnitude: ‘+’ being 10^3 – 10^4 , ‘++’ being 10^5 and ‘+++’ being 10^6 . Treatment cost is given as presence (‘+’) or absence (‘0’). Abbreviations: L1 = 1st instar larvae, L4 = 4th instar larvae, WT = wild type, TR = transgenic, CM = obtained by classical mutagenesis, CT = chemically treated, NC = non-communicated, *Glossina* = *Glossina p. gambiensis* and *Glossina pallidipes*. See also 15., 19., 26., 28., 29., 30., 50., 51., 53., 54., 55., 59., 60., 62., 64., 69., 70., 72..

Concluding remarks

Sexing Diptera has received a lot of attention over the past 15 years. Proposed methods include early and late sexing with variable outcomes in terms of sorting efficiency. Other parameters including sorting technology and treatment cost as well as strain characteristics influence their feasibility and acceptability by the public and governments. To enrich the toolbox for vectors, recent developments in pest sexing are a valuable source of inspiration. Further research is needed on theoretical aspects of sex determination and practical development of sexing strains to foster progress in genetic vector control programs, Novel methods will need to meet sorting efficiency but also social and regulatory acceptance criteria (see Outstanding Questions).

Outstanding Questions

What are the other factors involved in sex determination in Diptera, and how can we use them for building new sexing strains? For species with highly repetitive genomes, can long-read assemblies help us to find new targets?

Are next-generation pupal sorters for *Aedes* mosquitoes and tsetse flies scalable alternatives to the current sexing methods?

High-throughput sexing of 1st stage larvae by COPAS fluorescence recognition was successfully achieved in *An. gambiae*. Can it be applied to other *Anopheles* mosquitoes with the same efficiency? How to transfer this technology to other Culicidae that are quite different genetically?

How are public opinion and country laws going to turn in coming years regarding transgenic insect releases? Should such approaches be continued or abandoned?

Acknowledgements

We would like to thank Konstantinos Bourtzis for his valued advice on this review. His expertise on GSS was of great help. This project received funding from the European Research Council under the European Union's Horizon 2020 research and innovation program (grant agreement no. 682387—REVOLINC). This article reflects only the authors' views and the agency is not responsible for any use that may be made of the information it contains.

Resources

ⁱ National Environment Agency, International Atomic Energy Agency, Environmental Health Institute, Impact assessment on the release of X-ray or similar treated Wolbachia-Aedes mosquitoes for suppression of the urban Aedes aegypti mosquito population, <https://www.nea.gov.sg/docs/default-source/resource/impact-assessment-report.pdf>

ⁱⁱ DGSV, SAGARPA, SENASICA, *Informe Anual 2016. Programa Operativo Moscafrut: produccion de material biologico e investigacion basica y aplicada*, https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/199588/5__Informe_anual_Ejecutivo__2016.pdf

ⁱⁱⁱ <http://www.ipreunion.com/saint-leu-actualites/reportage/2019/01/23/nouvel-outil-pour-lutter-contre-les-moustiques-technique-de-l-insecte-sterile-la-nouvelle-arme-contre-la-dengue,96845.html>

^{iv} https://www.tahiti-infos.com/L-experience-des-moustiques-steriles-a-Tetiaroa-est-concluante_a146430.html

^v https://www.tahiti-infos.com/Tahiti-adopte-la-methode-Wolbachia-pour-combattre-la-dengue_a178552.html

^{vi} <http://data.europa.eu/eli/dir/2001/18/oj/fra>

References

- 1 Kassebaum, N.J. *et al.* (2016) Global, regional, and national disability-adjusted life-years (DALYs) for 315 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE), 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet* 388, 1603–1658
- 2 Knipling, E.F. (1955) Possibilities of Insect Control or Eradication Through the Use of Sexually Sterile Males. *J. Econ. Entomol.* 48, 459–462
- 3 Rendón, P. *et al.* (2004) Medfly (Diptera:Tephritidae) Genetic Sexing: Large-Scale Field Comparison of Males-Only and Bisexual Sterile Fly Releases in Guatemala. *J. Econ. Entomol.* 97, 1547–1553
- 4 Papathanos, P.A. *et al.* (2009) Sex separation strategies: past experience and new approaches. *Malar. J.* 8 (suppl. 2), S5
- 5 Alphey, L. (2014) Genetic Control of Mosquitoes. *Annu. Rev. Entomol.* 59, 205–224
- 6 Gilles, J.R.L. *et al.* (2014) Towards mosquito sterile insect technique programmes: Exploring genetic, molecular, mechanical and behavioural methods of sex separation in mosquitoes. *Acta Trop.* 132, S178–S187
- 7 Bernardini, F. *et al.* (2018) Molecular tools and genetic markers for the generation of transgenic sexing strains in Anopheline mosquitoes. *Parasit. Vectors* 11, 660
- 8 Häcker, I. and Schetelig, M.F. (2018) Molecular tools to create new strains for mosquito sexing and vector control. *Parasit. Vectors* 11, 645
- 9 Robinson, A.S. (2002) Mutations and their use in insect control. *Mutat. Res. Mutat. Res.* 511, 113–132
- 10 Fanson, B.G. *et al.* (2014) A review of 16 years of quality control parameters at a mass-rearing facility producing Queensland fruit fly, *Bactrocera tryoni*. *Entomol. Exp. Appl.* 151, 152–159
- 11 Orankanok, W. *et al.* (2007) Area-Wide Integrated Control of Oriental Fruit Fly *Bactrocera dorsalis* and Guava Fruit Fly *Bactrocera correcta* in Thailand. In *Area-Wide Control of Insect Pests* (Vreysen, M. J. B. *et al.*, eds), pp. 517–526, Springer Netherlands
- 12 Scott, M.J. *et al.* (2017) Review of research advances in the screwworm eradication program over the past 25 years. *Entomol. Exp. Appl.* 164, 226–236
- 13 Concha, C. *et al.* (2016) A transgenic male-only strain of the New World screwworm for an improved control program using the sterile insect technique. *BMC Biol.* 14, 72
- 14 Augustinos, A.A. *et al.* (2017) *Ceratitis capitata* genetic sexing strains: laboratory evaluation of strains from mass-rearing facilities worldwide. *Entomol. Exp. Appl.* 164, 305–317
- 15 Papathanos, P.A. *et al.* (2018) A perspective on the need and current status of efficient sex separation methods for mosquito genetic control. *Parasit. Vectors* 11, 654
- 16 Bellini, R. *et al.* (2013) Pilot Field Trials With *Aedes albopictus* Irradiated Sterile Males in Italian Urban Areas. *J. Med. Entomol.* 50, 317–325
- 17 Zheng, X. *et al.* (2019) Combining incompatible and sterile insect techniques to eliminate *Aedes albopictus*. *Nature* in press,
- 18 Bouyer, F. *et al.* (2014) Ex-ante Benefit-Cost Analysis of the Elimination of a *Glossina palpalis gambiensis* Population in the Niayes of Senegal. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8, e3112
- 19 Seck, M.T. *et al.* (2015) Quality of Sterile Male Tsetse after Long Distance Transport as Chilled, Irradiated Pupae. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9, e0004229
- 20 Agnew, P. *et al.* (2002) A minimalist approach to the effects of density-dependent competition on insect life-history traits. *Ecol. Entomol.* 27, 396–402
- 21 Phuc, H.K. *et al.* (2007) Late-acting dominant lethal genetic systems and mosquito control. *BMC Biol.* 5, 11

- 22 Saccone, G. *et al.* (2007) New Sexing Strains for Mediterranean Fruit Fly *Ceratitis capitata*: Transforming Females into Males. In *Area-Wide Control of Insect Pests* (Vreysen, M. J. B. *et al.*, eds), pp. 95–102, Springer Netherlands
- 23 Windbichler, N. *et al.* (2008) Targeting the X Chromosome during Spermatogenesis Induces Y Chromosome Transmission Ratio Distortion and Early Dominant Embryo Lethality in *Anopheles gambiae*. *PLOS Genet.* 4, e1000291
- 24 Galizi, R. *et al.* (2014) A synthetic sex ratio distortion system for the control of the human malaria mosquito. *Nat. Commun.* 5, 3977
- 25 Galizi, R. *et al.* (2016) A CRISPR-Cas9 sex-ratio distortion system for genetic control. *Sci. Rep.* 6, 31139
- 26 Catteruccia, F. *et al.* (2005) An *Anopheles* transgenic sexing strain for vector control. *Nat. Biotechnol.* 23, 1414–1417
- 27 Magnusson, K. *et al.* (2011) Transcription Regulation of Sex-Biased Genes during Ontogeny in the Malaria Vector *Anopheles gambiae*. *PLOS ONE* 6, e21572
- 28 Marois, E. *et al.* (2012) High-throughput sorting of mosquito larvae for laboratory studies and for future vector control interventions. *Malar. J.* 11, 302
- 29 Bernardini, F. *et al.* (2014) Site-specific genetic engineering of the *Anopheles gambiae* Y chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 7600–7605
- 30 Bernardini, F. *et al.* (2017) Cross-Species Y Chromosome Function Between Malaria Vectors of the *Anopheles gambiae* Species Complex. *Genetics* 207, 729–740
- 31 Li, F. *et al.* (2014) Transgenic sexing system for genetic control of the Australian sheep blow fly *Lucilia cuprina*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 51, 80–88
- 32 Ogaugwu, C.E. *et al.* (2013) Transgenic sexing system for *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) based on female-specific embryonic lethality. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 43, 1–8
- 33 Schetelig, M.F. and Handler, A.M. (2012) A transgenic embryonic sexing system for *Anastrepha suspensa* (Diptera: Tephritidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 42, 790–795
- 34 Yan, Y. *et al.* (2017) Building early-larval sexing systems for genetic control of the Australian sheep blow fly *Lucilia cuprina* using two constitutive promoters. *Sci. Rep.* 7, 2538
- 35 Franz, G. (2005) Genetic Sexing Strains in Mediterranean Fruit Fly, an Example for Other Species Amenable to Large-Scale Rearing for the Sterile Insect Technique. In *Sterile Insect Technique* (Dyck, V. A. *et al.*, eds), pp. 427–451, Springer, Dordrecht
- 36 Meza, J.S. *et al.* (2018) Comparison of classical and transgenic genetic sexing strains of Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) for application of the sterile insect technique. *PLOS ONE* 13, e0208880
- 37 Liu, G. *et al.* (2015) RNAi-Mediated Knock-Down of transformer and transformer 2 to Generate Male-Only Progeny in the Oriental Fruit Fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel). *PLOS ONE* 10, e0128892
- 38 Hoang, K.P. *et al.* (2016) Mechanisms of sex determination and transmission ratio distortion in *Aedes aegypti*. *Parasit. Vectors* 9, 49
- 39 Whyard, S. *et al.* (2015) Silencing the buzz: a new approach to population suppression of mosquitoes by feeding larvae double-stranded RNAs. *Parasit. Vectors* 8, 96
- 40 Krzywinska, E. *et al.* (2016) A maleness gene in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Science* 353, 67–69
- 41 Krzywinska, E. and Krzywinski, J. (2018) Effects of stable ectopic expression of the primary sex determination gene Yob in the mosquito *Anopheles gambiae*. *Parasit. Vectors* 11, 648
- 42 Li, J. and Handler, A.M. (2019) CRISPR/Cas9-mediated gene editing in an exogenous transgene and an endogenous sex determination gene in the Caribbean fruit fly, *Anastrepha suspensa*. *Gene* 691, 160–166
- 43 Aryan, A. *et al.* (2019) Nix confers heritable sex-conversion in *Aedes aegypti* and myo-sex is needed for male flight. *bioRxiv* DOI: 10.1101/595371
- 70 Développement de méthodes innovantes de sexage pour l'application de la Technique de l'Insecte Stérile

- 44 McInnis, D.O. *et al.* (2004) Development of a Pupal Color-Based Genetic Sexing Strain of the Melon Fly, *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) (Diptera: Tephritidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 97, 1026–1033
- 45 Isasawin, S. *et al.* (2012) Characterization and evaluation of microsatellite markers in a strain of the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae), with a genetic sexing character used in sterile insect population control. *Eur. J. Entomol.* 109, 331–338
- 46 Isasawin, S. *et al.* (2014) Development of a genetic sexing strain in *Bactrocera carambolae* (Diptera: Tephritidae) by introgression of sex sorting components from *B. dorsalis*, Salaya1 strain. *BMC Genet.* 15, S2
- 47 Zepeda-Cisneros, C.S. *et al.* (2014) Development, genetic and cytogenetic analyses of genetic sexing strains of the Mexican fruit fly, *Anastrepha ludens* Loew (Diptera: Tephritidae). *BMC Genet.* 15, S1
- 48 McInnis, D. *et al.* (2007) Melon Fly (Diptera: Tephritidae) Genetic Sexing: All-male Sterile Fly Releases in Hawaii. *Proc. Hawaii. Entomol. Soc.* 39, 105–110
- 49 Orozco-Dávila, D. *et al.* (2015) Sterility and Sexual Competitiveness of Tapachula-7 *Anastrepha ludens* Males Irradiated at Different Doses. *PLOS ONE* 10, e0135759
- 50 Smith, R.C. *et al.* (2007) Testis-specific expression of the $\beta 2$ tubulin promoter of *Aedes aegypti* and its application as a genetic sex-separation marker. *Insect Mol. Biol.* 16, 61–71
- 51 Nolan, T. *et al.* (2011) Developing transgenic *Anopheles* mosquitoes for the sterile insect technique. *Genetica* 139, 33–39
- 52 Condon, K.C. *et al.* (2007) Genetic sexing through the use of Y-linked transgenes. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 37, 1168–1176
- 53 Dowell, F.E. *et al.* (2005) Sex separation of tsetse fly pupae using near-infrared spectroscopy. *Bull. Entomol. Res.* 95, 249–257
- 54 Moran, Z.R. and Parker, A.G. (2016) Near Infrared Imaging As a Method of Studying Tsetse Fly (Diptera: Glossinidae) Pupal Development. *J. Insect Sci.* 16, 72; 1–9
- 55 Zacarés, M. *et al.* (2018) Exploring the potential of computer vision analysis of pupae size dimorphism for adaptive sex sorting systems of various vector mosquito species. *Parasit. Vectors* 11, 656
- 56 Bellini, R. *et al.* (2018) Exploring protandry and pupal size selection for *Aedes albopictus* sex separation. *Parasit. Vectors* 11, 650
- 57 Fu, G. *et al.* (2007) Female-specific insect lethality engineered using alternative splicing. *Nat. Biotechnol.* 25, 353–357
- 58 Ant, T. *et al.* (2012) Control of the olive fruit fly using genetics-enhanced sterile insect technique. *BMC Biol.* 10, 51
- 59 Yan, Y. and Scott, M.J. (2015) A transgenic embryonic sexing system for the Australian sheep blow fly *Lucilia cuprina*. *Sci. Rep.* 5, 16090
- 60 Fu, G. *et al.* (2010) Female-specific flightless phenotype for mosquito control. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 4550–4554
- 61 Labbé, G.M.C. *et al.* (2012) Female-Specific Flightless (fsRIDL) Phenotype for Control of *Aedes albopictus*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6, e1724
- 62 Marinotti, O. *et al.* (2013) Development of a population suppression strain of the human malaria vector mosquito, *Anopheles stephensi*. *Malar. J.* 12, 142
- 63 Sharma, A. *et al.* (2013) Gut microbes influence fitness and malaria transmission potential of Asian malaria vector *Anopheles stephensi*. *Acta Trop.* 128, 41–47
- 64 Yamada, H. *et al.* (2012) Genetic sex separation of the malaria vector, *Anopheles arabiensis*, by exposing eggs to dieldrin. *Malar. J.* 11, 208
- 65 Yamada, H. *et al.* (2014) The effects of genetic manipulation, dieldrin treatment and irradiation on the mating competitiveness of male *Anopheles arabiensis* in field cages. *Malar. J.* 13, 318

- 66 Ndo, C. *et al.* (2014) X-ray sterilization of the *An. arabiensis* genetic sexing strain ‘ANO IPCL1’ at pupal and adult stages. *Acta Trop.* 131, 124–128
- 67 Yamada, H. *et al.* (2015) The *Anopheles arabiensis* genetic sexing strain ANO IPCL1 and its application potential for the sterile insect technique in integrated vector management programmes. *Acta Trop.* 142, 138–144
- 68 Yamada, H. *et al.* (2013) *Anopheles arabiensis* egg treatment with dieldrin for sex separation leaves residues in male adult mosquitoes that can bioaccumulate in goldfish (*Carassius auratus auratus*). *Environ. Toxicol. Chem.* 32, 2786–2791
- 69 Munhenga, G. *et al.* (2016) Mating competitiveness of sterile genetic sexing strain males (GAMA) under laboratory and semi-field conditions: Steps towards the use of the Sterile Insect Technique to control the major malaria vector *Anopheles arabiensis* in South Africa. *Parasit. Vectors* 9, 122
- 70 Dandalo, L.C. *et al.* (2018) Development of a genetic sexing strain of *Anopheles arabiensis* for KwaZulu-Natal, South Africa. *Med. Vet. Entomol.* 32, 61–69
- 71 Lebon, C. *et al.* (2018) Construction of a genetic sexing strain for *Aedes albopictus*: a promising tool for the development of sterilizing insect control strategies targeting the tiger mosquito. *Parasit. Vectors* 11, 658
- 72 Yamada, H. *et al.* (2013) Eliminating female *Anopheles arabiensis* by spiking blood meals with toxicants as a sex separation method in the context of the sterile insect technique. *Parasit. Vectors* 6, 197
- 73 Kandul, N.P. *et al.* (2019) Transforming insect population control with precision guided sterile males with demonstration in flies. *Nat. Commun.* 10, 84
- 74 Bouyer, J. and Vreysen, M.J.B. (2019) Concerns about the feasibility of using “precision guided sterile males” to control insects. *Nat. Commun.* in press,
- 75 Panjwani, A. and Wilson, A. (2016) What Is Stopping the Use of Genetically Modified Insects for Disease Control? *PLOS Pathog.* 12, e1005830
- 76 Antonelli, T. *et al.* (2015) Transgenic pests and human health: a short overview of social, cultural, and scientific considerations. In *Genetic Control of Malaria and Dengue* (Adelman, Z. N., ed), pp. 1–30, Academic Press
- 77 Mukiyama, T.K. (1985) Y-autosome genetic sexing strain of *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae). *Int. J. Trop. Insect Sci.* 6, 649–652
- 78 Seawright, J.A. *et al.* (1982) Redeye and vermilion eye, recessive mutants on the right arm of chromosome 2 in *Anopheles albimanus*. *Mosq. News* 42, 590–593
- 79 Ndo, C. *et al.* (2018) Isolation and characterization of a temperature-sensitive lethal strain of *Anopheles arabiensis* for SIT-based application. *Parasit. Vectors* 11, 659
- 80 Black, W.C. *et al.* (2011) Why RIDL is not SIT. *Trends Parasitol.* 27, 362–370
- 81 Facchinelli, L. *et al.* (2019) Large-cage assessment of a transgenic sex-ratio distortion strain on populations of an African malaria vector. *Parasit. Vectors* 12, 70
- 82 Schliekelman, P. *et al.* (2005) Pest Control by Genetic Manipulation of Sex Ratio. *J. Econ. Entomol.* 98, 18–34
- 83 Lucchesi, J.C. and Kuroda, M.I. (2015) Dosage Compensation in *Drosophila*. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7, a019398
- 84 Hall, A.B. *et al.* (2015) A male-determining factor in the mosquito *Aedes aegypti*. *Science* 348, 1268–1270
- 85 Sharma, A. *et al.* (2017) Male sex in houseflies is determined by Mdmd, a paralog of the generic splice factor gene CWC22. *Science* 356, 642–645
- 86 Kyrou, K. *et al.* (2018) A CRISPR–Cas9 gene drive targeting *doublesex* causes complete population suppression in caged *Anopheles gambiae* mosquitoes. *Nat. Biotechnol.* 36, 1062–1066
- 87 Clough, E. *et al.* (2014) Sex- and Tissue-Specific Functions of *Drosophila* Doublesex Transcription Factor Target Genes. *Dev. Cell* 31, 761–773
- 72 Développement de méthodes innovantes de sexage pour l’application de la Technique de l’Insecte Stérile

- 88 Kopp, A. (2012) Dmrt genes in the development and evolution of sexual dimorphism. *Trends Genet.* 28, 175–184
- 89 Verhulst, E.C. and van de Zande, L. (2015) Double nexus—Doublesex is the connecting element in sex determination. *Brief. Funct. Genomics* 14, 396–406
- 90 Gomulski, L.M. *et al.* (2018) The Nix locus on the male-specific homologue of chromosome 1 in *Aedes albopictus* is a strong candidate for a male-determining factor. *Parasit. Vectors* 11, 647
- 91 Criscione, F. *et al.* (2016) GUY1 confers complete female lethality and is a strong candidate for a male-determining factor in *Anopheles stephensi*. *eLife* 5, e19281
- 92 Li, X. *et al.* (2019) Two of the three Transformer-2 genes are required for ovarian development in *Aedes albopictus*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 109, 92–105
- 93 Meccariello, A. *et al.* (2019) Maleness-on-the-Y (MoY) orchestrates male sex determination in major agricultural fruit fly pests. *bioRxiv* DOI: 10.1101/533646
- 94 Petrella, V. *et al.* (2019) Genomics and transcriptomics to unravel sex determination pathway and its evolution in sand flies. *bioRxiv* DOI: 10.1101/510586

2.3 Conclusion du chapitre 1

2.3.1 Récentes avancées quant au sexage des *Aedes*

Depuis la publication de cette revue, de nouvelles méthodes de sexage ont été proposées, particulièrement concernant les *Aedes*. Une équipe américaine a, notamment, présenté une preuve de concept chez la drosophile d'un système de sexage basé sur le croisement d'une souche exprimant Cas9 et d'une autre exprimant des ARN guides permettant à la fois la sélection et la stérilisation des mâles (Kandul et al. 2019) puis l'a appliquée à *Ae. aegypti* avec une combinaison de femelles incapables de voler et de mâles stériles (Li et al. 2021). Cette méthode, qui permettrait théoriquement d'effectuer des lâchers d'œufs directement, nécessite néanmoins un sexage précis des colonies parentales, lequel n'est pas automatisé par la méthode actuelle. Cette même équipe, a également proposé, chez la drosophile, un système permettant de tuer sélectivement tous les mâles ou toutes les femelles, basé sur l'introduction d'une résistance sexe-spécifique à deux antibiotiques (Kandul et al. 2020). Enfin, une étude de Verily Life Sciences a mis en place chez *Ae. aegypti* un système de sexage séquentiel, avec une première étape basée sur la taille des nymphes à l'aide d'un tamis métallique, puis trois vérifications par une intelligence artificielle reconnaissant les femelles résiduelles et deux contrôles visuels, aboutissant à une probabilité de contamination de $1,13 \times 10^{-9}$ (Crawford et al. 2020). Ce système permet, certes, une contamination extrêmement faible, mais est en revanche long et ne permet pas un tri avant le stade de nymphe.

2.3.2 Perspectives

Ainsi, nous avons relevé dans notre revue quatre types de stratégies permettant le sexage à des stades de développement précoces chez les Diptères, lesquelles sont i) la distorsion du sex-ratio en faveur des mâles, ii) l'identification de l'un ou l'autre sexe par un marqueur visuel permettant un tri automatisé, iii) les méthodes visant à tuer les femelles et iv) les méthodes rendant les femelles intersexuées et donc incapables de nuire et de se reproduire. Cette dernière impliquant malgré tout de conserver les femelles dans l'élevage, nous ne la jugeons pas pertinente dans notre cas et donc nous nous concentrerons sur les trois premières.

La distorsion du sex-ratio est une méthode intéressante du point de vue du rapport coût-efficacité, car elle suggère que 100% des individus seraient des mâles, ce qui permettrait de relâcher plus de mâles ou de réduire la taille des colonies d'élevage. Chez *Anopheles gambiae*, le moustique vecteur majeur du paludisme, une distorsion du sex-ratio a été obtenue

en utilisant des endonucléases dirigées contre le chromosome X paternel, ne rendant viables que les gamètes paternels porteurs d'un chromosome Y (Windbichler, Papathanos et Crisanti 2008; Galizi et al. 2014; Galizi et al. 2016). Chez *C. capitata*, elle a été obtenue par l'utilisation de la méthode ARN interférant contre le gène *transformer*, gène pivot de la détermination du sexe dans cette espèce, produisant 95% de mâles et 5% d'individus intersexués (Saccone et al. 2007). De manière intéressante, des approches similaires chez *Ae. aegypti* ciblant les gènes *transformer-2* et *doublesex*, deux effecteurs de la cascade de détermination du sexe, n'ont pas permis de distorsion du sex-ratio mais ont causé une mortalité massive des femelles au cours du développement embryonnaire ou larvaire (Whyard et al. 2015; Hoang et al. 2016). Aussi, la distorsion du sex-ratio nécessite une bonne connaissance des chromosomes ou des loci sexuels de l'espèce cible ainsi que de sa cascade de détermination du sexe. A l'heure actuelle, nos connaissances restent encore très partielles chez les *Aedes*, rendant de telles approches hasardeuses.

L'identification par marqueur visuel telle que développée chez *An. gambiae*, *An. arabiensis* et *Lucilia cuprina* permet un tri automatisé à haute vitesse par l'utilisation d'un COPAS, cytomètre en flux permettant le tri de plus grosses particules sur la base de leur fluorescence avec des *flowcells* allant jusqu'à 2000µm (Marois et al. 2012; Bernardini et al. 2014; Bernardini et al. 2017). Dans les cas présents, le marqueur fluorescent est exprimé uniquement chez les mâles par l'utilisation d'un promoteur sexe-spécifique, d'un intron sexe-spécifique ou encore en localisant physiquement le gène de fluorescence sur le chromosome Y. Cette méthode permet un tri très rapide des mâles à partir du premier stade larvaire. Elle souffre néanmoins de deux désavantages : un coût initial important lié à l'acquisition de l'équipement (bien que celui-ci soit rapidement rentabilisé par les économies d'échelle sur le reste de la production), et une acceptabilité plus difficile liée au caractère transgénique des mâles à relâcher. Ce dernier point soulève la question du devenir de telles approches : le cadre réglementaire et l'opinion publique vont-ils plutôt s'alléger ou se durcir ? doit-on se tourner vers des approches différentes ? En outre, l'adaptation d'une telle méthode aux moustiques du genre *Aedes* présenterait des difficultés similaires à celles soulevées par la méthode précédente -la distorsion du sex-ratio-, à savoir des loci sexuels relativement méconnus, en particulier chez *Ae. albopictus*.

Enfin, les méthodes visant à tuer les femelles en l'absence de tétracycline (Ogaugwu, Schetelig et Wimmer 2013; Schetelig et Handler 2012; Yan, Linger et Scott 2017) sont transgéniques donc posent le même problème d'acceptabilité, et impliquent l'utilisation de cet antibiotique en

élevage de masse, ce qui, de notre point de vue, n'est pas désirable pour l'environnement. L'usage d'autres substances moins nocives serait préférable pour ce type d'approches.

En conclusion, cette revue de la littérature nous a permis d'identifier des pistes de travail intéressantes quant au développement de méthodes de sexage chez les moustiques *Aedes*, mais également de pointer du doigt les lacunes de connaissances que nous allions devoir combler et/ou contourner.

2.3.3 Stratégies adoptées

A l'issue de cette analyse de la littérature scientifique, nous nous sommes focalisés sur trois approches différentes pour le sexage chez *Ae. albopictus* et *Ae. aegypti*.

2.3.3.1 Mortalité des femelles à l'aide de substances peu ou non nocives pour l'environnement

● Objectif

La première approche, débutée par Eric Marois en 2017 à Strasbourg, visait à conditionner la survie des femelles d'*Aedes* par la présence ou l'absence d'une substance donnée dans les eaux d'élevage, tel que nous avons pu le voir avec la tétracycline, ou à conditionner l'expression de *Nix*, gène de la masculinisation, afin que la population de moustiques cispéniques soit entièrement masculinisée en présence de ladite substance. Aussi, nous avons cherché, dans un premier temps, à identifier des promoteurs répondant à la présence de quatre substances : un mélange d'éthanol et d'isopropanol (noté « alcool » par la suite), du bleu de méthylène¹⁰, du diméthylsulfoxyde (DMSO) et du sulfate de cuivre¹¹.

● Méthodologie

Pour ce faire, 3 réplicats de larves d'*Ae. albopictus* juste écloses ont été plongés deux heures dans de l'eau distillée seule, de l'eau distillée contenant 0,75 % d'éthanol et 0,5 % d'isopropanol, de l'eau distillée contenant 0,1% de bleu de méthylène, de l'eau distillée contenant 1 % de DMSO ou de l'eau distillée contenant 2,5 mg/L de sulfate de cuivre. Suite à ces différents traitements, les larves étaient rincées, broyées, et leurs ARN totaux étaient

10 Le bleu de méthylène est un polluant des eaux usées d'usine dont l'élimination reste problématique (voir par exemple El Qada, Allen et Walker 2006). Cette approche ayant été écartée, je ne le discuterai pas davantage.

11 De même, l'accumulation du sulfate de cuivre peut présenter un impact écotoxicologique néfaste (voir par exemple Leal et al. 2018), lequel ne sera pas discuté dans cette thèse non plus.

extraits. Une analyse par RNAseq a visé à identifier les gènes surexprimés dans les traitements par rapport à l'eau. La reproductibilité de ces résultats a été vérifiée par qPCR.

● Résultats

L'analyse RNAseq a permis d'identifier 23 gènes surexprimés dans le DMSO, 51 dans le bleu de méthylène, 52 dans l'alcool et 31 dans le sulfate de cuivre (**Annexe 1, Données A1-1**). Parmi ceux-ci, nous nous sommes intéressés à ceux présentant un niveau basal d'expression quasiment nul, l'objectif étant d'obtenir un système ON/OFF. Seuls 7 gènes présentaient ces caractéristiques, 5 en présence de bleu de méthylène et 2 en présence d'alcool (**Tableau 2**).

Tableau 2 : Niveau d'expression des gènes sélectionnés après exposition des larves d'*Aedes albopictus* à l'eau et à la molécule d'intérêt mesuré par RNAseq.

id	Eau			Bleu de méthylène			log2(FC) MeBlue vs H2O	Adjusted p-value MeBlue vs H2O
	R1	R2	R3	R1	R2	R3		
AALF005659	80,14	142,28	295,05	600,16	439,50	1017,53	1,694407779	9,82758E-09
AALF015015	47,04	65,67	95,75	314,15	209,76	581,32	1,882600304	3,02893E-10
CUFF.12947	13,07	7,58	5,57	85,34	51,05	18,93	1,389810574	0,002453997
CUFF.27246	1,74	8,42	7,79	6,56	22,20	102,74	1,158028833	0,035418382
AALF028417	0,00	0,00	1,11	3,75	8,88	159,52	1,970139165	5,51603E-07
id	Eau			Alcool			log2(FC) alcOH H2O	Adjusted p-value alcOH vs H2O
	R1	R2	R3	R1	R2	R3		
CUFF.26114	3,48	50,52	17,81	31,21	104,22	92,03	1,393813915	0,007001936
CUFF.33049	35,72	35,36	37,86	107,83	50,66	139,12	1,077686416	0,031890773

L'induction a été répétée à Montpellier pour ces deux substances (bleu de méthylène, alcool) ainsi que le contrôle en 3 réplicats biologiques. Lors du démarrage de ma thèse, nous avons

ainsi pu extraire les ARN totaux, standardiser les concentrations et réaliser une reverse transcription. Des amorces de qPCR ont été choisies pour chacun de ces gènes (**Annexe 1, Tableau A1-1**) ainsi que pour un gène de ménage de la littérature, *AalRps17*, orthologue du gène *AeRpS17* pour lequel on a utilisé les mêmes amorces (décrites dans Cook et al. 2006, dont les séquences correspondaient dans le génome et le transcriptome d'*Ae. albopictus* dont on disposait au moment de l'étude ¹²), permettant de contrôler la réaction. Les couples d'amorces de tous les gènes ont d'abord été testés en PCR conventionnelle (résultats non présentés). A l'issue de cette étape, deux gènes (AALF015015 et CUFF.12947) ont été écartés.

Afin de vérifier l'efficacité des couples d'amorces, une gamme étalon a été réalisée en qPCR pour chacun (résultats non présentés).

Les échantillons d'ADNc ont été amplifiés par qPCR et leurs Ct (Cycle Threshold) ont été mesurés. Par la méthode de quantification relative du $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (RQ), la quantité relative d'ARNm d'un gène donné dans un échantillon a été mesurée (**Tableau 3**). La quantification relative équivaut à un *fold change* par rapport à un échantillon neutre dit « calibreur ». Elle donne donc un taux de sur/sous-expression d'un gène dans un échantillon donné par rapport à l'échantillon calibreur. Ces mesures sont ainsi normalisées par les variations du gène de référence *AalRpS17* dans les mêmes conditions. L'expression est considérée différente entre calibreur et échantillon si le RQ est inférieur à 0.5 (2 fois moins exprimé) ou supérieur à 2 (2 fois plus exprimé), avec un intervalle de confiance de 95%.

Dans notre cas, on s'attendait donc à obtenir $0.5 < RQ < 2$ pour les répliquats de l'eau vis-à-vis du calibreur et $RQ > 2$ pour tous les échantillons dans la molécule inductrice (tous nos gènes étaient surexprimés en présence de la molécule d'intérêt).

12 Les connaissances actuelles du génome et du transcriptome d'*Ae. albopictus* semblent indiquer que ce choix n'était pas le plus judicieux de ma part : ces amorces amplifient en effet un produit de même taille chez *Ae. albopictus*, mais ce à partir de plusieurs gènes annotés comme « Rps17-like », et avec 3 mismatches au total. Comme nous l'avons fait plus tard au cours de la thèse, nous aurions dû utiliser des amorces spécifiques au gène *AalRps7*, lesquelles sont bien décrites et font consensus dans la littérature récente.

Tableau 3: Quantification relative du niveau d'expression des gènes d'intérêt dans les échantillons exposés à l'eau (49, 50, 54), à l'alcool (49a, 50a, 54a) ou au bleu de méthylène (49b, 50b, 54b).

L'échantillon n°49 a été pris comme calibrateur. L'expression est considérée différente du calibrateur si $RQ < 0,5$ ou $RQ > 2$. RQmin et RQmax correspondent à un intervalle de confiance de 95%. Les résultats en rouge constituent des résultats en contradiction avec ceux attendus (réplicats du contrôle significativement différents du calibrateur c'est-à-dire possédant un $RQ < 0,5$ ou $RQ > 2$ ou répliquats du traitement possédant un $RQ < 2$).

Gène	Traitement	Echantillon	Ct moy. gene	SD gene	Ct moy. ref	SD ref	ΔCt	$\Delta \Delta Ct$	RQ	RQ min	RQ max
CUFF.26114	eau	49	36,41	0,23	27,43	0,12	8,98	0,00	1,00	0,95	1,05
		50	35,42	0,77	27,00	0,16	8,42	-0,57	1,48	1,41	1,56
		54	33,79	0,08	27,92	0,01	5,86	-3,12	8,70	8,27	9,14
	alcool	49a	33,41	0,06	26,57	0,13	6,83	-2,15	4,44	4,22	4,67
		50a	33,36	0,10	26,80	0,14	6,56	-2,43	5,38	5,11	5,65
		54a	35,63	0,54	26,67	0,12	8,96	-0,02	1,01	0,96	1,06
CUFF.33049	eau	49	24,68	0,10	27,43	0,12	-	0,00	1,00	0,95	1,05
		50	24,52	0,07	27,00	0,16	-	0,27	0,83	0,79	0,87
		54	24,40	0,06	27,92	0,01	-	-0,78	1,71	1,63	1,80
	alcool	49a	24,87	0,10	26,57	0,13	-	1,05	0,48	0,46	0,51
		50a	24,39	0,22	26,80	0,14	-	0,34	0,79	0,75	0,83
		54a	24,92	0,10	26,67	0,12	-	1,00	0,50	0,48	0,53
AALF005659	eau	49	29,12	0,20	27,43	0,12	1,70	0,00	1,00	0,95	1,05
		50	28,76	0,06	27,00	0,16	1,76	0,06	0,96	0,91	1,01
		54	32,89	0,62	27,92	0,01	4,96	3,27	0,10	0,10	0,11
	bleu de méthylène	49b	29,29	0,12	26,95	0,11	2,35	0,65	0,64	0,61	0,67
		50b	29,73	0,20	26,09	0,07	3,65	1,95	0,26	0,25	0,27
		54b	28,05	0,18	26,04	0,14	2,01	0,31	0,81	0,77	0,85
CUFF.12947	eau	49	26,48	0,14	27,43	0,12	-	0,00	1,00	0,95	1,05
		50	25,94	0,12	27,00	0,16	-	-0,11	1,08	1,03	1,14
		54	27,11	0,24	27,92	0,01	-	0,14	0,91	0,86	0,95
	bleu de méthylène	49b	24,84	0,05	26,95	0,11	-	-1,15	2,22	2,11	2,34
		50b	25,74	0,01	26,09	0,07	-	0,60	0,66	0,63	0,69
		54b	24,26	0,04	26,04	0,14	-	-0,83	1,78	1,69	1,87
CUFF.27246	eau	49	29,76	0,24	27,43	0,12	2,33	0,00	1,00	0,95	1,05
		50	29,37	0,23	27,00	0,16	2,37	0,04	0,97	0,92	1,02
		54	28,87	0,05	27,92	0,01	0,95	-1,38	2,60	2,47	2,73
	bleu de méthylène	49b	30,31	0,40	26,95	0,11	3,36	1,03	0,49	0,46	0,51
		50b	31,13	0,36	26,09	0,07	5,04	2,71	0,15	0,15	0,16
		54b	28,50	0,09	26,04	0,14	2,46	0,13	0,91	0,87	0,96

● Conclusion

Aucun des 5 gènes candidats n'a présenté le profil d'expression attendu (**Tableau 3**). Compte tenu de ces résultats, nous n'avons pas souhaité poursuivre cette approche et avons préféré nous tourner vers d'autres approches de sexage.

2.3.3.2 Distorsion du sex-ratio ou mortalité des femelles par ARN interférence

Cette deuxième approche a fait l'objet d'une collaboration avec Steve Whyard, de l'Université de Winnipeg (Canada). J'ai effectué en première année de thèse un séjour scientifique de 3 semaines dans le laboratoire de Steve Whyard afin d'être formée à cette méthode, et j'ai reçu son doctorant Canadien, David Giesbrecht, 2 mois au CIRAD à Montpellier pour mettre en place cette méthode dans notre laboratoire.

● Objectif

Nous avons souhaité adapter les résultats obtenus par Steve Whyard (Whyard et al. 2015) chez une souche de laboratoire d'*Ae. aegypti* dénommée Liverpool à une souche de terrain de la même espèce (La Réunion) et à *Ae. albopictus* de deux souches différentes (Montpellier, La Réunion). L'objectif de ce projet était, à terme, de mettre au point un traitement ARNi au stade larvaire provoquant une distorsion du sex-ratio ou la mort des femelles, permettant d'effectuer à lui seul le sexage ou d'être combiné aux méthodes existantes pour un sexage simplifié. La production d'ARN double-brin par des levures, plutôt que l'utilisation d'ARN synthétique, devait rendre cette technique transposable à une échelle opérationnelle.

● Méthodologie

La méthode de production et d'administration des ARN double-brin (dsRNA) était la même que publiée par Whyard et al. (2015). Les séquences cibles des dsRNA utilisées sont présentées en **Annexe 1, Tableau A1-2**. Chaque réplicat est constitué de 50 larves néonates initiales. Deux contrôles négatifs sont appliqués : des palets d'agar ne comportant que de la levure (sans bactérie exprimant des dsRNA), et des palets d'agar exprimant un dsRNA ne ciblant rien (scramble), supplémentés en levure. L'absence de variabilité de séquence des régions ciblées dans le génome des souches que nous avons utilisées a été vérifiée par PCR et séquençage Sanger.

Tableau 4 : Taux de survie chez *Aedes albopictus* et *Aedes aegypti* suite au traitement par dsRNA ciblant les gènes *fez2*, *lrc* et différents gènes codant des nucléases.

Chaque réplicat comportait n=50 larves néonates à J0. Dans certains des réplicats (au sein d'un même traitement ou contrôle), les palets d'agar servant de nourriture et permettant l'administration des dsRNA n'étaient pas ou à peine consommés d'un jour sur l'autre.

Espèce	Souche	Traitement	Réplicat	Survie (%)
<i>Ae. albopictus</i>	Montpellier	nucléase 1	1	100.0
		nucléase 1	2	100.0
		fez2	1	100.0
		fez2 + nucléase 1	1	97.5
		aucun	1	100.0
		scramble	1	100.0
		scramble	2	100.0
<i>Ae. aegypti</i>	La Réunion	fez2 v1	1	62.5
		fez2 v1 + nucléase	1	87.5
		aucun	1	75.0
		scramble	1	55.0
		scramble	2	67.5
<i>Ae. aegypti</i>	La Réunion	lrc	1	82.5
		lrc	2	67.5
		fez2 v2	1	82.5
		fez2 v2	2	80.0
		aucun	1	97.5
		scramble	1	97.5
	Liverpool	lrc	1	95.0
		lrc	2	67.5
		fez2	1	100.0
		fez2	2	30.0
		aucun	1	100.0
		scramble	1	77.5

● Résultats

Une des pistes d'amélioration de la méthode suggérée par Steve Whyard était de combiner nos dsRNA d'intérêt avec des dsRNA ciblant les nucléases présentes dans le système digestif du moustique, lesquelles dégraderaient une partie des dsRNA ingérés. Nous avons donc souhaité, d'une part, vérifier l'efficacité de notre protocole et des dsRNA contre les nucléases en ciblant des gènes essentiels (*fez2* et *lrc*). Ces traitements auraient dû causer de la mortalité chez les larves. Chez *Ae. albopictus*, aucune surmortalité significative n'a été observée (**Tableau 4**). Chez *Ae. aegypti*, *fez2* v1 avec ou sans nucléase n'a causé aucune surmortalité significative, tandis que *lrc* et *fez2* v2 ont causé une surmortalité significative d'environ 20% dans la souche de La Réunion tandis qu'aucune surmortalité n'a été observée avec la souche Liverpool. Ces résultats sont d'autant plus surprenants que les dsRNA *lrc* et *fez2* v2 sont des dsRNA publiés ayant montré des mortalités de près de 75% chez la souche Liverpool (Hapairai et al. 2017). Dans tous les traitements, contrôles compris, le développement larvaire a été fortement ralenti par ce mode d'élevage. Les larves semblaient avoir des difficultés à se nourrir sur les palets d'agar supplémentés en levure. On observe également des taux de survie faibles dans plusieurs contrôles, indiquant un problème de méthodologie plutôt qu'un effet des traitements.

D'autre part, nous avons voulu induire une distorsion du sex-ratio ou une mortalité des femelles chez *Ae. albopictus* (souche Montpellier) en ciblant les isoformes femelles spécifiques du gène *doublesex*, effecteur de la détermination du sexe conservé chez les Diptères, tel que cela avait été démontré chez *Ae. aegypti* (Whyard et al. 2015). Aucune modification du sex-ratio n'a été observée ici, en revanche, dans tous les traitements, contrôles compris, le développement larvaire a été fortement ralenti (il restait des larves après 30 jours) et la survie générale impactée par ce mode d'élevage (**Tableau 5**).

● Conclusion

Suite à ces résultats préliminaires peu prometteurs et à des discussions avec d'autres laboratoires rencontrant des difficultés similaires à répliquer les résultats publiés, nous avons décidé d'abandonner cette approche. En effet, il semblerait que ce mode d'administration des dsRNA conduise à une survie variable d'un réplicat biologique à un autre, les larves étant parfois incapables de se nourrir. En outre, dans une publication récente du laboratoire de Steve Whyard, l'efficacité de la méthode à éteindre l'expression d'un gène de fluorescence était comprise entre 8 et 32% selon les traitements (Giesbrecht et al. 2020). Ces problèmes

méthodologiques persistants et la faible efficacité observée étant incompatibles avec l'utilisation opérationnelle que nous visions et une troisième approche montrant des résultats préliminaires plus encourageants, nous avons préféré nous concentrer sur cette dernière.

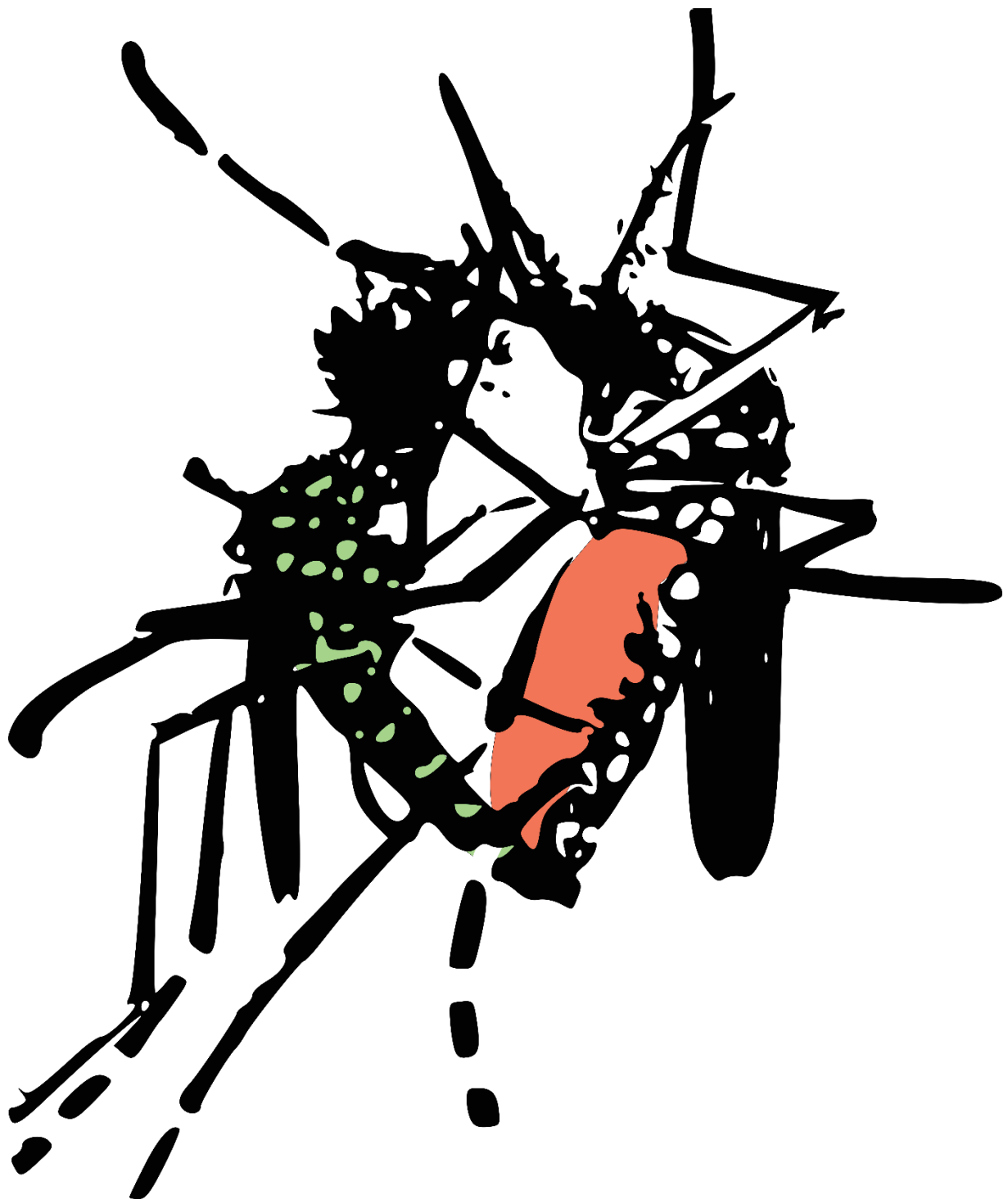
Tableau 5 : Sex-ratio et taux de survie chez *Aedes albopictus* traité par dsRNA contre des isoformes femelle-spécifiques de *doublesex*.

Les réplicats marqués d'un astérisque ont été effectués un jour différent des réplicats non marqués d'un astérisque. Chaque réplicat comportait n=50 larves néonates à J0. Le développement larvaire ayant été fortement ralenti, le comptage a été interrompu à J30 alors qu'il restait des larves.

Traitement	Réplicat	Mâles (%)	Femelles (%)	Survie jusqu'au stade adulte (%)
dsxF1 + dsxF2 + 3 nucléases	1	50.0	50.0	68.0
dsxF1 + dsxF2 + 3 nucléases	2	54.3	45.7	70.0
dsxF1 + dsxF2 + 3 nucléases	3*	38.7	61.3	62.0
dsxF1 + dsxF2 + 3 nucléases	4*	45.7	54.3	60.0
dsxF1 + dsxF2 + 3 nucléases	5*	40.0	60.0	68.0
aucun	1	60.0	40.0	40.0
scramble	1	56.3	43.8	64.0
scramble	2	48.3	51.7	58.0
aucun	2*	50.0	50.0	56.0
scramble	3*	35.1	64.9	74.0

2.3.3.3 Développement de souches de sexage basées sur l'expression sexe-spécifique d'un marqueur fluorescent

La troisième piste que nous avons explorée est le développement de souches de sexage porteuses d'un gène de fluorescence sur un locus sexuel. Celle-ci reprenait des travaux effectués chez les *Anophèles* où de telles souches se sont montrées particulièrement efficaces (Bernardini et al. 2014; Volohonsky et al. 2015). Cette troisième piste sera développée dans la suite de ma thèse.



3 Chapitre 2 : Etude du gène de masculinisation, *Nix*, chez *Aedes albopictus* et développement d'une souche de sexage

3.1 Introduction au chapitre 2

Notre objectif étant d'exprimer de façon sexe-spécifique voire de lier physiquement des transgènes de fluorescence aux loci sexuels, une bonne connaissance de la détermination du sexe et desdits loci chez l'espèce cible était nécessaire.

Aussi, nous nous sommes intéressés, d'une part, aux gènes et aux différents effecteurs intervenant dans la cascade de détermination du sexe lors du développement embryonnaire, et d'autre part à la structure des loci sexuels chez les *Aedes*.

Chez la drosophile *Drosophila melanogaster*, modèle historique de l'ordre des Diptères, la cascade de détermination du sexe est assez bien élucidée. Chez les *Aedes*, elle a été explorée par homologie avec celle de la drosophile et d'autres diptères. Toutefois, compte tenu des nombreuses différences entre ces cascades, la part d'inconnue reste grande.

3.1.1 Détermination du sexe chez la drosophile

Chez *Drosophila melanogaster*, les femelles possèdent deux chromosomes sexuels X, tandis que les mâles possèdent un X et un Y. Contrairement aux Mammifères, la détermination du sexe n'est pas dépendante du chromosome Y, lequel intervient uniquement dans la fertilité des mâles. La cascade de détermination du sexe y est initiée par le nombre de chromosomes X mesuré à l'aide de gènes « numérateurs » (*sisA*, *sisB*, *sisC*, *run*) et « dénominateur » (*dpn*, **Figure 9**).

Lorsque le ratio X:autosome vaut un, c'est-à-dire lorsqu'il y a deux chromosomes X (chez les femelles), le gène-clé *sex-lethal* (*sxl*) est activé par le biais de son promoteur précoce (Pe) (Pomiankowski, Nöthiger et Wilkins 2004; Lucchesi et Kuroda 2015) Sous le contrôle de Pe un site d'épissage alternatif est utilisé, lequel épisse les exons 2 et 3, éliminant le codon stop présent dans l'exon 3. Le gène *sxl* est donc traduit en une protéine fonctionnelle. Au cours du développement embryonnaire, le promoteur Pe est rapidement remplacé par un promoteur de maintenance, Pm, chez les deux sexes. Ce promoteur n'épisse pas l'exon 3, aussi, chez le mâle, les transcrits sont tronqués et la protéine est non fonctionnelle. Chez la femelle en revanche, les transcrits précoces se lient aux pre-ARNm et permettent l'excision de l'exon 3, ce qui résulte en une auto-régulation du gène *sxl* qui produit ainsi des protéines SXL

fonctionnelles tout au long du développement. Ces protéines SXL fonctionnelles bloquent, chez les femelles, le site d'épissage normal du gène *transformer (tra)*, le forçant à utiliser un site d'épissage cryptique excisant la portion de l'exon 2 qui contient plusieurs codons stop. Ainsi, seules les femelles ont une protéine TRA fonctionnelle. Associée à son cofacteur transformer-2 (TRA-2), celle-ci se lie aux pré-ARNm du gène *doublesex (dsx)*, résultant en un épissage femelle-spécifique de celui-ci, traduit en une protéine DSX_F. En l'absence du complexe TRA/TRA-2, *dsx* subit un épissage mâle-spécifique par défaut et est traduit en une protéine mâle-spécifique DSX_M. De même, le complexe TRA/TRA-2 est impliqué dans l'épissage femelle-spécifique du gène *fruitless (fru)*, résultant en des facteurs de transcription FRU_F, et des facteurs communs aux deux sexes FRU_{COM}. En l'absence dudit complexe, le site d'épissage mâle est utilisé par défaut. En fin de cascade, les facteurs de transcription DSX_F et DSX_M régulent des gènes impliqués dans la différenciation des tissus somatiques et des gonades, tandis que les facteurs communs FRU_{COM} régulent le développement du système nerveux central (SNC) des deux sexes. Les facteurs de transcription FRU_M sont, eux, impliqués dans le comportement sexuel et l'orientation sexuelle des mâles (Heinrichs, Ryner et Baker 1998; Ryner et al. 1996).

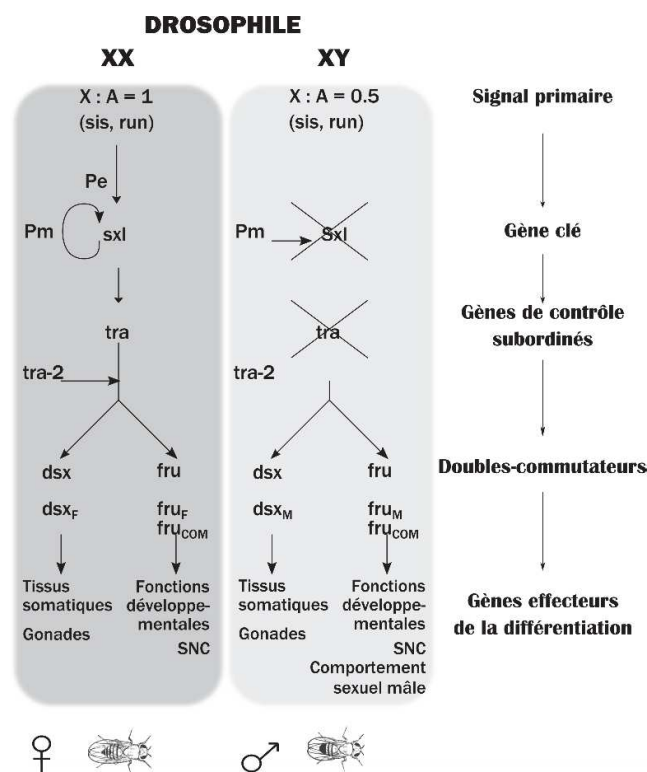


Figure 9 : Cascade de détermination du sexe chez la drosophile.

La cascade des femelles est présentée dans le rectangle gris foncé de gauche, celle des mâles dans le rectangle gris clair de droite. « SNC » signifie « système nerveux central ». Figure adaptée d'après Pomiankowski, Nöthiger et Wilkins 2004 et Lucchesi et Kuroda 2015.

En résumé, chez la drosophile, la cascade de détermination du sexe est initiée par un signal primaire porté par le nombre d'X, lequel active un gène clé, *sxl*, qui, à son tour, détermine l'isoforme du gène de contrôle subordonné *tra*, dont la protéine, associée au cofacteur TRA-2, régule l'épissage sexe-spécifique des doubles commutateurs *dsx* et *fru*, lesquels activent, en bout de chaîne, tous les gènes impliqués dans la différenciation des différents tissus.

3.1.2 DSX et FRU, des effecteurs conservés de la détermination du sexe chez les diptères

Le point commun dans la détermination du sexe chez de nombreux diptères, est la présence, la structure et le rôle des deux gènes commutateurs *dsx* et *fru*. Chez les *Aedes*, ils sont présents à la base de la cascade de détermination du sexe comme chez *D. melanogaster* (Salvemini et al. 2011; Salvemini et al. 2013; Chen et al. 2015; Liu et al. 2019).

Similairement à la drosophile, chez les *Aedes*, *doublesex* subit un épissage sexe-spécifique (**Figure 10**). En sus des deux formes femelle et mâle-spécifiques comparables à celles de la drosophile, une seconde isoforme femelle-spécifique a été identifiée chez *Ae. aegypti* comme chez *Ae. albopictus*, résultant d'un saut d'exon (Salvemini et al. 2011; Li et al. 2019). Salvemini et al. (2011) considèrent que, compte-tenu de leur relative conservation vis-à-vis de *D. melanogaster*, DSX_M et DSX_{F1} joueraient le même rôle chez les *Aedes*, c'est à dire réguler la différenciation sexe-spécifique des tissus somatiques. Le rôle de la seconde protéine femelle-spécifique DSX_{F2} n'est, lui, pas connu. De même, on ignore les modalités de l'épissage de *dsx* chez les *Aedes*, notamment les facteurs de transcription responsables de l'épissage sexe-spécifique. En effet, si l'on retrouve des sites de liaison homologues aux sites TRA/TRA-2 de la drosophile sur l'exon 5b de *dsx*, leur similarité est considérablement plus faible entre *D. melanogaster* et *Ae. aegypti* qu'entre *D. melanogaster* et d'autres diptères, rendant peu probable l'implication de ce complexe. En outre, des sites homologues aux sites TRA/FEM (feminizer) de l'hyménoptère *Nasonia vitripennis* sont également présents sur l'exon 5a d'*Ae. aegypti* (**Figure 10**) bien qu'à notre connaissance ce gène n'ait pas été décrit chez les *Aedes*.

L'autre gène à la base de la cascade de détermination du sexe, *fruitless*, a également une structure relativement conservée (**Figure 11**). L'épissage est similaire à celui de la drosophile,

avec deux sites d'épissage sexe-spécifiques distincts en 5' (Salvemini et al. 2013; Li et al. 2019). A partir de données issues d'autres diptères et d'autres insectes non-diptères, il est communément admis que le rôle de *fru* dans le système nerveux central et le comportement sexuel inné soit conservé chez les *Aedes*, bien que les séquences des portions mâle-spécifiques et N-terminales d'*Ae. aegypti* et *D. melanogaster* présentent une faible similarité (Salvemini et al. 2013). En outre, si leur position est conservée, les séquences des sites de liaison TRA/TRA-2 sont peu similaires. Aussi, comme pour le gène *dsx*, il n'est pas à exclure que le mode et les facteurs de l'épissage sexe-spécifique de *fru* chez les *Aedes* soient différents de ceux de la drosophile.

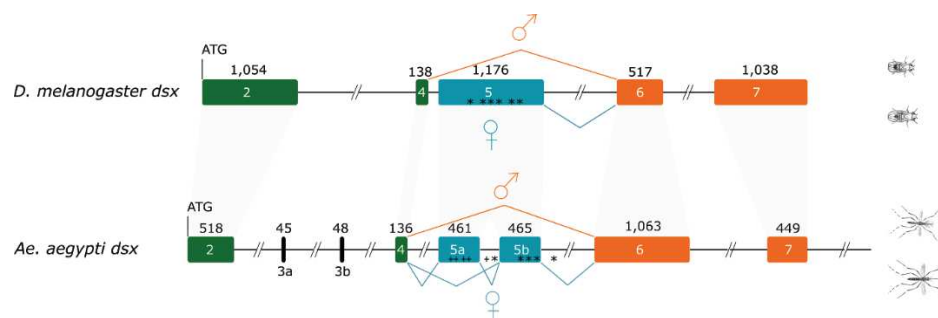


Figure 10 : Comparaison de la structure génomique et de l'épissage sexe-spécifique du gène *doublesex* chez *Drosophila melanogaster* et *Aedes aegypti*.

Les exons communs aux deux sexes sont représentés par des boîtes vertes, les exons spécifiques à *Ae. aegypti* sont représentés en noir, les exons mâle-spécifiques par des boîtes oranges et les exons femelle-spécifiques par des boîtes bleues. La longueur des exons en paires de base est indiquée au-dessus desdites boîtes. Les segments cassés oranges et bleus représentent, respectivement, les épissages mâle et femelle-spécifiques. Les astérisques et les croix symbolisent des séquences homologues à celles des sites de liaison TRA/TRA-2 de *Drosophila melanogaster* et TRA/FEM de *Nasonia vitripennis*, respectivement. Figure adaptée de Salvemini et al. 2011.

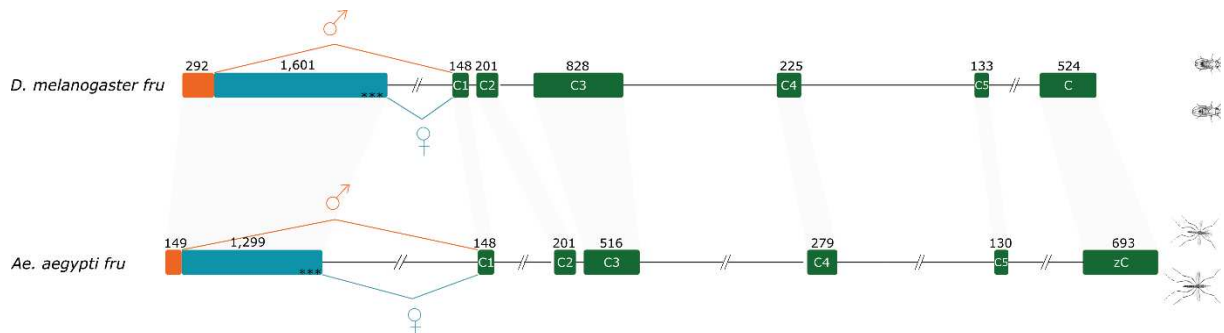


Figure 11 : Comparaison de la structure génomique et de l'épissage sexe-spécifique de la partie conservée du gène *fruitless* chez *Drosophila melanogaster* et *Aedes aegypti*.

Seule la portion homologue commençant par l'exon épissé de manière sexe-spécifique et terminant par l'exon comportant le domaine ZnF-C est représentée sur ce schéma. L'exon épissé de manière sexe-spécifique est représenté par un rectangle orange et bleu, les mâles ne conservant que la partie orange, et les femelles les deux.

Les exons communs aux deux sexes sont représentés par des rectangles verts. Les astérisques symbolisent des séquences homologues à celles des sites de liaison TRA/TRA-2 de *Drosophila melanogaster*. Figure adaptée d'après Salvemini et al. 2013.

3.1.3 Absence de *transformer* et rôle incertain de *transformer-2* dans la détermination du sexe chez les *Aedes*

Aucun homologue du gène *transformer* n'a été trouvé chez *Ae. aegypti* ou *Ae. albopictus* (Matthews et al. 2018; Palatini et al. 2020). Couplé à la faible similarité des séquences homologues aux sites de liaison TRA/TRA-2 des gènes *dsx* et *fru* chez les *Aedes* (Salvemini et al. 2011; Salvemini et al. 2013), cela laisse penser qu'un complexe à ce jour non identifié – comprenant ou non *transformer-2* – serait responsable de l'épissage sexe-spécifique des deux commutateurs. Plusieurs homologues de *tra-2* ont été identifiés dans les deux sexes et à tous stades du développement (Chen et al. 2015; Li et al. 2019). Les protéines TRA-2 sont composées d'une séquence de reconnaissance de l'ARN (RRM) entourée de deux régions riches en sérine et en arginine (Li et al. 2019). Cette structure permet les interactions protéine-protéine, lesquelles sont essentielles à l'épissage femelle-spécifique de *dsx* chez plusieurs espèces. Chez *Ae. albopictus*, trois paralogues de *tra-2* (*tra-2α*, *tra-2β* et *tra-2γ*) ont été identifiés, tandis que deux (*tra-2α* et *tra-2β*) l'ont été chez *Ae. aegypti* (Li et al. 2019). Toutefois, chez *Ae. aegypti* comme chez *Ae. albopictus*, le silençage des gènes *tra-2* n'induit pas de modification globale de l'épissage sexe-spécifique de *dsx*, contrairement à ce qui est observé chez d'autres diptères (Hoang et al. 2016; Li et al. 2019). En revanche, dans les ovaires et les corps gras d'*Ae. albopictus*, le silençage des trois gènes *tra-2* induit la diminution de la proportion de *dsx_F* et l'augmentation de *dsx_M*, ainsi qu'une réduction de l'expression du gène codant la vitellogénine, protéine précurseuse de réserves des œufs (Li et al. 2019). Phénotypiquement, cela se manifeste par un aspect anormal des ovaires, allant d'une réduction de la taille des follicules à une absence complète de développement ovarien. Ainsi, dans ces tissus, il semblerait que les gènes *tra-2* soit impliqués dans un mécanisme régulant le développement des ovaires, en activant l'épissage femelle-spécifique de *dsx*, lui-même activant ensuite la vitellogénine. Dans les testicules, on note également que *tra-2β*, plus éloigné phylogénétiquement des deux autres paralogues, est fortement exprimé, indiquant qu'il pourrait y jouer un rôle. Hoang et al. (2016) ont par ailleurs démontré que des mâles transgéniques exprimant un ARNi silençant l'expression de *tra-2β* produisaient des zygotes transgéniques « m » non viables, tandis que leurs zygotes transgéniques « M » l'étaient. Ainsi, les gènes *tra-2* semblent impliqués dans la différenciation des gonades en induisant localement l'épissage

sexe-spécifique de *dsx*. Toutefois, le rôle et la localisation de TRA-2 dans la cascade de détermination du sexe chez les *Aedes* ainsi que son éventuelle association à une ou plusieurs autres protéines dans ses interactions avec les commutateurs *dsx* et *fru* ne sont pas complètement élucidés.

3.1.4 *Nix*, gène du locus M, initiateur masculin de la cascade de détermination du sexe

Il n'existe pas de chromosomes sexuels différenciés chez les *Aedes*, contrairement à ce qui a longtemps été imaginé (Newton, Southern et Wood 1974), l'apparition des chromosomes sexuels différenciés au sein de l'ordre des Diptères étant postérieure à la divergence des *Aedes*. Dans ce genre, le sexe est codé par des loci sexuels m et M situés sur des chromosomes homomorphiques (revu dans Campbell et al. 2017).

Au sommet de la cascade de détermination du sexe, le M-facteur des *Aedes* a été identifié comme étant le gène *Nix*, localisé près du centromère du chromosome 1, dans le locus sexuel mâle M (Hall et al. 2015; Gomulski et al. 2018; Liu et al. 2019). Chez *Ae. aegypti*, *Nix* est un gène composé de deux exons et un long intron, codant une protéine unique de 288 aa (Hall et al. 2015). Il comporte deux motifs de reconnaissance de l'ARN (RNA recognition motifs, RRM), suggérant qu'il puisse s'agir d'un facteur d'épissage, et son expression est précoce au cours du développement. Chez *Ae. albopictus*, *Nix* avait d'abord été décrit par homologie avec *Ae. aegypti* comme un gène comportant deux exons séparés d'un court intron (Gomulski et al. 2018), mais ce postulat a récemment été corrigé par Liu et al. (2019) qui ont démontré par RACE (« amplification rapide des extrémités des ADNc ») qu'il comportait, chez le moustique tigre, au moins quatre exons. Via un phénomène d'épissage alternatif complexe, ceux-ci sont transcrits en six isoformes, dont quatre majoritaires, exprimés différenciellement au cours du développement (**Figure 12A**). Seul l'isoforme AalNix-1, exprimé précocement, comporte deux RRM ; les autres en comportant un seul. Comme chez *Ae. aegypti*, l'expression de *Nix* est détectée dès la 4^{ème} heure du développement embryonnaire (**Figure 12B**).

Chez *Ae. aegypti*, le rôle et la position de *Nix* dans la cascade de détermination du sexe ont été démontrés de deux manières : son knockout par CRISPR-Cas9 produit des mâles génétiques fortement féminisés et induit la production d'isoformes femelle-spécifiques de *dsx* et *fru*, tandis que son expression ectopique chez des femelles génétiques conduit à une masculinisation partielle ou totale desdites femelles, et à la production d'isoformes mâle-spécifiques de *dsx* et

fru (Hall et al. 2015; Aryan et al. 2020). En outre, la temporalité de détection de *Nix* et *dsx/fru* confirme que l'expression de *Nix* est antérieure à celle de *dsx/fru*, ce qui est cohérent avec sa position en amont de la cascade. Ainsi, chez *Ae. aegypti*, *Nix* est bien nécessaire et suffisant à l'initiation de la cascade de détermination du sexe masculin (Aryan et al. 2020).

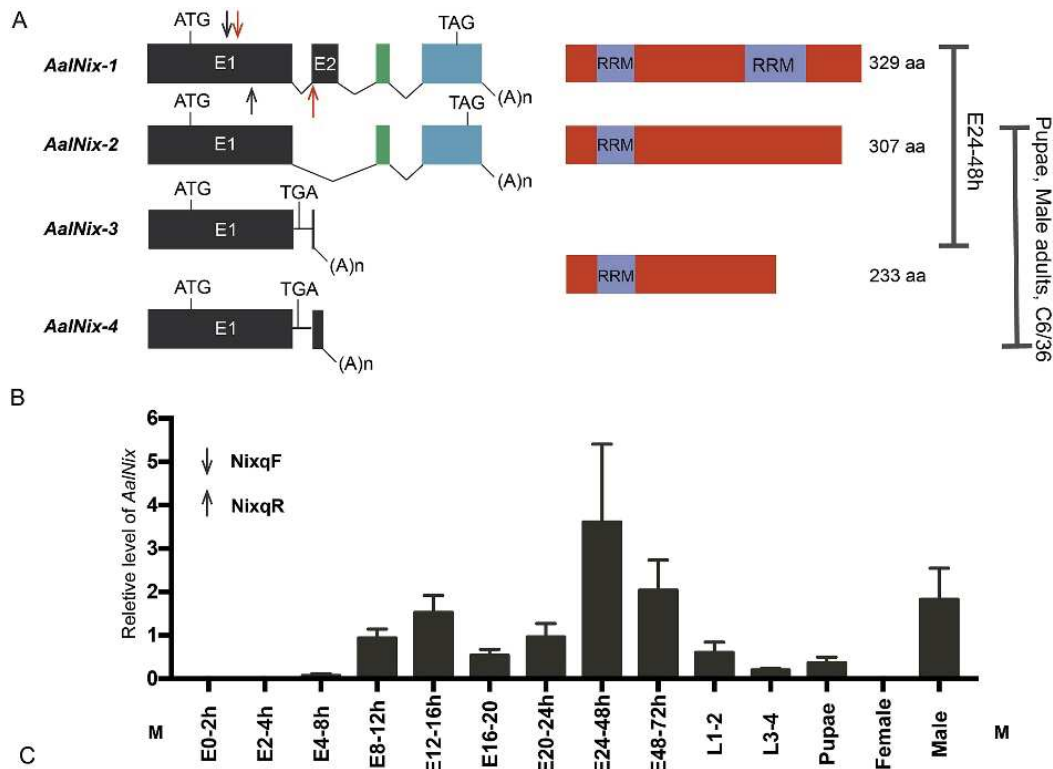


Figure 12 : Isoformes et profil transcriptionnel de *Nix* chez *Aedes albopictus*.

A. Isoformes majoritaires de *Nix* détectés 24 à 48h après oviposition (E24-48h) et/ou chez les nymphes mâles, adultes mâles et dans les cellules C6/36. Les rectangles noirs représentent les exons connus précédemment. Les rectangles verts et bleus représentent les exons découverts par Liu et al (2019). Les rectangles rouges schématisent les structures protéiques des différents isoformes. Seul AalNix-1 comporte deux RRM, les autres isoformes n'en comportent qu'un. Les flèches noires indiquent la position des amorces de qPCR utilisées en (B). Les flèches rouges indiquent la position d'autres amorces de PCR non utiles à notre propos. **B.** Profil d'expression de *Nix* au cours du développement établi par RT-qPCR à l'aide d'amorces internes au 1er exon. Les résultats sont normalisés par rapport au gène de ménage AalRps7 et représentés par leur moyenne $\pm$ l'écart type standard. Adapté de Liu et al. 2019.

Chez *Ae. albopictus*, le knockout de *Nix* provoque également la féminisation à divers degrés des mâles génétiques et l'augmentation de la fréquence des isoformes *dsx_F* et *fru_F* au détriment des isoformes *dsx_M* et *fru_M* à la fois *in vitro* et *in vivo* (Liu et al. 2019). Le profil d'expression

de *Nix* est également en faveur d'une action en amont de la cascade de détermination du sexe, puisque les transcrits de *Nix* sont détectés 16 à 20h avant ceux de *dsx*. Ainsi, ces données plaident en faveur d'un rôle similaire de *Nix* chez *Ae. albopictus*, bien qu'il reste à démontrer que la présence de *Nix* est nécessaire et suffisante à l'initiation de la cascade de détermination du sexe masculin.

En conclusion, il semblerait que, chez les *Aedes*, *Nix* soit le M-facteur, initiateur de la cascade de détermination du sexe masculin (**Figure 13**). *Nix* ne présente pas d'homologie avec les autres facteurs M connus chez les diptères (voir par exemple Krzywinska et al. 2016; Meccariello et al. 2019; Qi et al. 2019), indiquant une forte variabilité des signaux initiateurs de la cascade de détermination du sexe. Les gènes régulés directement ou indirectement par *Nix* sont en grande partie non élucidés, toutefois on retrouve, en aval de la cascade, les doubles commutateurs *dsx* et *fru*, communs à de nombreux diptères.

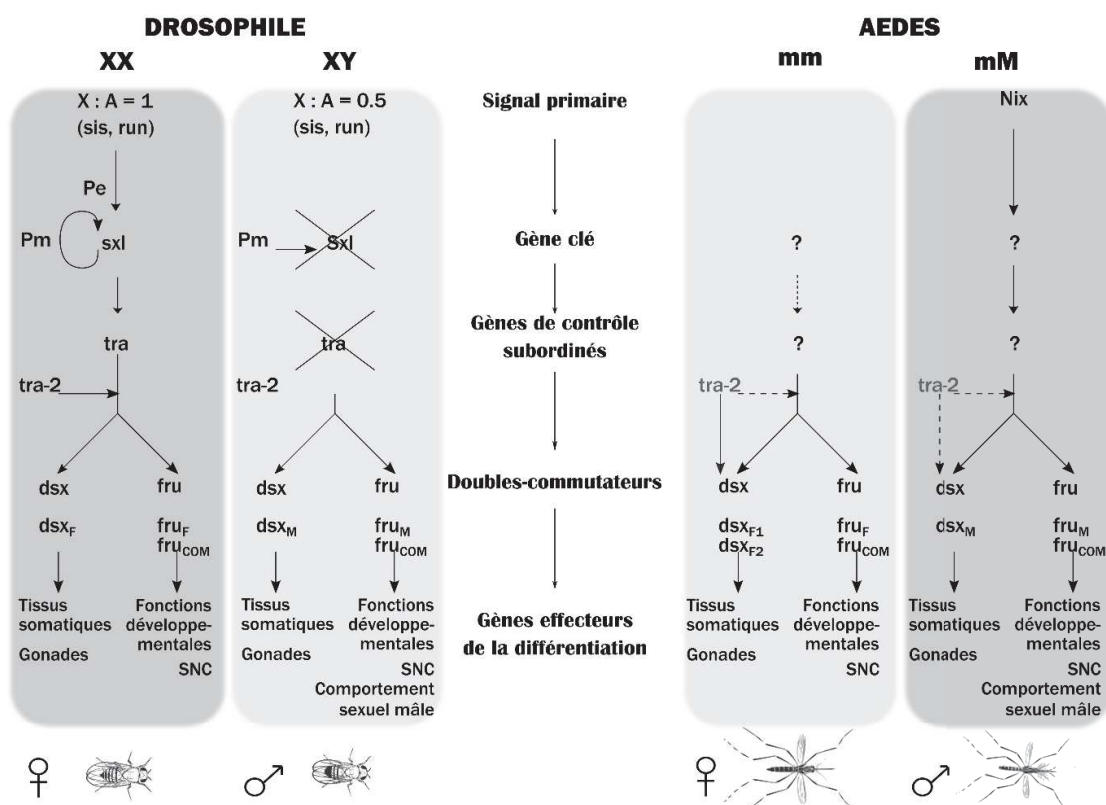


Figure 13 : Comparaison des cascades de détermination du sexe chez les Drosophiles et chez les Aedes.

La partie gauche de la figure présente la cascade des Drosophiles, XX étant le génotype femelle et XY le génotype mâle. La partie droite représente la cascade des *Aedes*, mm étant le génotype femelle et mM le génotype mâle. Pour les deux genres, la cascade du sexe « par défaut » est identifiée par un rectangle gris plus foncé. Les flèches pleines et la couleur de police noire indiquent des interactions ou des effets identifiés. Les points d'interrogation

représentent des gènes éventuels non identifiés. Les flèches discontinues et le texte grisé indiquent des interactions ou des effets supposés mais non démontrés. « SNC » signifie « système nerveux central ».

Ainsi, nous avons souhaité dans ce 2^{ème} chapitre mieux comprendre le fonctionnement de la détermination du sexe chez les *Aedes*. Plus particulièrement, nous nous sommes intéressés au rôle de *Nix* dans la cascade de détermination du sexe chez *Ae. albopictus*, lequel n'avait été que partiellement exploré. Pour ce faire, nous avons injecté des embryons avec des transposons piggyBac porteurs de différentes isoformes de *Nix* ainsi que de gènes rapporteurs fluorescents. Nous avons ainsi obtenu plusieurs lignées transgéniques stables composées exclusivement d'individus au génotype femelle, parmi lesquels les mâles phénotypiques résultaient de l'expression du transgène. Nous avons comparé ces pseudo-mâles à des mâles génétiques sous plusieurs aspects : le niveau d'expression des gènes connus de la cascade de détermination du sexe et d'autres gènes sexe-spécifiques, leur capacité de vol et leur vigueur de reproduction (*fitness*). Enfin, nous avons proposé l'une de ces lignées comme souche de sexage génétique transgénique chez *Ae. albopictus*. En effet, le marqueur de transgénèse fluorescent étant parfaitement lié au gène de masculinisation, les pseudo-mâles sont fluorescents tandis que les femelles ne le sont pas.

Ce chapitre a fait l'objet d'un article de recherche publié dans *Communications Biology* et disponible à <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03165-7>.

3.2 Article : “Transgenic expression of *Nix* converts genetic females into males and allows automated sex sorting in *Aedes albopictus*”

Transgenic expression of *Nix* converts genetic females into males and allows automated sex sorting in *Aedes albopictus*

Célia Lutrat ^{1,2,3,4,*}, Roenick P. Olmo ⁴, Thierry Baldet ^{1,2,5}, Jérémy Bouyer ^{1,6, †} and Eric Marois ^{4,†, *}.

¹ CIRAD, UMR ASTRE, F-34398 Montpellier, France.

² ASTRE, CIRAD, INRA, Univ. Montpellier, Montpellier, France.

³ Université de Montpellier, Montpellier, France.

⁴ CNRS UPR9022, INSERM U1257, Université de Strasbourg, F-67084 Strasbourg, France.

⁵ CIRAD, UMR ASTRE, F-97490 Sainte-Clotilde, Réunion.

⁶ CIRAD, UMR ASTRE, F-97410 Saint-Pierre, Réunion.

* Corresponding authors. Emails: celia.lutrat@outlook.com, e.marois@unistra.fr.

† Jointly supervising authors.

ABSTRACT

Aedes albopictus is a major vector of arboviruses. Better understanding of its sex determination is crucial for developing mosquito control tools, especially genetic sexing strains. In *Aedes aegypti*, *Nix* is the primary gene responsible for masculinization and *Nix*-expressing genetic females develop into fertile, albeit flightless, males. In *Ae. albopictus*, *Nix* has also been implicated in masculinization but its role remains to be further characterized.

In this work, we establish *Ae. albopictus* transgenic lines ectopically expressing *Nix*. Several are composed exclusively of genetic females, with transgenic individuals being phenotypic and functional males due to the expression of the *Nix* transgene. Their reproductive fitness is marginally impaired, while their flight performance is similar to controls. Overall, our results show that *Nix* is sufficient for full masculinization in *Ae. albopictus*. Moreover, the transgene construct contains a fluorescence marker allowing efficient automated sex sorting. Consequently, such strains constitute valuable sexing strains for genetic control.

KEYWORDS

Mosquito control, vector control, sex determination, M factor, *myo-sex*, *myo-fem*, genetic sexing strain, high-throughput sex sorting.

INTRODUCTION

Aedes albopictus can transmit the main human arboviruses including dengue, chikungunya, yellow fever and Zika viruses ¹⁻⁶. Given the global expansion of this mosquito ^{7,8} and its increasing insecticide resistance ^{9,10}, new and more sustainable vector control tools are urgently needed ¹¹. Genetic control methods to suppress mosquito population, including the Sterile Insect Technique ¹² and the Incompatible Insect Technique ¹³, have proven effective in several field trials ¹⁴⁻¹⁷. These methods rely on mass releases of male mosquitoes that compete with their field counterparts for mating. However, in order to upscale the mass production process, an automated and more cost-efficient method for separating males from females is still necessary ^{18,19}. Unfortunately, reliable sexing strains are not yet available on an operational

scale in *Ae. albopictus*, in part due to the limited knowledge of the sex determination in this species.

Insects exhibit a large diversity of primary signals that activate the sex determination cascade. These signals are poorly conserved between insect genera and few have been discovered so far. In *Drosophila melanogaster*, the X chromosome:autosome ratio is the primary signal for sex determination and dosage compensation. While the Y chromosome is essential for male fertility, it does not determine phenotypic sex²⁰. In some non-Drosophilid Diptera, the primary signal relies on a male factor (M-factor) located either on the Y chromosome or in the M-locus of an autosome. *Aedes* mosquitoes carry an M-factor located within an M-locus on the first pair of autosomes, which is called *Nix*^{21–23}. *Nix* was first identified in *Ae. aegypti*, where it consists of two exons separated by a 99-kb intron and encodes a 288-amino acid protein²¹. Stable transgenic expression of *Nix* in *Ae. aegypti* has been shown to be sufficient for converting all genetic females into phenotypic fertile males, confirming its role²⁴. However, these phenotypic males were unable to fly, most likely because they lacked *myo-sex*, another gene closely linked to the M-locus encoding a male-specific flight muscle myosin. In *Ae. albopictus*, *Nix* is also located on chromosome I and comprises two exons with high similarity to *Ae. aegypti* *Nix* and a much shorter intron²⁵, as well as two additional exons uncovered recently²². *Nix* disruption using CRISPR/Cas9 leads to partial feminization of males, confirming the role of *Nix* as the M-factor in this species²².

It remains to be shown whether *Ae. albopictus* *Nix* alone is sufficient for masculinization and if genetic females transformed into phenotypic males by transgenic expression of *Nix* would be fertile and able to fly.

In this work, we generated transgenic *Ae. albopictus* mosquitoes expressing the four main *Nix* isoforms in genetic females and showed that all can induce partial to complete masculinization. Some of these lines constitute valuable genetic sexing strains, allowing high-throughput sex sorting at the neonate stage.

RESULTS

Obtaining *Nix*-expressing transgenic *Ae. albopictus* lines

Because additional exons were unknown when this project began, we first built a transgenesis plasmid comprising only *Nix* exon 1, intron 1 and exon 2 under the control of the endogenous

Nix promoter (~2kb preceding the ATG start codon, see **Supplementary Note 1**). We included an OpIE2-eGFP fluorescence marker for identification of transgenic individuals (**Figure 1c**). About 300 *Ae. albopictus* embryos were injected with this plasmid. Among the surviving G0 adults, we obtained 24 males showing transient expression (TE) of the fluorescent marker and few females, some of which showing deformed genitalia at the pupal stage. After crossing *en masse* TE males with wild-types females, we recovered 29 eGFP positive G1 pupae, including 22 males and 7 females. We further outcrossed the 22 positive males *en masse* with wild-type females. In the G2 generation, we obtained 395 males expressing GFP while 53 were negative, and 185 females expressing eGFP while 151 were negative. Of these, 12 randomly selected eGFP males were outcrossed individually with WT females, creating the lines named herein SM1 to SM12. Two crosses, (SM8 and SM10), did not produce eggs and were not further investigated. In all the other progenies but SM4, 100% of the G3 males expressed eGFP. GFP positive females were also observed, although these were rare or absent in most lines. Interestingly, in SM9 57% of eGFP positive females (larger body size and female antennae) showed an intersex phenotype with deformed genitalia (**Supplementary Figure 1**). Transgenic lines were amplified over several generations and in five of them (SM1, SM3, SM7, SM9, and SM12), 100% of the males were GFP positive.

The second injection mix comprised three different transgenesis plasmids to express the newly reported *Nix* isoforms ²², labelled with different fluorescence markers (**Figure 1a, 1b and-1d** with DsRed, YFP and eGFP respectively) under the control of the *Ae. aegypti* poly-ubiquitin promoter (PUB). We injected about 700 embryos with this mix, from which approximately 100 TE individuals were obtained. Similar to our previous observations, we obtained mostly male G0 TE individuals that were split in five pools of males and outcrossed *en masse* with wild-type females. Strikingly, in the G1 generation, 70-100% of the transgenic individuals of each pool were males. Some of the transgenic females in at least three pools were deformed or partially masculinised. Most transgenic G1 individuals expressed more than one fluorescent marker, indicating that they carried multiple piggyBac insertions with different transgenes. In each of five G1 pools, 8 transgenic males were randomly selected and outcrossed individually with WT females in order to generate lines carrying a single fluorescent marker. From these 40 individual founder males, we retained 7 independent lines in which 100% of the males were fluorescent (namely 1.2R, 1.2G, 2.2G, 3.1YR, 3.1G, 4.4Y, 5.1GR) for further analysis.

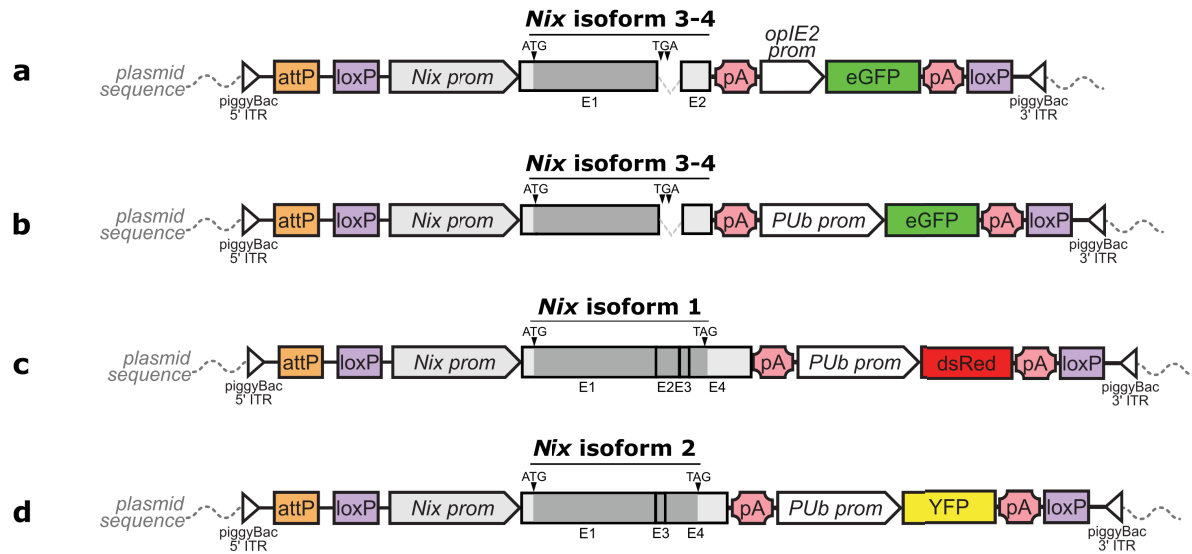


Figure 1: Schematic representation of *Ae. albopictus* *Nix* isoform cloning in the injected plasmids.

Isoform naming follows work published in ²². Grey boxes are *Nix* exons, with darker grey being the translated parts. White triangles are piggyBac 5' and 3' inverted terminal repeat (ITR) sequences, orange boxes represent an AttP landing site included for potential future purposes, purple boxes represent loxP recombination sites, white arrows are promoters, pink polygons are SV40 polyA sequences, green, red and yellow boxes are eGFP, DsRed and YFP gene sequences, respectively. Drawing not to scale. Plasmids carry a) *Nix* isoforms 3-4 and a GFP marker gene under the control of the OpIE2 promoter, b) *Nix* isoforms 3-4 and a GFP marker gene under the control of the polyubiquitin promoter, c) *Nix* isoform 1 and a DsRed marker gene under the control of the polyubiquitin promoter, and d) *Nix* isoform 2 and a YFP marker gene under the control of the polyubiquitin promoter. Detailed plasmid sequences can be found under Addgene references #173505, #173665, #173666, #173667.

Identification of transgenic lines devoid of an M-locus

During characterization of *Nix*-expressing transgenic lines, we observed strong genetic linkage between fluorescence and the male phenotype. This could be due either to transgenic fluorescent males actually being masculinised genetic females, resulting in mosquito lines lacking natural males; or to the insertion of the piggyBac plasmid cassette within or near the endogenous M-locus, resulting in genetic linkage between the fluorescent transgene and male sex. To distinguish between these two possibilities, we tested lines with 100% fluorescent males for the presence of endogenous and exogenous *Nix* by PCR (e.g. see **Supplementary Figure 2**). In eight out of twelve lines, endogenous *Nix* was detected in the GFP positive transgenic males. Therefore, in these lines, maleness was natural and at least one copy of the transgene was M-linked. In contrast, four of our mosquito lines were devoid of endogenous *Nix*, namely

SM9, 1.2G, 2.2G and 3.1G. Interestingly, these four lines possessed the GFP fluorescent marker, thus, they expressed the shortest *Nix* isoforms encoded by exons 1 and 2 only. In some lines marked by YFP and/or DsRed fluorescence, a fraction of the males lacked the M-locus, while others possessed it. However, the M-deprived males did not sire any progeny, thus they were possibly sterile.

Single males from the four M-free GFP lines (hereafter termed pseudo-males) were backcrossed to wild-type females for several generations to eliminate additional non-fully masculinizing transgene insertions. Following this step, we obtained three lines (SM9, 1.2G and 3.1G) where only pseudo-males showed eGFP fluorescence, without residual fluorescent females or intersex individuals. Further tests and analyses were performed on the SM9 line, and some experiments were replicated on the other two lines.

Confirmation of the role of *Nix* transgenes in masculinization

To further confirm the role of *Nix* transgenes in masculinization, we injected SM9 embryos with a plasmid expressing CRE recombinase in order to excise the *Nix*-eGFP transgenic cassette, which is flanked by lox recombination sites (**Figure 1**). At the pupal stage, efficiently injected individuals showed a striking loss of eGFP expression at the injection site (posterior pole), indicative of lox cassette excision. While these pupae should have developed into phenotypic males (due to the eGFP-marked *Nix* transgene cassette), they showed female genitalia, hence demasculinization of their posterior pole (**Figure 2a-c, Supplementary Figure 3**). Adult mosquitoes hatching from these pupae showed antero-posterior gynandromorphism, having male heads and female genitalia. Strikingly, a single individual, which arose from an embryo accidentally injected in the anterior pole rather than in the posterior, showed the opposite gynandromorphic phenotype, with a female head and male genitalia (**Figure 2d**). These results confirmed that maleness in the SM9 line results from the transgene's activity, which can be abolished by CRE/lox excision. The co-existence of male and female tissues in the same individual also illustrates that sex determination is tissue-autonomous in *Ae. albopictus*.

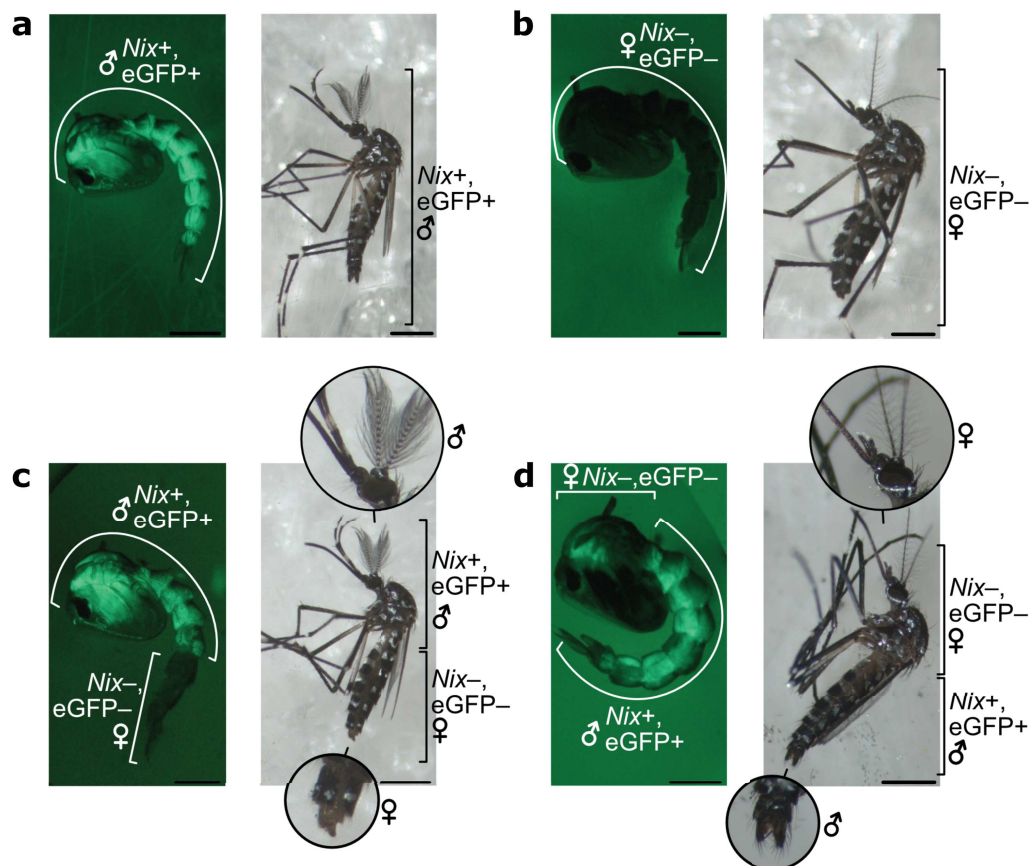


Figure 2: Tissue demasculinization upon CRE/lox excision of the transgenic *Nix* cassette. a) Representative transgenic male pupa and male adult from the SM9 line. b) Representative non-transgenic female pupa and female adult from the SM9 line. c) Transgenic SM9 male pupa and adult injected as embryos in the posterior pole with CRE-recombinase that excised the *Nix*-eGFP cassette in the injected region. These individuals show a male anterior body with female genitalia. d) Transgenic SM9 male pupa and adult injected with CRE-recombinase in the anterior pole of the embryo. Note the female anterior body and male genitalia. Scale bars in the bottom right corner of each picture represent 1 mm.

Characterization of *Nix*-expressing pseudo-males

To evaluate whether the *Nix*-eGFP cassette was stable and adult pseudo-males fully viable, we first determined the sex ratio in comparison to that of the parental wild-type (WT) line (**Figure 3a, Supplementary Table 2**). Male ratios from SM9 (sex-ratio estimate $\pm$ SE = 0.56 ± 0.05), 1.2G (0.49 ± 0.05) and 3.1G (0.54 ± 0.05) transgenic strains were not significantly different from that of the WT line (0.52 ± 0.09 , SM9 vs. WT p -value = 0.165, 1.2G vs. WT p -value = 0.528, 3.1G vs. WT p -value = 0.760).

In *Aedes* mosquitoes, males and females display a significant size dimorphism, with females having a larger body size ²⁶. We determined the body size of pseudo-males using wing length as a proxy ²⁷. Our results showed no significant difference between the size of the wild-type and transgenic males (WT male vs. SM9 pseudo-male $p = 0.998$), while both were significantly different from females (WT male vs. WT female p -value < 0.001 , SM9 pseudo-male vs. WT female p -value < 0.001 , **Figure 3b, Supplementary Data 2**).

Nix expression levels in pseudo-males vs. wild-type males were compared by RT-qPCR at the pupal stage (**Figure 4a, Supplementary Data 3**). Interestingly, pseudo-males from three different lines expressed *Nix* at a similar level to wild-type males (SM9 males vs. WT males p -value = 0.501, 1.2G males vs. WT males p -value = 0.391, 3.1G males vs. WT males p -value = 0.626). Thus, we inquired if the downstream double switch genes, *doublesex* (*dsx*) and *fruitless* (*fru*), showed male-specific splicing products in pseudo-males. For this, we performed RT-PCR on pseudo-males of four transgenic lines. Results revealed that pseudo-males displayed the same splicing pattern as WT males for both genes (**Supplementary Figure 4**).

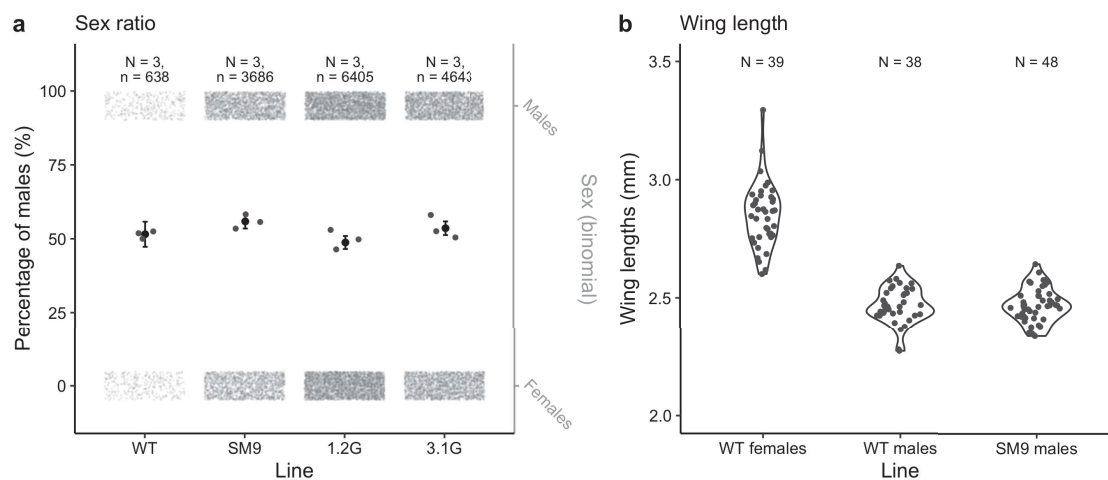


Figure 3: Comparison of sex ratios and wing lengths between transgenic and WT lines. a) Sex ratio comparison between the WT line and the SM9, 1.2G and 3.1G transgenic lines. Sex ratio of the WT line was counted manually on N=3 independent batches of pupae, while sex ratios of transgenic lines were counted on N=3 independent batches of neonate larvae using COPAS. Grey dots in rectangles represent the total numbers of males and females (right y-axis). Grey dots in the middle part represent the sex ratio of each replicate. Black dots are the estimate values with vertical lines being 95% confidence intervals. Sex ratios were compared using linear generalised mixed-effect model. None of the sex ratios were significantly different from that of the WT line: SM9 vs. WT p -value = 0.165, 1.2G vs. WT p -value = 0.528, 3.1G vs. WT p -value = 0.760. **b)** Wing length comparison between N=38 wild-type males,

N=39 wild-type females and N=48 *Nix*-expressing SM9 pseudo-males represented as violin plots with jitter grey data points. Wing length was measured on ImageJ software from pictures of dissected right wings taken under a binocular microscope. Comparisons were performed using linear model: WT male vs. WT female p -value < 0.001, SM9 male vs. WT female p -value < 0.001, WT male vs. SM9 male p -value = 0.998.

Expression of *myo-sex* orthologues in *Ae. albopictus* pseudo-males

Contrarily to *Ae. aegypti* where the lack of the M-linked gene *myo-sex* resulted in flightless pseudo-males²⁴, our *Ae. albopictus* pseudo-males were readily able to fly. Consequently, we wondered whether an essential orthologue of *myo-sex* was present in the *Ae. albopictus*'s M-locus. Using the current version of the *Ae. albopictus* genome (Vectorbase release 52, 20 May 2021), we found two homologous copies of *Ae. aegypti myo-sex* located on two distinct unplaced scaffolds (SWKY01000423 and SWKY01000369), annotated under the identifier references LOC109430926 and LOC109412105, respectively^{24,28}. We designed primer pairs specific to each of these two genes, exploiting differences in their non-coding regions. Interestingly, one of these PCR markers suggested the presence of a male-specific copy of *myo-sex*, characterized by a 664 bp deletion in its non-coding sequence (**Supplementary Note 2**). These results do not align with the currently available genomic data, and suggest that a third, M-linked copy of the *myo-sex* gene exists or that the genome assembly concerning one of the above-mentioned copies is erroneous possibly due to high similarity between them. Hence, we compared the expression levels of the *Ae. albopictus* orthologues of *myo-sex* in *Nix*-expressing pseudo-males lacking the M-linked copy vs. WT males by RT-qPCR. All *myo-sex* copies being 100% identical at the cDNA level, RT-qPCR reflects global expression of all copies combined. Our results showed that pseudo-males expressed *myo-sex* at a level similar to wild type males (SM9 males vs. WT males p -value = 1.000, 1.2G males vs. WT males p -value = 0.960, 3.1G males vs. WT males p -value = 0.843), and that this level was approximately 20 fold higher compared to WT females (p -values < 0.001 for all combinations, **Figure 4b, Supplementary Data 3**). These results suggest that one or several non M-linked, endogenous *myo-sex*-like copies are efficiently upregulated in pseudo-males.

Expression of *myo-fem* orthologue in *Ae. albopictus* pseudo-males

Another sex-specifically expressed flight gene is *myo-fem*, described in *Ae. aegypti* as essential for female flight²⁹. In *Ae. albopictus*, this gene has several potential orthologues. We compared their expression by RT-PCR between WT males and females and identified a putative *myo-fem* orthologue (LOC109402113) based on its strong female-specific expression pattern. RT-qPCR results revealed that pseudo-males express *myo-fem* at similarly low levels as wild-type males (SM9 males vs. WT males p -value = 0.995, 1.2G males vs. WT males p -value = 0.841, 3.1G males vs. WT males p -value = 0.614, **Figure 4c, Supplementary Data 3**). Gene expression in

all males tested was approximately 10,000 fold lower than in wild-type females (p -values < 0.001 for all combinations). Notably, another potential orthologue located on the same genomic scaffold as LOC109402113 and annotated as a pseudo-gene with detectable RNA expression, LOC115254984, displayed a very similar expression profile (**Figure 4d, Supplementary Data 3**).

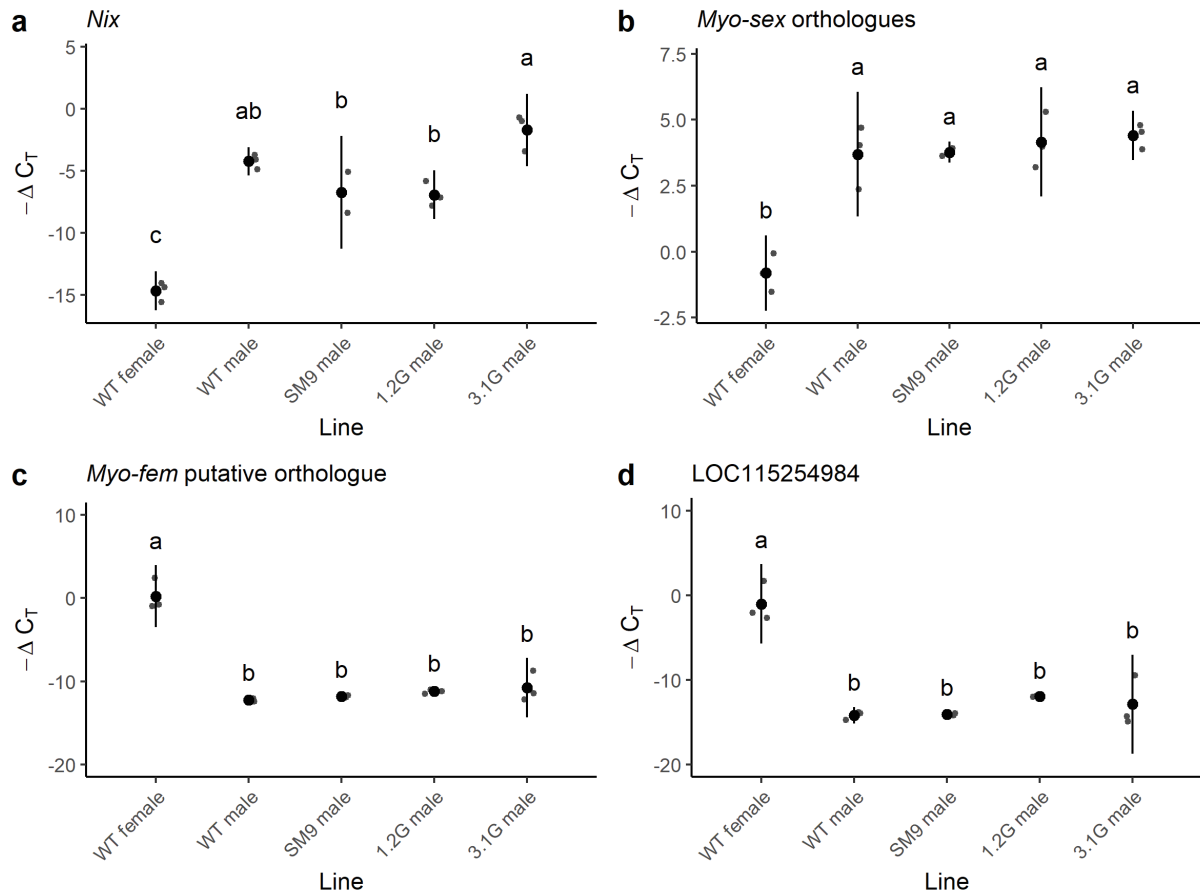


Figure 4: Relative expression of *Nix*, *myo-sex* and *myo-fem* orthologue in *Ae. albopictus* transgenic males. RT-qPCR results are represented by $-\Delta C_T$, which reflects the relative expression level of each gene in a given treatment, C_T values being inversely proportional to the expression levels. *AalRpS7* was used as endogenous reference gene. Grey dots represent each data point. Black dots represent the mean value of the $N = 3$ biological replicates, vertical lines represent 95% confidence intervals. On each panel, distinct letters represent significant difference in an ANOVA followed by a pairwise Tukey test (p -value < 0.001). **a)** *Nix* relative expression. **b)** Relative comparison of *myo-sex* orthologues total expression levels. **c)** Relative expression of the candidate orthologue of the *Ae. aegypti myo-fem* gene, LOC109402113. **d)** Relative expression of the candidate orthologue LOC115254984, which is annotated as a putative pseudo-gene. This primer pair could also amplify LOC115254986 due to high sequence similarity but this other pseudo-gene seems not to be expressed.

Flight ability and reproductive fitness of SM9 pseudo-males

Since we observed that genes potentially involved in flight are regulated similarly in *Nix*-expressing pseudo-males comparing to wild-type counterparts, we tested the SM9 pseudo-males' flight ability by performing a flight test as described in ³⁰. We observed that SM9 males had a higher escape probability than WT males (p -value < 0.001 , **Figure 5a, Supplementary Table 3**), suggesting that the flight capacity of SM9 pseudo-males was at least as high as that of WT male mosquitoes.

We compared SM9 to WT relative fertility (total number of live larvae in a given progeny) and fecundity (total number of eggs laid, estimated by dividing the total number of larvae by the hatching rate). We found no significant difference in SM9 hatching rate (p -value = 0.423, **Figure 5b, Supplementary Table 4**) or fertility (p -value = 0.532, **Figure 5c, Supplementary Table 5**) comparing to wild-type control, thus no difference in fecundity either. Then, we measured relative competitiveness between SM9 pseudo-males and wild-type males by mixing equal numbers of transgenic and wild-type males with wild-type females. If males from both lines were equally competitive, we would expect 50% of the females to be inseminated by a WT male (producing WT progeny), and 50% being inseminated by a transgenic pseudo-male. SM9 males producing 55.8% of GFP-positive sons, and their fecundity and fertility being similar to that of WT, we would therefore expect 27.9% of the total progeny from the competition assay to be GFP-positive. In this experiment, we observed an estimated mean of 10.2 ± 0.4 % of GFP-positive progeny indicating a reduced competitiveness (p -value < 0.001 , **Figure 5d, Supplementary Table 6**). The same competitiveness assay was performed between 1.2G pseudo-males and WT males, and between 3.1G pseudo-males and WT males (**Supplementary Table 6**). Both gave a similar result (1.2G pseudo-males vs. WT males 12.5 ± 0.3 % of transgenic progeny, p -value < 0.001 , 3.1G pseudo-males vs. WT males 9.6 ± 0.4 % of transgenic progeny, p -value < 0.001).

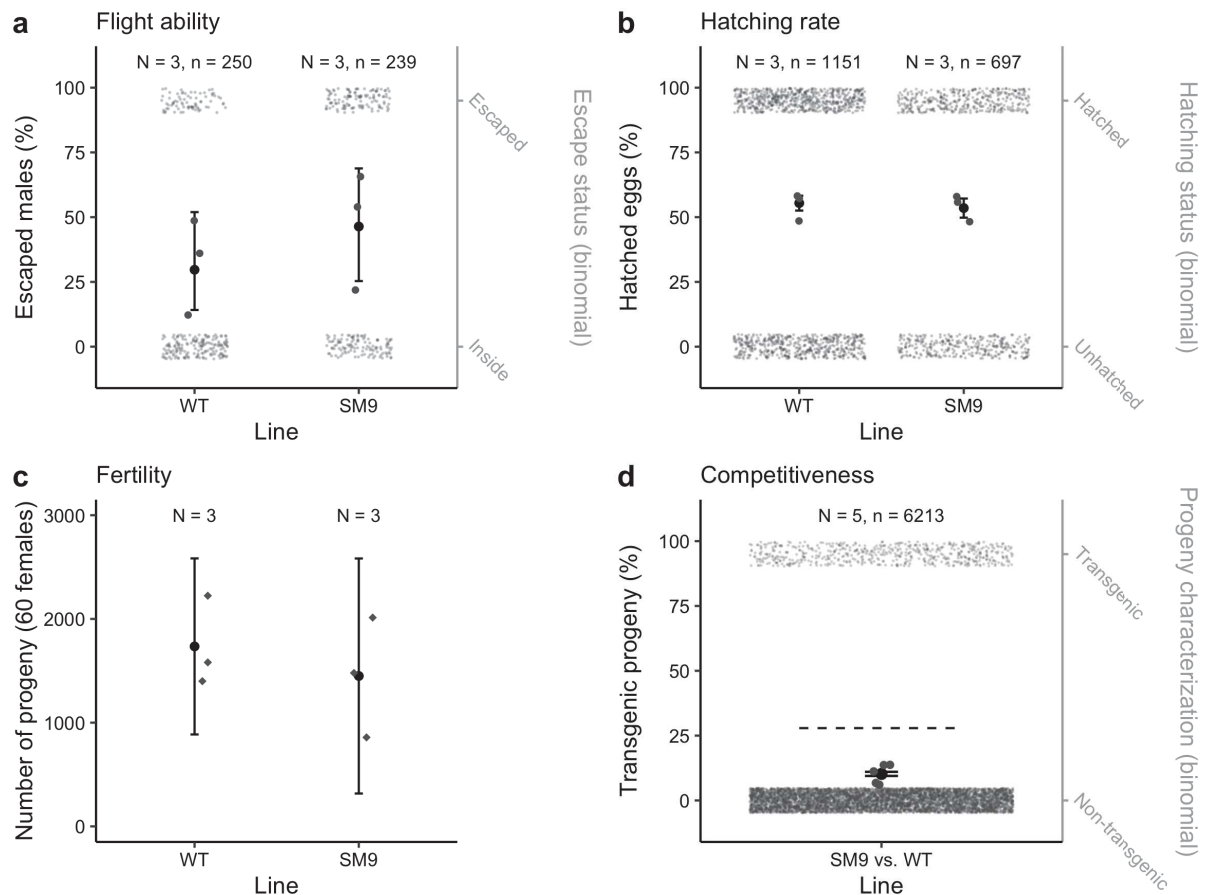


Figure 5: Fitness comparison of *Ae. albopictus* SM9 versus WT males. **a)** Percentage of males that successfully escaped the flight test device. Grey dots in rectangles represent the total numbers of males that remained inside the flight tunnel and that escaped (right y-axis). Black dots are the estimate values with vertical lines being 95% confidence intervals. N = 3 replicates with an average of 82 ± 13 males were performed. To test the effect of the lines on the flight test success, we used linear generalised mixed-effect model and Bernoulli distribution assumptions with “replicate” as random effect. p -value < 0.001. **b)** Hatching rate measured by dividing the number of progeny by the number of eggs on N = 3 egg batches. Dried eggs were counted, submerged, placed in a vacuum chamber for 30mn and allowed to hatch for 24h before counting larvae. Grey dots in rectangles show the total numbers of eggs that hatched or did not hatch (right y-axis). Black dots are the estimate values with vertical lines being 95% confidence intervals. Hatching rate was compared by linear generalised mixed-effect model: p -value = 0.423. **c)** Fertility measured by the number of progeny sired by 30 males crossed with 60 females. Black dots represent the mean value of the N = 3 biological replicates, vertical lines represent 95% confidence intervals. The effect of line on fertility was tested using a linear model: p -value = 0.532. **d)** To estimate SM9 male competitiveness, N = 5 competition assays were performed, crossing 30 WT males and 30 SM9 males to 30 females. In their progeny, the percentage of SM9 pseudo-males was measured by COPAS and compared to the expected percentage (dashed line) by linear generalised mixed-effect model: 10.2 ± 0.4 % of transgenic progeny vs. 27.9% of expected value (p -value < 0.001). Grey dots in rectangles are representative of the total numbers of transgenic SM9 pseudo-males and non-transgenic

individuals in the progeny (right y-axis). Black dots are the estimate values with vertical lines being 95% confidence intervals. In all panels, grey dots in the middle part of the graph represent pooled replicates.

Automated sex sorting of transgenic pseudo-males

The transgenesis plasmids carrying a fluorescent marker under strong promoters, neonate larvae can be sorted according to their fluorescence, which, in this case, is sex specific. Similarly to what has been developed in *Anopheles* mosquitoes^{31,32}, sex sorting can be automated using a COPAS device (Union Biometrica) which allows separation of particles based on fluorescence levels. Using COPAS on the SM9 line, we were able to separate green fluorescent males from non-fluorescent females (**Figure 6a**). However, due to the weak activity of the OpIE2 promoter driving eGFP at the neonate stage, the fluorescence was not always strong enough to get well separated positive vs. negative clouds by COPAS. Lines 3.1G and 1.2G express higher levels of GFP due to the high activity of the PUB promoter at the neonate stage and provide clearer sex separation (**Figure 6b-c**). In all cases, batches of several thousands of neonate larvae could be repeatedly sex separated using COPAS at a speed of approximately 2,400 larvae per minute. Visual screening at the pupal stage confirmed perfect sex separation.

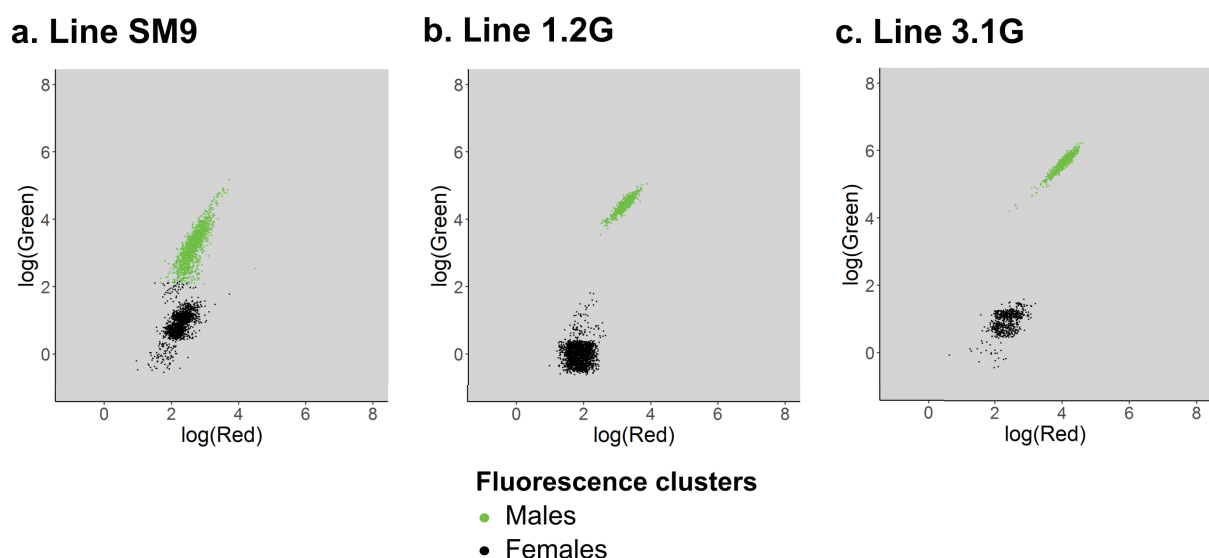


Figure 6: Automated sex sorting of *Ae. albopictus* Nix-expressing transgenic lines. Sorting is performed at the neonate stage using a COPAS device. Presented graphs show the fluorescence profile

of a representative sample of each line as $\log(\text{Green}) = f(\log(\text{Red}))$. Fluorescence clusters are detected automatically using the 'kmeans' function from the R package 'stat'. *Nix*-expressing pseudo-males being tagged with an eGFP marker gene, the top green cluster is composed of males, while females are in the bottom black cluster. **a)** 3,728 larvae from the SM9 line carrying an OpIE2-GFP marker. Here automated clustering detected the lowest male larvae as females, which depicts the difficulty of separating males from females at the neonate stage using an OpIE2-GFP marker **b)** 6,235 larvae from the 1.2G line carrying a polyubiquitin-GFP marker. **c)** 1,624 larvae from the 3.1G line carrying a polyubiquitin-GFP marker.

DISCUSSION

The *Nix*-expressing transgenic *Ae. albopictus* lines presented in this work confirm that *Nix* is necessary and sufficient to initiate the male sex determination cascade in *Ae. albopictus*. They also demonstrate that a short version of *Nix* comprising only the first two exons and the first intron is sufficient for complete masculinization. Pseudo-males resulting from the expression of a *Nix* transgene in a female genomic background seem as fecund and fertile as wild-type males.

Interestingly, the genomic location of the *Nix* transgene appears to strongly influence its functionality. While we selected three independent lines in which expression of the transgene leads to complete conversion of females into functional males, we also discarded many lines that showed either partial masculinisation with deformed genitalia or no masculinisation at all, although their fluorescent transgenesis markers were expressed. Therefore, the activity of the *Nix* promoter is strongly locus-dependent, and full masculinisation requires a certain threshold and/or stage specificity of *Nix* expression. In this work, the random nature of the piggyBac insertion greatly facilitated the selection of such amenable loci, whereas it would have been difficult to predict suitable host loci for targeted *Nix* insertion by CRISPR/Cas9. Now that random piggyBac insertion has allowed the selection of loci amenable to productive *Nix* transgene expression, an interesting follow-up to this work would be to insert the various *Nix* isoforms in one of these loci. This would allow a more rigorous assessment of whether all isoforms have similar phenotypes. A straightforward way to achieve this would be to excise the lox cassette containing the current transgene via injection of CRE recombinase, to replace it with another isoform by integration into the remaining attP docking site (see Figure 1).

Similarly to *Ae. aegypti*²⁴, we observed that pseudo-males harbour molecular characteristics of wild-type males. Of note, we were able to detect an undescribed M-linked homologue of *myo-sex* in the *Ae. albopictus* genome, besides additional autosomal copies, characterized by a 664

nucleotide deletion within the gene's non-coding region. *myo-sex* has been described as responsible for male flight ability in *Ae. aegypti* and is specifically present in wild-type males, hence linked to the M-locus in this species ²⁴. However, in *Ae. albopictus*, the M-linked copy does not appear to be essential for male flight, as synthetic males expressing a *Nix* transgene but devoid of the M-linked *myo-sex* copy showed similar total *myo-sex* expression level and performed better in flight tests. Moreover, we also identified a strong candidate for a *myo-fem* orthologue, a gene described in *Ae. aegypti* as essential for female flight ²⁹. In *Ae. albopictus*, we measured that this gene is highly expressed in wild-type females and strongly repressed in wild-type males as well as transgenic pseudo-males.

Interestingly, despite good flight ability, pseudo-males from all three transgenic lines suffered from reduced mating competitiveness. This may result from a negative effect of the ubiquitous expression of the GFP marker gene, from disruption of a gene at the transgene insertion sites, or from the absence of unknown factors encoded by the endogenous M-locus involved in male mating ability. Notably, it was observed in *Ae. aegypti* that several long non-coding RNAs of the M-locus were upregulated in the testes and in the male accessory glands ^{24,33}. We cannot exclude that similar features are present in the *Ae. albopictus* M-locus and that their absence might influence some aspects of the mating process that we were unable to detect in our fertility and fecundity assays.

Besides fully masculinizing *Nix* transgene insertions, we also obtained a number of insertions triggering no or only partial masculinization, whereas the associated fluorescence reporter genes were expressed under control of the polyubiquitin promoter at comparable levels for all obtained lines. This suggests that the genomic context where the *Nix* transgene is inserted affects its expression, and thus, masculinization. There might be a dose-dependency of *Nix* expression during development with a threshold ensuring full masculinization. However, while this might be true for GFP-bearing cassettes, we failed to isolate a masculinizing line carrying a YFP or a dsRed reporter, (i.e., expressing the long *Nix* isoforms 1 or 2). With these isoforms, we achieved partial to full apparent masculinization, but these individuals were apparently infertile. Therefore, it seems that longer isoforms might not be sufficient for masculinization. Alternatively, the short intron retained in our isoform 3-4 construct (marked by eGFP), which we did not include in the longer isoform constructs, could carry a regulatory sequence that is essential for complete masculinization and/or fertility. Finally, it is possible that lines fully masculinized by the longer isoforms would have been recovered had we screened a much larger sample of additional individual transgenic lines.

In transgenic lines where *Nix* transgene expression of specific isoforms is strong enough, *Nix* seems to constitute a self-sufficient ectopic M-locus. Indeed, over >10 generations, the masculinizing lines remained stable, with sex-ratios not differing significantly from the wild-type strain. This result is consistent with the high flexibility of sex determination in Diptera. This flexibility is probably best illustrated in *Musca domestica* in which the Mdmd male factor is mobile between chromosomes via translocation events ^{34–36}. Even though it is believed that the *Aedes* non-recombining sex-loci are currently evolving towards sex-chromosomes ³⁷, this experiment shows that incipient chromosome differentiation is not essential to the species' viability. Interestingly, the observed antero-posterior gynandromorphism after injection of a plasmid expressing CRE-recombinase into SM9 embryos shows that sex determination is tissue-autonomous in *Ae. albopictus* and is entirely consistent with the cell-autonomous function of *dsx* observed in *D. melanogaster* ^{38–40}.

Finally, from an operational point of view, the masculinizing *Nix*-expressing transgenic lines could be used as genetic sexing strains, since their fluorescence genes are tightly linked to the male-determining gene. Despite SM9 pseudo-males performing well in flight assays, their competitiveness in mating assays confronting equal numbers of wild-type and pseudo-males the progeny sired by pseudo-males was 2.7 fold reduced compared to the expected 50%. With proper adjustment in the number of males to be released in a SIT intervention ^{41,42}, this line still has strong potential for field deployment. One may also be interested in measuring the competitiveness of additional, newly generated masculinizing lines since the transgene insertion may have disrupted an important gene in the lines we tested.

In conclusion, in *Aedes albopictus*, *Nix* is confirmed to be necessary and sufficient for complete masculinization. The developed *Nix*-expressing m/m lines carrying a reporter fluorescence transgene are a promising starting point for the development of highly stable genetic sexing strains.

METHODS

Plasmid construction

Cloned genomic sequences were either amplified by PCR using Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (ThermoFisher Scientific, France), or ordered as gBlocks from IDT DNA (Belgium). Cloning of PCR products and gBlocks in the pKSB- intermediate vector ⁴³ was

performed using NEBuilder® HiFi DNA Assembly (New England Biolabs, France) following the manufacturer's instructions. Modules were then assembled by Golden Gate Cloning into a destination piggyBac vector backbone (Addgene #173496) using the Eco31I restriction enzyme (Thermo Scientific, ThermoFisher Scientific, France). Plasmids were purified using NucleoSpin Plasmid and NucleoBond Xtra Midi EF kits (Macherey Nagel, France) according to the manufacturer's instructions. Sequence verifications were performed using Eurofins Genomics (Germany) Sanger sequencing services.

Four *Nix*-expressing piggyBac-based transgenesis plasmids were built, all made available along with their annotated nucleotide sequence at Addgene (#173505, #173665, #173666, #173667). The *Nix* endogenous promoter was captured by PCR amplification of a 2kbp region upstream of the first exon (**Supplementary Note 1**). A plasmid composed of the *Nix* endogenous promoter plus the four exons, together with an *Ae. aegypti* polyubiquitin (AePUB)-dsRed reporter gene, was built to express and track isoform 1 according to the latest terminology²². A plasmid composed of the *Nix* endogenous promoter plus exons 1, 3 and 4 and an AePUB-YFP reporter gene was built to express and track isoform 2. Two plasmids encoding the *Nix* endogenous promoter, the first exon, the first intron and the second exon and the GFP reporter gene under the control of either the OpIE2 promoter or the AePUB promoter were both used to express and track isoforms 3 and 4.

Embryo microinjections

Embryo microinjections were performed as previously described for *Anopheles* eggs using a Nikon Eclipse TE2000-S inverted microscope, an Eppendorf Femtojet injector and a TransferMan NK2 micromanipulator⁴³, with injection mixes comprising 320 ng/μl of piggyBac construct and 80 ng/μl of transposase-expressing helper plasmid. We codon-optimized the sequence of piggyBac transposase for mosquitoes, added an extra nuclear localization signal to the transposase sequence, and placed it under the control of the *Aedes aegypti* PUB promoter. We observed these changes to result in a massive increase in the integration efficiency of the piggyBac construct. The plasmid and its sequence are available upon request. For injections with CRE recombinase, the injected solution also contained a neutral plasmid expressing DsRed gene under the control of the PUB promoter to control for microinjection efficiency. Surviving larvae expressing eGFP and transiently showing red fluorescence were collected and examined

again at the pupal stage. All larvae counting and fluorescence sorting were performed using a COPAS SELECT device (Union Biometrica, Belgium) with the provided Biosort software.

Mosquito rearing

Aedes albopictus mosquitoes (strain BiA) were collected as larvae from a garden rainwater collector in the city of Bischheim, near Strasbourg (France) in 2018 and maintained in the insectary since then at 25°C, 75-80% humidity, with a 14-hr/10-hr light/dark photoperiod. Larvae were reared in pans filled with demineralized water and provided ground TetraMin fish food twice a day. Adult mosquitoes were caged and provided with 10% sugar solution *ad libitum*. Females were blood-fed on anesthetised mice. Eggs were laid three days later on wet kraft paper and allowed to develop for another three days before being dried.

Molecular characterization of mosquito lines

Genomic DNA was extracted from pupae using NucleoSpin Tissue kit following the manufacturer's instructions (Macherey Nagel, France). Total RNA was extracted using TRIzol RNA Isolation Reagents (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, France) and reverse-transcribed using RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, ThermoFisher Scientific, France). Presence of endogenous and/or exogenous *Nix* in the genome was assessed by PCR using GoTaq® Green Master Mix (M712, Promega, France) according to the manufacturer's recommendations with the *Nix*-833 published primers²⁵ and primer EM1926-EM1927 (**Supplementary Table 1**). The *dsx* and *fru* splicing patterns were assessed by RT-PCR using published primers⁴⁴ with Phire Tissue Direct PCR Master Mix (Thermo Scientific, ThermoFisher Scientific, France). All PCRs were performed in a Veriti 96-wells Thermal Cycler (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific, France). Relative expression of *Nix*, *myo-sex*, and *myo-fem* orthologues was assessed by RT-qPCR with published primers²² as well as primers provided in **Supplementary Table 1**. All measurements were performed in triplicates. The *AalRpS7* housekeeping gene was used as an endogenous reference with published primers⁴⁴ for normalization of the expression level using the ΔC_T method. qPCRs were performed using SYBR™ Fast SYBR™ Green Master Mix (ThermoFisher Scientific, France) and a 7500 Fast Real-Time PCR System machine (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific, France).

Phenotypical characterization of mosquito lines

For all phenotypical tests, mosquitoes from the reference WT strain (BiA) and from the tested transgenic strain were hatched and reared mixed together, with the same larval density and the same amount of food in all tanks. The hatching rate was estimated by counting eggs on a piece of egg paper under a binocular microscope. Eggs were then submerged, placed in a vacuum chamber at 25% of atmospheric pressure for 30min and allowed to hatch for 24h before counting the number of larvae by COPAS, on N = 3 separate egg batches. Sex ratio was measured on N = 3 samples of each line. WT males and females were counted manually at the pupal stage based on genitalia observation under a binocular microscope ⁴⁵. The number of males and females in the transgenic lines was counted at the neonate stage using a COPAS based on fluorescence. Right wings from N = 38 WT males, N = 39 WT females and N = 48 SM9 males were dissected under a binocular microscope and placed on a microscope slide using double-sided tape. Pictures were taken under a Zeiss SteREO binocular microscope with X-Cite Xylis engine (Excelitas technologies) and analysed using ImageJ software ⁴⁶ to measure wing length as a proxy for body size ²⁷. Male flight ability was assessed using a Flight Test Device as previously described, with N = 3 replicates of 82 ± 13 males for each treatment ³⁰. Relative fertility was calculated by comparing the number of live larvae in the progeny from 30 SM9 pseudo-males crossed with 60 wild-type females vs. 30 wild-type males crossed with 60 wild-type females. N = 3 independent replicates of this test were performed for each strain. Relative competitiveness was estimated by placing 30 pseudo-males of a *Nix*-expressing line with 30 males of the wild-type line in a cage with 30 wild-type females in N = 5 independent replicates. In their progeny, we measured the percentage of *Nix*-expressing pseudo-males (tracked by fluorescence using a COPAS device). If fecundity and fertility are similar in both lines, and if they were equally competitive, half the females would mate with a WT male and the other half with a transgenic pseudo-male, meaning that 50% of the progeny would have been sired by transgenic pseudo-males. Within the offspring of the pseudo-transgenic males, the percentage of males would only depend on the line's sex ratio. Consequently, the expected percentage of transgenic males (fluorescent larvae) in the total progeny of the competition assay would equal half the percentage of males in the transgenic strain. This theoretical value is then compared to the measured percentage of transgenic males.

Statistics and Reproducibility

‘±’ symbols in main text represent the data standard deviation (SD) or model estimation standard errors (SE). Error bars in **Figures 3, 4 and 5** are 95% confidence intervals (CI). The number of biological replicates (N), total number of individuals (n) and type of statistical analysis are indicated in methods and figure legends. For qPCR, three technical replicates of each biological sample were used and each line was tested on three independent biological samples. To test the effects of the lines on gene expression we used linear model and normal distribution assumptions. The significance between the lines was tested by ANOVA followed by pairwise Tukey test. The effect of lines on wing length and fertility were tested using linear model and normal distribution assumptions. The effect of the lines on flight ability, hatching rates and sex ratios were tested using linear generalised mixed-effect model and binomial distribution assumptions. The replicate was set as random effect for sex ratios and flight tests as experiments were performed on different days. The relative competitiveness of transgenic lines compared to WT was tested using linear generalised mixed-effect model and binomial distribution assumptions. For this test, we compared the number of SM9 male progeny measured in the offspring of each competitiveness replicate, to the expected number of progeny that would have been obtained if both lines were as competitive. All statistical analyses and plots were performed on R software version 4.0.5⁴⁷. All model assumptions were tested using the R package ‘performance’ (**Supplementary Data 1**).

Data availability

Plasmid sequences have been deposited on Addgene (<https://www.addgene.org/>) under reference numbers: #173505, #173665, #173666, #173667 for *Nix*-expressing piggyBac-based transgenesis plasmids and #173496 for piggyBac vector backbone. All plasmids and mosquito strains described in this paper are available upon request to EM. All data needed to evaluate the conclusions in the paper are present in the paper and/or the Supplementary Information.

Animal care

Animal care was in accordance with CNRS guidelines and approved by the CREMEAS ethics committee.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was funded by EU ERC CoG—682387 REVOLINC to J.B. The contents of this publication are the sole responsibility of the authors and do not necessarily reflect the views of the European Commission. Mosquito production and insectarium operation were supported by Agence Nationale de la Recherche grant #ANR-11-EQPX-0022. Part of the technical work was funded by ANR grants #ANR-19-CE35-0007 GDaMO and # 18-CE35-0003-02 BAKOUMBA to E.M.

CONTRIBUTIONS

C.L., T.B., J.B. and E.M. designed research. C.L., R.P.O. and E.M. performed research and analysed data. C.L. wrote the paper with inputs from all authors.

COMPETING INTEREST

The authors declare no competing interest.

REFERENCES

1. Gutiérrez-López, R. *et al.* Vector Competence of *Aedes caspius* and *Ae. albopictus* Mosquitoes for Zika Virus, Spain. *Emerging infectious diseases* **25**, 346–348; 10.3201/eid2502.171123 (2019).
2. McKenzie, B. A., Wilson, A. E. & Zohdy, S. *Aedes albopictus* is a competent vector of Zika virus: A meta-analysis. *PloS One* **14**, e0216794; 10.1371/journal.pone.0216794 (2019).
3. Lounibos, L. P. & Kramer, L. D. Invasiveness of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* and Vectorial Capacity for Chikungunya Virus. *The Journal of Infectious Diseases* **214**, S453-S458; 10.1093/infdis/jiw285 (2016).
4. Kamgang, B. *et al.* Potential of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to transmit yellow fever virus in urban areas in Central Africa. *Emerging microbes & infections* **8**, 1636–1641; 10.1080/22221751.2019.1688097 (2019).
5. Mariconti, M. *et al.* Estimating the risk of arbovirus transmission in Southern Europe using vector competence data. *Scientific Reports* **9**; 10.1038/s41598-019-54395-5 (2019).
6. Lambrechts, L., Scott, T. W. & Gubler, D. J. Consequences of the expanding global distribution of *Aedes albopictus* for dengue virus transmission. *PLOS Neglected Tropical Diseases* **4**, e646; 10.1371/journal.pntd.0000646 (2010).
7. Kraemer, M. U. G. *et al.* Past and future spread of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Nature Microbiology* **4**, 854; 10.1038/s41564-019-0376-y (2019).

8. European Centre for Disease Prevention and Control and European Food Safety Authority. *Aedes albopictus* - current known distribution: August 2019. Available at <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/aedes-albopictus-current-known-distribution-august-2019> (2019).
9. Kasai, S. *et al.* First detection of a Vssc allele V1016G conferring a high level of insecticide resistance in *Aedes albopictus* collected from Europe (Italy) and Asia (Vietnam), 2016: a new emerging threat to controlling arboviral diseases. *Eurosurveillance* **24**, 1700847; 10.2807/1560-7917.ES.2019.24.5.1700847 (2019).
10. Pichler, V. *et al.* First evidence of resistance to pyrethroid insecticides in Italian *Aedes albopictus* populations 26 years after invasion. *Pest Management Science* **74**, 1319–1327; 10.1002/ps.4840 (2018).
11. World Health Organization & UNICEF. Global vector control response 2017-2030, 2017.
12. Knippling, E. F. Possibilities of Insect Control or Eradication Through the Use of Sexually Sterile Males. *Journal of Economic Entomology* **48**, 459–462; 10.1093/jee/48.4.459 (1955).
13. Laven, H. Eradication of *Culex pipiens fatigans* through cytoplasmic incompatibility. *Nature* **216**, 383–384; 10.1038/216383a0 (1967).
14. Bellini, R., Medici, A., Puggioli, A., Balestrino, F. & Carrieri, M. Pilot Field Trials With *Aedes albopictus* Irradiated Sterile Males in Italian Urban Areas. *Journal of Medical Entomology* **50**, 317–325; 10.1603/ME12048 (2013).
15. Harris, A. F. *et al.* Successful suppression of a field mosquito population by sustained release of engineered male mosquitoes. *Nature Biotechnology* **30**, 828–830; 10.1038/nbt.2350 (2012).
16. Zheng, X. *et al.* Incompatible and sterile insect techniques combined eliminate mosquitoes. *Nature* **572**, 56–61; 10.1038/s41586-019-1407-9 (2019).
17. Gato, R. *et al.* Sterile Insect Technique: Successful Suppression of an *Aedes aegypti* Field Population in Cuba. *Insects* **12**, 469; 10.3390/insects12050469 (2021).
18. Lutrat, C. *et al.* Sex Sorting for Pest Control: It's Raining Men! *Trends in Parasitology* **35**, 649–662; 10.1016/j.pt.2019.06.001 (2019).
19. Papathanos, P. A. *et al.* A perspective on the need and current status of efficient sex separation methods for mosquito genetic control. *Parasites & Vectors* **11**, 654; 10.1186/s13071-018-3222-9 (2018).
20. Lucchesi, J. C. & Kuroda, M. I. Dosage Compensation in *Drosophila*. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **7**, a019398; 10.1101/cshperspect.a019398 (2015).
21. Hall, A. B. *et al.* A male-determining factor in the mosquito *Aedes aegypti*. *Science (Washington)* **348**, 1268–1270; 10.1126/science.aaa2850 (2015).
22. Liu, P. *et al.* Nix is a male-determining factor in the Asian tiger mosquito *Aedes albopictus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 103311; 10.1016/j.ibmb.2019.103311 (2019).
23. Hall, B. *et al.* Insights into the Preservation of the Homomorphic Sex-Determining Chromosome of *Aedes aegypti* from the Discovery of a Male-Biased Gene Tightly Linked to the M-Locus. *Genome Biology and Evolution* **6**; 10.1093/gbe/evu002 (2014).
24. Aryan, A. *et al.* Nix alone is sufficient to convert female *Aedes aegypti* into fertile males and myo-sex is needed for male flight. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **117**, 17702–17709; 10.1073/pnas.2001132117 (2020).
25. Gomulski, L. M. *et al.* The Nix locus on the male-specific homologue of chromosome 1 in *Aedes albopictus* is a strong candidate for a male-determining factor. *Parasites & Vectors* **11**, 647; 10.1186/s13071-018-3215-8 (2018).
26. Cantrell, W. Relation of Size to Sex in Pupae of *Aedes aegypti* (Linn.), *A. triseriatus* (Say) and *A. vexans* Meigen. *Journal of Parasitology* **25**, 448–449; 10.2307/3272324 (1939).
27. Briegel, H. Metabolic relationship between female body size, reserves, and fecundity of *Aedes aegypti*. *Journal of Insect Physiology* **36**, 165–172; 10.1016/0022-1910(90)90118-Y (1990).
28. Palatini, U. *et al.* Improved reference genome of the arboviral vector *Aedes albopictus*. *Genome biology* **21**, 215; 10.1186/s13059-020-02141-w (2020).

29. O'Leary, S. & Adelman, Z. N. CRISPR/Cas9 knockout of female-biased genes *AeAct-4* or *myo-fem* in *Ae. aegypti* results in a flightless phenotype in female, but not male mosquitoes. *PLOS Neglected Tropical Diseases* **14**, e0008971; 10.1371/journal.pntd.0008971 (2020).
30. Culbert, N. J. *et al.* A rapid quality control test to foster the development of genetic control in mosquitoes. *Scientific Reports* **8**, 1–9; 10.1038/s41598-018-34469-6 (2018).
31. Marois, E. *et al.* High-throughput sorting of mosquito larvae for laboratory studies and for future vector control interventions. *Malaria Journal* **11**, 302; 10.1186/1475-2875-11-302 (2012).
32. Bernardini, F. *et al.* Site-specific genetic engineering of the *Anopheles gambiae* Y chromosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**, 7600–7605; 10.1073/pnas.1404996111 (2014).
33. Matthews, B. J. *et al.* Improved reference genome of *Aedes aegypti* informs arbovirus vector control. *Nature* **563**, 501; 10.1038/s41586-018-0692-z (2018).
34. Shearman, D. C. A. The Evolution of Sex Determination Systems in Dipteran Insects Other than *Drosophila*. *Genetica* **116**, 25–49; 10.1023/A:1020955507978 (2002).
35. Blackmon, H., Ross, L. & Bachtrog, D. Sex Determination, Sex Chromosomes, and Karyotype Evolution in Insects. *Journal of Heredity* **108**, 78–93; 10.1093/jhered/esw047 (2017).
36. Sharma, A. *et al.* Male sex in houseflies is determined by *Mdmd*, a paralog of the generic splice factor gene *CWC22*. *Science* **356**, 642–645; 10.1126/science.aam5498 (2017).
37. Fontaine, A. *et al.* Extensive Genetic Differentiation between Homomorphic Sex Chromosomes in the Mosquito Vector, *Aedes aegypti*. *Genome Biology and Evolution* **9**, 2322–2335; 10.1093/gbe/evx171 (2017).
38. Robinett, C. C., Vaughan, A. G., Knapp, J.-M. & Baker, B. S. Sex and the single cell. II. There is a time and place for sex. *PLoS biology* **8**, e1000365; 10.1371/journal.pbio.1000365 (2010).
39. Rideout, E. J., Dornan, A. J., Neville, M. C., Eadie, S. & Goodwin, S. F. Control of sexual differentiation and behavior by the doublesex gene in *Drosophila melanogaster*. *Nature neuroscience* **13**, 458–466; 10.1038/nn.2515 (2010).
40. Hopkins, B. R. & Kopp, A. Evolution of sexual development and sexual dimorphism in insects. *Current opinion in genetics & development* **69**, 129–139; 10.1016/j.gde.2021.02.011 (2021).
41. Oliva, C. F. *et al.* The sterile insect technique for controlling populations of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) on Reunion Island: mating vigour of sterilized males. *PloS One* **7**, e49414; 10.1371/journal.pone.0049414 (2012).
42. Haramboure, M. *et al.* Modelling the control of *Aedes albopictus* mosquitoes based on sterile males release techniques in a tropical environment. *Ecological Modelling* **424**, 109002; 10.1016/j.ecolmodel.2020.109002 (2020).
43. Volohonsky, G. *et al.* Tools for *Anopheles gambiae* Transgenesis. *G3: Genes, Genomes, Genetics* **5**, 1151–1163; 10.1534/g3.115.016808 (2015).
44. Li, X. *et al.* Two of the three Transformer-2 genes are required for ovarian development in *Aedes albopictus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **109**, 92–105; 10.1016/j.ibmb.2019.03.008 (2019).
45. Moorefield, H. H. Sexual dimorphism in mosquito pupae. *Mosquito News* **11**, 175–177 (1951).
46. Schneider, C. A., Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods* **9**, 671–675; 10.1038/nmeth.2089 (2012).
47. R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. version 4.0.5 (2021).

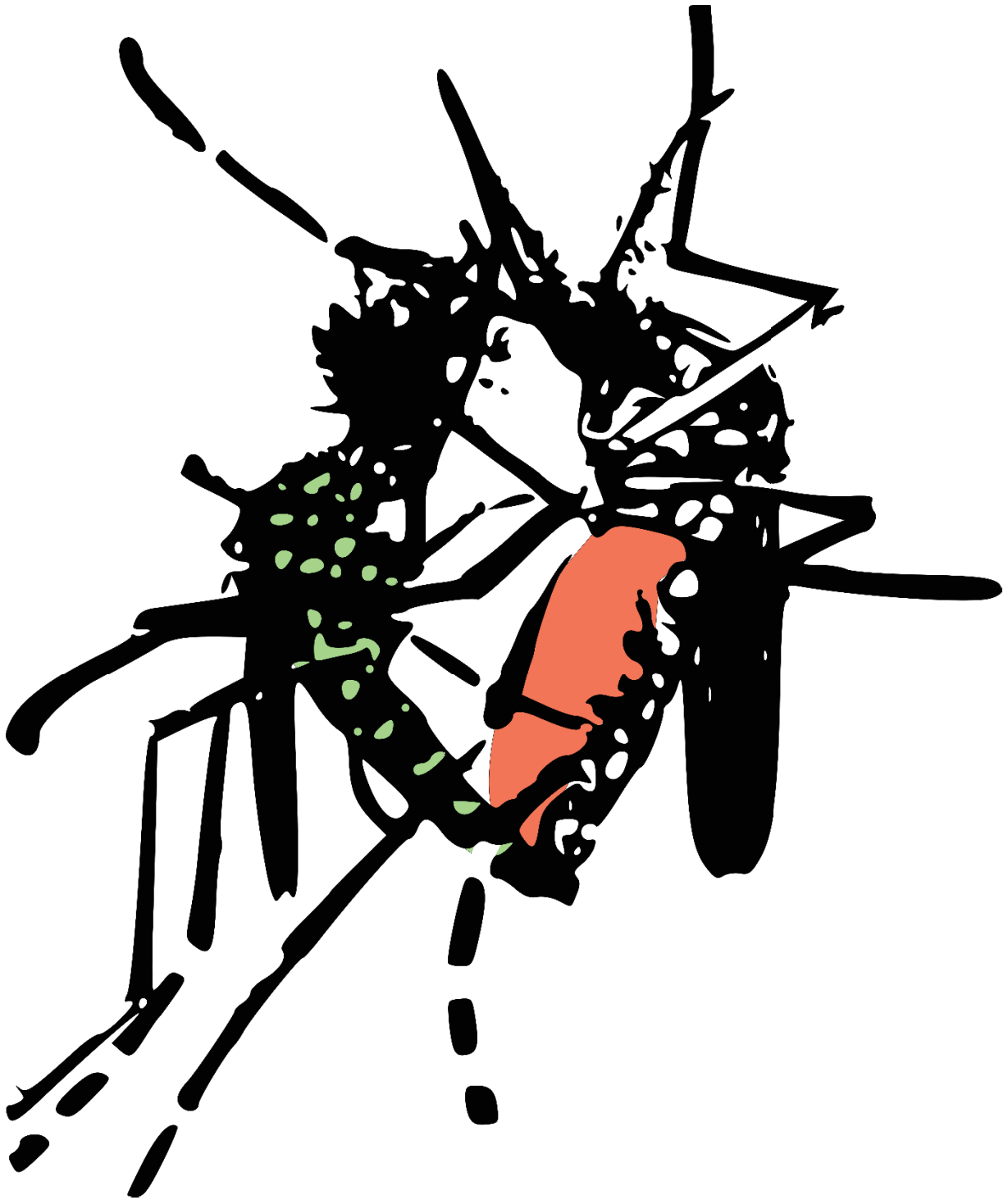
3.3 Conclusion du chapitre 2

Ainsi, ce travail nous a permis de préciser le rôle et le fonctionnement de *Nix* chez *Ae. albopictus*. Nous avons démontré que la seule expression de *Nix*, même réduit à ses deux premiers exons, pouvait suffire à produire, dans un fond génétique femelle, des pseudo-mâles viables et fertiles. Ces pseudo-mâles présentent un pattern d'excision des gènes *dsx* et *fru* similaire à celui des mâles génétiques.

Contrairement à ce qui avait été démontré chez *Ae. aegypti*, chez *Ae. albopictus* les pseudo-mâles avaient une capacité de vol similaire à celle des mâles génétiques. Nous avons identifié des gènes orthologues aux gènes sexe-spécifiques liés au vol chez *Ae. aegypti*, *myo-sex* et *myo-fem*. Nous avons découvert qu'il existe un orthologue de *myo-sex* lié au locus M mais que plusieurs copies autosomales de *myo-sex* permettent d'atteindre un niveau d'expression comparable chez les pseudo-mâles privés de locus M. De même, le niveau d'expression de l'orthologue de *myo-fem* est le même chez ces pseudo-mâles au génotype femelle que chez les mâles génétiques. Nous avons comparé le fitness reproductif des pseudo-mâles à celui de « vrais » mâles génétiques et observé une compétitivité réduite des mâles transgéniques, malgré une fertilité et un taux d'éclosion des œufs *a priori* similaires.

A l'issue de ce travail, nous proposons ces souches exprimant *Nix* et un marqueur de transgénèse fluorescent comme des souches de sexage génétiques. Celles-ci ne permettent toutefois qu'un usage transgénique, et souffrent d'une compétitivité réduite, requérant de relâcher des quantités de mâles *a priori* plus importantes.

Durant cette étude, un autre résultat a toutefois attiré notre attention : parmi les souches transgéniques obtenues dans lesquelles la fluorescence était spécifiquement corrélée au sexe mâle, huit étaient pourtant porteuses d'un locus M endogène. Ceci suggérerait donc que le lien entre sexe et fluorescence n'était pas dû au rôle masculinisant de la copie de *Nix* apportée par notre construction, mais plutôt à un lien génétique entre la copie endogène de *Nix* et la construction transgénique. En d'autres termes, dans une proportion non négligeable de cas, la construction semble s'être intégrée dans le M-locus par un processus non-aléatoire. Cette observation a été le point de départ de la construction d'une souche de sexage génétique liée au locus M chez *Ae. albopictus*, laquelle sera décrite au chapitre suivant.



4 Chapitre 3 : Développement de souches de sexage liant un gène de fluorescence aux loci sexuels chez *Aedes aegypti* et *Aedes albopictus* ainsi que d'un protocole permettant le tri automatisé de mâles non-transgéniques

4.1 Introduction au chapitre 3

Dans ce troisième chapitre, nous restituons nos travaux de recherche visant à construire des souches de sexage génétique marquant les loci m et M à l'aide d'un gène de fluorescence, chez *Ae. aegypti* comme chez *Ae. albopictus*. L'objectif était de proposer à la fois des souches marquant le locus M pouvant être utilisées directement dans les pays ou régions où le lâcher de mâles transgéniques est possible, et des souches marquant le m-locus, qui, combinées aux souches marquant le M-locus, permettent de trier des mâles non-transgéniques selon le modèle de ce qui avait été développé pour les anophèles (Bernardini et al. 2014) et présenté dans la revue du chapitre 1 (Lutrat et al. 2019).

Chez *Ae. aegypti*, le génome, long d'1,25Gb, est fortement répété (65% d'ADN répétitif), et n'est aligné sur toute la longueur des chromosomes que depuis 2018 (Waterhouse et al. 2018; Matthews et al. 2018). Le génome le plus récent, AaegL5, et son set d'annotations AaegL5.0, ont été obtenus par séquençage long-reads PacBio et Hi-C et ont permis de décrire plus de 14600 gènes et 28300 transcrits (Matthews et al. 2018). Chez *Ae. albopictus*, le génome le plus récent, Aalbo_primary.1, date de 2020 et a également été obtenu par séquençage PacBio et Hi-C mais celui-ci n'a pas permis de produire un alignement complet (Palatini et al. 2020). Ainsi, persistent 2197 scaffolds avec un N50 de 55,7Mb. La longueur totale du génome d'*Ae. albopictus* est estimée entre 1,19 et 1,28Gb selon les souches, soit du même ordre de grandeur que celui d'*Ae. aegypti* (Palatini et al. 2020). Par FISH (Fluorescence In Situ Hybridization), une vingtaine de scaffolds couvrant 57% de la longueur totale du génome ont pu être assignés à un chromosome. Bioinformatiquement, les 58 plus longs scaffolds ont été assignés à un chromosome par comparaison avec le génome AaegL5 d'*Ae. aegypti*, amenant la longueur couverte à 75% (Palatini et al. 2020). Toutefois, bien qu'assignés et positionnés approximativement sur chaque chromosome, ces scaffolds restent séparés par des « trous » plus ou moins importants.

Chez les *Aedes*, les loci sexuels sont situés près du centromère du chromosome 1. Le locus sexuel mâle, M, incluant le facteur M, *Nix*, est une région non recombinante identifiée en 2014-2015 chez *Ae. aegypti* (Hall et al. 2014; Hall et al. 2015). Cette région est bornée de facteurs antagonistes entre les loci m et M provoquant la mortalité en cas de recombinaison, ce qui maintient la différenciation des loci sexuels (Krzywinska et al. 2016; Campbell et al. 2017). En 2018, la séquence d'une première portion de 200kb du M-locus a été révélée (Turner et al. 2018), puis le génome AaegL5 l'a dévoilée complètement : il s'agit d'une portion de chromosome d'environ 1,18Mb située à 150,71Mb du début du chromosome 1 (Matthews et al. 2018). Chez *Ae. aegypti*, celui-ci comporte deux gènes, *Nix* et *myo-sex*, ainsi que deux autres séquences codantes prédites et de nombreux ARN longs non codants. *Myo-sex*, le deuxième gène caractérisé du locus M, est impliqué dans la capacité de vol des mâles (Aryan et al. 2020).

Dans le génome d'*Ae. albopictus*, *Nix* appartient à un scaffold d'une longueur de 917 kb. Une seconde copie incomplète de *Nix* a également été identifiée sur le même scaffold, mais elle ne présente pas de cadre de lecture (Palatini et al. 2020). Un homologue de *myo-sex* a été identifié sur deux contigs différents mais l'analyse de quotient chromosomique n'a pas permis de conclure sur son appartenance ou non au locus M car plusieurs paralogues très similaires brouillent l'analyse des résultats. Nos travaux du chapitre 2 suggèrent toutefois qu'il existe une copie de *myo-sex* spécifique aux mâles chez *Ae. albopictus*, mais n'ont pas permis de le situer dans le M-locus ou dans une région non recombinante avoisinante. Ainsi, les bornes et la séquence complète du M-locus d'*Ae. albopictus* n'étaient pas connus au moment de la rédaction de cette thèse.

La séquence du locus sexuel m commun aux mâles et aux femelles n'est, à ce jour et à notre connaissance, publiée pour aucun *Aedes*. Les auteurs du génome AaegL5 d'*Ae. aegypti* (Matthews et al. 2018), ont suggéré qu'il s'agirait de la région qui n'est pas partagée par les chromosomes 1 des génomes AaegL4 et AaegL5, région s'étendant sur 1,27Mb. Cette hypothèse n'a toutefois pas été vérifiée, la séquence n'a pas été publiée et les bornes du m locus potentiel ne sont pas claires.

Si les loci sexuels s'étendent sur un peu plus d'un million de paires de bases, la portion non recombinante du chromosome 1 est, elle, bien plus étendue. En effet, Fontaine et al. (2017) ont démontré que, chez *Ae. aegypti*, aucune recombinaison n'était détectée sur une région de 123Mb, soit 40% de la longueur totale du chromosome. En outre, une région de 63Mb au sein de celle-ci présentait une forte disparité entre mâles et femelles. Dans sa thèse, Turner (2018) a

par ailleurs remarqué qu’au-delà du locus sexuel, le chromosome 1 comportait de nombreux éléments transposables. L’ensemble de ces caractéristiques suggèrent une évolution en cours vers le développement de chromosomes sexuels hétéromorphiques (Campbell et al. 2017; Turner 2018; Fontaine et al. 2017).

Chez *Ae. aegypti* comme chez *Ae. albopictus*, notre première tentative de marquage du locus sexuel M a consisté en un knock-in par CRISPR-Cas9 du marqueur fluorescent au sein du gène *Nix* lui-même. Nos constructions visaient à intégrer ce gène de fluorescence en contre-sens dans le premier intron ou au sein d’un intron artificiel qui serait intégré au premier exon. Pour ce faire, nous avons choisi et commandé des gRNA synthétiques pour chacune des deux espèces d’*Aedes* et fabriqué des plasmides de réparation comportant environ 1 kb de séquence flanquante en 5’ et en 3’ de la cible du gRNA et encadrant un gène de fluorescence. Nous avons injecté plusieurs milliers d’embryons exprimant *Cas9* de chaque espèce, croisé en masse tous les mâles injectés présentant de l’expression transitoire du gène de fluorescence à des femelles sauvages et n’avons obtenu aucun transgénique dans leur descendance.

Dans ce chapitre, nous décrivons donc quatre GSS obtenues par des approches différentes, adaptées à nos connaissances des loci sexuels. Chez *Ae. aegypti*, espèce chez laquelle nous possédions un génome aligné, nous avons décidé de cibler par CRISPR-Cas9 une région plus éloignée des loci sexuels au sens strict. Celle-ci nous a permis d’obtenir des knock-in dans la région non-recombinante liée à l’un et l’autre des loci sexuels et ainsi une GSS avec liaison du transgène au m locus, et une avec liaison du transgène au M locus.

Chez *Ae. albopictus*, nous avons, dans un premier temps, essayé de cibler la région non-recombinante de manière aléatoire. En effet, si, comme chez *Ae. aegypti*, cette région couvre environ 40% du chromosome 1, nous avons estimé que la probabilité d’y insérer un transgène par intégration aléatoire du transposon piggyBac était d’environ 5%. Parmi plus de 120 insertions étudiées, nous avons ainsi obtenu une insertion liée au locus m, avec un taux de recombinaison d’environ 0,1%.

Pour le locus M, nous avons caractérisé plus en détail les huit lignées décrites au deuxième chapitre présentant une liaison génétique entre la construction *Nix*-gène de fluorescence et le locus M. Nous avons déduit que ces insertions, dont la fréquence d’occurrence dépasse largement la probabilité de s’intégrer dans ce locus de manière aléatoire, résultent d’un phénomène de « homing » dirigé par la présence d’une copie de *Nix* dans le plasmide de transgénèse et avons choisi l’une d’elle comme souche marquant le locus M chez *Ae.*

albopictus. Le homing de transposon a été rapporté pour la première fois chez *Drosophila melanogaster* avec l'élément P (Hama, Ali et Kornberg 1990; Taillebourg et Dura 1999). La fréquence d'insertion des transposons à proximité de la région encodée était de l'ordre de 20% et les transposons s'inséraient dans un périmètre de moins 1000 bp (Taillebourg et Dura 1999). Chez *D. melanogaster*, un autre cas de homing a été rapporté avec l'élément Hermes, lequel s'insérait à proximité de la région encodée à une fréquence de 4.4% et avec une précision de 2500 bp (Guimond et al. 2003). A notre connaissance, la seule occurrence de homing chez un moustique du genre *Aedes* concerne *Ae. aegypti* avec la transposase Mos1, qui s'insère dans une copie de son propre gène à une fréquence de 25% (Wilson et al. 2003). piggyBac est une transposase qui cible des sites TTAA, fréquents dans le génome, avec peu de sélectivité, ce qui en fait un outil de choix pour permettre des intégrations aléatoires (Fraser et al. 1995; Fraser et al. 1996). Des tentatives de fusionner piggyBac avec des protéines Zinc Finger pour guider son intégration n'ont pas été très concluantes (Kettlun et al. 2011; Li et al. 2013) tandis que dans des cellules humaines la fusion de la transposase à une protéine GAL4 a permis l'intégration des transposons à 67% dans des sites UAS, cible de GAL4 (Maragathavally, Kaminski et Coates 2006; Owens et al. 2012). Les souches obtenues au chapitre 2 constituent, à notre connaissance, le premier rapport du phénomène de homing de transposon avec piggyBac seule. Bien que des outils moléculaires plus précis existent pour intégrer des séquences d'intérêt à un site choisi, tels que CRISPR-Cas9 ou TALEN, ces méthodes souffrent d'un taux d'intégration encore nettement inférieur à celui de piggyBac. Dans notre cas, où le génome est mal connu et où la région d'intérêt est large, le homing de transposon était donc un outil adapté.

Enfin, nous avons démontré que le croisement de femelles non-transgéniques triées de manière automatisée grâce à une souche marquant le locus M à des mâles transgéniques obtenus par le tri d'une souche marquant le locus m permettait bien d'obtenir et de trier de manière automatisée les mâles non-transgéniques de leur descendance. Toutes ces lignées ont été caractérisées, et leur fitness général et reproductif a été comparé à celui des lignées sauvages dont elles sont issues. La compétitivité et la survie des mâles présentant un intérêt pour d'éventuels lâchers dans le cadre de la lutte génétique contre les *Aedes* (mâles transgéniques issus des souches M et non-transgéniques issus du schéma de croisement de lignées) a également été testée.

L'ensemble de ces travaux a fait l'objet d'un article de recherche en cours de finalisation et disponible en pré-publication sur la plateforme bioRxiv : <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.03.11.483912v1>.

4.2 Article : « Combining two Genetic Sexing Strains allows sorting of non-transgenic males for *Aedes* genetic control »

Combining two Genetic Sexing Strains allows sorting of non-transgenic males for *Aedes* genetic control

Authors

Célia Lutrat ^{1,2,3,4,*}, Myriam Burckbuchler ⁴, Roenick Proveti Olmo ⁴, Rémy Beugnon ^{5,6}, Albin Fontaine ⁷, Thierry Baldet ^{1,8}, Jérémy Bouyer ^{1,9,10,†}, Eric Marois ^{4,†,*}

Affiliations

¹ CIRAD, UMR ASTRE, F-34398 Montpellier, France.

² ASTRE, CIRAD, INRA, Univ. Montpellier, Montpellier, France.

³ Université de Montpellier, Montpellier, France.

⁴ CNRS UPR9022, INSERM U1257, Université de Strasbourg, France

⁵ German Centre for Integrative Biodiversity Research (iDiv) Halle-Jena-Leipzig, Puschstrasse 4, 04103 Leipzig, Germany

⁶ Institute of Biology, Leipzig University, Puschstrasse 4, 04103 Leipzig, Germany

⁷ Unité Parasitologie et Entomologie, Département Microbiologie et maladies infectieuses, Institut de Recherche Biomédicale des Armées (IRBA), Marseille, France.

⁸ CIRAD, UMR ASTRE, Sainte-Clotilde F-97490, Reunion, France

⁹ CIRAD, UMR ASTRE, Saint-Pierre F-97410, Reunion, France

¹⁰ Insect Pest Control Sub-Programme, Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, International Atomic Energy Agency (IAEA), Vienna, Austria

† These authors jointly supervised this work

* To whom correspondence should be addressed: celia.lutrat@outlook.com, e.marois@unistra.fr

Abstract

Chemical control of the mosquito vectors *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* is costly, unsustainable, and increasingly ineffective due to the spread of insecticide resistance. The Sterile Insect Technique is an autocidal control tactic that represents a valuable alternative but is limited by the slow, error-prone, and wasteful sex-separation stage.

Here, we present four genetic sexing strains (two for each *Aedes* species) based on fluorescence markers linked to the m and M sex loci, allowing the isolation of transgenic males. Furthermore, we show how combining these sexing strains allows the production of non-transgenic males. Scaling-up would allow the sorting of 100,000 neonate male larvae in under 1.5 hour with 0.01-0.1% female contamination. The resulting males present similar survival and flight ability to laboratory-reared wild-type males.

By facilitating the sorting of transgenic or non-transgenic males, these Genetic Sexing Strains should enable a major upscaling in control programmes against these major vectors.

Keywords

Vector control, M-locus, sex loci, *Aedes albopictus*, *Aedes aegypti*, COPAS, sex sorting, Sterile Insect Technique, Incompatible Insect Technique, mosquito control

Introduction

Aedes aegypti and *Aedes albopictus* are invasive mosquito species involved in the transmission of many pathogens including dengue (DENV), chikungunya (CHIKV), Zika (ZIKV) and yellow fever (YFV) viruses ^{1,2}. Driven by climate change and worldwide trade, both vectors are spreading rapidly and it is predicted that 49% of the world population will be at risk of *Aedes*-borne diseases by 2050 in the absence of effective control measures ^{3,4}.

Suppression of mosquito populations using genetic control is one of the most effective, sustainable and environmentally friendly alternatives to insecticide use. It relies on repeated mass releases of male mosquitoes – either sterile (the Sterile Insect Technique, SIT ⁵), *Wolbachia* infected (the Incompatible Insect Technique, IIT ^{6–8}), both ^{9,10}, or carrying a lethal transgene (Release of Insects carrying a Dominant Lethal, RIDL ¹¹.) For all these interventions, an efficient sex separation method is required. Currently, *Aedes* mosquitoes are sexed based on pupal size dimorphism using a Hoch's sorter, which can be either fully manual ^{12,13} or partly automated ¹⁰. In both cases, this method suffers from female contamination rates between 0.8 and 1% and high daily and user-to-user variability ¹⁴. Notably, a multi-step pupal and adult sorter was recently described which allowed $1.13 \times 10^{-7}\%$ female contamination ⁸. However, all these methods sort at a late stage and recover less than half of the reared males ¹³, meaning that > 75% of total pupae are reared and fed in vain.

In *Anopheles* mosquitoes, transgenic genetic sexing strains (GSSs) allowing automated sex separation of young larvae have been described ^{15–17}. Fluorescent markers show male-specific expression, either by using male-specific regulatory sequences or by linking markers to the Y chromosome. One *Anopheles coluzzii* sexing strain is X-linked ¹⁸, rendering females more fluorescent than males. Sex separation is accomplished using a Complex Object Parametric Analyzer and Sorter (COPAS) device, which functions as a flow cytometer, sorting large particles according to their fluorescence. Additionally, as an alternative to the release of transgenic males, a crossing scheme generating non-transgenic male-only populations using COPAS was proposed ¹⁹. This scheme requires a strain carrying a fluorescence marker on the Y chromosome and another carrying a fluorescence marker on the X chromosome. Crossing non-transgenic (X-/X-) females from the first strain to transgenic (X+/Y-) males from the second results in progeny consisting of transgenic (X+/X-) females and non-transgenic (X-/Y-) males.

In *Aedes* mosquitoes, GSSs allowing sex-sorting of transgenic males exist. Two studies have proposed the use of a repressible female-specific flightless phenotype ^{20,21}. In this system, transgenic males and females are released together but adult females do not survive long as they are unable to fly. A method combining such sex-sorting and sterilization has been developed and adapted to *Ae. aegypti* for SIT ^{22,23}. However, this system requires perfect sex-sorting of the parental strains to be crossed, otherwise fertile transgenic mosquitoes (some of them homozygous for a *Cas9* transgene) could be released. Recently, we developed a GSS for *Ae. albopictus* carrying a fluorescence marker within a masculinizing transgenic cassette, allowing automated sorting of transgenic males ²⁴.

Here, we examined if a crossing scheme similar to the one for *Anopheles* could be designed in *Aedes* mosquitoes despite the absence of heteromorphic sex chromosomes. In *Aedes*, sex is encoded by non-homologous sex loci located on the first pair of autosomes. The male locus is called “M”, while the common locus is called “m”; thus, females are m/m and males are m/M. These sex loci are about 1.18 Mbp long in *Ae. aegypti* ²⁵, and are delimited by antagonistic factors that protect them from recombination ^{26,27}. They are embedded within a 63 Mbp region with strong male-female genetic differentiation, in which recombination remains suppressed ²⁸. Consequently, linking a fluorescence marker transgene to the *Aedes* sex loci or to the surrounding non-recombining region might allow automated sorting of either transgenic males directly from an M-linked strain, or of non-transgenic males after crossing hemizygous m-transgenic males with wild-type females (**Figure 1**).

In this work, we developed two GSSs for both *Aedes* vector species, one linked to the M-locus and another to the m-locus, using gene engineering and transgenesis. We show that these GSSs can be used separately to release transgenic mosquitoes or combined to purify large populations of wild-type males. We discuss the suitability of the method for mass-rearing and inundative releases.

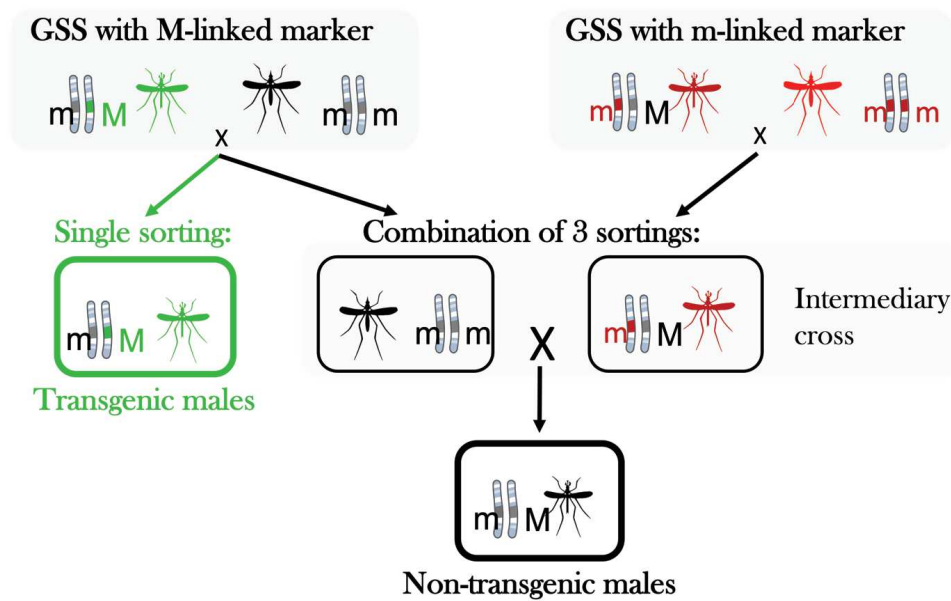


Figure 1: Combination of two GSSs for sorting non-transgenic males. Schematic representation of two sex-sorting strategies. The first (green arrow and rectangle) consists in sorting transgenic males directly from the GSS carrying an M-linked marker. The second (black arrows and rectangles) consists in using the M-linked GSS for sorting non-transgenic females and the m-linked GSS for sorting hemizygous transgenic males. These two sex-sorted populations are then crossed. In their progeny, females are transgenic while males are not. The latter can be sorted for the release of non-transgenic males.

Results

Obtaining four Genetic Sexing Strains

In *Ae. aegypti*, linkage of an *eGFP* transgene to the *m* and *M* loci was achieved by CRISPR-Cas9 knockin targeting the AAEL019619 gene located in the non-recombining region encompassing the sex-loci²⁸ (**Figure 2a-b**, see **Methods** for further details). We isolated an *Ae. aegypti* M-linked strain that we termed Aaeg-M, and an *Ae. aegypti* m-linked strain that we termed Aaeg-m. The *GFP* fluorescence in both lines allows sex separation at the neonate stage: in Aaeg-M, males express *GFP* while females are non-transgenic (**Figure 2c**) and in Aaeg-m, males express one copy of the *GFP* transgene, while females express two copies resulting in brighter fluorescence (**Figure 2d**). Both lines were backcrossed 7 times to a Brazilian genetic background (Bra). In *Ae. albopictus*, M-linkage of fluorescence markers was achieved by *piggyBac* homing stimulated by sequences derived from the *Nix* gene and cloned in the

piggyBac transgenesis plasmid (**Figure 2e**, see **Methods**). This approach yielded at least eight lines with tight M-linkage out of about 60 screened *piggyBac* insertions. Among the tightly M-linked *Ae. albopictus* strains, we selected one expressing YFP, that we termed Aal-M. To obtain a second sexing strain with m linkage in the absence of knowledge of the *Ae. albopictus* m locus sequence, we screened >120 *piggyBac* random insertions (**Figure 2f**). The best m-linked insertion line that we obtained showed a recombination frequency of 0.1%. Its transgenic cassette harboured a *Cas9* transgene associated with a *DsRed* fluorescence marker and was flanked by lox sites. A *Cas9* transgene being undesirable in a sexing strain, we excised it using CRE recombinase and replaced it with an *eGFP* transgene. This *Ae. albopictus* m-linked strain was termed Aal-m. Sequencing of the transposon's flanking genomic sequence indicated that it had landed into a highly repeated region; hence, its exact genomic location could not be identified (see **Methods** and **Supplementary Data 1**). Strikingly, no or weak M-linkage was obtained with these *piggyBac* constructs devoid of *Nix* sequence. Both *Ae. albopictus* transgenic lines show a clear sex-separation pattern in COPAS analyses (**Figure 2g-h**). All four lines were fluorescence-sorted and screened at each generation. In the Aaeg-M line, a single recombination event was observed after 15 generations (>10,000 individuals screened in total). Consequently, we estimated that the Aaeg-M and Aaeg-m lines recombine at approximately 0.01%. In Aal-M, four recombinant individuals were observed in the tenth generation after successively screening a total of >50,000 individuals. These recombinations are likely to have arisen from a single event, suggesting that recombination is extremely rare in the Aal-M strain as well. Of note, all tested recombinants in Aal-M appeared to be sterile.

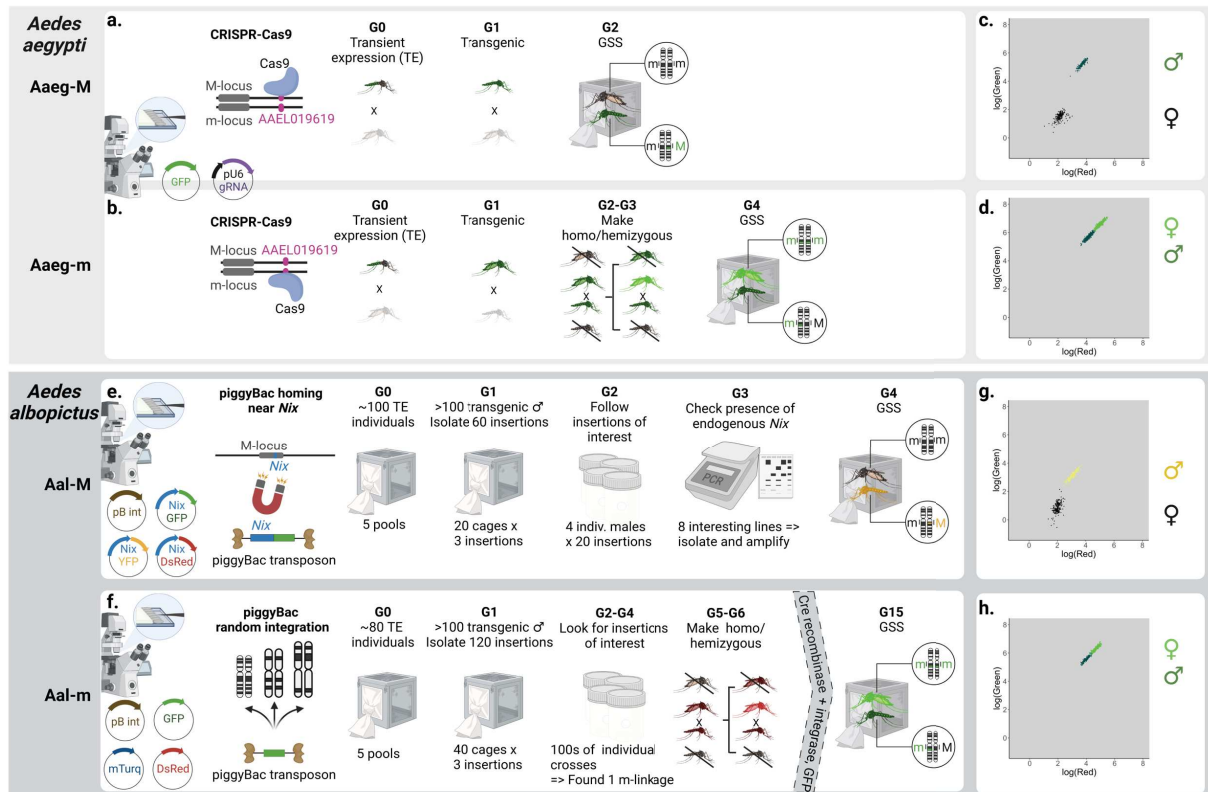


Figure 2: Schematic representation of the procedures used to obtain linkage of a fluorescence marker to the M and m-loci in *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus*. In *Ae. aegypti*, a single CRISPR-Cas9 target was used to obtain an M-linked strain (a) and an m-linked strain (b) in 2 to 4 generations. Both lines allow sex separation using a COPAS flow cytometer (c-d). In *Ae. albopictus*, M-linkage was obtained by *piggyBac* homing near the M-locus in 4 generations, requiring screening and testing (e). “pB int” = helper plasmid expressing *piggyBac* transposase. In *Ae. albopictus*, m-linkage was obtained by *piggyBac* random integration through intensive screening over 6 generations (f). The resulting line was then modified using CRE-recombinase and a *GFP* expressing plasmid docking into the attP site left-over after lox cassette excision. Both Aal-M and Aal-m allow sex separation using a COPAS flow cytometer (g-h).

Combining M and m-linked Genetic Sexing Strains for purifying non-transgenic males

A pilot experiment to obtain non-transgenic males using two GSS was performed in both *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus*. In *Ae. aegypti*, 1,000 negative females from Aaeg-M were COPAS-sorted (Figure 3a) and crossed with 300 COPAS sorted hemizygous males from Aaeg-m (Figure 3b). Their progeny (Aaeg-CS) comprised 65,839 larvae, of which 32,960 were negative and supposedly males (Figure 3c). We COPAS-extracted 2,000 of those, all of which emerged as non-transgenic males. In *Ae. albopictus*, we applied the same crossing scheme using 850 negative females from the Aal-M strain crossed with 250 hemizygous males from the Aal-m strain (Figure 3d-e). In their progeny, we obtained 24,239 Aal-CS larvae, of which 12,173

were negative and presumably males (**Figure 3f**). Of the 2,000 negative COPAS-extracted larvae, 1,468 pupae were recovered and visually verified, revealing the presence of one contaminant non-transgenic female, which is consistent with the estimated 0.1% recombination rate of the Aal-m strain.

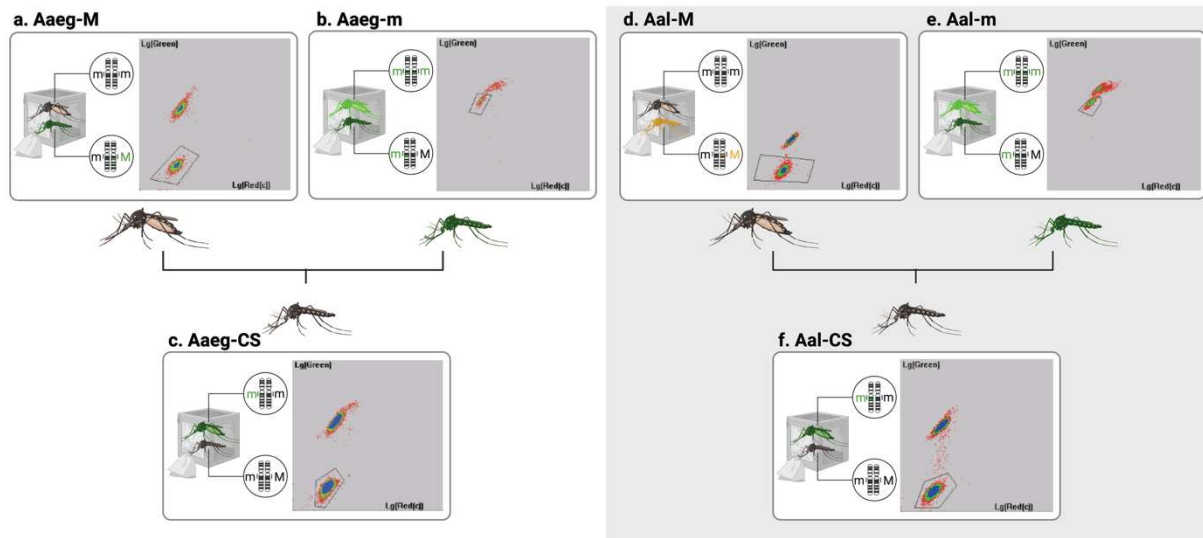


Figure 3: Successive sortings leading to purification of non-transgenic males. All panels show the fluorescence graphs $\log(\text{Green}) = f(\log(\text{Red}))$ displayed by the COPAS software. Gated regions were defined for sorting populations of interest. **a.** Sorting of non-transgenic females from Aaeg-M strain. Total larvae = 6,079. **b.** Sorting of hemizygous transgenic males from Aaeg-m strain. Total larvae = 711. **c.** Sorting of non-transgenic males in the progeny of 1,000 non-transgenic females from Aaeg-M strain crossed with 300 hemizygous transgenic males from Aaeg-m strain. Total larvae = 65,839. **d.** Sorting of non-transgenic females from Aal-M strain. Total larvae = 6,797. **e.** Sorting of hemizygous transgenic males from Aal-m strain. Total larvae = 1,960. **f.** Sorting of non-transgenic males in the progeny of 850 non-transgenic females from Aal-M strain crossed with 250 hemizygous transgenic males from Aal-m strain. Total larvae = 24,239.

Assessing the fitness of the Genetic Sexing Strains

The fitness of the selected M and m-linked lines, as well as of the intermediary colony from the sexing scheme (non transgenic females from the M-linked line crossed with hemizygous transgenic males from the m-linked line), was analysed by examining the following parameters: sex ratio, fecundity (number of eggs per female), egg hatching rate, and survival from larva to adulthood. In *Ae. aegypti*, lines Aaeg-M, Aaeg-m and the intermediary colony from the crossing scheme (Aaeg-CS) showed similar sex ratios to the Bra WT line (**Figure 4a, Supplementary Table 1 and Data 2**). The fecundity of Aaeg-M and Aaeg-m was not different from that of Bra (WT), while Aaeg-CS had a higher fecundity (**Figure 4b**). Aaeg-M eggs hatched similarly to

Bra eggs, while Aaeg-m eggs and Aaeg-CS eggs hatched significantly better (**Figure 4c**). Survival from neonate larvae to adult stages was not significantly different in Aaeg-M, Aaeg-m and Aaeg-CS compared to Bra (**Figure 4d**). In *Ae. albopictus*, the sex ratios of the Aal-M, Aal-m and Aal-CS lines were not significantly different from that of the wild-type line BiA (**Figure 4a**). Aal-M had significantly higher fecundity than BiA (WT), while Aal-m and Aal-CS had similar fecundities to WT (**Figure 4b**). Eggs from the Aal-M and Aal-CS lines had a slightly higher hatching rate than eggs from BiA (WT), while Aal-m eggs hatched similarly (**Figure 4c**). Survival from neonate larvae to adults was marginally increased in Aal-M and Aal-m compared to BiA (WT), while it was not significantly different in the progeny of the crossing scheme (Aal-CS, **Figure 4c**).

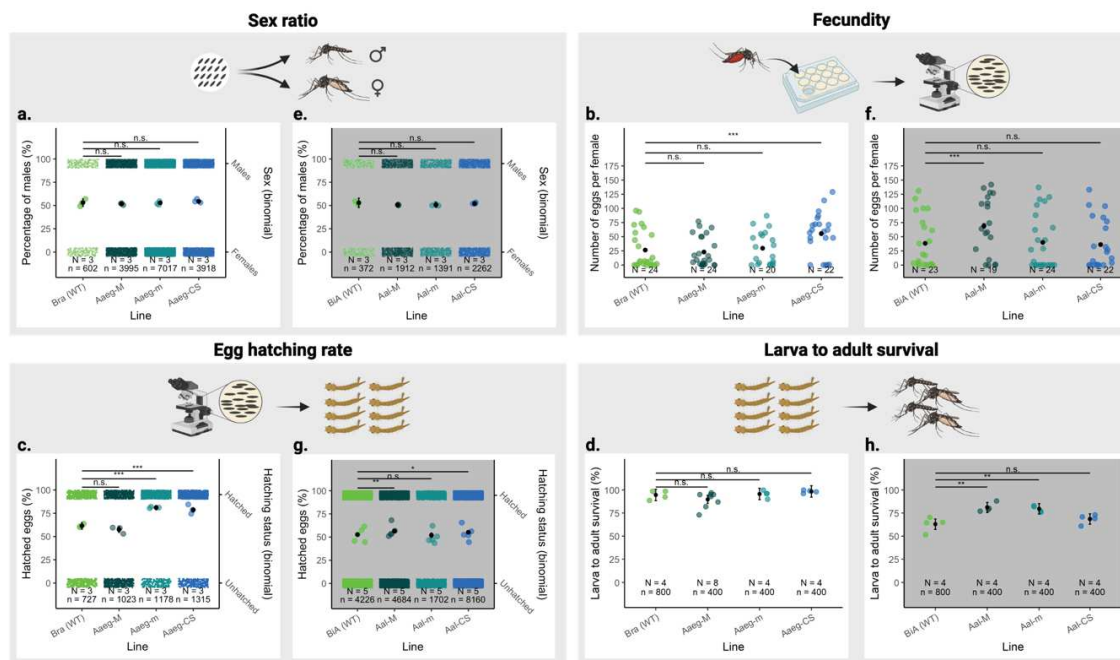


Figure 4: Fitness of the genetic sexing strains and of the intermediary colony yielding non-transgenic males. In all panels, the black dots with vertical bars represent the mean value and the 95% CI in the *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* assays, respectively. The thin coloured dots in the squares above and below estimates represent individual data points (n), while the large coloured dots around estimates represent the mean values of each replicate (N). Significant differences between the lines are specified in the figure (“n.s.”: no significant difference. “*”: p -value < 0.1, “**”: p -value < 0.01, “***”: p -value < 0.001). The percentages of males were compared using a generalised linear model with a binomial distribution in the *Ae. aegypti* (a) and *Ae. albopictus* (e) lines. Comparisons of the mean number of eggs laid by an individual were analysed using a generalised linear model with a Poisson distribution in the *Ae. aegypti* (b) and *Ae. albopictus* (f) lines. Comparisons of the percentage of egg hatch were analysed using a generalised linear model with a binomial distribution in the *Ae. aegypti* (c) and *Ae. albopictus* (g) lines. Comparison of survival from neonate larvae to adult stages were analysed using a linear model with the assumption of residual normality in the *Ae. aegypti* (d) and *Ae. albopictus* (h) lines.

Assessing the fitness of the males to be released

In an operational SIT approach, transgenic males from the M-linked lines or non-transgenic males from the crossing scheme would be intended for release. With this aim in mind, we assessed their fitness through competitiveness assays, flight tests and two-week survival tests under laboratory conditions. In the competitiveness assay between transgenic and non-transgenic males in *Ae. aegypti*, Aaeg-M performed equally to Bra (WT) and Aaeg-CS (**Figure 5a, Supplementary Table 1**). In *Ae. albopictus*, given the higher hatching rate and fecundity of Aal-M compared to BiA (WT) and Aal-CS, equal competitiveness would result in higher than expected percentages of Aal-M in both competitiveness assays. Aal-M showed a 0.59 competitiveness compared to BiA (WT) and a similar competitiveness compared to Aal-CS (**Figure 5b**), which means that both Aal-M and Aal-CS have a reduced competitiveness as compared to WT. In flight tests, *Ae. aegypti* transgenic males and non-transgenic males from the crossing scheme performed as well as control males, while in *Ae. albopictus*, the escape rates of Aal-M males were marginally lower and those of Aal-CS males marginally higher than those of WT, with no significant difference (**Figure 5c-d**). Adult survival was monitored for two weeks and no significant differences were observed between transgenic males, non-transgenic males from the crossing scheme, and males from their respective WT lines (**Figure 5e-f**).

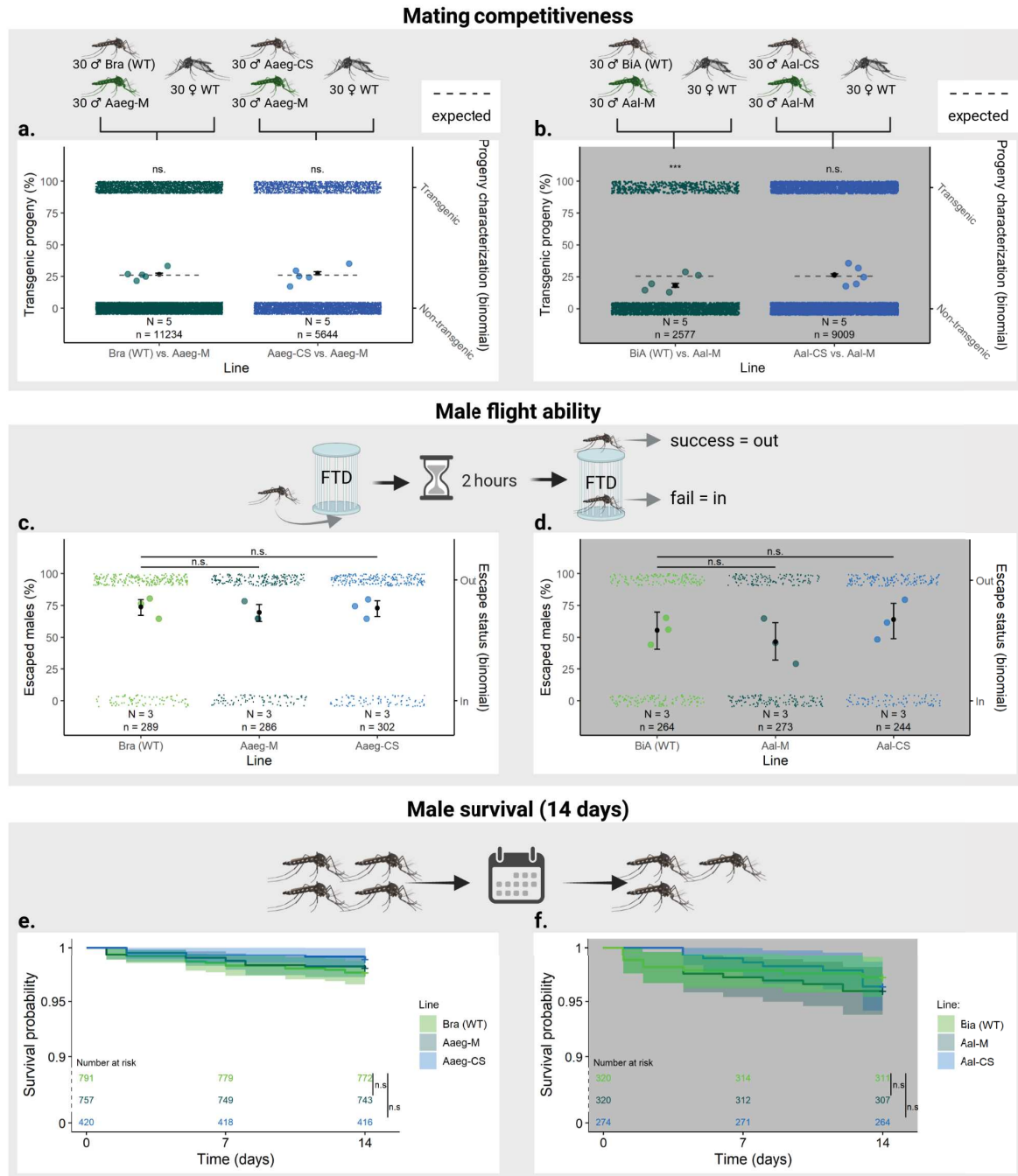


Figure 5: Fitness of transgenic and non-transgenic males as compared to wild type. Black dots with vertical bars represent the mean value and 95% CI in the competitiveness and male flight ability assays. The thin coloured dots in the squares above and below the estimates represent individual data points (n), while the large coloured dots around the estimates represent the mean values of each replicate (N). Significant differences between the lines are indicated in the figure (“n.s.”: no significant difference. “*”: p-value < 0.1, “***”: p-value < 0.01, “****”: p-value < 0.001). The competitiveness of males of the Aaeg-M line relatively to Bra (WT) or Aaeg-CS in *Ae. aegypti* (a) and the competitiveness of males of the Aal-M line relatively to BiA (WT) and Aal-CS in *Ae. albopictus* (b) were compared by measuring the number of transgenic and non-transgenic neonate larvae in the progeny of each of the N = 5 replicates. Results were compared to the percentage expected if transgenic males were as competitive as non-transgenic males (dashed line) and were analysed using a generalised mixed-effects model with a binomial distribution and replicates as a random effect. The flight ability of transgenic and non-transgenic males compared to the wild-type in *Ae. aegypti* (c), and *Ae. albopictus* (d) was tested by N = 3 replicates in a reference flight test

device (“FTD”). The results were analysed using a generalised mixed-effect model with a binomial distribution and replicates as a random effect. Survival of adult males 14 days after emergence was monitored in *Ae. aegypti* (e) and *Ae. albopictus* (f) lines. N=4 replicates were performed for each line. All values being above 90%, the y-axis is discontinuous between 0 and 90% for better visualisation. Male survival at 7 and 14 days was compared using the log-rank test and neither comparison was significantly different.

Determining the ideal COPAS-sorting speed

To assess the reliability of COPAS-sorting for high-throughput mass production of males in a mosquito production facility, we evaluated the contamination rate as a function of sorting speed. A pool of 10,000 Aaeg-CS neonate larvae (fluorescent females + non-fluorescent males) was repeatedly COPAS-sorted and we measured the male recovery rate and the female contamination rate at different sorting speeds. Sorting at a given speed was repeated N = 3 times. We observed that the percentage of recovery decreased from $91.5 \pm 1.4\%$ to $26.9 \pm 1.9\%$ when increasing the sorting speed from 6 to 300 larvae / sec, following a degree-two polynomial regression model ($R^2 = 0.983$), while contamination remained absent below 300 larvae/sec (**Figure 6**). We estimate that an operational speed for sex sorting would be around 60 larvae/sec (which corresponds to 200 larvae/mL in the reservoir water) with a mean recovery rate of $69.6 \pm 1.1\%$ and no female contamination detected among more than 6,500 sorted males. At this speed, a small COPAS reservoir (250mL) holds 50,000 larvae that are sorted in <14 minutes, yielding approximately $17,400 \pm 270$ males (considering a 50:50 sex ratio). Consequently, 100,000 males could be sorted in less than 1.5 hours. The same test run was repeated with *Ae. albopictus* neonate larvae and gave comparable results (**Figure 6**).

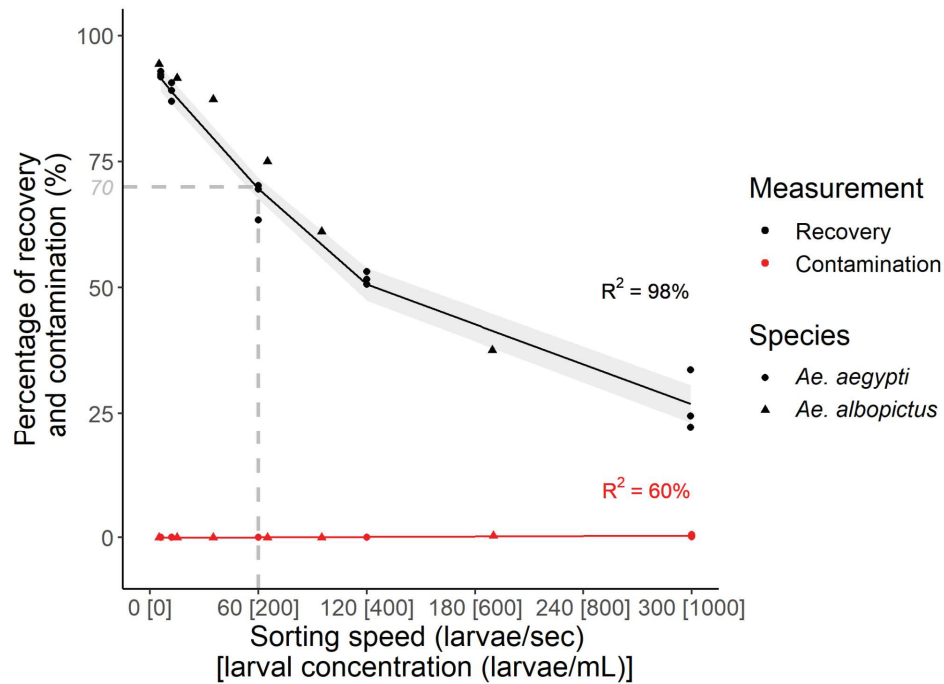


Figure 6: Evolution of male recovery and female contamination rates as a function of COPAS sorting speed. 10,000 *Ae. aegypti* neonate larvae from the crossing scheme were COPAS-sorted at different concentrations, resulting in different sorting speeds. Percentage of recovery (black dots) and percentage of contamination (red dots) were measured on three replicates for each sorting speed. Recovery values were fitted using a degree-two polynomial regression ($R^2 = 0.983$) and contamination values were fitted using a linear regression ($R^2 = 0.556$). The model predictions were plotted by black and red lines, respectively, with 95% confidence intervals ribbons. The same experiment was repeated with 4,000 *Ae. albopictus* neonate larvae from the crossing scheme. In this species, percentage of recovery (black triangles) and percentage of contamination (red triangles) were measured on a single replicate for each sorting speed.

Discussion

In this paper, we present the first genetic sexing strains (GSSs) for *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* based on m/M-linked transgenic fluorescent markers. We show that the M-linked Aaeg-M and Aal-M strains can be used alone to sort transgenic neonate larvae and that the M- and m-linked strains of each species can also be combined to produce a non-transgenic male population by two rounds of sex-sorting (of the parental strains and of the cross' offspring). In *Ae. aegypti*, transgenic males from the M-linked strain and non-transgenic males from the crossing scheme were found to be as fit and competitive as wild-type males of the same laboratory strain. In *Ae. albopictus*, a mild competitiveness reduction was observed in Aal-M transgenic males as well as in Aal-CS non-transgenic males. At a speed of 60 larvae/second

using a COPAS device, we estimate that 100,000 males can be obtained in under 1.5 hour with the current settings, recovering 70% males and with a female contamination of 0.01-0.1%.

Unexpectedly, we observed rare recombination events between the transgene and the M-locus in the Aaeg-M line after screening tens of thousands of larvae. In this line, the transgene is located approximately 9 Mbp from *Nix*, which remains well within the presumed non-recombining region ²⁸. Compared to the probability of recombination between two markers separated by the same distance at regular loci (3.4-4.7% according to the latest genomic information ²⁵), these results confirm that recombination is strongly reduced in this region, but not totally suppressed. Although not yet observed, the Aaeg-m line is expected to recombine at the same frequency as Aaeg-M, as both transgenes are inserted in the same target gene at a similar distance from their respective sex loci. The recombination events imply that these GSSs will require regular purification of the parental colonies to avoid an accumulation of recombinant individuals. Of note, such recombination events are easy to spot in single-sex batches of pupae due to size dimorphism and protandry, which will facilitate regular quality control of each strain.

Although our attempts at knocking-in a GFP marker into the large intron of *Nix* failed (not shown), better GSSs may be constructed by targeting regions closer to or within the sex loci, especially in *Ae. aegypti* which benefits from a fully assembled genome. In *Ae. albopictus*, rare recombination events were also found in Aal-M amongst more than 10,000 individuals screened over 10 generations. For more accurate genome editing, better assembly of the first chromosome would be required in this species. The lack of genetic stability under mass-rearing conditions and the appearance of aberrant sex recombinants have already been reported in the development of GSSs in other insect model organisms ²⁹. Alternatively, the creation of viable homozygous chromosomal inversions overlapping the sex-determining locus and the fluorescent transgene could help suppress crossing-over ³⁰. Finally, we have recently reported that transgenic *Ae. albopictus* pseudo-males masculinised by ectopic expression of *Nix* can be used as Aal-M GSS in which the fluorescent marker will show an absolute linkage to sex ²⁴. This type of GSS is particularly interesting for the production of non-transgenic males, since in this case the wild-type females derived from the Aal-M line and used in the crossing scheme are both non-transgenic and devoid of any recombinant contamination.

Compared to current sex-separation methods in *Aedes* mosquitoes ^{8,10,12}, these GSSs allow a higher male recovery than any other sorting methods based on pupal size (about 70% vs. 30%).

The female contamination rate (0.01 to 0.1% depending on recombination events) is higher than with the Verily's multi-step sorter ⁸, but much lower than with manual¹² or automated¹⁰ glass sorters. Our system offers a sorting speed similar to that of the automated glass sorter, which is higher than that of manual size sorters and multi-step sorters. Compared to all of these currently available methods, the main advantage of our GSSs is to allow sorting at the earliest stage of development, which results in significant savings in space, time and cost otherwise spent on rearing unnecessary individuals. Moreover, reducing the number of females reaching the pupal stage in the mass-rearing facility decreases the biting nuisance for the workers, a problem frequently observed with pupal sorting methods, due to early adult emergences.

Additionally, we propose a crossing strategy that proved to be effective in obtaining non-transgenic males. Compared to sorting pupae by size with glass plates or metal sieves, it has the advantage of automating all sorting steps and achieving much lower female contamination rates. Although it requires the rearing of two strains plus the sorting of males in the mass-rearing facility, this only represents the maintenance of approximately 2% of additional mosquitoes. In comparison to the savings achieved in rearing the released mosquitoes, this is negligible.

Although this work has focussed on the production of *Aedes* males for SIT, the same procedures for the production of transgenic or non-transgenic male could be directly applied in other mosquito control approaches such as IIT, RIDL, pg-SIT or other genetic control methods currently under development.

Of note, GSSs with an m-linked fluorescence marker show less obvious sex separation than M-linked GSSs. However, contamination of the sexing cross with females homozygous for the transgene only results in transgenic progeny that is subsequently eliminated when sorting the non-transgenic males. The release of non-transgenic males from crossbreeding schemes may in fact be more appropriate than the release of transgenic males, since GMO mosquito releases face public opposition and regulatory constraints ³¹. Therefore, costs related to public information and consultation campaigns, stakeholder engagement and compliance with regulatory processes may be reduced. These aspects need to be taken into account as in the past, lack of information and consultation has led to such strong public opposition that some release programmes have had to be cancelled ³¹. Of note, recombination in our GSSs would result in contamination of released males by non-transgenic irradiated females at a rate equal to the recombination rate; however, this release of sterile females would still be much lower as compared to current methods.

We found COPAS errors during the purification of non-transgenic males were extremely rare in our pilot experiments. However, such contaminations may occur due to occasional technical problems, and would result in the release of a small percentage of transgenic mosquitoes amidst the non-transgenic. This should be absolutely avoided in settings where GMOs are banned. An additional quality control step to eliminate any residual GFP fluorescent larvae from the sorted larvae could be achieved by a second COPAS run. It could also be achieved by a visual verification of the sorted larvae under a fluorescence microscope, as GFP positives are easy to spot and eliminate, even among many wild-type larvae.

In conclusion, the four GSSs developed in this work represent a very promising tool for improving the cost-efficiency of *Aedes* mass-rearing in genetic control programmes. According to our laboratory pilot tests, a facility harbouring two COPAS machines could produce 1,000,000 male larvae per day in a 7.5-hours regime. Considering that no females are reared, space constraints would be eased. Moreover, this technique would also reduce the production costs associated with low or no female contamination, facilitating compliance with local regulations. Our results suggest that COPAS sorting of our GSSs would allow a rapid, economical, and safe mass-production of male mosquitoes for SIT and other genetic control methods, with flexible up-scaling possibilities according to local needs, resources and regulations.

Acknowledgements

This study was funded by EU ERC grant CoG—682387 REVOLINC to J.B. The contents of this publication are the sole responsibility of the authors and do not necessarily reflect the views of the European Commission. Mosquito production and insectarium operation were supported by Agence Nationale de la Recherche grant #ANR-11-EQPX-0022 and contrat triennal "Strasbourg capitale européenne" 2019-2021. Part of the mosquito experiments have been performed on the Baillarguet insectarium platform, member of the National Infrastructure EMERG'IN and of the Vectopole Sud network (<http://www.vectopole-sud.fr/>). The Baillarguet insectarium platform is led by the joint units Intertryp (IRD, Cirad) and ASTRE (Cirad, INRAE). E.M. received funding from Agence Nationale de la Recherche through grants #ANR-19-CE35-0007 GDaMO and # 18-CE35-0003-02 BAKOUMBA. R.B. was supported by the International Research Training Group TreeDi funded by the Deutsche

Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation)—319936945/GRK2324. Figures 2, 3, 4 and 5 were designed on BioRender.com.

Author contributions

C.L., T.B., J.B. and E.M. designed research. A.F. contributed genomic data. C.L., M.B., R.P.O. and E.M. performed research. C.L., R.P.O., R.B. and A.F. analysed data. R.B. contributed analytic tools. C.L. wrote the paper with inputs from all authors.

Competing interests statement

The authors declare no competing interests.

References

1. Kassebaum, N. J. *et al.* Global, regional, and national disability-adjusted life-years (DALYs) for 315 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE), 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet* **388**, 1603–1658 (2016).
2. Vanlandingham, D. L., Higgs, S. & Huang, Y.-J. S. *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) and Mosquito-Borne Viruses in the United States: Table 1. *J. Med. Entomol.* **53**, 1024–1028 (2016).
3. Kraemer, M. U. G. *et al.* Past and future spread of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Nat. Microbiol.* **4**, 854–863 (2019).
4. Leta, S. *et al.* Global risk mapping for major diseases transmitted by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Int. J. Infect. Dis.* **67**, 25–35 (2018).
5. Gato, R. *et al.* Sterile Insect Technique: Successful Suppression of an *Aedes aegypti* Field Population in Cuba. *Insects* **12**, 469 (2021).
6. Ahmad, N. A. *et al.* *Wolbachia* strain w AlbB maintains high density and dengue inhibition following introduction into a field population of *Aedes aegypti*. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **376**, 20190809 (2021).
7. Utarini, A. *et al.* Efficacy of *Wolbachia*-Infected Mosquito Deployments for the Control of Dengue. *N. Engl. J. Med.* **384**, 2177–2186 (2021).
8. Crawford, J. E. *et al.* Efficient production of male *Wolbachia*-infected *Aedes aegypti* mosquitoes enables large-scale suppression of wild populations. *Nat. Biotechnol.* **38**, 482–492 (2020).
9. The Project *Wolbachia* – Singapore Consortium & Ching, N. L. *Wolbachia* -mediated sterility suppresses *Aedes aegypti* populations in the urban tropics. <http://medrxiv.org/lookup/doi/10.1101/2021.06.16.21257922> (2021) doi:10.1101/2021.06.16.21257922.
10. Zheng, X. *et al.* Incompatible and sterile insect techniques combined eliminate mosquitoes. *Nature* **572**, 56–61 (2019).
11. Carvalho, D. O. *et al.* Suppression of a Field Population of *Aedes aegypti* in Brazil by Sustained Release of Transgenic Male Mosquitoes. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **9**, e0003864 (2015).
12. Fay, R. W. & Morlan, H. B. A mechanical device for separating the developmental stages, sexes and species of mosquitoes. *Mosq. News* **19**, 144–147 (1959).

13. Papathanos, P. A. *et al.* A perspective on the need and current status of efficient sex separation methods for mosquito genetic control. *Parasit. Vectors* **11**, 654 (2018).
14. Mamai, W. *et al.* *Aedes aegypti* larval development and pupal production in the FAO/IAEA mass-rearing rack and factors influencing sex sorting efficiency. *Parasite* **27**, 43 (2020).
15. Bernardini, F. *et al.* Site-specific genetic engineering of the *Anopheles gambiae* Y chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 7600–7605 (2014).
16. Marois, E. *et al.* High-throughput sorting of mosquito larvae for laboratory studies and for future vector control interventions. *Malar. J.* **11**, 302 (2012).
17. Catteruccia, F., Benton, J. P. & Crisanti, A. An *Anopheles* transgenic sexing strain for vector control. *Nat. Biotechnol.* **23**, 1414–1417 (2005).
18. Volohonsky, G. *et al.* Tools for *Anopheles gambiae* Transgenesis. *G3 GenesGenomesGenetics* **5**, 1151–1163 (2015).
19. Lutrat, C. *et al.* Sex Sorting for Pest Control: It's Raining Men! *Trends Parasitol.* **35**, 649–662 (2019).
20. Labbé, G. M. C., Scaife, S., Morgan, S. A., Curtis, Z. H. & Alphey, L. Female-Specific Flightless (fsRIDL) Phenotype for Control of *Aedes albopictus*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **6**, e1724 (2012).
21. Fu, G. *et al.* Female-specific flightless phenotype for mosquito control. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 4550–4554 (2010).
22. Li, M. *et al.* Suppressing mosquito populations with precision guided sterile males. *Nat. Commun.* **12**, 5374 (2021).
23. Kandul, N. P. *et al.* Transforming insect population control with precision guided sterile males with demonstration in flies. *Nat. Commun.* **10**, 84 (2019).
24. Lutrat, C., Olmo, R. P., Baldet, T., Bouyer, J. & Marois, E. Transgenic expression of Nix converts genetic females into males and allows automated sex sorting in *Aedes albopictus*. *Commun. Biol.* **5**, 1–10 (2022).
25. Matthews, B. J. *et al.* Improved reference genome of *Aedes aegypti* informs arbovirus vector control. *Nature* **563**, 501–507 (2018).
26. Campbell, C. L. *et al.* Alternative patterns of sex chromosome differentiation in *Aedes aegypti* (L). *BMC Genomics* **18**, 943 (2017).
27. Krzywinska, E. *et al.* The sex locus is tightly linked to factors conferring sex-specific lethal effects in the mosquito *Aedes aegypti*. *Heredity* **117**, 408–416 (2016).
28. Fontaine, A. *et al.* Extensive Genetic Differentiation between Homomorphic Sex Chromosomes in the Mosquito Vector, *Aedes aegypti*. *Genome Biol. Evol.* **9**, 2322–2335 (2017).
29. Meza, J. S. *et al.* Comparison of classical and transgenic genetic sexing strains of Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) for application of the sterile insect technique. *PLOS ONE* **13**, e0208880 (2018).
30. Augustinos, A. A. *et al.* Irradiation induced inversions suppress recombination between the M locus and morphological markers in *Aedes aegypti*. *BMC Genet.* **21**, 142 (2020).
31. Panjwani, A. & Wilson, A. What Is Stopping the Use of Genetically Modified Insects for Disease Control? *PLOS Pathog.* **12**, e1005830 (2016).
32. R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing.* (2021).
33. Kassambara, A. & Mundt, F. *factoextra: Extract and Visualize the Results of Multivariate Data Analyses.* (2020).
34. Wickham, H. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis.* (2016).
35. Kassambara, A. *ggpubr: 'ggplot2' Based Publication Ready Plots.* (2020).
36. Gilpatrick, T. *et al.* Targeted nanopore sequencing with Cas9-guided adapter ligation. *Nat. Biotechnol.* **38**, 433–438 (2020).
37. Kearse, M. *et al.* Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* **28**, 1647–1649 (2012).
38. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403–410 (1990).
39. Palatini, U. *et al.* Improved reference genome of the arboviral vector *Aedes albopictus*. *Genome Biol.* **21**, 215 (2020).
40. Schneider, C. A., Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* **9**, 671–675 (2012).

41. Culbert, N. J. *et al.* A rapid quality control test to foster the development of genetic control in mosquitoes. *Sci. Rep.* **8**, 1–9 (2018).
42. Hothorn, T., Bretz, F. & Westfall, P. Simultaneous Inference in General Parametric Models. *Biom. J.* **50**, 346–363 (2008).
43. Bates, D., Mächler, M., Bolker, B. & Walker, S. Fitting Linear Mixed-Effects Models Using **lme4**. *J. Stat. Softw.* **67**, (2015).
44. Therneau, T. M. & Grambsch, P. M. Modeling Survival Data: Extending the Cox Model. *Stat. Med.* **20**, 2053–2054 (2001).
45. Therneau, T. M. *A Package for Survival Analysis in R.* (2021).
46. Kassambara, A., Kosinski, M. & Biecek, P. *survminer: Drawing Survival Curves using 'ggplot2'.* (2021).
47. Lüdtke, D. *et al.* *performance: Assessment of Regression Models Performance.* (2020). doi:10.5281/ZENODO.3952174.

Methods

Mosquito rearing

The *Ae. albopictus* wild-type colony (called BiA) was established from larvae collected in Bischheim (France, 48.36°N 07.45°E) in 2018. *Ae. aegypti* from the Bangkok genetic background obtained from MR4-BEI were used for molecular cloning and genetic engineering. *Ae. aegypti* strain BgR9, derived from Bangkok, and expressing *Cas9* under the control of the Exuperentia promoter and a *DsRed* reporter gene under the *AePUB* promoter was used for CRISPR/Cas9 knock-in experiments. The Bra *Ae. aegypti* strain originated from Juazeiro, Brazil and was provided to the IPCL in 2012 by Biofabrica Moscamed, a collaborative centre of the IAEA on the development of the SIT against mosquitoes. It was used for backcrossing the sexing transgenes.

Mosquitoes were maintained in standard insectary conditions (25–28°C, 75–80% relative humidity, 14-hr/10-hr light/dark cycle). Larvae were reared in 35 cm square pans in 1 L distilled water and daily fed ground TetraMin fish food. Adult mosquitoes were kept in 16x16x16-cm cages and provided a 10% sugar solution. Females were blood-fed on anaesthetised mice. Eggs were laid on humid kraft paper and hatched or dried after 3 days.

Plasmid construction

Plasmid construction was done using standard molecular biology procedures including PCR amplification of genomic DNA using Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (F530, Thermo Scientific, France), cloning with NEBuilder® HiFi DNA Assembly (New England Biolabs, France), GoldenGate cloning in destination backbones using Anza 36 Eco31I

restriction enzyme (Thermo Fisher Scientific, France), transformation in competent *Escherichia coli* bacteria, and Miniprep or Endo-Free Midiprep plasmid purifications (Macherey Nagel, France). For CRISPR/Cas9 knock-in in the *Ae. aegypti* M and m loci, we used plasmid pX4 and pX3 as repair donors, respectively (**Supplementary Data 3**, Addgene #183903 and #183904). For *piggyBac* integration near the *Ae. albopictus* M locus yielding the Aal-M strain, we used plasmid ppBAalbNixE1E3E4 PUB-YFP (Addgene #173666 described in ²⁴). For random *piggyBac* insertion near the m locus, we used plasmid ppBExu-Cas9-sv40 (Addgene #183905), the lox cassette of which (encompassing *Cas9* and PUB-*DsRed*) was subsequently excised from the genome by injection of a plasmid expressing Cre recombinase under the control of the PUB promoter, and replaced by inserting plasmid pENTR-attB-PUB-GFP (Addgene #183911) into the *attP* site by co-injecting it with a plasmid expressing integrase from phage PhiC31 (Addgene #183966).

Microinjection

Injection mixes were composed of 400ng/μL of DNA in 0.5x PBS. *piggyBac* injection mixes were prepared as described in ¹⁸. For CRISPR-Cas knock-ins, the initial mix injected into the BgR9 *Ae. aegypti* Cas9-expressing line comprised 84 μM gRNAs, 100 ng/μL repair plasmid and 2μM Scr7. Given the very low number of transgenics obtained (1 individual out of >20,000 screened larvae), we later injected the repair donor plasmid (190 ng/μL) with 5μM Scr7 and three plasmids expressing different gRNAs under the control of different *AeU6* promoters (70ng/μL each plasmid). This method gave significantly higher knock-in rates (25 GFP positive larvae out of about 4000 screened).

Embryo microinjection was performed essentially as published using a Nikon Eclipse TE2000-S inverted microscope, an Eppendorf Femtojet injector and a TransferMan NK2 micromanipulator ¹⁸ with the following modifications: eggs were hatched 3-8 days post-injection and neonate larvae were screened under a Nikon SMZ18 fluorescence microscope, only larvae showing transient expression of the reporter gene were retained for subsequent outcross.

***Ae. aegypti* transgenesis**

For targeting the sex loci, we exploited the work of Fontaine *et al.* showing a cluster of markers inside a non-recombining 63 Mbp region encompassing the sex loci with high male-female genetic differentiation and male heterozygosity consistent with Y chromosome-like null alleles²⁸ (**Supplementary Table 3**). DNA sequences of these markers with putative Y-linked-like null alleles were blasted on the assembled AegL5 genome²⁵ to identify a 4.9 Mb region extending from 160,092,339 bp to 165,014,624 bp on chromosome 1 in the AegL5 assembly. Within this non-recombining region we picked the gene AAEL019619, located ~9Mbp away from *Nix*. We used the CRISPR/Cas9 system to knock-in a 2.3 kb fluorescence marker cassette (*eGFP* marker under the *Ae. aegypti* poly-Ubiquitin promoter - PUB) flanked by 850-960 bp homology arms either within the fifth, 9 kb-intron of this gene (pX3 construct), or to create a synthetic intron within exon 5 (pX4 construct). We obtained a first M-linked strain for *Ae. aegypti* following the injection of 200 eggs of the BgR9 strain, which expresses *Cas9* under control of the *Exuperentia* promoter, with the pX4 repair plasmid and two synthetic gRNAs (GATGAATCATGGGGCGCCT[GGG] and GATTCATCAATCAACGGAG[CGG], brackets indicate PAM). About 30 G0 larvae showing transient GFP expression were crossed *en masse* to an excess of wild-type mosquitoes. Out of > 20,000 G1 larvae screened, a single transgenic male larva was found, raised to adulthood, and crossed to WT females. Its progeny was composed of 100% eGFP positive sons and 100% eGFP negative daughters, indicative of M linkage. We termed this *Ae. aegypti* M-linked strain Aeg-M. Upon injection of 600 BgR9 eggs with the pX3 repair plasmid and a mixture of three plasmids expressing gRNAs (GTGGCATAGCGCCGTGTGGA[GGG], GTCTTAAATGAAAGAGGCG[AGG], GTATCATGCGTATTGCGAG[AGG]) under the control of three different U6 promoters (gRNA cloning vectors: **Supplementary Data 3**), 43 larvae with transient eGFP expression were recovered in G0. Resulting 20 males and 20 females were crossed *en masse* to adults of the opposite sex. 25 transgenic G1 larvae were obtained, 10 of which were males carrying an M-linked insertion, 4 were males carrying an m-linked insertion and 11 were females carrying an m-linked insertion. Proper insertion site in AAEL019619 was confirmed by PCR in all tested individuals, which revealed that in some of these mosquitoes the whole repair plasmid had integrated. From a single male devoid of the plasmid backbone, an *Ae. aegypti* m-linked strain named Aeg-m was established and further characterized. Both Aeg-M and Aeg-m lines were backcrossed into a Brazilian (Bra) genetic background for 7 generations.

***Ae. albopictus* transgenesis: obtaining M-locus linked strains**

Following several unsuccessful attempts to knock-in a fluorescence marker near the *Ae. albopictus* *Nix* gene using the CRISPR/Cas9 system, we took advantage of the frequent spontaneous insertion near the M locus of *piggyBac* transposon constructs carrying *Nix* DNA sequences that we previously reported ²⁴. In the course of several transgenesis experiments, using *piggyBac* constructs carrying *Nix* sequences, we obtained 12 independent transgenic insertions with apparent M-linkage of the transgenesis reporter (100% fluorescent males) in addition to several *Nix*-expressing masculinized female lines and to non-M linked, non-masculinizing insertions. From the third generation on, these lines were amplified to confirm their M-linkage and estimate their recombination rate. Six lines showed no recombination out of >700 individuals screened in each line until the sixth generation (**Supplementary Table 4**). Most other M-linked lines also showed 100% fluorescent males but contained additional, non-M-linked multiple insertions and were discarded. Based on line fitness and COPAS profiles, we selected an YFP line termed Aal-M for further work as an *Ae. albopictus* M-linked strain. Additional M-linked lines marked with OpIE2-GFP or Pub-DsRed showing no recombination to date, carrying a docking *attP* site for subsequent transgenesis, and representing additional GSSs are also being maintained to date but were not further characterized in detail.

***Ae. albopictus* transgenesis: obtaining an m-locus linked strain**

We first attempted to obtain an m-linked fluorescence marker by screening through >120 random *piggyBac* insertions as described. For this, we screened our existing collection of *Ae. albopictus* transgenic lines for m/M-linkage and constructed an additional library of *piggyBac* constructs expressing various fluorescence proteins (eGFP, mTurquoise2, YFP or DsRed) under the control of promoters showing distinct expression patterns (3xP3, OpIE2, *Ae. aegypti* PUb, *Drosophila melanogaster* actin5C). By performing multiplex injections of these *piggyBac* plasmids together, we obtained lines carrying up to six distinct insertions as indicated by their colours and patterns of fluorescence. Out of 40 independent founder transgenic individuals screened (most of which carrying multiple insertions), only two insertions appeared m-linked: one carried an OpIE2-mTurquoise2 marker gene with a recombination rate of about 3%, and the other, called m-albR9, carried a *Cas9* transgene with a *DsRed* reporter gene and showed a recombination rate of 0.1%. We exploited the latter, in which transgenes are flanked by two *lox* sites adjacent to an *attP* docking site. We injected m-albR9 eggs with a plasmid encoding Cre recombinase to excise *Cas9* and *DsRed* transgenes, as *Cas9* is undesirable in a GSS. From

successfully excised individuals, we established an m-linked *attP* docking line, mX1, carrying no further transgene. In a second step, an *attB*-containing plasmid carrying a PUb-eGFP marker cassette was integrated into the *attP* site. The m-linkage of this new strain was verified by crossing eGFP males to WT females and screening their offspring. The new *Ae. albopictus* m-linked line, named Aal-m was made hemi/homozygous and amplified.

Automated larva sorting

Automated sorting of neonate larvae depending on their fluorescence level was performed using a large-object flow cytometer named Complex Object Parametric Analyzer and Sorter (COPAS SELECT; Union Biometrica, Belgium) as published ¹⁶, with the provided Biosort software. Sorting accuracy was controlled under a Nikon SMZ18 fluorescence microscope.

Analysis of COPAS outputs

To determine the exact number of larvae in COPAS clusters, we built a clustering algorithm based on manual outlier screening of particle size and fluorescence distribution, and an automated clustering algorithm. All data handling and statistical calculations were performed using the R statistical software version 4.1.0 ³². All R scripts used for this project can be found in our GitHub repository (https://github.com/Celia-Lutrat/Lutrat-et-al_2022_GSS). Briefly, COPAS raw data were filtered by the user via the visual examination of the individuals' size measurements (i.e., “log(EXT)” and “log(TOF)”) to remove outliers (e.g., egg debris and dust). A second filtering was performed on the two first axes of a Primary Component Analyses (PCA) applied to the size variables (EXT and TOF). A third manual filter was applied by examination of the individuals' fluorescence (i.e., “log(first fluorescence)” and “log(second fluorescence)”) . A final filtering was performed on the two first axes of a PCA applied to fluorescence variables. PCA analyses were performed using the R function ‘prcomp’ from the package ‘stat’ ³² and the PCA outputs were extracted using the R package ‘factoextra’ ³³. Filtered data were clustered using the R function ‘kmeans’ from the R package ‘stat’ ³². Data were plotted using the R packages ‘ggplot2’ and ‘ggpubr’ ^{34,35}.

Targeted sequencing method

Genomic DNA was extracted using NEB Monarch HMW DNA extraction kit (T3060, New England Biolabs, France) according to manufacturer instructions with the following modifications: after addition of isopropanol, precipitated DNA was caught directly on a pipette tip and transferred to a new tube containing 550 µl wash buffer and then to a final tube containing 70% ethanol. DNA was stored in 70% ethanol at 4°C until use. On the day of use, ethanol was removed and DNA was resuspended in water at 37°C with 500rpm agitation and gentle pipetting. DNA concentration was then measured using a Nanodrop One device (Ozyme, France).

Sequencing method was adapted from the Nanopore Cas9 Targeted Sequencing (nCATS ³⁶). gRNAs were selected in the known transgene region, with their PAMs towards the unknown genomic sequence to be determined. This orientation ensured preferential ligation of Nanopore adapters on DNA strands of interest.

Adapter ligation and library preparation were performed using the LSK109 kit (Oxford Nanopore Technologies, UK) according to manufacturer instructions. Library was loaded on Flongle flow cells. Sequencing, basecalling and alignment of reads to the transgenesis plasmid were performed using the provided MinKNOW v. 21.06.10 software (Oxford Nanopore Technologies, UK). Reads that showed homology to the transposon ends were then aligned to the transposon sequence using ClustalW on Geneious software v9.1.8 ³⁷ and one or several consensus sequences were determined. Finally, the consensus sequences were compared to genomic data using the online NCBI BLAST service ³⁸.

This method allowed us to determine the insertion site of the Aal-m transgene. We obtained only two low-quality reads extending by about 20 kb into the genomic sequence adjacent to the transgene, from which we designed a series of PCR primers. Sanger sequencing of PCR products spanning the transposon/genomic junction allowed us to refine 1647 bp of the flanking sequence, provided in **Supplementary Data 1**. Analysis of this sequence using NCBI BLAST showed only partial alignment to sequences of the AalbF2 genome ³⁹, presumably corresponding to a repetitive element, suggesting that the m-linked region where the transgene inserted is not represented in the available genome assemblies.

Assessment of lines' fitness

In transgenic lines, the sex ratio was measured by COPAS counting of the larvae of each fluorescence. In non-transgenic lines (BiA and Bra), we reared samples to the pupal stage and counted males and females under a binocular microscope based on genitalia examination. N=3 replicates were made for all lines.

For fecundity, males and females were allowed to mate for several days. Cages were then offered a blood meal and engorged females were selected and placed in a separate cup. After 2 days, engorged females were shortly anesthetised using CO₂ and placed individually in 24-well plates coated with wet filter paper. After 2 days, females were released and each well was photographed under a Zeiss SteREO binocular microscope. Eggs laid by each female were counted using the ImageJ software ⁴⁰.

Egg hatching rate was measured on egg samples collected from N=3-5 cages of each line, photographed under a Zeiss SteREO binocular microscope and counted using the ImageJ software ⁴⁰. Eggs were immersed in water, placed into a vacuum chamber for 20 to 30 minutes and allowed to hatch overnight. The following morning, larvae were counted by COPAS.

Larva to adult survival was measured by sorting N=4-8 samples of 100-200 neonate larvae by COPAS and rearing them to adulthood. The number of adults emerging from each batch was counted manually.

Assessment of males' fitness

Males' competitiveness was assessed by placing 30 transgenic males with 30 non-transgenic males in a cage with 30 females and measuring the proportion of transgenic progeny in their offspring. If both types of males are of similar fitness, it is expected that the progeny would be composed of ~25% transgenic individuals, corrected by the line sex ratio (transgenic fathers being hemizygous). Relative competitiveness was estimated by comparing the observed proportion of transgenic progeny to the theoretical value in N=4 or N=5 replicates.

Males' flight ability was assessed using a flight test device (FTD) as described ⁴¹. Tests were performed on pools of about 100 males with N = 3 replicates for each condition.

Males' 2-week survival was measured by counting the daily number of deaths in N=4-8 cages of ~100 males of each line for 14 days.

Statistical analysis

All data statistical analyses were performed using the R statistical software version 4.1.0 ³², the R scripts used for this study can be found in our GitHub repository (https://github.com/Celia-Lutrat/Lutrat-et-al_2022_GSS).

The difference of sex ratio and egg hatching rate between the lines of each species was modelled using the generalised model with binomial distribution and residuals distribution normality assumption (R function ‘glm’ ³²), and pairwise comparison of the lines was tested using a Tukey HSD test (R function ‘glht’ ⁴²). The difference in fecundity (number of eggs laid per female) between the lines of each species was modelled using a generalised model with Poisson distribution and residuals distribution normality assumption (R function ‘glm’), and a pairwise comparison of the lines was tested using a Tukey HSD test (R function ‘glht’). The differences in larval survival between the lines of each species was modelled using linear models with residuals distribution normality assumption (R function ‘lm’ ³²), and tested using a Tukey HSD test (R function ‘TukeyHSD’ ³²). The difference in male competitiveness and flight ability between the lines of each species was modelled using the generalised mixed-effect model with binomial distribution and residuals distribution normality assumption (R function ‘glmer’ from the package ‘lme4’ ⁴³), where technical replicates were set as random factor. Pairwise comparisons between lines were tested using a Tukey HSD test (R function ‘glht’). Male adult survival during the first 14 days was modelled using Cox regressions and Kaplan Meir formula (function from the R packages ‘survminer’, ‘survival’ ^{44–46}). Differences in survival at 7 and 14 days were modelled using linear models with residuals distribution normality assumption (R function ‘lm’) and tested using a Tukey HSD test (R function ‘TukeyHSD’). Model performances were assessed using the R function ‘check_model’ from the package ‘performance’ ⁴⁷. The packages used, data handling procedures, models structure, fit and performances can be found in **Supplementary Data 2**.

Data availability

All plasmid sequences are available in **Supplementary Data 3**. Plasmids are available from Addgene under reference numbers #173666, #183903, #183904, #183905, #183911, #183912, #183913, #183914 and #183966. Mosquito strains are available upon request from EM. All data needed to evaluate the conclusions in the paper are present in the paper and/or in the **Supplementary Information**.

Animal care

Animal care was in accordance with CNRS guidelines and approved by the CREMEAS ethics committee.

4.3 Conclusion du chapitre 3

Ainsi, dans ce travail, nous présentons les premières souches de sexage génétique marquant d'un transgène fluorescent les loci sexuels chez deux espèces d'*Aedes* d'intérêt majeur en santé publique. Nous présentons également une preuve de principe du protocole permettant de trier des mâles non-transgéniques. Nos tests préliminaires réalisés en conditions expérimentales en insectarium montrent que ces souches transgéniques ont un fitness comparable à celui des souches sauvages. Les mâles transgéniques et non-transgéniques triés présentent également des performances similaires aux mâles sauvages, à l'exception des mâles *Ae. albopictus* au locus M marqué (Aal-M), lesquels voient leur compétitivité légèrement réduite.

Par rapport aux critères de jugement que nous avons identifiés au chapitre 1 pour le développement d'une méthode de sexage chez les moustiques *Aedes*, ces souches de sexage génétique représentent une amélioration significative de la plupart des paramètres. En effet, le tri s'effectue au stade de larve néonate, soit immédiatement après l'éclosion des œufs. De cette manière, les individus non conservés sont éliminés avant qu'ils ne coûtent en frais d'élevage. Le taux de recouvrement des mâles est également accru : en effet, selon la vitesse de tri ce taux peut aller jusqu'à 98 % des mâles initiaux, sachant que dans le cas présent, les mâles « perdus » ne représentent une perte économique que vis-à-vis du dimensionnement des colonies parentales. Quant au taux de contamination par des femelles, il dépend ici de deux facteurs : d'une part les performances des souches, lesquelles recombinent à des taux compris entre 0,01% et 0,1%, taux qui pourraient être largement réduit par le développement de GSS aux transgènes plus proches des loci sexuels, et d'autre part les performances de l'appareil de tri. Le tri s'effectue à l'aide d'un COPAS, un cytomètre en flux permettant de trier des objets de diamètre allant jusqu'à 750µm sur la base de leur taille et de l'intensité de leur fluorescence. Ce dernier s'est montré fiable pour trier des échantillons de 20 000 larves jusqu'à des vitesses d'environ 100 larves par seconde. La vitesse de tri est, quant à elle, compatible avec un fonctionnement opérationnel : à la vitesse de 60 larves par secondes, laquelle permet de récupérer environ 70 % des mâles et à laquelle nous ne détectons pas d'erreur de tri due à l'appareil, un seul appareil permet d'obtenir 1 million de mâles en moins de 15h. L'appareil trierait de manière autonome et nécessiterait simplement 10 remplissages du plus grand modèle de contenant d'échantillon (1,5L). Avec deux appareils en parallèle, une seule journée de travail serait nécessaire à l'obtention d'un million de mâles au stade néonate.

A l'heure actuelle, les méthodes manuelles permettent d'obtenir un million de nymphes mâles en 18h de tri, contaminés par environ 1% de femelles (revu dans Lutrat et al. 2019).

Le coût initial d'achat et d'entretien d'un tel appareil est supérieur à celui des méthodes manuelles actuelles. Néanmoins, ces souches permettraient des économies à court et long terme dans les élevages de masse et des appareils similaires moins coûteux sont en cours de développement.

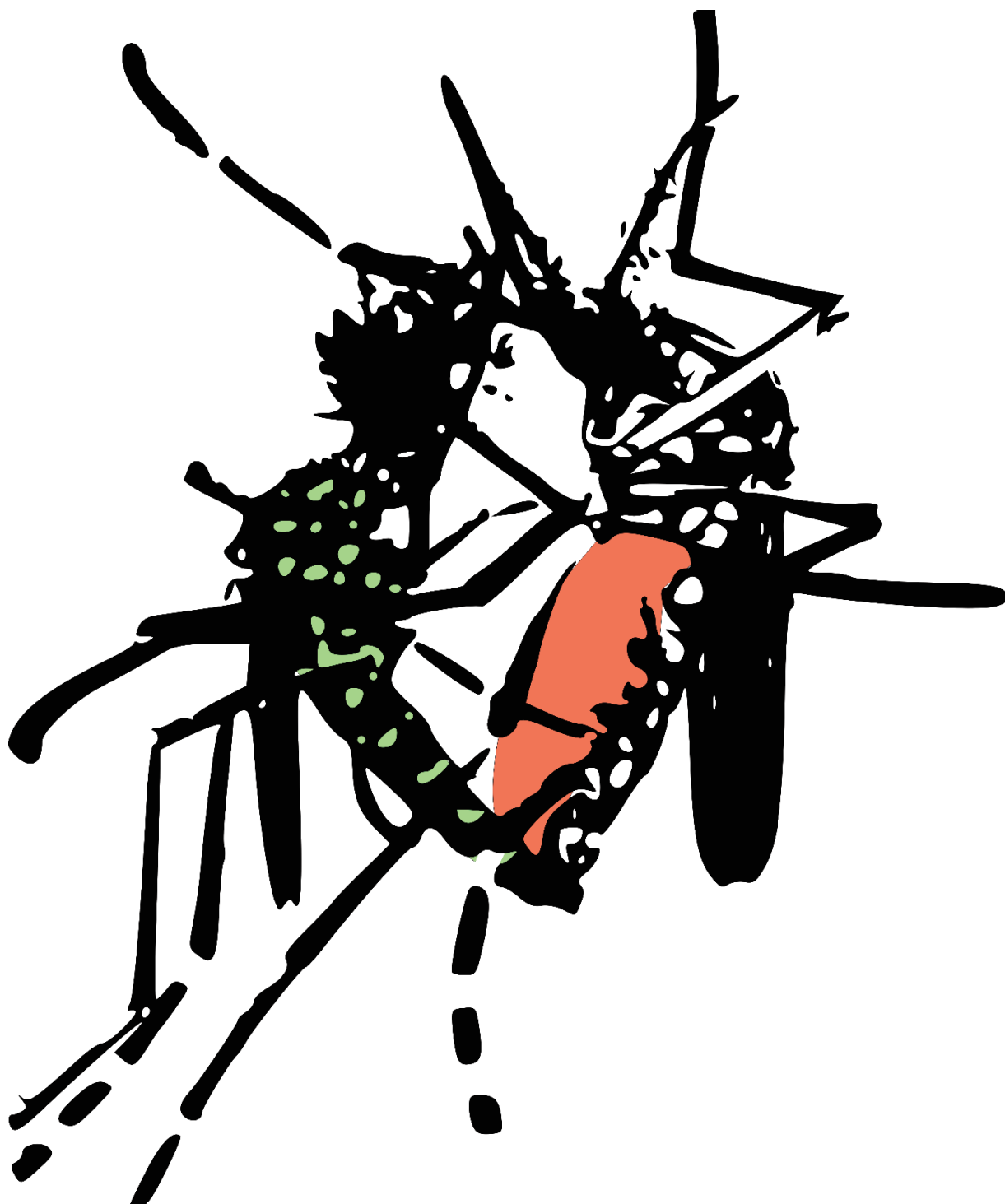
D'un point de vue environnemental, il n'y aurait pas, à notre connaissance, de différence liée au remplacement des souches sauvages par des souches transgéniques dans l'élevage de masse. En effet, les GSS expriment une protéine de fluorescence (la GFP, et son mutant la YFP) d'origine naturelle, issue de la méduse *Aequorea victoria*, qui n'aurait *a priori* pas d'impact néfaste sur l'environnement si des résidus étaient présents dans les eaux usées. Le COPAS, quant à lui, ne nécessite que de l'eau et de l'air comprimé. En outre, ces GSS permettraient un dimensionnement optimisé des usines d'élevage de masse, réduisant ainsi le gaspillage d'énergie. De plus, la nuisance liée à l'émergence des nymphes femelles dans le système de tri actuellement pratiqué serait totalement éliminée, améliorant ainsi considérablement les conditions de travail du personnel. Enfin, nous proposons pour leur utilisation une méthode transgénique et une méthode non-transgénique. Cette dernière requiert le passage par des colonies intermédiaires de taille modérée mais permet tout de même d'automatiser les différentes étapes de tri du processus, limitant ainsi le surcoût relatif.

Enfin, si ces GSS devaient être amenées à être utilisées pour des lâchers de terrain, nous avons dressé une liste des problèmes qui pourraient éventuellement être rencontrés et de clés de résolution dans le **Tableau 6**.

Tableau 6: Problèmes potentiels liés à l'utilisation des souches de sexage génétique et solutions recommandées.

Problème	Probabilité d' occurrence	Conséquences	Résolution
Phénomène de recombinaison	0.01-0.1%	Pour lâchers de mâles transgéniques: contamination par des femelles transgéniques à une fréquence égale au taux de recombinaison. Noter que ces femelles sont stériles et que leur probabilité de piquer est réduite *.	Lâcher ces femelles à très faible densité ne représente pas un problème pour la TIS car <<1%.
		Pour lâchers de mâles non transgéniques: contamination par des femelles non-transgéniques. Noter que ces femelles sont stériles et que leur probabilité de piquer est réduite *.	Lâcher ces femelles à très faible densité ne représente pas un problème pour la TIS car <<1%.
		Dans les deux cas : risque d' accumulation progressive de recombinants et donc d' augmentation du taux de contamination.	Séparer les sexes par COPAS à chaque génération des lignées parentales pour contrôle qualité.
Erreurs de COPAS	Rare	Pour lâchers de mâles transgéniques: contamination par des femelles WT à une fréquence égale au taux d' erreurs du COPAS. Noter que ces femelles sont stériles et que leur probabilité de piquer est réduite *.	Lâcher ces femelles à très faible densité ne représente pas un problème pour la TIS car <<1%.
		Pour lâcher de mâles non transgéniques: contamination par des femelles transgéniques. Noter que ces femelles sont stériles et que leur probabilité de piquer est réduite *.	Contrôler sous loupes binoculaire à fluorescence ou repasser au COPAS pour extraire les contaminants.
Silencage du transgène	Très rare	Pour lâcher de mâles non transgéniques: contamination par des femelles transgéniques dont le transgène est devenu invisible. Noter que ces femelles sont stériles et que leur probabilité de piquer est réduite *.	Limiter le phénomène par le contrôle qualité des souches parentales.

*Voir Aldridge et al. 2020



5 Discussion générale

5.1 Synthèse des résultats principaux

Aedes aegypti et *Aedes albopictus* sont deux espèces de moustiques invasives majeures et impliquées notamment dans la transmission des arbovirus de la fièvre jaune, de la dengue, du chikungunya et de Zika. Leur contrôle repose actuellement sur des méthodes peu durables et peu efficaces compte tenu de la biologie de ces espèces. Le contrôle génétique représente une alternative prometteuse, qui a fait ses preuves lors de nombreux essais de terrain, mais dont la mise en place opérationnelle reste freinée par des coûts importants et une logistique contraignante, notamment quant à l'étape de séparation des sexes. Aussi, l'objectif de ma thèse était de développer des méthodes permettant d'améliorer l'étape de sexage pour le contrôle génétique d'*Ae. aegypti* et d'*Ae. albopictus*.

Dans le premier chapitre, j'ai recensé et comparé les différentes méthodes de sexage développées chez les diptères au cours des 15 dernières années. Les critères pris en compte pour comparer les méthodes de sexage étaient les suivants : le stade de développement auquel le tri est effectué, le taux de recouvrement des mâles, la contamination par des femelles, la vitesse de tri, la durabilité et l'innocuité pour l'environnement, ainsi que l'acceptabilité des mâles obtenus en fonction de leur nature (génétiquement modifiés ou non). Ce travail m'a permis d'identifier les forces et les faiblesses de chaque méthode, et de dégager des pistes de travail pour la suite de ma thèse. Parmi celles-ci, nous avons retenu puis écarté la méthode par ingestion d'ARN double-brin (Whyard et al. 2015), que nous avons jugée trop sujette à variations après plusieurs essais infructueux. Faute de candidat suffisamment prometteur, nous avons également mis de côté la recherche d'un promoteur répondant à un stimulus chimique dans l'eau d'élevage des larves d'*Aedes* sur le modèle des travaux utilisant la tétracycline (Ogaugwu, Schetelig et Wimmer 2013; Schetelig et Handler 2012; Yan, Linger et Scott 2017) ou la dieldrine (Yamada et al. 2012) mais avec des composants moins nocifs pour l'environnement (Yamada et al. 2013). Nous nous sommes alors concentrés sur le développement de souches de sexage génétique (GSS) basées sur l'association d'un gène de fluorescence à un locus sexuel (Bernardini et al. 2014).

Pour ce faire, nous avons souhaité, dans un deuxième chapitre, mieux comprendre le rôle et le fonctionnement de *Nix* chez *Ae. albopictus*, gène central du locus sexuel mâle et prédit comme étant le gène initiateur de la cascade de détermination du sexe. Aussi, nous avons injecté des embryons avec des plasmides de transgénèse portant une des quatre isoformes

principales de *Nix* (Liu et al. 2019) accompagnée d'un marqueur fluorescent. Parmi les transgéniques obtenus, nous avons observé de nombreux cas de masculinisation partielle à totale, et avons pu établir des lignées stables de génotype m/m dans lesquelles les mâles phénotypiques résultaient de l'expression du gène *Nix* apporté par la cassette transgénique. Ces pseudo-mâles avaient un succès reproducteur similaire aux mâles génétiques lorsque testés séparément, avec toutefois une moindre compétitivité lorsque mis en compétition avec des mâles sauvages pour l'accouplement. Les résultats de ces travaux différant de ce qui avait été rapporté chez *Ae. aegypti* vis-à-vis de la capacité de vol des pseudo-mâles (Aryan et al. 2020), nous avons alors investigué la présence et le niveau d'expression des gènes sexe-spécifiques impliqués dans la capacité de vol, *myo-sex* et *myo-fem*. Chez *Ae. aegypti*, *myo-sex* est un gène du M-locus, donc présent chez les mâles uniquement, qui n'existe *a priori* qu'en une seule copie dans le génome et dont la présence est indispensable à la capacité de vol des mâles. Chez *Ae. albopictus*, nous avons montré qu'il existait au moins une copie de *myo-sex* non liée au M-locus, et une copie liée à celui-ci. En l'absence de la copie liée au M-locus, les pseudo-mâles présentent un niveau d'expression de *myo-sex* similaire à celui des mâles génétiques et une capacité de vol comparable. De même, nous avons identifié l'orthologue du gène *myo-fem* chez *Ae. albopictus*, gène indispensable à la capacité de vol chez les femelles (O'Leary et Adelman 2019), dont nous avons mesuré un niveau d'expression très faible par rapport aux femelles à la fois chez les mâles génétiques et chez les pseudo-mâles. Chez *Ae. aegypti*, ce gène est exploité pour les approches impliquant le phénotype *flightless females*, c'est-à-dire des femelles incapables de voler. L'identification de son orthologue chez *Ae. albopictus* devrait donc permettre d'y adapter ces approches. Les lignées stables, composées de femelles et de pseudo-mâles ainsi établies, nous avons montré que les pseudo-mâles transgéniques et les femelles non transgéniques pouvaient être triées automatiquement sur la base de leur fluorescence. Cette approche nous a donc permis d'obtenir la première souche de sexage génétique pour *Ae. albopictus* permettant de réaliser le tri des sexes au stade néonate. En outre, nous avons observé que, dans un nombre non négligeable de lignées, tous les mâles étaient transgéniques alors qu'ils portaient un locus M et un gène *Nix* endogènes. Ce résultat suggérerait que nos plasmides avaient tendance à s'intégrer préférentiellement au voisinage du M-locus, créant une liaison génétique entre le M-locus et le gène de fluorescence.

Ce phénomène, appelé *homing* et jusqu'alors jamais rapporté pour le transposon piggyBac, a été exploité dans le chapitre 3 afin de construire une GSS portant une insertion liée au M-locus chez *Ae. albopictus*. Celle-ci, porteuse d'un transgène YFP, permet de séparer les mâles

transgéniques des femelles non transgéniques. Dans cette espèce, nous avons aussi obtenu par criblage d'une centaine d'insertions aléatoires une souche portant un transgène lié au m-locus. Cette GSS permet de séparer les mâles hémizygotes pour le transgène des femelles homozygotes. Chez *Ae. aegypti*, nous avons construit deux GSS, une liée au M et une au m, par intégration ciblée CRISPR-Cas9 à 9 Mbp des loci sexuels. Ces deux souches permettent, de la même manière que chez *Ae. albopictus*, la séparation des sexes sur la base de leur fluorescence. En sus de permettre le tri automatisé de mâles transgéniques, nous avons démontré, dans ce même chapitre, que le croisement des femelles issues de la souche M, avec des mâles de la souche m, permet d'obtenir, dans leur descendance, des femelles transgéniques et des mâles non transgéniques. Ces derniers peuvent donc être triés automatiquement avant d'être stérilisés et relâchés. Les différentes lignées, y compris celle issue du croisement permettant d'obtenir des mâles non transgéniques, ont été testées pour leur fitness et présentent des caractéristiques similaires aux lignées sauvages de leurs espèces respectives. Les mâles transgéniques issus des souches liées au M et les mâles non transgéniques issus du croisement ont été comparés à des mâles sauvages de leurs espèces respectives quant à leur capacité de vol, leur survie et leur compétitivité. Chez *Ae. aegypti*, aucune différence n'a été observée, tandis que chez *Ae. albopictus* les mâles issus des deux lignées non sauvages semblent présenter une compétitivité légèrement réduite. Enfin, nous avons montré qu'en utilisant un COPAS à une vitesse de tri de 60 larves néonates par seconde, nous pouvons obtenir 1 million de mâles en moins de 15 heures, sans erreur, *a priori*, de l'appareil.

Ainsi, le chapitre 3 nous a permis de répondre aux prérequis identifiés au chapitre 1 en s'appuyant notamment sur des résultats obtenus au chapitre 2. En effet, les GSS développées au cours de ma thèse permettent un tri au stade néonate, avec un taux de recouvrement des mâles d'environ 70 % et un taux de contamination par des femelles de 0.01% à 0.1%. La vitesse de tri est compatible avec une utilisation opérationnelle, *a fortiori* en faisant fonctionner plusieurs appareils à la fois. Bien que plus complexe que le tri direct de mâles transgéniques à partir des souches liées au M, le schéma de croisement, conceptualisé par Eric Marois et démontré à petite échelle ici, permet d'obtenir des mâles non transgéniques.

5.2 Perspectives

5.2.1 Travaux prometteurs inachevés

5.2.1.1 Réciproque au chapitre 2 : chez *Aedes albopictus*, un génotype mâle privé de *Nix* produit-il un phénotype femelle fonctionnel ?

Dans le chapitre 2, nous avons démontré chez *Aedes albopictus* que la seule expression de *Nix* suffisait à produire des pseudo-mâles parfaitement fonctionnels dans un génotype femelle. Aussi, la question réciproque que nous nous posons désormais est : est-ce qu'un génotype mâle privé du seul gène *Nix* produirait des femelles fonctionnelles ? En effet, des knockouts partiels ont déjà été réalisés et ont conduit à une féminisation des tissus injectés dans les individus m/M (Liu et al. 2019). Toutefois, ces injections conduisent à un phénotype gynandromorphe, avec un pôle antérieur mâle et un pôle postérieur femelle, rendant les individus incapables de se reproduire. Afin de contourner ce problème, nous avons généré, chez *Ae. albopictus*, une souche exprimant transgéniquement trois ARNg ciblant le premier exon de *Nix* (commun à toutes les isoformes et seul traduit en protéine dans nos souches masculinisées) ainsi qu'une souche au locus M marqué d'un gène de fluorescence et exprimant *Cas9*. En croisant ces deux souches, *Cas9* devait mutagéniser *Nix* et nous espérions trouver dans la progéniture des individus de phénotype femelle ou intersexué porteurs de la fluorescence associée au M. Nous aurions pu tester ainsi le succès reproducteur et la viabilité de ces pseudo-femelles par rapport à ceux des femelles génétiques. Dans l'essai pilote que nous avons réalisé, nous avons examiné plus de 2000 nymphes fluorescentes et toutes étaient des mâles. Le croisement a été maintenu sur trois générations avec sélection positive des trois transgènes nécessaires, afin de maximiser l'exposition de *Nix* à l'activité mutagène de CRISPR/Cas9, mais sans succès.

Nous avons pu vérifier par *western blot* que la protéine Cas9 est bien exprimée dans la souche utilisée. En outre, elle nous a permis d'obtenir un knock-in dans un homologue de *myo-sex*, Cas9 est donc fonctionnelle. Toutefois nous n'avons pas pu nous assurer de l'efficacité des 3 gRNA utilisés. Aussi, nous souhaiterions génotyper les mâles fluorescents issus de ce croisement à la recherche d'éventuels indels silencieuses, notamment dans la copie transgénique de *Nix* liée au marqueur fluorescent. L'absence d'indels suggérerait que les ARNg sont mal choisis, auquel cas il faudrait en sélectionner d'autres et renouveler l'expérimentation. Au cas où nous observerions la présence d'individus fluorescents tous intersexués, cela suggérerait, soit que les indels causés par CRISPR-Cas9 ne bloquent pas suffisamment la fonction de *Nix*, soit que le M-locus privé de *Nix* ne peut se substituer à un m-locus. La présence

de femelles phénotypiques non complètement fonctionnelles suggérerait, quant à elle, l'efficacité de la méthode mais la présence de facteurs mâles persistants dans le M-locus ou l'absence de facteurs femelles en quantité suffisante en présence d'un seul m-locus. Enfin, la présence de femelles phénotypiques fonctionnelles, confirmerait l'efficacité de la méthode et indiquerait que le M-locus privé de *Nix* pourrait se substituer à un m-locus. Cela suggérerait en outre que les loci sexuels d'*Ae. albopictus* ne porteraient *a priori* aucun gène ou facteur essentiel à la survie de l'espèce. Dans ce cas, une souche dérivée de notre Aal-M porteuse du marqueur fluorescent, composée de pseudo-femelles homozygotes pour le M-locus privé de *Nix*, et de mâles possédant un M-locus sauvage et un M-locus privé de *Nix* pourrait être utilisée comme GSS avec marqueur lié au pseudo-m.

5.2.1.2 Utilisation d'un intron mâle-spécifique pour conditionner l'expression d'un gène chez les mâles

Pour créer une GSS fluorescente chez *Ae. albopictus*, en plus des approches présentées aux chapitres 2 et 3, nous avons envisagé une approche alternative basée sur des travaux réalisés chez l'anophèle d'une part (Magnusson et al. 2011), et chez la drosophile d'autre part (Kandul et al. 2020). Cette approche visait à conditionner l'expression d'un gène de fluorescence à l'aide d'un intron sexe-spécifique. Les travaux chez *Anopheles gambiae* ont montré en effet que lorsqu'un gène de fluorescence était intégré à un intron sexe-spécifique du gène *doublesex* (*dsx*), il s'exprimait davantage dans un sexe que dans l'autre (Magnusson et al. 2011). De façon intrigante, l'expression la plus forte était observée dans le sexe opposé à celui attendu. Chez la drosophile, la logique employée était contraire : un intron sexe-spécifique (issu du gène *dsx* ou *transformer*) était intégré au gène d'intérêt (un gène de résistance aux antibiotiques), lequel ne pouvait donc s'exprimer que lorsque l'intron s'excisait, c'est-à-dire dans le sexe ciblé (Kandul, Liu, Hsu et al. 2020). Dans notre construction, nous avons donc juxtaposé un marqueur GFP témoin de transgénèse et une DsRed au sein de laquelle nous avons intégré une version raccourcie de l'intron mâle-spécifique du gène *dsx* (**Annexe 5, Figure A5-1**). En effet, cet intron faisant plusieurs dizaines de milliers de paires de bases chez *Ae. albopictus*, nous avons conservé 15 bp en 5' et 1000bp en 3' du 4^{ème} intron compris entre les exons 4 et 5a, puis la totalité de la séquence comprise entre l'exon 5a (inclus) et l'exon 6 (exclu, voir **Données A5-1**). Nous avons injecté ce plasmide dans plusieurs centaines d'œufs d'*Ae. albopictus* et nous avons croisé en masse les mâles présentant une expression transitoire (dite « TE » pour *transient expression*) de la GFP à des femelles sauvages et les femelles TE à des mâles sauvages. En G1, la descendance transgénique issue des femelles TE était composée de 14

mâles et 2 femelles exprimant à la fois la GFP et la DsRed et de 14 femelles n'exprimant que la GFP. La descendance issue des mâles TE était composée de 158 mâles exprimant à la fois la GFP et la DsRed et de 137 femelles n'exprimant que la GFP ou accompagnée d'une très faible expression de DsRed (nettement inférieure à celle des mâles), ce qui correspondait au phénotype attendu. Nous avons alors établi 7 croisements de femelles individuelles descendant des mâles TE avec des mâles sauvages et obtenu 5 lignées prometteuses en G2. Nous avons amplifié ces lignées afin de vérifier par COPAS la séparation des sexes sur des plus grands nombres d'individus. Alors que jusqu'alors nous avions évalué la fluorescence de chaque sexe au stade de nymphe, ici nous souhaitions donc travailler au stade de larve néonate. En G3, aucune larve néonate n'exprimait de DsRed. L'expression de la DsRed est apparue plus tard, chez les larves âgées L3-L4. Un réexamen du plasmide de transgénèse nous a permis d'identifier une mutation de la DsRed pouvant être à l'origine de ce retard ou faiblesse d'expression. Nous l'avons corrigée et réinjecté des embryons, mais aucune DsRed n'a été visible au stade néonate. Parmi nos lignées transgéniques, nous avons plusieurs exemples de DsRed sous le promoteur polyubiquitine qui est parfaitement visible au stade L1. Le problème ici provient peut-être de la temporalité de l'excision de l'intron mâle spécifique ou de la perte d'un facteur important lors du raccourcissement de cet intron (nous avons toutefois vérifié que sa séquence n'était pas conservée pour minimiser les risques de perdre un élément essentiel). Ayant développé des GSS plus performantes, nous avons momentanément écarté cette approche mais souhaiterions la poursuivre ultérieurement car elle pourrait constituer un outil intéressant permettant de conditionner l'expression d'un gène d'intérêt à un seul sexe. Cela pourrait par exemple servir à développer des *gene drive* transmettant une létalité femelle-spécifique en insérant un intron mâle-spécifique dans un gène essentiel. D'autre part, une GSS basée sur ce type de fluorescence ne devrait souffrir d'aucun problème de recombinaison.

5.2.2 Pistes d'amélioration des souches de sexage génétique construites

Les souches de sexage génétique (GSS) que nous avons développées permettent une nette facilitation de la séparation des sexes. Celle-ci ne souffrent d'aucun problème de recombinaison dans le cas des lignées masculinisantes décrites au chapitre 2, chez lesquelles le marqueur fluorescent est indissociablement lié au sexe. Dans le cas des lignées fluorescentes liées au M décrites au chapitre 3, s'ils ne sont pas correctement éliminés, les très rares individus recombinants risquent de s'accoupler et de propager cette recombinaison dans la descendance,

augmentant ainsi le taux de contamination par des femelles et diminuant le taux de recouvrement de mâles. Aussi, il pourrait être intéressant de chercher à obtenir d'autres lignées recombinant le moins possible voire ne recombinant pas. Idéalement, de prochains travaux de recherche pourraient cibler les loci sexuels eux-mêmes, afin d'éviter au maximum toute recombinaison entre le transgène et l'encodage du sexe. Dans le cas du m-locus, nous ne pouvons pas complètement exclure que des *crossing over* existent avec le locus M, aussi, l'idéal serait de placer le transgène dans le locus m en regard de l'emplacement de *Nix*, afin de limiter au maximum le risque de recombinaison entre les deux. Chez *Ae. aegypti*, le génome actuel ne présente que le chromosome 1 porteur du M-locus. Toutefois, il a été supposé que la portion de chromosome 1 non homologue entre les génomes AaegL4 et AaegL5 pourrait être le m-locus, le génome AaegL4 étant une séquence d'individu femelle (Matthews et al. 2018). Ainsi, dans cette espèce, de futurs travaux pourraient s'attacher à rapprocher le gène de fluorescence des loci sexuels en réinjectant des embryons sauvages avec des ARNg et des plasmides de réparation ciblant des régions plus proches des loci sexuels, ou à cibler les loci sexuels eux-mêmes à partir des assemblages disponibles. Chez *Ae. albopictus*, en revanche, ni le M-locus ni le m-locus ne sont assemblés dans le génome actuel (Palatini et al. 2020). Aussi, un assemblage serait nécessaire pour pouvoir travailler plus précisément par mutagenèse ciblée. Pour ce faire, le chromosome 1-m pourrait plus facilement être aligné à partir d'un génome femelle (m/m) tandis que le chromosome 1-M pourrait bénéficier de l'approche présentée au paragraphe 4.2.1.1 consistant à obtenir des femelles de génotype (M*/M*) avec knockout de *Nix* dans les loci M. A défaut, plus de lignées résultant d'un « homing » du transgène à proximité du M-locus pourraient être obtenues et testées pour leur taux de recombinaison. Nous en possédons d'ailleurs trois qui n'ont à ce jour montré aucun recombinant; elles souffrent de la faiblesse d'expression de leur marqueur fluorescent mais ce défaut pourrait être corrigé par l'intégration d'un marqueur supplémentaire dans leur *docking site* AttP. De nouvelles souches recombinant le moins possible pourraient être utilisées comme GSS M, tandis qu'à partir des femelles recombinantes isolées, une GSS m pourrait être initiée. Afin de remplacer Aal-m par une lignée recombinant dix fois moins, nous sommes actuellement en train d'établir une lignée m à partir de femelles recombinantes d'Aal-M. Il est important de noter que nous avons essayé à plusieurs reprises, chez *Ae. albopictus* comme chez *Ae. aegypti*, de cibler le gène *Nix* directement, sans succès. Aussi, cette approche pourrait être réitérée et optimisée pour obtenir une liaison parfaite au M-locus, mais il n'est pas à exclure que cette région des loci sexuels soit particulièrement difficile à éditer pour des raisons que nous ignorons encore.

5.2.3 Applicabilité des souches de sexage génétique en contrôle génétique

Bien qu'améliorables, les souches de sexage génétique (GSS) que nous avons développées au cours de ce projet n'en sont pas moins tout à fait fonctionnelles. Les tests préliminaires sur le fitness de ces souches que nous avons réalisés au chapitre 3 présentent des résultats prometteurs, qui semblent indiquer que celles-ci pourraient être utilisées de façon opérationnelle. Deux facteurs restent toutefois à élucider : leur acceptabilité vis-à-vis du public et des décideurs, et leur efficacité en élevage de masse.

5.2.3.1 Acceptabilité des souches de sexage génétique vis-à-vis du public et des décideurs

Les souches de sexage génétique (GSS) que nous avons développées au chapitre 3 sont des GSS transgéniques, porteuses de séquences externes au génome naturel des *Aedes*, ce qui fait de nos moustiques des moustiques modifiés génétiquement ou GMM (*Genetically Modified Mosquitoes*). Peu d'études quant à l'acceptabilité des GMM par le grand public existent, a fortiori en Europe. Le dernier Eurobaromètre sur le sujet date de 2002 (Gaskell et al. 2003), ce qui est complètement obsolète compte tenu des avancées biotechnologiques majeures effectuées depuis, et de l'évolution des sociétés à ce sujet. D'après la littérature, les GMM rencontrent une acceptabilité variable : ils sont globalement moins bien perçus que les méthodes basées sur des traits morphologiques naturels (Panjwani et Wilson 2016), mais certaines études, aux Etats-Unis, ont démontré que le public les percevait comme plus sûrs et plus efficaces que les insecticides chimiques (Adalja et al. 2016). En 2016, aux Etats-Unis, l'Université de Pennsylvanie a montré qu'à peine 50% des répondants étaient pour l'utilisation de GMM dans le cadre de la lutte contre Zika (The Annenberg Public Policy Center of the University of Pennsylvania 2016a), et que 2/3 des personnes interrogées disaient peu comprendre les OGM de manière générale (The Annenberg Public Policy Center of the University of Pennsylvania 2016b). Au sein même de la communauté scientifique, des divergences existent. Une étude menée au Nigéria en 2014 a montré que les scientifiques Nigériens sont en majorité inquiets face à l'utilisation des GMM pour lutter contre le paludisme (Okorie et al. 2014), et il existe de nombreux autres exemples de scientifiques démontrant une certaine inquiétude face aux conséquences de l'utilisation de telles technologies, allant parfois jusqu'à faire preuve de sensationnalisme excessif pour appuyer leurs propos (voir par exemple Evans et al. 2019 et Evans et al. 2020).

Une étude sociologique a démontré que l'acceptabilité des GMM changeait selon la méthode d'obtention de ceux-ci. En effet, les GMM obtenus par transgénèse rencontrent une plus forte

opposition que ceux obtenus par mutagenèse classique, laquelle permet d'obtenir des individus cispéniques (Antonelli et al. 2015), tandis que les moustiques transinfectés avec des souches de la bactérie *Wolbachia* normalement présentes chez d'autres espèces d'insectes (wMel, wPip) sont, quant à eux, bien acceptés (Liew et al. 2021). De même, la réglementation européenne relative à la dissémination volontaire d'organismes génétiquement modifiés prévoit des dispositions différentes selon le processus d'obtention (Parlement européen 2001). Bien que celle-ci ne s'applique qu'aux « organismes » dans le sens d'un système vivant capable de reproduction et donc théoriquement pas aux lâchers de mâles stériles, cette régulation doit être prise en compte dans notre cas également car un faible pourcentage de fertilité résiduelle est inévitable. Sur le plan scientifique, la distinction sur la base du processus de fabrication est discutable. En effet, la nature du GMM peut être la même à l'issue de mutagenèse ciblée ou de transgénèse, l'édition par CRISPR-Cas9 (hors knock-in de transgène) n'introduisant, par exemple, pas de modification additionnelle à celle désirée dans le génome. Ainsi, lorsque l'objectif visé est le même, le résultat par transgénèse est non seulement plus facile à obtenir mais également plus précis donc plus performant du point de vue de la force de la liaison génétique (voir par exemple la comparaison entre VIENNA7/8 et FSEL#32 chez *C. capitata* Meza et al. 2018). En outre, que l'on manipule des gènes endogènes par mutagenèse classique ou par transgénèse, ou que l'on importe du matériel génétique extérieur par transgénèse ou par infection avec des bactéries non commensales, la question qui devrait se poser est davantage l'innocuité de la modification génétique résultante. Dans ce sens, il est pertinent qu'une évaluation des risques pour la santé humaine (vis à vis du risque vectoriel notamment) et des risques environnementaux soit requise par la législation européenne, ainsi que des mesures concernant la surveillance, les méthodes correctives, le traitement des déchets et les plans d'intervention d'urgence possibles et prévus (Parlement européen 2001). Toutefois, les difficultés à obtenir des autorisations de lâchers¹³ sont révélatrices d'une législation centrée sur le risque mais ne prenant pas en compte les bénéfices potentiels. En effet, les insecticides chimiques actuellement utilisés contre les moustiques ont un impact environnemental et sur la santé publique désastreux (WHO et UNICEF), lequel serait nettement réduit par l'utilisation de GMM. En outre, par la pression de sélection qu'ils exercent, les insecticides chimiques sélectionnent, chez les populations de moustiques et d'insectes en général, des mutations qui

13 Nos partenaires de l'IRD ont eu de grandes difficultés à obtenir l'aval des instances décisionnaires pour les lâchers de mâles stériles à Sainte Marie de La Réunion, lesquels ont pu finalement avoir lieu en 2020 et 2021.

ne peuvent être contrôlées, tandis que les techniques d'ingénierie génétique permettent un strict contrôle de la modification choisie, et peu/pas de sélection de résistance, exception faite des méthodes *gene drive* basées sur une reconnaissance de séquence (Unckless, Clark et Messer 2017) ou sur l'utilisation des bactéries *Wolbachia* (Price et al. 2020).

Une étude réalisée en 2015 a révélé que la terminologie utilisée pour qualifier les GMM, changeait nettement leur perception, et que le mot « transgénique » cristallisait la plus forte opposition (Antonelli et al. 2015). Ainsi, l'acceptabilité des souches de sexage que nous proposons pourrait poser problème, et l'acceptabilité de la souche non transgénique issue du schéma de croisement est inconnue car il s'agit d'une situation encore jamais évaluée. Comme cela a été souligné lors de l'audition de chercheurs par le Parlement Britannique, il est nécessaire d'impliquer en toute transparence le grand public dans le processus de décision et de mise en place (Houses of Parliament et al. 2015; Resnik 2018). Pour ce faire, une communication claire et factuelle est nécessaire, laquelle considérerait à la fois les risques mais également les bénéfices d'une telle approche. Plusieurs études ont démontré les bénéfices du contrôle génétique de manière générale sur la nuisance due aux moustiques et sur le risque vectoriel pour la santé humaine (Zheng et al. 2019; The Project Wolbachia – Singapore Consortium et Ching 2021). Avec nos souches de sexage, nous proposons un outil qui ajouterait un bénéfice économique à ceux-ci.

5.2.3.2 Rapport coût-efficacité des souches de sexage génétique pour l'élevage de masse

Les souches de sexage génétique (GSS) que nous avons développées permettent ainsi de trier les sexes au premier stade larvaire et de ne conserver que les mâles pour l'élevage. Comparativement aux méthodes actuellement utilisées chez les *Aedes*, qu'elles soient manuelles ou automatisées, ceci représente une économie de nourriture et d'espace non négligeable dans la structure et le fonctionnement des élevages de masse. De même, avec un taux de recouvrement de mâles supérieur, les colonies mères peuvent être redimensionnées en fonction. Afin de déterminer précisément les économies que permettraient leur utilisation, il pourrait être intéressant de mener un essai comparatif en semi-élevage de masse suivi de lâchers confinés en *semi-field*, lesquels permettraient de comparer les paramètres des lignées et les coûts d'élevage en conditions plus proches des conditions opérationnelles, ainsi que l'efficacité des mâles produits par les deux méthodes à contrôler une population cible. Pour ce faire, de futurs travaux de recherche pourraient s'inspirer des essais comparatifs qui ont été effectués entre deux GSS de la mouche des fruits *C. capitata* (Meza et al. 2018). Avec les données actuelles, nous pouvons néanmoins calculer des ordres de grandeur des différences de coûts et

de surface requis par les deux méthodes dans des usines hypothétiques en Europe, toutes choses égales par ailleurs. Nous avons comparé l'utilisation de nos GSS à l'utilisation de deux méthodes de sexage de référence chez *Ae. albopictus* : la méthode usuelle basée sur un tri mécanique manuel des nymphes (Fay et Morlan 1959; Bellini, Medici et al. 2013), et la méthode utilisée lors de l'essai TII/TIS en Chine (Zheng et al. 2019) qui automatise ce tri. Pour cela, nous avons utilisé le tableur créé par la FAO et l'IAEA pour les *Aedes* (FAO/IAEA 2019) en considérant une usine permettant de relâcher 20 millions de mâles par semaine, pendant toute l'année, ce qui correspond aux quantités de mâles stériles estimées pour réaliser un essai épidémiologique de type "randomized control trial" suivant les recommandations de l'OMS (WHO et IAEA 2020). Les paramètres que nous avons utilisés pour intégrer au mieux l'utilisation d'une GSS ainsi que pour reproduire les conditions de référence sont reportés en **Annexe 5, Tableau A5-2**. Nous avons ainsi estimé que l'utilisation de nos GSS pour relâcher des mâles transgéniques ou non transgéniques permettrait de réduire les coûts de construction des usines de 25 à 57% (1,2M€ vs. 1,6 à 2,8M€) et le coût des équipements de 25 à 62% (2,1M€ vs. 2,8 à 5,6M€) malgré l'achat théorique de 6 COPAS (**Figure 14**). L'usine d'élevage de masse aurait une surface réduite de 32 à 76% (630 à 650 m² vs. 950 à 1880m²) grâce à la quantité de larves et d'adultes à élever nettement réduite, tandis que la surface de l'usine de préparation des mâles avant leur lâcher serait constante (environ 340m²). Outre des coûts initiaux réduits, ces méthodes permettraient également des économies à l'usage. Le temps de travail nécessaire dans l'usine d'élevage de masse serait compris entre 80 et 90 heures quotidiennes, contre 120 à 390 heures quotidiennes avec les méthodes de référence, se traduisant en une diminution notable du temps de travail et par conséquent du nombre d'employés nécessaires. Les consommables (nourriture et autres consommables nécessaires à l'élevage) représenteraient un coût annuel compris entre 78 000 et 83 000€ avec nos méthodes (GSS avec lâcher de mâles transgéniques ou non transgéniques respectivement), contre 144 000 à 296 000€ avec les méthodes de référence, soit 42 à 74% d'économie. Enfin, la production de 20 millions de mâles par semaine serait contaminée, au plus, par 0,1% de femelles, contre 0,5 à 1% par les méthodes actuelles.

Ainsi, d'un point de vue coût-efficacité, l'utilisation de souches de sexage génétique représenterait un avantage non négligeable, et ce même en appliquant le schéma de croisement qui impose l'élevage de colonies parentales et de larves supplémentaires. Ces chiffres, basés sur des estimations de coûts en Europe, sont toutefois à mettre en regard du contexte local d'intérêt, et de l'acceptabilité de telles souches dans celui-ci.

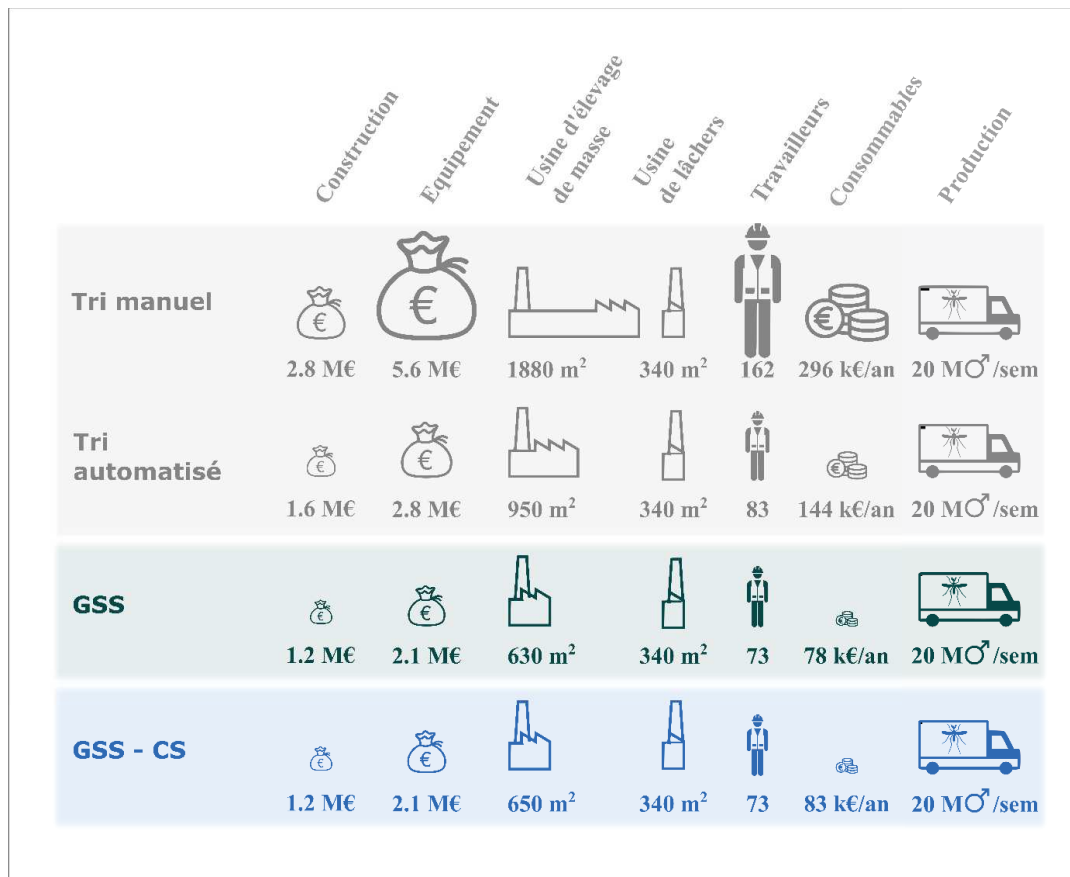
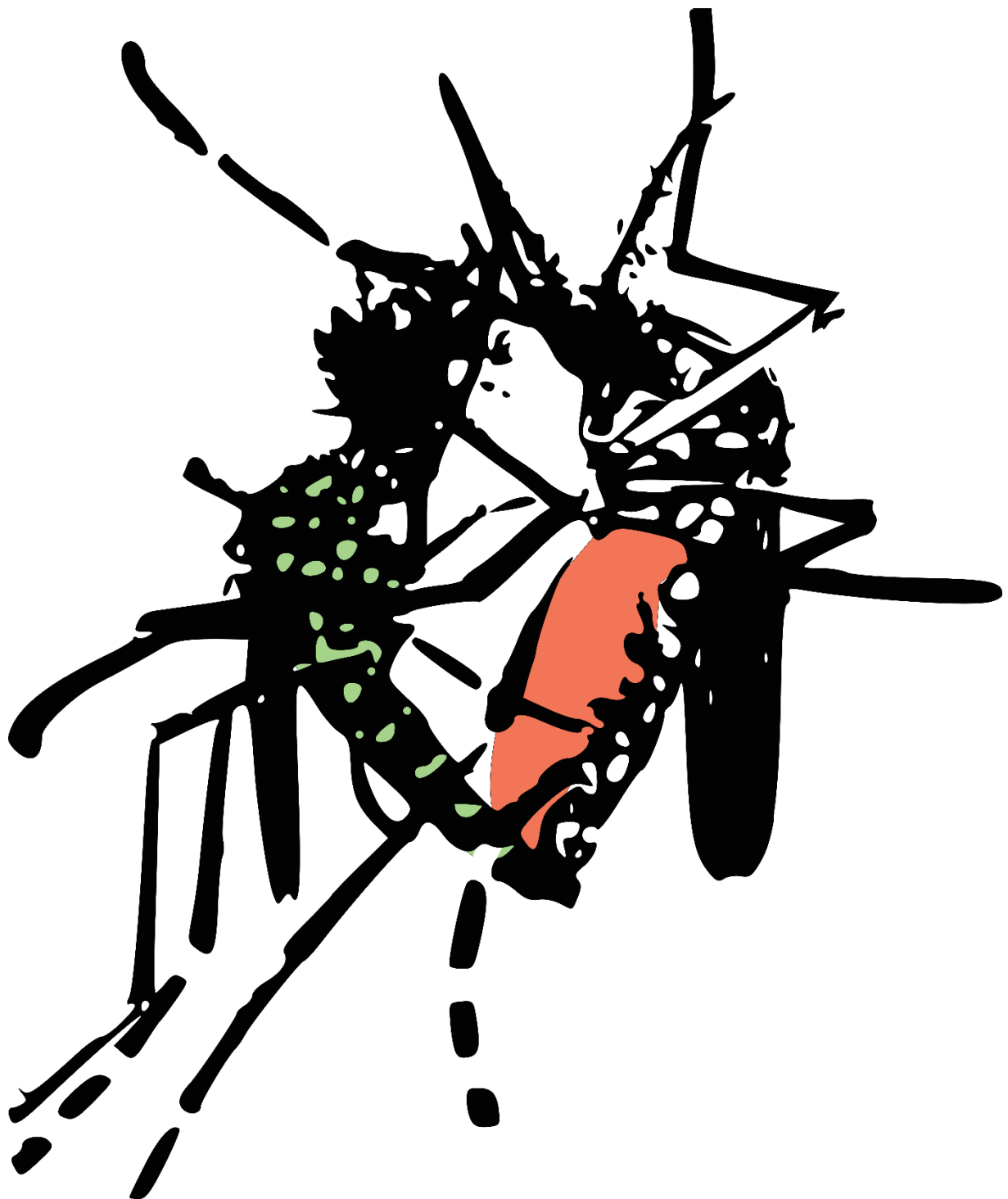


Figure 14: Estimation des coûts initiaux et de fonctionnement d'usines d'élevage de masse et de lâchers de moustiques mâles selon le mode de sexage choisi dans le cadre d'un programme de lutte génétique contre *Aedes albopictus*.

Les modes de sexages comparés sont, de haut en bas, le tri mécanique manuel basé sur la taille des nymphes (Fay et Morlan 1959; Bellini, Medici et al. 2013), le tri mécanique automatisé basé sur la taille des nymphes (Zheng et al. 2019) et le tri basé sur la fluorescence des larves L1 à partir des souches de sexage génétiques (GSS) construites au chapitre 3 de cette thèse, permettant des lâchers de mâles transgéniques (en vert) ou non transgéniques (GSS-CS, en bleu). Les coûts de construction et d'équipement sont présentés en millions d'euros et arrondis à la centaine de milliers d'euros. Les surfaces sont arrondies à la dizaine de mètres carrés. Le nombre de travailleurs comprend le personnel technique, encadrant et administratif des deux usines combinées. Les dépenses en consommables sont données en millier d'euros par an et arrondies au millier d'euros. Dans tous les cas, les usines et les coûts sont prévus pour relâcher 20 millions de mâles adultes par semaine tout au long de l'année. Un carré noir en haut à gauche des camions représente la contamination par des femelles, laquelle est estimée à 1% avec la méthode manuelle, 0,5% avec la méthode automatisée et 0,1% avec les méthodes utilisant des souches de sexage génétiques. L'ensemble de ces paramètres a été évalué sur la base du tableur produit par l'IAEA pour l'élevage des *Aedes* (FAO/IAEA 2019). Tous les icones sont de taille proportionnelle à leur valeur.

5.3 Conclusion

En conclusion, cette thèse m'a permis d'étudier la détermination du sexe chez *Ae. albopictus*, en explicitant notamment le rôle du gène *Nix*. J'ai également exploré plusieurs approches pour le sexage des *Aedes*, et me suis finalement consacrée au développement de souches de sexage génétiques (GSS). Au total, nous avons obtenu et caractérisé en détail 5 GSS : 3 pour *Ae. albopictus* et 2 pour *Ae. aegypti*. A partir des GSS liant un gène de fluorescence aux loci sexuels endogènes, nous avons démontré la faisabilité d'un schéma de croisement permettant d'aboutir à des mâles non-transgéniques. L'ensemble de ces travaux a donné des résultats prometteurs qui demandent désormais à être confirmés dans des conditions plus proches de celles de l'élevage de masse. A partir des résultats préliminaires obtenus, nous pouvons néanmoins estimer les économies potentielles permises par l'utilisation de telles GSS en comparaison aux méthodes de sexage mécaniques actuellement en place dans les élevages de masse pour la lutte génétique contre les *Aedes*. Nos estimations montrent que notre approche, qu'il s'agisse de relâcher des moustiques mâles transgéniques ou non transgéniques, permettrait des économies majeures à la fois pour la construction de l'usine et pour le fonctionnement de l'élevage de masse. Ainsi, bien qu'améliorables, ces GSS ouvrent la voie à une nette amélioration du rapport coût-efficacité du contrôle génétique des moustiques du genre *Aedes*. Celle-ci est particulièrement importante pour les approches auto-limitées -dont la Technique de l'Insecte Stérile fait partie-, lesquelles requièrent des quantités de moustiques mâles à élever plus importantes. Nous espérons que ces résultats favoriseront le déploiement de cette méthode de lutte antivectorielle durable et efficace et participeront ainsi, à leur échelle, à mieux contrôler les arboviroses transmises par les *Aedes* et améliorer ainsi la santé humaine.



Bibliographie

- Adalja, Amesh; Sell, Tara Kirk; McGinty, Meghan; Boddie, Crystal (2016) Genetically Modified (GM) Mosquito Use to Reduce Mosquito-Transmitted Disease in the US: A Community Opinion Survey. In : PLoS Currents, vol. 8. DOI: 10.1371/currents.outbreaks.1c39ec05a743d41ee39391ed0f2ed8d3.
- Adhami, J.; Reiter, P. (1998) Introduction and establishment of *Aedes (Stegomyia) albopictus* skuse (Diptera: Culicidae) in Albania. In : Journal of the American Mosquito Control Association, vol. 14, n° 3, p. 340–343.
- Agnew, Philip; Hide, Mallorie; Sidobre, Christine; Michalakakis, Yannis (2002) A minimalist approach to the effects of density-dependent competition on insect life-history traits. In : Ecological Entomology, vol. 27, n° 4, p. 396–402. DOI: 10.1046/j.1365-2311.2002.00430.x.
- Akiner, Muhammet M.; Demirci, Berna; Babuadze, Giorgi; Robert, Vincent; Schaffner, Francis (2016) Spread of the Invasive Mosquitoes *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in the Black Sea Region Increases Risk of Chikungunya, Dengue, and Zika Outbreaks in Europe. In : PLOS Neglected Tropical Diseases, vol. 10, n° 4, e0004664. DOI: 10.1371/journal.pntd.0004664.
- Aldridge, Robert L.; Kline, Jedidiah; Coburn, Jordan M.; Britch, Seth C.; Boardman, Leigh; Hahn, Daniel A. et al. (2020) Gamma-Irradiation Reduces Survivorship, Feeding Behavior, and Oviposition of Female *Aedes aegypti*. In : Journal of the American Mosquito Control Association, vol. 36, n° 3, p. 152–160. DOI: 10.2987/20-6957.1.
- Alphey, Luke S.; Andreassen, Morten H. (2002) Dominant lethality and insect population control. In : Molecular and Biochemical Parasitology, vol. 121, n° 2, p. 173–178. DOI: 10.1016/S0166-6851(02)00040-3.
- Alwis, Ruklanthi de; Williams, Katherine L.; Schmid, Michael A.; Lai, Chih-Yun; Patel, Bhumi; Smith, Scott A. et al. (2014) Dengue viruses are enhanced by distinct populations of serotype cross-reactive antibodies in human immune sera. In : PLOS Pathogens, vol. 10, n° 10, e1004386. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004386.
- Amraoui, Fadila; Vazeille, Marie; Failloux, Anna Bella (2016) French *Aedes albopictus* are able to transmit yellow fever virus. In : Eurosurveillance, vol. 21, n° 39. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.39.30361.
- Anderson, Katie B.; Chunsuttiwat, Supamit; Nisalak, Ananda; Mammen, Mammen P.; Libraty, Daniel H.; Rothman, Alan L. et al. (2007) Burden of symptomatic dengue infection in children at primary school in Thailand: a prospective study. In : The Lancet, vol. 369, n° 9571, p. 1452–1459. DOI: 10.1016/S0140-6736(07)60671-0.
- ANSES (2020) AVIS de l'ANSES relatif à «l'évaluation du rapport bénéfice risque des pratiques de lutte anti-vectorielle habituellement mises en œuvre pour lutter contre la dengue, dans le contexte actuel de confinement global». Maisons-Alfort (Saisine n° «2020-SA-0057»). En ligne : <https://www.anses.fr/fr/system/files/VECTEURS2020SA0057.pdf>, consulté le 8 juin 2020.
- Antonelli, T.; Clayton, A.; Hartzog, M.; Webster, S.; Zilnik, G. (2015) Transgenic pests and human health: a short overview of social, cultural, and scientific considerations. In : Zach N. Adelman, coord.: Genetic Control of Malaria and Dengue: Academic Press, p. 1–30.
- Antwi, Frank B.; Reddy, Gadi V. P. (2015) Toxicological effects of pyrethroids on non-target aquatic insects. In : Environmental toxicology and pharmacology, vol. 40, n° 3, p. 915–923. DOI: 10.1016/j.etap.2015.09.023.
- Aranda, C.; Eritja, R.; Roiz, D. (2006) First record and establishment of the mosquito *Aedes albopictus* in Spain. In : Medical and Veterinary Entomology, vol. 20, n° 1, p. 150–152. DOI: 10.1111/j.1365-2915.2006.00605.x.
- Aryan, Azadeh; Anderson, Michelle A. E.; Biedler, James Kite; Qi, Yumin; Overcash, Justin M.; Naumenko, Anastasia N. et al. (2020) Nix alone is sufficient to convert female *Aedes aegypti* into fertile males and myo-sex is needed for male flight. In : Proceedings of the National Academy of Sciences. DOI: 10.1073/pnas.2001132117.
- Auerswald, Heidi; Jesus, Ana de; Seixas, Gonçalo; Nazareth, Teresa; In, Saraden; Mao, Sokthea et al. (2019) First dengue virus seroprevalence study on Madeira Island after the 2012 outbreak indicates unreported dengue circulation. In : Parasites & Vectors, vol. 12, n° 1, p. 103. DOI: 10.1186/s13071-019-3357-3.
- Bagny, Leila (2009) Caractérisation de l'invasion d'*Aedes albopictus* en présence d'*Aedes aegypti* à la Réunion et à Mayotte. Université de la Réunion. En ligne : <https://agritrop.cirad.fr/557063/>, consulté le 22 mai 2020.
- Bagny, Leila; Delatte, H.; Quilici, Serge; Fontenille, Didier (2009) Progressive decrease in *Aedes aegypti* distribution in Reunion Island since the 1900s. In : Journal of Medical Entomology, vol. 46, n° 6, p. 1541–1545. DOI: 10.1603/033.046.0644.

- Balatsos, Georgios; Puggioli, Arianna; Karras, Vasileios; Lytra, Ioanna; Mastronikolos, George; Carrieri, Marco et al. (2021) Reduction in Egg Fertility of *Aedes albopictus* Mosquitoes in Greece Following Releases of Imported Sterile Males. In : *Insects*, vol. 12, n° 2. DOI: 10.3390/insects12020110.
- Baron, Gemma L.; Raine, Nigel E.; Brown, Mark J. F. (2014) Impact of chronic exposure to a pyrethroid pesticide on bumblebees and interactions with a trypanosome parasite. In : *Journal of Applied Ecology*, vol. 51, n° 2, p. 460–469. En ligne : www.jstor.org/stable/24032377.
- Becnel, James J.; White, Susan E. (2007) Mosquito Pathogenic Viruses - The Last 20 Years. In : *Journal of the American Mosquito Control Association*, vol. 23, n° sp2, p. 36–49. DOI: 10.2987/8756-971X(2007)23[36:MPVLY]2.0.CO;2.
- Beech, Camilla; Nagaraju, J.; Vasan, Seshadri S.; Rose, Robert I.; Saraswathy, T. S. (2009) Risk analysis of a hypothetical open field release of a self-limiting transgenic *Aedes aegypti* mosquito strain to combat dengue. In : *Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*, vol. 17, n° 3. En ligne : https://www.researchgate.net/publication/268060205_Risk_analysis_of_a_hypothetical_open_field_release_of_a_self-limiting_transgenic_Aedes_aegypti_mosquito_strain_to_combat_dengue.
- Beketov, Mikhail A.; Kefford, Ben J.; Schäfer, Ralf B.; Liess, Matthias (2013) Pesticides reduce regional biodiversity of stream invertebrates. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 110, n° 27, p. 11039–11043. DOI: 10.1073/pnas.1305618110.
- Bellini, Romeo; Albieri, Alessandro; Carrieri, Marco; Colonna, Roberta; Donati, Luciano; Magnani, Maurizio et al. (2009) Efficacy and lasting activity of four IGRs formulations against mosquitoes in catch basins of northern Italy. *European Mosquito Bulletin*. In : *Journal of the European Mosquito Control Association*, vol. 27, p. 33–46.
- Bellini, Romeo; Balestrino, F.; Medici, A.; Gentile, G.; Veronesi, R.; Carrieri, M. (2013) Mating competitiveness of *Aedes albopictus* radio-sterilized males in large enclosures exposed to natural conditions. In : *Journal of Medical Entomology*, vol. 50, n° 1, p. 94–102. DOI: 10.1603/mei1058.
- Bellini, Romeo; Carrieri, M.; Burgio, G.; Bacchi, M. (1996) Efficacy of different ovitraps and binomial sampling in *Aedes albopictus* surveillance activity. In : *Journal of the American Mosquito Control Association*, vol. 12, n° 4, p. 632–636.
- Bellini, Romeo; Medici, A.; Puggioli, A.; Balestrino, F.; Carrieri, M. (2013) Pilot Field Trials With *Aedes albopictus* Irradiated Sterile Males in Italian Urban Areas. In : *Journal of Medical Entomology*, vol. 50, n° 2, p. 317–325. DOI: 10.1603/MEI2048.
- Bellini, Romeo; Michaelakis, Antonios; Petrić, Dušan; Schaffner, Francis; Alten, Bulent; Angelini, Paola et al. (2020) Practical management plan for invasive mosquito species in Europe: I. Asian tiger mosquito (*Aedes albopictus*). In : *Travel medicine and infectious disease*, p. 101691. DOI: 10.1016/j.tmaid.2020.101691.
- Bernardini, Federica; Galizi, Roberto; Menichelli, Miriam; Papathanos, Philippos-Aris; Dritsou, Vicky; Marois, Eric et al. (2014) Site-specific genetic engineering of the *Anopheles gambiae* Y chromosome. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 111, n° 21, p. 7600–7605. DOI: 10.1073/pnas.1404996111.
- Bernardini, Federica; Galizi, Roberto; Wunderlich, Mariana; Taxiarchi, Chrysanthi; Kranjc, Nace; Kyrou, Kyros et al. (2017) Cross-Species Y Chromosome Function Between Malaria Vectors of the *Anopheles gambiae* Species Complex. In : *Genetics*, vol. 207, n° 2, p. 729–740. DOI: 10.1534/genetics.117.300221.
- Bernardini, Federica; Haghighat-Khah, Roya Elaine; Galizi, Roberto; Hammond, Andrew Marc; Nolan, Tony; Crisanti, Andrea (2018) Molecular tools and genetic markers for the generation of transgenic sexing strains in Anopheline mosquitoes. In : *Parasites & Vectors*, vol. 11, n° 2, p. 660. DOI: 10.1186/s13071-018-3207-8.
- Bhatt, Samir; Gething, Peter W.; Brady, Oliver J.; Messina, Jane P.; Farlow, Andrew W.; Moyes, Catherine L. et al. (2013) The global distribution and burden of dengue. In : *Nature*, vol. 496, n° 7446, p. 504–507. DOI: 10.1038/nature12060.
- Bhattacharya, Sajal; Pal, Sandip; Acharyya, Debanjan (2016) Are mosquitoes 'a necessary evil'? In : *International Journal of Fauna and Biological Studies*, vol. 3, n° 1, p. 124–129. En ligne : <http://www.faunajournal.com/archives/2016/vol3issue1/partb/3-1-6.1.pdf>.
- Blagrove, Marcus S. C.; Arias-Goeta, Camilo; Failloux, Anna-Bella; Sinkins, Steven P. (2012) Wolbachia strain wMel induces cytoplasmic incompatibility and blocks dengue transmission in *Aedes albopictus*. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 109, n° 1, p. 255–260. DOI: 10.1073/pnas.1112021108.
- Bloch, Danielle (2016) The Cost And Burden Of Chikungunya In The Americas. In : *Public Health Theses*. En ligne : <https://elischolar.library.yale.edu/ysphtdl/1022>.

- Bond, J. Guillermo; Osorio, Adriana R.; Avila, Nancy; Gómez-Simuta, Yeudiel; Marina, Carlos F.; Fernández-Salas, Ildefonso et al. (2019) Optimization of irradiation dose to *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* in a sterile insect technique program. In : PLOS ONE, vol. 14, n° 2, e0212520. DOI: 10.1371/journal.pone.0212520.
- Bourtzis, Kostas (2008) Wolbachia- Based Technologies for Insect Pest Population Control. In : Nathan. Back, Serap Aksoy, Irun R. Cohen, Abel Lajtha, John D. Lambris et Rodolfo Paoletti, coord.: Transgenesis and the Management of Vector-Borne Disease. New York, NY: Springer New York; Springer e-books (Advances in Experimental Medicine and Biology, 627), p. 104–113.
- Bourtzis, Kostas; Nirgianaki, A.; Markakis, G.; Savakis, C. (1996) Wolbachia infection and cytoplasmic incompatibility in *Drosophila* species. In : Genetics, vol. 144, n° 3, p. 1063–1073. En ligne : <https://www.genetics.org/content/144/3/1063.short>.
- Bouyer, Fanny; Seck, Momar Talla; Dicko, Ahmadou H.; Sall, Baba; Lo, Mbargou; Vreysen, Marc J. B. et al. (2014) Ex-ante Benefit-Cost Analysis of the Elimination of a *Glossina palpalis gambiensis* Population in the Niayes of Senegal. In : PLOS Neglected Tropical Diseases, vol. 8, n° 8, e3112. DOI: 10.1371/journal.pntd.0003112.
- Bouyer, Jérémy; Carter, Neil H.; Batavia, Chelsea; Nelson, Michael Paul (2019) The Ethics of Eliminating Harmful Species: The Case of the Tsetse Fly. In : Bioscience, vol. 69, n° 2, p. 125–135. DOI: 10.1093/biosci/biy155.
- Bouyer, Jérémy; Chandre, Fabrice; Gilles, Jérémie; Baldet, Thierry (2016) Alternative vector control methods to manage the Zika virus outbreak: more haste, less speed. In : The Lancet. Global Health, vol. 4, n° 6, e364. DOI: 10.1016/S2214-109X(16)00082-6.
- Bouyer, Jérémy; Lefrançois, Thierry (2014) Boosting the sterile insect technique to control mosquitoes. In : Trends in Parasitology, vol. 30, n° 6, p. 271–273. DOI: 10.1016/j.pt.2014.04.002.
- Bouyer, Jérémy; Vreysen, M. J. B. (2019) Concerns about the feasibility of using "precision guided sterile males" to control insects. In : Nature Communications, in press.
- Bouyer, Jérémy; Vreysen, Marc J. B. (2020) Yes, Irradiated Sterile Male Mosquitoes Can Be Sexually Competitive! In : Trends in Parasitology, vol. 36, n° 11, p. 877–880. DOI: 10.1016/j.pt.2020.09.005.
- Brustolin, M.; Santamaria, C.; Napp, S.; Verdún, M.; Rivas, R.; Pujol, N. et al. (2018) Experimental study of the susceptibility of a European *Aedes albopictus* strain to dengue virus under a simulated Mediterranean temperature regime. In : Medical and Veterinary Entomology, vol. 32, n° 4, p. 393–398. DOI: 10.1111/mve.12325.
- Caceres, C. (2002) Mass Rearing of Temperature Sensitive Genetic Sexing Strains in the Mediterranean Fruit Fly (*Ceratitis Capitata*). In : Genetica, vol. 116, n° 1, p. 107–116. DOI: 10.1023/A:1020967810703.
- Campbell, Corey L.; Dickson, Laura B.; Lozano-Fuentes, Saul; Juneja, Punita; Jiggins, Francis M.; Black, William C. (2017) Alternative patterns of sex chromosome differentiation in *Aedes aegypti* (L). In : BMC Genomics, vol. 18, n° 1, p. 1–11. DOI: 10.1186/s12864-017-4348-4.
- Caputo, Beniamino; Ienco, Annamaria; Cianci, Daniela; Pombi, Marco; Petrarca, Vincenzo; Baseggio, Alberto et al. (2012) The "auto-dissemination" approach: a novel concept to fight *Aedes albopictus* in urban areas. In : PLOS Neglected Tropical Diseases, vol. 6, n° 8, e1793. DOI: 10.1371/journal.pntd.0001793.
- Caputo, Beniamino; Langella, Giuliano; Petrella, Valeria; Virgillito, Chiara; Manica, Mattia; Filipponi, Federico et al. (2021) *Aedes albopictus* bionomics data collection by citizen participation on Procida Island, a promising Mediterranean site for the assessment of innovative and community-based integrated pest management methods. In : PLOS Neglected Tropical Diseases, vol. 15, n° 9, e0009698. DOI: 10.1371/journal.pntd.0009698.
- Carlson, Jonathan; Suchman, Erica; Buchatsky, Leonid (2006) Dengroviruses for Control and Genetic Manipulation of Mosquitoes. In : Bryony C. Bonning, coord.: Insect viruses. Biotechnological applications, 68^e tome. Amsterdam: Elsevier Academic Press (Advances in Virus Research, 68), p. 361–392.
- Cevallos, Varsovia; Ponce, Patricio; Waggoner, Jesse J.; Pinsky, Benjamin A.; Coloma, Josefina; Quiroga, Cristina et al. (2018) Zika and Chikungunya virus detection in naturally infected *Aedes aegypti* in Ecuador. In : Acta Tropica, vol. 177, p. 74–80. DOI: 10.1016/j.actatropica.2017.09.029.
- Chagnon, Madeleine; Kreutzweiser, David; Mitchell, Edward A. D.; Morrissey, Christy A.; Noome, Dominique A.; van der Sluijs, Jeroen P. (2015) Risks of large-scale use of systemic insecticides to ecosystem functioning and services. In : Environmental Science and Pollution Research, vol. 22, n° 1, p. 119–134. DOI: 10.1007/s11356-014-3277-x.

- Champer, Jackson; Buchman, Anna; Akbari, Omar S. (2016) Cheating evolution: engineering gene drives to manipulate the fate of wild populations. In : *Nature Reviews Genetics*, vol. 17, n° 3, p. 146–159. DOI: 10.1038/nrg.2015.34.
- Chen, Xiao-Guang; Jiang, Xuanting; Gu, Jinbao; Xu, Meng; Wu, Yang; Deng, Yuhua et al. (2015) Genome sequence of the Asian Tiger mosquito, *Aedes albopictus*, reveals insights into its biology, genetics, and evolution. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 112, n° 44, E5907-E5915. DOI: 10.1073/pnas.1516410112.
- Cloudsley-Thompson, J. L. (1976) *Insects and History*. Martins Press. New York.
- Cochran-Stafira, D. Liane; Ende, Carl N. von (1998) Integrating bacteria into food webs: studies with *Sarracenia purpurea* inquilines. In : *Ecology*, vol. 79, n° 3, p. 880–898. DOI: 10.1890/0012-9658(1998)079[0880:IBIFWS]2.0.CO;2.
- Comité scientifique du HCB (2017) Avis du Comité scientifique du Haut Conseil des Biotechnologies concernant l'utilisation de moustiques génétiquement modifiés dans le cadre de la lutte antivectorielle en réponse à la saison du 12 octobre 2015 (Réf. HCB-2017.06.07). Paris, HCB. En ligne : <http://www.hautconseildesbiotechnologies.fr/fr/avis/avis-relatif-a-lutilisation-moustiques-gm-dans-cadre-lutte-antivectorielle>, consulté le 1 octobre 2021.
- Committee on Gene Drive Research in Non-Human Organisms: Recommendations for Responsible Conduct; Board on Life Sciences; Division on Earth and Life Studies; National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine (2016) *Governing Gene Drive Research and Applications*. In : *Committee on Gene Drive Research in Non-Human Organisms: Recommendations for Responsible Conduct*. Sciences, Board on Life, Studies, Division on Earth and Life et National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine, coord.: *Gene Drives on the Horizon. Advancing Science, Navigating Uncertainty, and Aligning Research with Public Values*: National Academies Press (US). En ligne : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK379288/>.
- Cook, Peter E.; Hugo, Leon E.; Iturbe-Ormaetxe, Iñaki; Williams, Craig R.; Chenoweth, Stephen F.; Ritchie, Scott A. et al. (2006) The use of transcriptional profiles to predict adult mosquito age under field conditions. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 103, n° 48, p. 18060–18065. DOI: 10.1073/pnas.0604875103.
- CORDIS, European Commission, Grant agreement ID: 682387 (2016) *Revolutionizing Insect Control Projects H2020*. En ligne : <https://cordis.europa.eu/project/rcn/204738/factsheet/en>, consulté le 2 juillet 2019.
- Coulanges, P.; Clerc, Y.; Jousset, F. X.; Rodhain, F.; Hannoun, C. (1979) Dengue on Réunion. Isolation of a strain at the Pasteur Institute of Madagascar. In : *Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique et de ses Filiales*, vol. 72, n° 3, p. 205–209.
- Crawford, Jacob E.; Clarke, David W.; Criswell, Victor; Desnoyer, Mark; Cornel, Devon; Deegan, Brittany et al. (2020) Efficient production of male *Wolbachia*-infected *Aedes aegypti* mosquitoes enables large-scale suppression of wild populations. In : *Nature Biotechnology*, vol. 38, n° 4, p. 482–492. DOI: 10.1038/s41587-020-0471-x.
- Dalla Pozza, G.; Majori, G. (1992) First record of *Aedes albopictus* establishment in Italy. In : *Journal of the American Mosquito Control Association*, vol. 8, n° 3, p. 318–320.
- Darbro, Jonathan M.; Johnson, Petrina H.; Thomas, Matthew B.; Ritchie, Scott A.; Kay, Brian H.; Ryan, Peter A. (2012) Effects of *Beauveria bassiana* on survival, blood-feeding success, and fecundity of *Aedes aegypti* in laboratory and semi-field conditions. In : *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 86, n° 4, p. 656–664. DOI: 10.4269/ajtmh.2012.11-0455.
- Das, Ritwika; Das, Subhra Jyoti; Das, Amal Chandra (2016) Effect of synthetic pyrethroid insecticides on N₂-fixation and its mineralization in tea soil. In : *European Journal of Soil Biology*, vol. 74, p. 9–15. DOI: 10.1016/j.ejsobi.2016.02.005.
- Decourtye, A.; Devillers, J.; Genecque, E.; Le Menach, K.; Budzinski, H.; Cluzeau, S.; Pham-Delègue, M. H. (2005) Comparative sublethal toxicity of nine pesticides on olfactory learning performances of the honeybee *Apis mellifera*. In : *Archives of environmental contamination and toxicology*, vol. 48, n° 2, p. 242–250. DOI: 10.1007/s00244-003-0262-7.
- Dejnirattisai, Wanwisa; Supasa, Piyada; Wongwiwat, Wiyada; Rouvinski, Alexander; Barba-Spaeth, Giovanna; Duangchinda, Thanee et al. (2016) Dengue virus sero-cross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with Zika virus. In : *Nature immunology*, vol. 17, n° 9, p. 1102–1108. DOI: 10.1038/ni.3515.

- Delatte, H.; Paupy, C.; Dehecq, J. S.; Thiria, J.; Failloux, A. B.; Fontenille, D. (2008) *Aedes albopictus*, vecteur des virus du chikungunya et de la dengue à la Réunion: biologie et contrôle. *Aedes albopictus*, vector of chikungunya and dengue viruses in Reunion Island: biology and control. In : *Parasite* (Paris, France), vol. 15, n° 1, p. 3–13. DOI: 10.1051/parasite/2008151003.
- Devine, Gregor J.; Perea, Elvira Zamora; Killeen, Gerry F.; Stancil, Jeffrey D.; Clark, Suzanne J.; Morrison, Amy C. (2009) Using adult mosquitoes to transfer insecticides to *Aedes aegypti* larval habitats. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 106, n° 28, p. 11530–11534. DOI: 10.1073/pnas.0901369106.
- Dobson, S. L.; Rattanadechakul, W.; Marsland, E. J. (2004) Fitness advantage and cytoplasmic incompatibility in *Wolbachia* single- and superinfected *Aedes albopictus*. In : *Heredity*, vol. 93, n° 2, p. 135–142. DOI: 10.1038/sj.hdy.6800458.
- Duvignaud, A.; Fianu, A.; Bertolotti, A.; Jaubert, J.; Michault, A.; Poubeau, P. et al. (2018) Rheumatism and chronic fatigue, the two facets of post-chikungunya disease: the TELECHIK cohort study on Reunion island. In : *Epidemiology and infection*, vol. 146, n° 5, p. 633–641. DOI: 10.1017/S0950268818000031.
- Victor Arnold Dyck, J. Hendrichs, A. S. Robinson, éd. (2021) *Sterile insect technique. Principles and practice in area-wide integrated pest management*. Second edition. Boca Raton : CRC Press.
- Ecophyto PRO (2017) La loi mode d'emploi : FAQ sur la Loi Labbé. En ligne : <https://www.ecophyto-pro.fr/n/la-loi-mode-d-emploi-faq-sur-la-loi-labbe/n:323>, consulté le 26 mai 2020.
- Edwards, F. W. (1920) Notes on the Mosquitos of Madagascar, Mauritius and Réunion. In : *Bulletin of Entomological Research*, vol. 11, n° 2, p. 133–138. DOI: 10.1017/S0007485300044539.
- El Qada, Emad N.; Allen, Stephen J.; Walker, Gavin M. (2006) Adsorption of Methylene Blue onto activated carbon produced from steam activated bituminous coal: A study of equilibrium adsorption isotherm. In : *Chemical Engineering Journal*, vol. 124, n° 1-3, p. 103–110. DOI: 10.1016/j.cej.2006.08.015.
- Emmanouil, Mary; Evangelidou, Maria; Papa, Anna; Mentis, Andreas (2020) Importation of Dengue, Zika and Chikungunya infections in Europe: the current situation in Greece. In : *New Microbes and New Infections*, p. 100663. DOI: 10.1016/j.nmni.2020.100663.
- Enkerlin, W. R. (2005) Impact of Fruit Fly Control Programmes Using the Sterile Insect Technique. In : V. A. Dyck, J. Hendrichs et A. S. Robinson, coord.: *Sterile Insect Technique*: Springer, Dordrecht, p. 651–676. En ligne : https://doi.org/10.1007/1-4020-4051-2_25, consulté le 5 mars 2019.
- Enkerlin, W. R.; Ruelas, J. M. Gutiérrez; Pantaleon, R.; Litera, C. Soto; Cortés, A. Villaseñor; López, J. L. Zavala et al. (2017) The Moscamed Regional Programme: review of a success story of area-wide sterile insect technique application. In : *Entomologia Experimentalis et Applicata*, vol. 164, n° 3, p. 188–203. DOI: 10.1111/eea.12611.
- Epelboin, Yanouk; Talaga, Stanislas; Epelboin, Loïc; Dusfour, Isabelle (2017) Zika virus: An updated review of competent or naturally infected mosquitoes. In : *PLOS Neglected Tropical Diseases*, vol. 11, n° 11, e0005933. DOI: 10.1371/journal.pntd.0005933.
- European Centre for Disease Prevention and Control (2021) *Aedes albopictus* - current known distribution: March 2021. En ligne : <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/aedes-albopictus-current-known-distribution-march-2021>, consulté le 17 septembre 2021.
- European Centre for Disease Prevention and Control and European Food Safety Authority (2020a) Chikungunya worldwide overview. En ligne : <https://www.ecdc.europa.eu/en/chikungunya-monthly>, consulté le 31 mars 2020.
- European Centre for Disease Prevention and Control and European Food Safety Authority (2020b) Dengue worldwide overview. En ligne : <https://www.ecdc.europa.eu/en/dengue-monthly>, consulté le 31 mars 2020.
- Evans, Benjamin R.; Kotsakiozi, Panayiota; Costa-da-Silva, Andre Luis; Ioshino, Rafaella Sayuri; Garziera, Luiza; Pedrosa, Michele C. et al. (2019) Transgenic *Aedes aegypti* Mosquitoes Transfer Genes into a Natural Population. In : *Scientific Reports*, vol. 9, n° 1, p. 13047. DOI: 10.1038/s41598-019-49660-6.
- Evans, Benjamin R.; Kotsakiozi, Panayiota; Costa-da-Silva, Andre Luis; Ioshino, Rafaella Sayuri; Garziera, Luiza; Pedrosa, Michele C. et al. (2020) Editorial Expression of Concern: Transgenic *Aedes aegypti* Mosquitoes Transfer Genes into a Natural Population. In : *Scientific Reports*, vol. 10, n° 1, p. 5524. DOI: 10.1038/s41598-020-62398-w.
- Fanson, B. G.; Sundaralingam, S.; Jiang, L.; Dominiak, B. C.; D'Arcy, G. (2014) A review of 16 years of quality control parameters at a mass-rearing facility producing Queensland fruit fly, *Bactrocera tryoni*. In : *Entomologia Experimentalis et Applicata*, vol. 151, n° 2, p. 152–159. DOI: 10.1111/eea.12180.

- FAO/IAEA (2019) Spreadsheet for Dimensioning Aedes Mosquito Mass-rearing and Release Facilities. In : Rafael Argiles-Herrero, Carlos Cáceres et Jérémy Bouyer, coord.: Spreadsheet for Dimensioning Aedes Mosquito Mass-rearing and Release Facilities. Vienna, Austria.
- Fay, R. W.; Morlan, H. B. (1959) A mechanical device for separating the developmental stages, sexes and species of mosquitoes. In : Mosquito News, vol. 19, n° 3, p. 144–147. En ligne : <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19611000385>.
- Focks, Dana A. (2007) TOXORHYNCHITES AS BIOCONTROL AGENTS. In : Journal of the American Mosquito Control Association, vol. 23, n° sp2, p. 118–127. DOI: 10.2987/8756-971X(2007)23[118:TABA]2.0.CO;2.
- Fontaine, Albin; Filipović, Igor; Fansiri, Thanyalak; Hoffmann, Ary A.; Cheng, Changde; Kirkpatrick, Mark et al. (2017) Extensive Genetic Differentiation between Homomorphic Sex Chromosomes in the Mosquito Vector, *Aedes aegypti*. In : Genome Biology and Evolution, vol. 9, n° 9, p. 2322–2335. DOI: 10.1093/gbe/evx171.
- Fortuna, C.; Remoli, M. E.; Severini, F.; Di Luca, M.; Toma, L.; Fois, F. et al. (2015) Evaluation of vector competence for West Nile virus in Italian *Stegomyia albopicta* (= *Aedes albopictus*) mosquitoes. In : Medical and Veterinary Entomology, vol. 29, n° 4, p. 430–433. DOI: 10.1111/mve.12133.
- Franke, F.; Giron, S.; Cochet, A.; Jeannin, C.; Leparc-Goffart, I.; Valk, H. de et al. (2019) Autochthonous chikungunya and dengue fever outbreak in Mainland France, 2010–2018. In : European Journal of Public Health, vol. 29, n° Supplement_4. DOI: 10.1093/eurpub/ckz186.628.
- Franz, G. (2005) Genetic Sexing Strains in Mediterranean Fruit Fly, an Example for Other Species Amenable to Large-Scale Rearing for the Sterile Insect Technique. In : V. A. Dyck, J. Hendrichs et A. S. Robinson, coord.: Sterile Insect Technique: Springer, Dordrecht, p. 427–451. En ligne : https://link.springer.com/chapter/10.1007/1-4020-4051-2_16, consulté le 24 juillet 2018.
- Fraser, M. J.; Cary, L.; Boonvisudhi, K.; Wang, H. G. (1995) Assay for movement of Lepidopteran transposon IFP2 in insect cells using a baculovirus genome as a target DNA. In : Virology, vol. 211, n° 2, p. 397–407. DOI: 10.1006/viro.1995.1422.
- Fraser, M. J.; Ciszczon, T.; Elick, T.; Bauser, C. (1996) Precise excision of TTAA-specific lepidopteran transposons piggyBac (IFP2) and tagalong (TFP3) from the baculovirus genome in cell lines from two species of Lepidoptera. In : Insect Molecular Biology, vol. 5, n° 2, p. 141–151. DOI: 10.1111/j.1365-2583.1996.tb00048.x.
- Galizi, Roberto; Doyle, Lindsey A.; Menichelli, Miriam; Bernardini, Federica; Deredec, Anne; Burt, Austin et al. (2014) A synthetic sex ratio distortion system for the control of the human malaria mosquito. In : Nature Communications, vol. 5, p. 3977. DOI: 10.1038/ncomms4977.
- Galizi, Roberto; Hammond, Andrew Marc; Kyrou, Kyros; Taxiarchi, Chrysanthi; Bernardini, Federica; O’Loughlin, Samantha M. et al. (2016) A CRISPR-Cas9 sex-ratio distortion system for genetic control. In : Scientific Reports, vol. 6, p. 31139. DOI: 10.1038/srep31139.
- Ganushkina, Ludmila A.; Patraman, Ivan V.; Rezza, Giovanni; Migliorini, Luigi; Litvinov, Serguei K.; Sergiev, Vladimir P. (2016) Detection of *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, and *Aedes koreicus* in the Area of Sochi, Russia. In : Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.), vol. 16, n° 1, p. 58–60. DOI: 10.1089/vbz.2014.1761.
- Gaskell, G.; Allum, N.; Stares, S.; Fjæstad, Björn; Öhman, S.; Olofsson, A. (2003) Europeans and biotechnology in 2002 - Eurobarometer 58.0 : A report to the EC Directorate General for Research from the project. En ligne : <https://www.semanticscholar.org/paper/Europeans-and-biotechnology-in-2002-Eurobarometer-%3A-Gaskell-Allum/8b7fd4355354150bf5c625396e874d0694a504b2>.
- Gato, René; Menéndez, Zulema; Prieto, Enrique; Argiles-Herrero, Rafael; Rodríguez, Mislady; Baldoquín, Waldemar et al. (2021) Sterile Insect Technique: Successful Suppression of an *Aedes aegypti* Field Population in Cuba. In : Insects, vol. 12, n° 5. DOI: 10.3390/insects12050469.
- Gérardin, Patrick; Couderc, Thérèse; Bintner, Marc; Tournebize, Patrice; Renouil, Michel; Lémant, Jérôme et al. (2016) Chikungunya virus-associated encephalitis: A cohort study on La Réunion Island, 2005–2009. In : Neurology, vol. 86, n° 1, p. 94–102. DOI: 10.1212/WNL.0000000000002234.
- Giesbrecht, David; Heschuk, Daniel; Wiens, Ian; Boguski, David; LaChance, Parker; Whyard, Steve (2020) RNA Interference Is Enhanced by Knockdown of double-stranded RNases in the Yellow Fever Mosquito *Aedes Aegypti*. In : Insects, vol. 11, n° 6. DOI: 10.3390/insects11060327.
- Gilles, Jeremie R. L.; Schetelig, Marc F.; Scolari, Francesca; Marec, František; Capurro, Margareth L.; Franz, Gerald; Bourtzis, Kostas (2014) Towards mosquito sterile insect technique programmes: Exploring genetic,

- molecular, mechanical and behavioural methods of sex separation in mosquitoes. In : *Acta Tropica*, vol. 132, S178-S187. DOI: 10.1016/j.actatropica.2013.08.015.
- Giron, Sandra; Franke, Florian; Decoppet, Anne; Cadiou, Bernard; Travaglini, Thierry; Thirion, Laurence et al. (2019) Vector-borne transmission of Zika virus in Europe, southern France, August 2019. In : *Eurosurveillance*, vol. 24, n° 45. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2019.24.45.1900655.
- Gloria-Soria, Andrea; Ayala, Diego; Bheecarry, Ambicadutt; Calderon-Arguedas, Olger; Chadee, Dave D.; Chiappero, Marina et al. (2016) Global genetic diversity of *Aedes aegypti*. In : *Molecular ecology*, vol. 25, n° 21, p. 5377–5395. DOI: 10.1111/mec.13866.
- Gomulski, Ludvik M.; Mariconti, Marina; Di Cosimo, Alessandro; Scolari, Francesca; Manni, Mosè; Savini, Grazia et al. (2018) The Nix locus on the male-specific homologue of chromosome 1 in *Aedes albopictus* is a strong candidate for a male-determining factor. In : *Parasites & Vectors*, vol. 11, n° 2, p. 647. DOI: 10.1186/s13071-018-3215-8.
- Gouagna, Louis Clément; Damiens, David; Oliva, Clélia F.; Boyer, Sébastien; Le Goff, Gilbert; Brengues, Cécile et al. (2020) Strategic Approach, Advances, and Challenges in the Development and Application of the SIT for Area-Wide Control of *Aedes albopictus* Mosquitoes in Reunion Island. In : *Insects*, vol. 11, n° 11. DOI: 10.3390/insects11110770.
- Grigoraki, Linda; Puggioli, Arianna; Mavridis, Konstantinos; Douris, Vassilis; Montanari, Mario; Bellini, Romeo; Vontas, John (2017) Striking diflubenzuron resistance in *Culex pipiens*, the prime vector of West Nile Virus. In : *Scientific Reports*, vol. 7, n° 1, p. 11699. DOI: 10.1038/s41598-017-12103-1.
- Guimond, N.; Bideshi, D. K.; Pinkerton, A. C.; Atkinson, P. W.; O'Brochta, D. A. (2003) Patterns of Hermes transposition in *Drosophila melanogaster*. In : *Molecular genetics and genomics : MGG*, vol. 268, n° 6, p. 779–790. DOI: 10.1007/s00438-002-0800-4.
- Gutiérrez-López, Rafael; Bialosuknia, Sean M.; Ciota, Alexander T.; Montalvo, Tomás; La Martínez-de Puente, Josue; Gangoso, Laura et al. (2019) Vector Competence of *Aedes caspius* and *Ae. albopictus* Mosquitoes for Zika Virus, Spain. In : *Emerging infectious diseases*, vol. 25, n° 2, p. 346–348. DOI: 10.3201/eid2502.171123.
- Guzman, Maria G.; Harris, Eva (2015) Dengue. In : *The Lancet*, vol. 385, n° 9966, p. 453–465. DOI: 10.1016/S0140-6736(14)60572-9.
- Häcker, Irina; Schetelig, Marc F. (2018) Molecular tools to create new strains for mosquito sexing and vector control. In : *Parasites & Vectors*, vol. 11, n° 2, p. 645. DOI: 10.1186/s13071-018-3209-6.
- Hall, Andrew Brantley; Basu, Sanjay; Jiang, Xiaofang; Qi, Yumin; Timoshevskiy, Vladimir A.; Biedler, James Kite et al. (2015) A male-determining factor in the mosquito *Aedes aegypti*. In : *Science (Washington)*, vol. 348, n° 6240, p. 1268–1270. DOI: 10.1126/science.aaa2850.
- Hall, Andrew Brantley; Timoshevskiy, Vladimir A.; Sharakhova, Maria; Jiang, Xiaofang; Basu, Sanjay; Anderson, Michelle A. E. et al. (2014) Insights into the Preservation of the Homomorphic Sex-Determining Chromosome of *Aedes aegypti* from the Discovery of a Male-Biased Gene Tightly Linked to the M-Locus. In : *Genome Biology and Evolution*, vol. 6. DOI: 10.1093/gbe/evu002.
- Hama, C.; Ali, Z.; Kornberg, T. B. (1990) Region-specific recombination and expression are directed by portions of the *Drosophila* engrailed promoter. In : *Genes & development*, vol. 4, n° 7, p. 1079–1093. DOI: 10.1101/gad.4.7.1079.
- Hammond, Andrew Marc; Galizi, Roberto; Kyrou, Kyros; Simoni, Alekos; Siniscalchi, Carla; Katsanos, Dimitris et al. (2016) A CRISPR-Cas9 gene drive system targeting female reproduction in the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae*. In : *Nature Biotechnology*, vol. 34, n° 1, p. 78–83. DOI: 10.1038/nbt.3439.
- Hammond, Andrew Marc; Karlsson, Xenia; Morianou, Ioanna; Kyrou, Kyros; Beaghton, Andrea; Gribble, Matthew et al. (2021) Regulating the expression of gene drives is key to increasing their invasive potential and the mitigation of resistance. In : *PLOS Genetics*, vol. 17, n° 1, e1009321. DOI: 10.1371/journal.pgen.1009321.
- Hammond, Andrew Marc; Kyrou, Kyros; Bruttini, Marco; North, Ace; Galizi, Roberto; Karlsson, Xenia et al. (2017) The creation and selection of mutations resistant to a gene drive over multiple generations in the malaria mosquito. In : *PLOS Genetics*, vol. 13, n° 10, e1007039. DOI: 10.1371/journal.pgen.1007039.
- Hapairai, Limb K.; Mysore, Keshava; Chen, Yingying; Harper, Elizabeth I.; Scheel, Max P.; Lesnik, Alexandra M. et al. (2017) Lure-and-Kill Yeast Interfering RNA Larvicides Targeting Neural Genes in the Human Disease Vector Mosquito *Aedes aegypti*. In : *Scientific Reports*, vol. 7, n° 1, p. 13223. DOI: 10.1038/s41598-017-13566-y.

- Hardy, J. L.; Houk, E. J.; Kramer, L. D.; Reeves, W. C. (1983) Intrinsic factors affecting vector competence of mosquitoes for arboviruses. In : Annual review of entomology, vol. 28, p. 229–262. DOI: 10.1146/annurev.en.28.010183.001305.
- Hartberg, W. K. (1971) Observations on the mating behaviour of *Aedes aegypti* in nature. In : Bulletin of the World Health Organization, vol. 45, n° 6, p. 847–850.
- Hedges, Lauren M.; Brownlie, Jeremy C.; O'Neill, Scott L.; Johnson, Karyn N. (2008) Wolbachia and virus protection in insects. In : Science (New York, N.Y.), vol. 322, n° 5902, p. 702. DOI: 10.1126/science.1162418.
- Heinrichs, V.; Ryner, L. C.; Baker, Bruce S. (1998) Regulation of sex-specific selection of fruitless 5' splice sites by transformer and transformer-2. In : Molecular and cellular biology, vol. 18, n° 1, p. 450–458. DOI: 10.1128/mcb.18.1.450.
- Hoang, Kim Phuc; Teo, Tze Min; Ho, Thien Xuan; Le, Vinh Sy (2016) Mechanisms of sex determination and transmission ratio distortion in *Aedes aegypti*. In : Parasites & Vectors, vol. 9, n° 1, p. 49. DOI: 10.1186/s13071-016-1331-x.
- Horowitz, A. Rami; Mendelson, Zmira; Cahill, Matthew; Denholm, Ian; Ishaaya, Isaac (1999) Managing resistance to the insect growth regulator, pyriproxyfen, in *Bemisia tabaci*. In : Pesticide Science, vol. 55, n° 3, p. 272–276. DOI: 10.1002/(SICI)1096-9063(199903)55:3<272::AID-PS908>3.0.CO;2-Y.
- Houses of Parliament; Alphey, Luke S.; Burt, Austin; Crisanti, Andrea (2015) House of Lords - Genetically Modified Insects - Science and Technology Committee. En ligne : <https://publications.parliament.uk/pa/ld201516/ldselect/ldsctech/68/6804.htm>, consulté le 5 octobre 2021.
- Ibáñez-Bernal, S.; Briseño, B.; Mutebi, J. P.; Argot, E.; Rodríguez, G.; Martínez-Campos, C. et al. (1997) First record in America of *Aedes albopictus* naturally infected with dengue virus during the 1995 outbreak at Reynosa, Mexico. In : Medical and Veterinary Entomology, vol. 11, n° 4, p. 305–309. DOI: 10.1111/j.1365-2915.1997.tb00413.x.
- Ibañez-Justicia, A.; Gloria-Soria, A.; den Hartog, W.; Dik, M.; Jacobs, F.; Stroo, A. (2017) The first detected airline introductions of yellow fever mosquitoes (*Aedes aegypti*) to Europe, at Schiphol International airport, the Netherlands. In : Parasites & Vectors, vol. 10, n° 1, p. 603. DOI: 10.1186/s13071-017-2555-0.
- Ingala, Melissa R.; Simmons, Nancy B.; Wulsch, Claudia; Krampis, Konstantinos; Provost, Kaiya L.; Perkins, Susan L. (2021) Molecular diet analysis of neotropical bats based on fecal DNA metabarcoding. In : Ecology and Evolution, vol. 11, n° 12, p. 7474–7491. DOI: 10.1002/ece3.7579.
- Ingram, Erin M.; Augustin, Julie; Ellis, Marion D.; Siegfried, Blair D. (2015) Evaluating sub-lethal effects of orchard-applied pyrethroids using video-tracking software to quantify honey bee behaviors. In : Chemosphere, vol. 135, p. 272–277. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2015.04.022.
- Inouye, David W. (2010) Mosquitoes: more likely nectar thieves than pollinators. In : Nature, vol. 467, n° 7311, p. 27. DOI: 10.1038/467027d.
- Invest, J. F.; Lucas, J. R. (2008) Pyriproxyfen as a mosquito larvicide. In : 6th International Conference on Urban Pests, Budapest, Hungary, 13-16 July 2008, p. 239–245.
- Ishaaya, Isaac; Horowitz, A. Rami (1995) Pyriproxyfen, a novel insect growth regulator for controlling whiteflies: Mechanisms and resistance management. In : Pesticide Science, vol. 43, n° 3, p. 227–232. DOI: 10.1002/ps.2780430308.
- Johnson, Rebecca M.; Rasgon, Jason L. (2018) Densonucleosis viruses ('densovirus') for mosquito and pathogen control. In : Current Opinion in Insect Science, vol. 28, p. 90–97. DOI: 10.1016/j.cois.2018.05.009.
- Kamal, Mahmoud; Kenawy, Mohamed A.; Rady, Magda Hassan; Khaled, Amany Soliman; Samy, Abdallah M. (2018) Mapping the global potential distributions of two arboviral vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* under changing climate. In : PLOS ONE, vol. 13, n° 12, e0210122. DOI: 10.1371/journal.pone.0210122.
- Kamgang, Basile; Vazeille, Marie; Yougang, Aurélie P.; Tedjou, Armel N.; Wilson-Bahun, Theodel A.; Mousson, Laurence et al. (2019) Potential of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to transmit yellow fever virus in urban areas in Central Africa. In : Emerging microbes & infections, vol. 8, n° 1, p. 1636–1641. DOI: 10.1080/22221751.2019.1688097.
- Kandul, Nikolay P.; Liu, Junru; Hsu, Alexander D.; Hay, Bruce A.; Akbari, Omar S. (2020) A drug-inducible sex-separation technique for insects. In : Nature Communications, vol. 11, n° 1, p. 2106. DOI: 10.1038/s41467-020-16020-2.

- Kandul, Nikolay P.; Liu, Junru; Sánchez C, Héctor M.; Wu, Sean L.; Marshall, John M.; Akbari, Omar S. (2019) Transforming insect population control with precision guided sterile males with demonstration in flies. In : *Nature Communications*, vol. 10, n° 1, p. 84. DOI: 10.1038/s41467-018-07964-7.
- Kasai, Shinji; Caputo, Beniamino; Tsunoda, Takashi; Cuong, Tran Chi; Maekawa, Yoshihide; Lam-Phua, Sai Gek et al. (2019) First detection of a Vssc allele V1016G conferring a high level of insecticide resistance in *Aedes albopictus* collected from Europe (Italy) and Asia (Vietnam), 2016: a new emerging threat to controlling arboviral diseases. In : *Eurosurveillance*, vol. 24, n° 5, p. 1700847. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2019.24.5.1700847.
- Kassebaum, Nicholas J.; Arora, Megha; Barber, Ryan M.; Bhutta, Zulfiqar A.; Brown, Jonathan; Carter, Austin et al. (2016) Global, regional, and national disability-adjusted life-years (DALYs) for 315 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE), 1990Global Burden of Disease Study 2015. In : *The Lancet*, vol. 388, n° 10053, p. 1603–1658. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)31460-X.
- Katzelnick, Leah C.; Narvaez, César; Arguello, Sonia; Lopez Mercado, Brenda; Collado, Damaris; Ampie, Oscarlett et al. (2020) Zika virus infection enhances future risk of severe dengue disease. In : *Science (New York, N.Y.)*, vol. 369, n° 6507, p. 1123–1128. DOI: 10.1126/science.abb6143.
- Kettlun, Claudia; Galvan, Daniel L.; George, Alfred L.; Kaja, Aparna; Wilson, Matthew H. (2011) Manipulating piggyBac transposon chromosomal integration site selection in human cells. In : *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, vol. 19, n° 9, p. 1636–1644. DOI: 10.1038/mt.2011.129.
- Kirst, Herbert A. (2010) The spinosyn family of insecticides: realizing the potential of natural products research. In : *The Journal of antibiotics*, vol. 63, n° 3, p. 101–111. DOI: 10.1038/ja.2010.5.
- Klein, T. A.; Windbichler, N.; Deredec, A.; Burt, A.; Benedict, Mark Q. (2012) Infertility resulting from transgenic I-PpoI male *Anopheles gambiae* in large cage trials. In : *Pathogens and Global Health*, vol. 106, n° 1, p. 20–31. DOI: 10.1179/2047773212Y.0000000003.
- Knipling, E. F. (1955) Possibilities of Insect Control or Eradication Through the Use of Sexually Sterile Males. In : *Journal of Economic Entomology*, vol. 48, n° 4, p. 459–462. DOI: 10.1093/jee/48.4.459.
- Knipling, E. F. (1959) Sterile-Male Method of Population Control: Successful with some insects, the method may also be effective when applied to other noxious animals. In : *Science (Washington)*, vol. 130, n° 3380, p. 902–904. DOI: 10.1126/science.130.3380.902.
- Kraemer, Moritz U. G.; Reiner, Robert C.; Brady, Oliver J.; Messina, Jane P.; Gilbert, Marius; Pigott, David M. et al. (2019) Past and future spread of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. In : *Nature Microbiology*, vol. 4, n° 5, p. 854. DOI: 10.1038/s41564-019-0376-y.
- Kraemer, Moritz U. G.; Sinka, Marianne E.; Duda, Kirsten A.; Mylne, Adrian Q. N.; Shearer, Freya M.; Barker, Christopher M. et al. (2015) The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. In : *eLife*, vol. 4, e08347. DOI: 10.7554/eLife.08347.
- Krzywinska, E.; Kokoza, V.; Morris, M.; La Casa-Esperon, E. de; Raikhel, A. S.; Krzywinski, J. (2016) The sex locus is tightly linked to factors conferring sex-specific lethal effects in the mosquito *Aedes aegypti*. In : *Heredity*, vol. 117, n° 6, p. 408–416. DOI: 10.1038/hdy.2016.57.
- Kyrou, Kyros; Hammond, Andrew Marc; Galizi, Roberto; Kranjc, Nace; Burt, Austin; Beaghton, Andrea K. et al. (2018) A CRISPR-Cas9 gene drive targeting doublesex causes complete population suppression in caged *Anopheles gambiae* mosquitoes. In : *Nature Biotechnology*, vol. 36, n° 11, p. 1062–1066. DOI: 10.1038/nbt.4245.
- Labbé, Pierrick; Alout, Haoues; Djogbénou, Luc; Pasteur, Nicole; Weill, Mylène (2011) Evolution of Resistance to Insecticide in Disease Vectors. In : Michel. Tibayrenc, coord.: *Genetics and evolution of infectious disease*. 1st ed. Amsterdam, Boston: Elsevier (Elsevier insights), p. 363–409.
- Lacroix, R.; Delatte, H.; Hue, T.; Dehecq, J. S.; Reiter, P. (2009) Adaptation of the BG-Sentinel trap to capture male and female *Aedes albopictus* mosquitoes. In : *Medical and Veterinary Entomology*, vol. 23, n° 2, p. 160–162. DOI: 10.1111/j.1365-2915.2009.00806.x.
- Lahondère, Chloé; Vinauger, Clément; Okubo, Ryo P.; Wolff, Gabriella H.; Chan, Jeremy K.; Akbari, Omar S.; Riffell, Jeffrey A. (2020) The olfactory basis of orchid pollination by mosquitoes. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 117, n° 1, p. 708–716. DOI: 10.1073/pnas.1910589117.
- Lassalle, C.; Grizeau, P.; Isautier, H.; Bagnis, O.; Michault, A.; Zeller, H. (1998) Surveillance épidémiologique de la grippe et de la dengue. La Réunion, 1996. In : *Bull Soc Pathol Exot*, vol. 91, n° 1, p. 61–63.

- Laven, H. (1967) Eradication of *Culex pipiens fatigans* through cytoplasmic incompatibility. In : *Nature*, vol. 216, n° 5113, p. 383–384. DOI: 10.1038/216383a0.
- Leal, P. R.; Moschini-Carlos, V.; López-Doval, J. C.; Cintra, J. P.; Yamamoto, J. K.; Bitencourt, M. D. et al. (2018) Impact of copper sulfate application at an urban Brazilian reservoir: A geostatistical and ecotoxicological approach. In : *The Science of the total environment*, vol. 618, p. 621–634. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.07.095.
- Lenhart, Audrey; Morrison, Amy C.; Paz-Soldan, Valerie A.; Forshey, Brett M.; Cordova-Lopez, Jhonny J.; Astete, Helvio et al. (2020) The impact of insecticide treated curtains on dengue virus transmission: A cluster randomized trial in Iquitos, Peru. In : *PLOS Neglected Tropical Diseases*, vol. 14, n° 4, e0008097. DOI: 10.1371/journal.pntd.0008097.
- Li, Ming; Yang, Ting; Bui, Michelle; Gamez, Stephanie; Wise, Tyler; Kandul, Nikolay P. et al. (2021) Suppressing mosquito populations with precision guided sterile males. In : *Nature Communications*, vol. 12, n° 1, p. 5374. DOI: 10.1038/s41467-021-25421-w.
- Li, Ming; Yang, Ting; Kandul, Nikolay P.; Bui, Michelle; Gamez, Stephanie; Raban, Robyn et al. (2020) Development of a confinable gene drive system in the human disease vector *Aedes aegypti*. In : *eLife*, vol. 9. DOI: 10.7554/eLife.51701.
- Li, Xianghong; Burnight, Erin R.; Cooney, Ashley L.; Malani, Nirav; Brady, Troy; Sander, Jeffery D. et al. (2013) piggyBac transposase tools for genome engineering. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 110, n° 25, E2279-87. DOI: 10.1073/pnas.1305987110.
- Li, Xiaocong; Jin, Binbin; Dong, Yunqiao; Chen, Xiaoguang; Tu, Zhijian; Gu, Jinbao (2019) Two of the three Transformer-2 genes are required for ovarian development in *Aedes albopictus*. In : *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 109, p. 92–105. DOI: 10.1016/j.ibmb.2019.03.008.
- Liew, Christina; Soh, Li Ting; Chen, Irene; Ng, Lee Ching (2021) Public sentiments towards the use of Wolbachia-*Aedes* technology in Singapore. In : *BMC Public Health*, vol. 21, n° 1, p. 1417. DOI: 10.1186/s12889-021-11380-w.
- Liu, Peiwen; Jin, Binbin; Li, Xiaocong; Zhao, Yijie; Gu, Jinbao; Biedler, James Kite et al. (2019) Nix is a male-determining factor in the Asian tiger mosquito *Aedes albopictus*. In : *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, p. 103–311. DOI: 10.1016/j.ibmb.2019.103311.
- Liumbruno, Giancarlo Maria; Calteri, Deanna; Petropulacos, Kyriakoula; Mattivi, Andrea; Po, Claudio; Macini, Pierluigi et al. (2008) The Chikungunya epidemic in Italy and its repercussion on the blood system. In : *Blood Transfusion*, vol. 6, n° 4, p. 199–210. DOI: 10.2450/2008.0016-08.
- Lucchesi, John C.; Kuroda, Mitzi I. (2015) Dosage Compensation in *Drosophila*. In : *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, vol. 7, n° 5, a019398. DOI: 10.1101/cshperspect.a019398.
- Lutrat, Célia; Giesbrecht, David; Marois, Eric; Whyard, Steve; Baldet, Thierry; Bouyer, Jérémy (2019) Sex Sorting for Pest Control: It's Raining Men! In : *Trends in Parasitology*, vol. 35, n° 8, p. 649–662. DOI: 10.1016/j.pt.2019.06.001.
- Magnusson, Kalle; Mendes, Antonio M.; Windbichler, Nikolai; Papathanos, Philippos-Aris; Nolan, Tony; Dottorini, Tania et al. (2011) Transcription Regulation of Sex-Biased Genes during Ontogeny in the Malaria Vector *Anopheles gambiae*. In : *PLOS ONE*, vol. 6, n° 6, e21572. DOI: 10.1371/journal.pone.0021572.
- Maïga, Hamidou; Gilles, Jérémy R. L.; Susan Lees, Rosemary; Yamada, Hanano; Bouyer, Jérémy (2020) Démonstration de la résistance au comportement de satyrisation chez *Aedes aegypti* de l'île de La Réunion. In : *Parasite (Paris, France)*, vol. 27, p. 22. DOI: 10.1051/parasite/2020020.
- Mamai, Wadaka; Maiga, Hamidou; Somda, Nanwintoum Séverin Bimbilé; Wallner, Thomas; Konczal, Anna; Yamada, Hanano; Bouyer, Jérémy (2020) *Aedes aegypti* larval development and pupal production in the FAO/IAEA mass-rearing rack and factors influencing sex sorting efficiency. Développement larvaire et production de pupes d'*Aedes aegypti* dans le système d'élevage de masse de la FAO/AIEA et facteurs influençant l'efficacité de la séparation des sexes. In : *Parasite (Paris, France)*, vol. 27, p. 43. DOI: 10.1051/parasite/2020041.
- Maragathavally, K. J.; Kaminski, J. M.; Coates, C. J. (2006) Chimeric Mos1 and piggyBac transposases result in site-directed integration. In : *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, vol. 20, n° 11, p. 1880–1882. DOI: 10.1096/fj.05-5485fje.
- Mariconti, Marina; Obadia, Thomas; Mousson, Laurence; Malacrida, Anna; Gasperi, Giuliano; Failloux, Anna-Bella; Yen, Pei-Shi (2019) Estimating the risk of arbovirus transmission in Southern Europe using vector competence data. In : *Scientific Reports*, vol. 9. DOI: 10.1038/s41598-019-54395-5.

- Marois, Eric; Scali, Christina; Soichot, Julien; Kappler, Christine; Levashina, Elena A.; Catteruccia, Flaminia (2012) High-throughput sorting of mosquito larvae for laboratory studies and for future vector control interventions. In : *Malaria Journal*, vol. 11, n° 1, p. 302. DOI: 10.1186/1475-2875-11-302.
- Marten, Gerald G.; Nguyen, Mieu; Thompson, Greg; Bordes, Edgar (1997) Copepod production and application for mosquito control. New Orleans Mosquito Control Board, éd. City of New Orleans. En ligne : https://gerrymarten.com/publications/pdfs/gm_copepod-production.pdf.
- Matthews, Benjamin J.; Dudchenko, Olga; Kingan, Sarah B.; Koren, Sergey; Antoshechkin, Igor; Crawford, Jacob E. et al. (2018) Improved reference genome of *Aedes aegypti* informs arbovirus vector control. In : *Nature*, vol. 563, n° 7732, p. 501. DOI: 10.1038/s41586-018-0692-z.
- Maund, S. J.; Campbell, P. J.; Giddings, J. M.; Hamer, M. J.; Henry, K.; Pilling, E. D. et al. (2011) Ecotoxicology of Synthetic Pyrethroids. In : Noritada. Matsuo et Tatsuya. Mori, coord.: *Pyrethroids. From Chrysanthemum to Modern Industrial Insecticide*. 2012^e édition. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; Springer e-books (Topics in Current Chemistry, 314), p. 137–165.
- McInnis, D. O.; Tam, S.; Grace, C.; Miyashita, D. (1994) Population Suppression and Sterility Rates Induced by Variable Sex Ratio, Sterile Insect Releases of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) in Hawaii. In : *Annals of the Entomological Society of America*, vol. 87, n° 2, p. 231–240. DOI: 10.1093/aesa/87.2.231.
- McKenzie, Benjamin A.; Wilson, Alan E.; Zohdy, Sarah (2019) *Aedes albopictus* is a competent vector of Zika virus: A meta-analysis. In : *PLOS ONE*, vol. 14, n° 5, e0216794. DOI: 10.1371/journal.pone.0216794.
- Meccariello, Angela; Salvemini, Marco; Primo, Pasquale; Hall, Andrew Brantley; Koskinioti, Panagiota; Dalikova, Martina et al. (2019) Maleness-on-the-Y (MoY) orchestrates male sex determination in major agricultural fruit fly pests. In : *bioRxiv*, p. 533646. DOI: 10.1101/533646.
- Medlock, J. M.; Hansford, K. M.; Versteirt, V.; Cull, B.; Kampen, H.; Fontenille, D. et al. (2015) An entomological review of invasive mosquitoes in Europe. In : *Bulletin of Entomological Research*, vol. 105, n° 6, p. 637–663. DOI: 10.1017/S0007485315000103.
- Medlock, Jolyon M.; Hansford, Kayleigh M.; Schaffner, Francis; Versteirt, Veerle; Hendrickx, Guy; Zeller, Herve; van Bortel, Wim (2012) A review of the invasive mosquitoes in Europe: ecology, public health risks, and control options. In : *Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)*, vol. 12, n° 6, p. 435–447. DOI: 10.1089/vbz.2011.0814.
- Menudier, L.; Vilain, P.; Robinson, E.; Balleydier, E.; Daoudi, Jamel; Thébault, H. et al. (2019) Surveillance of dengue: evolution of surveillance strategies during a large outbreak, Réunion, France. In : *European Journal of Public Health*, vol. 29, n° Supplement_4, ckz185-590.
- Metselaar, D.; Grainger, C. R.; Oei, K. G.; Reynolds, D. G.; Pudney, M.; Leake, C. J. et al. (1980) An outbreak of type 2 dengue fever in the Seychelles, probably transmitted by *Aedes albopictus* (Skuse). In : *Bulletin of the World Health Organization*, vol. 58, n° 6, p. 937–943.
- Meza, José S.; Haq, Ihsan ul; Vreysen, Marc J. B.; Bourtzis, Kostas; Kyritsis, Georgios A.; Cáceres, Carlos (2018) Comparison of classical and transgenic genetic sexing strains of Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) for application of the sterile insect technique. In : *PLOS ONE*, vol. 13, n° 12, e0208880. DOI: 10.1371/journal.pone.0208880.
- Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation (2018) Jardiner avec des produits d'origine naturelle. En ligne : <https://agriculture.gouv.fr/jardiner-avec-des-produits-dorigine-naturelle>, consulté le 26 mai 2020.
- Ministère des Solidarités et de la Santé (2019) Cartes de présence du moustique tigre (*Aedes albopictus*) en France métropolitaine. En ligne : <https://solidarites-sante.gouv.fr/sante-et-environnement/risques-microbiologiques-physiques-et-chimiques/especes-nuisibles-et-parasites/article/cartes-de-presence-du-moustique-tigre-aedes-albopictus-en-france-metropolitaine>, consulté le 12 mars 2019.
- Moore, Chester G.; Francy, D. B.; Eliason, D. A.; Monath, T. P. (1988) *Aedes albopictus* in the United States: rapid spread of a potential disease vector. In : *Journal of the American Mosquito Control Association*, vol. 4, n° 3, p. 356–361. En ligne : http://www.biodiversitylibrary.org/content/part/jamca/jamca_v04_n3_p356-361.pdf.
- Moreira, Luciano A.; Iturbe-Ormaetxe, Iñaki; Jeffery, Jason A.; Lu, Guangjin; Pyke, Alyssa T.; Hedges, Lauren M. et al. (2009) A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and Plasmodium. In : *Cell*, vol. 139, n° 7, p. 1268–1278. DOI: 10.1016/j.cell.2009.11.042.
- Mulatier, Margaux (2018) Interactions entre l'état physiologique du moustique et le mode d'action des répulsifs chez les vecteurs de pathogènes. Montpellier. En ligne : <http://www.theses.fr/2018MONTG032>.

- Murray, Christopher J. L.; Lopez, Alan D. (1996) The global burden of disease. a comprehensive assessment of mortality and disability from diseases, injuries, and risk factors in 1990 and projected to 2020. En ligne : https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/41864/0965546608_eng.pdf.
- Muzari, Mutizwa Odwell; Devine, Gregor; Davis, Joseph; Crunkhorn, Bruce; van den Hurk, Andrew; Whelan, Peter et al. (2017) Holding back the tiger: Successful control program protects Australia from *Aedes albopictus* expansion. In : PLOS Neglected Tropical Diseases, vol. 11, n° 2, e0005286. DOI: 10.1371/journal.pntd.0005286.
- Newton, M. E.; Southern, D. I.; Wood, R. J. (1974) X and Y chromosomes of *Aedes aegypti* (L.) distinguished by Giemsa C-banding. In : Chromosoma, vol. 49, n° 1, p. 41–49. DOI: 10.1007/BF00284986.
- O’Leary, Sarah; Adelman, Zach N. (2019) Disrupting female flight in the vector *Aedes aegypti* (14).
- Ocampo, Clara B.; Mina, Neila Julieth; Carabali, Mabel; Alexander, Neal; Osorio, Lyda (2014) Reduction in dengue cases observed during mass control of *Aedes* (*Stegomyia*) in street catch basins in an endemic urban area in Colombia. In : Acta Tropica, vol. 132, p. 15–22. DOI: 10.1016/j.actatropica.2013.12.019.
- Ogaugwu, Christian E.; Schetelig, Marc F.; Wimmer, Ernst A. (2013) Transgenic sexing system for *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) based on female-specific embryonic lethality. In : Insect Biochemistry and Molecular Biology, vol. 43, n° 1, p. 1–8. DOI: 10.1016/j.ibmb.2012.10.010.
- Okorie, Patricia N.; Marshall, John M.; Akpa, Onoja M.; Ademowo, Olusegun G. (2014) Perceptions and recommendations by scientists for a potential release of genetically modified mosquitoes in Nigeria. In : Malaria Journal, vol. 13, n° 1, p. 154. DOI: 10.1186/1475-2875-13-154.
- Oliva, Clelia F.; Damiens, David; Vreysen, Marc J. B.; Lemperière, Guy; Gilles, Jérémie (2013) Reproductive strategies of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) and implications for the sterile insect technique. In : PLOS ONE, vol. 8, n° 11, e78884. DOI: 10.1371/journal.pone.0078884.
- Orankanok, W.; Chinvinikul, S.; Thanaphum, S.; Sitalob, P.; Enkerlin, W. R. (2007) Area-Wide Integrated Control of Oriental Fruit Fly *Bactrocera dorsalis* and Guava Fruit Fly *Bactrocera correcta* in Thailand. In : M. J. B. Vreysen, A. S. Robinson et J. Hendrichs, coord.: Area-Wide Control of Insect Pests: Springer, Dordrecht, p. 517–526.
- Owens, Jesse B.; Urschitz, Johann; Stoytchev, Ilko; Dang, Nong C.; Stoytcheva, Zoia; Belcaid, Mahdi et al. (2012) Chimeric piggyBac transposases for genomic targeting in human cells. In : Nucleic Acids Research, vol. 40, n° 14, p. 6978–6991. DOI: 10.1093/nar/gks309.
- Pagès, Frédéric; Peyrefitte, Christophe N.; Mve, Médard Tounng; Jarjaval, Fanny; Brisse, Sylvain; Iteman, Isabelle et al. (2009) *Aedes albopictus* mosquito: the main vector of the 2007 Chikungunya outbreak in Gabon. In : PLOS ONE, vol. 4, n° 3, e4691. DOI: 10.1371/journal.pone.0004691.
- Palatini, Umberto; Masri, Reem A.; Cosme, Luciano V.; Koren, Sergey; Thibaud-Nissen, Françoise; Biedler, James Kite et al. (2020) Improved reference genome of the arboviral vector *Aedes albopictus*. In : Genome biology, vol. 21, n° 1, p. 215. DOI: 10.1186/s13059-020-02141-w.
- Panjwani, Anusha; Wilson, Anthony (2016) What Is Stopping the Use of Genetically Modified Insects for Disease Control? In : PLOS Pathogens, vol. 12, n° 10, e1005830. DOI: 10.1371/journal.ppat.1005830.
- Papathanos, Philippos Aris; Windbichler, Nikolai (2018) Redkmer: An Assembly-Free Pipeline for the Identification of Abundant and Specific X-Chromosome Target Sequences for X-Shredding by CRISPR Endonucleases. In : The CRISPR Journal, vol. 1, n° 1, p. 88–98. DOI: 10.1089/crispr.2017.0012.
- Parlement européen (2001) Directive 2001/18/CE du Parlement européen et du Conseil du 12 mars 2001 relative à la dissémination volontaire d’organismes génétiquement modifiés dans l’environnement et abrogeant la directive 90/220/CEE du Conseil - Déclaration de la Commission: OJ L. En ligne : <http://data.europa.eu/eli/dir/2001/18/oj/fra>, consulté le 19 juillet 2018.
- Peach, Daniel A. H.; Gries, Gerhard (2016) Nectar thieves or invited pollinators? A case study of tansy flowers and common house mosquitoes. In : Arthropod-Plant Interactions, vol. 10, n° 6, p. 497–506. DOI: 10.1007/s11829-016-9445-9.
- Pereira Dos Santos, Taissa (2019) Invasion d’*Aedes albopictus* dans les milieux forestiers tropicaux et potentiel pour l’émergence de virus zoonotiques au Brésil. Montpellier. En ligne : <http://www.theses.fr/2019MONTG012>.
- Perrin, Aurélie; Gosselin-Grenet, Anne-Sophie; Rossignol, Marie; Ginibre, Carole; Scheid, Bethsabée; Lagneau, Christophe et al. (2020) Variation in the susceptibility of urban *Aedes* mosquitoes infected with a dengue virus. In : Scientific Reports, vol. 10, n° 1, p. 18654. DOI: 10.1038/s41598-020-75765-4.

- Pichler, Verena; Bellini, Romeo; Veronesi, Rodolfo; Arnoldi, Daniele; Rizzoli, Annapaola; Lia, Riccardo Paolo et al. (2018) First evidence of resistance to pyrethroid insecticides in Italian *Aedes albopictus* populations 26 years after invasion. In : Pest Management Science, vol. 74, n° 6, p. 1319–1327. DOI: 10.1002/ps.4840.
- Pierre, V., Thiria, J.; Rachou, E.; Sissoko, D.; Lassalle, C.; Renault, P. (2005) Journées de veille sanitaire : Epidémie de dengue 1 à la Réunion en 2004. En ligne : https://scholar.google.fr/citations?user=n3_dqegaaaaj&hl=fr&oi=sra.
- Pleydell, David R. J.; Bouyer, Jérémy (2019) Biopesticides improve efficiency of the sterile insect technique for controlling mosquito-driven dengue epidemics. In : Communications biology, vol. 2, p. 201. DOI: 10.1038/s42003-019-0451-1.
- Pluskota, Björn; Storch, Volker; Braunbeck, Thomas; Beck, Matthias; Becker, Norbert (2008) First record of *Stegomyia albopicta* (Skuse)(Diptera: Culicidae) in Germany. In : Journal of the European Mosquito Control Association, vol. 26, p. 1–5. En ligne : http://e-m-b.org/sites/e-m-b.org/files/emb26_1.pdf.
- Pomiankowski, Andrew; Nöthiger, Rolf; Wilkins, Adam (2004) The evolution of the *Drosophila* sex-determination pathway. In : Genetics, vol. 166, n° 4, p. 1761–1773. DOI: 10.1534/genetics.166.4.1761.
- Powell, Jeffrey R.; Tabachnick, Walter J. (2013) History of domestication and spread of *Aedes aegypti*--a review. In : Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, 108 Suppl 1, p. 11–17. DOI: 10.1590/0074-0276130395.
- Pratt Jr., J. J.; Hexerick, R. H.; Harrison, J. B.; Haber, L. (1946) Tires as a Factor in the Transportation of Mosquitoes by Ships. In : Military Surgeon, vol. 99, n° 6.
- Price, Tom A. R.; Windbichler, Nikolai; Unckless, Robert L.; Sutter, Andreas; Runge, Jan-Niklas; Ross, Perran A. et al. (2020) Resistance to natural and synthetic gene drive systems. In : Journal of evolutionary biology, vol. 33, n° 10, p. 1345–1360. DOI: 10.1111/jeb.13693.
- Puggioli, Arianna; Calvitti, Maurizio; Moretti, Riccardo; Bellini, Romeo (2016) wPip Wolbachia contribution to *Aedes albopictus* SIT performance: Advantages under intensive rearing. In : Acta Tropica, vol. 164, p. 473–481. DOI: 10.1016/j.actatropica.2016.10.014.
- Qi, Yumin; Wu, Yang; Saunders, Randy; Chen, Xiao-Guang; Mao, Chunhong; Biedler, James Kite; Tu, Zhijian Jake (2019) *Guy1*, a Y-linked embryonic signal, regulates dosage compensation in *Anopheles stephensi* by increasing X gene expression. In : eLife, vol. 8. DOI: 10.7554/eLife.43570.
- Ramalli, L.; Grard, G.; Beck, C.; Gallian, P.; L'Ambert, G.; Desvaux, S. et al. (2019) West Nile virus infections in France, July to November 2018. In : European Journal of Public Health, vol. 29, n° Supplement_4. DOI: 10.1093/eurpub/ckz186.631.
- Reiter, Paul (1998) *Aedes albopictus* and the world trade in used tires, 1988-1995: the shape of things to come? In : Journal of the American Mosquito Control Association, vol. 14, n° 1, p. 83–94. En ligne : http://www.biodiversitylibrary.org/content/part/jamca/jamca_v14_n1_p083-094.pdf.
- Reiter, Paul (2007) Oviposition, dispersal, and survival in *Aedes aegypti*: implications for the efficacy of control strategies. In : Vector-Borne and Zoonotic Diseases, vol. 7, n° 2, p. 261–273. DOI: 10.1089/vbz.2006.0630.
- Renault, Philippe; Solet, Jean-Louis; Sissoko, Daouda; Balleydier, Elsa; Larrieu, Sophie; Filleul, Laurent et al. (2007) A Major Epidemic of Chikungunya Virus Infection on Réunion Island, France, 2005–2006. In : The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, vol. 77, n° 4, p. 727–731. DOI: 10.4269/ajtmh.2007.77.727.
- Resnik, David B. (2018) Ethics of community engagement in field trials of genetically modified mosquitoes. In : Developing world bioethics, vol. 18, n° 2, p. 135–143. DOI: 10.1111/dewb.12147.
- Rezza, G.; Nicoletti, L.; Angelini, R.; Romi, R.; Finarelli, A. C.; Panning, M. et al. (2007) Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. In : The Lancet, vol. 370, n° 9602, p. 1840–1846. DOI: 10.1016/S0140-6736(07)61779-6.
- Ritchie, Scott A.; Pyke, Alyssa T.; Hall-Mendelin, Sonja; Day, Andrew; Mores, Christopher N.; Christofferson, Rebecca C. et al. (2013) An explosive epidemic of DENV-3 in Cairns, Australia. In : PLOS ONE, vol. 8, n° 7, e68137. DOI: 10.1371/journal.pone.0068137.
- Roekring, Songsak; Smith, Duncan R. (2010) Induction of apoptosis in densovirus infected *Aedes aegypti* mosquitoes. In : Journal of Invertebrate Pathology, vol. 104, n° 3, p. 239–241. DOI: 10.1016/j.jip.2010.04.002.
- Roiz, David; Duperier, Sandy; Roussel, Marion; Boussès, Philippe; Fontenille, Didier; Simard, Frédéric; Paupy, Christophe (2016) Trapping the Tiger: Efficacy of the Novel BG-Sentinel 2 With Several Attractants and Carbon

- Dioxide for Collecting *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Southern France. In : Journal of Medical Entomology, vol. 53, n° 2, p. 460–465. DOI: 10.1093/jme/tjv184.
- Rosen, L. (1986) Dengue in Greece in 1927 and 1928 and the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever: new data and a different conclusion. In : The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, vol. 35, n° 3, p. 642–653. DOI: 10.4269/ajtmh.1986.35.642.
- Ryner, Lisa C.; Goodwin, Stephen F.; Castrillon, Diego H.; Anand, Anuranjan; Villella, Adriana; Baker, Bruce S. et al. (1996) Control of Male Sexual Behavior and Sexual Orientation in *Drosophila* by the fruitless Gene. In : Cell, vol. 87, n° 6, p. 1079–1089. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)81802-4.
- Sabatini, A.; Raineri, V.; Trovato, G.; Coluzzi, M. (1990) *Aedes albopictus* in Italy and possible diffusion of the species into the Mediterranean area. *Aedes albopictus* in Italia e possibile diffusione della specie nell'area mediterranea. In : Parassitologia, vol. 32, n° 3, p. 301–304.
- Saccone, G.; Pane, A.; Simone, A. de; Salvemini, M.; Milano, A.; Annunziata, L. et al. (2007) New Sexing Strains for Mediterranean Fruit Fly *Ceratitis capitata*: Transforming Females into Males. In : M. J. B. Vreysen, A. S. Robinson et J. Hendrichs, coord.: Area-Wide Control of Insect Pests: Springer, Dordrecht, p. 95–102. En ligne : http://link.springer.com/10.1007/978-1-4020-6059-5_7, consulté le 29 janvier 2019.
- Salvemini, Marco; D'Amato, Rocco; Petrella, Valeria; Aceto, Serena; Nimmo, Derric; Neira, Marco et al. (2013) The Orthologue of the Fruitfly Sex Behaviour Gene Fruitless in the Mosquito *Aedes aegypti*: Evolution of Genomic Organisation and Alternative Splicing. In : PLOS ONE, vol. 8, n° 2, e48554. DOI: 10.1371/journal.pone.0048554.
- Salvemini, Marco; Mauro, Umberto; Lombardo, Fabrizio; Milano, Andreina; Zazzaro, Vincenzo; Arcà, Bruno et al. (2011) Genomic organization and splicing evolution of the doublesex gene, a *Drosophila* regulator of sexual differentiation, in the dengue and yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. In : BMC Evolutionary Biology, vol. 11, n° 1, p. 41. DOI: 10.1186/1471-2148-11-41.
- Savage, H. M.; Ezike, V. L.; Nwankwo, A. C. N.; Spiegel, R.; Miller, B. R. (1992) First Record Of Breeding Populations Of *Aedes Albopictus* In Continental Africa: Implications For Arboviral Transmission. En ligne : http://www.biodiversitylibrary.org/content/part/jamca/jamca_v08_n1_p101-103.pdf.
- Schetelig, Marc F.; Handler, Alfred M. (2012) A transgenic embryonic sexing system for *Anastrepha suspensa* (Diptera: Tephritidae). In : Insect Biochemistry and Molecular Biology, vol. 42, n° 10, p. 790–795. DOI: 10.1016/j.ibmb.2012.07.007.
- Scholte, Ernst-Jan; Schaffner, Francis (2007) Waiting for the tiger: establishment and spread of the *Aedes albopictus* Mosquito in Europe. In : Willem Takken et Bart G. Knols, coord.: Emerging pests and vector-borne diseases in Europe, 1^{re} tome. Wageningen: Wageningen Academic Publishers (Ecology and control of vector-borne diseases), p. 241.
- Scott, Maxwell J.; Concha, Carolina; Welch, John B.; Phillips, Pamela L.; Skoda, Steven R. (2017) Review of research advances in the screwworm eradication program over the past 25 years. In : Entomologia Experimentalis et Applicata, vol. 164, n° 3, p. 226–236. DOI: 10.1111/eea.12607.
- Seixas, Gonçalo; Jupille, Henri; Yen, Pei-Shi; Viveiros, Bela; Failloux, Anna-Bella; Sousa, Carla Alexandra (2018) Potential of *Aedes aegypti* populations in Madeira Island to transmit dengue and chikungunya viruses. In : Parasites & Vectors, vol. 11, n° 1, p. 509. DOI: 10.1186/s13071-018-3081-4.
- Seixas, Gonçalo; Salgueiro, Patrícia; Bronzato-Badial, Aline; Gonçalves, Ysabel; Reyes-Lugo, Matias; Gordicho, Vasco et al. (2019) Origin and expansion of the mosquito *Aedes aegypti* in Madeira Island (Portugal). In : Scientific Reports, vol. 9, n° 1, p. 2241. DOI: 10.1038/s41598-018-38373-x.
- Shepard, Donald S.; Undurraga, Eduardo A.; Halasa, Yara A. (2013) Economic and disease burden of dengue in Southeast Asia. In : PLOS Neglected Tropical Diseases, vol. 7, n° 2, e2055. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002055.
- signalement-moustique.anses.fr/signalement_albopictus/ (2020) site de signalement du moustique tigre. En ligne : https://signalement-moustique.anses.fr/signalement_albopictus/, consulté le 7 mai 2020.
- Sinkins, Steven P.; Gould, Fred (2006) Gene drive systems for insect disease vectors. In : Nature reviews. Genetics, vol. 7, n° 6, p. 427–435. DOI: 10.1038/nrg1870.
- Skottowe, Alex J. F. (1890) An Epidemic of Dengue Fever in Fiji during the Year 1885. In : Glasgow Medical Journal, vol. 34, n° 3, p. 166–182.

Soghigian, John; Gloria-Soria, Andrea; Robert, Vincent; Le Goff, Gilbert; Failloux, Anna-Bella; Powell, Jeffrey R. (2020) Genetic evidence for the origin of *Aedes aegypti*, the yellow fever mosquito, in the southwestern Indian Ocean. In : *Molecular ecology*, vol. 29, n° 19, p. 3593–3606. DOI: 10.1111/mec.15590.

solidarites-sante.gouv.fr/sante-et-environnement/risques-microbiologiques-physiques-et-chimiques/especes-nuisibles-et-parasites/moustiques (2020) Moustiques vecteurs de maladies – Ministère des Solidarités et de la Santé. En ligne : <https://solidarites-sante.gouv.fr/sante-et-environnement/risques-microbiologiques-physiques-et-chimiques/especes-nuisibles-et-parasites/moustiques>, consulté le 7 mai 2020.

Soper, F. L. (1967) *Aedes aegypti* and yellow fever. In : *Bulletin of the World Health Organization*, vol. 36, n° 4, p. 521–527.

Souza-Neto, Jayme A.; Powell, Jeffrey R.; Bonizzoni, Mariangela (2019) *Aedes aegypti* vector competence studies: A review. In : *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, vol. 67, p. 191–209. DOI: 10.1016/j.meegid.2018.11.009.

Sunahara, Toshihiko; Ishizaka, Kenji; Mogi, Motoyoshi (2002) Habitat size: a factor determining the opportunity for encounters between mosquito larvae and aquatic predators. In : *Journal of Vector Ecology*, vol. 27, p. 8–20. En ligne : <https://scholar.archive.org/work/sqhca2m6wvvgw5eysw7dr3ql22e/access/wayback/http://www.sove.org:80/sove%20folder/journal/june2002/sunahara.pdf>.

Taillebourg, E.; Dura, J. M. (1999) A novel mechanism for P element homing in *Drosophila*. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 96, n° 12, p. 6856–6861. DOI: 10.1073/pnas.96.12.6856.

Teixeira, Luís; Ferreira, Alvaro; Ashburner, Michael (2008) The bacterial symbiont *Wolbachia* induces resistance to RNA viral infections in *Drosophila melanogaster*. In : *PLoS biology*, vol. 6, n° 12, e2. DOI: 10.1371/journal.pbio.1000002.

Tempelis, C. H.; Hayes, R. O.; Hess, A. D.; Reeves, W. C. (1970) Blood-feeding habits of four species of mosquito found in Hawaii. In : *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 19, n° 2, p. 335–341. DOI: 10.4269/ajtmh.1970.19.335.

The Annenberg Public Policy Center of the University of Pennsylvania (2016a) Just Over Half of U.S. Public Favors Using GM Mosquitoes to Fight Zika | The Annenberg Public Policy Center of the University of Pennsylvania. En ligne : <https://www.annenbergpublicpolicycenter.org/just-over-half-of-u-s-public-favors-using-gm-mosquitoes-to-fight-zika/>, consulté le 6 octobre 2021.

The Annenberg Public Policy Center of the University of Pennsylvania (2016b) Nearly 2/3 of Americans Claim 'Poor' or 'Fair' Understanding of GMOs | The Annenberg Public Policy Center of the University of Pennsylvania. En ligne : <https://www.annenbergpublicpolicycenter.org/nearly-23-of-americans-claim-poor-or-fair-understanding-of-gmos/>, consulté le 6 octobre 2021.

The Project *Wolbachia* – Singapore Consortium; Ching, Ng Lee (2021) *Wolbachia*-mediated sterility suppresses *Aedes aegypti* populations in the urban tropics. In : *medRxiv*. DOI: 10.1101/2021.06.16.21257922.

Tomasello, Danilo; Schlagenhauf, Patricia (2013) Chikungunya and dengue autochthonous cases in Europe, 2007–2012. In : *Travel medicine and infectious disease*, vol. 11, n° 5, p. 274–284. DOI: 10.1016/j.tmaid.2013.07.006.

Tsatsarkin, Konstantin A.; Vanlandingham, Dana L.; McGee, Charles E.; Higgs, Stephen (2007) A single mutation in chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. In : *PLOS Pathogens*, vol. 3, n° 12, e201. DOI: 10.1371/journal.ppat.0030201.

Turner, Joe (2018) Genomics of sex determination in the mosquito *Aedes aegypti*. University of Liverpool, Liverpool, UK. En ligne : <https://core.ac.uk/download/pdf/218076147.pdf>.

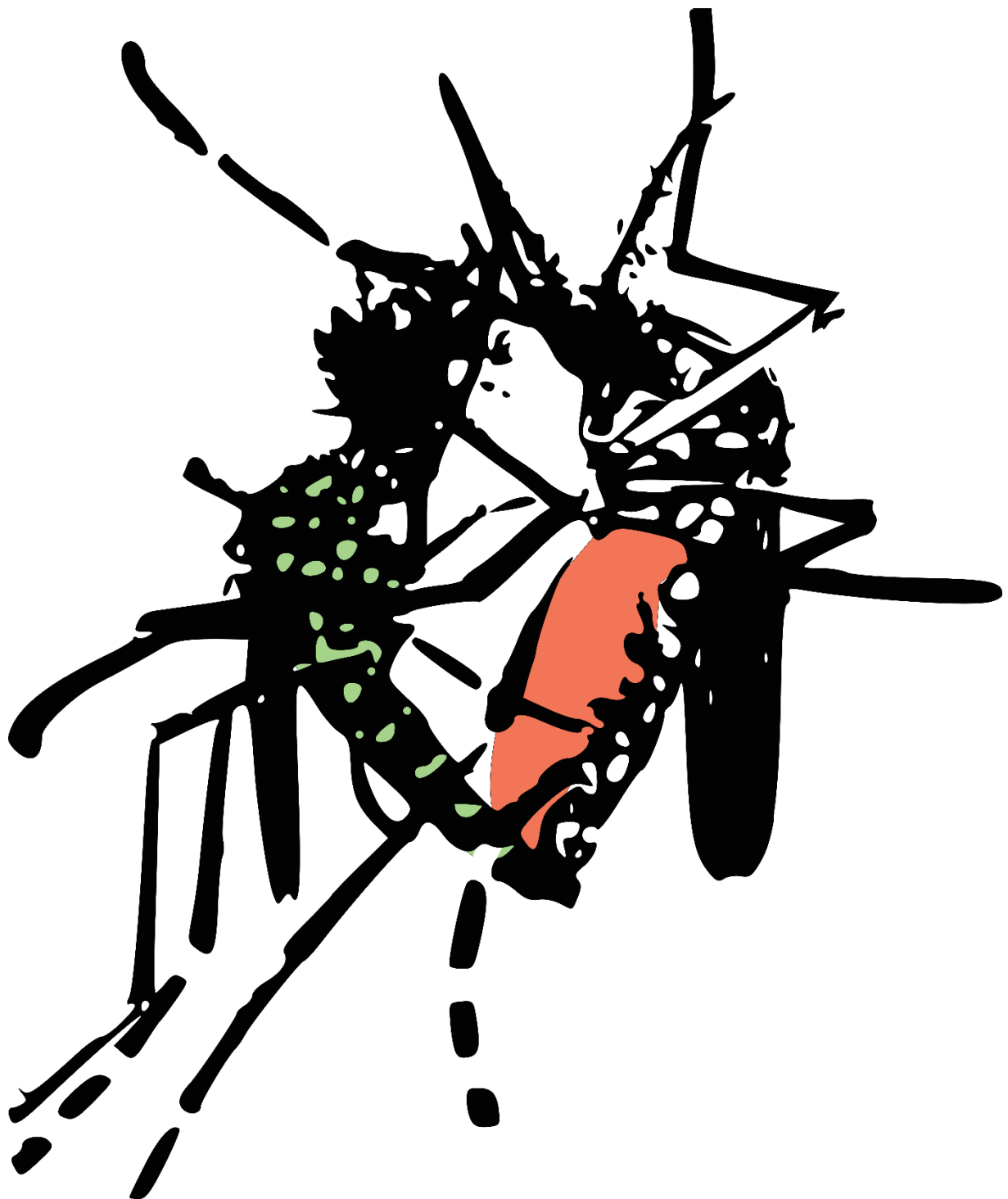
Turner, Joe; Krishna, Ritesh; van't Hof, Arjen E.; Sutton, Elizabeth R.; Matzen, Kelly; Darby, Alistair C. (2018) The sequence of a male-specific genome region containing the sex determination switch in *Aedes aegypti*. In : *Parasites & Vectors*, vol. 11, n° 1, p. 549. DOI: 10.1186/s13071-018-3090-3.

Unckless, Robert L.; Clark, Andrew G.; Messer, Philipp W. (2017) Evolution of Resistance Against CRISPR/Cas9 Gene Drive. In : *Genetics*, vol. 205, n° 2, p. 827–841. DOI: 10.1534/genetics.116.197285.

Unlu, Isik; Rochlin, Ilia; Suman, Devi S.; Wang, Yi; Chandel, Kshitij; Gaugler, Randy (2020) Large-Scale Operational Pyriproxyfen Autodissemination Deployment to Suppress the Immature Asian Tiger Mosquito (Diptera: Culicidae) Populations. In : *Journal of Medical Entomology*. DOI: 10.1093/jme/tjaa011.

- Utarini, Adi; Indriani, Citra; Ahmad, Riris A.; Tantowijoyo, Warsito; Arguni, Eggi; Ansari, M. Ridwan et al. (2021) Efficacy of Wolbachia-Infected Mosquito Deployments for the Control of Dengue. In : *New England Journal of Medicine*, vol. 384, n° 23, p. 2177–2186. DOI: 10.1056/NEJMoa2030243.
- van Bortel, W.; Dorleans, F.; Rosine, J.; Bateau, A.; Rousset, D.; Matheus, S. et al. (2014) Chikungunya outbreak in the Caribbean region, December 2013 to March 2014, and the significance for Europe. In : *Eurosurveillance*, vol. 19, n° 13. DOI: 10.2807/1560-7917.es2014.19.13.20759.
- Vanlandingham, Dana L.; Higgs, Stephen; Huang, Yan-Jang S. (2016) *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) and Mosquito-Borne Viruses in the United States. In : *Journal of Medical Entomology*, vol. 53, n° 5, p. 1024–1028. DOI: 10.1093/jme/tjw025.
- Vazquez-Prokopec, Gonzalo M.; Medina-Barreiro, Anuar; Che-Mendoza, Azael; Dzul-Manzanilla, Felipe; Correa-Morales, Fabian; Guillermo-May, Guillermo et al. (2017) Deltamethrin resistance in *Aedes aegypti* results in treatment failure in Merida, Mexico. In : *PLOS Neglected Tropical Diseases*, vol. 11, n° 6, e0005656. DOI: 10.1371/journal.pntd.0005656.
- vectornet.ecdc.europa.eu (2019) European network for sharing data on the geographic distribution of arthropod vectors transmitting human and animal disease agents (VectorNet). En ligne : <https://www.ecdc.europa.eu/en/about-us/partnerships-and-networks/disease-and-laboratory-networks/vector-net>, consulté le 7 mai 2020.
- Vincent, Muriel; Larrieu, Sophie; Vilain, Pascal; Etienne, Aurélie; Solet, Jean-Louis; François, Claire et al. (2019) From the threat to the large outbreak: dengue on Reunion Island, 2015 to 2018. In : *Eurosurveillance*, vol. 24, n° 47. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2019.24.47.1900346.
- Volohonsky, Gloria; Terenzi, Olivier; Soichot, Julien; Naujoks, Daniel A.; Nolan, Tony; Windbichler, Nikolai et al. (2015) Tools for *Anopheles gambiae* Transgenesis. In : *G3: Genes, Genomes, Genetics*, vol. 5, n° 6, p. 1151–1163. DOI: 10.1534/g3.115.016808.
- Walton, William E. (2007) LARVIVOROUS FISH INCLUDING GAMBUSIA. In : *Journal of the American Mosquito Control Association*, vol. 23, n° sp2, p. 184–220. DOI: 10.2987/8756-971X(2007)23[184:LFIG]2.0.CO;2.
- Waterhouse, Robert M.; Seppey, Mathieu; Simão, Felipe A.; Manni, Mosè; Ioannidis, Panagiotis; Klioutchnikov, Guennadi et al. (2018) BUSCO Applications from Quality Assessments to Gene Prediction and Phylogenomics. In : *Molecular biology and evolution*, vol. 35, n° 3, p. 543–548. DOI: 10.1093/molbev/msx319.
- WHO; IAEA (2020) Guidance framework for testing the sterile insect technique as a vector control tool against aedes-borne diseases. World Health Organization and the International Atomic Energy Agency. Avec la collaboration de IkeOluwapo Ajayi, Romeo Bellini, Pascal Boireau, Steven Bradbury, Salome A. Bukachi, Lee Ching Ng et al. Eva Ciabattini, éd. Geneva. En ligne : <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/331679/9789240002371-eng.pdf>.
- WHO; UNICEF Global vector control response 2017-2030. En ligne : <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/259205/9789241512978-eng.pdf>.
- Whyard, Steve; Erdelyan, Cassidy N. G.; Partridge, Alison L.; Singh, Aditi D.; Beebe, Nigel W.; Capina, Rupert (2015) Silencing the buzz: a new approach to population suppression of mosquitoes by feeding larvae double-stranded RNAs. In : *Parasites & Vectors*, vol. 8, n° 1, p. 96. DOI: 10.1186/s13071-015-0716-6.
- Widenfalk, Anneli; Svensson, Jonas M.; Goedkoop, Willem (2004) Effects of the pesticides captan, deltamethrin, isoprotruron, and pirimicarb on the microbial community of a freshwater sediment. In : *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 23, n° 8, p. 1920–1927. DOI: 10.1897/03-345.
- Wilkerson, Richard C.; Linton, Yvonne-Marie; Fonseca, Dina M.; Schultz, Ted R.; Price, Dana C.; Strickman, Daniel A. (2015) Making Mosquito Taxonomy Useful: A Stable Classification of Tribe Aedini that Balances Utility with Current Knowledge of Evolutionary Relationships. In : *PLOS ONE*, vol. 10, n° 7, e0133602. DOI: 10.1371/journal.pone.0133602.
- Wilson, Raymond; Orsetti, Jamison; Klocko, Andrew D.; Aluvihare, Channa; Peckham, Edward; Atkinson, Peter W. et al. (2003) Post-integration behavior of a Mos1 mariner gene vector in *Aedes aegypti*. In : *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 33, n° 9, p. 853–863. DOI: 10.1016/S0965-1748(03)00044-4.
- Windbichler, Nikolai; Menichelli, Miriam; Papathanos, Philippos Aris; Thyme, Summer B.; Li, Hui; Ulge, Umut Y. et al. (2011) A synthetic homing endonuclease-based gene drive system in the human malaria mosquito. In : *Nature*, vol. 473, n° 7346, p. 212–215. DOI: 10.1038/nature09937.

- Windbichler, Nikolai; Papathanos, Philippos Aris; Crisanti, Andrea (2008) Targeting the X Chromosome during Spermatogenesis Induces Y Chromosome Transmission Ratio Distortion and Early Dominant Embryo Lethality in *Anopheles gambiae*. In : PLOS Genetics, vol. 4, n° 12, e1000291. DOI: 10.1371/journal.pgen.1000291.
- Xi, Zhiyong; Dean, Jeffry L.; Khoo, Cynthia; Dobson, Stephen L. (2005) Generation of a novel Wolbachia infection in *Aedes albopictus* (Asian tiger mosquito) via embryonic microinjection. In : Insect Biochemistry and Molecular Biology, vol. 35, n° 8, p. 903–910. DOI: 10.1016/j.ibmb.2005.03.015.
- Yamada, Hanano; Benedict, Mark Q.; Malcolm, Colin A.; Oliva, Clelia F.; Soliban, Sharon M.; Gilles, Jeremie R. L. (2012) Genetic sex separation of the malaria vector, *Anopheles arabiensis*, by exposing eggs to dieldrin. In : Malaria Journal, vol. 11, n° 1, p. 208. DOI: 10.1186/1475-2875-11-208.
- Yamada, Hanano; Jandric, Zora; Chhem-Kieth, Sorivan; Vreysen, Marc J. B.; Rathor, Mohammad N.; Gilles, Jeremie R. L.; Cannavan, Andrew (2013) *Anopheles arabiensis* egg treatment with dieldrin for sex separation leaves residues in male adult mosquitoes that can bioaccumulate in goldfish (*Carassius auratus auratus*). In : Environmental Toxicology and Chemistry, vol. 32, n° 12, p. 2786–2791. DOI: 10.1002/etc.2371.
- Yan, Ying; Linger, Rebecca J.; Scott, Maxwell J. (2017) Building early-larval sexing systems for genetic control of the Australian sheep blow fly *Lucilia cuprina* using two constitutive promoters. In : Scientific Reports, vol. 7, n° 1, p. 2538. DOI: 10.1038/s41598-017-02763-4.
- Zacarés, Mario; Salvador-Herranz, Gustavo; Almenar, David; Tur, Carles; Argiles-Herrero, Rafael; Bourtzis, Kostas et al. (2018) Exploring the potential of computer vision analysis of pupae size dimorphism for adaptive sex sorting systems of various vector mosquito species. In : Parasites & Vectors, vol. 11, n° 2, p. 656. DOI: 10.1186/s13071-018-3221-x.
- Zhang, Dongjing; Zhang, Meichun; Wu, Yu; Gilles, Jeremie R. L.; Yamada, Hanano; Wu, Zhongdao et al. (2017) Establishment of a medium-scale mosquito facility: optimization of the larval mass-rearing unit for *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). In : Parasites & Vectors, vol. 10, n° 1, p. 569. DOI: 10.1186/s13071-017-2511-z.
- Zheng, Min-Lin; Zhang, Dong-Jing; Damians, David D.; Lees, Rosemary Susan; Gilles, Jeremie R. L. (2015) Standard operating procedures for standardized mass rearing of the dengue and chikungunya vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) - II - Egg storage and hatching. In : Parasites & Vectors, vol. 8, n° 1, p. 348. DOI: 10.1186/s13071-015-0951-x.
- Zheng, Xiaoying; Zhang, Dongjing; Li, Yongjun; Yang, Cui; Wu, Yu; Liang, Xiao et al. (2019) Incompatible and sterile insect techniques combined eliminate mosquitoes. In : Nature, vol. 572, n° 7767, p. 56–61. DOI: 10.1038/s41586-019-1407-9.



Remerciements

Je voudrais commencer par remercier les **membres de mon jury de thèse** d'avoir accepté d'évaluer mon travail et de s'être rendus disponibles malgré la période agitée que nous vivons. Merci d'être arrivés jusqu'ici dans votre lecture, j'espère que ce ne fut pas trop pénible.

Je poursuivrais par l'équipe encadrante de ma thèse sans laquelle ce pavé n'aurait pas vu le jour. **Jérémy**, je te remercie pour la confiance que tu m'as accordée au cours de ces trois années et pour la liberté d'entreprendre -parfois pour réussir, souvent pour me planter-, que tu m'as laissée. Si c'est en se plantant que l'on pousse, j'ai sacrément poussé en trois ans. **Thierry**, je te remercie pour ton soutien, ton humanité et ton aide dans la gestion de tous les aspects administratifs et organisationnels reliés au projet. Ma navigation dans la thèse s'en est trouvée infiniment plus simple et plus sereine. **Éric**, merci d'avoir été présent même à distance, ainsi que d'avoir accepté d'intégrer l'équipe encadrante de ma thèse et que je te rejoigne à Strasbourg. Ton entrée dans ma thèse a été un nouveau départ. Merci de m'avoir éclairée de tes expertises variées ; j'ai énormément appris à tes côtés. Merci de ton soutien, y compris technique, et surtout merci de m'avoir suivie dans mes idées les plus farfelues, et de les avoir enrichies d'idées encore plus farfelues. Je crois qu'on aurait pu ne jamais arrêter.

I would also like to thank **Steve Whyard** who have welcome me in Winnipeg and taught me a lot. Canada in November was super cold, but your welcome was the warmest.

Je dirigerais ensuite tous mes remerciements vers les membres de mon comité de thèse qui m'ont suivie dans cette aventure mouvementée : **Mylène, Christophe, Albin et Etienne**. Merci pour vos conseils, votre écoute et votre soutien, pendant et en dehors des réunions annuelles. Cette thèse partait de très loin ; je ne sais pas où elle est arrivée, mais elle est arrivée grâce à vous. **Mylène**, merci de m'avoir ramassée à la petite cuillère quelques fois, de m'avoir aiguillée souvent, et d'avoir fait preuve d'une patience infinie pour me faire entendre ce que je ne voulais pas toujours entendre. Je suis sortie plus légère de chacune de nos discussions. **Albin**, merci pour tes excellents conseils et ta disponibilité. Le monde des moustiques est petit, il était très chouette de te retrouver sur ce projet.

Je voudrais ensuite remercier **Cécilia**, qui m'a nourrie de ses conseils et de son expérience pendant toute ma dernière année de thèse. Merci d'avoir accepté de me mentorer dans le cadre du programme Femmes et Sciences et d'avoir répondu à mes interrogations et mes doutes quant au pendant et à l'après thèse. Discuter avec toi était infiniment enrichissant.

A l'IBMC, j'aimerais également remercier **Jean-Luc Imler, Stéphanie Blandin et Bénédicte Stévenin** d'avoir permis mon séjour parmi vous, et de m'avoir si bien accueillie. **Steph**, merci pour tes conseils, toujours pointus, au labo, en réunion d'équipe et en salle café. I would also like to thank the lab's awesome postdocs, namely **Roenick, Fabien** (well, ex-postdoc), **Dennis** and **Diwas**. Your advice was always much needed and much appreciated ("advice" can also be replaced by "wine" here). J'adresserais des remerciements tout particuliers à **Myriam** et à **Nathalie** pour leur aide et leur amitié. Le déracinement et le manque de vitamine D ont été un petit peu moins durs grâce à vous.

Côté CIRAD, je souhaite remercier **Maxime** et **Ignace** pour leur aide et leurs précieux conseils à l'insectarium. Merci également à **Claire**, qui s'est montrée disponible et attentive, notamment lorsque le confinement nous est tombé dessus. Merci aux **assistantes ASTRE**, à qui j'en aurai fait voir de toutes les couleurs avec pléthores de dossiers, d'ordres de missions, et autres commandes, mais qui ont toujours trouvé un moment pour m'aider. Mille mercis aux copains thésards avec lesquels j'ai partagé un bureau, un canapé et des pauses au son des cigales, **Antoine, Yannis, Cécile, Roger, Rémi et Célia**. Merci pour vos rires, votre soutien et pour tous les moments partagés ensemble. A vos côtés, j'ai développé mes aptitudes en course de chaise roulante, Photoshop, et ascenseurs émotionnels. Le *Wall of Shame* témoignera en revanche d'une certaine constance dans la qualité de mes PCR (et des vôtres). **Yannis et Antoine**, vous remarquerez que je vous remercie pour les moments partagés, pas les chocolats. Bref, le chemin a été long et sinueux mais, fort heureusement, l'accompagnement était sympathique. Merci de m'avoir empêchée de tout cramer un milliard de fois, vous avez été les meilleurs pompiers.

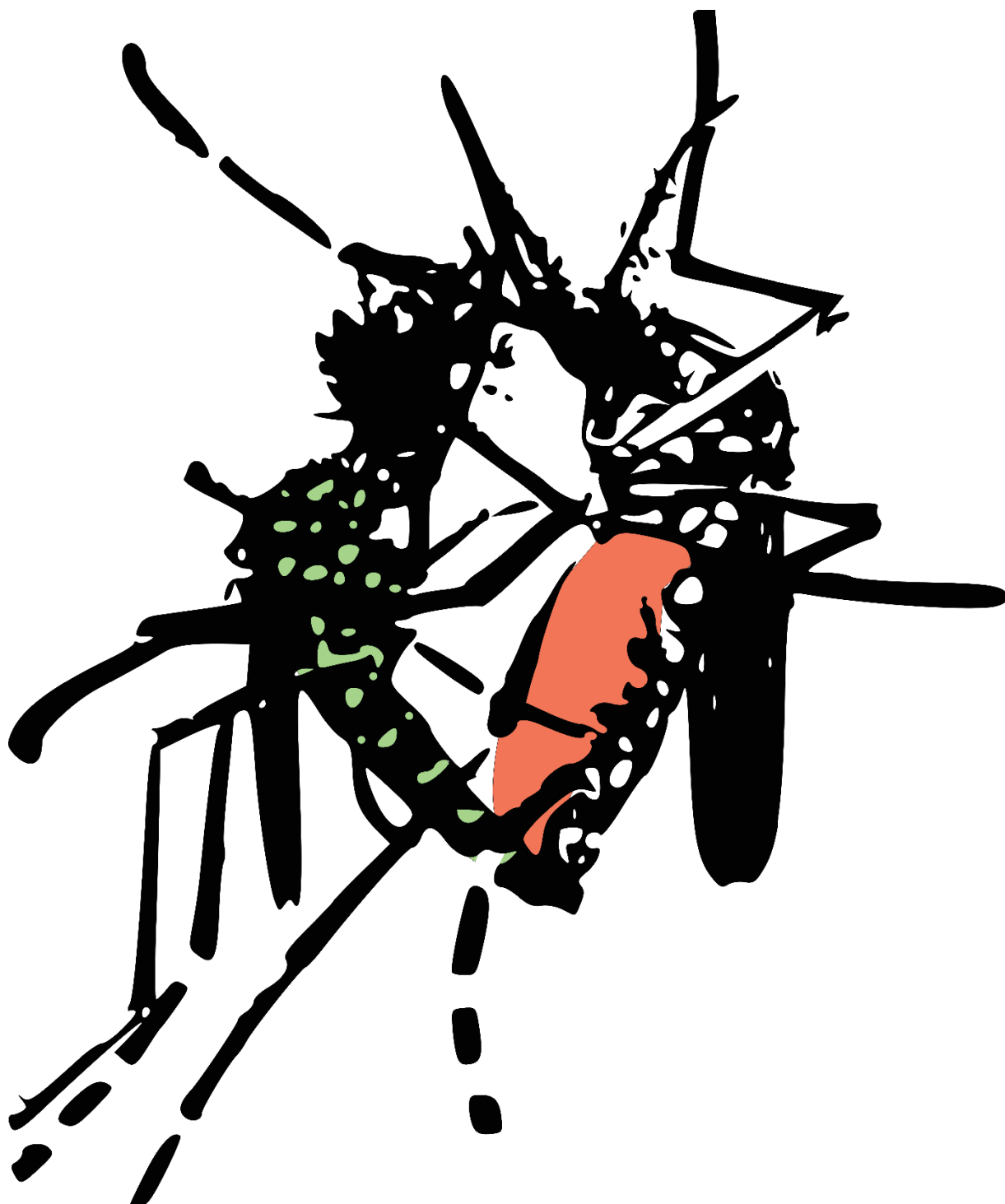
Je poursuivrai ces remerciements par mes amis d'école. Je remercie les XZB pour les soirées, les weekends, les vacances et les commentaires télé qualitatifs partagés ensemble : **Agathe, Camille, Chloé, Gaëlle, Léa, Manon, Marion, Adam, André, Denis, Guillaume, Léonard, Nils et Robin**. Je remercie également les autres copains·ines de SupAgro : **Agnès, Carla, Charlotte, Gabriel, Lucie, Pierre, et Thibault**. Vous n'étiez pas dans la bonne famille, mais je vous aime quand même. De prépa, je remercie les ami·e·s que j'ai eu l'occasion de voir le plus, **Ada, Alice, Antoine et Elsa**, ainsi que celles et ceux que j'ai moins vu·e·s mais que je savais là. Après toutes les tempêtes, je suis ravie de vous compter encore à mes côtés, et vous attends de pied ferme Place des Grands Hommes en 2023. Enfin, je remercie mes ami·e·s de plus longue date encore pour leur fidélité et leur soutien. Je ne sais pas comment vous me supportez depuis tant d'années (ni comment vous n'avez pas encore ruiné le peu de crédibilité

qu'il me restait en faisant fuiter les images de mes heures stylistiques et capillaires les plus sombres), vous êtes merveilleux·ses. Merci à **Marianne, Godefroy, Alicia et Jérémy**.

Puisqu'on est sur une thématique coiffures douteuses, j'adresserais ensuite une mention toute particulière à des personnes qui m'ont permis, à leur manière, d'être ici aujourd'hui malgré des couettes, soyons honnêtes, ridicules. **Anne-Marie et Jean-Claude**, je ne vous remercierais jamais assez pour les merveilleuses soirées passées chez vous après l'école. Votre rigueur pour me faire faire mes devoirs m'a indubitablement permise d'être ici aujourd'hui, même si à l'époque, ça ne me ravissait pas. Les crêpes, gâteaux et chocolats m'ont permis d'y arriver peut-être un peu trop gâtée... J'aurais également une pensée particulière pour **Ludovic Poullaouec**, mon instituteur de CE2, qui m'a transmis son goût pour les sciences, la nature et les petites bêtes. Merci de nous avoir partagé ta passion, je garde d'excellents souvenirs de nos escapades en forêt avec Tifenn, Julien et Léo.

Passons désormais aux personnes qui sont à l'origine de mes couettes, mes parents. **Papa, Maman**, il n'y a pas de mot assez fort pour décrire la reconnaissance que j'ai envers vous. Vous m'avez toujours soutenue, toujours poussée, et m'avez permis d'essayer, me tromper, et recommencer autant de fois que nécessaire. J'ai une chance incroyable d'avoir des parents comme vous. Là où, en revanche, j'ai été moins chanceuse, c'est côté fratrie... Deux frères ! Heureusement que Loumia est là pour rattraper le coup ! A mes petits frères -il me semble nécessaire de rappeler que ces deux individus d'1m90 sont mes petits frères-, **Carl et Clarence**, merci. Merci d'être là, merci d'être vous. Je remercie également mes **oncles et tantes** –ceux qui sont là et celui qui ne l'est plus- pour leur soutien sans faille : nous formons une petite famille mais une famille unie.

Pour terminer je remercierais celle et celui qui m'ont supportée et soutenue au quotidien, en plus d'être objectivement les plus beaux chats du monde : **Ortie et Ricin**. Miaou, miaou, miaou. Bien entendu, je ne terminerai pas ces remerciements sans adresser quelques mots à **Rémy**, qui m'a réellement supportée et soutenue tous les jours (et même pas en l'échange de croquettes, lui). Ton soutien a été sans faille, et ta présence un véritable pilier pendant ces trois années. Je ne serais pas arrivée jusqu'ici sans toi. Je répèterais donc *ad lib.* : merci, merci, merci. J'ai hâte de découvrir ce que le futur nous réserve.



Annexes

Liste des documents annexes :

Annexe 1 : Informations supplémentaires au contexte de la thèse

- **Données A1-1** : Analyses du RNAseq effectué dans le cadre de la recherche d'un promoteur inductible par une molécule d'intérêt chez *Ae. albopictus*
- **Tableau A1-1** : Nom et séquence des couples d'amorces associés aux gènes d'intérêt pour la recherche d'un promoteur inductible par une molécule d'intérêt chez *Ae. albopictus*
- **Tableau A1-2** : Séquences cibles des ARN double-brin utilisés pour la méthode ARNi chez *Ae. aegypti* et *Ae. albopictus*

Annexe 2 : Informations supplémentaires au Chapitre 1

- **Supplementary Information**

Annexe 3 : Informations supplémentaires au Chapitre 2

- **Supplementary Information**

Annexe 4 : Informations supplémentaires au Chapitre 3

- **Supplementary Information**

Annexe 5 : Informations supplémentaires à la discussion générale

- **Figure A5-1** : Carte du plasmide ayant servi à la construction des lignées transgéniques de conditionnement de l'expression d'un gène de fluorescence par l'intron du gène *doublesex* chez *Aedes albopictus*
- **Données A5-1** : Séquence de l'intron raccourci de *doublesex* ayant servi à la construction des lignées transgéniques
- **Données A5-2** : Paramètres implémentés et calculés pour la comparaison des coûts relatifs à l'élevage de masse des *Aedes* selon le mode de sexage choisi

Annexe 1 : Informations supplémentaires au contexte de la thèse

Données A1-1 : Analyses du RNAseq effectué dans le cadre de la recherche d'un promoteur inductible par une molécule d'intérêt chez *Ae. albopictus*. 18 pages

Differential expression analysis of S17134 project

Damien Plassard

October 4, 2017

Contents

1	Details about the samples	1
2	Mapping	1
3	Quantification	1
4	Normalization of the data	2
5	Clustering analysis	3
5.1	Variance stabilization	3
5.2	Principal Component Analysis and Heatmap	3
6	Statistical analysis	6
7	Delivery files	16
8	Version of used packages	16

1 Details about the samples

All samples were sequenced on the flow cell HS390 in 50-length Single-Read. A summary of the main characteristics of the input data analyzed in this document is available in Table 1.

Input data used in this document correspond to the fastq files where rRNA reads were removed.

2 Mapping

Reads were mapped onto the AaloF1 Foshan strain assembly of the *Aedes albopictus* genome using Tophat 2.0.14 [1, 2] and bowtie version 2-2.1.0 [3]. A summary of the mapping results is available in Table 2.

Uniquely mapped reads and multi-mapped reads have been used for further analyses.

3 Quantification

Quantification of gene expression has been performed using Rsubread-1.20.6 [4] with annotations coming from VectorBase (AaloF1.2) where Cufflinks has been used in order to find novel annotations. Table 3 shows summary about the assignment of the gene name to each read.

Table 1: **Main characteristics of the analyzed input data.** The field “Nb total reads” indicates the total number of reads in the input fastq files; the field “Nb unique reads” indicates the number of unique reads (without duplicates); and the field “%” corresponds to the percentage of the ratio “Nb unique reads”/“Nb total reads”.

Sample ID	Sample name	Nb total reads	Nb unique reads	%
RCMS1	1	19,432,148	9,098,429	46.82
RCMS2	2	22,223,035	9,736,504	43.81
RCMS3	3	21,722,727	9,562,319	44.02
RCMS4	4	24,854,212	10,683,159	42.98
RCMS5	5	19,673,442	9,181,900	46.67
RCMS10	10	22,359,208	9,720,204	43.47
RCMS11	11	27,784,886	11,761,092	42.33
RCMS12	12	23,273,329	10,486,204	45.06
RCMS13	13	22,236,116	10,066,959	45.27
RCMS14	14	27,071,403	11,534,264	42.61
RCMS15	15	26,725,512	11,669,326	43.66
RCMS16	16	31,871,391	13,504,848	42.37
RCMS17	17	14,349,632	7,176,157	50.01
RCMS18	18	26,272,182	11,260,516	42.86
RCMS19	19	22,661,404	9,462,836	41.76

Table 2: **Summary of mapping results.** The field “Nb total reads” indicates the total number of reads in the input fastq files; the field “Nb aligned reads” indicates the number of mapped reads; the field “Nb uniquely mapped” indicates the number of reads uniquely mapped; and the fields “%₁” and “%₂” are the percentage of the ratios “Nb aligned reads” and “Nb uniquely mapped” divided by “Nb aligned reads” respectively.

Sample ID	Sample name	Nb total reads	Nb aligned reads	% ₁	Nb uniquely mapped	% ₂
RCMS1	1	19,432,148	16,053,851	82.61	11,729,825	73.07
RCMS2	2	22,223,035	18,637,777	83.87	14,491,099	77.75
RCMS3	3	21,722,727	18,202,889	83.80	14,143,547	77.70
RCMS4	4	24,854,212	20,776,531	83.59	15,887,819	76.47
RCMS5	5	19,673,442	16,426,404	83.50	12,780,676	77.81
RCMS10	10	22,359,208	18,885,127	84.46	14,773,569	78.23
RCMS11	11	27,784,886	23,445,952	84.38	18,511,545	78.95
RCMS12	12	23,273,329	19,411,703	83.41	14,948,850	77.01
RCMS13	13	22,236,116	18,584,539	83.58	14,139,435	76.08
RCMS14	14	27,071,403	22,917,090	84.65	17,975,500	78.44
RCMS15	15	26,725,512	22,422,704	83.90	17,523,010	78.15
RCMS16	16	31,871,391	26,705,751	83.79	20,910,850	78.30
RCMS17	17	14,349,632	11,946,336	83.25	9,320,680	78.02
RCMS18	18	26,272,182	22,036,228	83.88	17,385,924	78.90
RCMS19	19	22,661,404	19,198,417	84.72	15,040,117	78.34

4 Normalization of the data

Read counts have then been normalized across libraries with the median-of-ratios method proposed by Anders and Huber [5].

To check if the normalization was correctly performed, Relative Log Expression (RLE) plots were drawn (Figure 1). This kind of plot is a useful diagnostic plot to visualize the differences between the distributions of read counts across samples. It shows the boxplots of the log-ratios

Table 3: **Summary of quantification results.** The field “Nb of alignments” indicates the number of alignment. It corresponds to the number of uniquely mapped read plus the number of alignment for reads multi-mapped; the field “Nb assigned” indicates the number of alignments that could have been assigned to a gene; the field “Nb no-assigned” indicates the number of alignments that could not be assigned to a gene; the field “Nb ambiguous assigned” indicates the number of alignments that can be assigned to more than one gene; and the fields “%₁”, “%₂”, and “%₃” are the percentage of the ratios “Nb assigned”, “Nb no-assigned”, and “Nb ambiguous assigned” divided by “Nb of alignments” respectively.

Sample ID	Sample name	Nb of alignments	Nb assigned	% ₁	Nb no-assigned	% ₂	Nb ambiguous assigned	% ₃
RCMS1	1	23,810,725	13,206,404	55.46	10,555,310	44.33	49,011	0.21
RCMS2	2	25,038,842	16,759,444	66.93	8,213,836	32.80	65,562	0.26
RCMS3	3	24,501,079	16,355,037	66.75	8,082,058	32.99	63,984	0.26
RCMS4	4	28,752,486	18,952,183	65.91	9,729,108	33.84	71,195	0.25
RCMS5	5	22,159,551	14,997,790	67.68	7,099,077	32.04	62,684	0.28
RCMS10	10	25,276,971	17,039,597	67.41	8,179,336	32.36	58,038	0.23
RCMS11	11	31,008,329	21,281,807	68.63	9,652,606	31.13	73,916	0.24
RCMS12	12	26,716,347	17,141,273	64.16	9,515,598	35.62	59,476	0.22
RCMS13	13	25,967,520	16,294,818	62.75	9,614,376	37.02	58,326	0.22
RCMS14	14	30,624,190	20,594,061	67.25	9,957,492	32.52	72,637	0.24
RCMS15	15	30,269,441	20,384,271	67.34	9,808,359	32.40	76,811	0.25
RCMS16	16	35,942,384	24,615,819	68.49	11,226,477	31.23	100,088	0.28
RCMS17	17	16,204,586	10,836,610	66.87	5,327,956	32.88	40,020	0.25
RCMS18	18	29,367,708	20,341,279	69.26	8,943,497	30.45	82,932	0.28
RCMS19	19	25,567,523	17,358,702	67.89	8,150,790	31.88	58,031	0.23

of the gene-level read counts of each sample to those of a reference sample (defined as the median across the samples). Ideally, the distributions should be centered around the zero line and as tight as possible. Clear deviations indicate the need for normalization and/or the presence of outlying samples.

5 Clustering analysis

5.1 Variance stabilization

In RNA-Seq data, genes with larger average expression have on average larger observed variances across samples, that is, they vary in expression from sample to sample more than other genes with lower average expression.

The Principal Component Analysis (PCA) method uses the variance to explain the data and may be overly influenced by these genes. To avoid that, variance should be stabilized. Figure 2A shows your data without stabilized variance and Figure 2B shows your data stabilized using the regularized log transformation (rlog) method [6].

5.2 Principal Component Analysis and Heatmap

Figure 3 provides a Principal Component Analysis (PCA) based on their normalized and stabilized gene expression level.

Figure 5 represents another samples clustering visualization. Figure 6, figure 7, figure 8 and figure 9 represents a sample-to-sample clustering for H2O-DMSO, H2O-MeBlue, H2O-alcOH and H2O-CuSO4 samples.

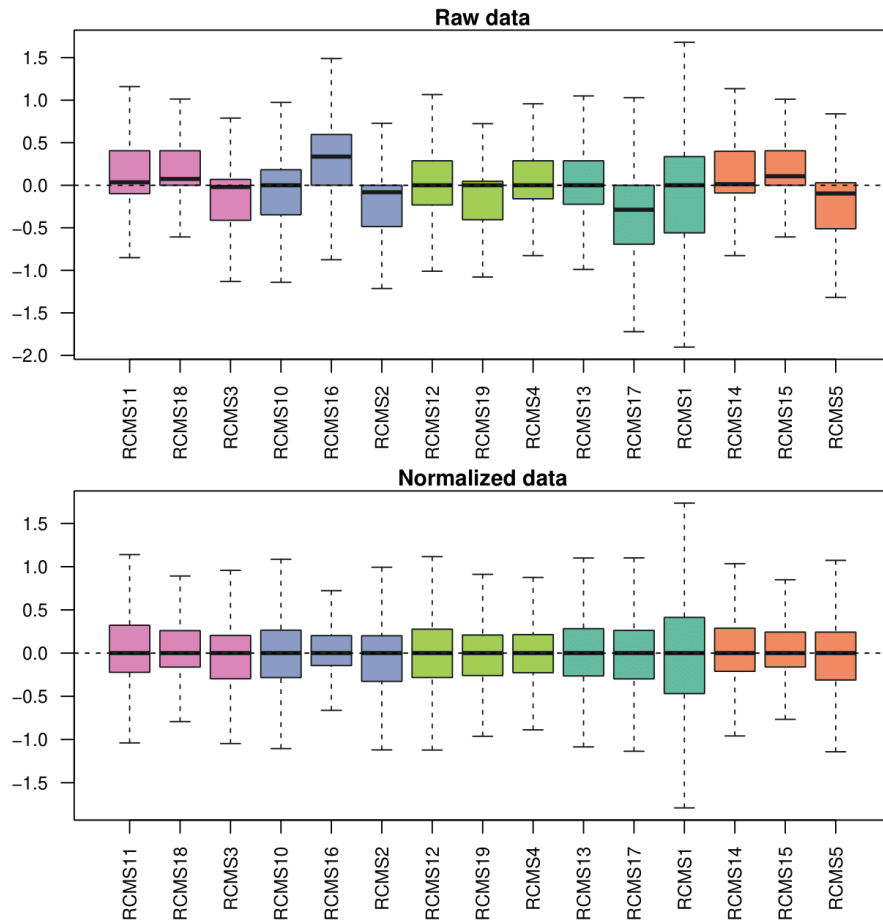


Figure 1: **Relative Log Expression of raw and normalized data.** The x-axis represents the samples that will be analyzed and the y-axis the relative log expression (RLE) values. Each experimental condition is represented by a different color.

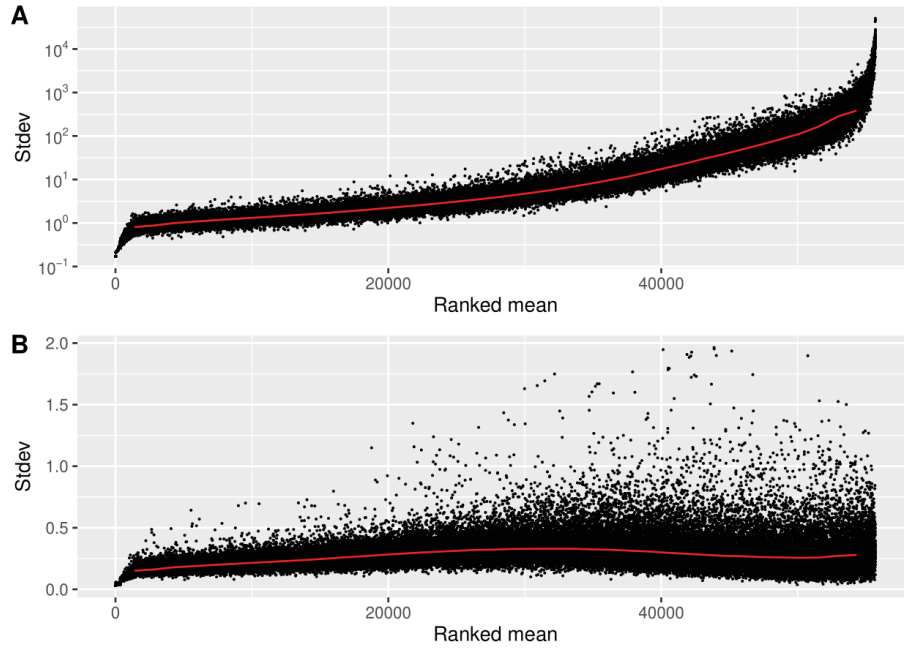


Figure 2: **Standard-deviation in function of the ranked mean.** The x-axis represents the rank of the mean and the y-axis the standard-deviation of the normalized read counts. Each black dot represents a gene. The red line represents the median. If there is no variance-mean dependence, then the line should be approximately horizontal. **(A)** Data without any stabilization; **(B)** data stabilized with the regularized log transformation (rlog) method.

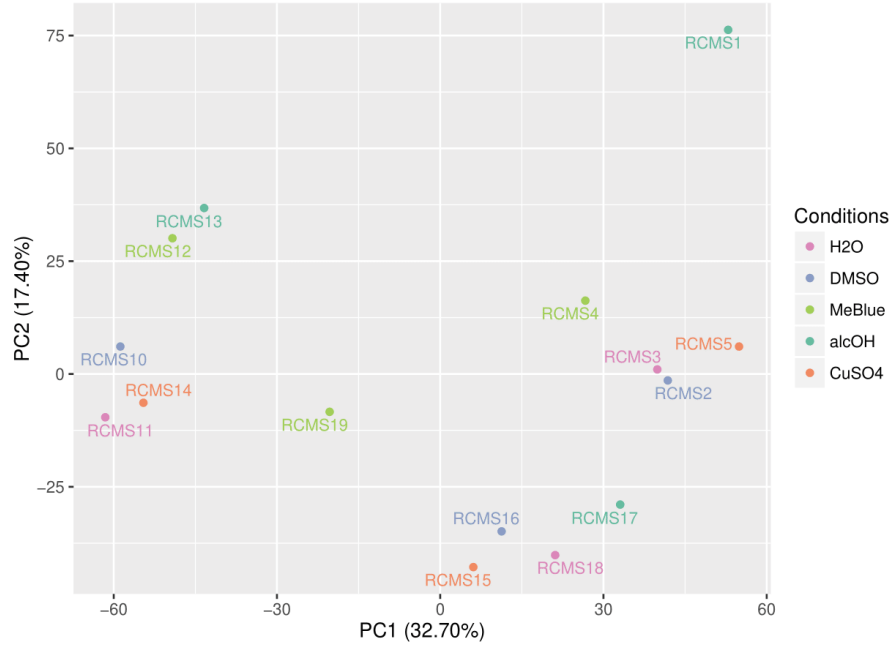


Figure 3: **General principal component analysis.** This PCA contains all of the samples.

6 Statistical analysis

Comparisons of interest have been performed using the statistical method proposed by Anders and Huber [6]. The Wald test was used to estimate the p-values and they were adjusted for multiple testing with the Benjamini and Hochberg method [7].

A summary of the differentially expressed genes, for each comparison, is available in Table 4.

Table 4: **Summary of the comparison results.** The results corresponds to genes with a p-value adjusted for multiple testing < 0.05 .

Comparison	Number of over-expressed genes	Number of under-expressed genes	Total
DMSO vs H2O	23	22	45
MeBlue vs H2O	51	158	209
alcOH vs H2O	52	663	715
CuSO4 vs H2O	31	13	44

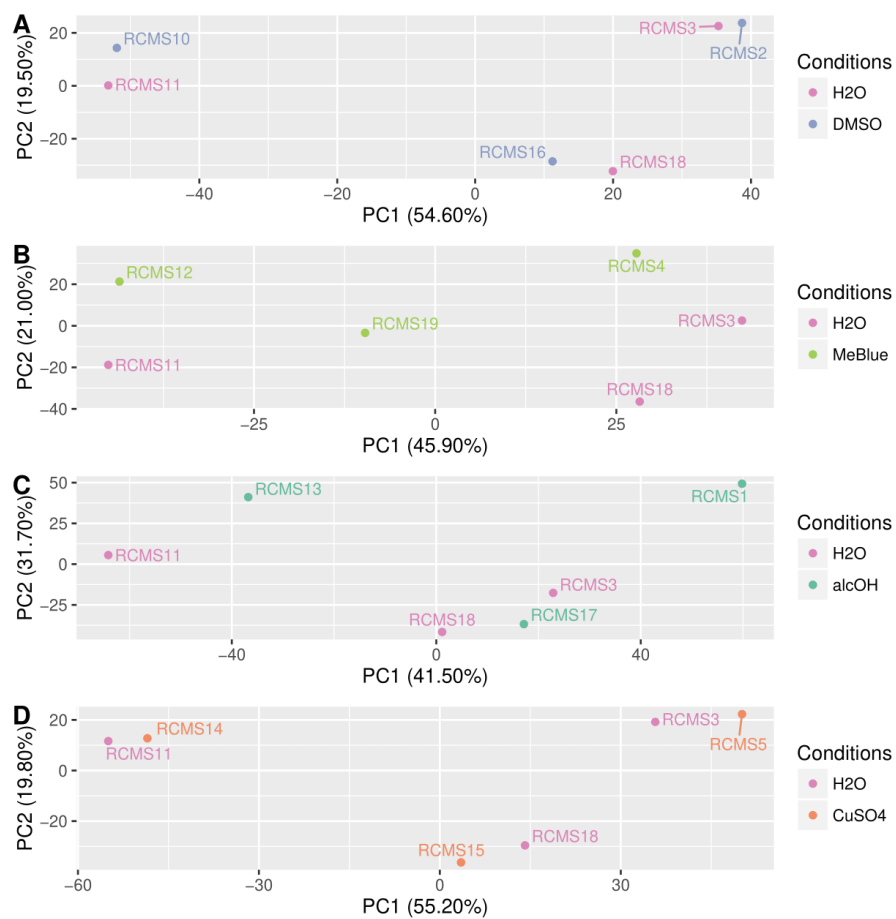


Figure 4: Principal component analysis for each group.

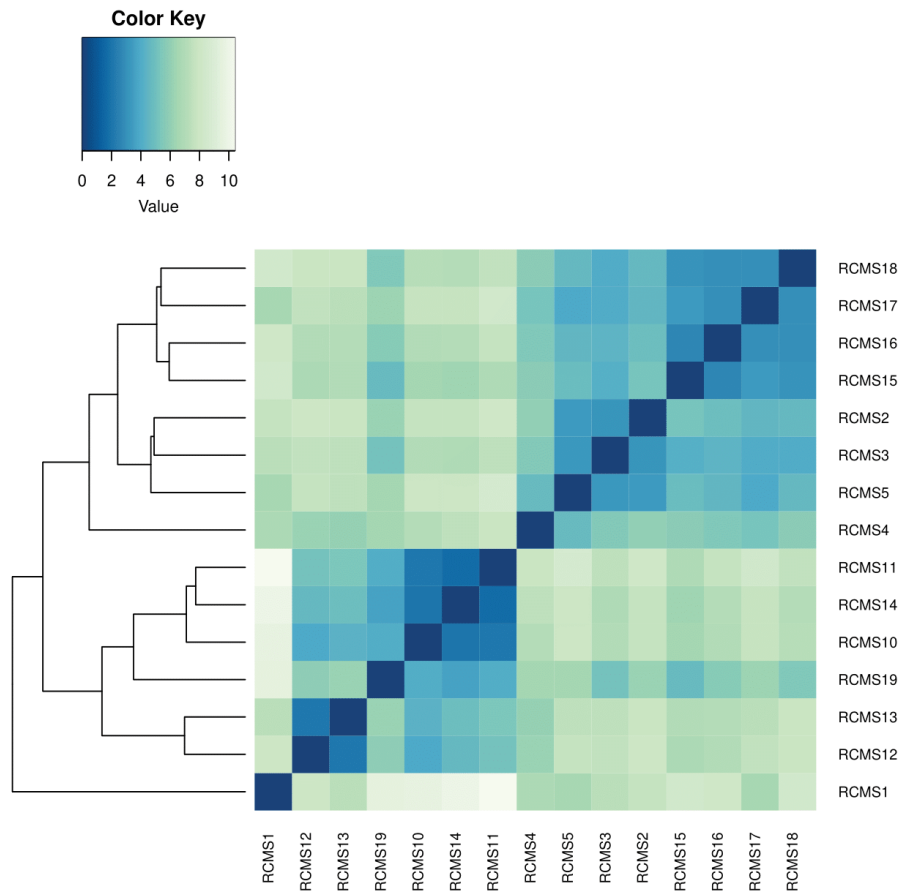


Figure 5: **Sample-to-sample distances.** Hierarchical clustering was calculated using the UPGMA algorithm (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) with the SERE coefficient.

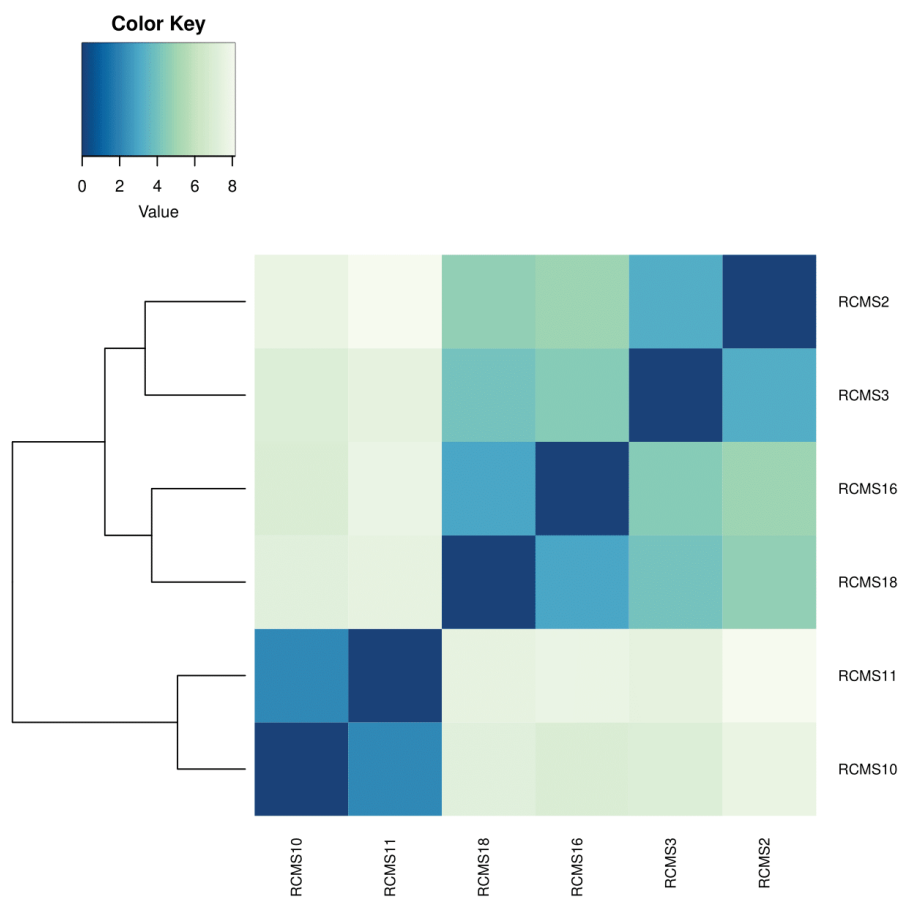


Figure 6: Sample-to-sample distances for the H₂O and DMSO samples.

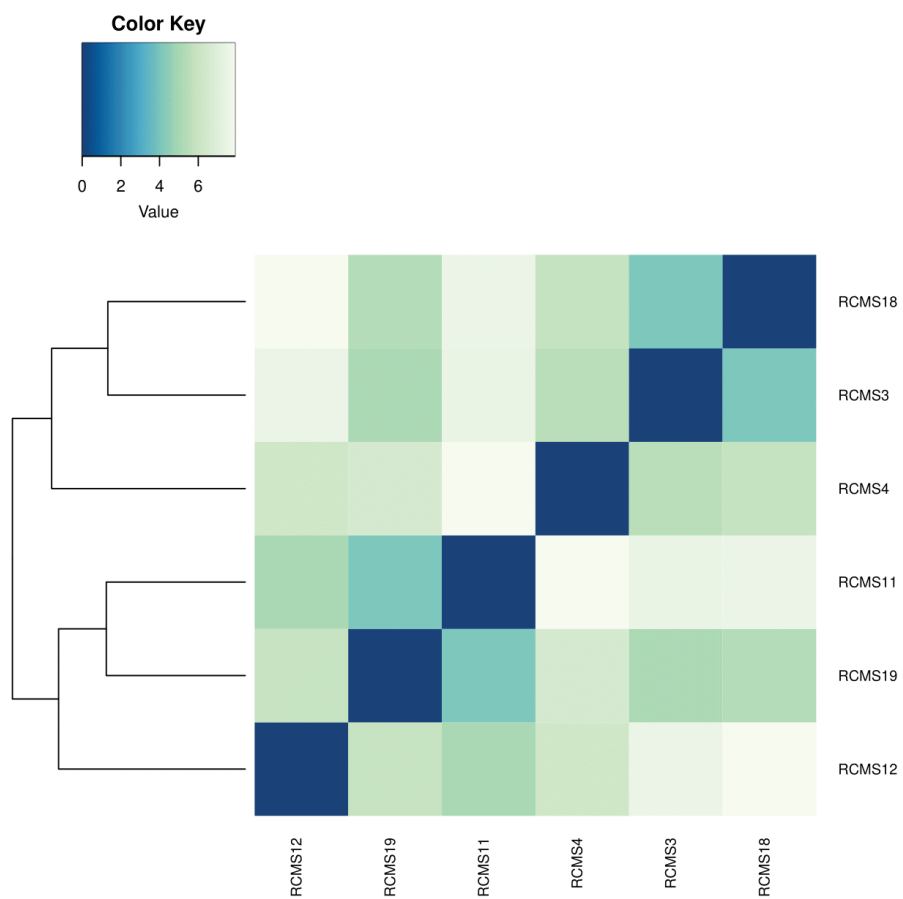


Figure 7: Sample-to-sample distances for the H₂O and MeBlue samples.

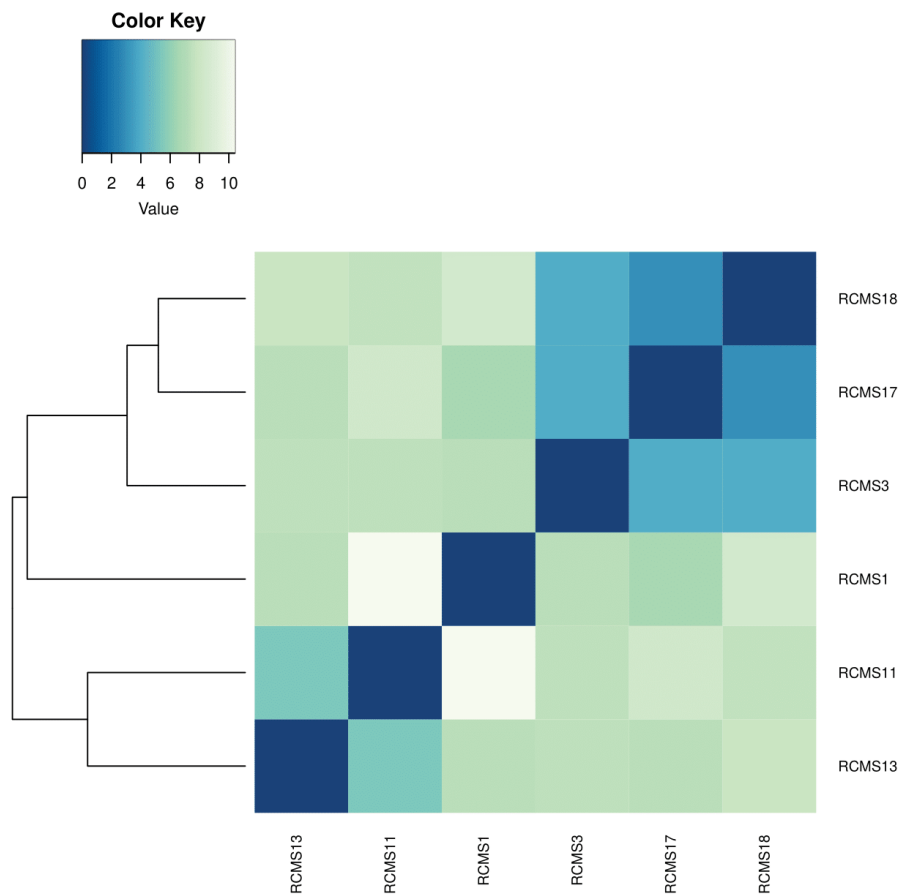


Figure 8: **Sample-to-sample distances for the H₂O and alcOH samples.**

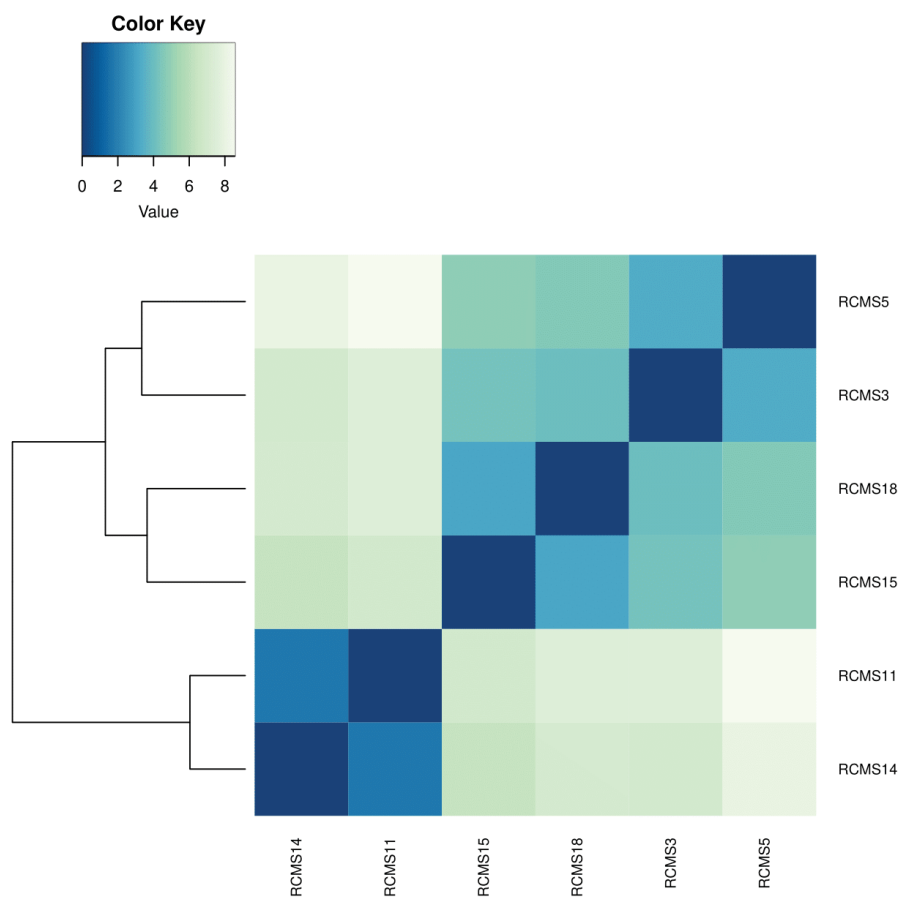


Figure 9: Sample-to-sample distances for the H₂O and CuSO₄ samples.

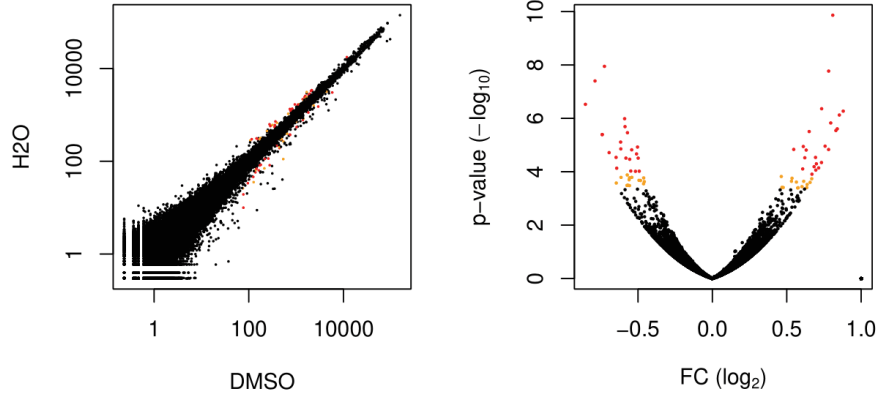


Figure 10: **DMSO vs H2O : Statistical results.** The graph on the left represents a scatterplot of the normalized gene expression. For a given gene, its value is obtained by mean on all samples belonging to the same condition. The graph on the right represents a volcano plot. The x-axis represents the log₂ Fold Change values and the y-axis the p-values (in $-\log_{10}$). Red points show values with an adjusted p-value < 0.05 and orange points show values with an adjusted p-value < 0.1.

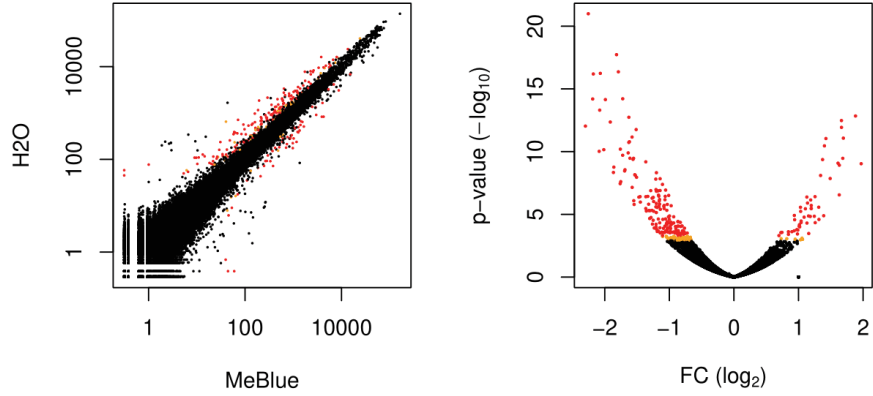
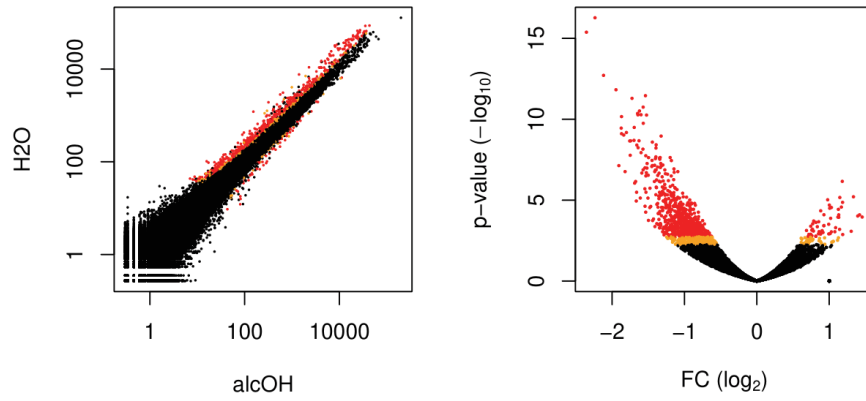
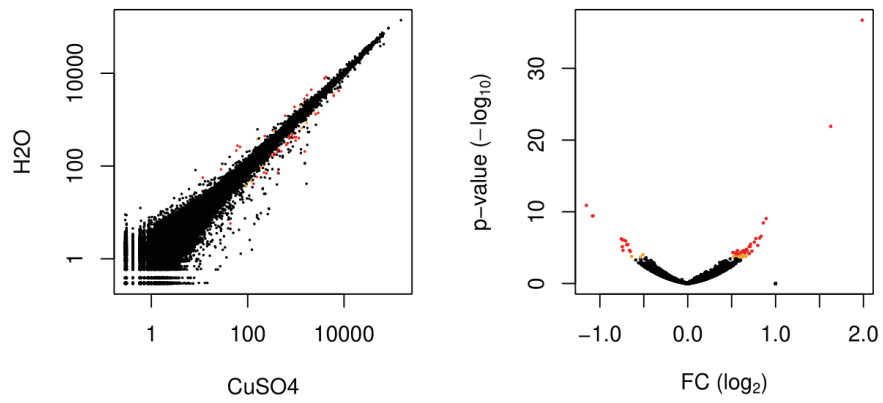


Figure 11: **MeBlue vs H2O : Statistical results.**

Figure 12: **alcOH vs H2O** : Statistical results.Figure 13: **CuSO4 vs H2O** : Statistical results.

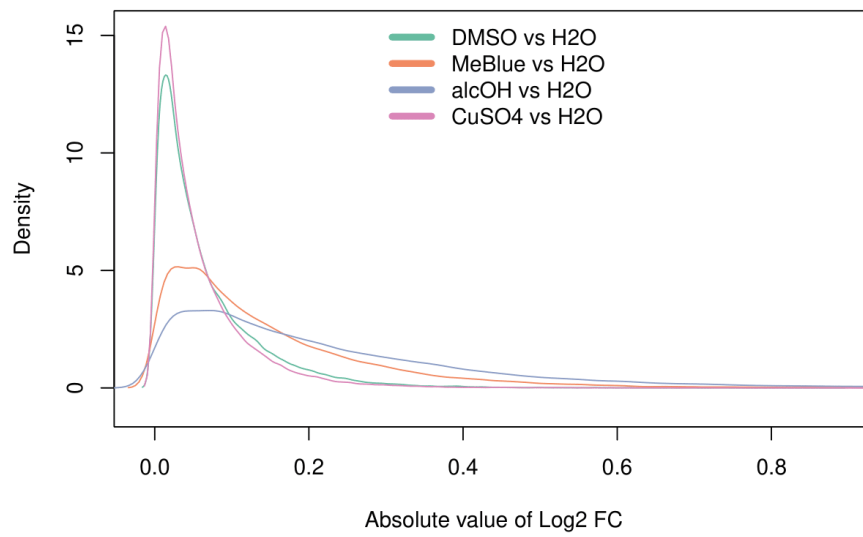


Figure 14: **Estimation of the log₂FC threshold.** The x-axis represents the absolute value of log₂ Fold Change and the y-axis their probability density function estimated by the kernel density estimation (KDE) method.

7 Delivery files

Alignment files

An alignment file, in bam format, is available for each sample, with its index file (bai format). These files can be viewed in any genome browser, like IGV¹ (Integrative Genomics Viewer).

Excel file

An excel file provides raw read counts and normalized read counts for each gene together with the p-value and log2 fold-change for the requested comparisons. Genes with a null raw read count for each sample were removed. Below is a description of each column:

Gene id The ID of the gene.

Raw read counts The quantity of reads that have been mapped to the gene.

Normalized The normalized read counts. You can use these values to compare expression between samples.

Normalized and divided by gene length in kb The normalized read counts that have been divided by the gene length. The gene length has been estimated as the median of all transcripts. You can use these counts to compare expression between genes of a sample.

log2 The estimation of the fold change value (in $\log_2$) indicating how much the differential expression of a gene is important between two conditions. The higher the absolute value is, the more differential the expression level is.

P-value The p-value associated to the fold change. Typically, a value lower than 0.05 is considered as statistically significant. In some cases, we can use a threshold of 0.1.

Adjusted p-value The corrected p-value associated to the fold change when the multiple testing has been taken into account. This value is never lower than the p-value. Typically, a value lower than 0.05 is considered as statistically significant. In some cases, we can use a threshold of 0.1.

8 Version of used packages

```
## R version 3.2.5 (2016-04-14)
## Platform: x86_64-pc-linux-gnu (64-bit)
## Running under: Scientific Linux release 6.6 (Carbon)
##
## locale:
##  [1] LC_CTYPE=fr_FR.UTF-8      LC_NUMERIC=C
##  [3] LC_TIME=fr_FR.UTF-8      LC_COLLATE=fr_FR.UTF-8
##  [5] LC_MONETARY=fr_FR.UTF-8  LC_MESSAGES=fr_FR.UTF-8
##  [7] LC_PAPER=fr_FR.UTF-8     LC_NAME=C
##  [9] LC_ADDRESS=C             LC_TELEPHONE=C
## [11] LC_MEASUREMENT=fr_FR.UTF-8 LC_IDENTIFICATION=C
##
## attached base packages:
## [1] parallel stats4 stats graphics grDevices utils datasets
```

¹<http://software.broadinstitute.org/software/igv/>


```
## [8] methods    base
##
## other attached packages:
## [1] vsn_3.38.0          scales_0.4.1
## [3] Rsubread_1.20.6     biomaRt_2.26.1
## [5] gtools_3.5.0        plots_3.0.1
## [7] ggrepel_0.6.5       RColorBrewer_1.1-2
## [9] RUVSeq_1.4.0        edgeR_3.12.1
## [11] limma_3.26.9        EDASeq_2.4.1
## [13] ShortRead_1.28.0    GenomicAlignments_1.6.3
## [15] Rsamtools_1.22.0    Biostrings_2.38.4
## [17] XVector_0.10.0      BiocParallel_1.4.3
## [19] DESeq2_1.10.1       RcppArmadillo_0.7.500.0.0
## [21] Rcpp_0.12.8         SummarizedExperiment_1.0.2
## [23] Biobase_2.30.0      GenomicRanges_1.22.4
## [25] GenomeInfoDb_1.6.3  IRanges_2.4.8
## [27] S4Vectors_0.8.11    BiocGenerics_0.16.1
## [29] cowplot_0.6.3       ggplot2_2.1.0
## [31] knitr_1.15.1
##
## loaded via a namespace (and not attached):
## [1] splines_3.2.5       R.utils_2.5.0
## [3] Formula_1.2-1       affy_1.48.0
## [5] aroma.light_3.0.0    latticeExtra_0.6-28
## [7] RSQLite_1.1         lattice_0.20-33
## [9] digest_0.6.10       colorspace_1.3-1
## [11] preprocessCore_1.32.0 htmltools_0.3.5
## [13] Matrix_1.2-4        R.oo_1.21.0
## [15] plyr_1.8.4          XML_3.98-1.5
## [17] genefilter_1.52.1    zlibbioc_1.16.0
## [19] xtable_1.8-2        gdata_2.17.0
## [21] affyio_1.40.0       htmlTable_1.7
## [23] annotate_1.48.0      GenomicFeatures_1.22.13
## [25] nnet_7.3-12         survival_2.40-1
## [27] magrittr_1.5         memoise_1.0.0
## [29] evaluate_0.10        R.methodsS3_1.7.1
## [31] MASS_7.3-45         hwriter_1.3.2
## [33] foreign_0.8-66       BiocInstaller_1.20.3
## [35] tools_3.2.5          data.table_1.10.0
## [37] matrixStats_0.51.0  stringr_1.1.0
## [39] munsell_0.4.3        locfit_1.5-9.1
## [41] cluster_2.0.5        AnnotationDbi_1.32.3
## [43] lambda.r_1.1.9       DESeq_1.22.1
## [45] caTools_1.17.1       futile.logger_1.4.3
## [47] grid_3.2.5           RCurl_1.95-4.8
## [49] labeling_0.3         bitops_1.0-6
## [51] tcltk_3.2.5          gtable_0.2.0
## [53] DBI_0.5-1            gridExtra_2.2.1
## [55] rtracklayer_1.30.4   Hmisc_4.0-0
## [57] futile.options_1.0.0 KernSmooth_2.23-15
## [59] stringi_1.1.2        geneplotter_1.48.0
```

```
## [61] rpart_4.1-10      acepack_1.4.1
```

References

- [1] Trapnell C, Pachter L, Salzberg L. *Tophat: discovering splice junctions with rna-seq*. Bioinformatics, 25:1105-1111, 2009.
- [2] Kim D, Pertea G, Trapnell C, Pimentel H, Kelley R, Salzberg SL. *TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions*. Genome Biology, 14:R36, 2013.
- [3] Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL. *Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome*. Genome Biology, 10:R25, 2009.
- [4] Liao Y Smyth GK and Shi W. *featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features*. Bioinformatics 2014 Apr 1;30(7):923-30.
- [5] Anders S, Huber W. *Differential expression analysis for sequence count data*. Genome Biology, 11:R106, 2010.
- [6] Love M, Huber W, Anders S. *Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2*. Genome Biology, 15:550, 2014.
- [7] Benjamini Y, Hochberg Y. *Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing*. Journal of the Royal Statistical Society, 57:289-300, 1995.

Tableau A1-1 : Nom et séquence des couples d'amorces associés aux gènes d'intérêt pour la recherche d'un promoteur inductible par une molécule d'intérêt chez *Ae. albopictus*.

Molécule	Gène	Nom			Taille du produit (bp)
		couple d'amorces	Amorce sens (<i>forward</i>)	Amorce antisens (<i>reverse</i>)	
Bleu de Méthylène	AALF015	Albo- Mblu- 01	CAACCGTTGAGAAAA GCGCA	CTGTTTGGTTGCCTTC ACCG	406
Bleu de Méthylène	AALF005	Albo- Mblu- 03	CGCTGACGATTTGCT AACGG	GATGTAGCGACGCA CAAAT	302
Bleu de Méthylène	CUFF.12	Albo- Mblu- 05	CCCATCTGGCATCCC TGTA	GACGGGAGAATCAAA CACGC	85
Bleu de Méthylène	AALF028	Albo- Mblu- 07	ACAGCCATCACGGAA ACGAT	CTAGCTACGCCAATG CGAGA	761
Bleu de Méthylène	CUFF.27	Albo- Mblu- 09	AGCAGTCATCACATC ACCCG	AAATTTTCCATCGCA GCGCA	75
EtOH- isopropal	CUFF.26	Albo- EtOH- 01	CCCGTATACATCAGC GGCAA	GCCACTGGTATCGCG TCAAT	105
EtOH- isopropal	CUFF.33	Albo- EtOH- 03	GTTTTGGGCTGGTGG TTCAA	TGAGCTGTCAGTTGT AGCCC	270

Tableau A1-2 : Séquences cibles des ARN double-brin utilisés pour la méthode ARNi chez *Ae. aegypti* et *Ae. albopictus*.

Espèce	Cible (identifiant NCBI ou référence)	Séquence dsRNA
<i>Ae. albopictus</i>	Fez2 (XM_019709180.1)	CATGATGACTAAAGCAGAAATCA
	Nucléase 1 (XM_019679594.1)	GGTAGGATTTCTGACTTACATTG
	Nucléase 2 (XM_019701402.1)	GGGTAAAGAATTCAACACCAAGC
	Nucléase 3 (XM_019683641.1)	CGAGTATCAGCTGAAATTGAATG
	dsxF1 (MF682531.1)	CAAGCCGTGGTAAATGAATACTC
	dsxF2 (MF682532.1)	GAAGTGCAAATGCTGTTCAACAA
<i>Ae. aegypti</i>	Fez2 (XM_021849792.1)	v1 GAGGTCATCAAGGAAATTGACGA
	Nucléase (XM_001653429.2)	ACAAGTACCTCTTGCGGTGGCG
	Fez2 v2 (voir Hapairai et al. 2017)	CTAGCATCATCTTCCGACCGAACCA
	Lrc (voir Hapairai et al. 2017)	GTATCAGTCAGTATCAGAACCAGAA
Aucune	Aucune (contrôle négatif)	GTATAGTATAGTATACCGTATAA

Annexe 2 : Informations supplémentaires au Chapitre 1

Glossary

Genetically modified organism (GMO): European legal definition: “an organism, with the exception of human beings, in which the genetic material has been altered in a way that does not occur naturally by mating and/or natural recombination”^{vi}. As sterile insects are not considered as organisms (see “Organism”), they are not considered GMOs. Even with residual fertility, irradiated sterile male insects are exempted from GMO regulations when they are obtained by mutagenesis techniques that have conventionally been used in a number of applications, have a long safety record and do not involve the use of recombinant nucleic acid molecules. However, on the international stage, in the Cartagena Protocol on Biosafety to the Convention on Biological Diversity the definition of “living modified organism” includes sterile organisms.

Incompatible Insect Technique (IIT): The IIT relies on *Wolbachia* bacteria’s property to confer cytoplasmic incompatibility to its host. When crossed to infected females, *Wolbachia*-infected males mosquitoes sire infected offspring, while when mating with uninfected females, they cannot sire any progeny. IIT is the repeated releases of infected males in non-infected populations, resulting in target population reduction.

Organism: European legal definition: “any biological entity capable of replication or of transferring genetic material”^{iv}. According to this definition, sterile insects are not organisms.

Canadian Environmental Protection Act, 1999: an organism refers to a living organism i.e. “a substance that is an animate product of biotechnology”.

Protandry/protogyny: in insects, protandry is the fact that males emerge before females while protogyny is the opposite.

Release of Insects carrying a Dominant Lethal (RIDL): Although considered as SIT by some authors, it does not fully fit the definition since released males are still fertile but transmit a lethality gene.

Sexual dimorphism: differences other than the sexual organs between sexes of the same species.

Sterile Insect Technique (SIT): According to the International Standards for Phytosanitary Measures No. 5 Glossary of phytosanitary terms, the Sterile Insect Technique is a “Method of pest control using area-wide inundative releases of sterile insects to reduce reproduction in a field population of the same species”.

Supplemental information

Sex sorting for pest control: it's raining men!

Célia Lutrat^{1,2,3}, David Giesbrecht⁴, Eric Marois⁵, Steve Whyard⁴, Thierry Baldet^{1,2}, Jérémy Bouyer^{1,6*}

¹ CIRAD, UMR ASTRE, F-34398 Montpellier, France.

² ASTRE, CIRAD, INRA, Univ Montpellier, Montpellier, France.

³ Université de Montpellier, Montpellier, France.

⁴ Department of Biological Sciences, University of Manitoba, Winnipeg, MB, Canada

⁵ CNRS UPR9022, INSERM U963, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université de Strasbourg, Strasbourg, France

⁶ Insect Pest Control, Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, International Atomic Energy Agency (IAEA), Vienna, Austria

* Correspondence: jeremy.bouyer@cirad.fr (Jérémy Bouyer)

Supplemental figure S1, related to Tables 1 and 2

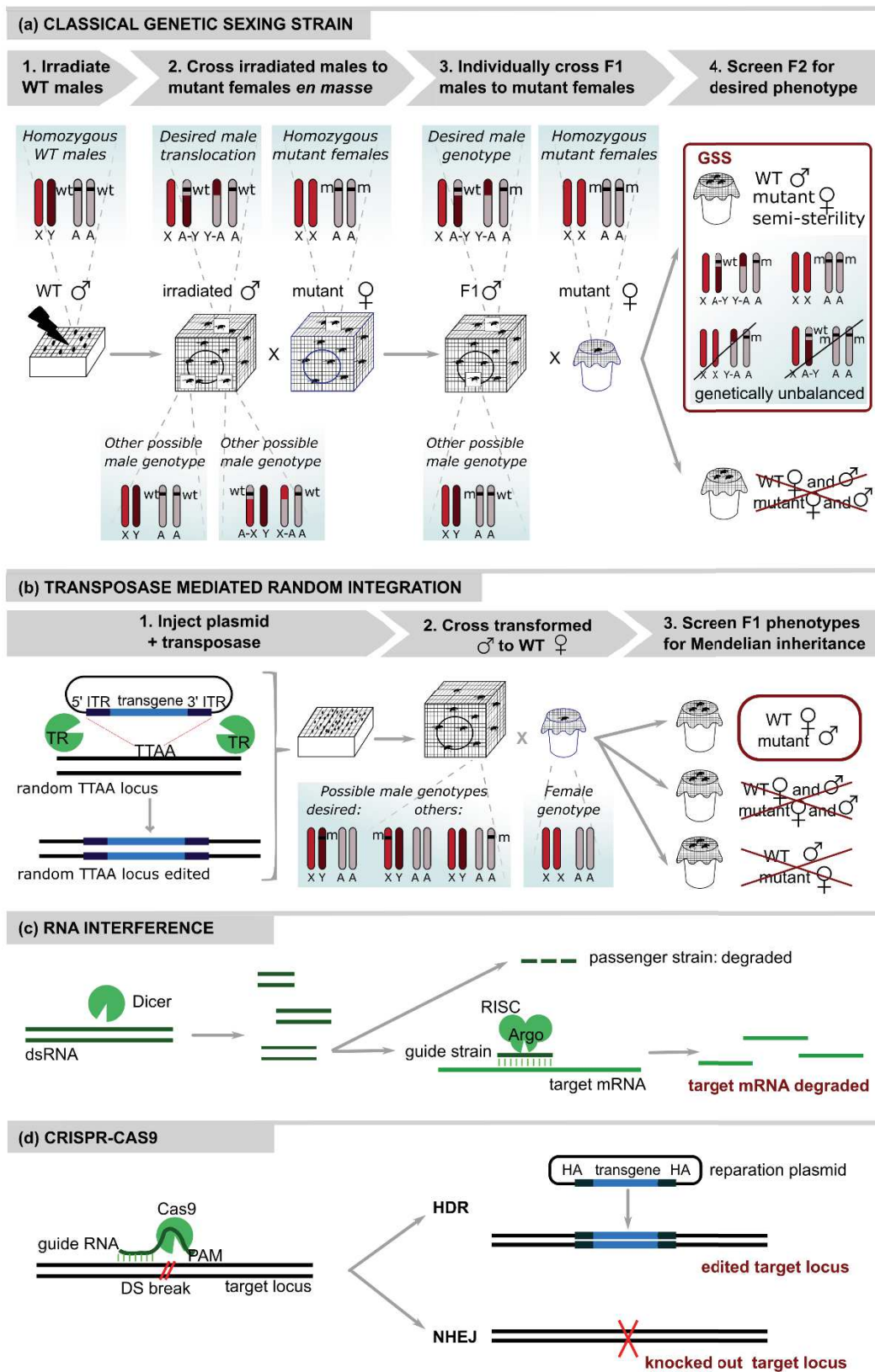


Figure S1. Mutagenesis and genome editing tools

(a) Classical Genetic Sexing Strains. For building a classical Genetic Sexing Strain, two initial strains are required: a wild-type (WT) strain and a homozygous mutant strain for selectable traits [S1,S2]. Translocation of the WT allele to the chromosome carrying the male-determining locus happens by irradiating WT males. Irradiated and F1 males are crossed to mutant females respectively *en masse* and individually. Finally, F2 populations are screened for desired phenotype: in the absence of recombination, all males will be wild type and all females will be mutant. From F2 onwards, a genetic sexing strain can be stably maintained. Because half the male gametes are genetically imbalanced, such strains are semi-sterile. Desired and other possible genotypes are provided at each step, with “X” being X (or m-bearing) chromosome, “Y” being Y or (M-bearing) chromosome, “A” is the autosome carrying the gene of interest, “m” is its mutant allele and “wt” its wild-type allele. Other autosomes are not shown for simplification. **(b) Transposase mediated random integration.** The plasmid carries a transgene of interest and visible markers flanked by transposon inverted terminal repeats (ITR). When injected with a source of transposase, the enzyme recognises the ITRs and randomly inserts the transgene and the ITRs into a recognition sequence (TTAA for the piggyBac transposon) in the genome [S3]. Successfully transformed males carrying the marker are then crossed to WT females individually. Using Mendelian inheritance rules their offspring can be screened for sex-locus linkage [S4]. Similar to (a), genotypes are shown with “X” being X (or m-bearing) chromosome, “Y” being Y or (M-bearing) chromosome, “A” being an autosome and “m” being the location of the injected mutant transgene. **(c) RNA interference.** RNA interference uses long (up to several hundred base pairs) or short (~23 base pairs) double-stranded RNAs (dsRNA) targeting a gene transcript. When injected, fed to, or transgenically expressed in larvae, they are recognized by the endonuclease *Dicer* which cleaves and transfers them to the RNA-induced silencing complex (RISC). When complementarity with the target transcript is complete, *Argonaute* (*Argo*) cleaves the mRNA, resulting in down-regulation of the target gene [S5]. **(d) CRISPR-Cas9.** A guide RNA (gRNA) containing a stretch of 20 target nucleotides chosen adjacent to a protospacer adjacent motif (PAM) is injected or expressed in the embryo with endonuclease Cas9. Cas9 is directed by the gRNA to its target and causes a double-stranded break three base pairs 5’ from the PAM motif. Repair mechanisms include homology directed repair (HDR) if template DNA with homology to the disrupted site is provided, and non-homologous end joining (NHEJ) that repairs the break without a template, usually disrupting the reading frame. HA = homology arms.

Supplemental references

- S1 Robinson, A.S. (2002) Mutations and their use in insect control. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 511, 113–132
- S2 Franz, G. (2005) Genetic Sexing Strains in Mediterranean Fruit Fly, an Example for Other Species Amenable to Large-Scale Rearing for the Sterile Insect Technique. In *Sterile Insect Technique* (Dyck, V. A. et al., eds), pp. 427–451, Springer, Dordrecht
- S3 Adolphi, A. and Lycett, G.J. (2018) Opening the toolkit for genetic analysis and control of Anopheles mosquito vectors. *Current Opinion in Insect Science* 30, 8–18
- S4 Condon, K.C. et al. (2007) Genetic sexing through the use of Y-linked transgenes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 37, 1168–1176
- S5 Munkácsy, G. et al. (2016) Validation of RNAi Silencing Efficiency Using Gene Array Data shows 18.5% Failure Rate across 429 Independent Experiments. *Mol Ther Nucleic Acids* 5, e366

Annexe 3 : Informations supplémentaires au Chapitre 2

Supplementary Information for

Transgenic expression of *Nix* converts genetic females into males and allows automated sex sorting in *Aedes albopictus*

Célia Lutrat, Roenick P. Olmo, Thierry Baldet, Jérémy Bouyer and Eric Marois

Correspondence:

Célia Lutrat

Email: celia.lutrat@outlook.com

Eric Marois

Email: e.marois@unistra.fr

This PDF file includes:

Supplementary Notes 1 and 2

Supplementary Figures 1 to 4

Supplementary Tables 1 to 6

Supplementary Data 1

Other supplementary materials for this manuscript include the following:

Supplementary Data 2 (separate file): Wing length measurements (Fig. 3b)

Supplementary Data 3 (separate file): qPCR data (Fig. 4)

Supplementary Data 4 (separate file): COPAS data for SM9 line (Fig. 6a)

Supplementary Data 5 (separate file): COPAS data for 1.2G line (Fig. 6b)

Supplementary Data 6 (separate file): COPAS data for 3.1G line (Fig. 6c)

Supplementary Note 1: Sequence of the *Ae. albopictus* genomic region amplified for cloning *Nix* promoter.

In the sequence below, *Nix* promoter sequence is included in the 1,916 bp sequence highlighted in grey, the 5' UTR sequence of the *Nix* gene is not highlighted, while the ATG start codon is highlighted in blue.

```
TCGCATTTTATGAGTAAAGGCCCATTAATCATATATGGGTAAAGTGCTTTTTGTAA
AAAATGAGTAAATCGATTTACTCATAAATTATAATTTACCGTGTTTACTTTTCGT
CTTTTGTTATATTTTGAAGTGTAACTATTTTGTATTTATCATTAAATTCATACAA
AATTTTGCCTTTATTTTGTAGTTTATTGCAATCTACGAAAATTATTAATGAATTTT
ACATGTTTCAAATACTCTTAATCATTTTCCTCCTGGAAAACAGACCTTCCGAGACG
TAGCTCTTTGAAGTTTTCATAATGATCCATGTATGAAATTTTCCCCTCCGGCTGTT
GTTTCATCGCGCAGTTGTTCTGTTCTTCCGTTCCCTCGTTCTTCCGGCGCTTGAAGCC
TTGGTGCAGTCGGAAGTGTGGAAAAGACTGATATATTTTTATTTCACGGTCGTTA
ATGAAAATGATGCTGTCACTATGGAAGTTACCTGCAAATTCCATGCTTTTGTAGCC
TTTCTTGTAGCTCCACATGATGATTTGTTGCTCCTGTATTATCTTCGAGTACCAA
CCTTGTGAAACGGAAATAATCCATCGTAAATGAAAATTGAACGGTATCAATTTAT
CCAGGAAGTACTTACCGATTAAAATATCAATGTATTTGGGAACCTCGACTCTAAT
CCGCGTGGAATCCGATGGACGCGGTATCGGTCATTGAACCCGATGCTGAAGGG
CCTCGACTGGCTATAGCGGTGCCGTGAAAATCAAAATATCTAAAATTTCCCGATA
GTGTTATGATCAGGGGATCCGCATGCGGCAAGGTAGGCCTACTGCTCATCTTTTG
CGAGTGTGTTAGTGTGACTGGCAACGCGACCAGAAGTCTAGTCGAATCCTGCTTG
GAAATCGGTTTGTGTTTGTGCGATGGGGGTGGCCCGCGAAATCGCATTGTGTTGTTTG
GGAAGGCCCGCTCGATGCATGTTAGGTAGGCGTAGTTTGTTCGAGTTTGACGTGC
CTGCACCCTCCCTGGTTATGATGGCGCACTAATGCATTCCGAGAAAAGTTGCTAA
CTTGAAAATTTTCATCCAAATATGGGTAAGTTCATTTACCCATGTTTGGGTATAGC
GATTTTACCTATAATATGGGCAAATTTGACCGTTTTTCAAAGGTATATTTTACCCA
TATTATGGGTAATGCATATGAAACCCAAATATGGGTAATCAACTACTGATCTAT
GGGTAAACTGATCTTAGCGTGTATGTTTCACACGTGACATTCAGTGGTTTTACAAT
TGGCTTCTTTAGCAGTGTGTTGGGATAATTCCATATTATGAATCTGCATGCCAAACTG
GGCCGAAATCCAAATTTTCATCAATTTTGGTGCACGGGAACCTATTTAAATATCA
ATTTGAAGTTTGTATGGGAGCGATTTGTGCAATCACCCCTCGTTGCATTTTGTACT
GGGCGGAGCTGTCAAACAGTTGCCTAGCTGTCAAAGGTGATTTCGAATAATCTC
TTTGAAATTGATTTTAGGTATCAAATAAAGTTCTAAAAATCTGAAAAAATCAT
```


AGTGGCTCAGAAAAAGGTGCTCTTTCGTATAAAATCAAAAAATGAACACTTTTTT
CAAAATTTAAAAACCCAATTTTCGCAAATCTATAGGGCTCTGCACGAAGTTCTCT
CCCTCTCTTTCGCTCTCATTGAGATTTTGTAACAACAAGGCCAGGAAATGTCAA
AATCCCATACAAAATCAAAACAGTGCAGTGCCCTATATGTAAACACATCACTCC
GACGTGTAAATTTTTTTGAGTGTTGATTTAATCAAAGTGAATAAAAAATATTAGTTT
TATGACATACTTGTTTTCTGAGTGTAGCAAAAATATGAAAACACATTTTGTACTT
TGAATGTTAAGCGTGTATGCTTTTTGTGTCAATATGTCAATTGTTAAACCCATGTT
AATAGTTTAAATTTTTTTTAAATCAAATTCCTTTTTTAAGTAATG

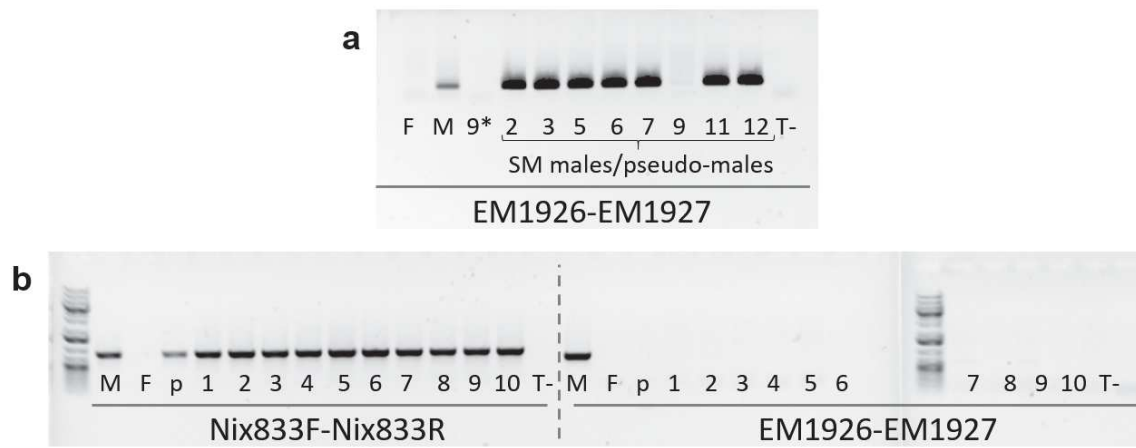
Supplementary Note 2: Male-specific amplification pattern of one of the copies of the *myo-sex* orthologue.

PCR amplification was performed using primers Myosex369-F and Myosex369-R targeting the end of the first intron of *myo-sex*. The expected product with this primer pair was 997 bp as provided below. The discovered male-specific product carries a 664 bp deletion (highlighted in grey) and is present in genetic males only.

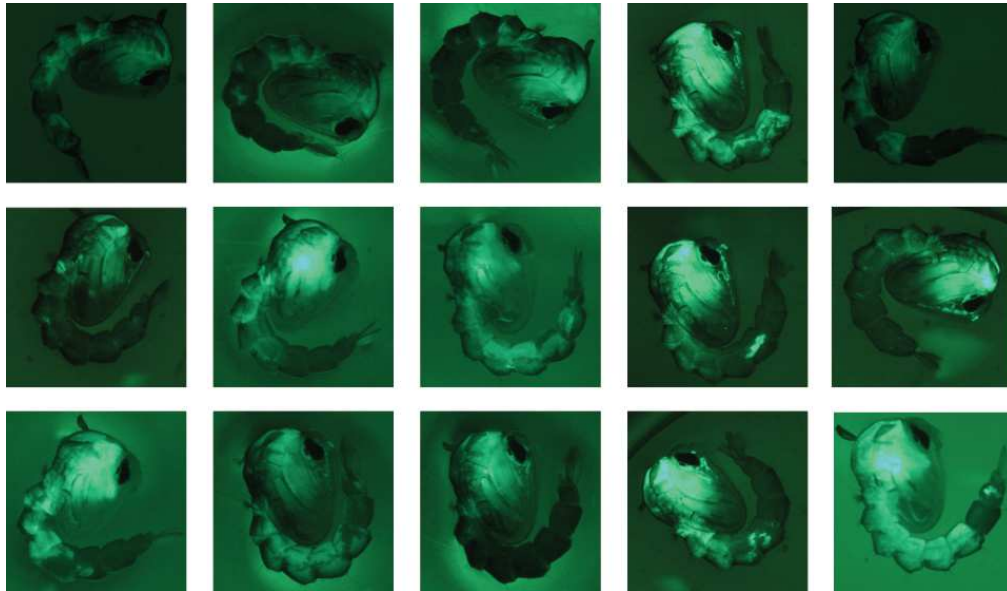
AGGCCATACTAACCTTCCGTAAATCACGCGGTTGGCCACTACCGTCAGCACCACG
ATAATGCTGAGTACAAAATTTAGATTTCTTCAACGTGTTGTACAAAATACAAAAG
CGCGATCGCTCGAGGGCTAAGAATTAATGAAGAAAATTGCAAATCAATTACATAT
TTATACAAAATCATAACAATAGGTATAGATGTTTGCAAAGATGTTTCGTTGACAGC
TTGAATCTCGAAACAGAGATGAATAGATTGAACTATAAAACAAACTCGATCAAA
AATAACACAGCGTAACAAAAATAACTTTTTGTATGTCTCTAGAGCAAACCTTACGT
GTCTCCGAAGGATTTTGGGCGCTGAATCCGAATCTGGGCTCAGATTTGCTCTAA
CACGTCACAATTTTGAGCTATACCTCAATTTATAGGGCAAAATATGCGATTTTGG
GCTTTTTTGACTGCAAGCCATTAAGCAAGGAAATATTTTTTTAAGCAATCAAAAG
GTTAATTGGTCAATTAACATCTAAATTACGACTCATGCAAAATATTTTCGTTTTACC
AAATCGAATTTGATAGTTTTAAGCGATTTATGTTAGGTACGATATTTCCCATATAA
GTCAGCCTCCAAAAGTTGCATGCAAGTTTTTCATGCTAACATAAAATGCTTAAATC
CATCAAATTTGATTAGGTAAAACGAAATATTTTGCATGAGTCGTTAATTTAGATG
TTAGTTGACCAATTAACCTTTTGATTGCTTAAAAAAAATATTTTCCTTGCTTAATGG
CTTGCAAGTCAAAAAAGCCCAAAATCGCATATTTTGCCCTATAAATTGAGGTATAG
CTCAAATTTGTGACGTGTTAGAGCAAATCTAAGCCCGGATTCGGATTCAGCGGCC
CAAAATCCTTCGGAGACACATAAGTTTGCTCTTGAGACAAAAAAAATGTTGCGCT
GTGTAACTCTGTATAAAACATTGTCCTACATTTTTTGCGCTCCATTGTTACTTCATTG
TAT



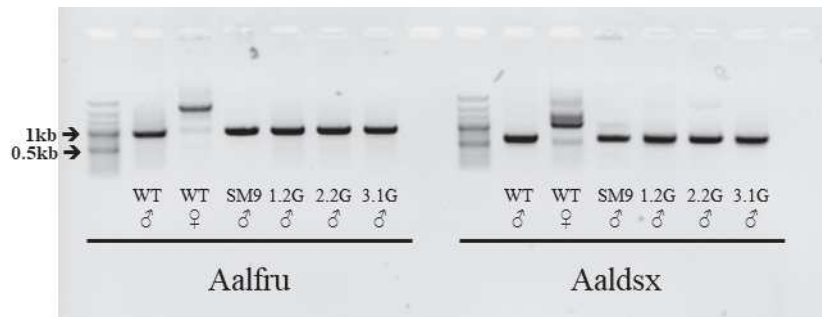
Supplementary Figure 1: Intersex phenotypes in SM9 line prior to purification. The two pupae on the left side of the picture are a control male and a control female from SM9 line. All four pupae on the right are representative GFP-expressing intersex individuals with deformed genitalia found in the SM9 line prior to elimination of additional non-fully masculinizing transgene insertions. Pictures were taken under a binocular microscope with white light.



Supplementary Figure 2: Detection of lines composed exclusively of genetic females in lines carrying the *Nix*-OpIE2-GFP plasmid. a) PCR amplification of genomic DNA from pooled phenotypic males using primers EM1926-EM1927. This primer pair is located within the second intron of *Nix*, absent from our construct, and thus amplifies only DNA from genetic males. Genomic DNA was extracted from pooled pupae and analysed in the following order: WT females (“F”, negative control), WT males (“M”, positive control), SM9 partially masculinized female (“9*”), males or pseudo-males from selected lines arising from injection of the first OpIE2-GFP -marked *Nix* expressing plasmid (numbers 2 to 12), negative control without DNA template (“T-“). This PCR allowed identification of line SM9 as composed exclusively of genetic females. **b)** Screening of 10 SM9 individual males (labelled 1 to 10) with primer pair Nix-833F-Nix-833R amplifying any *Nix*-bearing genomic DNA ¹ and primer pair EM1926-EM1927 for endogenous *Nix* only. The following controls were used: “M” is WT male positive control, “F” is WT female negative control, “p” is the pooled SM9 male DNA from top panel, and “T-” is a negative control without template DNA. This PCR confirmed that all phenotypic males in the SM9 line were pseudo-males. PCR products were resolved on a 0.8% agarose gel with 0.2µg/mL ethidium bromide.



Supplementary Figure 3: Gallery of male SM9 pupae arising from CRE-injected embryos, showing local demasculinization in the posterior pole. All adults that emerged from these pupae had male heads and female genitalia. Pictures were taken under a binocular fluorescence microscope using a GFP filter.



Supplementary Figure 4: Sex-specific *fruitless* and *doublesex* splicing patterns. mRNAs from WT male, WT female, SM9 pseudo-male, 1.2G pseudo-male, 2.2G pseudo-male, and 3.1G pseudo-male pupae were extracted, reverse-transcribed into cDNA, which was used for PCR. Products were resolved on a 1.5% agarose gel with 0.2µg/mL ethidium bromide. Left side: RT-PCR with *fruitless* sex-specific primers for which the male product is expected at 987 bp and the female product at 2010 bp. Right side: RT-PCR with *doublesex* primers, for which the male product is expected at 620 bp and the female product at 1062 bp.

Supplementary Table 1: Sequences of primers used in this study.

Name	5' – 3' sequence	Use
EM1926	CCCTCAATTTTCCGCCAACTATT	655bp amplicon in intron 2 for detection of endogenous <i>Nix</i>
EM1927	AATCTTTGGTGCGCCGTGTC	
Myosex369-F	AGGCCATACTAACCTTCCGT	Genomic amplification of a non-coding part of the <i>myo-sex</i> copy from scaffold 369 (end of intron 1).
Myosex396-R	ATACAATGAAGTAACAATGGAGCG	
EM2145	CAAGTTGGTGACGATCCCGA	For RT-qPCR of mRNA from <i>myo-sex</i> orthologues
EM2146	GTTGGGTAGAGCAACGGTGA	
EM2147	CGCCGGAAAAACGTATCCACT	For RT-PCR of mRNA from LOC115254984, a candidate <i>myo-fem</i> orthologue
EM2148	GCTGGTTCCAGGTTAGTTGG	
EM2149	CCCGTGCTGAAGAGTTGGAG	For RT-PCR of mRNA from LOC115254986, a candidate <i>myo-fem</i> orthologue
EM2150	GTGGACAGACGTTGCTTAGT	
EM2151	GTAGGCATCTACGAGCCCAA	For RT-PCR of mRNA from LOC109402113, a candidate <i>myo-fem</i> orthologue
EM2152	CCAACCTGTACCACTGGCTT	
EM2153	CATTGGAAACATTCCCGCCG	For RT-PCR or RT-qPCR of mRNA from <i>Nix</i>
EM2154	ACTGCCGGTTTCACATCACA	
EM2170	ACGTGCCGAAGAATTGGAAG	For RT-qPCR of mRNA from LOC109402113, putative <i>myo-fem</i> orthologue
EM2171	TTCTAAGGCAACACACTTCTGA	
EM2174	CGTGCCACCCTTCTTGGTAA	For RT-qPCR of mRNA from LOC115254984, candidate <i>myo-fem</i> orthologue
EM2175	CCTCCAACCTCTTCTGCACGG	

Supplementary Table 2: Sex ratios of transgenic versus WT lines

Line	Replicate	Males	Females
WT	1	125	116
WT	2	128	128
WT	3	74	67
SM9	1	936	745
SM9	2	677	590
SM9	3	430	308
1.2G	1	889	1027
1.2G	2	477	423
1.2G	3	1787	1802
3.1G	1	1246	1224
3.1G	2	339	306
3.1G	3	887	641

Supplementary Table 3: Flight ability of SM9 transgenic pseudo-males versus WT males.

Line	Replicate	Number failed	Number succeeded
WT	1	55	31
WT	2	38	36
WT	3	79	11
SM9	1	35	41
SM9	2	34	65
SM9	3	50	14

Supplementary Table 4: Hatching rate of eggs from the SM9 versus WT lines

Replicate	Line	Larvae	Eggs
1	WT	373	641
2	WT	150	309
3	WT	115	201
1	SM9	138	286
2	SM9	82	147
3	SM9	153	264

Supplementary Table 5: Fertility of the SM9 versus WT lines

Replicate	Line	Number of progeny
1	WT	2224
2	WT	1400
3	WT	1581
1	SM9	2013
2	SM9	1479
3	SM9	858

Supplementary Table 6: Competitiveness of transgenic versus WT males

Comparison	Replicate	Number of transgenic progeny	Number of non- transgenic progeny
SM9 vs WT	1	22	364
SM9 vs WT	2	129	1912
SM9 vs WT	3	211	1540
SM9 vs WT	4	57	421
SM9 vs WT	5	157	1401
1.2G vs WT	1	586	2681
1.2G vs WT	2	530	4296
1.2G vs WT	3	474	3571
1.2G vs WT	4	187	1875
3.1G vs WT	1	16	281
3.1G vs WT	2	99	1042
3.1G vs WT	3	71	895
3.1G vs WT	4	175	1165
3.1G vs WT	5	73	710

Supplementary Data 1: Model output from all statistical analyses and performance assessment

Supplementary Information

Supplementary Data 1: Model output from all statistical analyses and performance assessment

Sex ratios

Goal

To evaluate whether the Nix-eGFP cassette was stable and adult males fully viable, we first determined the sex ratios of transgenic strains in comparison to that of the parental wild strain (WT).

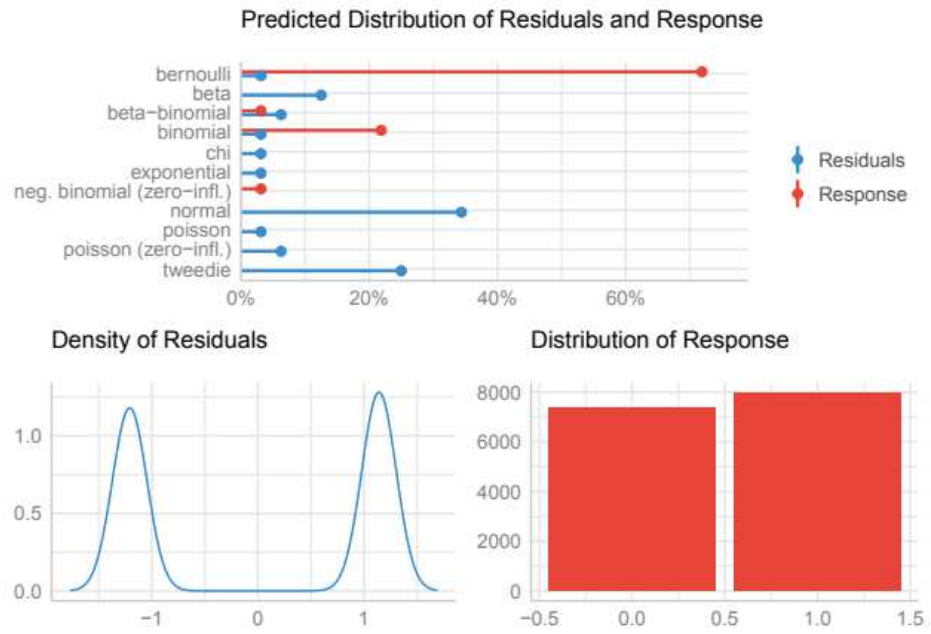
Method

The effect of the lines on sex ratios was tested using linear generalised mixed-effect model and binomial distribution assumptions. The replicate was set as random effect as measurements were performed on different days. The significance between the lines was tested by ANOVA followed by pairwise Tukey test.

Model output

```
##
## Simultaneous Tests for General Linear Hypotheses
##
## Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts
##
##
## Fit: glmer(formula = male_percentage ~ line + (1 | replicate), data = males,
## family = binomial(link = logit))
##
## Linear Hypotheses:
##              Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
## SM9 - BiA == 0    0.17455    0.08562   2.039   0.162
## 1.2G - BiA == 0   -0.11167    0.08380  -1.332   0.526
## 3.1G - BiA == 0    0.08180    0.08475   0.965   0.758
## 1.2G - SM9 == 0   -0.28622    0.04359  -6.566 <0.001 ***
## 3.1G - SM9 == 0   -0.09275    0.04498  -2.062   0.155
## 3.1G - 1.2G == 0   0.19347    0.03975   4.867 <0.001 ***
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
## (Adjusted p values reported -- single-step method)

## Line Estimate Std_Error
## 1 BiA 0.5153738 0.08697104
## 2 SM9 0.5587437 0.04952702
## 3 1.2G 0.4874640 0.04510691
## 4 3.1G 0.5357665 0.04750739
```



Wing lengths

Goal

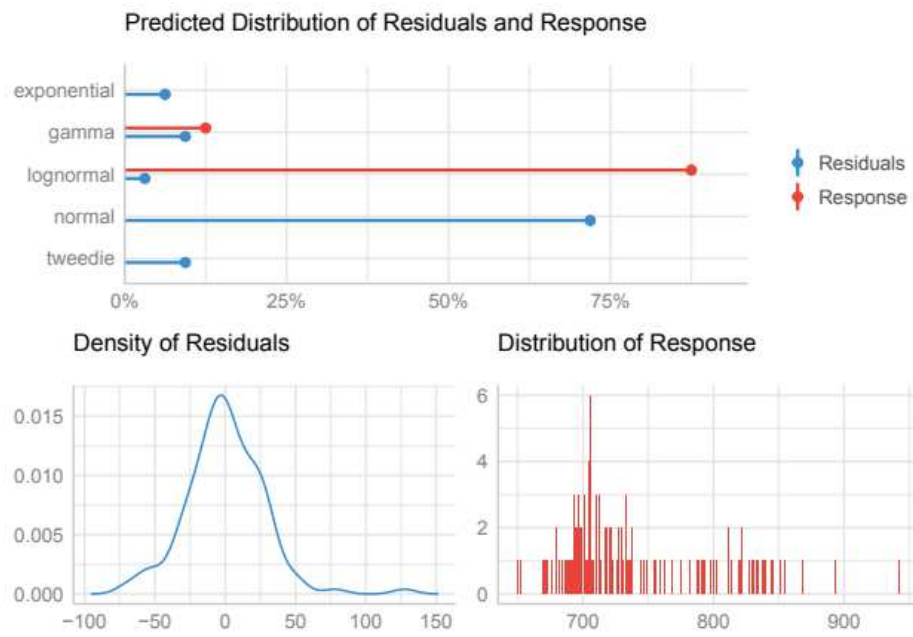
In *Aedes* mosquitoes, males and females display a significant size dimorphism, with females having a larger body size. We compared the body size of masculinized genetic females to WT females and WT males using wing length as a proxy for mosquito body size.

Method

The effect of lines on wing length was tested using linear model and normal distribution assumptions. The significance between the lines was tested by ANOVA followed by pairwise Tukey test.

Model output

```
##
## Call:
## lm(formula = Length ~ Line, data = wings)
##
## Residuals:
##      Min       1Q   Median       3Q      Max
## -71.257 -15.393  -1.055   16.187  127.278
##
## Coefficients:
##              Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
## (Intercept)    815.065      4.469   182.40  <2e-16 ***
## LineBiA male  -109.314      6.361   -17.18  <2e-16 ***
## LineSM9 male  -108.970      6.016   -18.11  <2e-16 ***
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
##
## Residual standard error: 27.91 on 122 degrees of freedom
## Multiple R-squared:  0.7708, Adjusted R-squared:  0.767
## F-statistic: 205.1 on 2 and 122 DF,  p-value: < 2.2e-16
##
## Tukey multiple comparisons of means
## 95% family-wise confidence level
##
## Fit: aov(formula = mod.wings)
##
## $Line
##              diff          lwr          upr          p adj
## BiA male-BiA female -109.3141235 -124.40642 -94.22182 0.0000000
## SM9 male-BiA female -108.9702244 -123.24407 -94.69638 0.0000000
## SM9 male-BiA male    0.3438991  -14.03319  14.72099 0.9982258
```

RT-qPCR : relative expresion of *Nix*

Goal

To assess whether transgenic males express *Nix* in similar levels to wild-type males, expression levels were measured by RT-qPCR at the pupal stage.

Method

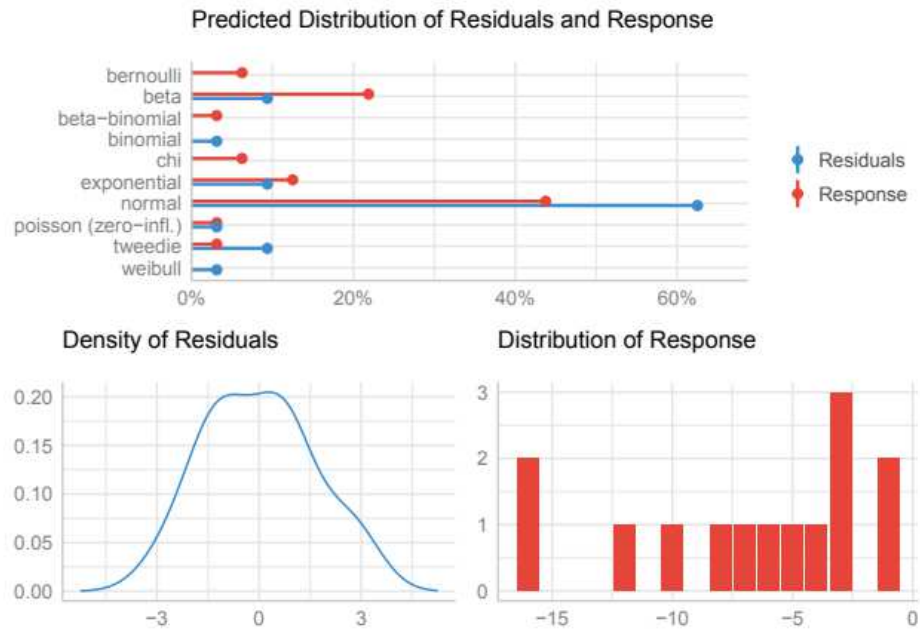
For qPCR, three technical replicates of each biological sample were used. Each line was tested on 3 independent biological samples. To test the effects of the lines on gene expression we used linear model and normal distribution assumptions. The significance between the lines was tested by ANOVA followed by pairwise Tukey test.

Model output

```
## Tukey multiple comparisons of means
## 95% family-wise confidence level
##
## Fit: aov(formula = mod.dCt)
##
## $line
##
```

	diff	lwr	upr	p adj
## WT female-WT male	-10.65328068	-15.9581933	-5.348368	0.0005953
## SM9 male-WT male	-2.92265574	-8.8537284	3.008417	0.5014045
## 1.2G male-WT male	-2.96413962	-8.2690522	2.340773	0.3910419
## 3.1G male-WT male	2.25456640	-3.0503462	7.559479	0.6262636
## SM9 male-WT female	7.73062494	1.7995523	13.661698	0.0115720
## 1.2G male-WT female	7.68914106	2.3842284	12.994054	0.0059238
## 3.1G male-WT female	12.90784709	7.6029345	18.212760	0.0001348
## 1.2G male-SM9 male	-0.04148388	-5.9725565	5.889589	0.9999999
## 3.1G male-SM9 male	5.17722214	-0.7538505	11.108295	0.0933632
## 3.1G male-1.2G male	5.21870602	-0.0862066	10.523619	0.0541624

```
## [1] 3406.05
```



RT-qPCR : relative expresion of *myo-sex*

Goal

To assess whether transgenic males express *myo-sex* in similar levels to wild-type males, expression levels were measured by RT-qPCR at the pupal stage.

Method

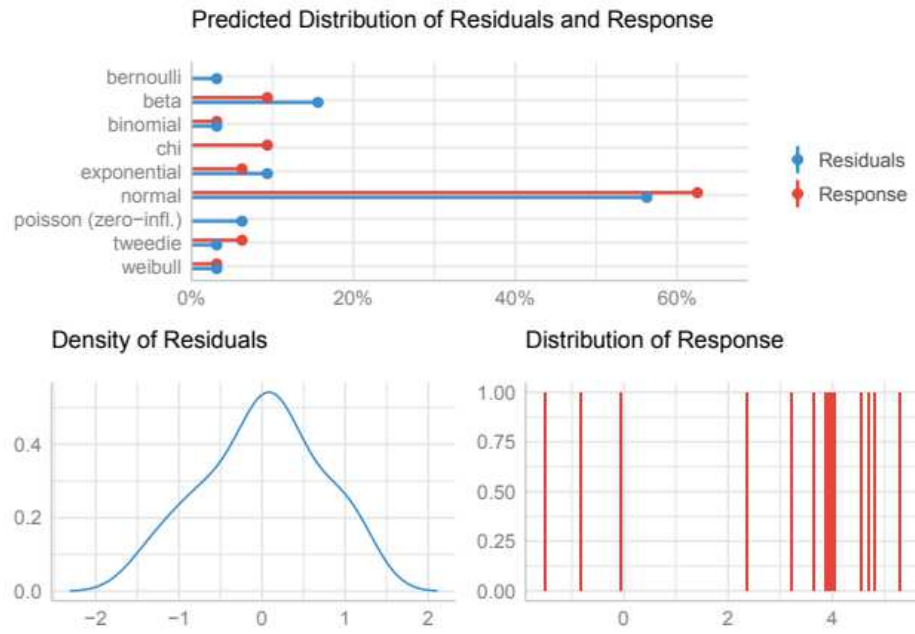
For qPCR, three technical replicates of each biological sample were used. Each line was tested on 3 independent biological samples. To test the effects of the lines on gene expression we used linear model and normal distribution assumptions. The significance between the lines was tested by ANOVA followed by pairwise Tukey test.

Model output

```
## Tukey multiple comparisons of means
## 95% family-wise confidence level
##
## Fit: aov(formula = mod.dCt)
##
## $line
##
```

	diff	lwr	upr	p adj
## WT female-WT male	-4.50142023	-6.865756	-2.137084	0.0008858
## SM9 male-WT male	0.07875527	-2.564652	2.722163	0.9999723
## 1.2G male-WT male	0.46634928	-1.897986	2.830685	0.9596094
## 3.1G male-WT male	0.71218332	-1.652152	3.076519	0.8434409
## SM9 male-WT female	4.58017550	1.936768	7.223583	0.0017537
## 1.2G male-WT female	4.96776952	2.603434	7.332105	0.0004226
## 3.1G male-WT female	5.21360355	2.849268	7.577939	0.0002916
## 1.2G male-SM9 male	0.38759401	-2.255814	3.031002	0.9860491
## 3.1G male-SM9 male	0.63342805	-2.009980	3.276836	0.9223992
## 3.1G male-1.2G male	0.24583403	-2.118502	2.610170	0.9961853

```
## [1] 32.59559
```



RT-qPCR : relative expression of LOC109402113

Goal

To assess whether transgenic males express LOC109402113 (*Ae. aegypti myo-fem* homologue) in similar levels to wild-type males, expression levels were measured by RT-qPCR at the pupal stage.

Method

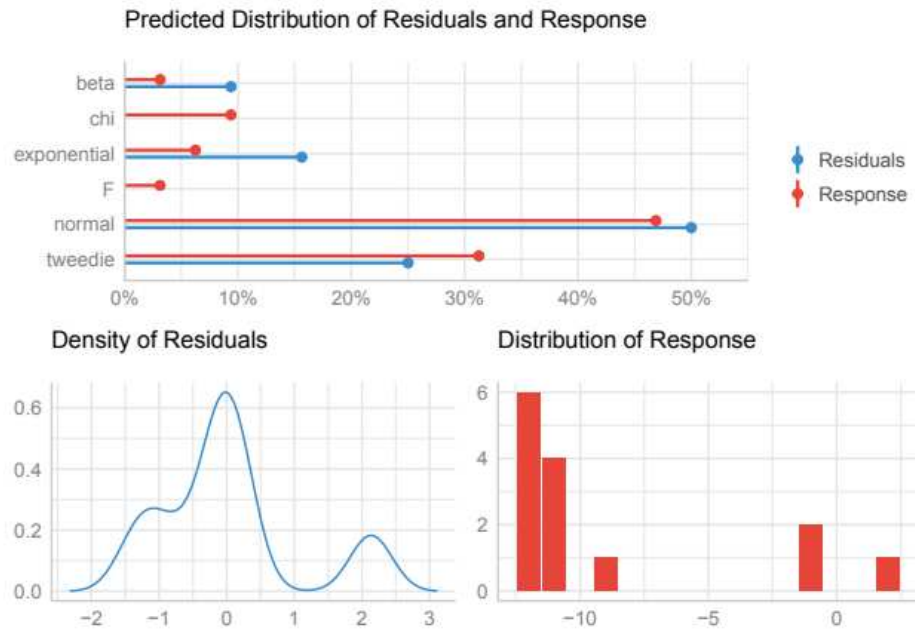
For qPCR, three technical replicates of each biological sample were used. Each line was tested on 3 independent biological samples. To test the effects of the lines on gene expression we used linear model and normal distribution assumptions. The significance between the lines was tested by ANOVA followed by pairwise Tukey test.

Model output

```
## Tukey multiple comparisons of means
## 95% family-wise confidence level
##
## Fit: aov(formula = mod.dCt)
##
## $line
##
```

	diff	lwr	upr	p adj
## WT female-WT male	12.4843140	9.035306	15.933322	0.0000051
## SM9 male-WT male	0.4245338	-3.431574	4.280642	0.9952514
## 1.2G male-WT male	1.0438734	-2.405134	4.492881	0.8412790
## 3.1G male-WT male	1.4883477	-1.960660	4.937356	0.6139971
## SM9 male-WT female	-12.0597801	-15.915888	-8.203672	0.0000174
## 1.2G male-WT female	-11.4404406	-14.889448	-7.991433	0.0000106
## 3.1G male-WT female	-10.9959663	-14.444974	-7.546958	0.0000148
## 1.2G male-SM9 male	0.6193395	-3.236768	4.475448	0.9805259
## 3.1G male-SM9 male	1.0638138	-2.792294	4.919922	0.8792667
## 3.1G male-1.2G male	0.4444743	-3.004534	3.893482	0.9913742

```
## [1] 3947.643
```



RT-qPCR : relative expression of LOC115254984

Goal

To assess whether transgenic males express LOC115254984 (*Ae. aegypti myo-fem homologue*) in similar levels to wild-type males, expression levels were measured by RT-qPCR at the pupal stage.

Method

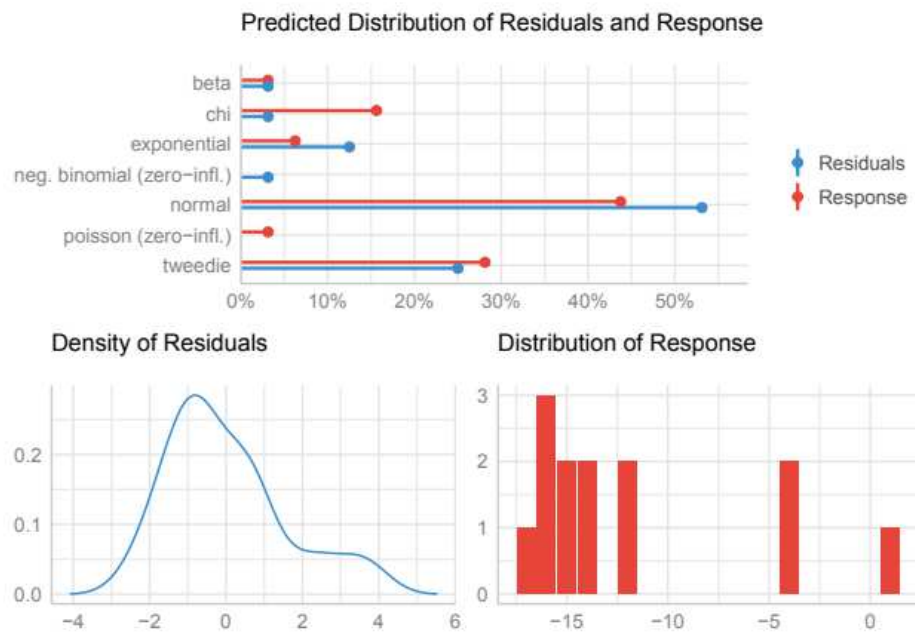
For qPCR, three technical replicates of each biological sample were used. Each line was tested on 3 independent biological samples. To test the effects of the lines on gene expression we used linear model and normal distribution assumptions. The significance between the lines was tested by ANOVA followed by pairwise Tukey test.

Model output

```
## Tukey multiple comparisons of means
## 95% family-wise confidence level
##
## Fit: aov(formula = mod.dCt)
##
## $line
##
```

	diff	lwr	upr	p adj
## WT female-WT male	12.6736647	7.185298	18.162031	0.0003073
## SM9 male-WT male	-1.1926133	-7.328794	4.943567	0.9573246
## 1.2G male-WT male	2.1106772	-4.025503	8.246858	0.7580825
## 3.1G male-WT male	0.6872514	-4.801115	6.175618	0.9912738
## SM9 male-WT female	-13.8662780	-20.002459	-7.730097	0.0003583
## 1.2G male-WT female	-10.5629875	-16.699168	-4.426807	0.0022847
## 3.1G male-WT female	-11.9864133	-17.474780	-6.498047	0.0004555
## 1.2G male-SM9 male	3.3032905	-3.418558	10.025140	0.4846920
## 3.1G male-SM9 male	1.8798647	-4.256316	8.016045	0.8221682
## 3.1G male-1.2G male	-1.4234258	-7.559606	4.712755	0.9230466

```
## [1] 7440.647
```

Flight ability

Goal

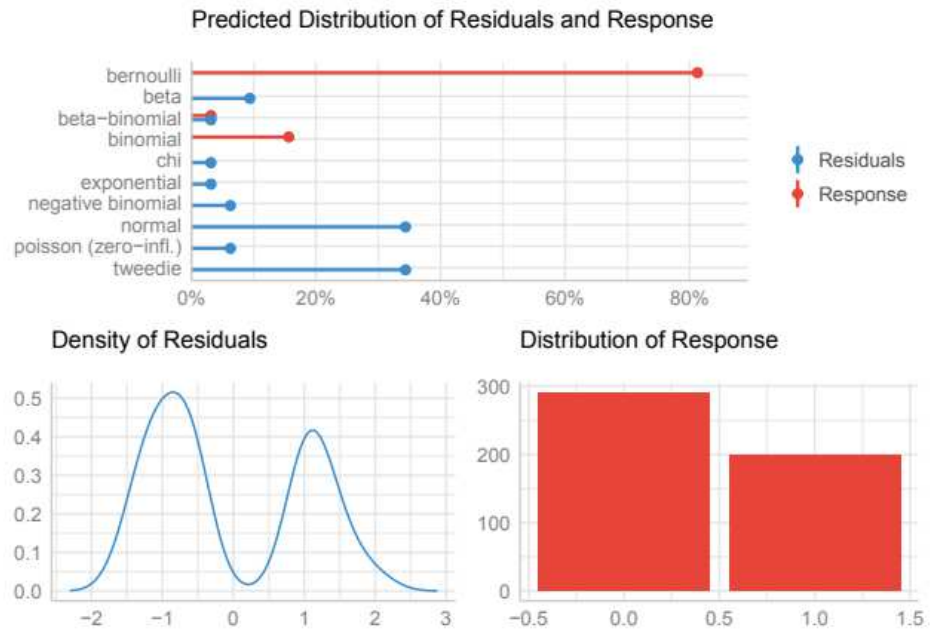
Since we observed that genes potentially involved in flight were regulated similarly in *Nix*-expressing pseudo-males comparing to wild-type counterparts, we compared SM9 males' flight ability to WT males by performing a flight test.

Method

The effect of the lines on flight ability was tested using linear generalized mixed-effect model and binomial distribution assumptions. The replicate was set as random effect for flight tests as experiments was performed on different days.

Model output

```
## Generalized linear mixed model fit by maximum likelihood (Laplace
## Approximation) [glmerMod]
## Family: binomial ( logit )
## Formula: escape.rate ~ line + (1 | replicate)
## Data: flight
##
##      AIC      BIC    logLik deviance df.resid
##    599.5    612.0   -296.7    593.5     486
##
## Scaled residuals:
##      Min       1Q   Median       3Q      Max
## -1.3666 -0.7490 -0.3862  0.9328  2.5890
##
## Random effects:
## Groups Name Variance Std.Dev.
## replicate (Intercept) 0.625  0.7906
## Number of obs: 489, groups: replicate, 3
##
## Fixed effects:
##              Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
## (Intercept)  -0.8617    0.4796  -1.797 0.072351 .
## lineSM9       0.7171    0.1996   3.593 0.000327 ***
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
##
## Correlation of Fixed Effects:
##              (Intr)
## lineSM9 -0.217
```



Hatching rate

Goal

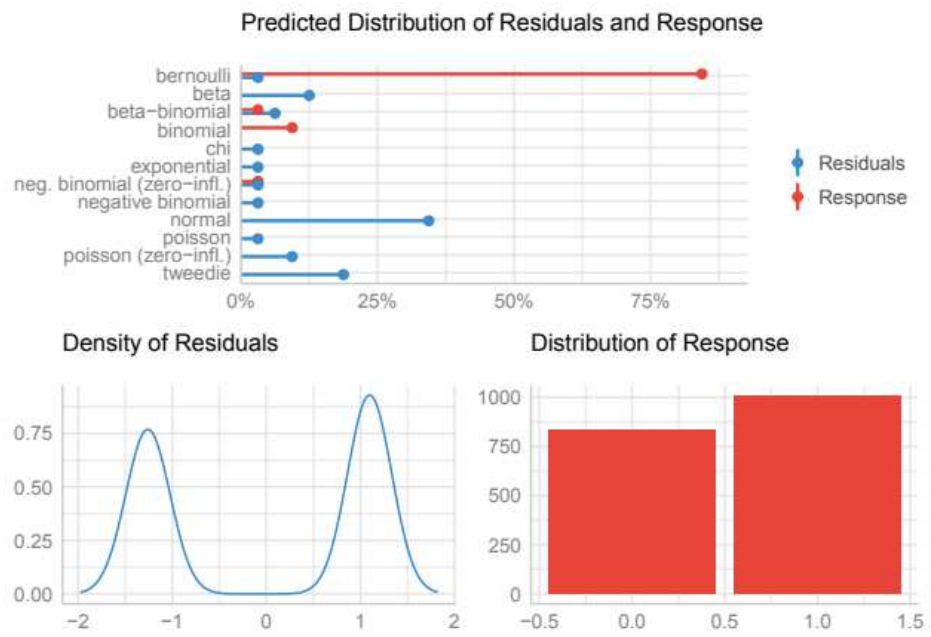
We compared the hatching rate of eggs produced by the trasngenic SM9 line and the control wild-type line.

Method

The effect of the lines on hatching rates was tested using linear generalized mixed-effect model and binomial distribution assumptions.

Model output

```
##
## Call:
## glm(formula = "hatched ~ line", family = binomial(link = logit),
##      data = hatch)
##
## Deviance Residuals:
##      Min       1Q   Median       3Q      Max
## -1.271  -1.271   1.086   1.086   1.118
##
## Coefficients:
##              Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
## (Intercept)  0.21806     0.05930   3.677 0.000236 ***
## lineSM9      -0.07723     0.09635  -0.802 0.422842
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
##
## (Dispersion parameter for binomial family taken to be 1)
##
##      Null deviance: 2545.5  on 1847  degrees of freedom
## Residual deviance: 2544.8  on 1846  degrees of freedom
## AIC: 2548.8
##
## Number of Fisher Scoring iterations: 3
## # A tibble: 2 x 3
##   line estimate      SE
##   <chr>    <dbl>  <dbl>
## 1 BiA      0.554 0.0147
## 2 SM9      0.535 0.0189
##
## Warning: Removed 9 rows containing missing values (geom_segment).
## Warning: Removed 9 rows containing missing values (geom_point).
```



Fertility

Goal

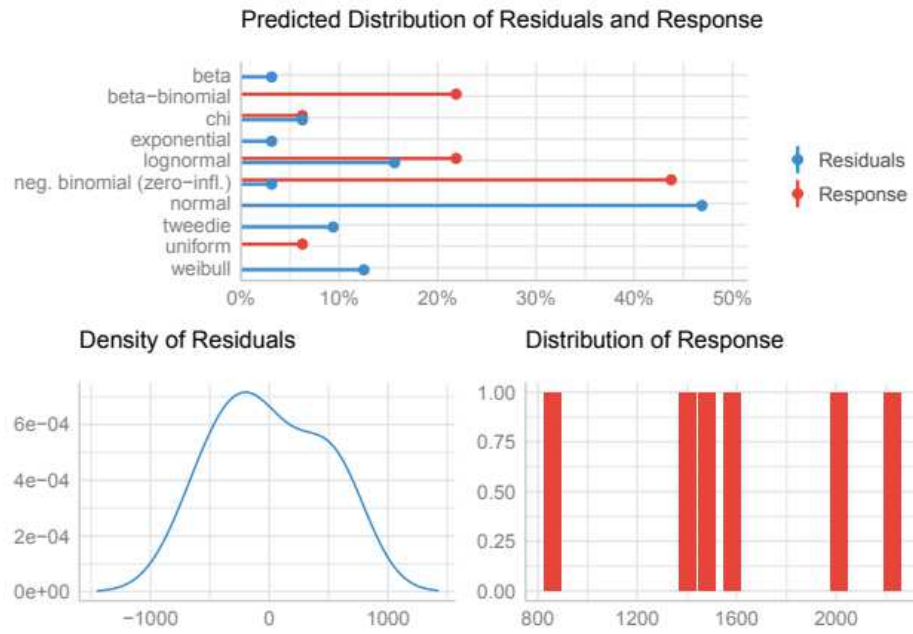
We compared the fertility (total number of progeny obtained from a given number of females) of the SM9 line and the wild-type line.

Method

The effect of lines on fertility was tested using linear model and normal distribution assumptions.

Model output

```
##
## Call:
## lm(formula = "fertility ~ Line", data = fertil)
##
## Residuals:
##      1      2      3      4      5      6
##  489 -335 -154  563   29 -592
##
## Coefficients:
##              Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
## (Intercept)   1450.0      294.9   4.918  0.00794 **
## LineWT         285.0      417.0   0.683  0.53186
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
##
## Residual standard error: 510.7 on 4 degrees of freedom
## Multiple R-squared:  0.1046, Adjusted R-squared:  -0.1193
## F-statistic: 0.4671 on 1 and 4 DF, p-value: 0.5319
```



Relative competitiveness of SM9 compared to WT

Goal

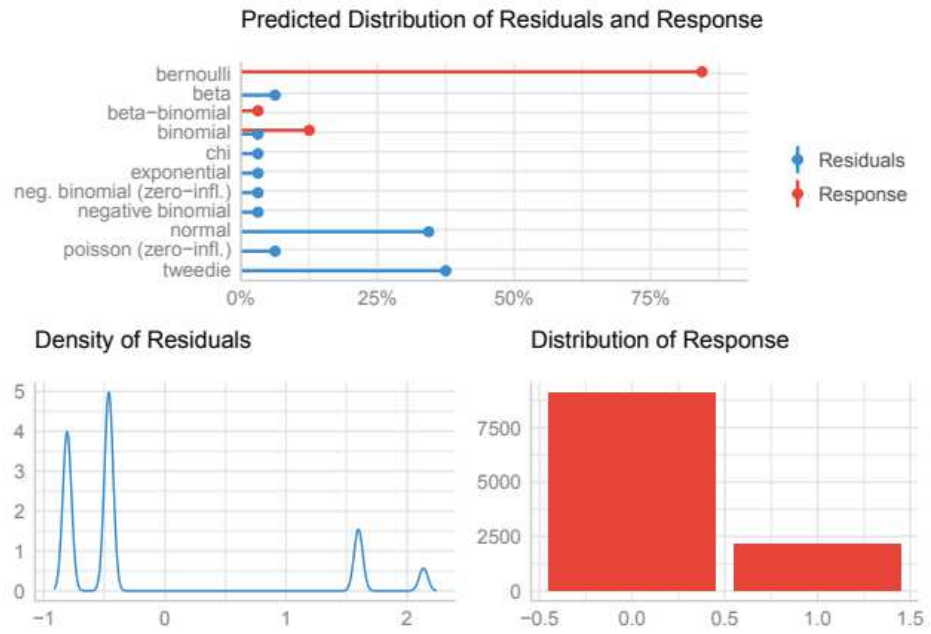
We measured relative competitiveness between SM9 males and wild-type males by mixing equal numbers of transgenic and wild-type males with wild-type females. The percentage of transgenic progeny was used as an indicator for relative competitiveness.

Method

The effect of the lines on competitiveness was tested using linear generalised model and binomial distribution assumptions. For this test, we compared the number of SM9 male progeny measured in the offspring of each competitiveness replicate, to the expected number of progeny that would have been obtained if both lines were as competitive.

Model output

```
##
## Call:
## glm(formula = "result ~ line", family = binomial(link = logit),
##      data = compet.Bernou)
##
## Deviance Residuals:
##      Min       1Q   Median       3Q      Max
## -0.8086  -0.8086  -0.4644  -0.4644   2.1357
##
## Coefficients:
##              Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
## (Intercept) -0.95011    0.02972  -31.97  <2e-16 ***
## lineobs     -1.22271    0.05307  -23.04  <2e-16 ***
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
##
## (Dispersion parameter for binomial family taken to be 1)
##
##      Null deviance: 10971  on 11264  degrees of freedom
## Residual deviance: 10383  on 11263  degrees of freedom
## AIC: 10387
##
## Number of Fisher Scoring iterations: 4
##
## # A tibble: 2 x 3
##   line estimate      SE
##   <fct>    <dbl>    <dbl>
## 1 1 th      0.279 0.00598
## 2 obs      0.102 0.00404
```

Relative competitiveness of 1.2G compared to WT

Goal

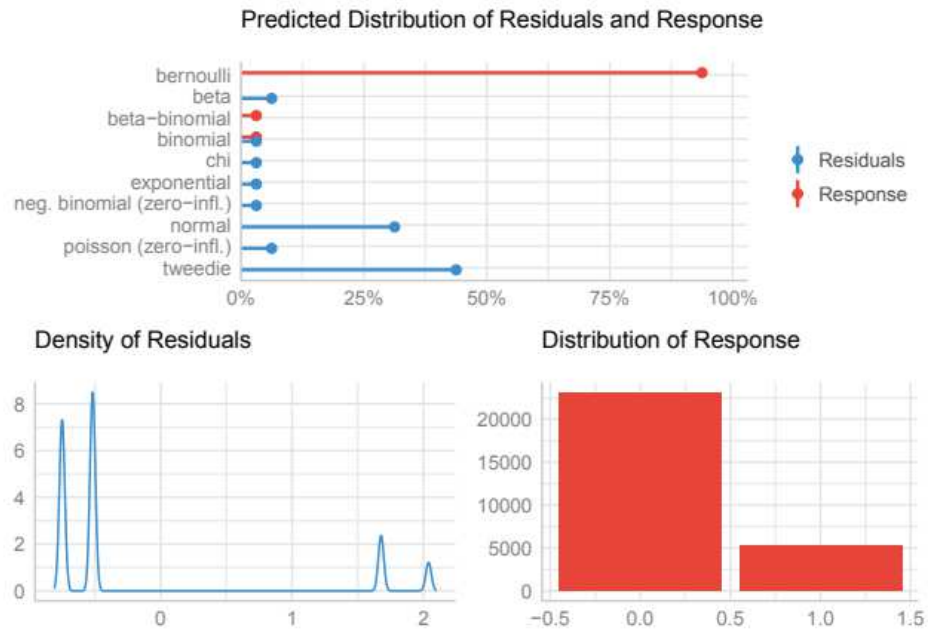
We measured relative competitiveness between 1.2G males and wild-type males by mixing equal numbers of transgenic and wild-type males with wild-type females. The percentage of transgenic progeny was used as an indicator for relative competitiveness.

Method

The effect of the lines on competitiveness was tested using linear generalised model and binomial distribution assumptions. For this test, we compared the number of 1.2G male progeny measured in the offspring of each competitiveness replicate, to the expected number of progeny that would have been obtained if both lines were as competitive.

Model output

```
##
## Call:
## glm(formula = "result ~ line", family = binomial(link = logit),
##      data = compet1.2g.Bernou)
##
## Deviance Residuals:
##      Min       1Q   Median       3Q      Max
## -0.7497  -0.7497  -0.5171  -0.5171   2.0388
##
## Coefficients:
##              Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
## (Intercept) -1.12547    0.01951  -57.67  <2e-16 ***
## lineobs      -0.81916    0.03200  -25.60  <2e-16 ***
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
##
## (Dispersion parameter for binomial family taken to be 1)
##
##      Null deviance: 27202  on 28395  degrees of freedom
## Residual deviance: 26516  on 28394  degrees of freedom
## AIC: 26520
##
## Number of Fisher Scoring iterations: 4
##
## # A tibble: 2 x 3
##   line estimate      SE
##   <fct>    <dbl>    <dbl>
## 1 1 th      0.245 0.00361
## 2 obs      0.125 0.00278
```



Relative competitiveness of 3.1G compared to WT

Goal

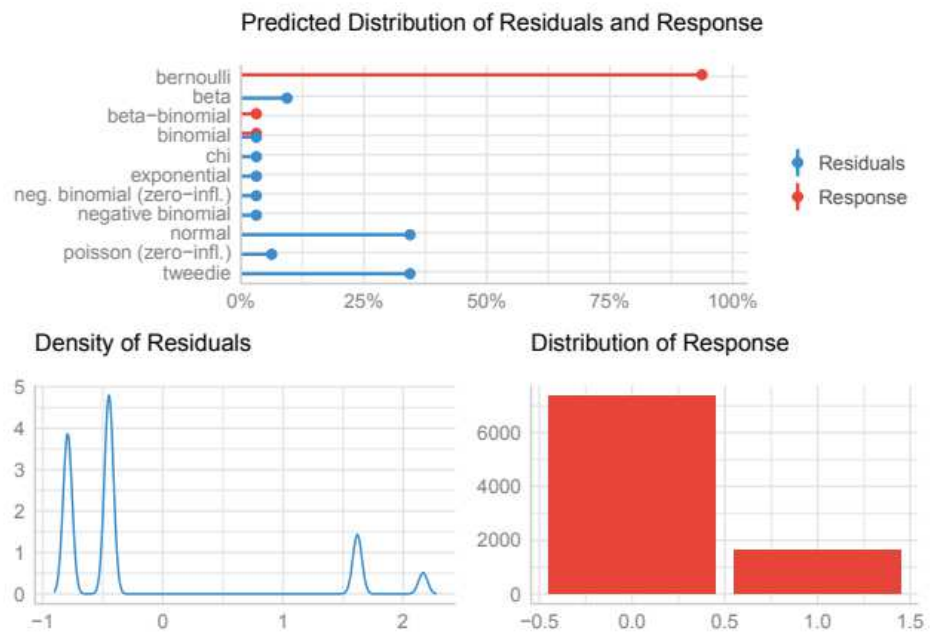
We measured relative competitiveness between 3.1G males and wild-type males by mixing equal numbers of transgenic and wild-type males with wild-type females. The percentage of transgenic progeny was used as an indicator for relative competitiveness.

Method

The effect of the lines on competitiveness was tested using linear generalised model and binomial distribution assumptions. For this test, we compared the number of 3.1G male progeny measured in the offspring of each competitiveness replicate, to the expected number of progeny that would have been obtained if both lines were as competitive.

Model output

```
##
## Call:
## glm(formula = "result ~ line", family = binomial(link = logit),
##      data = compet3.1g.Bernou)
##
## Deviance Residuals:
##      Min       1Q   Median       3Q      Max
## -0.793  -0.793  -0.449  -0.449   2.166
##
## Coefficients:
##              Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
## (Intercept) -0.99568    0.03350  -29.72  <2e-16 ***
## lineobs      -1.24831    0.06058  -20.61  <2e-16 ***
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
##
## (Dispersion parameter for binomial family taken to be 1)
##
##      Null deviance: 8607.2  on 9048  degrees of freedom
## Residual deviance: 8133.4  on 9047  degrees of freedom
## AIC: 8137.4
##
## Number of Fisher Scoring iterations: 4
##
## # A tibble: 2 x 3
##   line estimate      SE
##   <fct>    <dbl>    <dbl>
## 1 th      0.270  0.00660
## 2 obs     0.0959 0.00438
```



Annexe 4 : Informations supplémentaires au Chapitre 3

Supplementary Information

Combining two Genetic Sexing Strains allows sorting of non-transgenic males for *Aedes* genetic control

Célia Lutrat, Myriam Burckbuchler, Roenick Proveti Olmo, Rémy Beugnon, Albin Fontaine, Thierry Baldet, Jérémy Bouyer, Eric Marois

List of Supplementary Tables:

Supplementary Table 1

Supplementary Table 2

Supplementary Table 3

List of Supplementary Data:

Supplementary Data 1

Supplementary Data 2

Supplementary Data 3

Supplementary Table 1: Summary and significance of statistical tests performed. More details can be found in **Supplementary Data 2**.

Sex ratio (%)		
Pairwise comparison	Estimate (SE) *	<i>p</i>-value
Aaeg-M vs. Bra (WT)	-0.06 (0.09)	0.903
Aaeg-m vs. Bra (WT)	-0.01 (0.08)	0.995
Aaeg-CS vs. Bra (WT)	0.05 (0.09)	0.935
Aal-M vs. BiA (WT)	-0.09 (0.11)	0.847
Aal-m vs. BiA (WT)	-0.09 (0.12)	0.858
Aal-CS vs. BiA (WT)	-0.03 (0.11)	0.990
Fecundity (%)		
Pairwise comparison	Estimate (SE) **	<i>p</i>-value
Aaeg-M vs. Bra (WT)	-0.14 (0.06)	0.075
Aaeg-m vs. Bra (WT)	0.11 (0.06)	0.188
Aaeg-CS vs. Bra (WT)	0.74 (0.05)	< 0.001 ***
Aal-M vs. BiA (WT)	0.59 (0.04)	< 0.001 ***
Aal-m vs. BiA (WT)	0.04 (0.05)	0.813
Aal-CS vs. BiA (WT)	-0.06 (0.05)	0.632
Egg hatching rate (%)		
Pairwise comparison	Estimate (SE) *	<i>p</i>-value
Aaeg-M vs. Bra (WT)	-0.17 (0.10)	0.334
Aaeg-m vs. Bra (WT)	0.99 (0.11)	< 0.001 ***
Aaeg-CS vs. Bra (WT)	0.83 (0.10)	< 0.001 ***
Aal-M vs. BiA (WT)	0.15 (0.04)	0.002 **
Aal-m vs. BiA (WT)	-0.03 (0.06)	0.9646
Aal-CS vs. BiA (WT)	0.10 (0.04)	0.046 *
Larva to adult survival (%)		
Pairwise comparison	Estimate (SE)	<i>p</i>-value
Aaeg-M vs. Bra (WT)	-4.87 (3.83)	0.592

Aaeg-m vs. Bra (WT)	1.00 (4.22)	0.996
Aaeg-CS vs. Bra (WT)	3.75 (4.22)	0.831
Aal-M vs. BiA (WT)	18.13 (4.00)	0.003 **
Aal-m vs. BiA (WT)	16.63 (4.00)	0.006 **
Aal-CS vs. BiA (WT)	5.62 (4.00)	0.520
Male competitiveness (%)		
Difference from expected	Estimate (SE) *	<i>p</i>-value
Aaeg-M vs. Bra (WT)	0.04 (0.04)	0.318
Aaeg-M vs. Aaeg-CS	0.08 (0.04)	0.057
Aal-M vs. BiA (WT)	-0.42 (0.07)	< 0.001
Aal-CS vs. BiA (WT)	0.05 (0.05)	0.34
Flight test (%)		
Pairwise comparison	Estimate (SE) *	<i>p</i>-value
Aaeg-M vs. Bra (WT)	-0.22 (0.19)	0.461
Aaeg-CS vs. Bra (WT)	-0.05 (0.19)	0.966
Aal-M vs. BiA (WT)	-0.36 (0.18)	0.103
Aal-CS vs. BiA (WT)	0.35 (0.19)	0.148
Male survival		
Pairwise comparison	Estimate (SE)	<i>p</i>-value
(7 days)		
Aaeg-M vs. Bra (WT)	0.00 (0.01)	0.875
Aaeg-CS vs. Bra (WT)	0.01 (0.01)	0.226
Aal-M vs. BiA (WT)	0.00 (0.01)	1.000
Aal-CS vs. BiA (WT)	-0.01 (0.01)	0.802
Pairwise comparison	Estimate (SE)	<i>p</i>-value
(14 days)		
Aaeg-M vs. Bra (WT)	0.00 (0.01)	0.997
Aaeg-CS vs. Bra (WT)	0.01 (0.01)	0.831

Annexes		
Aal-M vs. BiA (WT)	0.00 (0.01)	1.000
Aal-CS vs. BiA (WT)	0.00 (0.01)	0.996

* estimated difference in logit of individuals

Supplementary Table 2: Sequences of markers marking out and within the 63Mbp with high male-female genetic differentiation in *Ae. Aegypti*.

137972_left _side_Xspe _16334123 8	GGAAAAAGGGTTTAAAAAATAACTGCATCAACCAACTATGCAAA AGCCAAGTAGTACACACAGCTGACGTACAAACACTGCTGGAGACA CTCAGCTTATTTTCCGCTGCAGGGTTATGTCATTGCAGGCAACACA T
220255_Xs pe_166482 560	TCGACCTTGGCTCGGAGTTTCCGTCGCGTTTGACCCAAAACCGGCG TACATAGGAAAGCATCCGAACCAAGGTGGTCAGATTCGTTGTAAC CGGCGATACGGTCCATTTTCGGCAATCGCCGAAACCGGTGTTTTGG
31870_righ t_side_Xsp e_1746261 99	CAGCCAATCCGAAAAGCAAACACAAAGCCTGCCCCGAGTTCGTCTG CTTTCCCGATGGGGTGCAATAGAGCAAAAGTTTCTCTTTTGTCTAT GCGGTGATATTTTTCGAAACTCGCGATAGAAAGCCTTTCCTGTG

Supplementary Table 3: Cumulative number of fluorescent and negative males and females between generations 3 and 6 in 11 *Ae. albopictus* lines carrying an M-linked transgene. Underlined numbers are observations that may correspond to recombination events or to the presence of additional, less sex-linked transgene insertions. Lines showing such events were thus discarded. The selected M-linked line (Aal-M) is the one named “4.4Y” in the table.

Line	Positive males	Negative males	Positive females	Negative females	Total
SM1	181	0	<u>3</u>	316	500
SM2	53	0	<u>34</u>	25	112
SM3	301	0	0	625	926
SM5	259	<u>11</u>	<u>26</u>	384	680
SM6	22	0	<u>1</u>	17	40
SM7	81	0	<u>30</u>	63	174
SM11	79	0	<u>11</u>	51	141
SM12	647	0	0	623	1270
1.2R	666	0	0	569	1235
4.4Y = Aal-M	905	0	0	813	1718
5.2GR	403	0	0	310	713

Supplementary Data 1: 1647 bp *Ae. albopictus* genomic sequence flanking the Aal-m transposon.

TTAAGCTAGTATTTACATTCTGGTTTCCGATTTAGTTTAATAAGAATCAATCCGCA
AACAGAGATAAGATTTTGTATCCTGGCCCGAGGTAGTGGCTCACAATGGCTCAAC
GCAGACCCAAGCAACACAGAAAACATCTTTGGACCATCAGTATTTCCAAAGATGT
TTTTTAAGTGAATTATAAGCGATTTCAGAAAACATCTTGTGTTAATATCCAGCTCTA
ATTATGCTGATCGAAAACAAACAACATCAAACATGTTATTGTCTATATCACGTAT
GAAATATGTTTATATAACTATCAGTGAATCAAAATTCAACCATCGCGCAACAATA
ATGACAATGTCGCAACCTGTATTTGTTGCGACAAAACAACCCATGCGACATATGT
TTGTCCCAACTTGAAAATAATGGGATTAACATCGTACACCACGAGTTTAGAGATT
TTAAGCCTTGCATTGCGATTTTCGAACGGTTACTTCGAGTCGGTAAACACTGCAA
CTCTGGTGAAGCTCTATCATCAAACAGTTTCGACTTTGGATTAGTAATAATTGATT
ATTCACGAGTTGAAAAGTACGCAACAAATTCAGCTTCCGTTTTGTCTGCAACAAA
AAATTTTCGAGATCATGTCATTATCTGTCACCAGTAGGGATAAAGACTATCCATCA
CATCTTCTTTGTTGCTTGTTTTGTGCTCTTTTGTCTGACAATTCTCTTCACTGATA
ACTATTATATAACAGAAACATCAAGTTGCTAATTCAATCATATGTAAAAGCAAAC
GCGACAGAACAACAGAAAGAAGATAAAGATAAAAAATAAACCAAAATGCAAACA
TTGTACCGTCTACCCCCGATGGTTTGAACGACACCTCATGCAAACCAACGGGGTT
CTTTTTTTAATTTGAACTTTTAGTAACCCTGTGGACATCAACAAACGTACTTTTGG
TAACCTTATTTGTTGTTTTGTTTTGATTCTGCGTTCCGTTTCACCGCGTTCCATGGG
CAGAAATGACGTTTGAACCATTTTTAGTTTGAACGATGTGCAGATTGGCGGGGGTC
AAATTAAAAAGTGTTTCAGATTAGATGCTGTCAAACCAATGGGGGTAGACGGTAT
GCATTGATTTTAACCATTCCTAGGAGGCTCTGGTCGATGGGGGAGAGTGAGTGGT
TCAAGGGACCACGTCCCCCACGTCCGACGAACGTCCCCGCGCTAATTAGGATCAC
CATAACAAATTTGGCCATCATCCTCAAGGCCAAAATGTACAGGCTGCTGATCTA
CCAATGGTCTGTGCAATACTATCCAGAAACACCGCGCAACTTGTATTCCGGCCT
ATGTGAAAGAATCAGCATCCAACAGTCGGTGCTATTCCAATCCAGCGTGAATTC
CGGCACTCAAACCTTCACCTCTCTGCCGTGTGCAGCATAGTTGTCCCATGTTCCAAA
ACAGCAAACCTGAGAAAAACGCGTTTTAAGTTTCAGCATTGTTTCCATCTCTACGG
ACAAGTGTAATAAAAAACAAAAATGAATCCACCATCATAGCGTTAGAATTGGTAT
TTATCATTGAAGTTTGAACAAAAAGTTTCATAAACATACAATTTACTTTGATTACA
CGGTCCGACAAAAAATCAACTTTTGTCTGCCCAGCTCTTAAATT

Supplementary Data 2: Detailed statistical outputs

Supplementary Data 2: Detailed statistical outputs

Contents

Initial settings	1
R version	1
Packages	2
Plot common settings	2
Figure 4	3
Sex ratio	3
Hatching rate	12
Fecundity	23
Larva survival	32
Figure 5	41
Competitiveness	41
Flight test	53
Adult survival	63
Figure 6	80
Data	80
Model	80

Initial settings

R version

```
platform x86_64-w64-mingw32
arch x86_64
os mingw32
system x86_64, mingw32 major 4
minor 1.0
year 2021
svn rev 80317
language R
version.string R version 4.1.0 (2021-05-18) nickname Camp Pontanezen
```

Packages

```
set.seed(2501)

libs <- c(
  'plyr', 'dplyr', 'tidyr', 'stringr',
  'ggeffects', 'lme4', 'multcomp',
  'performance', 'reshape2', 'icenReg',
  'survminer', 'survtools', 'survival',
  'ggplot2', 'ggpubr', 'viridis', 'cowplot'
)

invisible(lapply(libs, library, character.only = T))
```

Versions:

```
plyr_1.8.6, dplyr_1.0.7, tidyr_1.1.3, stringr_1.4.0
ggeffects_1.0.2, lme4_1.1-26, multcomp_1.4-16
performance_0.7.0, reshape2_1.4.4, icenReg_2.0.15
survminer_0.4.9, survtools_0.1, survival_3.2-11
ggplot2_3.3.5, ggpubr_0.4.0, viridis_0.5.1
```

Plot common settings

```
# Panel background color
species.bg = c('Ae. aegypti' = 'white', 'Ae. albopictus' = 'grey')

# Aeg line colors
line.color.aeg = c('Bra (WT)' = "#24ff24", 'Aaeg-M' = "#004949",
  'Aaeg-m' = "#009292", 'Aaeg-CS' = "#006ddb")

# Alb line colors
line.color.alb = c('BiA (WT)' = "#24ff24", 'Aal-M' = "#004949",
  'Aal-m' = "#009292", 'Aal-CS' = "#006ddb")

# Set of colors
pal <- c('1' = "#000000", '2' = "#004949", '3' = "#009292",
  '4' = "#ff6db6", '5' = "#ffb6db", '6' = "#490092",
  '7' = "#006ddb", '8' = "#b66dff", '9' = "#6db6ff",
  '10' = "#b6dbff", '11' = "#920000", '12' = "#924900",
  '13' = "#db6d00", '14' = "#24ff24", '15' = "#ffff6d")
```

Figure 4

Sex ratio

Aegypti

Data

```
# Data measurements
sr.aeg.rep = read.csv('data/Sex-ratio_aeg.csv', header = T, sep = ';')
sr.aeg.rep$sr = sr.aeg.rep$Males / (sr.aeg.rep$Males + sr.aeg.rep$Females) * 100
sr.aeg.rep$Line = factor(sr.aeg.rep$Line,
                        levels = c('Bra (WT)', 'Aaeg-M', 'Aaeg-m', 'Aaeg-CS'))
head(sr.aeg.rep)
```

	Replicate	Line	Males	Females	sr
1	2	Bra (WT)	97	100	49.23858
2	3	Bra (WT)	97	87	52.71739
3	4	Bra (WT)	126	95	57.01357
4	1	Aaeg-M	562	512	52.32775
5	2	Aaeg-M	912	837	52.14408
6	3	Aaeg-M	592	580	50.51195

```
# Build binomial dataset
males.aeg =
  rbind(
    data.frame(replicate = sr.aeg.rep[1,1],
               treatment = sr.aeg.rep[1,2],
               result = rep(1, sr.aeg.rep[1,3])),
    data.frame(replicate = sr.aeg.rep[1,1],
               treatment = sr.aeg.rep[1,2],
               result = rep(0, sr.aeg.rep[1,4]))))

for(i in 2:nrow(sr.aeg.rep)){
  males.aeg =
    rbind(
      males.aeg,
      data.frame(replicate = sr.aeg.rep[i,1],
                 treatment = sr.aeg.rep[i,2],
                 result = rep(1, sr.aeg.rep[i,3])),
      data.frame(replicate = sr.aeg.rep[i,1],
                 treatment = sr.aeg.rep[i,2],
                 result = rep(0, sr.aeg.rep[i,4]))
    )
}
males.aeg$treatment = factor(x = males.aeg$treatment,
                           levels = c('Bra (WT)', 'Aaeg-M', 'Aaeg-m', 'Aaeg-CS'))
males.aeg$Species = "Ae. aegypti"

summary.sr.aeg = males.aeg %>% group_by(treatment) %>%
  dplyr::summarise(value = n(),
                  N = max(replicate)) %>% data.frame() %>%
```

```
mutate(pos = c(1, 2, 3,4))
head(males.aeg)
```

	replicate	treatment	result	Species
1	2	Bra (WT)	1	Ae. aegypti
2	2	Bra (WT)	1	Ae. aegypti
3	2	Bra (WT)	1	Ae. aegypti
4	2	Bra (WT)	1	Ae. aegypti
5	2	Bra (WT)	1	Ae. aegypti
6	2	Bra (WT)	1	Ae. aegypti

Model

```
# Generalized linear model with Bernoulli distribution
sr.aeg = glm(formula = 'result ~ treatment',
             family = binomial,
             data = males.aeg)
summary(sr.aeg)
```

Call:

```
glm(formula = "result ~ treatment", family = binomial, data = males.aeg)
```

Deviance Residuals:

	Min	1Q	Median	3Q	Max
	-1.253	-1.228	1.103	1.128	1.148

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
(Intercept)	0.126414	0.081677	1.548	0.122
treatmentAaeg-M	-0.057801	0.087599	-0.660	0.509
treatmentAaeg-m	-0.009136	0.085106	-0.107	0.915
treatmentAaeg-CS	0.050668	0.087750	0.577	0.564

(Dispersion parameter for binomial family taken to be 1)

Null deviance: 21476 on 15531 degrees of freedom
 Residual deviance: 21470 on 15528 degrees of freedom
 AIC: 21478

Number of Fisher Scoring iterations: 3

```
# Pairwise comparison
pairwise.aeg = glht(sr.aeg, mcp(treatment="Tukey"))
summary(pairwise.aeg)
```

Simultaneous Tests for General Linear Hypotheses

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts


```
Fit: glm(formula = "result ~ treatment", family = binomial, data = males.aeg)
```

Linear Hypotheses:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
Aaeg-M ~ Bra (WT) == 0	-0.057801	0.087599	-0.660	0.9063
Aaeg-m ~ Bra (WT) == 0	-0.009136	0.085106	-0.107	0.9995
Aaeg-CS ~ Bra (WT) == 0	0.050668	0.087750	0.577	0.9347
Aaeg-m ~ Aaeg-M == 0	0.048666	0.039679	1.226	0.5924
Aaeg-CS ~ Aaeg-M == 0	0.108469	0.045071	2.407	0.0689
Aaeg-CS ~ Aaeg-m == 0	0.059804	0.040012	1.495	0.4216

 Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
 (Adjusted p values reported -- single-step method)

Replication

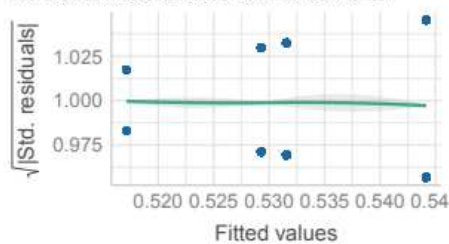
Line	N	n
1	Bra (WT)	4 602
2	Aaeg-M	3 3995
3	Aaeg-m	3 7017
4	Aaeg-CS	3 3918

Model fit quality

```
check_model(sr.aeg)
```

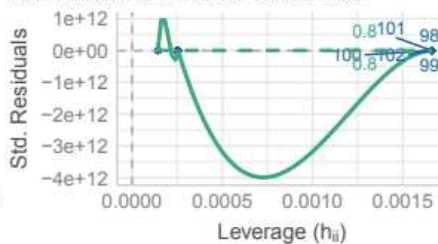
Homogeneity of Variance

Reference line should be flat and horizontal



Influential Observations

Points should be inside the contour lines



Plot

```

# Extration of the results
pred.sr.aeg = ggpredict(model = sr.aeg, terms = c("treatment")) %>% data.frame()
pred.sr.aeg$Species = "Ae. aegypti"

# plot
sr.plot.aeg =
  ggplot(data = NULL) +
    geom_point(data = sr.aeg.rep,
              aes(x= jitter(as.numeric(factor(Line))), factor = .5),
                y = sr , color = Line), alpha = .6, size = 2) +
    geom_point(data = pred.sr.aeg,
              aes(x = as.numeric(x),
                y = predicted * 100), color = 'black',
                size = 1.5) +
    geom_errorbar(data = pred.sr.aeg,
                 aes(x = as.numeric(x),
                   ymin = conf.low* 100,
                   ymax = conf.high* 100),
                 color = 'black',
                 width = 0.05) +

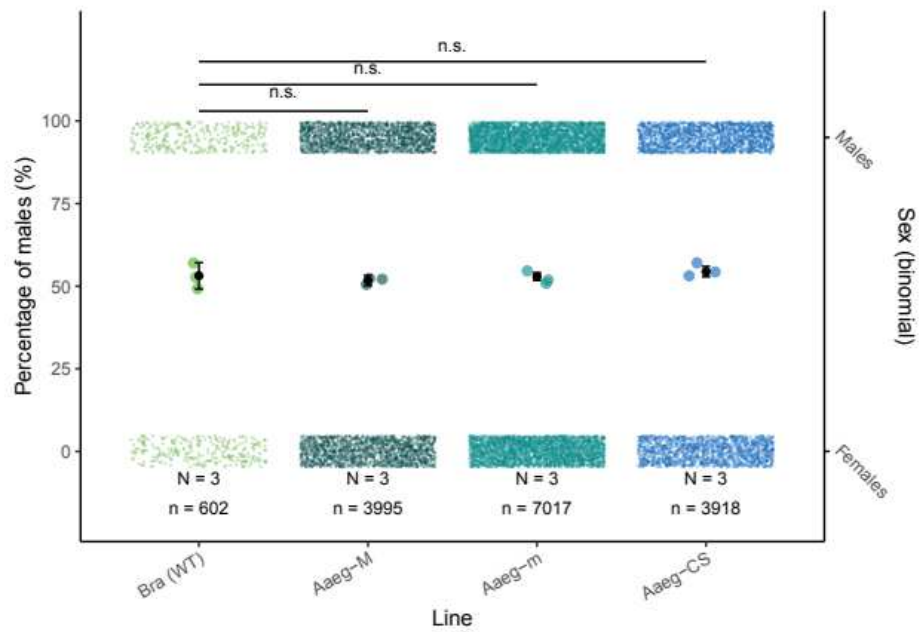
    geom_point(data = males.aeg,
              aes(x = jitter(as.numeric(factor(treatment))), factor = 2),
                y = jitter((result * 95), factor = .25), color = treatment),
              alpha = .25,
              size = .01
    ) +
    annotate(geom = 'text', x= summary.sr.aeg$pos, y=-8,
            label = 'N = 3',
            size = 3) +
    annotate(geom = 'text', x= summary.sr.aeg$pos, y=-17,
            label = paste0('n = ', summary.sr.aeg$value),
            size = 3) +
    annotate(geom = 'line', x= 1:4, y=118) +
    annotate(geom = 'text', x= 2.5, y=123,
            label = 'n.s.',
            size = 3) +
    annotate(geom = 'line', x= 1:3, y=111) +
    annotate(geom = 'text', x= 2, y=116,
            label = 'n.s.',
            size = 3) +
    annotate(geom = 'line', x= 1:2, y=103) +
    annotate(geom = 'text', x= 1.5, y=109,
            label = 'n.s.',
            size = 3) +
    scale_x_continuous(breaks = 1:4,
                      labels = c("Bra (WT)",
                                "Aaeg-M",
                                "Aaeg-m",
                                "Aaeg-CS"),
                      limits = c(.5,4.5), guide = guide_axis(angle = 30)) +

```

```

scale_y_continuous(sec.axis = sec_axis(., breaks = c(0,95),
                                         labels = c('Females', 'Males'),
                                         name = 'Sex (binomial)'),
                  limits = c(-20,126),
                  breaks = c(0,25,50,75,100)) +
scale_color_manual(values = line.color.aeg, labels = names(line.color.aeg)) +
labs(x = 'Line',
     y = 'Percentage of males (%)') +
theme_classic() +
theme(panel.background =
      element_rect(fill = species.bg[names(species.bg)=="Ae. aegypti"]),
      legend.position = 'none',
      axis.title.y.right = element_text(color = 'black'),
      axis.text.y.right = element_text(angle = -45,
                                       hjust = 0, vjust = 0),
      axis.ticks.y.right = element_line(color = 'black'),
      axis.line.y.right = element_line(color = 'black'))
sr.plot.aeg

```



Albopictus

Data

```
# Data measurements
sr.alb.rep = read.table("data/Sex-ratio_albo.csv", header=T, sep=";")
sr.alb.rep$sr = sr.alb.rep$Males / (sr.alb.rep$Males + sr.alb.rep$Females) * 100
sr.alb.rep$Line = factor(sr.alb.rep$Line,
                        levels = c('BiA (WT)', 'Aal-M', 'Aal-m', 'Aal-CS'))
head(sr.alb.rep)
```

	Replicate	Line	Males	Females	sr
1	A	Aal-m	167	166	50.15015
2	B	Aal-m	245	246	49.89817
3	C	Aal-m	293	274	51.67549
4	D	Aal-CS	136	119	53.33333
5	E	Aal-CS	533	493	51.94932
6	F	Aal-CS	510	471	51.98777

```
# Build binomial dataset
males.albo =
  rbind(
    data.frame(replicate = sr.alb.rep[1,1],
              treatment = sr.alb.rep[1,2],
              result = rep(1, sr.alb.rep[1,3])),
    data.frame(replicate = sr.alb.rep[1,1],
              treatment = sr.alb.rep[1,2],
              result = rep(0, sr.alb.rep[1,4]))
  )

for(i in 2:nrow(sr.alb.rep)){
  males.albo =
    rbind(
      males.albo,
      data.frame(replicate = sr.alb.rep[i,1],
                treatment = sr.alb.rep[i,2],
                result = rep(1, sr.alb.rep[i,3])),
      data.frame(replicate = sr.alb.rep[i,1],
                treatment = sr.alb.rep[i,2],
                result = rep(0, sr.alb.rep[i,4]))
    )
}
males.albo$treatment = factor(males.albo$treatment,
                             levels = c('BiA (WT)', 'Aal-M', 'Aal-m', 'Aal-CS'))
males.albo$Species = "Ae. albopictus"

summary.sr.alb = males.albo %>% group_by(treatment) %>%
  dplyr::summarise(value = n()) %>% data.frame() %>%
  mutate(pos = c(1, 2, 3, 4))

head(males.albo)
```

	replicate	treatment	result	Species
1	A	Aal-m	1	Ae. albopictus
2	A	Aal-m	1	Ae. albopictus
3	A	Aal-m	1	Ae. albopictus
4	A	Aal-m	1	Ae. albopictus

```

5      A      Aal-m      1 Ae. albopictus
6      A      Aal-m      1 Ae. albopictus

```

Model

```

# Generalized linear model with Bernoulli distribution
sr.albo = glm(formula = 'result ~ treatment',
              family = binomial,
              data = males.albo)
summary(sr.albo)

```

Call:

```
glm(formula = "result ~ treatment", family = binomial, data = males.albo)
```

Deviance Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-1.228	-1.189	1.128	1.166	1.166

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
(Intercept)	0.11842	0.10388	1.140	0.254
treatmentAal-M	-0.09122	0.11350	-0.804	0.422
treatmentAal-m	-0.09110	0.11690	-0.779	0.436
treatmentAal-CS	-0.03349	0.11208	-0.299	0.765

(Dispersion parameter for binomial family taken to be 1)

Null deviance: 8226.0 on 5936 degrees of freedom
 Residual deviance: 8224.4 on 5933 degrees of freedom
 AIC: 8232.4

Number of Fisher Scoring iterations: 3

```

# Pairwise comparison
pairewise.albo = glht(sr.albo, mcp(treatment="Tukey"))
summary(pairewise.albo)

```

Simultaneous Tests for General Linear Hypotheses

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

Fit: glm(formula = "result ~ treatment", family = binomial, data = males.albo)

Linear Hypotheses:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
Aal-M - BiA (WT) == 0	-0.0912194	0.1135026	-0.804	0.847
Aal-m - BiA (WT) == 0	-0.0910976	0.1169041	-0.779	0.858
Aal-CS - BiA (WT) == 0	-0.0334861	0.1120801	-0.299	0.990
Aal-m - Aal-M == 0	0.0001218	0.0704883	0.002	1.000
Aal-CS - Aal-M == 0	0.0577333	0.0621609	0.929	0.781

```
Aal-CS - Aal-m == 0      0.0576115 0.0681741 0.845 0.826
(Adjusted p values reported -- single-step method)
```

Replication

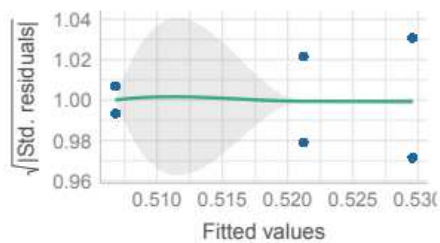
```
# A tibble: 4 x 3
  Line      N      n
<fct> <int> <int>
1 BiA (WT)     3   372
2 Aal-M        3  1912
3 Aal-m        3  1391
4 Aal-CS       3  2262
```

Model fit quality

```
check_model(sr.albo)
```

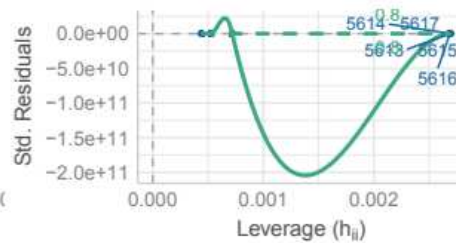
Homogeneity of Variance

Reference line should be flat and horizontal



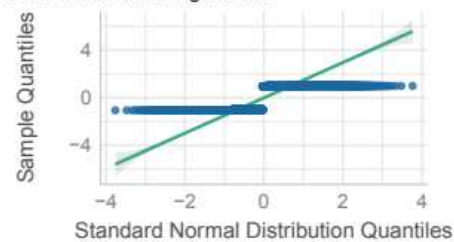
Influential Observations

Points should be inside the contour lines



Normality of Residuals

Dots should fall along the line



Plot

```
# Extration of the results
pred.sr.albo = ggpredict(model = sr.albo, terms = c("treatment")) %>%
  data.frame()
pred.sr.albo$Species = "Ae. albopictus"
```

```

# plot
sr.plot.albo =
  ggplot(data = NULL) +
    geom_point(data = sr.alb.rep,
              aes(x= jitter(as.numeric(factor(Line))), factor = .5),
                y = sr ,
                color = Line),
              alpha = .6,
              size = 2) +
    geom_point(data = pred.sr.albo,
              aes(x = as.numeric(x),
                y = predicted * 100),
              size = 1.5, color = 'black') +
    geom_errorbar(data = pred.sr.albo,
                 aes(x = as.numeric(x),
                   ymin = conf.low* 100,
                   ymax = conf.high* 100),
                 width = 0.05,
                 color = 'black') +
    geom_point(data = males.albo,
              aes(x = jitter(as.numeric(factor(treatment))), factor = 2),
              y = jitter((result * 95), factor = .25),
              color = treatment),
              alpha = .25,
              size = .01
    ) +
    annotate(geom = 'text', x= summary.sr.alb$pos, y=-8,
            label = 'N = 3',
            size = 3) +
    annotate(geom = 'text', x= summary.sr.alb$pos, y=-17,
            label = paste0('n = ', summary.sr.alb$value),
            size = 3) +
    annotate(geom = 'line', x= 1:4, y=118) +
    annotate(geom = 'text', x= 2.5, y=123,
            label = 'n.s.',
            size = 3) +
    annotate(geom = 'line', x= 1:3, y=111) +
    annotate(geom = 'text', x= 2, y=116,
            label = 'n.s.',
            size = 3) +
    annotate(geom = 'line', x= 1:2, y=103) +
    annotate(geom = 'text', x= 1.5, y=109,
            label = 'n.s.',
            size = 3) +
    scale_x_continuous(breaks = 1:4,
                      labels = c("BiA (WT)",
                                "Aal-M",
                                "Aal-m",
                                "Aal-CS"),
                      limits = c(.5,4.5),
                      guide = guide_axis(angle = 30)) +
    scale_y_continuous(sec.axis = sec_axis(-., breaks = c(0,95),
                      labels = c('Females', 'Males')),

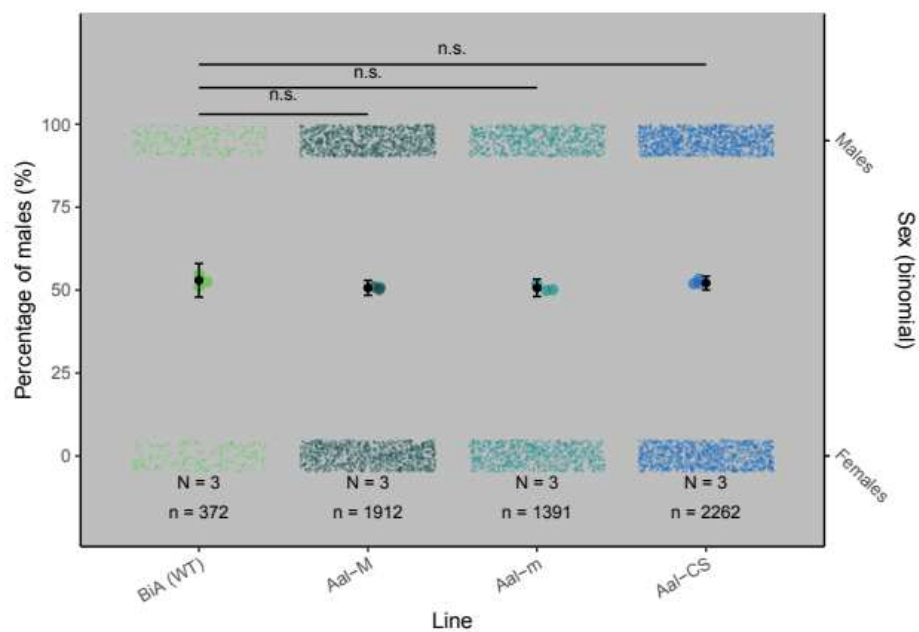
```



```

                                name = 'Sex (binomial)'),
                                limits = c(-20,126),
                                breaks = c(0,25,50,75,100)) +
scale_color_manual(values = line.color.alb, labels = names(line.color.alb)) +
labs(x = 'Line',
     y = 'Percentage of males (%)') +
theme_classic() +
theme(panel.background =
      element_rect(fill = species.bg[names(species.bg)=="Ae. albopictus"]),
      legend.position = 'none',
      axis.title.y.right = element_text(color = 'black'),
      axis.text.y.right = element_text(angle = -45,
                                       hjust = 0, vjust = 0),
      axis.ticks.y.right = element_line(color = 'black'),
      axis.line.y.right = element_line(color = 'black'))
sr.plot.albo

```



Hatching rate

Aegypti

Data


```
# Data measurements
hr.aeg = read.table("data/H-rate_aeg.csv", header = T, sep = ";")
hr.aeg$hr = hr.aeg$Larvae/hr.aeg$Eggs * 100
hr.aeg$Line = factor(hr.aeg$Line, levels = c("Bra (WT)",
                                             "Aaeg-M",
                                             "Aaeg-m",
                                             "Aaeg-CS"))

head(hr.aeg)
```

Replicate	Line	Eggs	Larvae	Unhatched	hr
1	1 Bra (WT)	220	140	80	63.63636
2	2 Bra (WT)	235	141	94	60.00000
3	3 Bra (WT)	272	166	106	61.02941
4	1 Aaeg-M	435	259	176	59.54023
5	2 Aaeg-M	297	157	140	52.86195
6	3 Aaeg-M	291	172	119	59.10653

```
# Build binomial dataset
hatch.aegypti =
  rbind(
    data.frame(replicate = hr.aeg[1,1],
               treatment = hr.aeg[1,2],
               result = rep(0, hr.aeg[1,5])),
    data.frame(replicate = hr.aeg[1,1],
               treatment = hr.aeg[1,2],
               result = rep(1, hr.aeg[1,4])))

for(i in 2:nrow(hr.aeg)){
  hatch.aegypti =
    rbind(
      hatch.aegypti,
      data.frame(replicate = hr.aeg[i,1],
                 treatment = hr.aeg[i,2],
                 result = rep(0, hr.aeg[i,5])),
      data.frame(replicate = hr.aeg[i,1],
                 treatment = hr.aeg[i,2],
                 result = rep(1, hr.aeg[i,4]))
    )
}
hatch.aegypti$treatment=factor(hatch.aegypti$treatment,
                              levels = c("Bra (WT)", "Aaeg-M", "Aaeg-m", "Aaeg-CS"))
hatch.aegypti$Species = 'Ae. aegypti'

summary.hatch.aeg = hatch.aegypti %>% group_by(treatment) %>%
  dplyr::summarise(value = n()) %>% data.frame() %>%
  mutate(pos = c(1, 2, 3, 4))

head(hatch.aegypti)
```

replicate	treatment	result	Species
1	1 Bra (WT)	0	Ae. aegypti
2	1 Bra (WT)	0	Ae. aegypti

```

3      1 Bra (WT)      0 Ae. aegypti
4      1 Bra (WT)      0 Ae. aegypti
5      1 Bra (WT)      0 Ae. aegypti
6      1 Bra (WT)      0 Ae. aegypti

```

Model

```

# Generalized linear model with Bernoulli distribution
hatch.aegypti_stat = glm(formula = 'result ~ treatment',
                          family = binomial,
                          data = hatch.aegypti)
summary(hatch.aegypti_stat)

```

Call:

```
glm(formula = "result ~ treatment", family = binomial, data = hatch.aegypti)
```

Deviance Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-1.8245	-1.3078	0.6479	0.6934	1.0524

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
(Intercept)	0.46777	0.07621	6.138	8.38e-10 ***
treatmentAaeg-M	-0.16639	0.09904	-1.680	0.0929 .
treatmentAaeg-m	0.98677	0.10649	9.266	< 2e-16 ***
treatmentAaeg-CS	0.83507	0.10166	8.214	< 2e-16 ***

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for binomial family taken to be 1)

Null deviance: 5089.2 on 4242 degrees of freedom
Residual deviance: 4871.9 on 4239 degrees of freedom
AIC: 4879.9

Number of Fisher Scoring iterations: 4

```

# Pairwise comparison
pairewise.h.aeg = glht(hatch.aegypti_stat,
                       mcp(treatment="Tukey"))

h.aeg<-summary(pairewise.h.aeg)
h.aeg

```

Simultaneous Tests for General Linear Hypotheses

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

Fit: glm(formula = "result ~ treatment", family = binomial, data = hatch.aegypti)

Linear Hypotheses:

```

              Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
Aaeg-M - Bra (WT) == 0 -0.16639   0.09904 -1.680   0.334
Aaeg-m - Bra (WT) == 0  0.98677   0.10649  9.266 <1e-04 ***
Aaeg-CS - Bra (WT) == 0  0.83507   0.10166  8.214 <1e-04 ***
Aaeg-m - Aaeg-M == 0    1.15316   0.09763 11.812 <1e-04 ***
Aaeg-CS - Aaeg-M == 0    1.00145   0.09233 10.846 <1e-04 ***
Aaeg-CS - Aaeg-m == 0   -0.15170   0.10029 -1.513   0.429
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
(Adjusted p values reported -- single-step method)

```

Replication

```

# A tibble: 4 x 3
  Treatment      N      n
  <fct>      <int> <int>
1 Bra (WT)         3    727
2 Aaeg-M           3   1023
3 Aaeg-m           3   1178
4 Aaeg-CS          3   1315

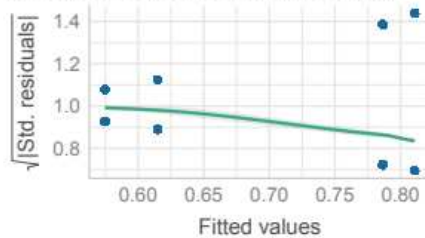
```

Model fit quality

```
check_model(hatch.aegypti_stat)
```

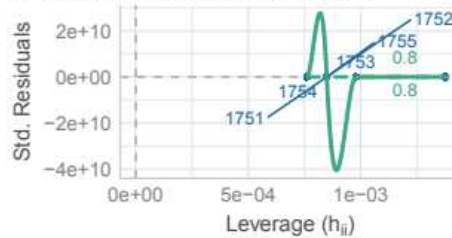
Homogeneity of Variance

Reference line should be flat and horizontal



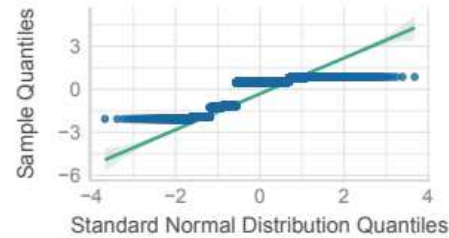
Influential Observations

Points should be inside the contour lines



Normality of Residuals

Dots should fall along the line



Plot

```

# Extraction of the results
pred.aeg = data.frame(ggpredict(model = hatch.aegypti_stat,
                                terms = c("treatment")))
pred.aeg$x = factor(pred.aeg$x, levels = c("Bra (WT)",
                                           "Aaeg-M",
                                           "Aaeg-m",
                                           "Aaeg-CS"))
pred.aeg$Species = 'Ae. aegypti'

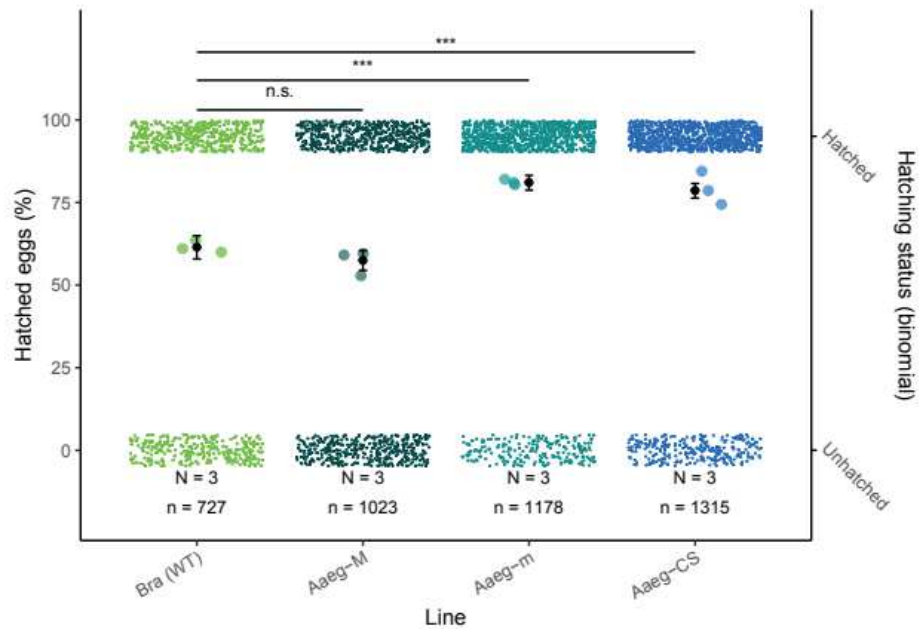
# plot
hr.plot.aeg =
  ggplot(data = NULL) +
  geom_point(data = hr.aeg,
            aes(x = jitter(as.numeric(Line), factor = 1),
                y = hr, color = Line),
            size = 2, alpha = .6) +
  geom_point(data = pred.aeg,
            aes(x = as.numeric(x),
                y = predicted * 100),
            size = 1.5, color = 'black') +
  geom_errorbar(data = pred.aeg,
            aes(x = as.numeric(x),
                ymin = conf.low* 100,
                ymax = conf.high* 100),
            width = 0.05,
            color = 'black') +
  geom_point(data = hatch.aegypti,
            aes(x = jitter(as.numeric(factor(treatment)), factor = 2),
                y = jitter((result * 95), factor = .25),
                color = treatment),
            size = .05
  ) +
  annotate(geom = 'text', x= summary.hatch.aeg$pos, y=-8,
    label = 'N = 3',
    size = 3) +
  annotate(geom = 'text', x= summary.hatch.aeg$pos, y=-17,
    label = paste0('n = ', summary.hatch.aeg$value),
    size = 3) +
  annotate(geom = 'line', x= 1:4, y=120.5) +
  annotate(geom = 'text', x= 2.5, y=123,
    label = '***',
    size = 3) +
  annotate(geom = 'line', x= 1:3, y=112) +
  annotate(geom = 'text', x= 2, y=116,
    label = '***',
    size = 3) +
  annotate(geom = 'line', x= 1:2, y=103) +
  annotate(geom = 'text', x= 1.5, y=109,
    label = 'n.s.',
    size = 3) +
  scale_x_continuous(breaks = 1:4,

```

```

      labels = c("Bra (WT)",
                 "Aaeg-M",
                 "Aaeg-m",
                 "Aaeg-CS"),
      limits = c(.5, 4.5), guide = guide_axis(angle = 30)) +
scale_y_continuous(sec.axis = sec_axis(~., breaks = c(0, 95),
      labels = c('Unhatched', 'Hatched'),
      name = 'Hatching status (binomial)'),
      limits = c(-20, 126),
      breaks = c(0, 25, 50, 75, 100)) +
scale_color_manual(values = line.color.aeg, labels = names(line.color.aeg)) +
labs(x = 'Line',
     y = 'Hatched eggs (%)' +
theme_classic() +
theme(legend.position = 'none',
      axis.title.y.right = element_text(color = 'black'),
      axis.text.y.right = element_text(angle = -45,
      hjust = 0, vjust = 0),
      axis.ticks.y.right = element_line(color = 'black'),
      axis.line.y.right = element_line(color = 'black'))
hr.plot.aeg

```



Albopictus

Data

```

# Data measurements
hr.alb = read.table("data/H-rate_albo.csv", header = T, sep = ";")
hr.alb$hr = hr.alb$Larvae/hr.alb$Eggs * 100
hr.alb$Line = factor(hr.alb$Line, levels = c("BiA (WT)",
                                             "Aal-M",
                                             "Aal-m",
                                             "Aal-CS"))

head(hr.alb)

  Replicate   Line Eggs Larvae Unhatched      hr
1         1 BiA (WT)  965    555      410 57.51295
2         2 BiA (WT)  750    461      289 61.46667
3         3 BiA (WT) 1025    539      486 52.58537
4         4 BiA (WT)  730    326      404 44.65753
5         5 BiA (WT)  756    347      409 45.89947
6         1  Aal-M  927    632      295 68.17691

# Build binomial dataset
hatch.albo =
  rbind(
    data.frame(replicate = hr.alb[1,1],
               treatment = hr.alb[1,2],
               result = rep(0, hr.alb[1,5])),
    data.frame(replicate = hr.alb[1,1],
               treatment = hr.alb[1,2],
               result = rep(1, hr.alb[1,4])))

for(i in 2:nrow(hr.alb)){
  hatch.albo =
    rbind(
      hatch.albo,
      data.frame(replicate = hr.alb[i,1],
                 treatment = hr.alb[i,2],
                 result = rep(0, hr.alb[i,5])),
      data.frame(replicate = hr.alb[i,1],
                 treatment = hr.alb[i,2],
                 result = rep(1, hr.alb[i,4]))
    )
}
hatch.albo$treatment=factor(hatch.albo$treatment,
                            levels = c("BiA (WT)", "Aal-M", "Aal-m", "Aal-CS"))
hatch.albo$Species = 'Ae. albopictus'

summary.hatch.albo = hatch.albo %>%
  group_by(treatment) %>%
  dplyr::summarise(value = n()) %>%
  data.frame() %>%
  mutate(pos = c(1, 2, 3, 4))

```

```
head(hatch.albo)
```

	replicate	treatment	result	Species
1	1	BiA (WT)	0	Ae. albopictus
2	1	BiA (WT)	0	Ae. albopictus
3	1	BiA (WT)	0	Ae. albopictus
4	1	BiA (WT)	0	Ae. albopictus
5	1	BiA (WT)	0	Ae. albopictus
6	1	BiA (WT)	0	Ae. albopictus

Model

```
# Generalized linear model with Bernoulli distribution
hatch.albo_stat = glm(formula = 'result ~ treatment',
                      family = binomial,
                      data = hatch.albo)
summary(hatch.albo_stat)
```

Call:

```
glm(formula = "result ~ treatment", family = binomial, data = hatch.albo)
```

Deviance Residuals:

	Min	1Q	Median	3Q	Max
	-1.289	-1.267	1.070	1.091	1.144

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
(Intercept)	0.10896	0.03081	3.536	0.000406 ***
treatmentAal-M	0.14952	0.04263	3.507	0.000453 ***
treatmentAal-m	-0.02901	0.05747	-0.505	0.613746
treatmentAal-CS	0.09815	0.03801	2.582	0.009816 **

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for binomial family taken to be 1)

Null deviance: 25862 on 18771 degrees of freedom
Residual deviance: 25844 on 18768 degrees of freedom
AIC: 25852

Number of Fisher Scoring iterations: 3

```
# Pairwise comparison
pairewise.h.alb = glht(hatch.albo_stat,
                      mcp(treatment="Tukey"))

h.albo <- summary(pairewise.h.alb)
h.albo
```

Simultaneous Tests for General Linear Hypotheses

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

```
Fit: glm(formula = "result ~ treatment", family = binomial, data = hatch.albo)
```

Linear Hypotheses:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
Aal-M - BiA (WT) == 0	0.14952	0.04263	3.507	0.00238 **
Aal-m - BiA (WT) == 0	-0.02901	0.05747	-0.505	0.95667
Aal-CS - BiA (WT) == 0	0.09815	0.03801	2.582	0.04646 *
Aal-m - Aal-M == 0	-0.17853	0.05676	-3.145	0.00848 **
Aal-CS - Aal-M == 0	-0.05137	0.03693	-1.391	0.49669
Aal-CS - Aal-m == 0	0.12716	0.05338	2.382	0.07787 .

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
(Adjusted p values reported -- single-step method)

Replication

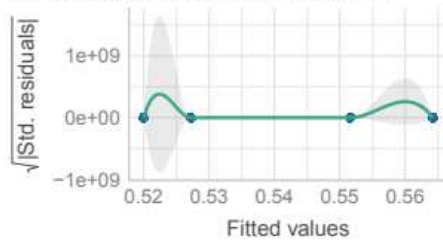
```
# A tibble: 4 x 3
  Treatment      N      n
  <fct>      <int> <int>
1 BiA (WT)      5  4226
2 Aal-M         5  4684
3 Aal-m         5  1702
4 Aal-CS        5  8160
```

Model fit quality

```
check_model(hatch.albo_stat)
```

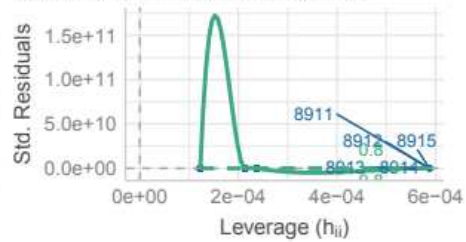

Homogeneity of Variance

Reference line should be flat and horizontal



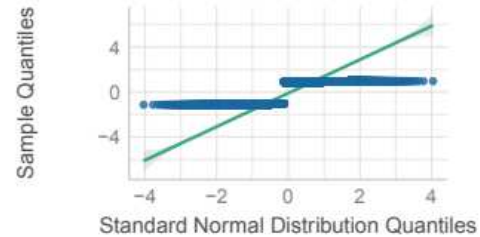
Influential Observations

Points should be inside the contour lines



Normality of Residuals

Dots should fall along the line



Plot

```
# Extration of the results
pred.alb = data.frame(ggpredict(model = hatch.albo_stat,
                                terms = c("treatment")))
pred.alb$x = as.character(pred.alb$x)
pred.alb$x = factor(pred.alb$x, levels = c("BiA (WT)",
                                           "Aal-M",
                                           "Aal-m",
                                           "Aal-CS"))

pred.alb$Species = 'Ae. albopictus'
pred.alb$group = as.factor(2)

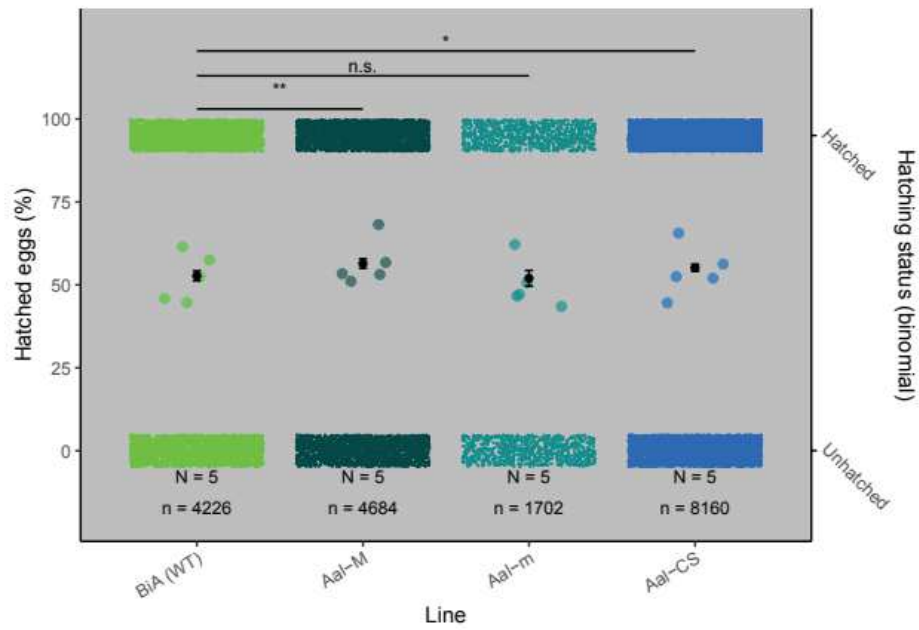
# plot
hr.plot.alb =
  ggplot(data = NULL) +
  geom_point(data = hr.alb,
            aes(x = jitter(as.numeric(Line), factor = 1),
                y = hr, color = Line),
            size = 2, alpha = .6) +
  geom_point(data = pred.alb,
            aes(x = as.numeric(x),
                y = predicted * 100),
            size = 1.5, color = 'black') +
  geom_errorbar(data = pred.alb,
```

```

aes(x = as.numeric(x),
    ymin = conf.low* 100,
    ymax = conf.high* 100),
width = 0.05,
color = 'black') +
geom_point(data = hatch.albo,
    aes(x = jitter(as.numeric(factor(treatment))), factor = 2),
    y = jitter((result * 95), factor = .25),
    color = treatment),
    size = .05
) +
annotate(geom = 'text', x= summary.hatch.albo$pos, y=-8,
    label = 'N = 5',
    size = 3) +
annotate(geom = 'text', x= summary.hatch.albo$pos, y=-17,
    label = paste0('n = ', summary.hatch.albo$value),
    size = 3) +
annotate(geom = 'line', x= 1:4, y=120.5) +
annotate(geom = 'text', x= 2.5, y=123,
    label = '*',
    size = 3) +
annotate(geom = 'line', x= 1:3, y=113) +
annotate(geom = 'text', x= 2, y=116,
    label = 'n.s.',
    size = 3) +
annotate(geom = 'line', x= 1:2, y=103) +
annotate(geom = 'text', x= 1.5, y=109,
    label = '**',
    size = 3) +
scale_x_continuous(breaks = 1:4,
    labels = c("BiA (WT)",
               "Aal-M",
               "Aal-m",
               "Aal-CS"),
    limits = c(.5,4.5), guide = guide_axis(angle = 30)) +
scale_y_continuous(sec.axis = sec_axis(~., breaks = c(0,95),
    labels = c('Unhatched', 'Hatched'),
    name = 'Hatching status (binomial)'),
    limits = c(-20,126),
    breaks = c(0,25,50,75,100)) +
scale_color_manual(values = line.color.alb, labels = names(line.color.alb)) +
labs(x = 'Line',
    y = 'Hatched eggs (%)') +
theme_classic() +
theme(panel.background =
    element_rect(fill =species.bg[names(species.bg)=="Ae. albopictus"]),
    legend.position = 'none',
    axis.title.y.right = element_text(color = 'black'),
    axis.text.y.right = element_text(angle = -45,
    hjust = 0, vjust = 0),
    axis.ticks.y.right = element_line(color = 'black'),
    axis.line.y.right = element_line(color = 'black'))

```

hr.plot.alb



Fecundity

Aegypti

Data

```
fecund_aeg = read.table("data/Fecundity_aeg.csv", header=TRUE, sep=";")
fecund_aeg = fecund_aeg %>% filter(Eggs != "NA")
fecund_aeg$Line = factor(fecund_aeg$Line,
  levels = c('Bra (WT)', 'Aaeg-M', 'Aaeg-m', 'Aaeg-CS'))
fecund_aeg$Species = "Ae. aegypti"
head(fecund_aeg)
```

Line	Well	Eggs	Species
1 Bra (WT)	A1	33	Ae. aegypti
2 Bra (WT)	A2	0	Ae. aegypti
3 Bra (WT)	A3	0	Ae. aegypti
4 Bra (WT)	A4	53	Ae. aegypti

```
5 Bra (WT) A5 96 Ae. aegypti
6 Bra (WT) A6 7 Ae. aegypti
```

```
fecund.summary.aeg = fecund_aeg %>%
  group_by(Line) %>%
  dplyr::summarise(value = n()) %>%
  data.frame() %>%
  mutate(pos = c(1, 2, 3, 4))
```

Model

```
fecund_aeg.glm = glm(formula = 'Eggs ~ Line',
  data = fecund_aeg, family = poisson)
```

```
fec_aeg_sum = summary(fecund_aeg.glm)
fec_aeg_sum
```

Call:

```
glm(formula = "Eggs ~ Line", family = poisson, data = fecund_aeg)
```

Deviance Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-10.531	-6.659	-1.429	3.857	10.410

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
(Intercept)	3.27557	0.03968	82.542	<2e-16 ***
LineAaeg-M	-0.14008	0.05819	-2.407	0.0161 *
LineAaeg-m	0.11389	0.05711	1.994	0.0461 *
LineAaeg-CS	0.73999	0.04893	15.122	<2e-16 ***

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for poisson family taken to be 1)

Null deviance: 3503.5 on 89 degrees of freedom
 Residual deviance: 3103.4 on 86 degrees of freedom
 AIC: 3463.7

Number of Fisher Scoring iterations: 6

```
# Pairwise comparison
pairewise.f.aeg = glht(fecund_aeg.glm,
  mcp(Line = "Tukey"))

f.aeg <- summary(pairewise.f.aeg)
f.aeg
```

Simultaneous Tests for General Linear Hypotheses

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

```
Fit: glm(formula = "Eggs ~ Line", family = poisson, data = fecund_aeg)
```

Linear Hypotheses:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
Aaeg-M ~ Bra (WT) == 0	-0.14008	0.05819	-2.407	0.075 .
Aaeg-m ~ Bra (WT) == 0	0.11389	0.05711	1.994	0.188
Aaeg-CS ~ Bra (WT) == 0	0.73999	0.04893	15.122	<0.001 ***
Aaeg-m ~ Aaeg-M == 0	0.25397	0.05914	4.294	<0.001 ***
Aaeg-CS ~ Aaeg-M == 0	0.88007	0.05130	17.157	<0.001 ***
Aaeg-CS ~ Aaeg-m == 0	0.62610	0.05006	12.507	<0.001 ***

 Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
 (Adjusted p values reported -- single-step method)

```
pred.fecund.aeg =
  ggpredict(fecund_aeg.glm) %>%
  data.frame() %>%
  dplyr::select(
    Line = Line.x,
    mean.pro = Line.predicted,
    sd.pro = Line.std.error,
    conf.inf = Line.conf.low,
    conf.sup = Line.conf.high)
```

```
head(pred.fecund.aeg)
```

	Line	mean.pro	sd.pro	conf.inf	conf.sup
1	Bra (WT)	26.45833	0.03968379	24.47843	28.59838
2	Aaeg-M	23.00000	0.04256283	21.15915	25.00100
3	Aaeg-m	29.65000	0.04106508	27.35710	32.13508
4	Aaeg-CS	55.45455	0.02862992	52.42849	58.65526

Replication

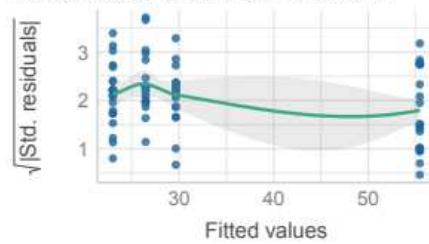
	Line	N
1	Bra (WT)	24
2	Aaeg-M	24
3	Aaeg-m	20
4	Aaeg-CS	22

Model fit quality

```
check_model(fecund_aeg.glm)
```

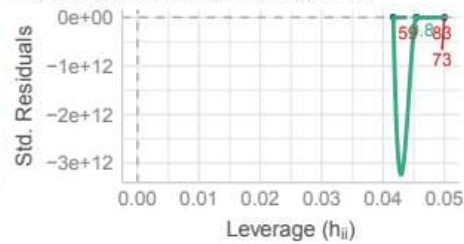
Homogeneity of Variance

Reference line should be flat and horizontal



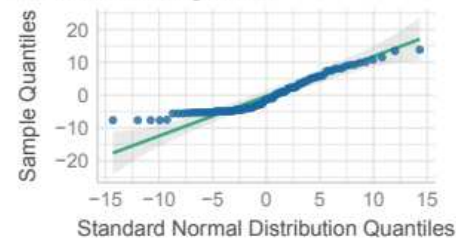
Influential Observations

Points should be inside the contour lines



Normality of Residuals

Dots should fall along the line



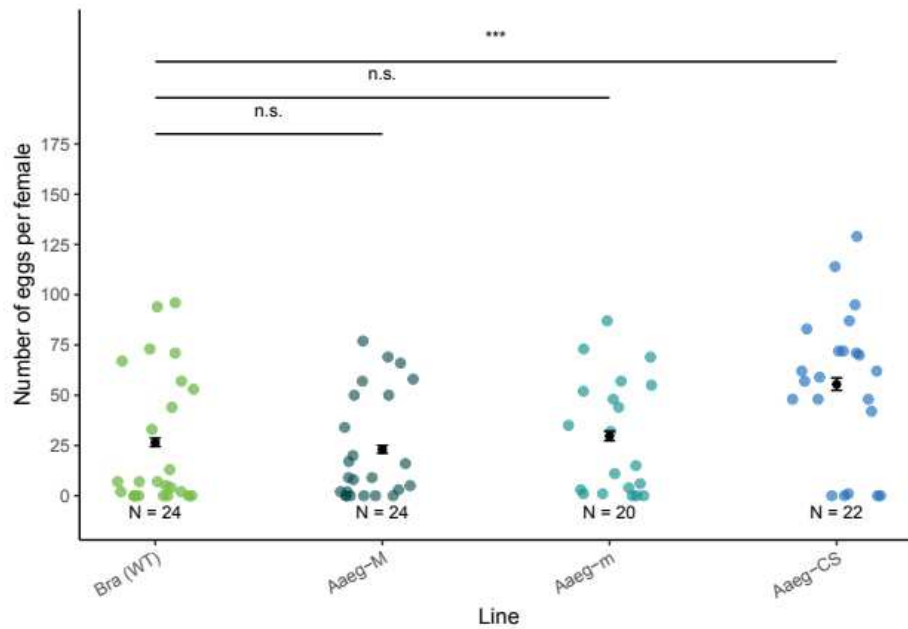
Plot

```
fecund.plot.aeg = ggplot(data=NULL) +
  geom_point(data = fecund.aeg,
    aes(x = jitter(as.numeric(Line)),
      y = Eggs, color = Line),
    size = 2, show.legend = FALSE, alpha = 0.6) +
  geom_point(data = pred.fecund.aeg,
    aes(x = as.numeric(Line),
      y = mean.pro),
    size = 1.5, show.legend = FALSE,
    color = 'black') +
  geom_errorbar(data = pred.fecund.aeg,
    aes(x = as.numeric(Line),
      ymin = conf.inf,
      ymax = conf.sup), width = 0.05,
    color = 'black') +
  annotate(geom = 'text', x= fecund.summary.aeg$pos, y = -8,
    label = paste0('N = ', fecund.summary.aeg$value),
    size = 3) +
  annotate(geom = 'line', x= 1:2, y=180) +
  annotate(geom = 'text', x= 1.5, y=192,
    label = 'n.s.',
    size = 3) +
  annotate(geom = 'line', x= 1:3, y=198) +
```

```

annotate(geom = 'text', x= 2, y=210,
          label = 'n.s.',
          size = 3) +
annotate(geom = 'line', x= 1:4, y=216) +
annotate(geom = 'text', x= 2.5, y=228,
          label = '***',
          size = 3) +
labs(x = 'Line', y = 'Number of eggs per female',
      color = "Line") +
scale_y_continuous(breaks = seq(0,175,25),limits = c(-10,230)) +
scale_color_manual(values = line.color.aeg,
                   labels = names(line.color.aeg)) +
scale_x_continuous(guide = guide_axis(angle = 30), breaks = 1:4,
                   labels = c("Bra (WT)", "Aaeg-M", "Aaeg-m", "Aaeg-CS")) +
theme_classic() +
theme(legend.position = 'none')
fecund.plot.aeg

```



Albopictus

Data


```
fecund_albo = read.table("data/Fecundity_albo.csv", header=TRUE, sep=";")

fecund_albo = fecund_albo %>% filter(Eggs != "NA")

fecund_albo$Line = factor(fecund_albo$Line,
                          levels = c('BiA (WT)', 'Aal-M', 'Aal-m', 'Aal-CS'))

fecund_albo$Species = "Ae. albopictus"

head(fecund_albo)
```

	Line	Well	Eggs	Species
1	BiA (WT)	A1	3	Ae. albopictus
2	BiA (WT)	A2	100	Ae. albopictus
3	BiA (WT)	A3	1	Ae. albopictus
4	BiA (WT)	A4	0	Ae. albopictus
5	BiA (WT)	A5	97	Ae. albopictus
6	BiA (WT)	A6	17	Ae. albopictus

```
fecund.summary.alb = fecund_albo %>%
  group_by(Line) %>%
  dplyr::summarise(value = n()) %>%
  data.frame() %>%
  mutate(pos = c(1, 2, 3, 4))
```

Model

```
fecund_albo.glm = glm(formula = 'Eggs ~ Line',
                      data = fecund_albo,
                      family = 'poisson')

fec_albo_sum = summary(fecund_albo.glm)
fec_albo_sum
```

Call:

```
glm(formula = "Eggs ~ Line", family = "poisson", data = fecund_albo)
```

Deviance Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-11.752	-8.501	-2.258	5.312	12.365

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
(Intercept)	3.64556	0.03369	108.206	<2e-16 ***
LineAal-M	0.58931	0.04356	13.529	<2e-16 ***
LineAal-m	0.04123	0.04668	0.883	0.377
LineAal-CS	-0.05826	0.04892	-1.191	0.234

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for poisson family taken to be 1)


```

Null deviance: 5146.1 on 87 degrees of freedom
Residual deviance: 4856.8 on 84 degrees of freedom
AIC: 5201.8

```

```
Number of Fisher Scoring iterations: 6
```

```

# Pairwise comparison
pairewise.f.albo = glht(fecund_albo.glm,
                        mcp(Line = "Tukey"))

f.albo <- summary(pairewise.f.albo)
f.albo

```

Simultaneous Tests for General Linear Hypotheses

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

```
Fit: glm(formula = "Eggs ~ Line", family = "poisson", data = fecund_albo)
```

Linear Hypotheses:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
Aal-M ~ BiA (WT) == 0	0.58931	0.04356	13.529	<0.001 ***
Aal-m ~ BiA (WT) == 0	0.04123	0.04668	0.883	0.813
Aal-CS ~ BiA (WT) == 0	-0.05826	0.04892	-1.191	0.632
Aal-m ~ Aal-M == 0	-0.54808	0.04250	-12.897	<0.001 ***
Aal-CS ~ Aal-M == 0	-0.64757	0.04495	-14.408	<0.001 ***
Aal-CS ~ Aal-m == 0	-0.09949	0.04798	-2.074	0.161

```

---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
(Adjusted p values reported -- single-step method)

```

```

pred.fecund.albo =
  ggpredict(fecund_albo.glm) %>%
  data.frame() %>%
  dplyr::select(
    Line = Line.x,
    mean.pro = Line.predicted,
    sd.pro = Line.std.error,
    conf.inf = Line.conf.low,
    conf.sup = Line.conf.high)

pred.fecund.albo$Line = factor(pred.fecund.albo$Line,
                               levels = c('BiA (WT)', 'Aal-M', 'Aal-m', 'Aal-CS'))

head(pred.fecund.albo)

```

	Line	mean.pro	sd.pro	conf.inf	conf.sup
1	BiA (WT)	38.30435	0.03369086	35.85670	40.91907
2	Aal-M	69.05263	0.02760788	65.41545	72.89204
3	Aal-m	39.91667	0.03230853	37.46737	42.52608
4	Aal-CS	36.13636	0.03546634	33.70974	38.73767

Replication

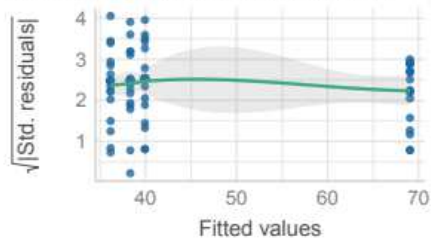
	Line	N
1	BiA (WT)	23
2	Aal-M	19
3	Aal-m	24
4	Aal-CS	22

Model fit quality

```
check_model(fecund_albo.glm)
```

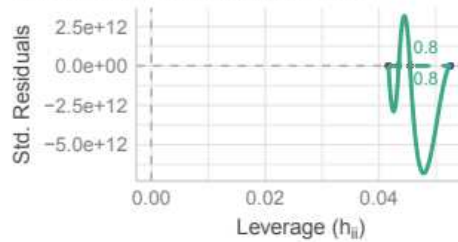
Homogeneity of Variance

Reference line should be flat and horizontal



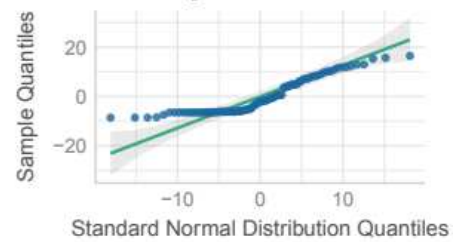
Influential Observations

Points should be inside the contour lines



Normality of Residuals

Dots should fall along the line



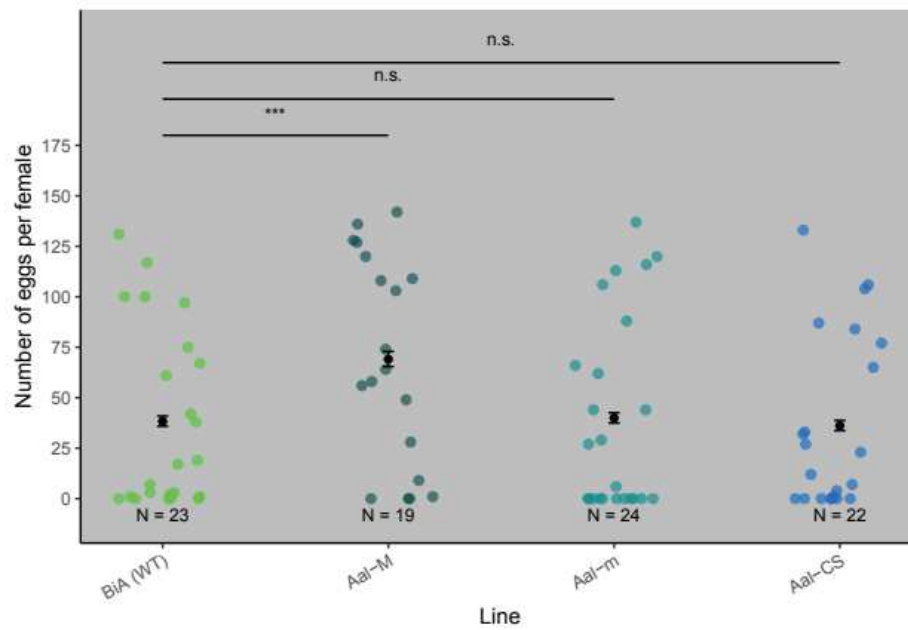
Plot

```
fecund.plot.alb = ggplot(data=NULL) +
  geom_point(data = fecund_albo,
    aes(x = jitter(as.numeric(Line)),
      y = Eggs, color = Line),
    size = 2, show.legend = FALSE, alpha = 0.6) +
  geom_point(data = pred.fecund.albo,
    aes(x = as.numeric(Line),
      y = mean.pro),
    size = 1.5, show.legend = FALSE,
    color = 'black') +
```

```

geom_errorbar(data = pred.fecund.alb,
              aes(x = as.numeric(Line),
                  ymin = conf.inf,
                  ymax = conf.sup), width = 0.05,
              color = 'black') +
annotate(geom = 'text', x = fecund.summary.alb$pos, y = -8,
          label = paste0('N = ', fecund.summary.alb$value),
          size = 3) +
annotate(geom = 'line', x = 1:2, y = 180) +
annotate(geom = 'text', x = 1.5, y = 190,
          label = '***',
          size = 3) +
annotate(geom = 'line', x = 1:3, y = 198) +
annotate(geom = 'text', x = 2, y = 210,
          label = 'n.s.',
          size = 3) +
annotate(geom = 'line', x = 1:4, y = 216) +
annotate(geom = 'text', x = 2.5, y = 228,
          label = 'n.s.',
          size = 3) +
labs(x = 'Line', y = 'Number of eggs per female',
     color = "Line") +
scale_y_continuous(breaks = seq(0,175,25), limits = c(-10,230)) +
scale_color_manual(values = line.color.alb,
                   labels = names(line.color.alb)) +
scale_x_continuous(guide = guide_axis(angle = 30), breaks = 1:4,
                   labels = c("BiA (WT)",
                              "Aal-M",
                              "Aal-m",
                              "Aal-CS")) +
theme_classic() +
theme(legend.position = 'none',
      panel.background = element_rect(fill = "grey"))
fecund.plot.alb

```



Larva survival

Aegypti

Data

```
surv.aeg.larv = read.table("data/Survival-larvae_aeg.csv", sep = ";", header = T)
surv.aeg.larv = surv.aeg.larv %>%
  dplyr::select(Replicate, Line, larvae, adults)

surv.aeg.larv$Species = "Ae. aegypti"

surv.aeg.larv$Line = factor(surv.aeg.larv$Line,
  levels = c('Bra (WT)', 'Aaeg-M', 'Aaeg-m', 'Aaeg-CS'))

surv.aeg.larv$survie = surv.aeg.larv$adults/surv.aeg.larv$larvae * 100

head(surv.aeg.larv)
```

	Replicate	Line	larvae	adults	Species	survie
1	1	Aaeg-M	100	87	Ae. aegypti	87
2	2	Aaeg-M	100	82	Ae. aegypti	82
3	3	Aaeg-M	100	93	Ae. aegypti	93
4	4	Aaeg-M	100	73	Ae. aegypti	73

```

5      1 Aaeg-m    100    96 Ae. aegypti    96
6      2 Aaeg-m    100   100 Ae. aegypti   100

```

Model

```

mod.tot.sl.aeg = lm(data=surv.aeg.larv, formula = survie ~ Line)
mod.tot.sl.aeg %>% summary()

```

Call:

```
lm(formula = survie ~ Line, data = surv.aeg.larv)
```

Residuals:

```

      Min       1Q   Median       3Q      Max
-16.625  -2.344   0.625   4.125   7.375

```

Coefficients:

```

              Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
(Intercept)    94.500      3.127   30.225 1.52e-15 ***
LineAaeg-M     -4.875      3.829   -1.273   0.221
LineAaeg-m      1.000      4.422    0.226   0.824
LineAaeg-CS     3.750      4.422    0.848   0.409
---

```

```
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Residual standard error: 6.253 on 16 degrees of freedom

Multiple R-squared: 0.2691, Adjusted R-squared: 0.1321

F-statistic: 1.964 on 3 and 16 DF, p-value: 0.1601

```
mod.tot.sl.aeg %>% aov %>% TukeyHSD()
```

```

Tukey multiple comparisons of means
 95% family-wise confidence level

```

```
Fit: aov(formula = .)
```

\$Line

```

              diff      lwr      upr    p adj
Aaeg-M-Bra (WT) -4.875 -15.830534  6.080534 0.5920067
Aaeg-m-Bra (WT)  1.000 -11.650361 13.650361 0.9957513
Aaeg-CS-Bra (WT)  3.750 -8.900361 16.400361 0.8308209
Aaeg-m-Aaeg-M     5.875 -5.080534 16.830534 0.4414047
Aaeg-CS-Aaeg-M     8.625 -2.330534 19.580534 0.1514294
Aaeg-CS-Aaeg-m     2.750 -9.900361 15.400361 0.9235384

```

```

df.larv.aeg = ggpredict(mod.tot.sl.aeg) %>%
  data.frame %>%
  dplyr::select(
    Line = Line.x,
    m = Line.predicted,
    sd = Line.std.error,
    conf.inf = Line.conf.low,
    conf.sup = Line.conf.high
  )

```

```
)
df.larv.aeg$Line = factor(df.larv.aeg$Line,
                           levels = c('Bra (WT)', 'Aaeg-M', 'Aaeg-m', 'Aaeg-CS'))
head(df.larv.aeg)
```

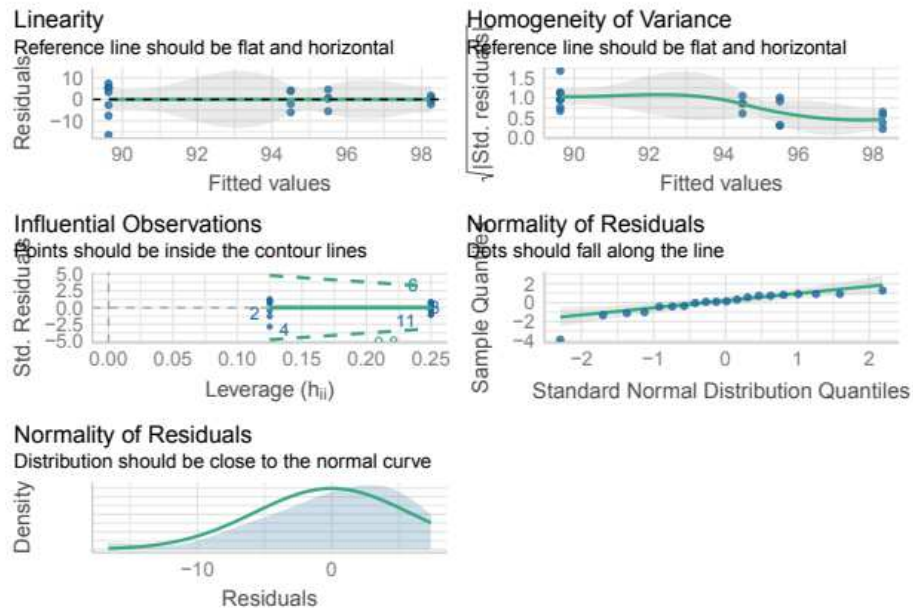
```
      Line      m      sd conf.inf  conf.sup
1 Bra (WT) 94.500 3.126562 88.37205 100.62795
2  Aaeg-M 89.625 2.210813 85.29189  93.95811
3  Aaeg-m 95.500 3.126562 89.37205 101.62795
4  Aaeg-CS 98.250 3.126562 92.12205 104.37795
```

Replication

```
# A tibble: 4 x 3
  Line      N      n
  <fct> <int> <int>
1 Bra (WT)      4    800
2 Aaeg-M        8    800
3 Aaeg-m        4    400
4 Aaeg-CS        4    400
```

Model quality

```
check_model(mod.tot.sl.aeg)
```

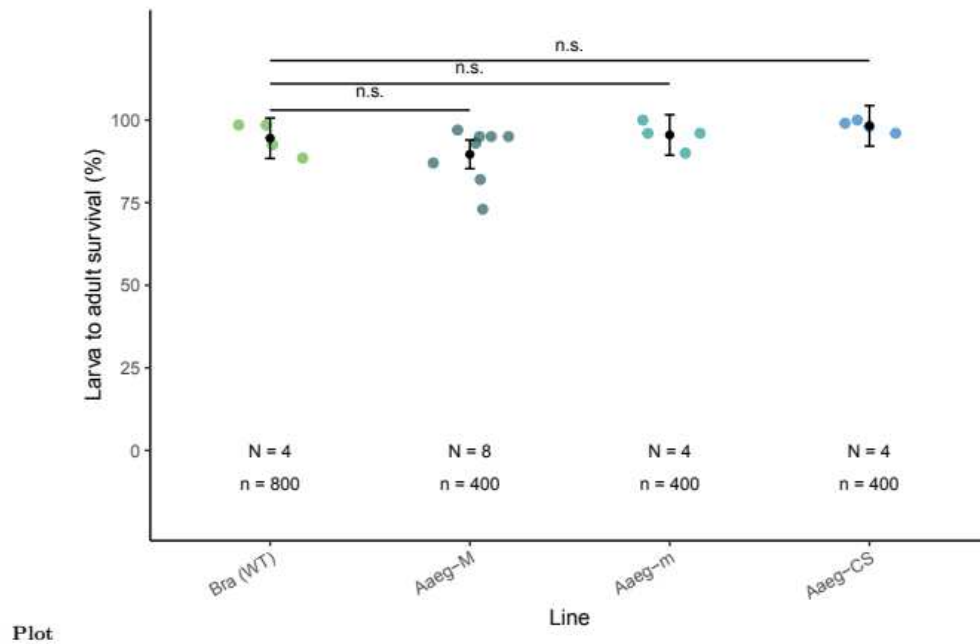


```
larval.surv.plot.aeg = ggplot(data = NULL,
                             aes()) +
  geom_point(data = surv.aeg.larv,
            aes(x = jitter(as.numeric(factor(Line))),
                y = survie, color = Line),
            size = 2, alpha = 0.6) +
  geom_point(data = df.larv.aeg,
            aes(x=Line, y=m), col = 'black') +
  geom_errorbar(data = df.larv.aeg, aes(x=Line, ymin = conf.inf,
                                       ymax = conf.sup),
               width = 0.05, col = 'black') +
  annotate(geom = 'text', x= 1:4, y=0,
          label = c("N = 4", "N = 8", "N = 4", "N = 4"),
          size = 3) +
  annotate(geom = 'text', x= 1:4, y=-10,
          label = c("n = 800", "n = 400", "n = 400", "n = 400"),
          size = 3) +
  annotate(geom = 'line', x= 1:4, y=118) +
  annotate(geom = 'text', x= 2.5, y=123,
          label = 'n.s.',
          size = 3) +
  annotate(geom = 'line', x= 1:3, y=111) +
  annotate(geom = 'text', x= 2, y=116,
```

```

      label = 'n.s.',
      size = 3) +
  annotate(geom = 'line', x= 1:2, y=103) +
  annotate(geom = 'text', x= 1.5, y=109,
    label = 'n.s.',
    size = 3) +
  scale_x_discrete(limits = levels(df.larv.aeg$Line), labels = c("Bra (WT)",
    "Aaeg-M",
    "Aaeg-m",
    "Aaeg-CS"
  ),
  guide = guide_axis(angle = 30)) +
  scale_y_continuous(breaks = c(0, 25, 50, 75, 100),
    limits = c(-20, 126), labels = c(0, 25, 50, 75, 100)) +
  scale_color_manual(labels = names(line.color.aeg),
    values = line.color.aeg) +
  labs(x = 'Line',
    y = 'Larva to adult survival (%)',
    color = 'Line') +
  theme_classic() +
  theme(legend.position = 'none')
larval.surv.plot.aeg

```



Albopictus

Data

```

surv.alb.larv = read.table("data/Survival-larvae_albo.csv", sep = ";", header = T)
surv.alb.larv = surv.alb.larv %>%
  dplyr::select( Replicate, Line, larvae, adults)

surv.alb.larv$Species = "Ae. albopictus"

surv.alb.larv$Line = factor(surv.alb.larv$Line,
  levels = c('BiA (WT)', 'Aal-M', 'Aal-m', 'Aal-CS'))

surv.alb.larv$survie = surv.alb.larv$adults/surv.alb.larv$larvae * 100

head(surv.alb.larv)

```

	Replicate	Line	larvae	adults	Species	survie
1	1	BiA (WT)	200	103	Ae. albopictus	51.5
2	2	BiA (WT)	200	141	Ae. albopictus	70.5
3	3	BiA (WT)	200	129	Ae. albopictus	64.5
4	4	BiA (WT)	200	130	Ae. albopictus	65.0
5	1	Aal-M	100	88	Ae. albopictus	88.0
6	2	Aal-M	100	79	Ae. albopictus	79.0

Model

```

mod.tot.sl.alb = lm(data=surv.alb.larv, formula = survie ~ Line)
mod.tot.sl.alb %>% summary()

```

Call:

```
lm(formula = survie ~ Line, data = surv.alb.larv)
```

Residuals:

	Min	1Q	Median	3Q	Max
	-11.375	-2.750	1.062	2.750	7.625

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	62.875	2.831	22.210	4.09e-11 ***
LineAal-M	18.125	4.004	4.527	0.000693 ***
LineAal-m	16.625	4.004	4.153	0.001341 **
LineAal-CS	5.625	4.004	1.405	0.185378

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 5.662 on 12 degrees of freedom
Multiple R-squared: 0.7043, Adjusted R-squared: 0.6303
F-statistic: 9.525 on 3 and 12 DF, p-value: 0.001695

```
mod.tot.sl.alb %>% aov %>% TukeyHSD()
```

```
Tukey multiple comparisons of means
95% family-wise confidence level
```

```
Fit: aov(formula = .)
```

```
$Line
      diff      lwr      upr      p adj
Aal-M-BiA (WT) 18.125  6.238769 30.0112306 0.0033427
Aal-m-BiA (WT) 16.625  4.738769 28.5112306 0.0063439
Aal-CS-BiA (WT)  5.625 -6.261231 17.5112306 0.5198078
Aal-m-Aal-M      -1.500 -13.386231 10.3862306 0.9812185
Aal-CS-Aal-M     -12.500 -24.386231 -0.6137694 0.0383297
Aal-CS-Aal-m     -11.000 -22.886231  0.8862306 0.0730385
```

```
df.larv.alb = ggpredict(mod.tot.sl.alb) %>%
  data.frame %>%
  dplyr::select(
    Line = Line.x,
    m = Line.predicted,
    sd = Line.std.error,
    conf.inf = Line.conf.low,
    conf.sup = Line.conf.high
  )
df.larv.alb$Line = factor(df.larv.alb$Line,
  levels = c('BiA (WT)', 'Aal-M', 'Aal-m', 'Aal-CS'))
head(df.larv.alb)
```

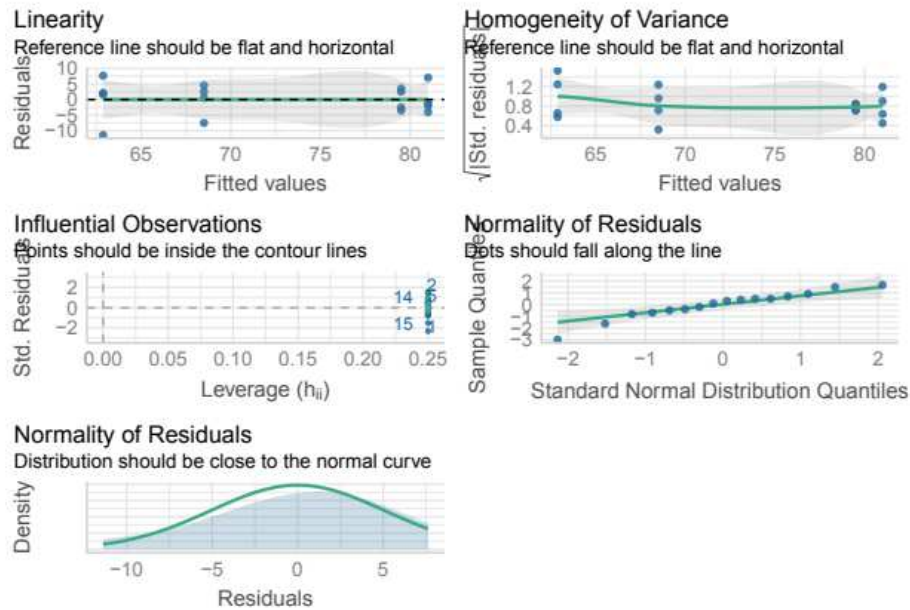
```
      Line      m      sd conf.inf conf.sup
1 BiA (WT) 62.875 2.830958 57.32642 68.42358
2 Aal-M 81.000 2.830958 75.45142 86.54858
3 Aal-m 79.500 2.830958 73.95142 85.04858
4 Aal-CS 68.500 2.830958 62.95142 74.04858
```

```
Replication
```

```
# A tibble: 4 x 3
  Line      N      n
<fct> <int> <int>
1 BiA (WT)    4    800
2 Aal-M      4    400
3 Aal-m      4    400
4 Aal-CS      4    400
```

```
Model quality
```

```
check_model(mod.tot.sl.alb)
```



Plot

```
larval.surv.plot.alb = ggplot(data = NULL,
                             aes()) +
  geom_point(data = surv.alb.larv,
            aes(x = jitter(as.numeric(factor(Line))),
               y = survie, color = Line),
            size = 2, alpha = 0.6) +
  geom_point(data = df.larv.alb,
            aes(x=Line, y=m), col = 'black') +
  geom_errorbar(data = df.larv.alb, aes(x=Line, ymin = conf.inf,
                                       ymax = conf.sup),
               width = 0.05, col = 'black') +
  annotate(geom = 'text', x= 1:4, y=0,
          label = c("N = 4", "N = 4", "N = 4", "N = 4"),
          size = 3) +
  annotate(geom = 'text', x= 1:4, y=-10,
          label = c("n = 800", "n = 400", "n = 400", "n = 400"),
          size = 3) +
  annotate(geom = 'line', x= 1:4, y=118) +
  annotate(geom = 'text', x= 2.5, y=123,
          label = 'n.s.',
          size = 3) +
  annotate(geom = 'line', x= 1:3, y=111) +
  annotate(geom = 'text', x= 2, y=114,
```

```

      label = '**',
      size = 3) +
  annotate(geom = 'line', x= 1:2, y=103) +
  annotate(geom = 'text', x= 1.5, y=106,
    label = '**',
    size = 3) +
  scale_x_discrete(limits = levels(df.larv.alb$Line), labels = c("B1A (WT)",
    "Aal-M",
    "Aal-m",
    "Aal-CS"
  ),
  guide = guide_axis(angle = 30)) +
  scale_y_continuous(breaks = c(0, 25, 50, 75, 100),
    limits = c(-20, 126), labels = c(0, 25, 50, 75, 100)) +
  scale_color_manual(labels = names(line.color.alb),
    values = line.color.alb) +
  labs(x = 'Line',
    y = 'Larva to adult survival (%)',
    color = 'Line') +
  theme_classic() +
  theme(legend.position = 'none',
    panel.background = element_rect(fill = "grey"))
larval.surv.plot.alb

```

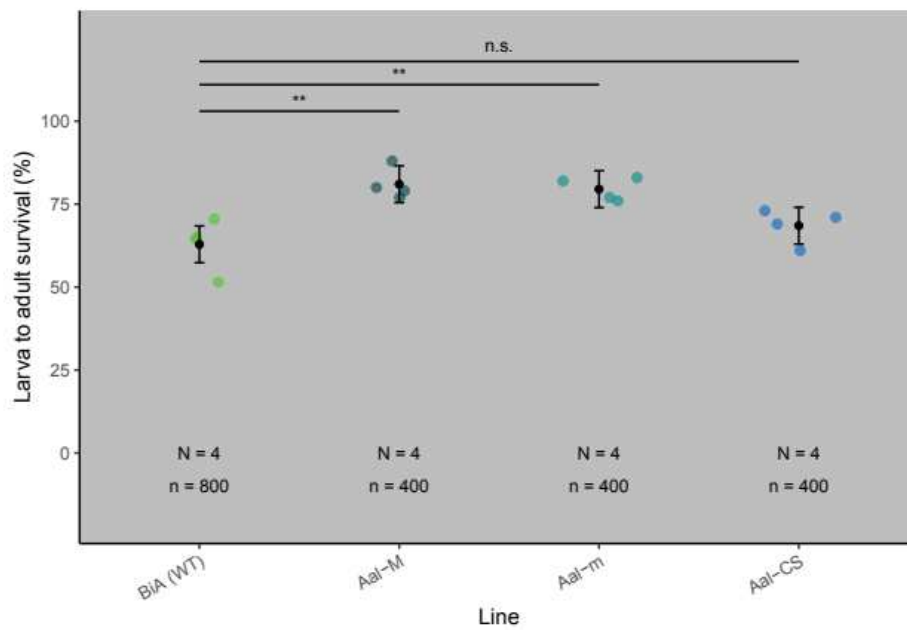


Figure 5

Competitiveness

Aegypti

Data

```
compet_aeg<-read.table("data/Competitiveness_aeg.csv", header=TRUE, sep=",")
compet_aeg$total = compet_aeg$tsg + compet_aeg$no_tsg
compet_aeg$comp = compet_aeg$tsg / (compet_aeg$total) * 100
compet_aeg$line = factor(x = compet_aeg$line,
                          levels = c('Expected', 'Aaeg-M', 'Aaeg-CS'))
head(compet_aeg)
```

	line	Replicate	tsg	no_tsg	total	comp
1	Expected	1	1300	3700	5000	26.00000
2	Aaeg-M	1	632	1758	2390	26.44351
3	Aaeg-M	2	618	1670	2288	27.01049
4	Aaeg-M	3	740	1472	2212	33.45389
5	Aaeg-M	4	493	1775	2268	21.73721
6	Aaeg-M	5	522	1554	2076	25.14451

```
compet.aeg =
  rbind(
    data.frame(replicate = compet_aeg[1,2],
               line = compet_aeg[1,1],
               result = rep(1, compet_aeg[1,3])),
    data.frame(replicate = compet_aeg[1,2],
               line = compet_aeg[1,1],
               result = rep(0, compet_aeg[1,4]))))

for(i in 2:nrow(compet_aeg)){
  compet.aeg =
    rbind(
      compet.aeg,
      data.frame(replicate = compet_aeg[i,2],
                  line = compet_aeg[i,1],
                  result = rep(1, compet_aeg[i,3])),
      data.frame(replicate = compet_aeg[i,2],
                  line = compet_aeg[i,1],
                  result = rep(0, compet_aeg[i,4]))
    )
}

compet.aeg$line = factor(x = compet.aeg$line,
                          levels = c('Expected', 'Aaeg-M', 'Aaeg-CS'))
compet.aeg$Species = "Ae. aegypti"

sum.compet.aeg = compet.aeg %>%
  filter(line != 'Expected') %>%
  group_by(line) %>%
  dplyr::summarize(value = n(),
```

```

      N = max(replicate)) %>%
data.frame() %>%
mutate(pos = c(1,2))

head(compet.aeg)

```

```

  replicate   line result Species
1         1 Expected    1 Ae. aegypti
2         1 Expected    1 Ae. aegypti
3         1 Expected    1 Ae. aegypti
4         1 Expected    1 Ae. aegypti
5         1 Expected    1 Ae. aegypti
6         1 Expected    1 Ae. aegypti

```

```

Expected_Aaeg_M = 0.26
Expected_Aaeg_CS = 0.26

```

Model

```

# Generalized linear model with Bernoulli distribution
cpt.aeg = glm(formula = 'result ~ line',
              family = binomial,
              data = compet.aeg)
summary(cpt.aeg)

```

Call:

```
glm(formula = "result ~ line", family = binomial, data = compet.aeg)
```

Deviance Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-0.8044	-0.7890	-0.7890	1.6037	1.6414

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
(Intercept)	-1.04597	0.03224	-32.442	<2e-16 ***
lineAaeg-M	0.03858	0.03865	0.998	0.3182
lineAaeg-CS	0.08358	0.04388	1.905	0.0568 .

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for binomial family taken to be 1)

Null deviance: 25437 on 21877 degrees of freedom
Residual deviance: 25433 on 21875 degrees of freedom
AIC: 25439

Number of Fisher Scoring iterations: 4

```

# Pairwise comparison
cpt.aeg.pred = ggpredict(cpt.aeg) %>% data.frame()

```

```
cpt.aeg.pred %>% dplyr::select(Line = line.x,
                                Mean = line.predicted, SE = line.std.error,
                                CI.low = line.conf.low, CI.high = line.conf.high)
```

	Line	Mean	SE	CI.low	CI.high
1	Expected	0.2600000	0.03224127	0.2480275	0.2723411
2	Aaeg-M	0.2674915	0.02131430	0.2593860	0.2757561
3	Aaeg-CS	0.2763997	0.02976378	0.2648858	0.2882179

Replication

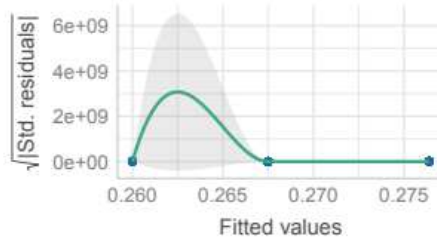
	Line	N	n
1	Aaeg-M	5	11234
2	Aaeg-CS	5	5644

Model fit quality

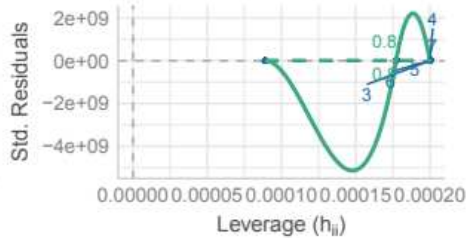
```
check_model(cpt.aeg)
```

Homogeneity of Variance

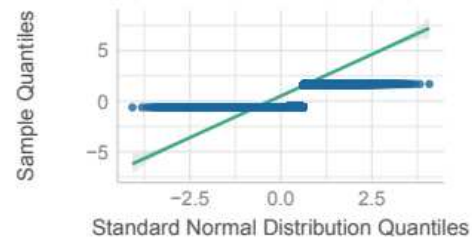
Reference line should be flat and horizontal

**Influential Observations**

Points should be inside the contour lines

**Normality of Residuals**

Dots should fall along the line



Plot


```

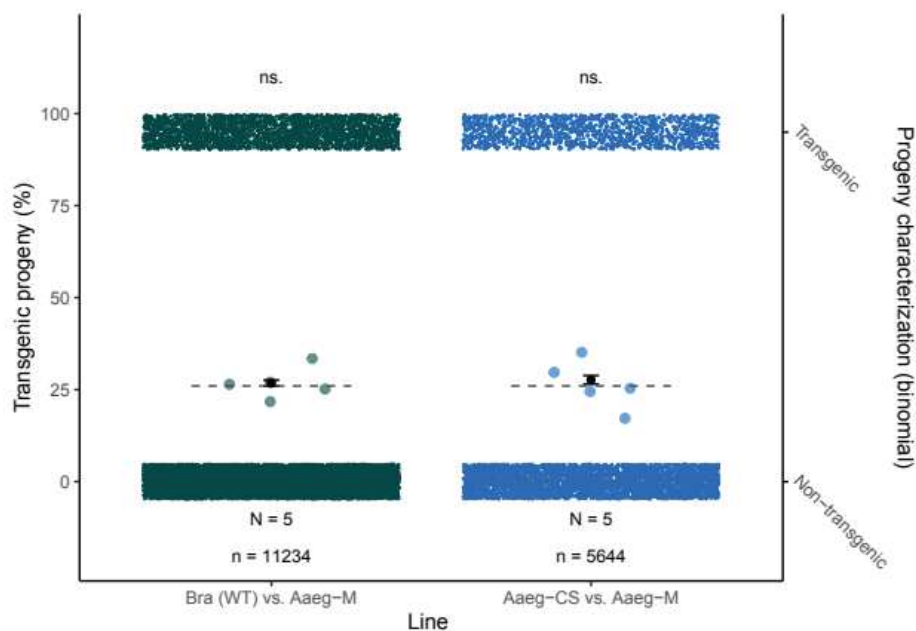
comp.aeg.plot =
  ggplot(data = NULL) +
  geom_point(data = compet_aeg[compet_aeg$line!='Expected',],
    aes(x = jitter(as.numeric(factor(line))),
      y = comp,
      color = line),
    size = 2, alpha = .6) +
  geom_point(data = cpt.aeg.pred[-1,],
    aes(x = (as.numeric(line.x)-1),
      y = line.predicted * 100),
    size = 1.5, color = 'black') +
  geom_errorbar(data = cpt.aeg.pred[-1,],
    aes(x = (as.numeric(line.x)-1),
      ymin = line.conf.low* 100,
      ymax = line.conf.high* 100),
    width = 0.05, color = 'black') +
  geom_point(data = compet.aeg,
    aes(x = jitter((as.numeric(factor(line))-1), factor = 2),
      y = jitter((result * 95), factor = .25),
      color = line),
    size = .1) +
  annotate(geom = 'text', x = sum.compet.aeg$pos, y=-20,
    label = paste0('n = ', sum.compet.aeg$value),
    size = 3) +
  annotate(geom = 'text', x= sum.compet.aeg$pos, y=-10,
    label = c('N = 5', 'N = 5'),
    size = 3) +
  annotate(geom = 'line', x = c(.75, 1.25),
    y=rep(Expected_Aaeg_M*100, 2),
    lty = 2, color = 'grey30') +
  annotate(geom = 'line', x = c(1.75, 2.25),
    y=rep(Expected_Aaeg_CS*100, 2),
    lty = 2, color = 'grey30') +
  annotate(geom = 'text', x= 2, y=110,
    label = 'ns.',
    size = 3) +
  annotate(geom = 'text', x= 1, y=110,
    label = 'ns.',
    size = 3) +
  scale_x_continuous(breaks = 1:2,
    labels = c("Bra (WT) vs. Aaeg-M",
      "Aaeg-CS vs. Aaeg-M"),
    limits = c(.5,2.5)) +
  scale_y_continuous(sec.axis = sec_axis(-., breaks = c(0,95),
    labels = c('Non-transgenic', 'Transgenic'),
    name = 'Progeny characterization (binomial)'),
    limits = c(-20,120),
    breaks = c(0,25,50,75,100)) +
  scale_color_manual(values = line.color.aeg, labels = names(line.color.aeg)) +
  labs(x = 'Line ',
    y = 'Transgenic progeny (%)') +
  theme_classic() +
  theme(legend.position = 'none',

```



```
axis.title.y.right = element_text(color = 'black'),
axis.ticks.y.right = element_line(color = 'black'),
axis.line.y.right = element_line(color = 'black'),
axis.text.y.right = element_text(angle = -45, hjust = 0, vjust = 0))

comp.aeg.plot
```



Albopictus

Data

```
compet_albo<-read.table("data/Competitiveness_albo.csv", header=TRUE, sep=",")
compet_albo$total = compet_albo$tsg + compet_albo$no_tsg
compet_albo$comp = compet_albo$tsg / (compet_albo$total) * 100
compet_albo$line = factor(x = compet_albo$line,
                           levels = c('Expected', 'Aal-M', 'Aal-CS'))
head(compet_albo)
```

	line	Replicate	tsg	no_tsg	total	comp
1	Expected	1	637	1863	2500	25.48000
2	Aal-M	1	75	185	260	28.84615
3	Aal-M	2	60	247	307	19.54397
4	Aal-M	3	119	335	454	26.21145
5	Aal-M	4	151	887	1038	14.54721

6 Aal-M 5 67 451 518 12.93436

```
compet.albo =
  rbind(
    data.frame(replicate = compet_albo[1,2],
              line = compet_albo[1,1],
              result = rep(1, compet_albo[1,3])),
    data.frame(replicate = compet_albo[1,2],
              line = compet_albo[1,1],
              result = rep(0, compet_albo[1,4]))

for(i in 2:nrow(compet_albo)){
  compet.albo =
    rbind(
      compet.albo,
      data.frame(replicate = compet_albo[i,2],
                line = compet_albo[i,1],
                result = rep(1, compet_albo[i,3])),
      data.frame(replicate = compet_albo[i,2],
                line = compet_albo[i,1],
                result = rep(0, compet_albo[i,4]))
    )
}

compet.albo$line = factor(x = compet.albo$line,
                        levels = c('Expected', 'Aal-M', 'Aal-CS'))
compet.albo$Species = "Ae. albopictus"

sum.compet.albo = compet.albo %>%
  filter(line != "Expected") %>%
  group_by(line) %>%
  dplyr::summarize(value = n(),
                  N = max(replicate)) %>%
  data.frame() %>%
  mutate(pos = c(1,2))

head(compet.albo)
```

	replicate	line	result	Species
1	1	Expected	1	Ae. albopictus
2	1	Expected	1	Ae. albopictus
3	1	Expected	1	Ae. albopictus
4	1	Expected	1	Ae. albopictus
5	1	Expected	1	Ae. albopictus
6	1	Expected	1	Ae. albopictus

```
Expected_Aal_M = 0.255
Expected_Aal_CS = 0.255
```

Model

```
# Generalized linear model with Bernoulli distribution
cpt.albo = glm(formula = 'result ~ line',
               family = binomial,
               data = compet.albo)
summary(cpt.albo)
```

Call:
glm(formula = "result ~ line", family = binomial, data = compet.albo)

Deviance Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-0.7835	-0.7835	-0.7670	-0.6361	1.8425

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
(Intercept)	-1.07317	0.04590	-23.382	< 2e-16 ***
lineAal-M	-0.42192	0.06856	-6.154	7.55e-10 ***
lineAal-CS	0.04939	0.05174	0.955	0.34

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for binomial family taken to be 1)

Null deviance: 15773 on 14085 degrees of freedom
Residual deviance: 15697 on 14083 degrees of freedom
AIC: 15703

Number of Fisher Scoring iterations: 4

```
# Pairwise comparison
cpt.albo.pred = ggpredict(cpt.albo) %>% data.frame()

cpt.albo.pred %>% dplyr::select(Line = line.x,
                               Mean = line.predicted, SE = line.std.error,
                               CI.low = line.conf.low, CI.high = line.conf.high)
```

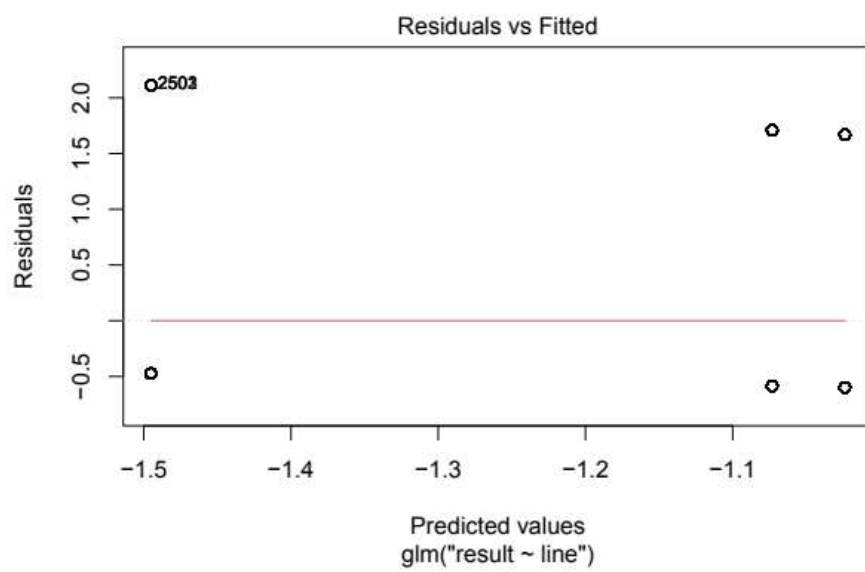
	Line	Mean	SE	CI.low	CI.high
1	Expected	0.2548000	0.04589797	0.2380986	0.2722543
2	Aal-M	0.1831587	0.05092841	0.1686943	0.1985671
3	Aal-CS	0.2642913	0.02389280	0.2552868	0.2734967

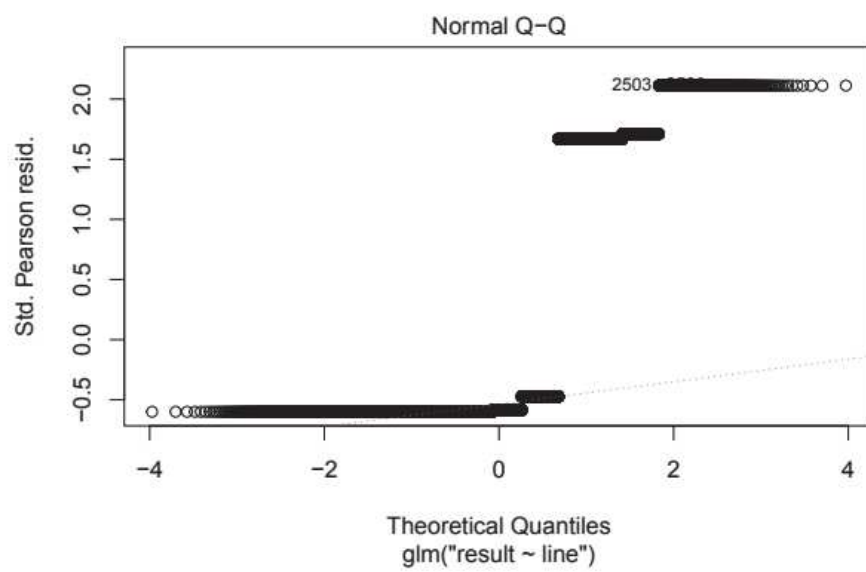
Replication

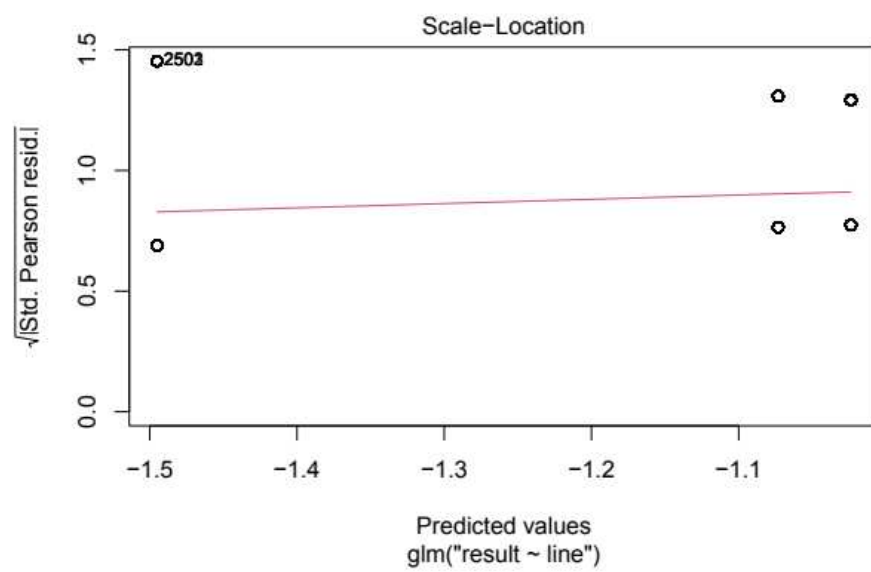
	Line	N	n
1	Aal-M	5	2577
2	Aal-CS	5	9009

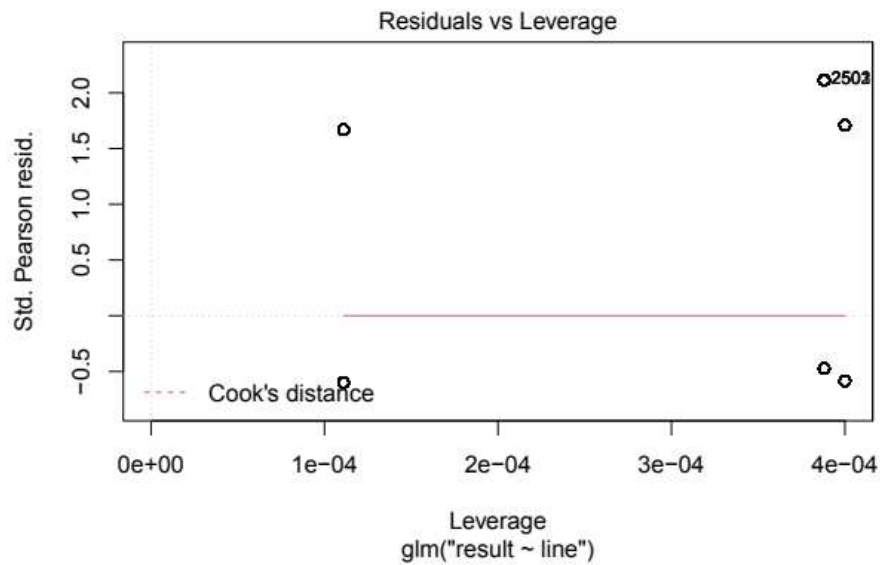
Model fit quality

```
plot(cpt.albo)
```









Plot .

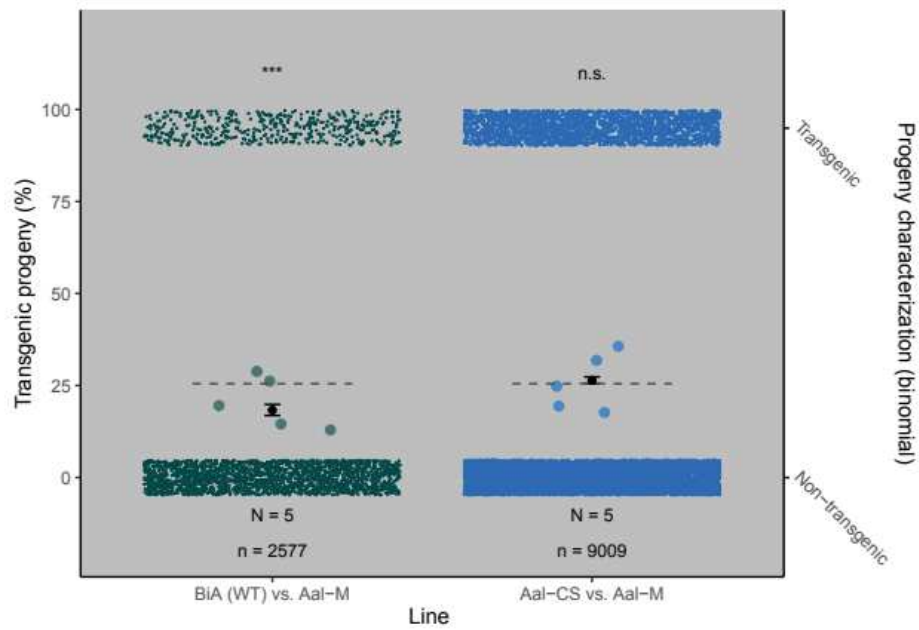
```
comp.albo.plot =
  ggplot(data = NULL) +
    geom_point(data = compet_albo[compet_albo$line!='Expected',],
      aes(x = jitter(as.numeric(factor(line))),
        y = comp,
        color = line),
      size = 2, alpha = .6)+
    geom_point(data = cpt.albo.pred[-1,],
      aes(x = (as.numeric(line.x)-1),
        y = line.predicted * 100),
      size = 1.5, color = 'black') +
    geom_errorbar(data = cpt.albo.pred[-1,],
      aes(x = (as.numeric(line.x)-1),
        ymin = line.conf.low* 100,
        ymax = line.conf.high* 100),
      width = 0.05, color = 'black') +
    geom_point(data = compet.albo,
      aes(x = jitter((as.numeric(factor(line))-1), factor = 2),
        y = jitter((result * 95), factor = .25),
        color = line),
      size = .1) +
    annotate(geom = 'text', x = sum.compet.albo$pos, y=-20,
      label = paste0('n = ', sum.compet.albo$value),
```

```

      size = 3) +
annotate(geom = 'text', x= sum.compet.albo$pos, y=-10,
      label = c('N = 5', 'N = 5'),
      size = 3) +
annotate(geom = 'line', x = c(.75, 1.25),
      y=rep(Expected_Aal_M*100, 2),
      lty = 2, color = 'grey30') +
annotate(geom = 'line', x = c(1.75, 2.25),
      y=rep(Expected_Aal_CS*100, 2),
      lty = 2, color = 'grey30') +
annotate(geom = 'text', x= 2, y=110,
      label = 'n.s.',
      size = 3) +
annotate(geom = 'text', x= 1, y=110,
      label = '***',
      size = 3) +
scale_x_continuous(breaks = 1:2,
      labels = c("BiA (WT) vs. Aal-M",
        "Aal-CS vs. Aal-M"),
      limits = c(.5,2.5)) +
scale_y_continuous(sec.axis = sec_axis(~., breaks = c(0,95),
      labels = c('Non-transgenic', 'Transgenic'),
      name = 'Progeny characterization (binomial)'),
      limits = c(-20,120),
      breaks = c(0,25,50,75,100)) +
scale_color_manual(values = line.color.alb, labels = names(line.color.alb)) +
labs(x = 'Line ',
      y = 'Transgenic progeny (%)') +
theme_classic() +
theme(legend.position = 'none',
      axis.title.y.right = element_text(color = 'black'),
      axis.ticks.y.right = element_line(color = 'black'),
      axis.line.y.right = element_line(color = 'black'),
      axis.text.y.right = element_text(angle = -45, hjust = 0, vjust = 0),
      panel.background = element_rect(fill = 'grey'))

comp.albo.plot

```

Flight test

Aegypti

Data

```
flight_aegypti<-read.table("data/Flight_aeg.csv", header=TRUE, sep=";")
flight_aegypti$esc = flight_aegypti$out / (flight_aegypti$out + flight_aegypti$in.) * 100
flight_aegypti$Line = factor(flight_aegypti$Line, levels = c("Bra (WT)", "Aaeg-M", "Aaeg-CS"))
head(flight_aegypti)
```

Replicate	Line	out	in.	esc
1	2 Aaeg-M	65	36	64.35644
2	2 Aaeg-CS	66	36	64.70588
3	2 Bra (WT)	71	22	76.34409
4	3 Aaeg-M	57	31	64.77273
5	3 Aaeg-CS	75	19	79.78723
6	3 Bra (WT)	64	35	64.64646

```
flight.aeg =
  rbind(
    data.frame(replicate = flight_aegypti[1,1],
              treatment = flight_aegypti[1,2],
              result = rep(1, flight_aegypti[1,3])),
```

```

data.frame(replicate = flight_aegypti[1,1],
           treatment = flight_aegypti[1,2],
           result = rep(0, flight_aegypti[1,4]))

for(i in 2:nrow(flight_aegypti)){
  flight.aeg =
  rbind(
    flight.aeg,
    data.frame(replicate = flight_aegypti[i,1],
              treatment = flight_aegypti[i,2],
              result = rep(1, flight_aegypti[i,3])),
    data.frame(replicate = flight_aegypti[i,1],
              treatment = flight_aegypti[i,2],
              result = rep(0, flight_aegypti[i,4]))
  )
}

flight.aeg$Species = 'Ae. aegypti'
flight.aeg$treatment = factor(flight.aeg$treatment, levels = c("Bra (WT)", "Aaeg-M", "Aaeg-CS"))

head(flight.aeg)

```

	replicate	treatment	result	Species
1	2	Aaeg-M	1	Ae. aegypti
2	2	Aaeg-M	1	Ae. aegypti
3	2	Aaeg-M	1	Ae. aegypti
4	2	Aaeg-M	1	Ae. aegypti
5	2	Aaeg-M	1	Ae. aegypti
6	2	Aaeg-M	1	Ae. aegypti

```

flight.aeg.summary = flight.aeg %>% group_by(treatment) %>%
  dplyr::summarise(value = n()) %>% data.frame() %>%
  mutate(pos = 1:3)

head(flight.aeg.summary)

```

	treatment	value	pos
1	Bra (WT)	289	1
2	Aaeg-M	286	2
3	Aaeg-CS	302	3

Model

```

flight.aeg.glmer = glmer(formula = 'result ~ treatment + (1|replicate)',
                        data = flight.aeg, family = binomial)

summary(flight.aeg.glmer)

```

Generalized linear mixed model fit by maximum likelihood (Laplace
Approximation) [glmerMod]
Family: binomial (logit)

```

Formula: result ~ treatment + (1 | replicate)
Data: flight.aeg

      AIC      BIC   logLik deviance df.resid
1045.4   1064.5   -518.7   1037.4     873

Scaled residuals:
      Min       1Q   Median       3Q      Max
-1.8340 -1.4218  0.6088  0.6315  0.7033

Random effects:
 Groups      Name      Variance Std.Dev.
 replicate (Intercept) 0.02668  0.1633
Number of obs: 877, groups: replicate, 3

Fixed effects:
              Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
(Intercept)    1.03584    0.16391   6.320 2.62e-10 ***
treatmentAaeg-M -0.22027    0.18562  -1.187   0.235
treatmentAaeg-CS -0.04688    0.18646  -0.251   0.801
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Correlation of Fixed Effects:
              (Intr) trtA-M
tretmntAg-M -0.590
trtmntAg-CS -0.587  0.519

pairewise.f.aeg = glht(flight.aeg.glmer,
                        mcp(treatment="Tukey"))
summary(pairewise.f.aeg)

Simultaneous Tests for General Linear Hypotheses

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

Fit: glmer(formula = result ~ treatment + (1 | replicate), data = flight.aeg,
            family = binomial)

Linear Hypotheses:
              Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
Aaeg-M - Bra (WT) == 0 -0.22027    0.18562  -1.187   0.461
Aaeg-CS - Bra (WT) == 0 -0.04688    0.18646  -0.251   0.966
Aaeg-CS - Aaeg-M == 0  0.17339    0.18254   0.950   0.609
(Adjusted p values reported -- single-step method)

Replication

# A tibble: 3 x 3
  Line      N      n
  <fct>   <int> <int>

```

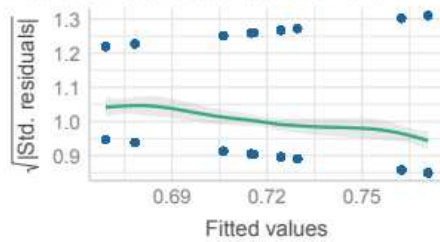
1 Bra (WT)	3	289
2 Aaeg-M	3	286
3 Aaeg-CS	3	302

Model fit quality

```
check_model(flight.aeg.glmer)
```

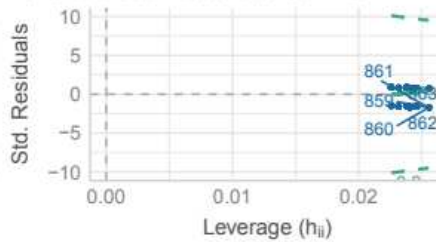
Homogeneity of Variance

Reference line should be flat and horizontal



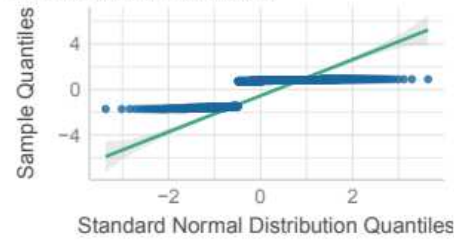
Influential Observations

Points should be inside the contour lines



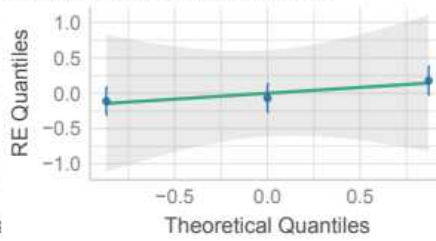
Normality of Residuals

Dots should fall along the line



Normality of Random Effects (replicate)

Dots should be plotted along the line



Plot

```
ft.aeg = data.frame(ggpredict(model = flight.aeg.glmer,
                             terms = c("treatment")))
ft.aeg$x = factor(ft.aeg$x, levels = c("Bra (WT)", "Aaeg-M", "Aaeg-CS"))
ft.aeg$Species = 'Ae. aegypti'

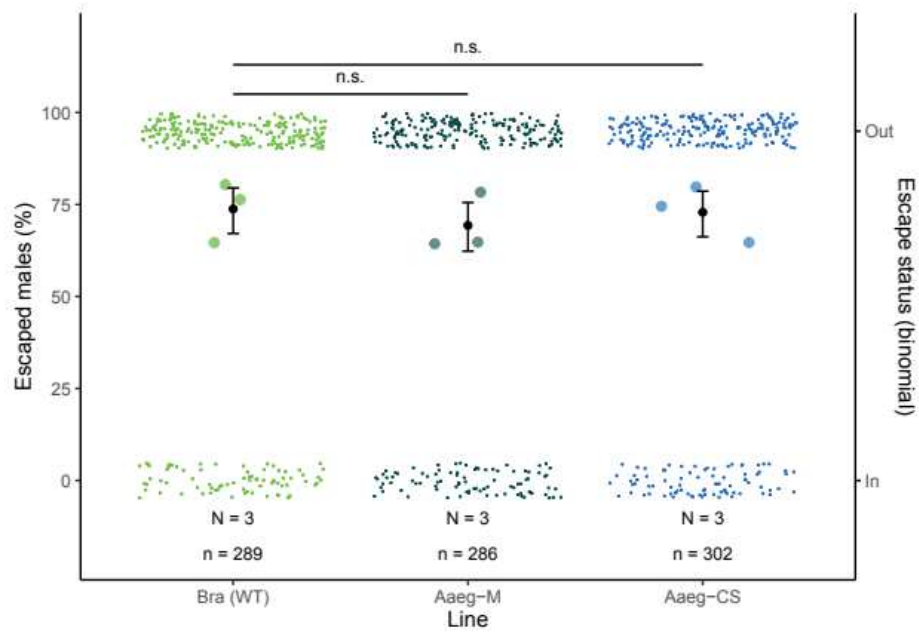
ft.plot.aeg =
  ggplot(data = NULL) +
  geom_point(data = flight_aegypti,
            aes(x = jitter(as.numeric(factor(Line))),
                y = esc,
                color = Line),
            size = 2, alpha = .6) +
  geom_point(data = ft.aeg,
            aes(x = as.numeric(x),
```

```

      y = predicted * 100,
      size = 1.5, color = 'black') +
geom_errorbar(data = ft.aeg,
  aes(x = as.numeric(x),
      ymin = conf.low* 100,
      ymax = conf.high* 100),
  width = 0.05, color = 'black') +
geom_point(data = flight.aeg,
  aes(x = jitter(as.numeric(factor(treatment))), factor = 2),
  y = jitter((result * 95), factor = .25),
  color = treatment),
  #alpha = .25,
  size = .1) +
annotate(geom = 'text', x= flight.aeg.summary$pos, y=-20,
  label = paste0('n = ', flight.aeg.summary$value),
  size = 3) +
annotate(geom = 'text', x= flight.aeg.summary$pos, y=-10,
  label = 'N = 3',
  size = 3) +
annotate(geom = 'line', x= 1:3, y=113) +
annotate(geom = 'text', x= 2, y=118,
  label = 'n.s.',
  size = 3) +
annotate(geom = 'line', x= 1:2, y=105) +
annotate(geom = 'text', x= 1.5, y=110,
  label = 'n.s.',
  size = 3) +
scale_x_continuous(breaks = 1:3,
  labels = c("Bra (WT)",
    "Aaeg-M",
    "Aaeg-CS"),
  limits = c(.5,3.5)) +
scale_y_continuous(sec.axis = sec_axis(., breaks = c(0,95),
  labels = c('In', 'Out'),
  name = 'Escape status (binomial)'),
  limits = c(-20,120),
  breaks = c(0,25,50,75,100)) +
scale_color_manual(values = line.color.aeg, labels = names(line.color.aeg)) +
labs(x = 'Line',
  y = 'Escaped males (%)') +
theme_classic() +
theme(legend.position = 'none',
  axis.title.y.right = element_text(color = 'black'),
  axis.ticks.y.right = element_line(color = 'black'),
  axis.line.y.right = element_line(color = 'black'))

ft.plot.aeg

```



Albopictus

Data

```
flight_albo<-read.table("data/Flight_albo.csv", header=TRUE, sep=";")
flight_albo$esc = flight_albo$out / (flight_albo$out + flight_albo$in.) * 100
flight_albo$Line = factor(flight_albo$Line,
                           levels = c("BiA (WT)", "Aal-M", "Aal-CS"))
head(flight_albo)
```

Replicate	Line	out	in.	esc
1	2 Aal-M	26	63	29.21348
2	2 Aal-CS	45	48	48.38710
3	2 BiA (WT)	38	48	44.18605
4	3 Aal-M	57	31	64.77273
5	3 Aal-CS	62	16	79.48718
6	3 BiA (WT)	58	31	65.16854

```
flight_albo =
  rbind(
    data.frame(replicate = flight_albo[1,1],
               treatment = flight_albo[1,2],
               result = rep(1, flight_albo[1,3])),
```

```

data.frame(replicate = flight_albo[1,1],
           treatment = flight_albo[1,2],
           result = rep(0, flight_albo[1,4]))

for(i in 2:nrow(flight_albo)){
  flight.albo =
  rbind(
    flight.albo,
    data.frame(replicate = flight_albo[i,1],
               treatment = flight_albo[i,2],
               result = rep(1, flight_albo[i,3])),
    data.frame(replicate = flight_albo[i,1],
               treatment = flight_albo[i,2],
               result = rep(0, flight_albo[i,4]))
  )
}

flight.albo$Species = 'Ae. albopictus'
flight.albo$treatment = factor(flight.albo$treatment,
                              levels = c("BiA (WT)", "Aal-M", "Aal-CS"))

head(flight.albo)

```

	replicate	treatment	result	Species
1	2	Aal-M	1	Ae. albopictus
2	2	Aal-M	1	Ae. albopictus
3	2	Aal-M	1	Ae. albopictus
4	2	Aal-M	1	Ae. albopictus
5	2	Aal-M	1	Ae. albopictus
6	2	Aal-M	1	Ae. albopictus

```

flight.alb.summary = flight.albo %>% group_by(treatment) %>%
  dplyr::summarise(value = n()) %>% data.frame() %>%
  mutate(pos = 1:3)

head(flight.alb.summary)

```

	treatment	value	pos
1	BiA (WT)	264	1
2	Aal-M	273	2
3	Aal-CS	244	3

Model .

```

mod.glmer.albo = glmer(formula = 'result ~ treatment + (1|replicate)',
                       data = flight.albo, family = binomial)

summary(mod.glmer.albo)

```

Generalized linear mixed model fit by maximum likelihood (Laplace Approximation) [glmerMod]


```

Family: binomial ( logit )
Formula: result ~ treatment + (1 | replicate)
Data: flight.albo

      AIC      BIC   logLik deviance df.resid
1036.3   1054.9   -514.1   1028.3     777

Scaled residuals:
      Min       1Q   Median       3Q      Max
-1.7839 -0.9200  0.5606   0.9063   1.4280

Random effects:
 Groups      Name      Variance Std.Dev.
 replicate (Intercept) 0.2407   0.4906
Number of obs: 781, groups: replicate, 3

Fixed effects:
              Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
(Intercept)      0.2196     0.3106   0.707   0.4795
treatmentAal-M    -0.3636     0.1784  -2.038   0.0415 *
treatmentAal-CS    0.3490     0.1867   1.869   0.0616 .
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Correlation of Fixed Effects:
      (Intr) trtA-M
tretmntAal-M -0.293
trtmntAal-CS -0.279  0.485

pairewise.f.albo = glht(mod.glmer.albo,
                        mcp(treatment="Tukey"))
summary(pairewise.f.albo)

Simultaneous Tests for General Linear Hypotheses

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

Fit: glmer(formula = result ~ treatment + (1 | replicate), data = flight.albo,
            family = binomial)

Linear Hypotheses:

              Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
Aal-M - BiA (WT) == 0   -0.3636     0.1784  -2.038   0.103
Aal-CS - BiA (WT) == 0    0.3490     0.1867   1.869   0.147
Aal-CS - Aal-M == 0      0.7126     0.1854   3.843 <0.001 ***
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
(Adjusted p values reported -- single-step method)

Replication

# A tibble: 3 x 3

```

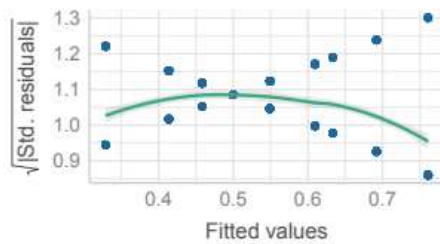

Line	N	n
<fct>	<int>	<int>
1 BiA (WT)	3	264
2 Aal-M	3	273
3 Aal-CS	3	244

Model fit quality

```
check_model(mod.glmr.albo)
```

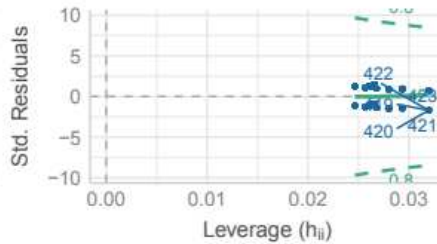
Homogeneity of Variance

Reference line should be flat and horizontal



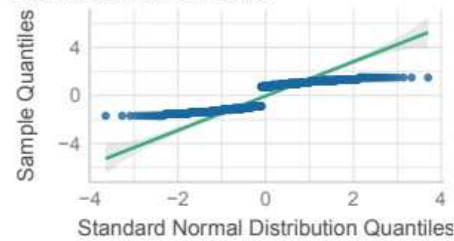
Influential Observations

Points should be inside the contour lines



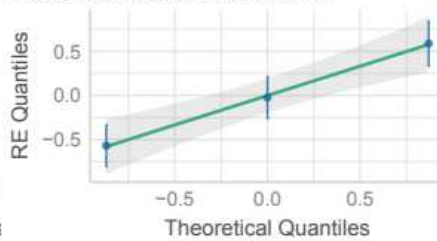
Normality of Residuals

Dots should fall along the line



Normality of Random Effects (replicate)

Dots should be plotted along the line



Plot

```
ft.albo = data.frame(ggpredict(model = mod.glmr.albo, terms = c("treatment")))
ft.albo$Specft.albo$Species = 'Ae. albopictus'

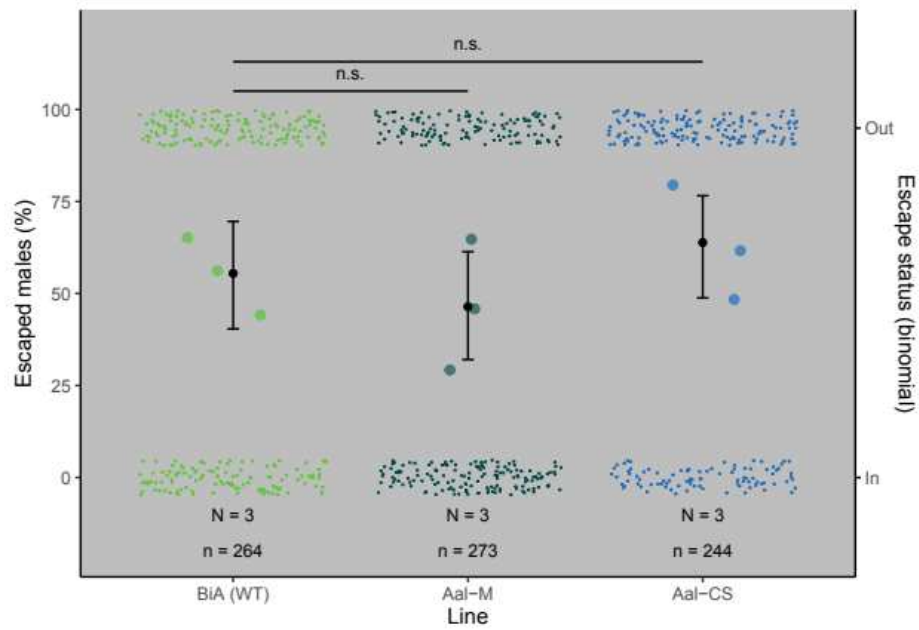
ft.plot.alb =
  ggplot(data = NULL) +
  geom_point(data = flight_albo,
    aes(x = jitter(as.numeric(factor(Line))),
      y = esc, color = Line),
    size = 2, alpha = .6) +
  geom_point(data = ft.albo,
    aes(x = as.numeric(x),
      y = predicted * 100),
```

```

      size = 1.5, color = 'black') +
geom_errorbar(data = ft.albo,
  aes(x = as.numeric(x),
      ymin = conf.low* 100,
      ymax = conf.high* 100),
  width = 0.05, color = 'black') +
geom_point(data = flight.albo,
  aes(x = jitter(as.numeric(factor(treatment))), factor = 2),
  y = jitter((result * 95), factor = .25),
  color = treatment),
  #alpha = .25,
  size = .1) +
annotate(geom = 'text', x= flight.alb.summary$pos, y=-20,
  label = paste0('n = ', flight.alb.summary$value),
  size = 3) +
annotate(geom = 'text', x= flight.alb.summary$pos, y=-10,
  label = 'N = 3',
  size = 3) +
annotate(geom = 'line', x= 1:3, y=113) +
annotate(geom = 'text', x= 2, y=118,
  label = 'n.s.',
  size = 3) +
annotate(geom = 'line', x= 1:2, y=105) +
annotate(geom = 'text', x= 1.5, y=110,
  label = 'n.s.',
  size = 3) +
scale_x_continuous(breaks = 1:3,
  labels = c("BiA (WT)",
    "Aal-M",
    "Aal-CS"),
  limits = c(.5,3.5)) +
scale_y_continuous(sec.axis = sec_axis(-., breaks = c(0,95),
  labels = c('In', 'Out'),
  name = 'Escape status (binomial)'),
  limits = c(-20,120),
  breaks = c(0,25,50,75,100)) +
scale_color_manual(values = line.color.alb, labels = names(line.color.alb)) +
labs(x = 'Line',
  y = 'Escaped males (%)') +
theme_classic() +
theme(legend.position = 'none',
  axis.title.y.right = element_text(color = 'black'),
  axis.ticks.y.right = element_line(color = 'black'),
  axis.line.y.right = element_line(color = 'black'),
  panel.background = element_rect(fill = 'grey'))

ft.plot.alb

```



Adult survival

Aegypiti

Data

```
data_aeg <- read.table("data/Survival_aeg.txt", h=T)
data_aeg$Line[data_aeg$Line=='Bra-(WT)'] = 'Bra (WT)'
data_aeg$Line = factor(data_aeg$Line,
                        levels = c('Bra (WT)', 'Aaeg-M', 'Aaeg-CS'))
head(data_aeg)
```

Replicate	Line	larvae	adults	larval_deaths	male_adults	D1	D2	D3	D4	D5	D6
1	1 Aaeg-M	100	87	13	87	0	0	0	0	0	0
2	2 Aaeg-M	100	82	18	82	0	0	0	0	0	0
3	3 Aaeg-M	100	93	7	93	1	0	0	0	1	0
4	4 Aaeg-M	100	73	27	73	0	0	0	0	0	0
5	1 Bra (WT)	200	185	15	82	0	0	0	0	0	0
6	2 Bra (WT)	200	197	3	97	0	0	0	0	2	0

	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14
1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	1	0	0	0	0	0	1

```

5 0 0 0 0 0 0 1 0
6 0 0 0 0 0 0 0 0

```

```

# First, melt the data.frame
data1 <- melt(data_aeg , .(Replicate,Line, larvae, adults, larval_deaths, male_adults))
# Transform days in numbers
data1$variable <- as.numeric(str_replace(data1$variable, "D",""))

#Sort by Line, Replicate and variable.
data2 <- arrange(data1, Line, Replicate, variable )
event <- subset(data2, value>0)

dat <- NULL
temporary_event <- NULL
for (i in 1:nrow(event)) {
  N <- event[i, "value"]
  dat <- data.frame(Replicate=rep(event[i,"Replicate"],N) ,Line=rep(event[i,"Line"],N) ,larvae=rep(event[i,"larvae"],N) ,adults=rep(event[i,"adults"],N) ,larval_deaths=rep(event[i,"larval_deaths"],N) ,male_adults=rep(event[i,"male_adults"],N))
  temporary_event <- rbind(temporary_event ,dat )
}

dat <- data.frame(Replicate=1, Line="Aaeg-M", larvae=100, adults=87, larval_deaths=13, male_adults=87,
dat1 <- data.frame(Replicate=2, Line="Aaeg-M", larvae=100, adults=82, larval_deaths=18, male_adults=82

temporary_event <- rbind(temporary_event, dat, dat1)

# Add the censored values.
censored <- unique(ddply(temporary_event,
                          .(Replicate,Line,larvae,adults,larval_deaths,male_adults),
                          summarise,
                          variable=Day,
                          Event=sum(Event),
                          Censored=(male_adults-Event))[, -7])
censored$variable <- max(data2$variable)

dat <- NULL
temporary <- NULL
for (i in 1:nrow(censored)) {
  N <- censored[i, "Censored"]
  dat <- data.frame(Replicate=rep(censored[i,"Replicate"],N) ,Line=rep(censored[i,"Line"],N) ,larvae=rep(censored[i,"larvae"],N) ,adults=rep(censored[i,"adults"],N) ,larval_deaths=rep(censored[i,"larval_deaths"],N) ,male_adults=rep(censored[i,"male_adults"],N))
  temporary <- rbind(temporary,dat )
}

data_surv <- rbind(temporary_event, temporary)
data_surv <- arrange(data_surv, Line,Replicate,desc(Event),Day)

SurvObj <- with(data_surv, Surv(Day, Event))

```

Model

```

my.KMest <- survfit(SurvObj ~ Line , conf.int=0.95, data = data_surv)
summary(my.KMest)

```

```
Call: survfit(formula = SurvObj ~ Line, data = data_surv, conf.int = 0.95)
```

```

Line=Bra (WT)
time n.risk n.event survival std.err lower 95% CI upper 95% CI
  1    791      5    0.994 0.00282    0.988    0.999
  2    786      2    0.991 0.00333    0.985    0.998
  5    784      4    0.986 0.00416    0.978    0.994
  6    780      1    0.985 0.00435    0.976    0.993
  7    779      2    0.982 0.00469    0.973    0.992
 10    777      2    0.980 0.00501    0.970    0.990
 12    775      1    0.979 0.00516    0.968    0.989
 13    774      2    0.976 0.00544    0.965    0.987

```

```

Line=Aaeg-M
time n.risk n.event survival std.err lower 95% CI upper 95% CI
  1    757      5    0.993 0.00294    0.988    0.999
  2    752      1    0.992 0.00322    0.986    0.998
  5    751      2    0.989 0.00372    0.982    0.997
  7    749      2    0.987 0.00415    0.979    0.995
  8    747      3    0.983 0.00472    0.974    0.992
 11    744      1    0.982 0.00490    0.972    0.991
 14    743      1    0.980 0.00507    0.970    0.990

```

```

Line=Aaeg-CS
time n.risk n.event survival std.err lower 95% CI upper 95% CI
  2    420      2    0.995 0.00336    0.989    1.000
  5    418      1    0.993 0.00411    0.985    1.000
 11    417      1    0.990 0.00474    0.981    1.000
 14    416      1    0.988 0.00529    0.978    0.999

```

```

df = data.frame(t = my.KMest$time,
                 nb.rk = my.KMest$n.risk,
                 line = c(rep(names(my.KMest$strata[1]),
                               my.KMest$strata[1]),
                           rep(names(my.KMest$strata[2]),
                               my.KMest$strata[2]),
                           rep(names(my.KMest$strata[3]),
                               my.KMest$strata[3])))
)

# df$t[df$line == 'Line=MyriaF' & df$t==4] = 7
df$t[df$line == 'Line=Aaeg-CS' & df$t==5] = 7
# df$t[df$line == 'Line=MyriaF' & df$t==3] = 1
df$t[df$line == 'Line=Aaeg-CS' & df$t==2] = 1

# Test differences of survival at 7 and 14 days
data_aeg.sum =
  data_aeg %>%
  group_by(Line, Replicate) %>%
  dplyr::summarise(sur.7 = (male_adults - (D1 + D2 + D3 + D4 + D5 + D6 + D7))/ male_adults,
                  sur.14 = (male_adults - (D1 + D2 + D3 + D4 + D5 + D6 + D7 + D8 + D9 + D10 + D11 + D14 + D13)

mod.surv.7 = lm(data = data_aeg.sum,
                formula = sur.7 ~ Line)

```

```
summary(mod.surv.7)
```

Call:

```
lm(formula = sur.7 ~ Line, data = data_aeg.sum)
```

Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-0.030523	-0.004965	0.002688	0.008733	0.017097

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	0.982904	0.004902	200.529	<2e-16 ***
LineAaeg-M	0.004884	0.006932	0.705	0.491
LineAaeg-CS	0.009954	0.008490	1.172	0.257

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 0.01386 on 17 degrees of freedom

Multiple R-squared: 0.07789, Adjusted R-squared: -0.0306

F-statistic: 0.7179 on 2 and 17 DF, p-value: 0.502

```
TukeyHSD(aov(mod.surv.7))
```

Tukey multiple comparisons of means
95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = mod.surv.7)

\$Line		diff	lwr	upr	p adj
Aaeg-M-Bra (WT)	0.004884479	-0.01289814	0.02266710	0.7640413	
Aaeg-CS-Bra (WT)	0.009953603	-0.01182557	0.03173277	0.4848501	
Aaeg-CS-Aaeg-M	0.005069124	-0.01671005	0.02684830	0.8235245	

```
mod.surv.14 = lm(data = data_aeg.sum,
  formula = sur.14 ~ Line)
```

```
summary(mod.surv.14)
```

Call:

```
lm(formula = sur.14 ~ Line, data = data_aeg.sum)
```

Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-0.025193	-0.009310	0.002312	0.010522	0.020920

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	0.977574	0.005019	194.776	<2e-16 ***
LineAaeg-M	0.001505	0.007098	0.212	0.835
LineAaeg-CS	0.008140	0.008693	0.936	0.362

```
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

```
Residual standard error: 0.0142 on 17 degrees of freedom
Multiple R-squared:  0.05089,    Adjusted R-squared:  -0.06077
F-statistic: 0.4558 on 2 and 17 DF,  p-value: 0.6415
```

```
TukeyHSD(aov(mod.surv.14))
```

```
Tukey multiple comparisons of means
95% family-wise confidence level
```

```
Fit: aov(formula = mod.surv.14)
```

```
$Line
              diff          lwr          upr          p adj
Aaeg-M-Bra (WT) 0.001505310 -0.01670328 0.01971390 0.9755453
Aaeg-CS-Bra (WT) 0.008139992 -0.01416088 0.03044087 0.6254566
Aaeg-CS-Aaeg-M  0.006634682 -0.01566619 0.02893556 0.7299193
```

```
Replication
```

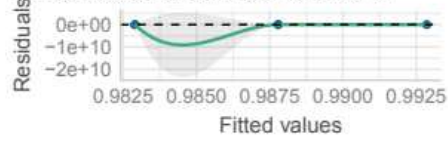
```
# A tibble: 3 x 3
  Line      N      n
  <fct>    <int> <int>
1 Bra (WT)      8    791
2 Aaeg-M        8    755
3 Aaeg-CS       4    420
```

```
Model quality
```

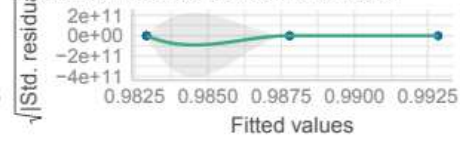
```
check_model(mod.surv.7)
```


Linearity

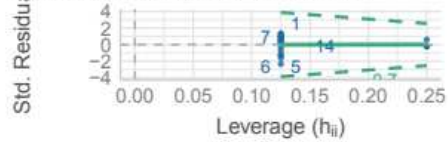
Reference line should be flat and horizontal

**Homogeneity of Variance**

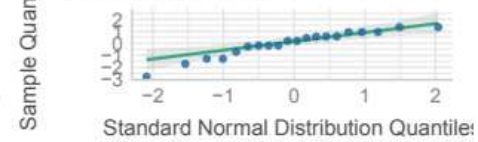
Reference line should be flat and horizontal

**Influential Observations**

Points should be inside the contour lines

**Normality of Residuals**

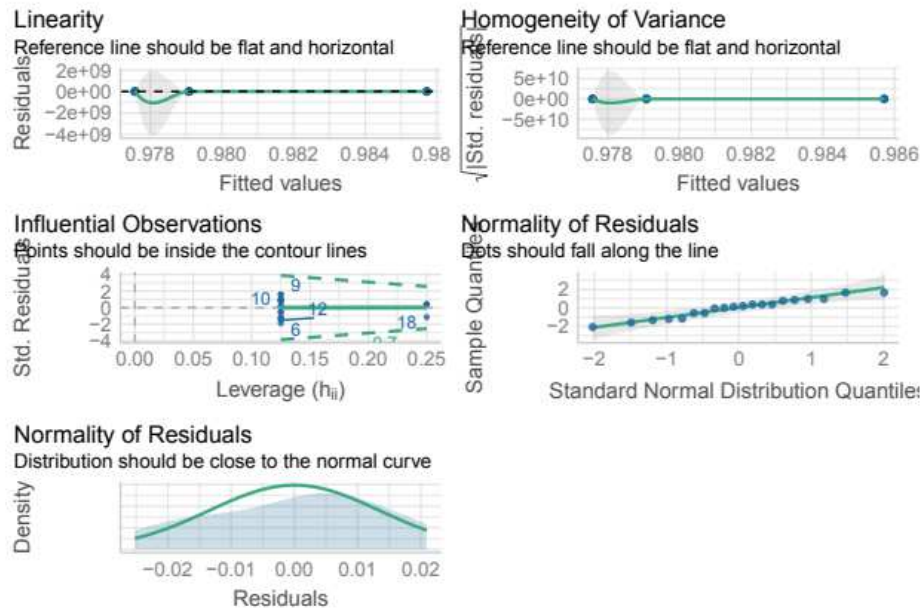
Points should fall along the line

**Normality of Residuals**

Distribution should be close to the normal curve



```
check_model(mod.surv.14)
```

Plot .

```
ggsurv <-
  ggsvrplot(my.KMest,
    data = data_surv,
    conf.int = T,
    risk.table = T,
    pval = T,
    risk.table.height = 0.25)

line.color.aeg = c("#24ff24", "#004949", "#006ddb")
names(line.color.aeg) = c('Line=Bra (WT)', 'Line=Aaeg-M', 'Line=Aaeg-CS')

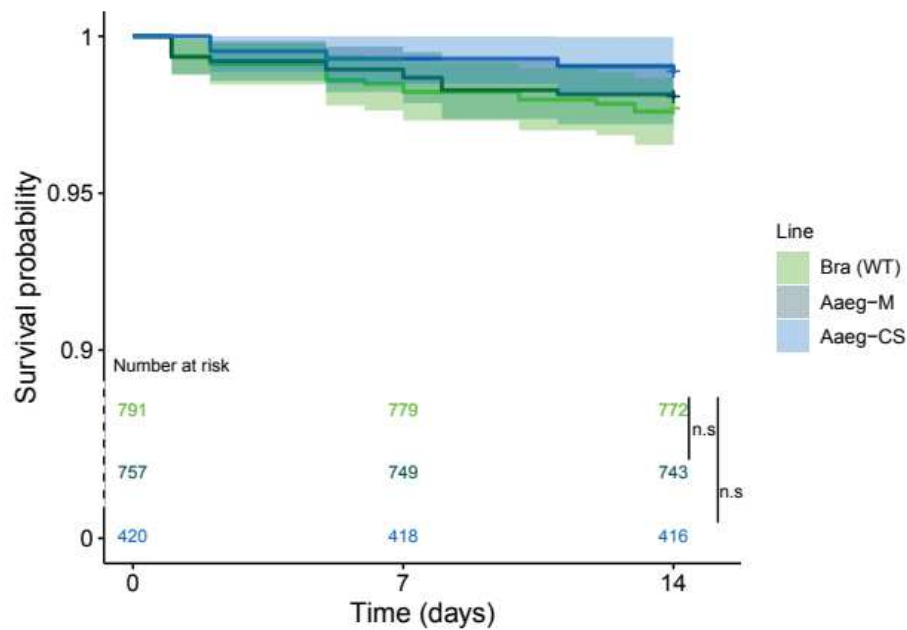
p.aeg =
  ggsvr$plot +
  labs(x = 'Time (days)') +
  scale_y_continuous(limits = c(.84, 1),
    breaks = c(.84, .90, .95, 1),
    labels = c(0, .90, .95, 1)) +
  scale_x_continuous(breaks = c(0, 7, 14)) +
  scale_color_manual(breaks = names(line.color.aeg),
    values = line.color.aeg,
    guide = 'none') +
  scale_fill_manual(breaks = names(line.color.aeg),
    values = line.color.aeg,
```

```

        labels = c("Bra (WT)", "Aaeg-M", "Aaeg-CS"),
        name = "Line") +
theme(axis.line.y = element_blank(),
      legend.position = 'right',
      panel.background = element_rect(fill = 'white')) +
annotate(geom = 'segment', x = -Inf, xend = -Inf,
        y = -Inf, yend = Inf) +
annotate(geom = 'segment', x = -Inf, xend = -Inf,
        y = .85, yend = .89, linetype = 'dashed', color = 'white') +
annotate(geom = 'text',
        x = -.5, y = .895,
        label = "Number at risk",
        hjust = 0, size = 3) +
annotate(geom = 'text',
        x = rep(0, 3), y = seq(.841, .881, .02),
        label = rev(df$nb.rk[df$t == 1]),
        color = rev(c("#24ff24", "#004949", "#006ddb")),
        size = 3) +
annotate(geom = 'text',
        x = rep(7, 3), y = seq(.841, .881, .02),
        label = rev(df$nb.rk[df$t == 7]),
        color = rev(c("#24ff24", "#004949", "#006ddb")),
        size = 3) +
annotate(geom = 'text',
        x = rep(14, 3), y = seq(.841, .881, .02),
        label = rev(df$nb.rk[df$t == 14]),
        color = rev(c("#24ff24", "#004949", "#006ddb")),
        size = 3) +
annotate(geom = 'text', x = 14.8, y = .875, label = 'n.s', size = 3) +
annotate(geom = "line", x = rep(14.4, 2), y = c(.865, .885)) +
annotate(geom = 'text', x = 15.5, y = .855, label = 'n.s', size = 3) +
annotate(geom = "line", x = rep(15.15, 2), y = c(.845, .885))

p.aeg

```



Albopictus

Data

```
data_albo <- read.table("data/Survival_albo.txt", h=T)
data_albo$Line[data_albo$Line=='BiA-(WT)'] = 'BiA (WT)'
data1 <- melt(data_albo, .(Replicate, Line, larvae, adults, larval_deaths, male_adults))
#Then transform days in numbers
data1$variable <- as.numeric(str_replace(data1$variable, "D", ""))
#Sort by Line, Replicate and variable.
data2 <- arrange(data1, Line, Replicate, variable)
#We now separate the data set in two parts: individuals that has experienced an event(death) and censor

event <- subset(data2, value>0)

#We will now work of the dataset with individuals experiencig an event.

dat <- NULL
temporary_event <- NULL
for (i in 1:nrow(event)) {
  N <- event[i, "value"]
  dat <- data.frame(Replicate=rep(event[i, "Replicate"], N), Line=rep(event[i, "Line"], N), larvae=rep(event[i, "larvae"], N), adults=rep(event[i, "adults"], N), larval_deaths=rep(event[i, "larval_deaths"], N), male_adults=rep(event[i, "male_adults"], N))
  temporary_event <- rbind(temporary_event, dat)
}
```

```
temporary_event #here is or transformed dataset with one row for each time we have an event.
```

	Replicate	Line	larvae	adults	larval_deaths	male_adults	Day	Event
1	1	Aal-CS	100	71	29	71	5	1
2	1	Aal-CS	100	71	29	71	7	1
3	1	Aal-CS	100	71	29	71	13	1
4	1	Aal-CS	100	71	29	71	13	1
5	2	Aal-CS	100	73	27	73	4	1
6	2	Aal-CS	100	73	27	73	4	1
7	2	Aal-CS	100	73	27	73	11	1
8	2	Aal-CS	100	73	27	73	13	1
9	3	Aal-CS	100	61	39	61	13	1
10	4	Aal-CS	100	69	31	69	8	1
11	1	Aal-M	100	88	12	88	1	1
12	1	Aal-M	100	88	12	88	2	1
13	1	Aal-M	100	88	12	88	4	1
14	1	Aal-M	100	88	12	88	4	1
15	1	Aal-M	100	88	12	88	12	1
16	2	Aal-M	100	79	21	79	1	1
17	2	Aal-M	100	79	21	79	2	1
18	2	Aal-M	100	79	21	79	6	1
19	2	Aal-M	100	79	21	79	10	1
20	3	Aal-M	100	80	20	80	1	1
21	3	Aal-M	100	80	20	80	8	1
22	3	Aal-M	100	80	20	80	12	1
23	4	Aal-M	100	77	23	73	1	1
24	1	BiA (WT)	200	103	97	56	1	1
25	1	BiA (WT)	200	103	97	56	1	1
26	1	BiA (WT)	200	103	97	56	2	1
27	1	BiA (WT)	200	103	97	56	4	1
28	2	BiA (WT)	200	141	59	96	1	1
29	2	BiA (WT)	200	141	59	96	2	1
30	2	BiA (WT)	200	141	59	96	13	1
31	4	BiA (WT)	200	130	70	76	1	1
32	4	BiA (WT)	200	130	70	76	9	1

```
#BiA rep3 has no event over the course of the study, we add it manually so that it would appear.
```

```
dat <- data.frame(Replicate=3, Line="BiA (WT)", larvae=200, adults=129, larval_deaths=71, male_adults=
```

```
temporary_event <- rbind(temporary_event, dat)
```

```
#We now add the censored values.
```

```
censored <- unique(ddply(temporary_event, .(Replicate,Line,larvae,adults,larval_deaths,male_adults), su  
censored$variable <- max(data2$variable)
```

```
dat <- NULL
```

```
temporary <- NULL
```

```
for (i in 1:nrow(censored)) {
```

```
  N <- censored[i, "Censored"]
```

```
  dat <- data.frame(Replicate=rep(censored[i,"Replicate"],N), Line=rep(censored[i,"Line"],N), larvae=re
```

```
temporary <- rbind(temporary,dat )
```

```

}

#Bind the final dataset
data_surv <- rbind(temporary_event, temporary)
data_surv <- arrange(data_surv, Line, Replicate, desc(Event), Day)

SurvObj <- with(data_surv, Surv(Day, Event))

```

Model

```

my.KMest <- survfit(SurvObj ~ Line, conf.int=0.95, data = data_surv)
summary(my.KMest)

```

Call: survfit(formula = SurvObj ~ Line, data = data_surv, conf.int = 0.95)

```

      Line=Aal-CS
time n.risk n.event survival std.err lower 95% CI upper 95% CI
  4    274      2    0.993 0.00514    0.983    1.000
  5    272      1    0.989 0.00629    0.977    1.000
  7    271      1    0.985 0.00725    0.971    1.000
  8    270      1    0.982 0.00809    0.966    0.998
 11    269      1    0.978 0.00884    0.961    0.996
 13    268      4    0.964 0.01133    0.942    0.986

```

```

      Line=Aal-M
time n.risk n.event survival std.err lower 95% CI upper 95% CI
  1    320      4    0.988 0.00621    0.975    1.000
  2    316      2    0.981 0.00758    0.967    0.996
  4    314      2    0.975 0.00873    0.958    0.992
  6    312      1    0.972 0.00924    0.954    0.990
  8    311      1    0.969 0.00973    0.950    0.988
 10    310      1    0.966 0.01018    0.946    0.986
 12    309      2    0.959 0.01104    0.938    0.981

```

```

      Line=BiA (WT)
time n.risk n.event survival std.err lower 95% CI upper 95% CI
  1    320      4    0.988 0.00621    0.975    1.000
  2    316      2    0.981 0.00758    0.967    0.996
  4    314      1    0.978 0.00818    0.962    0.994
  9    313      1    0.975 0.00873    0.958    0.992
 13    312      1    0.972 0.00924    0.954    0.990

```

```

df = data.frame(t = my.KMest$time,
  nb.rk = my.KMest$n.risk,
  line = c(rep(names(my.KMest$strata[1]),
    my.KMest$strata[1]),
    rep(names(my.KMest$strata[2]),
    my.KMest$strata[2]),
    rep(names(my.KMest$strata[3]),
    my.KMest$strata[3]))
)

```

```

df$t[df$line == 'Line=Aal-M' & df$t==6] = 7
df$t[df$line == 'Line=BiA (WT)' & df$t==4] = 7
df$t[df$line == 'Line=Aal-CS' & df$t==4] = 1

df$line = factor(df$line, levels = c('Line=BiA (WT)', 'Line=Aal-M', 'Line=Aal-CS'))
df = df[order(df$line),]

data_albo.sum =
  data_albo %>%
  group_by(Line, Replicate) %>%
  dplyr::summarise(sur.7 = (male_adults - (D1 + D2 + D3 + D4 + D5 + D6 + D7))/ male_adults,
                   sur.14 = (male_adults - (D1 + D2 + D3 + D4 + D5 + D6 + D7 + D8 + D9 + D10 + D11 + D14 + D13)

data_albo.sum$Line = data_albo.sum$Line %>%
  factor(., levels = c('BiA (WT)', 'Aal-M', 'Aal-CS'))

mod.surv.7 = lm(data = data_albo.sum,
                formula = sur.7 ~ Line)

summary(mod.surv.7)

```

Call:

```
lm(formula = sur.7 ~ Line, data = data_albo.sum)
```

Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-0.045074	-0.013699	0.009359	0.013892	0.026355

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	0.973645	0.011243	86.600	1.85e-14 ***
LineAal-M	-0.001052	0.015900	-0.066	0.949
LineAal-CS	0.012463	0.015900	0.784	0.453

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 0.02249 on 9 degrees of freedom

Multiple R-squared: 0.09038, Adjusted R-squared: -0.1118

F-statistic: 0.4471 on 2 and 9 DF, p-value: 0.6529

```
TukeyHSD(aov(mod.surv.7))
```

Tukey multiple comparisons of means
95% family-wise confidence level

```
Fit: aov(formula = mod.surv.7)
```

\$Line		diff	lwr	upr	p adj
Aal-M-BiA (WT)		-0.001052015	-0.04544497	0.04334094	0.9975900
Aal-CS-BiA (WT)		0.012463381	-0.03192957	0.05685634	0.7216963
Aal-CS-Aal-M		0.013515396	-0.03087756	0.05790835	0.6831225


```
mod.surv.14 = lm(data = data_albo.sum,
  formula = sur.14 ~ Line)

summary(mod.surv.14)
```

Call:

```
lm(formula = sur.14 ~ Line, data = data_albo.sum)
```

Residuals:

	Min	1Q	Median	3Q	Max
	-0.039180	-0.017525	0.003466	0.019333	0.032249

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	0.967751	0.011931	81.111	3.33e-14 ***
LineAal-M	-0.001448	0.016873	-0.086	0.933
LineAal-CS	-0.003256	0.016873	-0.193	0.851

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 0.02386 on 9 degrees of freedom

Multiple R-squared: 0.004137, Adjusted R-squared: -0.2172

F-statistic: 0.0187 on 2 and 9 DF, p-value: 0.9815

```
TukeyHSD(aov(mod.surv.14))
```

Tukey multiple comparisons of means
95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = mod.surv.14)

\$Line

	diff	lwr	upr	p adj
Aal-M-BiA (WT)	-0.001447932	-0.04855825	0.04566239	0.9959503
Aal-CS-BiA (WT)	-0.003256096	-0.05036641	0.04385422	0.9797262
Aal-CS-Aal-M	-0.001808164	-0.04891848	0.04530215	0.9936934

Replication

A tibble: 3 x 3

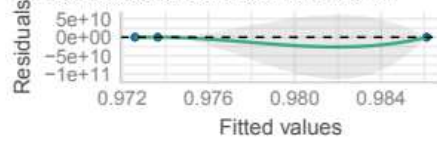
	Line	N	n
	<chr>	<int>	<int>
1	Aal-CS	4	274
2	Aal-M	4	320
3	BiA (WT)	4	319

Model quality

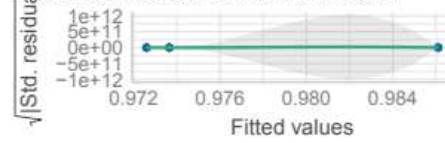
```
check_model(mod.surv.7)
```

Linearity

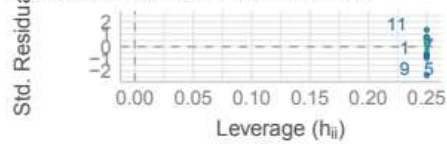
Reference line should be flat and horizontal

**Homogeneity of Variance**

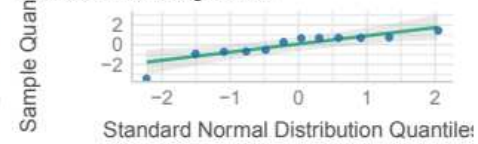
Reference line should be flat and horizontal

**Influential Observations**

Points should be inside the contour lines

**Normality of Residuals**

Points should fall along the line

**Normality of Residuals**

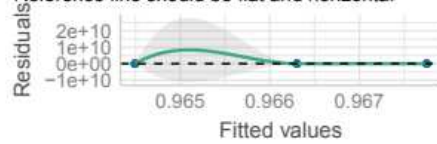
Distribution should be close to the normal curve



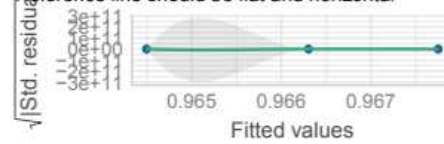
```
check_model(mod.surv.14)
```


Linearity

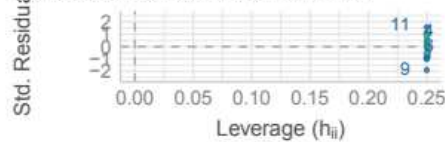
Reference line should be flat and horizontal

**Homogeneity of Variance**

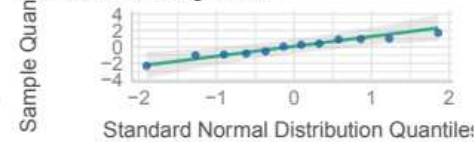
Reference line should be flat and horizontal

**Influential Observations**

Points should be inside the contour lines

**Normality of Residuals**

Points should fall along the line

**Normality of Residuals**

Distribution should be close to the normal curve

**Plot**

```

ggsurv <-
  gg survplot(my.KMest,
    data = data_surv,
    conf.int = T,
    risk.table = T,
    pval = T,
    risk.table.height = 0.25)

line.color.alb = c("#24ff24", "#004949", "#006ddb")
names(line.color.alb) = c('Line=BiA (WT)', 'Line=Aal-M', 'Line=Aal-CS')

p.albo =
  gg surv$plot +
    labs(x = 'Time (days)') +
    scale_y_continuous(limits = c(.84, 1),
                      breaks = c(.84, .90, .95, 1),
                      labels = c(0, .90, .95, 1)) +
    scale_x_continuous(breaks = c(0, 7, 14)) +
    scale_color_manual(breaks = names(line.color.alb),
                      values = line.color.alb,
                      guide = 'none') +
    scale_fill_manual(breaks = names(line.color.alb),
                     values = line.color.alb,

```

```

        labels = c("BiA (WT)", "Aal-M", "Aal-CS"),
        name = "Line: ") +
theme(axis.line.y = element_blank(),
      legend.position = 'right',
      panel.background = element_rect(fill = 'grey')) +
annotate(geom = 'segment', x = -Inf, xend = -Inf,
        y = -Inf, yend = Inf) +
annotate(geom = 'segment', x = -Inf, xend = -Inf,
        y = .85, yend = .89, linetype = 'dashed', color = 'white') +
annotate(geom = 'text',
        x = -.5, y = .895,
        label = "Number at risk",
        hjust = 0, size = 3) +
annotate(geom = 'text',
        x = rep(0, 3), y = seq(.841, .881, .02),
        label = rev(df$nb.rk[df$t == 1]),
        color = rev(c("#24ff24", "#004949", "#006ddb")),
        size = 3) +
annotate(geom = 'text',
        x = rep(7, 3), y = seq(.841, .881, .02),
        label = rev(df$nb.rk[df$t == 7]),
        color = rev(c("#24ff24", "#004949", "#006ddb")),
        size = 3) +
annotate(geom = 'text',
        x = rep(14, 3), y = seq(.841, .881, .02),
        label = rev(df$nb.rk[df$t == 14]),
        color = rev(c("#24ff24", "#004949", "#006ddb")),
        size = 3) +
annotate(geom = 'text', x = 14.8, y = .875, label = 'n.s', size = 3) +
annotate(geom = "line", x = rep(14.4, 2), y = c(.865, .885)) +
annotate(geom = 'text', x = 15.5, y = .855, label = 'n.s', size = 3) +
annotate(geom = "line", x = rep(15.15, 2), y = c(.845, .885))

```

p.albo

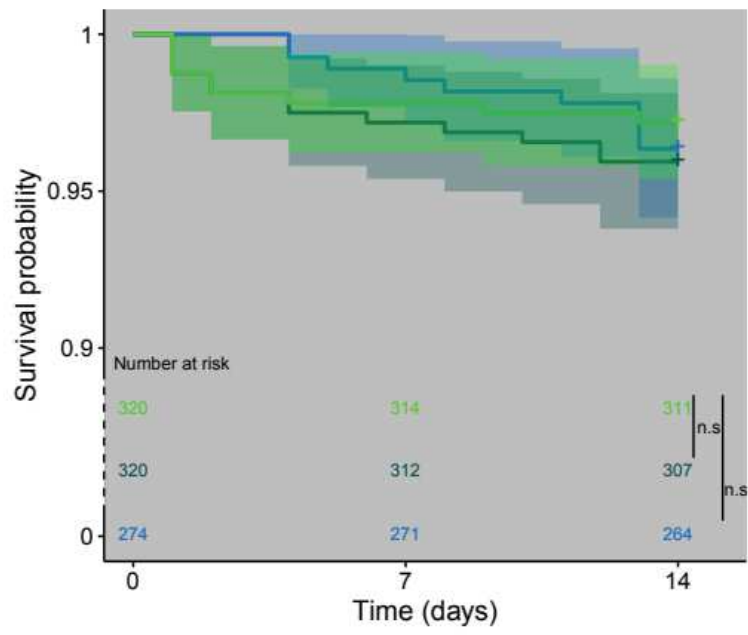


Figure 6

Data

```

speed.aeg = read.csv('data/Speed-test_aeg.csv', sep = ';') %>%
  mutate(recovery = 100*recovered_males/total_males) %>%
  mutate(contamination = 100*contamination/total_males)

speed.albo = read.csv('data/Speed-test_albo.csv', sep = ';') %>%
  mutate(recovery = 100*recovered_males/total_males) %>%
  mutate(contamination = 100*contamination/total_males)

head(speed.aeg)

```

	Replicate	Volume	Larval_concentration	Mean_speed	total_males	recovered_males
1	1	500	20	6	3924.536	3619
2	2	500	20	6	3898.820	3578
3	3	500	20	6	3829.696	3556
4	1	250	40	12	3672.180	3328
5	2	250	40	12	3366.765	2927
6	3	250	40	12	3408.405	3037

	contamination	recovery
1	0	92.21472
2	0	91.77136
3	0	92.85332
4	0	90.62737
5	0	86.93805
6	0	89.10326

Model

Recovery

```

#
speed.lm = lm(formula = recovery~Mean_speed,
              data = speed.aeg)

speed.poly2 = lm(formula = recovery~poly(Mean_speed, degree = 2),
                 data = speed.aeg)

speed.poly3 = lm(formula = recovery~poly(Mean_speed, degree = 3),
                 data = speed.aeg)

speed.poly4 = lm(formula = recovery~poly(Mean_speed, degree = 4),
                 data = speed.aeg)

speed.log = lm(formula = recovery~log(Mean_speed),
               data = speed.aeg)

compare_performance(speed.lm, speed.log, speed.poly2, speed.poly3, speed.poly4)

```

Comparison of Model Performance Indices

Name	Model	AIC	AIC weights	BIC	BIC weights	R2	R2 (adj.)	RMSE	Sigma
speed.lm	lm	107.090	< 0.001	109.215	< 0.001	0.917	0.911	7.034	7.556
speed.log	lm	103.154	< 0.001	105.278	< 0.001	0.936	0.932	6.169	6.626
speed.poly2	lm	82.932	0.409	85.764	0.518	0.986	0.983	2.941	3.288
speed.poly3	lm	82.824	0.432	86.365	0.383	0.987	0.984	2.742	3.201
speed.poly4	lm	84.823	0.159	89.072	0.099	0.987	0.982	2.742	3.358

Best model:

```
summary(speed.poly2)
```

Call:

```
lm(formula = recovery ~ poly(Mean_speed, degree = 2), data = speed.aeg)
```

Residuals:

```
      Min       1Q   Median       3Q      Max
-6.2202 -1.0021  0.2709  1.1871  6.7801
```

Coefficients:

```
              Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
(Intercept)      65.498      0.849   77.144 < 2e-16 ***
poly(Mean_speed, degree = 2)1  -90.774      3.288 -27.605 3.15e-12 ***
poly(Mean_speed, degree = 2)2   24.746      3.288   7.526 6.99e-06 ***
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Residual standard error: 3.288 on 12 degrees of freedom

Multiple R-squared: 0.9856, Adjusted R-squared: 0.9831

F-statistic: 409.3 on 2 and 12 DF, p-value: 9.089e-12

Contamination

```
conta.lm = lm(formula = contamination~Mean_speed,
              data = speed.aeg)

conta.poly2 = lm(formula = contamination~poly(Mean_speed, degree = 2),
                data = speed.aeg)

conta.poly3 = lm(formula = contamination~poly(Mean_speed, degree = 3),
                data = speed.aeg)

conta.poly4 = lm(formula = contamination~poly(Mean_speed, degree = 4),
                data = speed.aeg)

conta.log = lm(formula = contamination~log(Mean_speed),
               data = speed.aeg)
```

```
compare_performance(conta.lm,
                    conta.log,
                    conta.poly2,
                    conta.poly3,
                    conta.poly4)
```

Comparison of Model Performance Indices

Name	Model	AIC	AIC weights	BIC	BIC weights	R2	R2 (adj.)	RMSE	Sigma
conta.lm	lm	-17.088	0.138	-14.963	0.207	0.626	0.597	0.112	0.120
conta.log	lm	-8.249	0.002	-6.125	0.002	0.326	0.274	0.150	0.162
conta.poly2	lm	-19.887	0.561	-17.055	0.588	0.729	0.683	0.096	0.107
conta.poly3	lm	-18.007	0.219	-14.467	0.161	0.731	0.657	0.095	0.111
conta.poly4	lm	-16.007	0.081	-11.759	0.042	0.731	0.623	0.095	0.117

Best model

```
summary(conta.lm)
```

Call:

```
lm(formula = contamination ~ Mean_speed, data = speed.aeg)
```

Residuals:

```
      Min       1Q   Median       3Q      Max
-0.25076 -0.06549  0.03905  0.04709  0.24102
```

Coefficients:

```
              Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
(Intercept) -0.0551361  0.0422440  -1.305  0.214460
Mean_speed   0.0013403  0.0002872   4.667  0.000441 ***
```

```
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Residual standard error: 0.1204 on 13 degrees of freedom

Multiple R-squared: 0.6262, Adjusted R-squared: 0.5975

F-statistic: 21.78 on 1 and 13 DF, p-value: 0.0004409

Plot

```
pred.speed = ggpredict(speed.poly2) %>%
  data.frame()
pred.conta = ggpredict(conta.lm) %>%
  data.frame()

reco.plot =
  ggplot(data = NULL) +
    annotate(geom = 'line', x = c(60, 60), y = c(-Inf, 70),
             lty = 2, color = 'gray', size = 1) +
```

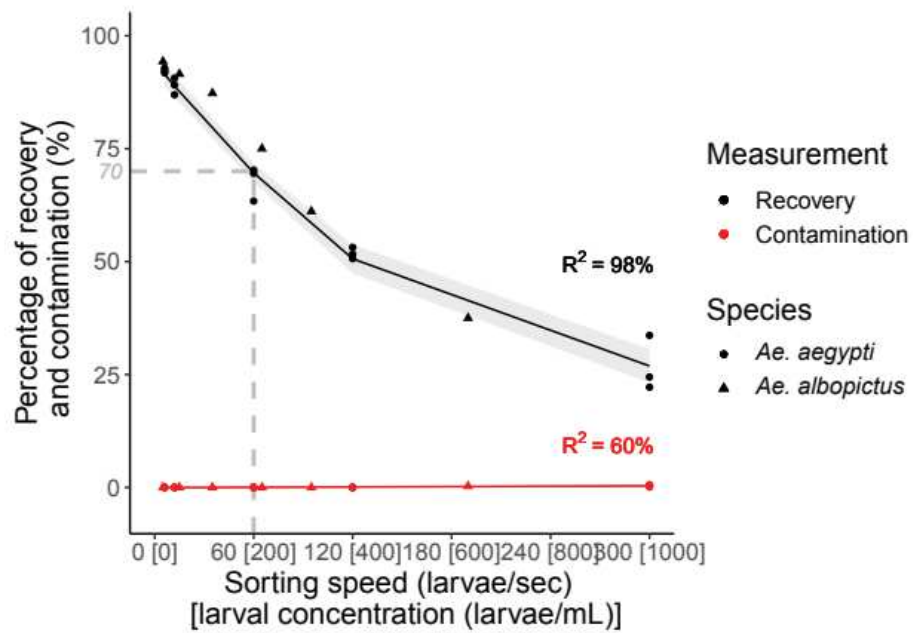
```

annotate(geom = 'line', x = c(-Inf, 60), y = c(70,70),
  lty = 2, color = 'gray', size = 1 ) +
geom_ribbon(data = pred.speed,
  aes(x = Mean_speed.x,
    ymin = Mean_speed.conf.low,
    ymax = Mean_speed.conf.high),
  fill = "grey", alpha=.3) +
geom_line(data= pred.speed,
  aes(Mean_speed.x,
    Mean_speed.predicted),
  col = "black") +
geom_ribbon(data = pred.conta,
  aes(x = Mean_speed.x,
    ymin = Mean_speed.conf.low,
    ymax = Mean_speed.conf.high),
  fill = "red", alpha=.3) +
geom_line(data= pred.conta,
  aes(x = Mean_speed.x,
    y = Mean_speed.predicted),
  col="red") +
geom_point(data = speed.aeg,
  aes(x = Mean_speed,
    y = recovery,
    col = 'Recovery', pch = "Ae. Aegypti")) +
geom_point(data = speed.aeg,
  aes(x = Mean_speed,
    y = contamination,
    col = 'Contamination', pch = "Ae. Aegypti")) +
geom_point(data = speed.albo,
  aes(x = Mean_speed,
    y = recovery,
    col = 'Recovery', pch = "Ae. Albopictus")) +
geom_point(data = speed.albo,
  aes(x = Mean_speed,
    y = contamination,
    col = 'Contamination', pch = "Ae. Albopictus")) +
annotate(geom='text', x = -27, y =70, label = bquote(italic('70')), color = 'gray') +
annotate(geom='text', x = 275, y =50, label = bquote(R^2 ~ '=' 98%), color = 'black') +
annotate(geom='text', x = 275, y =10, label = bquote(R^2 ~ '=' 60%), color = 'red') +
labs(x = 'Sorting speed (larvae/sec) \n [larval concentration (larvae/mL)]',
  y = 'Percentage of recovery\n and contamination (%)',
  color = "Measurement" ,
  pch = "Species") +
scale_y_continuous(breaks = seq(0,100,25)) +
scale_x_continuous(breaks = seq(0, 300, 60),
  labels = c("0 [0]", '60 [200]', '120 [400]', '180 [600]', '240 [800]', '300 [1000]
scale_shape_manual(labels = c(bquote(italic("Ae. aegypti")),
  bquote(italic("Ae. albopictus"))),
  values = c(16, 17)) +
scale_color_manual(labels = c("Recovery",
  "Contamination"),
  values = c(Recovery = "black", Contamination = "red")) +
coord_cartesian(xlim = c(0,300), ylim = c(-5,100), clip = 'off') +

```



```
theme_classic() +
  theme(text = element_text(size = 15),
        legend.position = 'right')
reco.plot
```



Supplementary Data 3: Plasmid and genomic integration nucleotide sequences

1. pX4 plasmid used for CRISPR/Cas9 knock-in of a Pub-GFP cassette into exon 6 of the *Aedes aegypti* M-linked gene AAEL019619 (Addgene #183903)
2. Nucleotide sequence of three gRNA expression cassettes, each under the control of a different *Aedes aegypti* U6 promoter, used to knock-in the pX4 GFP cassette in the *Ae. aegypti* M locus (Addgene #183912, #183913, #183914)
3. pX3 plasmid used for CRISPR/Cas9 knock-in into the *Aedes aegypti* m-linked gene AAEL019619 (Addgene #183904)
4. ppBAalbNixE1E3E4 PUB-YFP plasmid that produced M-linked *piggyBac* insertion Aalb-M on *Aedes albopictus* chromosome 1 (Addgene #173666)
5. *piggyBac* plasmid containing *Cas9* under control of the *Exuperentia* promoter, used to obtain the m-linked m-albR9 *Ae. albopictus* line (Addgene #183905)
6. pattBPUB-GFP, attB site-containing plasmid expressing *GFP* under control of the *Ae. aegypti* PUB promoter, inserted in the m-linked attP site of *Ae. albopictus* strain mX1 derived from m-albR9 (Addgene #183911)
7. Helper plasmid (*piggyBac* construct) used to express PhiC31 integrase under control of the PUB promoter (Addgene #183966)
8. Genomic sequence flanking the Aalb-m insertion on the 3' *piggyBac* side.

1. pX4 plasmid used for CRISPR/Cas9 knock-in of a Pub-GFP cassette into exon 6 of the *Aedes aegypti* M-linked gene AAEL019619 (Addgene #183903)

LOCUS pX4 6785 bp DNA circular 19-MAY-2021

```

FEATURES             Location/Qualifiers
     misc_feature     complement(603..727)
                     /note="attR4"
     misc_feature     complement(5090..5108)
                     /note="pDONR-RP"
     misc_feature     537..552
                     /note="M13F"
     misc_feature     complement(5046..5064)
                     /note="M13R"
     exon             1666..1738
                     /note="exon_id=AAEL019619-RC-E5.1"
     exon             1666..1738
                     /note="exon_id=AAEL019619-RA-E6.1"
     misc_feature     complement(1737..1738)
                     /note="gRNA1 X4 "
     CDS              1666..1687
                     /gene="AAEL019619.1"
                     /protein_id="AAEL019619-PC"
                     /note="transcript_id=AAEL019619-RC"
                     /db_xref="RefSeq_peptide:XP_021708495.1"
                     /db_xref="RefSeq_peptide:XP_021708495.1"
                     /db_xref="RefSeq_dna:XM_021852803.1"
                     /db_xref="Uniprot/SPTREMBL:A0A1S4FXT0"
                     /db_xref="Uniprot/SPTREMBL:Q16KX0"
                     /db_xref="GO:0005856"
                     /db_xref="GO:0030036"
                     /db_xref="UniParc:UPI000B789663"

```

/translation="MPFVQRVVTPKYVARSTKPSHSRGTAALPVQDYELEAITNLTL

NALRQLASLVLISNQIFTELNKELASVSERSLGKQRIIDNLSKRVEEFDPKQVAVPES

DLVAFSQIKNHYSTKYHIDTCLFTAETRTETLQELYDAAAKTPVSAIAEMDRIAGYNE

SDHLGSDAFLCTPVLGQTRRKLRAKVDMDIETRLPSAVEDLRKWTSIEAIGDTTVPPD

CTVRLTGNGSVILGNVSQNASPSYQAGTSASFDETDIIMVDSSSRGLGREQDTPLDH

RLPSPEEQCMIALKFPAETIKVDTSGKRFDRMCATRKSLHFVSTSEQAETNAAGGQ

QADGSDGDTIRRRSRPRRSRGKRRNTIAGTDQKEIAEVVNNGLSTFVP"
 /dnas_title="AAEL019619.1"
 misc_feature 778..1738
 /note="X4 5%82%C4%F4flk region"
 misc_feature 1922..2637
 /note="GFP"
 misc_feature 1739..1740
 /note="perfect intron splice acceptor site!"
 misc_feature complement(1753..1921)
 /note="Dm beta-Tub56D terminator"
 misc_feature complement(1808..1813)
 /note="polyA site"
 misc_feature 1739..1752
 /note="PRESERVED"
 misc_feature 1739..1920
 /note="gBlock"
 misc_feature complement(2643..3998)
 /note="PUB promoter"
 misc_feature 4024..4053
 /note="intron"
 misc_feature 4063..4081
 /note="gRNA2 X4"
 variation 4464..4464
 /replace="A/C"
 /db_xref="VBP0000121:supercont1.93:2165054"
 exon 4054..4137
 /note="exon_id=AAEL019619-RC-E5.1"
 misc_feature complement(4054..4070)
 /note="gRNA1 X4 "
 mRNA 4054..4137
 /gene="AAEL019619.1"
 /standard_name="AAEL019619-RC"
 /dnas_title="AAEL019619.1"
 variation 4720..4720
 /replace="G/A"
 /db_xref="VBP0000177:AX-93227275"
 misc_feature 4054..5018
 /note="X4 5%82%C4%F4 flk"

Annexes

source 1..6785
/dnas_title="knockin plasmid X4"

ORIGIN

```

1 CTTTCCTGCG TTATCCCCTG ATTCTGTGGA TAACCGTATT ACCGCCTTTG AGTGAGCTGA
61 TACCGCTCGC CGCAGCCGAA CGACCGAGCG CAGCGAGTCA GTGAGCGAGG AAGCGGAAGA
121 GCGCCCAATA CGCAAACCGC CTCTCCCCGC GCGTTGGCCG ATTCATTAAT GCAGCTGGCA
181 CGACAGGTTT CCCGACTGGA AAGCGGGCAG TGAGCGCAAC GCAATTAATA CGCGTACCGC
241 TAGCCAGGAA GAGTTTGTAG AAACGCAAAA AGGCCATCCG TCAGGATGGC CTTCTGCTTA
301 GTTTGTATGCC TGGCAGTTTA TGGCGGGCGT CCTGCCCCGC ACCCTCCGGG CCGTTGCTTC
361 ACAACGTTCA AATCCGCTCC CGGCGGATTT GTCCCTACTCA GGAGAGCGTT CACCGACAAA
421 CAACAGATAA AACGAAAGGC CCAGTCTTCC GACTGAGCCT TTCGTTTTAT TTGATGCCTG
481 GCAGTTCCTT ACTCTCGCGT TAACGCTAGC ATGGATGTTT TCCCAGTCAC GACGTTGTAA
541 AACGACGGCC AGTCTTAAGC TCGGGCCCCCT ACAGGTCACT AATACCATCT AAGTAGTTGA
601 TTCATAGTGA CTGGATATGT TGTGTTTTAC AGTATTATGT AGTCTGTTTT TTATGCAAAA
661 TCTAATTTAA TATATTGATA TTTATATCAT TTTACGTTTC TCGTTCAACT TTTCTATACA
721 AAGTTGGTAC CGGGCCCCCC GCTAGCGTCG ACGGTATCGA TAAGCTTGAT cggatccGCT
781 CCGTTGATTG ATGAATCATT GATTCTAGTA CTTAGTTGAT CAATAACTCT AACACGAAAA
841 TTACGGATAT AATTTCTGTA TTTCTGAATTT TGAGGGTTTT GTTAGATGAA CTTTGATTTA
901 AGATCTTGTT TCGTAGGAAG ATAAATGTCA CAATCATTGT TTTGCAATAC CCTATTATTG
961 ATATAAAAAA TCTGAAATTT TTTTAAATTT AGTTTATAGG CACTCGTTGT TTACGAAATA
1021 TGATGCAAAA TTCAGTTTAT TATAAAAAAG TTTTTTaTTT TTCGAATTAG GGTAGCATCC
1081 CAAATTATGT CACGCTAAAT TTCAACTTTT TCGACCCCCT TCCCTCCTCT ACTTTGTCAC
1141 ATTTTTTGTA TGAGTCCTCC GAAAATTTTG TAAGGCTTGA CCCCCTCCAC CCCTCTTAAA
1201 GCGTGACGTA ATTTGTGCAT GACCCCTTAG ATAGAAATGT TGAAAACCTA TCAACATAAA
1261 TCTGGGCAAA ACTTCAATCA AAATAAATGC AATGTACACT GAACAGGTAA GTGTAGGAGG
1321 TAAGAAAAGA TAGCTAAAAA AAACCTCGACT CGACTTGATG ATGGTTTTGA AAAAActCAA
1381 AAACGACATG TAACAATAAA GGTAAGTATT GAATGGATAC TTGTATACAA AGTACTTTGA
1441 AGTTCAATTC TTGTTGAAAT TGAAGTGTCT TCCATAACAT TTATTCTTAA AACTAAATT
1501 TCTAAGTTTT AACGGCATT TCGTGGTGCG ACTGAACTTG TTCTCTTTTC TCCTGATACA
1561 TAACTCACAT GTAGCTCTGA TGTGAAACA CTTTCATATC TATCATTAAG TCAGCAATCT
1621 CAGGACAATT TTCATCATAT TTTTCTCTT GTATTTTTTC AACAGGTTAT CTACATTCGT
1681 CCCCTGATGA GTACGTTCAA TATTATGGAC CACAAACTCA CACATACACG CTTCCCAGGT
1741 AaGTTTCCTAT ACgaaacccc aacaaaaacc ataattgttt AGACTTGTTGA AAAAAATTGG
1801 ATCCGACTTT ATTGATTACG TTGTTAAGAG AACAAATCTT TTACAACTGA ATTCATTTGT
1861 TCTCGTTTCA TTTTTTTTCG CAAAACATTG ATCGAGAATT CGATTGATTT CCGATTGCAA
1921 TTTACTTGTA CAGCTCGTCC ATGCCGAGAG TGATCCCGGC GGCGGTCACG AACTCCAGCA
1981 GGACCATGTG ATCGCGCTTC TCGTTGGGGT CTTTGCTCAG GGCGGACTGG GTGCTCAGGT
2041 AGTGGTTGTC GGGCAGCAGC ACGGGGCCGT CGCCGATGGG GGTGTTCTGC TGGTAGTGGT
2101 CGGCGAGCTG CACGCTGCCG TCCTCGATGT TGTGGCGGAT CTTGAAGTTC ACCTTGATGC
2161 CGTTCTTCTG CTTGTCGGCC ATGATATAGA CGTTGTGGCT GTTGTAGTTG TACTCCAGCT
2221 TGTGCCCCAG GATGTTGCCG TCCTCCTTGA AGTCGATGCC CTTGAGCTCG ATGCGGTTCA
2281 CCAGGGTGTC GCCCTCGAAC TTCACCTCGG CGCGGGTCTT GTAGTTGCCG TCGTCCTTGA

```

Annexes

2341	AGAAGATGGT	GCGCTCCTGG	ACGTAGCCTT	CGGGCATGGC	GGACTTGAAG	AAGTCGTGCT
2401	GCTTCATGTG	GTCGGGGTAG	CGGCTGAAGC	ACTGCACGCC	GTAGGTCAGG	GTGGTCACGA
2461	GGGTGGGCCA	GGGCACGGGC	AGCTTGCCGG	TGGTGCAGAT	GAACCTCAGG	GTCAGCTTGC
2521	CGTAGGTGGC	ATCGCCCTCG	CCCTCGCCGG	ACACGCTGAA	CTTGTGGCCG	TTTACGTGCG
2581	CGTCCAGCTC	GACCAGGATG	GGCACCACCC	CGGTGAACAG	CTCCTCGCCC	TTGCTCAcca
2641	tgGTTGAAAT	CTCTGTTGAG	CAGAAAAAGA	AACGAGGAAA	CGCTTCAGTA	ATTGGTTGTG
2701	AAATGCAAAC	TCTCATTTGA	TATTGATTCA	TTGCCTTTGG	CTTCGAGCAC	GACACGACAG
2761	GTTTTAAACT	TGTTTTGCTT	TGTCTGCGTT	TGCAGTCGCA	GGCCAAGTGA	AAAATATACA
2821	CTTGAAGGTG	ATGACGTCAC	AACAACGCCC	TACTTTTTAG	TGAAAAATTA	ACTTGTTTTC
2881	GACTTTGAAC	TACGTAGTTT	GGAAATTGCG	TATCTTCAAG	TTTTACGAT	TTCTCAAGG
2941	TTTTTCTCGA	TATGTGTTAA	TATTACCTTA	ATGGGTAATT	ATCACCACAA	TATTTAATTT
3001	TAGAAATATG	GCGAATTCGC	GCTTGCTCTA	GAAATTTAAT	TCAATTAGCA	GCGATGATTC
3061	AACGAAATAT	GATTATCGCC	GTGAATCACA	ATTGGGTTTT	ATCAATGATG	ATGAAACTGC
3121	GTTGCAAATT	TTCACTAATC	ACTCAAAGCT	CAATAGTCGC	CATCTTGGA	AATAGTTTGC
3181	TCATTCAAAG	ACAAAGGAAT	CATTACACAA	ACTAGTTTTT	GCTCATAGCT	ATAATTTTAT
3241	CATTTAATTT	ACCTACCTTC	ACTAGAAGAT	TCCCTTCACC	GAAATGCACT	TTACACAAAT
3301	TAATAGTAAT	TGTCCTTTGA	ACAAAGCTTT	GTTCACTCTG	AAATTTTCTC	CTCTGGCTAA
3361	TTGGATCACT	CTTTTTCACT	AGAGACTTCA	CTTCACTTGC	ACTGGCACTG	CTTACTTGGA
3421	CCGCGTAATG	TTCACTCCAC	TAGGAAACGT	ATTCGATTGA	GCTGGTTTTG	CCTTTGCAGG
3481	GGCGTTTTAT	AGACACTGCC	GTAGTGGTGG	TTGTACTTCT	AGAAAAATTC	TGCAATCCAT
3541	TCATACATAT	ACCTCTGTTC	GGTTGGATGG	CTCTAAATCG	ATCGACTATG	GGTACCATCC
3601	CTGTGTCTGA	ATGGACAGCA	AAACGTGCTT	GTGTCTGTTA	GTCGTTTATT	CTGTACCTTG
3661	AACGATGCAG	TTCAACTTCT	GGCAAAGACG	TCAATGTACC	TACCATTTCGT	GTATATGGCA
3721	TACAGAGAAA	GATGTGCGAA	TGCCTTTTTT	GATAGAGAAA	GGATTTCTCT	ATTTGATCGA
3781	CAATTTTCGGT	AGCTATTCTT	AGCTTCGAAT	GTAATCTGAT	AACCAAATCC	AGAGACAAAAG
3841	CAGTAATTTG	GGAATTTTAC	TTGAATCATT	CTAATTGTAT	CATTTGCTGT	ATTAGTGCAG
3901	TCAGCAAAGT	GACGTCAACC	CTTCTAAATC	GATATACTTC	TGGGAAGCTT	TCTTTCTTGT
3961	CTGGCTCAGC	TGGTGCCAAG	GCAAATTATA	ATTGGATTCA	ATGCACAAGC	TACATGTAAA
4021	GATCTTTTCT	ACGCCTACCC	CCTCGGACAA	CAGGCGtCCC	ATGATTCATC	AATCAACGGA
4081	GCGaCCTCAT	AGAAATATTA	CGCCAACTGG	AATACCAATG	GCATCCAGAC	ATATCTATGG
4141	GTATGACGCC	CAAGTTGACA	ATAATGCAAG	CACATTCCAC	CGGAACAACG	ATATGTACTG
4201	GACCTTGCAA	ACTCGTCGTC	GACCAATTCC	AATGGACCAG	CCGAATATGC	GTGAAGCTCT
4261	TAATTTATCC	CAGCAGAGCG	TTAGACCAAT	AGAAGAACTC	TATTCAACAC	CAAACAAGAT
4321	CAAATCAAAT	GCACTGAAAA	CTACACCAAC	TGGGTTTGCT	ACGTACTTTT	CTCCTATCGC
4381	TAAAAGTAAC	ACGGGTGGTG	AATTAAACGA	CGATGTGGAT	AGCAGTTTTA	AGATTTCTCC
4441	GATCGACCCT	CGGAGTATTG	CTCATTTCAA	AACATCTACT	CCGTCAAAAC	CAAACGAGAC
4501	ATCACTTTCT	CCTACAAGAT	CGCTTACCGA	AGAGCTTCGA	TATAGATTAA	GACTGCAACA
4561	GGTCGGAGTT	CGATCACATG	GGAATTCTCC	GGTAAGCTCC	GGCCGTTCAA	CACCAAAAAA
4621	CGTACTTGAA	GCACAAGCTC	CACGTGGCAG	ACACAGTTGG	GCTTCCAACA	GTACCGACAT
4681	TCCACAGACA	TGCTCTGATC	GACTTGGGAC	ACCAAAAAACG	AGCCTTATGG	ATTTCAAAAA
4741	GTTGCTTCTT	GCGCATGGAT	CGAAATCTAA	TATTTCTGCT	GGAAGTAAAA	TTTCTGCCGT
4801	TGAACTACTT	AAGAAATCAA	AAAGTAACGC	TCCAGTTAAC	CCAGTTTCTC	CAGTTACAAA

Annexes

4861 AACTTCTGCA AATAGTAGTT TGAATATTTT GGACCTTTTCG GGATCTCCAA AAACATTTCGC
4921 TACAAGACGC ATGATTTCGAC AAGGAAACTT TGGAAATGGT TCACCATCAA AGCTCGGTAA
4981 TGTGTCTAAA CATTCTTCAA GGGGTGGTTG GCGGTACAgc ttATCCCCTA TAGTGAGTCG
5041 TATTACATGG TCATAGCTGT TTCCTGGCAG CTCTGGCCCCG TGTCTCAAAA TCTCTGATGT
5101 TACATTGCAC AAGATAAAAA TATATCATCA TGAACAATAA AACTGTCTGC TTACATAAAC
5161 AGTAATACAA GGGGTGTTAT GAGCCATATT CAACGGGAAA CGTCGAGGCC GCGATTAAAT
5221 TCCAACATGG ATGCTGATTT ATATGGGTAT AAATGGGCTC GCGATAATGT CGGGCAATCA
5281 GGTGCGACAA TCTATCGCTT GTATGGGAAG CCCGATGCGC CAGAGTTGTT TCTGAAACAT
5341 GGCAAAGGTA GCGTTGCCAA TGATGTTACA GATGAGATGG TCAGACTAAA CTGGCTGACG
5401 GAATTTATGC CTCTTCCGAC CATCAAGCAT TTTATCCGTA CTCCTGATGA TGCATGGTTA
5461 CTCACCACTG CGATCCCCGG AAAAACAGCA TTCCAGGTAT TAGAAGAATA TCCTGATTCA
5521 GGTGAAAATA TTGTTGATGC GCTGGCAGTG TTCTTGCGCC GGTGTCATTC GATTCTGT
5581 TGTAATTGTC CTTTTAACAG CGATCGCGTA TTTCTGCTCG CTCAGGCGCA ATCACGAATG
5641 AATAACGGTT TGGTTGATGC GAGTGATTTT GATGACGAGC GTAATGGCTG GCCTGTTGAA
5701 CAAGTCTGGA AAGAAATGCA TAAACTTTTG CCATTCTCAC CGGATTCAGT CGTCACTCAT
5761 GGTGATTTCT CACTTGATAA CCTTATTTTT GACGAGGGGA AATTAATAGG TTGTATTGAT
5821 GTTGACGAG TCGGAATCGC AGACCGATAC CAGGATCTTG CCATCCTATG GAACTGCCTC
5881 GGTGAGTTTT CTCCTTCATT ACAGAAACGG CTTTTTCAAA AATATGGTAT TGATAATCCT
5941 GATATGAATA AATTGCAGTT TCATTTGATG CTCGATGAGT TTTTCTAATC AGAATTGGTT
6001 AATTGGTTGT AACACTGGCA GAGCATTACG CTGACTTGAC GGGACGGCGC AAGCTCATGA
6061 CCAAATCCC TTAACGTGAG TTACGCGTCG TTCCACTGAG CGTCAGACCC CGTAGAAAAG
6121 ATCAAAGGAT CTTCTTGAGA TCCTTTTTTT CTGCGCGTAA TCTGCTGCTT GCAAAACAAA
6181 AAACCACCGC TACCAGCGGT GGTTTGTTTG CCGGATCAAG AGCTACCAAC TCTTTTTCCG
6241 AAGGTAAC TGCTTACGAG AGCGCAGATA CCAAATACTG TTCTTCTAGT GTAGCCGTAG
6301 TTAGGCCACC ACTTCAAGAA CTCTGTAGCA CCGCCTACAT ACCTCGCTCT GCTAATCCTG
6361 TTACCAGTGG CTGCTGCCAG TGGCGATAAG TCGTGTCTTA CCGGGTTGGA CTCAAGACGA
6421 TAGTTACCGG ATAAGGCGCA GCGGTCGGGC TGAACGGGGG GTTCGTGCAC ACAGCCCAGC
6481 TTGGAGCGAA CGACCTACAC CGAACTGAGA TACCTACAGC GTGAGCTATG AGAAAGCGCC
6541 ACGCTTCCCG AAGGGAGAAA GGCGGACAGG TATCCGGTAA GCGGCAGGGT CGGAACAGGA
6601 GAGCGCACGA GGGAGCTTCC AGGGGGAAAC GCCTGGTATC TTTATAGTCC TGTCGGGTTT
6661 CGCCACCTCT GACTTGAGCG TCGATTTTTG TGATGCTCGT CAGGGGGGCG GAGCCTATGG
6721 AAAAACGCCA GCAACGCGGC CTTTTTACGG TTCCTGGCCT TTTGCTGGCC TTTTGCTCAC
6781 ATGTT

//

2. Nucleotide sequence of three gRNA expression cassettes, each under the control of a different *Aedes aegypti* U6 promoter, used to knock-in the pX4 GFP cassette in the *Ae. aegypti* M locus (Addgene #183912, #183913, #183914)

LOCUS Plasmid1243 632 bp ds-DNA linear SYN 13-OCT-2021

DEFINITION synthetic DNA fragment

ORGANISM synthetic DNA construct

REFERENCE 1 (bases 1 to 632)

FEATURES Location/Qualifiers

```

    source              1..632
                        /organism="synthetic DNA construct"
                        /mol_type="other DNA"
    misc_feature        8..481
                        /label=promoter of Chr1 U6 AAEL017702
                        /note="promoter of Chr1 U6 AAEL017702"
    misc_feature        421..433
                        /label=Conserved atccatcgctaga
    misc_feature        455..460
                        /label=TATA
    misc_feature        482..504
    misc_feature        505..590
                        /label=pX330 chimeric guide RNA scaffold
                        /note="pX330 chimeric guide RNA scaffold"
    misc_feature        505..515
                        /label=CRISPR end
                        /note="CRISPR end"
    misc_feature        510..540
                        /label=mutations to optimize gRNA according to
                        /note="mutations to optimize gRNA according to Dang et
al."
    misc_feature        525..590
                        /label=tracer
                        /note="tracer"
    misc_feature        complement(574..590)
                        /label=EM334
                        /note="EM334"
    misc_feature        591..595
                        /label=U6 Aedes - AAEL017702

```

ORIGIN

1 ggtctcattc catagtaa atactacaaa taatattaat gttccatgaa aaaaggagta

Annexes

```

61 agagtctggt aaccctagtg cacgcaaata tctcgcgggc atatttggtt gctgaggtat
121 atttataattt gaacgccatg agaaaaagcg gaagaaattg gctcatggcc gattttaagg
181 atatttaaaa attgtacaat gtacatataa ttaaacaatcc gttccttcaa tgtgttcttt
241 tttttaagcg tgtgttaaaa gtttgctctg gtggtgaatt cacgctctac ccgttcaggc
301 agcattcatc gaaaagccct atctgctcgc acacatttac aaaatgctga ttgcgttggtg
361 tgctgaatgg gtcactcgtc cgtcactgct tgctgtgtac actgtacagt tacgcagtct
421 gtgcatcgct agaatacatat ttacggaaaa gtattatata tacccaatgc gttgctcatc
481 ggttggtggca tagcgccgtg tggagtttca gagctatgct ggaaacagca tagcaagttg
541 aaataaggct agtccgttat caacttgaaa aagtggcacc gagtcggtgc tttttttgtg
601 gttttattat tcgataattg tggatagaga cc

```

//

```

LOCUS      Plasmid1244                      520 bp ds-DNA      linear SYN 13-OCT-
2021
DEFINITION  synthetic DNA fragment
SOURCE      synthetic DNA construct
  ORGANISM  synthetic DNA construct
REFERENCE   1  (bases 1 to 520)
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..520
                     /organism="synthetic DNA construct"
                     /mol_type="other DNA"
     misc_feature    8..328
                     /label=pU6 promoter Chr3 AAEL017905 Konet2007
                     /note="pU6 promoter Chr3 AAEL017905 Konet2007"
     misc_feature    288..301
                     /label=conserved
     misc_feature    322..327
                     /label=TATA
     misc_feature    329..350
                     /label=this section from AAEL017774 U6
                     /note="this section from AAEL017774 U6"
     misc_feature    351..372
                     /label=Linker
     misc_feature    373..458
                     /label=pX330 chimeric guide RNA scaffold
                     /note="pX330 chimeric guide RNA scaffold"
     misc_feature    373..383
                     /label=CRISPR end
                     /note="CRISPR end"
     misc_feature    378..408

```


Annexes

```

/label=mutations to optimize gRNA according to
/note="mutations to optimize gRNA according to Dang et
al."
misc_feature      393..458
                  /label=tracer
                  /note="tracer"
misc_RNA          459..463
                  /label=AAEL017905-RA
                  /note="snRNA"

```

ORIGIN

```

    1 ggtctcactc taattggagc tgccagacaa atttgatttg tccgtgcggt atgcatatgt
   61 acctacttac gtctgtcggt ttgtctccgt ttaccgggag ggaaagtctg gaaacatgga
  121 aactctatag ttgccaggta gaccatctgc ctccgtcggc tggctggatt ccaatttgaa
  181 tattggctaa ttggaagaga tggaaagttt tgaatggatg attgaataat tgaagcgact
  241 ccgggtacct gtttgtaagc tctgcaacag tgccatagat tcgtgtcagt ccatacctag
  301 aatcaaatac acttgtaact gatataatag agcagaggga agagtagtga aatgtcttaa
  361 atgaaagagg cggtttcaga gctatgctgg aaacagcata gcaagttgaa ataaggctag
  421 tccgttatca acttgaaaaa gtggcaccga gtcggtgctt tttttacaaa tctattatgc
  481 atgaggtact atgttggcag agtaatgaat tccagagacc
//

```

LOCUS Plasmid1245 530 bp ds-DNA linear SYN 13-OCT-2021

DEFINITION synthetic DNA fragment

SOURCE synthetic DNA construct

ORGANISM synthetic DNA construct

REFERENCE 1 (bases 1 to 530)

```

FEATURES             Location/Qualifiers
     source            1..530
                      /organism="synthetic DNA construct"
                      /mol_type="other DNA"
     misc_feature      8..364
                      /label=U6 prom from Chr3 AAEL017763
                      /note="U6 prom from Chr3 AAEL017763"
     misc_feature      304..317
                      /label=Conserved
     misc_feature      337..342
                      /label=TATA
     misc_feature      365..386
                      /label=Linker
     misc_feature      387..472
                      /label=pX330 chimeric guide RNA scaffold

```

Annexes

```

        /note="pX330 chimeric guide RNA scaffold"
misc_feature 387..397
        /label=CRISPR end
        /note="CRISPR end"
misc_feature 392..422
        /label=mutations to optimize gRNA according to
        /note="mutations to optimize gRNA according to Dang et
al."
misc_feature 407..472
        /label=tracer
        /note="tracer"
misc_RNA 473..477
        /label=U6 AAEL017763-RA
        /note="snRNA"
ORIGIN
    1 ggtctcatgt tcgttcttca acacctctcc atggtgataa cggatacggg ttcattgtca
    61 gcatccatcc tccgaaaaat acattacgcc ttgaaatatg caatcgcaaa cacggatctg
   121 tttggaacat ttattttact atgaagagat gcgataggta atatttatTT gagcgtttaa
   181 gatactcatt gttctctcaa agaatgtcat tgaaagccaa cgagggtcaaa tcaaataatta
   241 taataaaaaag gtcaaagagg actaacttaa agctctcttt atggatagga aaaaatattt
   301 tcgcccacgc ctagaacttt taccgtttcc attgagtata taactaagat gaatgaggct
   361 aattgatgta tcatgcgtat tgcgagggtt cagagctatg ctggaaacag catagcaagt
   421 tgaaataagg ctagtccgtt atcaacttga aaaagtggca ccgagtcggt gcttttttaa
   481 gatgcttcgg caattaataa taaggaatgg taaagcattc tctagagacc
//

```

3. pX3 plasmid used for CRISPR/Cas9 knock-in into the *Aedes aegypti* m-linked gene AAEL019619 (Addgene #183904)

LOCUS pX3 6628 bp ds-DNA circular SYN 20-NOV-2019

DEFINITION synthetic circular DNA

FEATURES Location/Qualifiers

```

    terminator      268..295
                    /label=rrnB T2 terminator
                    /note="transcription terminator T2 from the E. coli rrnB
                    gene"
    terminator      387..473
                    /gene="Escherichia coli rrnB"
                    /label=rrnB T1 terminator
                    /note="transcription terminator T1 from the E. coli rrnB
                    gene"
    primer_bind     537..553
                    /label=M13 fwd
                    /note="common sequencing primer, one of multiple similar
                    variants"
    misc_feature     774..1707
                    /label=X3 5' flk region
    misc_feature     complement(1721..1889)
                    /label=DmTub56Dterm
    CDS              complement(1890..2609)
                    /codon_start=1
                    /product="the original enhanced GFP (Yang et al., 1996)"
                    /label=EGFP
                    /note="mammalian codon-optimized"

```

/translation="MVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTL

KFICTTGKLPVPWPTLVTTLTYGVCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDD

GNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNNSHNVYIMADKQKNGIK

VNFKIRHNIEDGSVQLADHYQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMLLL

EFVTAAGITLGMDELYK"

```

    misc_feature     complement(2610..3986)
                    /label=AePUB promoter

```

```

    misc_feature     3987..4861
                    /label=X3 3' flk region

```

```

    promoter         complement(4870..4888)

```

clxx

Annexes

```

        /label=T7 promoter
        /note="promoter for bacteriophage T7 RNA polymerase"
primer_bind    complement(4893..4909)
        /label=M13 rev
        /note="common sequencing primer, one of multiple similar
        variants"
CDS            5022..5831
        /codon_start=1
        /gene="aph(3')-Ia"
        /product="aminoglycoside phosphotransferase"
        /label=KanR
        /note="confers resistance to kanamycin in bacteria or
G418          (Geneticin(R)) in eukaryotes"

/translation="MSHIQRETSRPRNLNSNMDADLYGYKWARDNVGQSGATYRLYGKP

DAPELFLKHGKGSVANDVTDEMVRNLNWLTEFMPLPTIKHFIRTPDDAWLLTTAIPGKTA

FQVLEEYPDSGENIVDALAVFLRRLHSIPVCNCPFNSDRVFRLAQAQSRMNGLVDASD

FDDERNGWPEQVWKEMHKLLPFSPDSVVTHGDFSLDNLIFDEGKLIGCIDVGRVGIAD
        RYQDLAILWNCLGEFSPSLQKRLFQKYGIDNPDMNKLQFHLMLDEFF"
rep_origin     5978..6566
        /direction=RIGHT
        /label=ori
        /note="high-copy-number ColE1/pMB1/pBR322/pUC origin of
        replication"

ORIGIN
      1 ctttctctgcg ttatcccctg attctgtgga taaccgtatt accgcctttg agtgagctga
     61 taccgctcgc cgcagccgaa cgaccgagcg cagcgagtca gtgagcgagg aagcggaaga
    121 gcgccaata cgcaaaccgc ctctccccgc gcgttggccg attcattaat gcagctggca
    181 cgacaggttt cccgactgga aagcgggcag tgagcgcaac gcaattaata cgcgtaccgc
    241 tagccaggaa gagtttgtag aaacgcaaaa aggccatccg tcaggatggc cttctgctta
    301 gtttgatgcc tggcagttta tggcgggcgt cctgcccgcc accctccggg ccgttgcttc
    361 acaacgttca aatccgctcc cggcggatth gtctactca ggagagcggt caccgacaaa
    421 caacagataa aacgaaaggc ccagtcttcc gactgagcct ttcgttttat ttgatgcctg
    481 gcagttccct actctcgcgt taacgctagc atggatgttt tcccagtcac gacgttgtaa
    541 aacgacggcc agtccttaagc tcgggcccct acaggtcact aataccatct aagtagttga
    601 ttcatagtga ctggatatgt tgtgttttac agtattatgt agtctgtttt ttatgcaaaa
    661 tctaatttaa tatattgata tttatatcat tttacgtttc tcgttcaact tttctataca
    721 aagttggtac cgggcccccc gctagcgctc acggtatcga taagcttgat cggatccgga

```

Annexes

781 gagtacgttc gcattgccga agtaaaaact accaagaaaa ttcaacacag cggtaggcgtt
841 tactattcaa acgatgtggt aaaacgtaat ttagccacag tcctctcggg aaatctcaac
901 gaagaaaccg aatatgtatc cttgaatgaa ttgccgtgca atatgcatg cgagagcaat
961 gttctctcgc aaaacgacac ccctcctggc ggaagcggaa aactgaatac ttcgggtacg
1021 ggaggagaag caccctcggc aggagaaaaac aacgaacatg ctataaaaaag gggtagcacgc
1081 gtgaaactgg atgcgcacgg taaggttatc tacagttcgg atagtctgaa gaggagaaag
1141 ggtgcgcaca cgacctttgc gccgggtcca tttgtgaaag acgtaaatac ggcacagcca
1201 ctgacgacca aactcctac tacaacact acaactcggc cagcatcacc agcagcatcc
1261 acagaaaatg gcaaatgtgc tgttgttgca tctccattac taagtgggtg tctagctaac
1321 aggaaaccaa tagcagttaa accagtgata tcgcagtccg cattgaaaac gaaagcaatc
1381 gtcaacacca atagtaatat aagtaatcat agcgacggag tggcagccca tcgtatggcc
1441 ccaattgccg gtattcttcc caacaacagt acggtgcaag aagtggaaaa aatagctgca
1501 gcatcacaca tcatgtcctc cggagttcta aaaggtgcat acgttaatgt acaggaatct
1561 aaaccaccgt cttcaaaacc tcaatcgatt cactatatgg aagcaacaaa cttacagcat
1621 ccccaaacag gtaagcaagc taaatcgcaa aagaataaca aaatagttgg tgcttcgcca
1681 aaggctagga acgtaatat tccctccggg gttcctatac gaaaccccaa caaaaacct
1741 aattgttttag acttgtgaac aaaattggat ccgactttat tgattacgtt gttaagagaa
1801 caaatctttt acaactgaat tcatttgttc tcgtttcatt ttttttcgca aaacattgat
1861 cgagaattcg attgatttcc gattcgaatt tacttgtaca gctcgtccat gccgagagt
1921 atcccggcgg cggtcacgaa ctccagcagg accatgtgat cgcgcttctc gttgggtct
1981 ttgctcaggg cggactgggt gctcaggtag tgggtgtcgg gcagcagcac ggggccgtc
2041 ccgatggggg tgttctgctg gtagtgggtg gcgagctgca cgctgccgtc ctcgatgtt
2101 tggcggatct tgaagttcac cttgatgccg ttcttctgct tgcggccat gatatagacg
2161 ttgtggctgt tgtagtgtga ctccagcttg tgcccagga tgttgccgtc ctccttgaag
2221 tcgatgccct tcagctcgat gcggttcacc aggggtgtgc cctcgaactt cacctcggcg
2281 cgggtcttgt agttgccgtc gtccttgaag aagatggtgc gtcctggac gtagccttcg
2341 ggcatggcgg acttgaagaa gtcgtgctgc ttcattgtgt cggggtagcg gctgaagcac
2401 tgcacgccgt aggtcagggg ggtcacgagg gtgggccagg gcacgggcag cttgccgggtg
2461 gtgcagatga acttcagggg cagcttgccg taggtggcat cgccctcgcc ctcgccggac
2521 acgctgaact tgtggccgtt tacgtcgccg tccagctcga ccaggatggg caccaccccg
2581 gtgaacagct cctcgccctt gctcaccatg gttgaaatct ctggtgagca gaaaaagaaa
2641 cgaggaaacg cttcagtaat tgggtgtgaa atgcaaactc tcatttgata ttgattcatt
2701 gcctttggct tcgagcacga cacgacaggt tttaaacttg ttttgctttg tctgcgtttg
2761 cagtgcagg ccaagtgaag aatatacact tgaaggtgat gacgtcacia caacgcccta
2821 ctttttagtg aaaaattaac ttgttttcga ctttgaacta cgtagtttg aaattgcgta
2881 tcttcaagtt ttcacgattt cctcaagggt tttctcgata tgtgttaata ttacctaat
2941 gggtaattat caccacaata ttttaatttta gaaatatggc gaattcgcgc ttgctctaga
3001 aatttaattc aattagcagc gatgattcaa cgaaatatga ttatcgccgt gaatcacaat
3061 tgggtttttat caatgatgat gaaactgcgt tgcaaatttt cactaatcac tcaaagctca
3121 atagtgcga tcttgaaaa tagtttgctc attcaaagac aaaggaatca ttcaccaaac
3181 tagttttcgc tcatagctat aatttcatca ttttaatttac ctaccttcac tagaagattc
3241 ccttcaccga aatgcacttt cacaaattta atagtaattg tcctttgaac aaagctttgt

Annexes

3301 tcaactctgaa attttctcct ctggctaatt ggatcactct ttttcactag agacttcact
3361 tcaacttgacac tggcactgct tacttggacc gcgtaatggt cactccacta ggaaacgtat
3421 tcgattgagc tggttttgcc tttgcagggg cgttttatag aactgccgt agtggtggtt
3481 gtacttctag aaaatttctg caatccattc atacatatac ctctgttcg tggatgggt
3541 ctaaactgat cgactatggg taccatccct gtgtctgaat ggacagcaaa acgtgcttgt
3601 gtctgttagt cgttcattct gtaccttgaa cgatgcagtt caacttctgg caaagacgtc
3661 aatgtacctt ccattcgtgt atatggcata cagagaaaga tgtgcgaatg cttttttcga
3721 tagagaaagg atttctgat ttgatcgaca atttcggtag ctattcttag cttcgaatgt
3781 aatctgataa ccaaactccag agacaaagca gtaatttggg aatttcactt gaatcattct
3841 aattgtatca tttgctgtat tagtgcagtc agcaaagtga cgtcaaccct tctaaactga
3901 tatacttctg ggaagctttc tttcttgtct ggctcagctg gtgccaaggc aaattataat
3961 tggattcaat gcacaagcta catgtaaaga cgcagatgac tcatcacatt agacgtaata
4021 aggacattga ccagatagc aattctacta tcaagcgcag gaatagctat agaaatgcga
4081 actcgttcaa aatcgatact gatgctgcga gttttaccga tttcttgga gaacatgtaa
4141 ataaacaaga ggaacggcta cagtcctccg cggatgaaga tgatagcaat tcatataaca
4201 agtatacca tttgcatgat caaaatagcg ataaggacga tggctacgaa gaaatcagcg
4261 atattgactt ggacgaggat agcaaactct ttgctcgttc gtttgaaaga ttactcaatc
4321 tatcagatga ggtgtttggg cttcagaaga tggatagcac tagaccagat atcctggaga
4381 agtgcaattt cgatgaatta gataccagta cagtggagaa taatgacgac gagttggaga
4441 ttgtattacg tgacctgata ccttccacac ctaccggttg tagaagaagt ttctctattc
4501 ctcttacacc cagtaagttg actatacctt cagatggggg tcagcatcgt gctagagttc
4561 ttagcttcag cgctaccagc aacgacaact ctacagatat ctggtgagtc ggacgtttta
4621 atataatttt caatggtagt gtttaacact ctttctccc aataaatcac aaaagtacaa
4681 attattgtca tctagacaca tttttaaata atcgcttcta tcttggtctt attctattct
4741 aattattttt gttaaataag acaaatacac catgctttat aatgaaggcc attaatcaaa
4801 aagttacaaa atgacaacca ttcaagtgc tgtccgactg tggcatagcg ccgtgtggac
4861 ggcttatccc ctatagtgag tctgattaca tggatcatagc tgtttcctgg cagctctggc
4921 ccgtgtctca aaatctctga tgttacattg cacaagataa aaatatatca tcatgaacaa
4981 taaaactgtc tgcttacata aacagtaata caaggggtgt tatgagccat attcaacggg
5041 aaacgtcgag gccgcgatta aattccaaca tggatgctga tttatatggg tataaatggg
5101 ctgcgataa tgcgaggcaa tcaggtgcga caatctatcg cttgtatggg aagcccgatg
5161 cgccagagtt gtttctgaaa catggcaaag gtacggttc caatgatgtt acagatgaga
5221 tggctcagact aaactggctg acggaattta tgcctcttcc gaccatcaag cattttatcc
5281 gtactcctga tgatgcatgg ttactcacca ctgcgatccc cgaaaaaaca gcattccagg
5341 tattagaaga atatcctgat tcaggtgaaa atattgttga tgcgctggca gtgttcctgc
5401 gccggttgca ttcgattcct gtttgtaatt gtctttttaa cagcgatcgc gtatttcgtc
5461 tcgctcaggc gcaatcacga atgaataacg gtttggttga tgcgagtgat tttgatgacg
5521 agcgtaatgg ctggcctgtt gaacaagtct ggaaagaaat gcataaactt ttgccattct
5581 caccggattc agtcgtcact catggtgatt tctcacttga taaccttatt tttgacgagg
5641 ggaaattaat aggttgatt gatgttgac gagtcggaat cgcagaccga taccaggatc
5701 ttgccatcct atggaaactgc ctcggtgagt tttctccttc attacagaaa cggctttttc
5761 aaaaatatgg tattgataat cctgatatga ataaattgca gtttcatttg atgctcgatg

Annexes

5821 agttttttcta atcagaattg gttaattggt tgtaacactg gcagagcatt acgctgactt
5881 gacggggacgg cgcaagctca tgaccaaaat cccttaacgt gagttacgcg tcgttccact
5941 gagcgtcaga ccccgtagaa aagatcaaag gatcttcttg agatcctttt tttctgcgcg
6001 taatctgctg cttgcaaaca aaaaaaccac cgctaccagc ggtggtttgt ttgccggatc
6061 aagagctacc aactcttttt ccgaaggtaa ctggcttcag cagagcgcag ataccaaata
6121 ctgttcttct agtgtagccg tagttaggcc accacttcaa gaactctgta gcaccgccta
6181 catacctcgc tctgctaata ctgttaccag tggctgctgc cagtggcgat aagtcgtgtc
6241 ttaccggggt ggactcaaga cgatagttac cggataaggc gcagcggtcg ggctgaacgg
6301 ggggttcgtg cacacagccc agcttggagc gaacgaccta caccgaactg agatacctac
6361 agcgtgagct atgagaaagc gccacgcttc ccgaagggag aaaggcggac aggtatccgg
6421 taagcggcag ggtcggaaca ggagagcgca cgagggagct tccaggggga aacgcctggt
6481 atctttatag tctgtcggg tttcgccacc tctgacttga gcgtcgatth ttgtgatgct
6541 cgtcaggggg gcggagccta tggaaaaacg ccagcaacgc ggccttttta cggttcctgg
6601 ccttttgctg gccttttgct cacatggt

//

4. ppBAalbNixE1E3E4 Pub-YFP plasmid that produced M-linked *piggyBac* insertion Aalb-M on *Aedes albopictus* chromosome 1 (Addgene #173666)

LOCUS AlbNixE1E2E3_PubYFP 8956 bp ds-DNA circular SYN 22-JUN-2021

SOURCE synthetic DNA construct

ORGANISM synthetic DNA construct

REFERENCE 1 (bases 1 to 8956)

AUTHORS .

TITLE Direct Submission

JOURNAL Exported Friday, Jul 2, 2021 from SnapGene 5.2.5
<https://www.snapgene.com>

FEATURES

	Location/Qualifiers
source	1..8956 /dnas_title="Exported" /organism="synthetic DNA construct" /mol_type="other DNA"
primer_bind	4..20 /label=M13 rev
misc_feature	complement(61..196) /label=PiggyBac 5'TR
misc_feature	77..95 /label=TR2
misc_feature	complement(371..591) /label=attP'
protein_bind	427..526 /label=phage phi-C31 attP
protein_bind	602..635 /label=loxP
misc_feature	638..640 /label=lac promoter
promoter	645..2559 /label=Nix promoter
exon	2560..3305 /label=Exon 1
misc_feature	2560..2631 /label=5' UTR
misc_feature	2632..2634 /label=Start
exon	3306..3370 /label=Exon 3

Annexes

exon	3371..3712 /label=Exon 4
misc_feature	3471..3473 /label=stop?
misc_feature	3472..3712 /label=3' UTR
misc_feature	3713..3714 /label=added to match isof 1
misc_feature	3719..3941 /label=SV40 term
polyA_signal	3822..3904 /label=SV40 poly(A) signal
promoter	3951..5336 /label=PUB
misc_feature	5337..6053 /label=YFP
misc_feature	6058..6311 /label=SV40
primer_bind	6074..6096 /label=EM820
misc_feature	6175..6296 /label=SV40 polyA signal
protein_bind	6352..6385 /label=loxP
misc_feature	complement(6478..6635) /label=original PiggyBac 3'region
misc_feature	complement(6573..6591) /label=TR2
misc_feature	6587..6607 /label=direct repeat
misc_feature	complement(6623..6635) /label=TR1
primer_bind	complement(6765..6781) /label=M13 fwd
misc_feature	join(6813..8956,1..33) /label=pDONR backbone
terminator	6946..6973 /label=rrnB T2 terminator
rep_origin	complement(7303..7891) /direction=LEFT /label=ori
CDS	complement(8038..8847)

Annexes

/label=KanR
misc_feature 8918..8936
/label=pDONR-RP

ORIGIN

```

1  tgccaggaaa cagctatgac catgtaatac gacgatatga tcctgatgca gctagattaa
61  ccctagaaaag atagtctgcg taaaattgac gcatgcattc ttgaaatatt gctctctctt
121 tctaaatagc gcgaatccgt cgctgtgcat ttaggacatc tcagtcgccg cttggagctc
181 ccgtgaggcg tgcttgtcaa tgcggtaagt gtcactgatt ttgaactata acgaccgcgt
241 gagtcaaaat gacgcatgat tatctttttac gtgactttta agatttaact catacgataa
301 ttatatgtgt atttcatggt ctacttacgt gataacttat tatatatata ttttcttgtt
361 atagattaga tcgcgctcgc gcgactgacg gtcgtaagca cccgcgtacg tgtccacccc
421 ggtcacaacc ctttgtgtca tgtcggcgac cctacgcccc caactgagag aactcaaagg
481 ttaccccagt tggggcacta ctcccgaaaa ccgcttctga cctgggaaaa cgtgaagccc
541 cggggcatcc gctgagggtt gccgccgggg cttcgggtgtg tccgtcagta ctgcaggtag
601 cataacttcg tatagcatac attatacgaa gttataccgg atcctcgcat tttatgagta
661 aaggcccat actcatatat gggtaaagtg ctttttgtaa aaaatgagta aatcgattta
721 ctcataaatt ataatttcac cgtgtttact tttcgtcttt tgttatattt ttgaactgtt
781 aactattttg tatttatcat ttaattcata caaaattttg cgtttatttt gtagtttatt
841 gcaatctacg aaaattatta atgaattttt acatgtttca aatactctta atcattttcc
901 tcctggaaaa cagaccttcc gagacgtagc tctttgaagt tttcataatg atccatgtat
961 gaaattttcc cctccggctg ttgttcatcg cgcagttgtt cctgttcttc cgttcctcgt
1021 tcttccggcg cttgaagcct tgggtgcagtc ggaactgtgg aaaagactga tatattttta
1081 tttcacggtc gttaatgaaa atgatgctgt cactatggaa cttacctgca aattccatgc
1141 ttttgtagcc tttctttag tagtccacatga tgatttggtg ctctgtatt atcttcgagt
1201 accaaacctt gtgaaacgga aataatccat cgtaaagaa aattgaacgg tatcaattta
1261 tccaggaagt acttaccgat taaaatatca atgtatttgg gaacctcgac tctaaccgc
1321 gtgggaatcc gatggacgcg gtatcgggtc ttgaaccoga tgctgaaggg cctcgactgg
1381 ctatagcggg gccgtgaaaa tcaaaatatc taaaatttcc cgatagtgtt atgatcaggg
1441 gatccgcatg cggcaaggta ggccactactg tcatcttttg cgagtgtgtt agtgtgactg
1501 gcaacgcgac cagaagtcta gtcgaatcct gcttggaat cggtttgttt tgcgatggg
1561 ggtggcccg cgaatcgcat tgtgttgttt gggaaggccc gctcgatgca tgttaggtag
1621 gcgtagtttg ttcgagtttg acgtgcctgc accctccctg gttatgatgg cgcactaatg
1681 cattccgaga aaagttgcta acttgaaaat tttcatccaa atatgggtaa gttcatttac
1741 ccatgtttgg gtatagcgat tttacctata atatgggcaa atttgaccgt ttttcaaagg
1801 tatattttac ccatattatg ggtaatgcat atgaaacca aatatgggta aatcaactac
1861 tgatctatgg gtaactgat cttagcgtgt atgtttcaca cgtgacattc actggtttta
1921 caattggcct ctttagcagt gttgggataa ttccatatta tgaatctgca tgccaaactg
1981 ggccgaaatc caaattttca tcaattttgg tgcacgggaa cctattttaa tatcaatttg
2041 aagtttgtat gggagcgatt tgtcgaatca cccctcggtg cattttgtac tgggcggagc
2101 tgtcaaacag ttgcctagct gtcaaaagg gatttcgaat aatctctttg aaattgattt
2161 taggtatcaa aataaagttc taaaaatctg aaaaaaatca tagtggctca gaaaagggtg
2221 ctctttcgta taaaatcaaa aaatgaacac ttttttcaaa atttaaaaac ccaattttcg

```

Annexes

2281 caaatctata gggctctgca cgaagttctc tccctctctt tcgctctcat tgagattttg
2341 taaacaacaa ggccaggaaa tgtcaaaatc ccatacaaaa tcaaaacagt gcagtgcctt
2401 atatgtaaaa cacatcactc cgacgtgtaa atttttttga gtgttgattt aatcaaagtg
2461 aataaaaaata ttagttttat gacatacttg ttttctgagt gtagcaaaaa tatgaaaaca
2521 cttttttgta ctttgaatgt taagcgtgta tgctttttgt gtcaatatgt caattgttaa
2581 acccatgtta atagttttta ttttttttta atcaaattct ttttttaagt aatgtacagt
2641 aaaagtgaac ttaatctcat taacaatcaa tttgaatata ttaaaaaata ttgcatatac
2701 attggaaaca ttcccgcga agtatcgaaa acagatttaa ttgcaaaatt ttccgtattt
2761 ggtgaaatat ctaacttata catgaagtca ttcattcagt tttgtgatgt gaaaccggca
2821 gttgttcgtt acagactgat gaaaagtgt aaggaatctt caagtttaca caatagtcga
2881 tatattcaat cggttttaat agttctgcca ctagattctt cctacaataa ttactttctt
2941 ccttacaaca cttgtgttgt ggtatacact tataacaaat ttggcatggt agatttttat
3001 caaaaattca gtaaattagg agatatacat gcgatgaaga aagctacaaa tgtcatgggt
3061 tacattagct ttgtatcaga aagagctgca aggaccattc tggatactaa gcctacagat
3121 atacatataa atgtacaaac aattaatcat gttacacgaa atattaacgt atgcttaata
3181 gattttgaaa aggaatgtac atcaaatacg gcgataaaat taacactttt atataatcgc
3241 tcaattggaa tattcggact accatctaatt ttcacagaag caaaactgca cgatgaattt
3301 tcaagctgcg gaccgttcaa gaaattttg cagcggaaac atttcttgac cttttccaca
3361 atacttatca gctttggaaa atccccagag gtagatcaat cctactccgc caaaaacttc
3421 cctggcgatg gaagctcttc cgaaccgatc ttcccgagtc ggtgtcgagc tagattctgt
3481 tttttccggt tggagactgg tctccgggtc actggcgccc cagcgaccgt gctttccatg
3541 acgttatcga tctagcctac tctcccgcg gtggacctag cctactctga tggaaaaaat
3601 cccagcgaa agaagttctc ccgaaaccga gaattcaatc tcgaccatcc aggtgccgag
3661 gtcgaccag cgatgccggt tggagggtga cttccagttc actatcactc cgattaagca
3721 taatcagcca taccacattt gtagagggtt tacttgcttt aaaaaacctc ccacacctcc
3781 ccctgaacct gaaacataaa atgaatgcaa ttgttggtgt taacttggtt attgcagctt
3841 ataattggtta caaataaagc aatagcatca caaatttcac aaataaagca tttttcttca
3901 ctgcattcta gttgtggttt gtccaaactc atcaatgtat ctaagtatcg aatccatctt
3961 tacatgtagc ttgtgcattg aatccaatta taatttgctt tggcaccagc tgagccagac
4021 aagaaagaaa gcttcccaga agtatatcga tttagaaggg ttgacgtcac tttgctgact
4081 gcactaatac agcaaatgat acaattagaa tgattcaagt gaaattccca aattactgct
4141 ttgtctctgg atttggttat cagattacat tcgaagctaa gaatagctac cgaaattgtc
4201 gatcaaatca ggaaatcctt tctctatcga aaaaggcatt cgcacatctt tctctgtatg
4261 ccatatacac gaatggtagg tacattgacg tctttgccag aagttgaact gcacgttca
4321 aggtacagaa tgaacgacta acagacacaa gcacgttttg ctgtccattc agacacaggg
4381 atggtaccca tagtcgatcg atttagagcc atccaaccga acagaggat atgtatgaat
4441 ggattgcaga aattttctag aagtacaacc accactacgg cagtgtctat aaaacgcccc
4501 tgcaaaggca aaaccagctc aatcgaatac gtttcctagt ggagtgaaca ttacgcggtc
4561 caagtaagca gtgccagtg aagtgaagtg aagtctctag tgaaaaagag tgatccaatt
4621 agccagagga gaaaatttca gagtgaacaa agctttgttc aaaggacaat tactattaaa
4681 tttgtgaaag tgcatttcgg tgaagggaat cttctagtga aggtaggtaa attaaatgat
4741 gaaattatag ctatgagcga aaactagttt ggtgaatgat tcctttgtct ttgaatgagc

Annexes

4801 aaactatttt ccaagatggc gactattgag ctttgagtga ttagtgaaaa tttgcaacgc
 4861 agtttcatca tcattgataa aacccaattg tgattcacgg cgataatcat atttcgttga
 4921 atcatcgctg ctaattgaat taaatttcta gagcaagcgc gaattcgcca tattttctaaa
 4981 attaaatatt gtggtgataa ttaccacatta aggtaatatt aacacatatc gagaaaaacc
 5041 ttgaggaaat cgtgaaaact tgaagatacg caattttcaa actacgtagt tcaaagtcca
 5101 aaacaagtta attttttact aaaaagtagg gcgttggtgt gacgtcatca ctttcaagt
 5161 tataatttttc acttggcctg cgactgcaa cgcagacaaa gcaaaaacaag tttaaaacct
 5221 gtcgtgtcgt gctcgaagcc aaaggcaatg aatcaatatc aaatgagagt ttgcatttca
 5281 caaccaatta ctgaagcgtt tcctcgtttc tttttctgct caacagagat ttcaacatgg
 5341 tgagcaaggg cgaggagctg ttcaccgggg tggtgccccat cctggctcgag ctggacggcg
 5401 acgtaaacgg ccacaagttc agcgtgtccg gcgagggcga gggcgatgcc acctacggca
 5461 agctgaccct gaagttcac tgcaccaccg gcaagctgcc cgtgccctgg cccaccctcg
 5521 tgaccacctt cggctacggc ctgcagtgtc tcgcccgtc ccccgaccac atgaagcagc
 5581 acgacttctt caagtccgcc atgcccgaag gctacgtcca ggagcgcacc atcttcttca
 5641 aggacgacgg caactacaag acccgcgccg aggtgaagtt cgagggcgac accctggtga
 5701 accgcatcga gctgaagggc atcgacttca aggaggacgg caacatcctg gggcacaagc
 5761 tggagtacaa ctacaacagc cacaacgtct atatcatggc cgacaagcag aagaacggca
 5821 tcaaggtgaa cttcaagatc cgccacaaca tcgaggacgg cagcgtgcag ctcgccgacc
 5881 actaccagca gaacaccccc atcggcgacg gcccgtgtc gctgcccgc aaccactacc
 5941 tgagctacca gtccgccctg agcaaagacc ccaacgagaa gcgcgatcac atggtcctgc
 6001 tggagttcgt gaccgcgcgc gggatcactc tcggcatgga cgagctgtac aagaagcggc
 6061 cgcgactcta gatcataatc agccatacca catttgtaga gggtacttgc tttaaaaaac
 6121 ctcccacacc tccccctgaa cctgaaacat aaaatgaatg caattgttgt tgtaacttg
 6181 tttattgcag cttataatgg ttacaaataa agcaatagca tcacaaatct cacaaataaa
 6241 gcattttttt cactgcattc tagttgtggt ttgtccaaac tcatcaatgt atcttagctt
 6301 gtaattcgtc gacgcggata tcgttttaac cgttgcttgt aattcgtcga cataacttcg
 6361 tatagcatac attatacgaa gttatgagct caattcgata aaagttttgt tactttatag
 6421 aagaaatctt gagtttttgt tttttttaat aaataaataa acataaataa attgttttgt
 6481 gaattttatta ttagtatgta agtgtaaata taataaaaact taatatctat tcaaattaat
 6541 aaataaacct cgatatacag accgataaaa cacatgcgtc aattttacgc atgattatct
 6601 ttaacgtacg tcacaatatg attatctttc taggggtaat ctagctgcgt gttctgcagc
 6661 gtgtcgagca tcttcatctg ctccatcacg ctgtaaaaca catttgcacc gcgagctgtc
 6721 ccgtcctcca cgggttcaaa aacgtgaatg aacgagggcg gctcactggc cgtcgtttta
 6781 caggggatgt cttcatatat atgaagactc ccatctgttg tttgtcgggt aacgctctcc
 6841 tgagtaggac aaatccgccc ggagcggatt tgaacgttgt gaagcaacgg cccggagggg
 6901 ggcgggcagg acgcccgcga taaactgcca ggcacaaac taagcagaag gccatcctga
 6961 cggatggcct ttttgcgttt ctacaaactc ttcttggtc gcggtacgcg tattaattgc
 7021 gttgcgctca ctgcccgtt tcagtcggg aaacctgtcg tgccagctgc attaatgaat
 7081 cggccaacgc gcggggagag gcggtttgcg tattgggcgc tcttccgctt cctcgtcac
 7141 tgactcgctg cgctcggtcg ttcggctgcg gcgagcggta tcagctcact caaaggcggg
 7201 aatacgggta tccacagaat caggggataa cgcaggaaag aacatgtgag caaaaggcca
 7261 gcaaaaggcc aggaaccgta aaaaggccgc gttgctggcg tttttccata ggctccgccc

Annexes

7321 ccctgacgag catcacaaaa atcgacgctc aagtcagagg tggcgaaacc cgacaggact
7381 ataaagatac caggcgtttc cccctggaag ctccctcgtg cgctctcctg ttccgaccct
7441 gccgcttacc ggatacctgt ccgcctttct cccttcggga agcgtggcgc tttctcatag
7501 ctcacgctgt aggtatctca gttcgggtgta ggtcgttcgc tccaagctgg gctgtgtgca
7561 cgaaccccc gttcagcccc accgctgcgc cttatccggt aactatcgtc ttgagtccaa
7621 cccggtaaga cagcacttat cgccactggc agcagccact ggtaacagga ttagcagagc
7681 gaggtatgta ggcgggtgcta cagagttctt gaagtgggtg cctaactacg gctacactag
7741 aagaacagta tttggatatct gcgctctgct gaagccagtt accttcggaa aaagagttgg
7801 tagctcttga tccggcaaac aaaccaccgc tggtagcggg ggtttttttg tttgcaagca
7861 gcagattacg cgcagaaaaa aaggatctca agaagatcct ttgatctttt ctacggggtc
7921 tgacgctcag tggaaacgac cgtaactcac gttaagggat tttggtcatg agcttgccgc
7981 gtcccgtaaa gtcagcgtaa tgctctgccg gtgttacaac caattaacca attctgatta
8041 gaaaaactca tcgagcatca aatgaaactg caatttattc atatcaggat tatcaatacc
8101 atatttttga aaaagccggt tctgtaatga aggagaaaac tcaccgaggc agttccatag
8161 gatggcaaga tcctgggtatc ggtctgcgat tccgactcgt ccaacatcaa tacaacctat
8221 taattttccc tcgtcaaaaa taaggttatc aagtggagaa tcaccatgag tgacgactga
8281 atccggtgag aatggcaaaa gtttatgcat ttctttccag acttggtcaa caggccagcc
8341 attacgctcg tcatcaaaat cactcgcata aaccaaaccg ttattcattc gtgattgcgc
8401 ctgagcgaga cgaaatacgc gatcgtgtt aaaaggacaa ttacaaacag gaatcgaatg
8461 caaccggcgc aggaacactg ccagcgcata aacaatattt tcacctgaat caggatattc
8521 ttctaatacc tggaatgctg tttttccggg gatcgcagtg gtgagtaacc atgcatcatc
8581 aggagtacgg ataaaatgct tgatgggtcgg aagaggcata aattccgtca gccagtttag
8641 tctgaccatc tcatctgtaa catcattggc aacgctacct ttgccatgtt tcagaaacaa
8701 ctctggcgca tcgggcttcc catacaagcg atagattgtc gcacctgatt gcccgcatt
8761 atcgcgagcc catttatacc catataaatc agcatccatg ttggaattta atcgcggcct
8821 cgacgtttcc cgttgaatat ggctcataac accccttgta ttactgttta tgtaagcaga
8881 cagttttatt gttcatgatg atatatTTTT atcttggtgca atgtaacatc agagattttg
8941 agacacgggc cagagc

//

5. *piggyBac* plasmid containing *Cas9* under control of the *Exuperentia* promoter, used to obtain the m-linked m-albR9 *Ae. albopictus* line (Addgene #183905)

```

LOCUS      pBExuCas9              13831 bp ds-DNA      circular SYN 23-OCT-
2017
DEFINITION synthetic circular DNA
SOURCE      synthetic DNA construct
FEATURES             Location/Qualifiers
     source             1..13831
                        /organism="recombinant plasmid"
                        /mol_type="other DNA"
     rep_origin          complement(63..651)
                        /direction=LEFT
                        /label=ori
                        /note="high-copy-number ColE1/pMB1/pBR322/pUC origin of
                        replication"
     CDS                 complement(798..1607)
                        /codon_start=1
                        /gene="aph(3')-Ia"
                        /product="aminoglycoside phosphotransferase"
                        /label=KanR
                        /note="confers resistance to kanamycin in bacteria or
G418
                        (Geneticin(R)) in eukaryotes"

/translation="MSHIQRETSRPRLNSNMDADLYGYKWARDNVGQSGATYRLYGKP

DAPELFLKHGKGSVANDVTDEMVRNLNWLTEFMPLPTIKHFIRTPDDAWLLTTAIPGKTA

FQVLEEYPDSGENIVDALAVFLRRLHSIPVCNCPFNSDRVFRLAQAQSRMNNGLVDASD

FDDERNGWPEQVVKEMHKLLPFSPDSVVTHGDFSLDNLIFDEGKLIGCIDVGRVGIAD
                        RYQDLAILWNCLGEFSPSLQKRLFQKYGIDNPDMNKLQFHLMLDEFF"
     primer_bind        1720..1736
                        /label=M13 rev
                        /note="common sequencing primer, one of multiple similar
                        variants"
     misc_feature        1722..1740
                        /label=M13R
                        /note="M13R"
     misc_feature        complement(1777..1912)
                        /label=PiggyBac 5'TR

```

Annexes

```

                                /note="PiggyBac 5'TR"
misc_feature    1793..1811
                                /label=TR2
                                /note="TR2"
                                /label=Rv2 - PiggyBac NO attP NO lox
misc_feature    complement(2087..2307)
                                /label=attP'
                                /note="attP'"
protein_bind    2143..2242
                                /label=phage phi-C31 attP
                                /bound_moiety="phage phi-C31 integrase"
                                /note="attachment site of phage phi-C31"
protein_bind    2318..2351
                                /label=loxP
                                /bound_moiety="Cre recombinase"
                                /note="Cre-mediated recombination occurs in the 8-bp
core
                                sequence (GCATACAT).".
misc_feature    2354..2356
                                /label=lac promoter
                                /note="lac promoter"
misc_feature    2357..3135
                                /label=ExupPromoter
CDS              3137..3205
                                /codon_start=1
                                /label=3xFLAG
                                /note="3xFLAG"
                                /translation="MDYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDK"
CDS              3206..3256
                                /codon_start=1
                                /label=NLS
                                /note="NLS"
                                /translation="MAPKKKRRKVGIHGVPAA"
CDS              3257..7357
                                /codon_start=2
                                /product="Cas9 endonuclease from the Streptococcus
pyogenes
                                Type II CRISPR/Cas system, mutated to improve targeting
                                specificity (Slaymaker et al., 2016)"
                                /label=eSpCas9(1.1)
                                /note="carries the mutations K848A, K1003A, and R1060A"
misc_feature    complement(3486..3519)

```

Annexes

```

/label=EM686
/note="EM686"
CDS      7358..7405
        /codon_start=1
        /product="bipartite nuclear localization signal from
        nucleoplasmin"
        /label=nucleoplasmin NLS
        /translation="KRPAATKKAGQAKKKK"
misc_feature 7397..7637
        /label=MCS
        /note="pBluescript multiple cloning site"
misc_feature 7397..7405
        /label=NLS
        /note="NLS"
misc_feature 7415..7637
        /label=SV40 term
        /note="SV40 term"
3'UTR      join(8245..8423,9028..9037)
intron      8424..9027
        /label=3'UTRintron
CDS      9042..9722
        /codon_start=1
        /product="wild-type DsRed"
        /label=DsRed1
        /note="mammalian codon-optimized"

/translation="MVRSSKNVIKEFMRFKVRMEGTVNGHEFEIEGEGEGRPYEGHNTV
KLKVTGGGPLPFAWDILSPQFQYGSKVYVKHPADIPDYKKLSFPEGFKWERVMNFEDGG
VVTVTQDSSLQDGCFIYKVKFIGVNFPSDGPVMQKKTMGWEASTERLYPRDGVLKGEIH
KALKLKDGGHYLVEFKSIYMAKKPVQLPGYYYVDSKLDITSHNEDYTIVEQYERTEGRH
HLFL"
misc_feature 9724..9960
        /label=SV40 Term
        /note="SV40 Term"
primer_bind complement(9765..9784)
        /label=GATC-pEGFP_C2-RP
polyA_signal 9843..9961
        /label=SV40 poly(A) signal
        /note="SV40 polyadenylation signal"

```


Annexes

```

protein_bind    9979..10012
                /label=loxP
                /bound_moiety="Cre recombinase"
                /note="Cre-mediated recombination occurs in the 8-bp
core
                sequence (GCATACAT)."
```

```

primer_bind    10012..10041
                /label=Fw2 - PiggyBac NO attP NO lox EM834
```

```

misc_feature    complement(10105..10262)
                /label=original PiggyBac 3'region
```

```

misc_feature    complement(10200..10218)
                /label=TR2
                /note="TR2"
```

```

misc_feature    10214..10234
                /label=direct repeat
```

```

misc_feature    complement(10250..10262)
                /label=TR1
                /note="TR1"
```

```

primer_bind    complement(10392..10408)
                /label=M13 fwd
                /note="common sequencing primer, one of multiple similar
variants"
```

```

misc_feature    10681..10878
                /label=hs promoter
                /note="hs promoter"
```

```

misc_feature    10879..11267
                /label=hs promoter
                /note="hs promoter"
                /label=rrnB terminator, EM33
                /note="rrnB terminator, EM33"
```

```

terminator      11268..11313
                /label=rrnB T1 terminator
                /note="transcription terminator T1 from the E. coli rrnB
gene"
```

```

CDS              11397..13181
                /codon_start=1
                /label=transposase
                /note="transposase"
```

/translation="MGCSLDDEHILSALLQSDDELVGEDSDSEISDHVSEDDVQSDTEE

AFIDEVHEVQPTSSGSEILDEQNVIEQPGSSLASNRILTLPQRTIRGKNKHCWSTSKST

Annexes

RRSRVSALNIVRSQRGPTRMCRNIYDPLLCFKLFFTDEIISEIVKWTNAEISLKRRESM

TGATFRDTNEDEIYAFFGILVMTAVRKDNHMSTDDLFDRSLSMVYVSVMSRDRFDFLIR

CLRMDDKSIRPTLRENDVFTPVRKIWDLFIHQCIQNYTPGAHLTIDEQLLGFRGRCPFR

MYIPNKPSKYGIKILMMCDSGTKYMINGMPYLGRGTQTNGVPLGEYYVKELSKPVHGSC

RNITCDNWFTSIPLAKNLLQEPYKLTIVGTVRSNKREIPEVLKNSRSRPVGTSMFCFDG

PLTLVSYKPKPAKMVYLLSSCDEDASINESTGKPQMVMYYNQTKGGVDTLDQMCSVMTC

SRKTNRWPMALLYGMINIACINSFIIYSHNVSSKGEKVQSRKKFMRNLYMSLTSSFMRK

RLEAPTLKRYLRDNISNILPNEVPGTSDDSTEOPVMMKRTYCTYCPSKIRRKANASCKK

CKKVICREHNIDMCQSCF"

terminator

13537..13564

/label=rrnB T2 terminator

/note="transcription terminator T2 from the E. coli rrnB gene"

ORIGIN

```
1 aacatgtgag caaaaggcca gcaaaaggcc aggaaccgta aaaaggccgc gttgctggcg
61 tttttccata ggctccgccc ccctgacgag catcacaaaa atcgacgctc aagtcagagg
121 tggcgaaacc cgacaggact ataaagatac caggcgtttc cccctggaag ctccctcgtg
181 cgctctcctg ttccgaccct gccgcttacc ggatacctgt ccgcctttct cccttcggga
241 agcgtggcgc tttctcatag ctcacgctgt aggtatctca gttcgggtgta ggtcgttcgc
301 tccaagctgg gctgtgtgca cgaaccccc gttcagccc accgctgcgc cttatccggt
361 aactatcgtc ttgagtccaa cccggtaga cagcacttat cgccactggc agcagccact
421 ggtaacagga ttagcagagc gaggtatgta ggcggtgcta cagagttctt gaagtgggtg
481 cctaactacg gctacactag aagaacagta tttggtatct gcgctctgct gaagccagtt
541 accttcggaa aaagagttgg tagctcttga tccggcaaac aaaccaccgc tggtagcggc
601 gggttttttg tttgcaagca gcagattacg cgcagaaaaa aaggatctca agaagatcct
661 ttgatctttt ctacgggggc tgacgctcag tggaaacgac cgtaactcac gttaagggat
721 tttgggtcatg agcttgccgc gtcccgtcaa gtcagcgtaa tgctctgcca gtgttacaac
781 caattaacca attctgatta gaaaaactca tcgagcatca aatgaaactg caattttattc
841 atatcaggat tatcaatacc atatttttga aaaagccggt tctgtaatga aggagaaaaac
901 tcaccgagga agttccatag gatggcaaga tcctgggtatc ggtctgcgat tccgactcgt
961 ccaacatcaa tacaacctat taatttcccc tcgtcaaaaa taagggtatc aagtgaagaa
1021 tcaccatgag tgacgactga atccggtgag aatggcaaaa gtttatgcat ttctttccag
1081 acttggtcaa caggccagcc attacgctcg tcatcaaaat cactcgcac aaccaaacccg
1141 ttattcattc gtgattgcgc ctgagcgaga cgaaatacgc gatcgctggt aaaaggacaa
```

clxxxv

Annexes

1201 ttacaaacag gaatcgaatg caaccggcgc aggaacactg ccagcgcacg aacaatatatt
 1261 tcacctgaat caggatatct ttctaatacc tggaaatgctg tttttccggg gatcgcagtg
 1321 gtgagtaacc atgcatcatc aggagtacgg ataaaatgct tgatgggtcgg aagaggcata
 1381 aattccgtca gccagtttag tctgaccatc tcatctgtaa catcattggc aacgctacct
 1441 ttgccatgtt tcagaaacaa ctctggcgca tcgggcttcc catacaagcg atagattgtc
 1501 gcacctgatt gcccgacatt atcgcgagcc catttatacc catataaatc agcatccatg
 1561 ttggaattta atcgcggcct cgacgtttcc cgttgaatat ggctcataac accccttgta
 1621 ttactgttta tgtaagcaga cagttttatt gttcatgatg atatatattt atcttgtgca
 1681 atgtaacatc agagattttg agacacgggc cagagctgcc aggaaacagc tatgaccatg
 1741 taatacgacg atatgatcct gatgcagcta gattaaccct agaaagatag tctgcgtaaa
 1801 attgacgcat gcattcttga aatattgctc tctctttcta aatagcgcga atccgtcgtc
 1861 gtgcatttag gacatctcag tcgccgcttg gagctcccggt gaggcgtgct tgtcaatgcg
 1921 gtaagtgtca ctgattttga actataacga ccgcgtgagt caaaatgacg catgattatc
 1981 ttttacgtga cttttaagat ttaactcata cgataattat attgttattt catgttctac
 2041 ttacgtgata acttattata tatatatattt cttgttatag attagatcgc gtcgcgcga
 2101 ctgacggctg taagcaccgc cgtacgtgtc caccgccgtc acaaccctt gtgtcatgtc
 2161 ggcgacccta cgcccccaac tgagagaact caaagggttac cccagttggg gcactactcc
 2221 cgaaaaccgc ttctgacctg ggaaaacgtg aagccccggg gcatccgctg agggttgccg
 2281 ccggggcttc ggtgtgtccg tcagtactgc aggtaccata acttcgtata gcatacatta
 2341 tacgaagtta taccggatcc aatatagata ttttgatgct tgaggcgaaa aaaaaggctc
 2401 gcagtgttat ttttgaaaaa ttttaagggtg aaaacattgg atgacacttt tccgtgcatt
 2461 gaaatcaata cataaaaaata aattacctgg catccctgtc cggtagtggt gagtgcacaa
 2521 tgtgatggca ttggtgacat tgggtgagtgc atgcatgatt aaaaaatata aacggtcgcg
 2581 atttttcgca tttcttgcca caaattccat tggcatctca aatattacaa taattccgca
 2641 tcgagtataa attttcaact ccatcaatgg tcacatttaa actaatattc gaatttttcc
 2701 gccggatatt ccacaaaacc cggcacgtaa tcaactataa ctcatctag taccgcaccg
 2761 aactaacga aattttgctc cggtttcgtc cgacttattt ttgctctaga ccagatcgac
 2821 cttgccaaac ttcaactcaa gttcatcaag ccaaggacga gcatcgccgc gttggaagaa
 2881 aaaaaggaa agtttcagaa aagtgttctg tggaaatatt atcctcaaaa gtgaaaatct
 2941 aaacacaaa cgggtcgcta aaagcgtgcg tgaaaacatt gataaaaacc tgtgtgaaaa
 3001 ttgcaaattt cttcgaaaga gtattggtaa gtgtcgttct tttttccacc atgtgaccat
 3061 tttgtagaat tttccttttc ggaggaaaag ctgggttgctg ggataaaaga ggttatcttt
 3121 tgtctacaga gtgaaaatgg actataagga ccacgacgga gactacaagg atcatgatat
 3181 tgattacaaa gacgatgacg ataagatggc cccaaagaag aagcgggaag tcggtatcca
 3241 cggagtccca gcagccgaca agaagtacag catcggcctg gacatcggca ccaactctgt
 3301 gggctgggac gtgatcaccg acgagtacaa ggtgcccgac aagaaattca aggtgctggg
 3361 caacaccgac cggcacagca tcaagaagaa cctgatcgga gccctgctgt tcgacagcgg
 3421 cgaaacagcc gaggccaccc ggctgaagag aaccgccaga agaagatata ccagacggaa
 3481 gaaccggatc tgctatctgc aagagatctt cagcaacgag atggccaagg tggacgacag
 3541 cttcttccac agactggaag agtccttctt ggtggaagag gataagaagc acgagcggca
 3601 ccccatcttc ggcaacatcg tggacgaggt ggcctaccac gagaagtacc ccaccatcta
 3661 ccacctgaga aagaaactgg tggacagcac cgacaaggcc gacctgcggc tgatctatct

Annexes

3721 ggccctggcc cacatgatca agttccgggg ccacttcctg atcgagggcg acctgaaccc
3781 cgacaacagc gacgtggaca agctgttcat ccagctgggtg cagacctaca accagctgtt
3841 cgaggaaaac cccatcaacg ccagcggcgt ggacgccaag gccatcctgt ctgccagact
3901 gagcaagagc agacggctgg aaaatctgat cgcccagctg cccggcgaga agaagaatgg
3961 cctgttcgga aacctgattg ccctgagcct gggcctgacc cccaacttca agagcaactt
4021 cgacctggcc gaggatgcca aactgcagct gagcaaggac acctacgacg acgacctgga
4081 caacctgctg gccagatcg gcgaccagta cgccgacctg tttctggccg ccaagaacct
4141 gtccgacgcc atcctgctga gcgacatcct gagagtgaac accgagatca ccaaggcccc
4201 cctgagcgcc tctatgatca agagatacga cgagcaccac caggacctga cctgctgaa
4261 agctctcgtg cggcagcagc tgccctgagaa gtacaaaagag attttcttcg accagagcaa
4321 gaacggctac gccggctaca ttgacggcgg agccagccag gaagagttct acaagttcat
4381 caagcccatc ctggaaaaga tggacggcac cgaggaactg ctcgtgaagc tgaacagaga
4441 ggacctgctg cggaagcagc ggaccttcga caacggcagc atccccacc agatccacct
4501 gggagagctg cacgccattc tgcggcggca ggaagatttt taccattcc tgaaggacia
4561 ccgggaaaag atcgagaaga tcctgacctt ccgcatcccc tactacgtgg gccctctggc
4621 caggggaaac agcagattcg cctggatgac cagaaaagagc gaggaaacca tcacccctg
4681 gaacttcgag gaagtgggtg acaagggcgc ttccgcccag agcttcatcg agcggatgac
4741 caacttcgat aagaacctgc ccaacgagaa ggtgctgccc aagcacagcc tgctgtacga
4801 gtacttcacc gtgtataacg agctgaccaa agtgaaatac gtgaccgagg gaatgagaaa
4861 gccgccttc ctgagcggcg agcagaaaaa ggccatcgtg gacctgctgt tcaagaccaa
4921 ccggaaagtg accgtgaagc agctgaaaga ggactacttc aagaaaatcg agtgcttcca
4981 ctccgtggaa atctccggcg tggaagatcg gttcaacgcc tccctgggca cataccacga
5041 tctgctgaaa attatcaagg acaaggactt cctggacaat gaggaaaacg aggacattct
5101 ggaagatatc gtgctgacct tgacactgtt tgaggacaga gagatgatcg aggaacggct
5161 gaaaacctat gccacctgt tcgacgacaa agtgatgaag cagctgaagc ggcggagata
5221 caccggctgg ggcaggctga gccggaagct gatcaacggc atccgggaca agcagtcggg
5281 caagacaatc ctggatttcc tgaagtccga cggcttcgcc aacagaaaact tcatgcagct
5341 gatccacgac gacagcctga cctttaaaga ggacatccag aaagcccagg tgtccggcca
5401 gggcgatagc ctgcacgagc acattgccaa tctggccggc agccccgcca ttaagaaggg
5461 catcctgcag acagtgaagg tgggtggacga gctcgtgaaa gtgatgggcc ggcacaagcc
5521 cgagaacatc gtgatcgaaa tggccagaga gaaccagacc accagaagg gacagaagaa
5581 cagccgcgag agaataagc ggatcgaaag gggcatcaaa gagctgggca gccagatcct
5641 gaaagaacac cccgtggaaa acaccagct gcagaacgag aagctgtacc tgtactacct
5701 gcagaatggg cgggatatgt acgtggacca ggaactggac atcaaccggc tgtccgacta
5761 cgatgtggac catatcgtgc ctcagagctt tctggccgac gactccatcg acaacaagg
5821 gctgaccaga agcgacaaga accggggcaa gagcgacaac gtgccctccg aagaggtcgt
5881 gaagaagatg aagaactact ggcggcagct gctgaacgcc aagctgatta cccagagaaa
5941 gttcgacaat ctgaccaagg ccgagagagg cggcctgagc gaactggata aggcggctt
6001 catcaagaga cagctggtgg aaaccgggca gatcacaag cagctggcac agatcctgga
6061 ctcccgatg aacactaagt acgacgagaa tgacaagctg atccgggaag tgaaagtgat
6121 caccctgaag tccaagctgg tgtccgattt ccggaaggat ttccagtttt acaaagtgcg
6181 cgagatcaac aactaccacc acgcccacga cgcctacctg aacgccgtcg tgggaaccgc

Annexes

6241 cctgatcaaa aagtaccctg cgctggaaag cgagttcgtg tacggcgact acaaggtgta
6301 cgacgtgctg aagatgatcg ccaagagcga gcaggaaatc ggcaaggcta ccgccaagta
6361 cttctttctac agcaacatca tgaacttttt caagaccgag attaccctgg ccaacggcga
6421 gatccggaag gcgcctctga tcgagacaaa cggcgaaacc ggggagatcg tgtgggataa
6481 gggccgggat tttgccaccg tgcggaaagt gctgagcatg ccccaagtga atatcgtgaa
6541 aaagaccgag gtgcagacag gcggcttcag caaagagtct atcctgcca agaggaacag
6601 cgataagctg atcgccagaa agaaggactg ggaccctaag aagtacggcg gcttcgacag
6661 cccaccctg gcctattctg tgctggtggt ggccaaagtg gaaaagggca agtccaagaa
6721 actgaagagt gtgaaagagc tgctggggat caccatcatg gaaagaagca gcttcgagaa
6781 gaatcccatc gactttctgg aagccaaggg ctacaaaagaa gtgaaaaagg acctgatcat
6841 caagctgcct aagtactccc tgttcgagct ggaaaacggc cggaagagaa tgctggcctc
6901 tgccggcgaa ctgcagaagg gaaacgaact ggccctgccc tccaaatatg tgaacttcct
6961 gtacctggcc agccactatg agaagctgaa gggctcccc gaggataatg agcagaaaca
7021 gctgtttgtg gaacagcaca agcactacct ggacgagatc atcgagcaga tcagcgagtt
7081 ctccaagaga gtgatcctgg ccgacgctaa tctggacaaa gtgctgtccg cctacaacaa
7141 gcaccgggat aagcccatca gagagcaggc cgagaatatc atccacctgt ttacctgac
7201 caatctggga gccctgccc ccttcaagta ctttgacacc accatcgacc ggaagaggta
7261 caccagcacc aaagaggtgc tggacgccac cctgatccac cagagcatca ccggcctgta
7321 cgagacacgg atcgacctgt ctgagctggg aggcgacaaa aggcggcgcg ccacgaaaaa
7381 ggccggccag gcaaaaaaga aaaagtaaga attctagaca taatcagcca taccacattt
7441 gtagagggtt tacttgcttt aaaaaacctc ccacacctcc ccctgaacct gaaacataaa
7501 atgaatgcaa ttgttgttgt taacttggtt attgcagctt ataatggtta caaataaagc
7561 aatagcatca caaatctcac aaataaagca tttttcttca ctgcattcta gttgtggttt
7621 gtccaaactc atcaatgtat ctaggatgtg cgatccatct ttacatgtag cttgtgcatt
7681 gaatccaatt ataatttgcc ttggcaccag ctgagccaga caagaaagaa agcttcccag
7741 aagtatatcg atttagaagg gttgacgtca ctttgctgac tgcactaata cagcaaatga
7801 tacaattaga atgattcaag tgaaattccc aaattactgc tttgtctctg gatttggtta
7861 tcagattaca ttcgaagcta agaatagcta ccgaaattgt cgatcaaatc aggaaatcct
7921 ttctctatcg aaaaaggcat tcgcacatct ttctctgtat gccatataca cgaatggtag
7981 gtacattgac gtctttgcca gaagttgaac tgcacgttc aaggtagaga atgaacgact
8041 aacagacaca agcacgtttt gctgtccatt cagacacagg gatggtacct atagtcgac
8101 gatttagagc catccaaccg aacagaggta tatgtatgaa tggattgcag aaattttcta
8161 gaagtacaac caccactacg gcagtgctta taaaacgccc ctgcaaaggc aaaaccagct
8221 caatcgaata cgtttcctag tggagtgaac attacgcggg ccaagtaagc agtgccagtg
8281 caagtgaagt gaagtctcta gtgaaaaaga gtgatccaat tagccagagg agaaaatttc
8341 agagtgaaca aagctttggt caaaggacaa ttactattaa atttgtgaaa gtgcatttcg
8401 gtgaagggaa tcttctagtg aaggtaggta aattaaatga tgaaattata gctatgagcg
8461 aaaactagtt tggatgaatga ttcctttgtc tttgaatgag caaactatct tccaagatgg
8521 cgactattga gctttgagtg attagtgaat atttgcaacg cagtttcatc atcattgata
8581 aaaccaatt gtgattcacg gcgataatca tatttcgttg aatcatcgct gctaattgaa
8641 ttaaatttct agagcaagcg cgaattcgcc atatttctaa aattaaatat tgtggtgata
8701 attaccatt aaggtaatat taacacatat cgagaaaaac cttgaggaaa tcgtgaaaac

Annexes

8761 ttgaagatac gcaattttcca aactacgtag ttcaaagtcg aaaacaagtt aatttttcac
8821 taaaaagtag ggcgttggtg tgacgtcatc accttcaagt gtatatTTTT cacttggcct
8881 gcgactgcaa acgcagacaa agcaaaacaa gtttaaaacc tgtcgtgctg tgctcgaagc
8941 caaaggcaat gaatcaatat caaatgagag tttgcatttc acaaccaatt actgaagcgt
9001 ttcctcgttt ctttttctgc tcaacagaga tttcaacaat gatgggtgcg tcttccaaga
9061 acgtcatcaa ggagttcatg cgcttcaagg tgcgcatgga gggcaccgtg aacggccacg
9121 agttcgagat cgagggcgag ggcgagggcc gccctacga gggccacaac accgtgaagc
9181 tgaaggtgac caagggcggc cccctgccct tcgcctggga catcctgtcc cccagttcc
9241 agtacggctc caaggtgtac gtgaagcacc ccgccgacat ccccgactac aagaagctgt
9301 ccttccccga gggcttcaag tgggagcgcg tgatgaactt cgaggacggc ggcgtggtga
9361 ccgtgaccca ggactcctcc ctgcaggacg gctgcttcat ctacaagggtg aagttcatcg
9421 gcggtgaactt cccctccgac ggccccgtaa tgcagaagaa gaccatgggc tgggaggcct
9481 ccaccgagcg cctgtacccc cgcgacggcg tgctgaaggg cgagatccac aaggccctga
9541 agctgaagga cggcgccac tacctgggtg agttcaagtc catctacatg gccagaagc
9601 ccgtgcagct gcccggtac tactacgtgg actccaagct ggacatcacc tcccacaacg
9661 aggactacac catcgtggag cagtacgagc gcaccgaggg ccgccaccac ctgttctgt
9721 agcgcccgcg actctagatc ataatcagcc ataccacatt tgtagagggtt ttacttgctt
9781 taaaaaacct cccacacctc cccctgaacc tgaaacataa aatgaatgca attggtgtg
9841 ttaacttggt tattgcagct tataatggtt acaataaag caatagcatc acaaatttca
9901 caaataaagc atttttttca ctgcattcta gttgtggttt gtccaaactc atcaatgtat
9961 cgcttgtaat tcgtcgacat aacttcgtat agcatacatt atacgaagtt atgagctcaa
10021 ttcgataaaa gttttgttac tttatagaag aaattttgag tttttgtttt ttttaataaa
10081 taaataaaca taaataaatt gtttgttgaa tttattatta gtatgtaagt gtaaatataa
10141 taaaacttaa tatctattca aattaataaa taaacctcga tatacagacc gataaaacac
10201 atgctcaat tttacgcatg attatcttta acgtacgtca caatatgatt atctttctag
10261 ggttaatcta gctgctgtt ctgcagcgtg tcgagcatct tcatctgctc catcacgctg
10321 taaaacacat ttgcaccgcg agtctgcccg tctccacgg gttcaaaaac gtgaatgaac
10381 gaggcgcgt cactggccgt cgttttacaa cgctcgtgact gggaaaaccc tggcgttacc
10441 caacttaatc gccttgacgc acatccccct ttcgccagct ggcgtaatag cgaagaggcc
10501 cgcaccgatc gcccttccca acagttgcgc agcctgaatg gcgaatggga cgcgccctgt
10561 agcggcgcat taagcgcggc ggggtgtggtg gttacgcgca gcgtgaccgc tacacttgcc
10621 agcgccctag cgcccgctcc tttcgctttc tcccttcct tctcgccac gttcgccgat
10681 cagataagtt caatgatatc cagtgcagta aaaaaaaaaa tgtttttttt atctactttc
10741 cgcaaaaatg ggttttatta acttacatac atactagaat tgatccccga tccccctaga
10801 atcccaaaac aaactggtta ttgtggtagg tcatttggtt ggcagaaaga aaactcgaga
10861 aatttctctg gccgttattc gttattctct cttttctttt tgagtctctc cctctctgca
10921 ctaatgctct ctactctgt cacacagtaa acggcatact gctctcgttg gttcgagaga
10981 gcgcgcctcg aatgttcgcg aaaagagcgc cggagtataa atagaggcgc ttcgtctacg
11041 gagcgacaat tcaattcaaa caagcaaagt gaacacgctc ctaagcgaaa gctaagcaaa
11101 taaacaagcg cagctgaaca agctaataaa tctgcagtaa agtgcaagtt aaagtgaatc
11161 aattaaaagt aaccagcaac caagtaaata aactgcaact actgaaatct gccagaagt
11221 aattattgaa tacaagaaga gaactctgaa tagggaattg ggaatttcaa ataaaacgaa

Annexes

11281 aggcctcagtc gaaagactgg gcctttcggt ttatctgtct agaaggccta attccagctg
 11341 agcgccgggtc gctaccatta ccagttgggtc tgggtgctggg gatcctatat aataaaaatgg
 11401 gatgttcttt agacgatgag catatcctct ctgctcttct gcaaagcgat gacgagcttg
 11461 ttggtgagga ttctgacagt gaaatatcag atcacgtaag tgaagatgac gtccagagcg
 11521 atacagaaga agcgtttata gatgaggtag atgaagtgca gccaacgtca agcggtagtg
 11581 aaatattaga cgaacaaaat gttattgaac aaccagggtt ttcatgtggt tctaacagaa
 11641 tcttgacctt gccacagagg actattagag gtaagaataa acattgttgg tcaacttcaa
 11701 agtccacgag gcgtagccga gtctctgcac tgaacattgt cagatctcaa agagggtccga
 11761 cgcgtatgtg ccgcaatata tatgaccac ttttatgctt caaactatth tttactgatg
 11821 agataattht ggaaattgta aaatggacaa atgctgagat atcattgaaa cgtcgggaat
 11881 ctatgacagg tgctacatth cgtgacacga atgaagatga aatctatgct tcttttggtg
 11941 ttctggtaat gacagcagtg agaaaagata accacatgtc cacagatgac ctctttgatc
 12001 gatctttgtc aatgggtgtac gtctctgtaa tgagtcgtga tcgthttgat tttttgatac
 12061 gatgtcttag aatggatgac aaaagtatac ggcccacact tcgagaaaac gatgtattta
 12121 ctctgttag aaaaatatgg gatctcttht tccatcagtg catacaaat tacactccag
 12181 gggctcatth gaccatagat gaacagttac ttggthtttag aggacgggtg ccgthtagga
 12241 tgtatatccc aaacaagcca agtaagtatg gaataaaaat cctcatgatg tgtgacagtg
 12301 gtacgaagta tatgataaat ggaatgcctt atthgggaag aggaacacag accaacggag
 12361 taccactcgg tgaatactac gtgaaggagt tatcaaagcc tgtgcacggt agthgtcgta
 12421 atattacgtg tgacaattgg ttcacctcaa tccctthtagc aaaaactta ctacaagaac
 12481 cgtataagth aaccattgtg ggaaccgtgc gatcaaaaa acgcgagata ccggaagtac
 12541 tgaaaaacag tcgctccagg ccagtgggaa catcgatgth ttgthttgac ggaccctta
 12601 ctctcgtctc atataaacgg aagccagcta agatgggtata cttattatca tcttgatg
 12661 aggatgcttc tatcaacgaa agtaccggtg aaccgcaaat ggttatgtat tataatcaaa
 12721 ctaaaggcgg agtggacacg ctagaccaa tgtgttctgt gatgacctgc agtaggaaga
 12781 cgaataggth gcctatggca ttattgtacg gaatgataaa cattgcctgc ataaattctt
 12841 ttattatata cagccataat gtcagtagca agggagaaaa ggttcaaagt cgcaaaaaat
 12901 ttatgagaaa cctttacatg agcctgacgt catcgthtat gcgtaagcgt ttgaaagctc
 12961 ctactthgaa gagatatttg cgcgataata tctctaata tthgccaaat gaagtgcctg
 13021 gtacatcaga tgacagtact gaagagccag taatgaaaa acgtacttac tgtacttact
 13081 gccctctaa aataaggcga aaggcaaatg catcgtgcaa aaaatgcaa aaagtattth
 13141 gtcgagagca taatattgat atgtgcaaa gthgtthctg actgactaat aagtataatt
 13201 tgtthctatt atgtataagt taaactaatt acttatttht taatacaaca tgactgttht
 13261 taaagtacaa aataagtht tthttgtaaa ggagagaatg tthaaaagt ttgttactth
 13321 atagaagaaa tthtgagtht tthgtththt ttaataaata aataaacata aattgtthgt
 13381 tgaatttgga tccgtcgagg cthtctgtt gthtgctggg gaacgctctc ctgagtagga
 13441 caaatccgcc gggagcggat ttgaacgtht tgaagcaacg gcccgaggg tggcgggcag
 13501 gacgcccgcc ataaactgcc aggcatacaa ctaagcagaa ggccatctct acggatggcc
 13561 tthttgcgth tctacaaact cthtctgggt agcggtagc gtattaattg cgttgctctc
 13621 actgcccgt ttcagtcgg gaaacctgtc gtgccagctc cattaatgaa tcggccaacg
 13681 cgcggggaga ggcggttht gtattggggt ctcttccgt tctcgtctc ctgactcgtc
 13741 gcgctcggtc gthcggctgc ggcgagcgg atcagctcac tcaaaggcgg taatacggth

Annexes

13801 atccacagaa tcaggggata acgcaggaaa g

//

6. pattBPUb-GFP, attB site-containing plasmid expressing *GFP* under control of the *Ae. aegypti* PUB promoter, inserted in the m-linked attP site of *Ae. albopictus* strain mX1 derived from m-albR9 (Addgene #183911)

```

LOCUS      attBPUbGFP                      4729 bp ds-DNA      circular SYN 19-
OCT-2020
DEFINITION synthetic circular DNA
SOURCE      synthetic DNA construct
            ORGANISM recombinant plasmid
FEATURES             Location/Qualifiers
     source             1..4729
                        /organism="recombinant plasmid"
                        /mol_type="other DNA"
     misc_feature       537..552
                        /label=M13F
                        /note="M13F"
     promoter           564..1944
                        /label=AePUB promoter
     3'UTR              join(1152..1330,1935..1944)
     intron             1331..1934
                        /label=3'UTRintron
     CDS                1946..2662
                        /codon_start=1
                        /product="enhanced GFP"
                        /label=EGFP
                        /note="mammalian codon-optimized"

/translation="MVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTLL
KFICTTGKLPVPWPTLVTTLTLYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDD
GNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNNSHNVYIMADKQKNGIK
VNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMLLL
EFVTAAGITLGMDELYK"
     polyA_signal       2787..2869
                        /label=SV40 poly(A) signal
                        /note="SV40 polyadenylation signal"
     misc_feature       2911..2966
                        /label=attB 2

```

Annexes

```

        /note="attB 2"
misc_feature      2914..2951
        /label=minimal attB
        /note="minimal attB"
misc_feature      complement(2990..3008)
        /label=M13R
        /note="M13R"

```

ORIGIN

```

1  ctttctctgcg ttatcccctg attctgtgga taaccgtatt accgcctttg agtgagctga
61  taccgctcgc cgcagccgaa cgaccgagcg cagcgagtca gtgagcgagg aagcggaaga
121 ggcgccaata cgcaaaccgc ctctccccgc gcgttggccg attcattaat gcagctggca
181 cgacaggttt cccgactgga aagcgggcag tgagcgcaac gcaattaata cgcgtaccgc
241 tagccaggaa gagtttgtag aaacgcaaaa aggccatccg tcaggatggc cttctgctta
301 gtttgatgcc tggcagttta tggcgggcgt cctgcccgcc accctccggg ccgttgcttc
361 acaacgttca aatccgctcc cggcggattt gtcctactca ggagagcggt caccgacaaa
421 caacagataa aacgaaaggc ccagtcttcc gactgagcct ttcgttttat ttgatgcctg
481 gcagttccct actctcgct taacgctagc atggatgttt tcccagtcac gacgttgtaa
541 aacgacggcc agtccttaaga tccatcttta catgtagctt gtgcattgaa tccaattata
601 atttgccttg gcaccagctg agccagacaa gaaagaaagc ttcccagaag tatatcgatt
661 tagaaggggt gacgtcactt tgctgactgc actaatacag caaatgatac aattagaatg
721 attcaagtga aattcccaaa ttactgcttt gtctctggat ttggttatca gattacattc
781 gaagctaaga atagctaccg aaattgtcga tcaaatcagg aaatcctttc tctatcgaaa
841 aaggcattcg cacatctttc tctgtatgcc atatacacga atggtaggta cattgacgtc
901 ttgcccagaa gttgaactgc atcgttcaag gtacagaatg aacgactaac agacacaagc
961 acgttttgct gtccattcag acacagggat ggtaccata gtcgatcgat ttagagccat
1021 ccaaccgaac agaggtatat gtatgaatgg attgcagaaa ttttctagaa gtacaaccac
1081 cactacggca gtgtctataa aacgcccctg caaaggcaaa accagctcaa tcgaatacgt
1141 ttcctagtgg agtgaacatt acgcggtcca agtaagcagt gccagtcaa gtgaagtga
1201 gtctctagtg aaaaagagtg atccaattag ccagaggaga aaatttcaga gtgaacaaag
1261 ctttgttcaa aggacaatta ctattaaatt tgtgaaagtg catttcggtg aagggaatct
1321 tctagtgaag gtaggtaaat taaatgatga aattatagct atgagcgaaa actagtttgg
1381 tgaatgattc ctttgtcttt gaatgagcaa actattttcc aagatggcga ctattgagct
1441 ttgagtgatt agtgaaaatt tgcaacgcag tttcatcatc attgataaaa cccaattgtg
1501 attcacggcg ataatacatat ttcgttgaat catcgctgct aattgaatta aatttctaga
1561 gcaagcgcga attcgccata tttctaaaat taaatattgt ggtgataatt acccataaag
1621 gtaatatata cacatatcga gaaaaacctt gaggaatcg tgaaaacttg aagatacgca
1681 atttccaaac tacgtagtcc aaagtcgaaa acaagttaat ttttactaa aaagtagggc
1741 gttgttgtga cgtcatcacc ttcaagtgtg tatttttcac ttggcctgcg actgcaaacg
1801 cagacaaagc aaaacaagt taaaacctgt cgtgtcgtgc tcgaagccaa aggcaatgaa
1861 tcaatatcaa atgagagttt gcatttcaca accaattact gaagcgtttc ctcgtttctt
1921 tttctgctca acagagattt caacaatggg gagcaagggc gaggagctgt tcaccggggt
1981 ggtgcccata ctggctcgagc tggacggcga cgtaaaccgc cacaagttca gcgtgtccgg

```

Annexes

2041 cgagggcgag ggcgatgcc cctacggcaa gctgaccctg aagttcatct gcaccaccgg
 2101 caagctgccc gtgccctggc ccaccctcgt gaccaccctg acctacggcg tgcagtgttt
 2161 cagccgctac cccgaccaca tgaagcagca cgacttcttc aagtccgcca tgcccgaagg
 2221 ctacgtccag gagcgcacca tcttcttcaa ggacgacggc aactacaaga cccgcgccga
 2281 ggtgaagtgc gagggcgaca ccctggtgaa ccgcatcgag ctgaagggca tgcacttcaa
 2341 ggaggacggc aacatcctgg ggcacaagct ggagtacaac tacaacagcc acaacgtcta
 2401 tatcatggcc gacaagcaga agaacggcat caaggtgaac ttcaagatcc gccacaacat
 2461 cgaggacggc agcgtgcagc tcgccgacca ctaccagcag aacaccccca tcggcgacgg
 2521 ccccgctgctg ctgcccgaca accactacct gagcaccacg tccgccctga gcaaagaccc
 2581 caacgagaag cgcgatcaca tggctcctgct ggagttcgtg accgccgccg ggatcactct
 2641 cggcatggac gagctgtaca agtaaagcgg ccgcgactct agatcaaatc agccatacca
 2701 cttttgtaga ggttttactt gcttttaaaa acctcccaca cctccccctg aacctgaaac
 2761 ataaaatgaa tgcaattggt gttgttaact tgtttattgc agcttataat ggttacaat
 2821 aaagcaatag catcacaat ttcacaaata aagcattttt ctactgca ttctagtgt
 2881 ggtttgtcca aactcatcaa tgtatcgctt tgcgggtgcc agggcggtgcc cttgggctcc
 2941 ccgggcgctg actccacctc acccatatcc cctatagtga gtcgtattac atggtcatag
 3001 ctgtttcctg gcagctctgg cccgtgtctc aaaatctctg atgttacatt gcacaagata
 3061 aaaatatatc atcatgaaca ataaaactgt ctgcttacat aaacagtaat acaaggggtg
 3121 ttatgagcca tattcaacgg gaaacgtcga ggccgcgatt aaattccaac atggatgctg
 3181 atttatatgg gtataaatgg gctcgcgata atgtcgggca atcaggtgcg acaatctatc
 3241 gcttgatgg gaagcccgat gcgccagagt tgtttctgaa acatggcaaa ggtagcgtg
 3301 ccaatgatgt tacagatgag atggtcagac taaactggct gacggaatct atgcctcttc
 3361 cgaccatcaa gcattttatc cgtactcctg atgatgcatg gttactcacc actgcatcc
 3421 ccggaataac agcattccag gtattagaag aatatcctga ttcaggtgaa aatattgttg
 3481 atgcgctggc agtggtcctg cgccggttgc attcgattcc tgtttgtaat tgcctttta
 3541 acagcgatcg cgtatttctg ctgcgtcagg cgcaatcacg aatgaataac ggttggttg
 3601 atgcgagtga ttttgatgac gagcgtaatg gctggcctgt tgaacaagtc tggaaagaaa
 3661 tgcataaact tttgcatc tcaccggatt cagtcgtcac tcatggtgat ttctcacttg
 3721 ataaccttat ttttgacgag gggaaattaa taggttgat tgatgttga cgagtcggaa
 3781 tcgcagaccg ataccaggat cttgccatcc tatggaactg cctcgggtgag ttttctcctt
 3841 cattacagaa acggcttttt caaaaatatg gtattgataa tcctgatatg aataaattgc
 3901 agtttcatct gatgctcgat gagtttttct aatcagaatt ggttaattgg ttgtaacact
 3961 ggcagagcat tacgctgact tgacgggacg gcgcaagctc atgacaaaaa tcccttaacg
 4021 tgagttacgc gtcgttccac tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt
 4081 gagatccttt ttttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaaacca ccgctaccag
 4141 cgggtggtttg tttgccggat caagagctac caactctttt tccgaaggta actggcttca
 4201 gcagagcgca gataccaaat actgttcttc tagtgtagcc gtagttaggc caccacttca
 4261 agaactctgt agcaccgcct acatacctcg ctctgctaata cctgttacca gtggctgctg
 4321 ccagtggcga taagtctgt cttaccgggt tggactcaag acgatagtta ccggataagg
 4381 cgcagcggtc gggctgaacg gggggttctg gcacacagcc cagcttggag cgaacgcact
 4441 acaccgaact gagataccta cagcgtgagc tatgagaaaag cgccacgctt cccgaaggga
 4501 gaaaggcgga caggtatccg gtaagcggca gggtcggaac aggagagcgc acgagggagc

Annexes

4561 ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtcctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg
4621 agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg
4681 cggccttttt acggttcctg gccttttgct ggccttttgc tcacatggt

//

7. Helper plasmid (*piggyBac* construct) used to express PhiC31 integrase under control of the PUB promoter (Addgene #183966)

LOCUS pB PUB-phiC31integrase 7924 bp ds-DNA circular
 SYN 07-OCT-2021
 DEFINITION synthetic circular DNA.
 ACCESSION .
 VERSION .
 KEYWORDS .
 SOURCE synthetic DNA construct
 ORGANISM synthetic DNA construct
 REFERENCE 1 (bases 1 to 7924)
 AUTHORS Li
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Exported Thursday, Oct 7, 2021 from SnapGene 5.2.5
<https://www.snapgene.com>

FEATURES Location/Qualifiers

source	1..7924
	/organism="synthetic DNA construct"
	/mol_type="other DNA"
primer_bind	4..20
	/label=M13 rev
	/note="common sequencing primer, one of multiple similar variants"
misc_feature	complement(61..196)
	/label=PiggyBac 5'TR
	/note="PiggyBac 5'TR"
misc_feature	77..95
	/label=TR2
	/note="TR2"
misc_feature	complement(371..379)
	/label=attP'
	/note="attP'"
promoter	387..1767
	/label=AePUB promoter
primer_bind	387..416
	/label=PUBFw-taag
3'UTR	join(975..1153,1758..1767)
intron	1154..1757
	/label=3'UTRintron
CDS	1781..1801
	/codon_start=1

Annexes

```

/product="nuclear localization signal of SV40 large
Tantigen"
/label=SV40 NLS
/translation="PKKKRKV"
CDS      1817..3631
        /codon_start=1
        /label=integrase
        /note="integrase"

/translation="DTYAGAYDRQSRERENSSAASPATQRSANEDKAADLQREVERDGG
RFRFVGHFSEAPGTSAFGTAERPEFERILNECRAGRLNMIIVYDVS RFSRLKVMDAIPI
VSELLALGVTIVSTQEGVFRQGNVMDLIHLIMRLDASHKESSLKSAKILDTKNLQRELG
GYVGGKAPYGFELVSETKEITRNGRMVNVVINKLAHSTTPLTGPF EFEPDVIRWWWREI
KTHKHLPFKPGSQAAIHGPSITGLCKRMDADAVPTRGETIGKKTASSAWDPATVMRILR
DPRIAGFAAEVIYKKKPDGTPPTTKIEGYRIQRDPITLRPVELDCGP IIEPAEWYELQAW
LDGRGRGKGLSRGQAILSAMDKLYCECGAVMTSKRGEESIKDSYRCRRRKVVDP SAPGQ
HEGTCNVSM AALDKFVAERIFNKIRHAEGDEETLALLWEAARRFGKLTEAPEKSGERAN
LVAERADALNALEELYEDRAAGAYDGPVGRKHFRKQQAALTLRQQGAEERLAELEAAEA
PKLPLDQWFPEDADADPTGPKSWWGRASVDDKRVFVGLFVDKIVVTKSTTGRGQGTPIE
        KRASITWAKPPTDDDEDDAQDGTEDVAA"
misc_feature      3636..3858
                  /label=SV40 term
                  /note="SV40 term"
polyA_signal      3739..3821
                  /label=SV40 poly(A) signal
                  /note="SV40 polyadenylation signal"
misc_feature      3864..4164
                  /label=18xP3
                  /note="3xP3"
promoter          4165..4374
                  /label=Hsp70 minimal promoter
misc_feature      4204..4209
                  /label=TATA
                  /note="TATA "
CDS              4375..5094
                  /codon_start=1
                  /product="enhanced GFP"
                  /label=EGFP
                  /note="mammalian codon-optimized"

```

/translation="MVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTL

KFICTTGKLPVPWPTLVTTLTYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDD

GNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNNSHNVYIMADKQKNGIK

VNFKIRHNIEDGSVQLADHYQONTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHML

EFVTAAGITLGMDELYK"

polyA_signal 5216..5297

/label=SV40 poly(A) signal

/note="SV40 polyadenylation signal"

misc_feature complement(5446..5603)

/label=original PiggyBac 3'region

/note="original PiggyBac 3'region"

misc_feature 5555..5575

/label=direct repeat

/note="direct repeat"

misc_feature complement(5591..5603)

/label=TR1

/note="TR1"

primer_bind complement(5733..5749)

/label=M13 fwd

/note="common sequencing primer, one of multiple similar variants"

terminator 5914..5941

/label=rrnB T2 terminator

/note="transcription terminator T2 from the E. coli rrnBgene"

rep_origin complement(6271..6859)

/direction=LEFT

/label=ori

/note="high-copy-number ColE1/pMB1/pBR322/pUC origin of replication"

CDS complement(7006..7815)

/codon_start=1

/gene="aph(3')-Ia"

/product="aminoglycoside phosphotransferase"

/label=KanR

/note="confers resistance to kanamycin in bacteria or

G418

(Geneticin(R)) in eukaryotes"

/translation="MSHIQRETSRPRLNNSMDADLYGYKWARDNVGQSGATIYRLYGKP

DAPELFLKHGKGSVANDVTDEMVRNLNWLTEFMPLPTIKHFIRTPDDAWLLTTAIPGKTA

FQVLEEYPDSGENIVDALAVFLRRLHSIPVCNCPFNSDRVFRLAQAQSRMNNGLVDASD

FDDERNGWPFVEQVWKEMHKLLPFSPDSVVTHGDFSLDNLIFDEGKLIGCIDVGRVGIAD

RYQDLAILWNCLGEFSPSLQKRLFQKYGIDNPDMNKLQFHLMLDEFF"

misc_feature 7886..7904

/label=pDONR-RP

/note="pDONR-RP"

ORIGIN

```

1  tgccaggaaa  cagctatgac  catgtaatac  gacgatatga  tcctgatgca  gctagattaa
61  ccctagaaag  atagtctgcg  taaaattgac  gcatgcattc  ttgaaatatt  gctctctctt
121 tctaaatagc  gcgaatccgt  cgctgtgcat  ttaggacatc  tcagtcgccg  cttggagctc
181 ccgtgaggcg  tgcttgtcaa  tgcggtaagt  gtcactgatt  ttgaactata  acgaccgcgt
241 gagtcaaaat  gacgcatgat  tatcttttac  gtgactttta  agatttaact  catacgataa
301 ttatatgtgt  atttcatgtt  ctacttacgt  gataacttat  tatatatata  ttttcttggt
361 atagattaga  tcgcgctcgc  ggatccatct  ttacatgtag  cttgtgcatt  gaatccaatt
421 ataatttgcc  ttggcaccag  ctgagccaga  caagaaagaa  agcttcccag  aagtatatcg
481 atttagaagg  gttgacgtca  ctttgctgac  tgcactaata  cagcaaataa  tacaattaga
541 atgattcaag  tgaaattccc  aaattactgc  tttgtctctg  gatttggtta  tcagattaca
601 ttcgaagcta  agaatagcta  ccgaaattgt  cgatcaaata  aggaaatcct  ttctctatcg
661 aaaaaggcat  tcgcacatct  ttctctgtat  gccatataca  cgaatggtag  gtacattgac
721 gtctttgcca  gaagttgaac  tgcacgttcc  aaggtagaga  atgaacgact  aacagacaca
781 agcacgtttt  gctgtccatt  cagacacagg  gatggtaccc  atagtcgacg  gatttagagc
841 catccaaccg  aacagaggta  tatgtatgaa  tggattgcag  aaattttcta  gaagtacaac
901 caccactacg  gcagtgtcta  taaaacgccc  ctgcaaaggc  aaaaccagct  caatcgaata
961 cgtttcctag  tggagtgaac  attacgcggt  ccaagtaagc  agtgccagtg  caagtgaagt
1021 gaagtctcta  gtgaaaaaga  gtgatccaat  tagccagagg  agaaaatttc  agagtgaaca
1081 aagctttggt  caaaggacaa  ttactattaa  atttgtagaa  gtgcatttcg  gtgaagggaa
1141 tcttctagtg  aaggtaggta  aattaaatga  tgaaattata  gctatgagcg  aaaactagtt
1201 tgggtgaatga  ttctttgtgc  tttgaatgag  caaactatct  tccaagatgg  cgactattga
1261 gctttgagtg  attagtgaag  atttgcaacg  cagtttcatc  atcattgata  aaaccaattt
1321 gtgattcacg  gcgataatca  tatttcgttg  aatcatcgct  gctaattgaa  ttaaatttct
1381 agagcaagcg  cgaattcgcc  atatttctaa  aattaaatat  tgtggtgata  attaccattt
1441 aaggtaatat  taacacatat  cgagaaaaac  cttgaggaaa  tcgtgaaaac  ttgaagatac
1501 gcaatttcca  aactacgtag  ttcaaagtcg  aaaacaagtt  aatttttcac  taaaaagtag
1561 ggcgttggtg  tgacgtcatc  accttcaagt  gtatatTTTT  cacttggcct  gcgactgcaa
1621 acgcagacaa  agcaaaaaca  gtttaaaacc  tgctgtgtcg  tgctcgaagc  caaaggcaat
1681 gaatcaatat  caaatgagag  tttgcatttc  acaaccaatt  actgaagcgt  ttctctgttt

```


Annexes

1741 ctttttctgc tcaacagaga tttcaacaat gagcggccct ccaaaaaaga agagaaaggt
 1801 agaagacccg ggcggcgaca cgtacgcggg tgcttacgac cgtcagtcgc gcgagcgca
 1861 aaattcgagc gcagcaagcc cagcgacaca gcgtagcgcc aacgaagaca aggcggccga
 1921 ccttcagcgc gaagtcgagc gcgacggggg ccggttcagg ttcgtcgggc atttcagcga
 1981 agcgccgggc acgtcggcgt tcgggacggc ggagcgcccg gagttcgaac gcatcctgaa
 2041 cgaatgccgc gccgggcggc tcaacatgat cattgtctat gacgtgtcgc gcttctcgcg
 2101 cctgaaggtc atggacgcga ttccgattgt ctcggaattg ctcgccctgg gcgtgacgat
 2161 tgtttccact caggaaggcg tcttccggca gggaaacgtc atggacctga ttcacctgat
 2221 tatgcggctc gacgcgtcgc acaaagaatc ttcgctgaag tcggcgaaga ttctcgacac
 2281 gaagaacctt cagcgcgaaat tgggcgggta cgtcggcggg aaggcgccct acggcttcga
 2341 gcttgtttcg gagacgaagg agatcacgcg caacggccga atggtcaatg tcgtcatcaa
 2401 caagcttgcg cactcgacca ctccccctac cggacccttc gagttcgagc ccgacgtaat
 2461 ccggtggttg tggcgtgaga tcaagacgca caaacacctt cccttcaagc cgggcagtca
 2521 agccgccatt caccgggca gcacacggg gctttgtaag cgcattggacg ctgacgccgt
 2581 gccgaccggg ggcgagacga ttgggaagaa gaccgcttca agcgccctggg acccggaac
 2641 cgttatgcga atccttcggg acccgcgat tgcgggcttc gccgctgagg tgatctacaa
 2701 gaagaagccg gacggcacgc cgaccacgaa gattgagggg taccgcattc agcgcgaccc
 2761 gatcacgctc cggccggctc agcttgattg cggaccgatc atcgagcccg ctgagtggta
 2821 tgagcttcag gcgtgggttg acggcagggg gcgcggcaag gggctttccc gggggcaagc
 2881 cattctgtcc gccatggaca agctgtactg cgagtgtggc gccgtcatga cttcgaagcg
 2941 cggggaagaa tcgatcaagg actcttaccg ctgccgtcgc cggaagggtg tcgaccgcgc
 3001 cgcacctggg cagcacgaag gcacgtgcaa cgtcagcatg gcggcactcg acaagtctgt
 3061 tgcggaacgc atcttcaaca agatcaggca cgccgaaggc gacgaagaga cgttggcgct
 3121 tctgtgggaa gccgcccgc gcttcggcaa gctcactgag gcgcctgaga agagcgggca
 3181 acgggcaaac cttgttgcg agcgcgccga cgccctgaac gcccttgaag agctgtacga
 3241 agaccgcgcg gcaggcgct acgacggacc cgttggcagg aagcacttcc ggaagcaaca
 3301 ggcagcgctg acgctccggc agcaaggggc ggaagagcgg cttgccgaac ttgaagccgc
 3361 cgaagccccg aagcttcccc ttgaccaatg gttccccgaa gacgccgacg ctgaccgcgc
 3421 cggccctaag tcgtgggtgg ggcgcgcgtc agtagacgac aagcgcggtg tcgtcgggct
 3481 cttcgtagac aagatcgttg tcacgaagtc gactacgggc agggggcagg gaacgcccac
 3541 cgagaagcgc gcttcgatca cgtgggcgaa gccgcccacc gacgacgacg aagacgacgc
 3601 ccaggacggc acggaagacg tagcggcgta gtaagcataa tcagccatac cacatttgta
 3661 gaggttttac ttgctttaaa aaacctccca cacctcccc tgaacctgaa acataaaatg
 3721 aatgcaattg ttgttggtta cttgtttatt gcagcttata atggttacaa ataaagcaat
 3781 agcatcacia atttcacaaa taaagcattt ttcttactg cattctagtt gtggtttgc
 3841 caaactcatc aatgtatcta agtatcta tcaattagag actaattcaa ttagagtcta
 3901 attcaattag agttatctaa ttcaattaga gactaattca attagagtct aattcaatta
 3961 gagttatcta attcaattag agactaattc aattagagtc taattcaatt agagtattct
 4021 aattcaatta gagactaatt caattagagt ctaattcaat tagagttatc taattcaatt
 4081 agagactaat tcaattagag tctaattcaa ttagagttat ctaattcaat tagagactaa
 4141 ttcaattaga gctaattcaa ttaggatcca agcttatcga tttcgaaccc tcgaccgcgc
 4201 gagtataaat agaggcgctt cgtctacgga gcgacaattc aattcaaaca agcaaagtga

Annexes

4261 acacgtcgct aagcgaaagc taagcaaata aacaagcgca gctgaacaag ctaaacaatc
4321 ggggtaccgc tagagtcgac ggtaccgcgg gcccgggatc caccggtcgc caccatggtg
4381 agcaagggcg aggagctggt caccgggggtg gtgcccattcc tggctgagct ggacggcgac
4441 gtaaaccggcc acaagttcag cgtgtccggc gagggcgagg gcgatgccac ctacggcaag
4501 ctgaccctga agttcatctg caccaccggc aagctgcccc tgccctggcc caccctcgtg
4561 accaccctga cctacggcgt gcagtgcctc agccgctacc ccgaccacat gaagcagcac
4621 gactttcttca agtccgccat gcccggaaggc tacgtccagg agcgcaccat cttcttcaag
4681 gacgacggca actacaagac ccgcgccgag gtgaagttcg agggcgacac cctggtgaac
4741 cgcacgcgac tgaagggcat cgacttcaag gaggacggca acatcctggg gcacaagctg
4801 gagtacaact acaacagcca caacgtctat atcatggccg acaagcagaa gaacggcatc
4861 aaggtgaact tcaagatccg ccacaacatc gaggacggca gcgtgcagct cgccgaccac
4921 taccagcaga acacccccat cggcgacggc cccgtgctgc tgcccgacaa ccactacctg
4981 agcaccacgt ccgccctgag caaagacccc aacgagaagc gcgatcacat ggtcctgctg
5041 gagttcgtga ccgccgccgg gatcactctc ggcattggacg agctgtacaa gtaaagcggc
5101 cgcgactcta gatcaaatca gccataccac atttgtagag gttttacttg ctttaaaaaa
5161 cctcccacac ctccccctga acctgaaaca taaaatgaat gcaattggtg ttgttaactt
5221 gttttattgca gtttataatg gttacaaata aagcaatagc atcacaaaatt tcacaaaataa
5281 agcatttttt tcaactgcatt ctagttgttg tttgtccaaa ctcatcaatg tatcgcttgt
5341 aattcgtcga catgagctca attcgataaa agttttgtta ctttatagaa gaaattttga
5401 gtttttgttt tttttaataa ataaataaac ataaataaat tgtttgttga atttattatt
5461 agtatgtaag tgtaaatata ataaaactta atatctattc aaattaataa ataaacctcg
5521 atatacagac cgataaaaaca catgcgtcaa ttttacgcat gattatcttt aacgtacgtc
5581 acaatatgat tatctttcta ggggttaatct agctgcgtgt tctgcagcgt gtcgagcatc
5641 ttcatctgct ccatcacgct gtaaaacaca tttgcaccgc gagtctgccc gtcctccacg
5701 ggttcaaaaa cgtgaatgaa cgaggcgcg cactggccg tcgttttaca ggggatgtct
5761 tcatatatat gaagactccc atctgttggt tgctcggtaga cgctctcctg agtaggacaa
5821 atccgccggg agcggatttg aacgttgtga agcaacggcc cgagggggtg cgggcaggac
5881 gcccgccata aactgccagg catcaaaacta agcagaaggc catcctgacg gatggccttt
5941 ttgcgtttct acaaaactct cctggctagc ggtacgcgta ttaattgcgt tgcgctcact
6001 gcccgctttc cagtcgggaa acctgtcgtg ccagctgcat taatgaatcg gccaacgcgc
6061 ggggagaggc ggtttgcgta ttgggcgctc ttccgcttcc tcgctcactg actcgtcgcg
6121 ctcggtcggt cggctgcggc gagcggatc agctcactca aaggcggtaa tacggttatc
6181 cacagaatca ggggataacg caggaaagaa catgtgagca aaaggccagc aaaaggccag
6241 gaaccgtaaa aaggccgcgt tgctggcggt tttccatagg ctccgcccc ctgacgagca
6301 tcacaaaaat cgacgctcaa gtcagagggt gcgaaacccg acaggactat aaagatacca
6361 ggcgtttccc cctggaagct ccctcgtgcg ctctcctggt ccgaccctgc cgcttacggg
6421 atacctgtcc gcctttctcc cttcgggaag cgtggcgctt tctcatagct cacgctgtag
6481 gtatctcagt tcgggtgtagg tcgttcgctc caagctgggc tgtgtgcacg aacccccgt
6541 tcagcccgac cgctgcgcct tatccggtaa ctatcgtctt gagtccaacc cggtaaagaca
6601 cgacttatcg ccaactggcag cagccactgg taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg
6661 cgggtctaca gagttcttga agtggtggcc taactacggc tacactagaa gaacagtatt
6721 tggatatctgc gctctgctga agccagttac cttcggaaaa agagttggta gctcttgatc

Annexes

6781 cggcaaacaa accaccgctg gtagcgggtgg tttttttggt tgcaagcagc agattacgcg
6841 cagaaaaaaa ggatctcaag aagatccttt gatcttttct acgggggtctg acgctcagtg
6901 gaacgacgcg taactcacgt taagggattt tggatcatgag cttgcgccgt cccgtcaagt
6961 cagcgtaatg ctctgccagt gttacaacca attaaccaat tctgattaga aaaactcatc
7021 gagcatcaaa tgaaactgca atttattcat atcaggatta tcaataccat atttttgaaa
7081 aagccgtttc tgtaatgaag gagaaaactc accgaggcag ttccatagga tggcaagatc
7141 ctggtatcgg tctgcgattc cgactcgtcc aacatcaata caacctatta atttcccctc
7201 gtcaaaaata aggttatcaa gtgagaaatc accatgagtg acgactgaat ccggtgagaa
7261 tggcaaaagt ttatgcattt ctttccagac ttgttcaaca ggccagccat tacgctcgtc
7321 atcaaaatca ctgcgcatcaa ccaaaccgtt attcattcgt gattgcgcct gagcgagacg
7381 aaatacgcgga tcgctgttaa aaggacaatt acaaacagga atcgaatgca accggcgcag
7441 gaacactgcc agcgcgcatcaa caatatcttc acctgaatca ggatattcct ctaataacctg
7501 gaatgctgtt tttccgggga tcgcagtggt gagtaaccat gcatcatcag gagtacggat
7561 aaaatgcttg atggtcggaa gaggcataaa ttccgtcagc cagtttagtc tgaccatctc
7621 atctgtaaca tcattggcaa cgctaccttt gccatgtttc agaaacaact ctggcgcgcatc
7681 gggcttccca tacaagcgat agattgtcgc acctgattgc ccgacattat cgcgagccca
7741 ttataacca tataaatcag catccatgtt ggaatttaac cgcggcctcg acgtttcccg
7801 ttgaatatgg ctcataacac cccttgattt actgtttatg taagcagaca gttttattgt
7861 tcatgatgat atatctttat cttgtgcaat gtaacatcag agatcttgag acacggggcca
7921 gagc

//

8. Genomic sequence flanking the Aalb-m insertion on the 3' piggyBac side.

In black: sequence confirmed by sequencing PCR products. In Blue: low-quality sequence (2x coverage) obtained from two Nanopore reads

```
TTAAGCTAGTATTTACATTCTGGTTTCCGATTTAGTTTAATAAGAATCAATCCGCAAAACAGAGATAAGATT
TTGTATCCTGGCCCGAGGTAGTGGCTCACAATGGCTCAACGCAGACCCAAGCAACACAGAAAACATCTTTG
GACCATCAGTATTTCCAAAGATGTTTTTTAAGTGAATTATAAGCGATTGAGAAAACATCTTGTGTTAATAT
CCAGCTCTAATTATGCTGATCGAAAAACAAACATCAAAACATGTTATTGTCTATATCACGTATGAAATAT
GTTTATATAACTATCAGTGAATCAAAATTC AACCATCGCGCAACAATAATGACAATGTGCAACCTGTATT
TGTTGCGACAAAACAACCCATGCGACATATGTTTGTCCCAACTTGAAAATAATGGGATTAACATCGTACAC
CACGAGTTTAGAGATTTTAAGCCTTGCAATTGCGATTTTCGAACGGTTACTTCGAGTCGGTAAACACTGCAA
CTCTGGTGAAGCTCTATCATCAAACAGTTTCGACTTTGGATTAGTAATAATTGATTATTCACGAGTTGAAA
AGTACGCAACAAATTCAGCTTCCGTTTTGTCTGCAACAAAAAATTCGAGATCATGTCATTATCTGTCACC
AGTAGGGATAAAGACTATCCATCACATCTTCTTTGTTGCTTGTTTGTGCCTCTTTTGTCTGACAATTCTC
TTCACTGATAACTATTATATAACAGAAACATCAAGTTGCTAATTCATCATATGTAAAAGCAAACGCGACA
GAACAACAGAAAGAAGATAAAGATAAAAAATAAACCAAAATGCAAACATTGTACCGTCTACCCCCGATGGTT
TGAACGACACCTCATGCAAACCAACGGGGTCTTTTTTTAATTTGAACTTTTAGTAACCTGTGGACATCA
ACAAACGTACTTTTGTAACCTTATTTGTTGTTTTGTTTTGATTCTGCGTTCGGTTTCACCGCGTTCCTATG
GGCAGAATGACGTTTGAACCATTTTGTAGTTTGAACGATGTGCAGATTGGCGGGGGTCAAATTAAGTGT
TCAGATTAGATGCTGTCAAACCAATGGGGGTAGACGGTATGCATTGATTTTAACCATTCCTAGGAGGCTCT
GGTCGATGGGGGAGAGTGAGTGGTTC AAGGGACCACGTCCCCACGTCCGACGAACGTCCCCGCGCTAATT
AGGATCACCATACACAAATTTGGCCATCATCCTCAAGGCCAAAATGTACAGGCTGCTGATCTACCAACTGG
TCTGTGCAATACTATCCAGAAACACCGCGCAACTTGTATTCCGGCCTATGTGAAAGAATCAGCATCCAACA
GTCGGTGCTATTCCAACCTCCAGCGTGAATTCGGGCACTCAAACCTCACCTCTCTGCCGTGTGCAGCATAGT
TGTCCCATGTTCCAAAACAGCAAACTGAGAAAAACGCGTTTTAAGTTTCAGCATTGTTTCCATCTCTACGG
ACAAGTGTAATAAAAAACACAAATGAATCCACCATCATAGCGTTAGAATTGGTATTTATCATTGAAGTTTG
AACAAAAAGTTTCATAAACATACAATTTACTTTGATTACACGGTCCGACAAAAAATCAACTTTTGTCTG
CCAGCTCWTAAATTTCACTTTTTCTGATTACTCCCGACTAGAACTCATAAATCCGAAGTTTGGACCACTC
CCCCTCCTGGGAGAGGRRGGGCATTGATTTTKRAATTTTGAAAAATCGAAAAATTCGAGGTTTTCGACC
GCCATTTTCGGCTAAATGCACGATGTCAAAAAAGGAAAAGGTTGACCRRCRGAGCTTTRGGGTGTGCAACTA
TCAASWAAATTTACGAAGATCCATCAAGCCATTCAAWSGAAACGGTGTTTTTACGAAATGATGTTTTARA
GATTTCTTATAKTGCACGCAAGAATCCAACCTACTATATGGCACAATTGTTGATTTAATCATGTCGTTTAG
CATCATRGTTCTTCGAGGAAGTTTTCTACTACAATAACGTGCTTCTTTTAACCTGTTGGTAAAAACGATC
AATCCCCCTAAAAGTGAGATAGAAAATTTCTTTTTTAATTTTCAAGATRCAAGGTTGATGTCCTTCACAA
GAGTTGTAGAAAATGCTGTTCTGAATAACTTTGTGCAAGACGCCAAATTCARTAACTCCGTTAGTTTTC
AGATACGCTACGTTTTTCAATTACCGCGGTCTCTTGAAAGTGTTTTTTCACCTCAATAACTTTTTTCACTT
TTGATTCCACAATTCTATTCTCATAGGTCAATCATTTTGACTTCTTAAAGGAGACAAKTACTTGTACTTTC
GCATTTTGCACCTTACATTAAAGTTTTATTACTAGAGCTACAGAAAGATCTCGATAAARTAGYAGTGCTAT
TTTTTGAAGTTTACATGATAGGGAATCGTAAAGCAATGAAAAGCGAAATTATTGTCTTTCCGCTCAATAGTT
ATTTTGTGGAGACTGTTAGGTGCGAACTTGYYSCGCSACTACTGYTATAAGCAAATGTAAGCAAATTACC
TCATACAAATGCGAAAGTACAARTAAATGTCTCCTTTMGAAGTCAAATGAGTAAGMCTATTGGAGACWG
YGAGAATTAAATTGTGGAATCCAAAAGATGAAAAGAAGTTATTGAGAAAAAACACTTTCAGAGACCGCC
SGCAMTGAAMYRTAACGTAATCTTGAAAACCTAACGGAGTTMGCTAAATTTTCATGGATATTCACCATCCATT
GACACTCCAAGTGATTTAGATGATGCCGTTGATACTACAACGACCTTCATCATGGAAGCTTTTAAAGA : A :
GCATGCCCTCTACGGTCTGTGAAGATCACAAGAGGAACCCCTTGG : TGGAACCTCTGATCTGGCGAA : : ACT
CAGGAAACAATGTAGAAAAACCTTTGCACAAATGTTTCCAGCTTG : AGTGAAGTCAGTCGGTTAAACAATT
TCCTTGCGAAATCTAAGGATTTCCGGGTGAACGAACCTTCGTTTGCCAGARTGGCGATCTGACTTCCTCTGA
TGAGGAAGTTTTTGAATCTTATTCAGCACACAYTYCCTGGATGTGTGGATATTACATCTTCCGGATGATC
CTGATGTCTTTTTCTTGTAGTTATGATTCTTTTRGCTTTTTTAACRTAGAAATCGATTGAGTGGGCTCTTAAT
AGCTTTTGCTCCTTTCAAATCTCCTGGGGCRGATGGGATTTTRCCTATTTTGCTTCCAGAAGGGATTTGATT
ATTTCAAACATGTTTTGAAAAAACTACTTGTTYRCAGTTTTGCTACARGGGTATATTCCCAAATCCTGGCG
GGATATTACTGTAAAAGTTTATTCAAAAAGTGAGTCGTTMATMKTRTGAAGAARCAAAGAGTTTCAGAC
CTATCAGTTTGACCACTCTTTTCTCWSAAATGCTWARAACGCAKTGTGGATCATCACATCMGTGATGTTT
ATCTGGCCAACGATGCCTCTTCATGTGAACCAACATGCCTACCAATCTGGTAAGTCCACTGTGACTCTTTT
```

Annexes

ACACAAGGTTGTTTACGATATCGAAGGCATTTCGCTCCAAAAGCAATCTTGTTTGGGGTGTTTTCTTAGAT
ATCGAGGGTGCCTTTGACAACGTGCCTTTTCGATGCCATAWTGGAAGCCACTTTTGAGTCATGGTATATCTC
CGATGATTTCCAATTRGATTACCAAATGCTCAAAAACCGATATCTCTTCTCGACAKTGCCTCTAGCRGRG
WTWGGAAATTRGTGTTTGTGGATGCCCCAAAGGGAATCTTATCACCGCTTTTGTGRRATCTCGTAGCRRA
TRCGCTATTGAGGTAACCTCAATAATGSYAGCGKTTYCCTACTTAGYRGTTTTGCCGATGACTACCTARCA
TTGTTAGTTGGTATGTGCATCAGCACCTTTTCARACCTGATGCAAAGCGCCCTTCAGGTAGTTGAGGGTT
RRGTGTCGCCAATATGGCCTTTTCRGTTAATCCGAARTRAAACATCTATTGTTCTTTTCACSGRAAGGCGAA
ACCGTAATGGCCGTTTCGACCTTTTACGTCTCTCTTTGATTCTGAAATCGATGTGACTGAACGGGTAAAGTA
CGTTGGAGTGCATTCTTGATTCCAAGCTTTTCCTGGACACCTCRCATTGAGGTCAGAATCAAAAGCTTAATA
TAGCCTTCRGGCAATGCCGGCGTACTTTTGARTRCAGCTWGGGTCTAAAACCCAAGTATATCAAATGGATT
TACACAACCTGTRGTTCCGGCYAATAKTGGCTTATGGATGTCTTAKTAGTGGTAGCAAAAGGGTGAAGTAGRG
AACGGTCCAATCAAAATTAGGCCATCTCCAAAGGATGWKMTTAAATAGCGATGTCCGGAGCGTTCTCTTCAA
CACCYRCGGCAGCGCTCGARGATTCTCTTTGACGTTGCCYYACTACWCGATCTCATMWCAAAACAGAACAC
TTTCTTGCACTTACCGGTTACGGGTACTCGGTCATGMKGAAACTCCRTAATGAAACGCACATCAACACAC
CTCGTTGTTTTTCRCTTYTGGTGAATTGGGACAAAATGTTCTTGCTCCAAGTGATCTTACAATTGGCTTGTA
ATTTTCCATATAGGACATTTTTCACGRAATTCCCCTTCCMGGGAAGAGTGACATCTGGTTATCTGAAAG
AAGTRTTTCAGACGGCATCGTATGTTACACTGATGRCTCCCTTCTCGAAGGTCGAGACGGTCTGGTGTTT
ATTCTCGTGAGCTAARRCTGTATCAGTTTTACTCRCTYGGTGARWCACTRCACCGTTTTTCAGGCCGAAAT
CTTTTGCTCTTATGTGCGGAGTGCAATCAGCACTTYTCAAGGGCGCYTGTTGTGAACCCATTGTGGTACGC
TTTGTGCACAKKTAAKTRCCCTCTTCCAGGGAGTATTTTTTCTATYTCCTACCTGTCCCTATCCCCATCCA
AATCCTTTTCTCTCTTTTCYCTCAGGTAGATGATGAAATAGGCTGTTATTTTTTAGCGATGGCACAAATGC
TCCCAAATGGAGGATAACGTGCCTCTGGRSCCGGCCTTCTGATACCTGATACCTATCATTASTAACCTTCA
AAATARYASYACATTTTTATTGAGATCTTTCTGTAGCTCTAGTAATAAACTTTTAATGCAAGTACAAAATG
CGAAAGTACAAGTAATTGTCTCCYTWAGAAAGTCAAAATGATTGACCTATTGGAGACTGTGAGGAATAGAA
TTGTGGAATCAAAGTGAAAAAAGAGTTATTGAGGAAAAAACACTTTCRAGAMSKMTGGCYAAWSAAAACGT
AACGTATCTTGAAAACATAACGGAGTTMYGAATTTGGCGTCTTCGACAAAGTTRTWCAGAACAGCATTCTCT
ACAACCTCTTGTAAGACATCAACCTTGATCTTGAAAAATTAAARAAGTAAATTTTCTATCTCACTTTTAG
GGGGGATTGATCGTTTTTACCWRYAGGTTAAAARRAGCACGTTATTGTAGTGAAAAACTTCCTCGRRRACA
CTGAWRWTGCTAARCGACATGGTTAAATCAACAATTGTGCCATATAGTAGTTGGATTCTTTGCGTGCARTA
TAAAAAGAAATCTTTAAACATCATTTTCGTAAAAATYACCGTTTTCTCGAGAATGGTTTTGATGGATCTTCG
TGAAATTTTGTTGATAGTTGCACARCTAAACRCTCCGTGGTCAACCTTTTTCTCTTTTGACATCGTGCAT
TTAGCCGAARTGRMGGTCSRAAAACCTCGAAATTTTTTCGATTTTTTCAAATTTCAAATCAATGCCCTCYC
CCTCTCCCAGGAGGGRGAGGTCAAAACTTCCCGGATTTATGAGTTTTCTAGTCAGGGMATAGTMAGAAAAG
GTGAAATTTAGAGCTGRRCAAAAAAAYWTKTMRGACMRWGTAYYTARWGAARRACTCTAGTGAKACTGTT
ATMYGATAAATCTAGCAATTTTCGGGATTTTCTCGGCATAAAARCTGTCCCATGTCAATRTGAGATGTTTCAGC
ATAAGCTGTCCCATGTTGTAATTTTCRTCCCWTAAGCTGTCCCATGTGAGTTTTGCRGCATAAGCTGTCC
CCATAKTTGAATTTTACAAATGATATCAGGWTTTCCGGAAAAATGTTTCAGGATTCCCTCAGAGATGCTCGGA
CAGCTTTTTATGCGTATAAACTGAACATGATATARCTTTKWGARAAAATAATRAACATGGGACAGCTTATG
CTRCAAAACTGGAACATRGGACAACTYATGATGACAAAATTGAACATGGGACAAATTGACTTGATGTTGTT
TTCATGGAGTTTTCTRRACAAAGTATACTAATCGAGGAAGTAGATTCTGAAAGAATATGCGAAAATAGAMC
YTTTGATGATAAAATGTCAAWMTCGCTYAAAAAGTAACATGGGACAACTATGCTGCACACGGCAGTCTAGC
ACACATGAATTGCACCGGAASCTTTTCTCAAKTGCTCCAATGCTGCGTCRKCWTTCATTCACTGCTACCGC
GRRGATTATRCGGAACACTGAATGGTCGGATARATCRTCGACCACCTATAATTCCACGAAGGMKYACAAGA
AGCTCCGTGCGACYATCAGCAGCASCATTAKTACTATTGACAATTAGTTTGCCATTTTGACAGGTATAG
CCCCGCTAAAAGTATAGCTATAAATATGTTATTTTGGCGTAGTCTAAATGTTGAAAACAGAAGAGTGAGGG
TATGTTGAAATGATGTTGAYTKAGACGTATTATAAATACTTTCCGTTATTGATTGCAGARRTTGCTCTCA
GRGGTGCAAAATTAACGTATTTTGAACCTGTTTCAAAAAGCTTGACGTGTGAAGTTTGGTTATTTAAGAAA
CGTCTTGATAGATTACAATGCCGAACAGATATACAAATTAATAAAAAAATGGAACAAAACCCACGCTTTCAT
TGCTTGCTCGAAATTATTAARGAATCCTRCTTCCAYCAGTTTAAAAACACTCCCGAACTTTRCTTGAGTAA
TAATCTGTAGTTAGCCAGAGGTTCCAGTTATTCAAAAAGTAAATATTACGATTGCAACATTTTTGAACGG
CACTGTAAGCCAATGGAARGCTGCCATACTGCTCACACCGTAATTTGGAAAAAATAGAAAATTTAGAA
AAAAATGCACCATTTGATTGATTCAATCTGAATATTTCAACGCAATTCAGGGGCGGTTGAATTTAAGATA
GGTAAAATCATATGTTTACCATAAATCTTAAATCGCAATCAAAAACACTACCCTTCTGAAAATAAACC
ATTTMRMTAAATGTTTATTAATTTGTTGTAGAAAATATCCAAGCAACACGACTTGTTTTCAAAGCCAGTA
CCAGCAACATCAGTGCAATTTATCACTGTTCAAATTAAGGACAACAGAACACAATTGCTTCTTCTWYGAA
GTACGCAAAAAGCGYRRAATTKYAAATCGTTATGCAACTWRKMKGGGAATGATAAAAAAATGAAAAATA
TATTCAGACTCGAACCATGGACACCAGGAGTATTAACCATTACCTTACATACTACAYAGAAGCTCTGTGA
AAGATTTGCTGCTCAATRCCATAAARMYRCTGAAGTTACGCGTTRCTTCCRTTGATGMMRTCTTTTCCRC
AAGTTAGARAGCTGTCAAATGAAAWGRCRCGCAAGTTTTCCGCAATACATTWAAAMCCTAATCTRRACAA
ACAAACCAGAGTAAGATGTTTCATGTGTGTACATAGCACATTTAATGCAARCTGACTGTATTGCCACTTG

Annexes

TGAGGAATATGTAAGCTCCGCCTCTATAAATCGATGTTAAATACGATGTTATTTGTAATTCCTATGAARYA
AAGCTGCAARCTTAACRWTATTTGGAGTTTAAATGCAACKCAACTGACAAGATGGAAGTTGCGTGCGCTTTT
ATTRCARCTCTTTTAGACCAARGCATAGAAAACCACATTTTGGATGATGTTGCAGGTGCTRCTTGGGATGR
WYTTTGTCTTCATCACCAGAAGAGAAACAATTTTGTCTRCGTTTRTRGAGTCATAAAATTATATGTAATATAT
TTTTYCTGTCAGTCGCTTTACGTAGTCTATATCTTCATTATGAGATGATATTTATATTATATATGTAGTT
CGTTATAAACAAGGCTCTCGCAAGTTATCATCCRCTATCAATTTTTCCAATTTGAACCCATGCATGTGGTA
TGTCATATAATAGTATTTTACAAATCGTATTACTAAAAGCAASMARCTTAGTTTCAACCAATAAATATATT
TRTWMTATTGAGAGTGTTTTCCAAGTATCCATTGACGAACAGTAACTTTGTTAATGCATGAAAGCTAAATG
GAAAGCAATTATTARTACTATAAGAGTATTARGGATACATCTTATATAACCTTTAAATGTTTTATAAGC
TMKMCATTTTTTGGCGTGTTTAGKKMTATAAGTATCSCATACGACGTTAAAAATGCAAGGAATAAAACAAT
CGAGTTAGTTCGAAACYKGAATTTTTAGCTWWCTTACTTATATAACAAGCTGTGTTACTTGGGGAGCAYGT
TCGATACGATGGGCTGCTGCGGTGAACAACTGGTTCGATGACRGTRCRAGAAGATTTTGGRWYAAAAGAA
CGCAGCGAGRGGCGGTCTRTGCTGCAGCTWYRGGACTCCGTAGTACGTGGAACGATATAAAAAGAACGCGGGA
AACAGCGAATCCACGCTTTCGGGAGAAAAAGACACCGCTTGGAACTGTGCAATGTGCATCGTCTACCACT
ACACACGATCCCAAGCGATAGTGCACCTACGTGTGCACCTACCTTGCGCCCCACCGCAAGTGGAGAGAGA
ASACAAAGGCGAGKTGTTAATTGAACCTATCGTTTTTTGTTGATGAAGGATTTGCACCGGTGGTGTCTATGC
TACACGATAAGTTTTYRTCTGCAACAACAGGCAGCTCATCAAAGCAGGCATAAAATTAGTTTGGTGMTTAR
MRATGCAGATGTAAACAACAGAAAAATCGAAGAAAAATTTGGAGTGGAGAAAGCCSGGAAACAGTGCTGGAR
GATTCAGCAAGGAAATGGTGGACTTCGGTGAAGAGTTCTCCCGACGGATTTATAGARGWYCYCTTRCRGG
ATCTATCCAYSAAATTTTCCCCGAAAAGACTGCWGYAGAACATTTCCAAGCGGAAATTTTRCCTGATATTT
TCTCCAAAATGTCTCACCGAGGATTTTCCAGTGAATTCCTCTACCGARAATTCCTCCAGAATTTCCCCRTA
AATCTCCYCTGGGATTTTACCGGAGATTCACCRGGAGCTCCTCCCGGGGKTTTCTCCACGGAATTCCT
CCATAATTCGCTCGRGAATCCTCCTGAYWKTTTTTCRGAAATTCASCAGGAATTTCTTCCRGGATCCACT
CAGGAATTAATCCGGAAATTTCTCYCAGCATTTTTGTTTTCGGAATTTCTCTAAAGAATACCTATGTGGAANK
TCAGGAATTCACCCAGGGATTTCTCAAGGAATTTCTACWGGGGTTCTCCKYSAATTTCAACCGAAGATA
TTTTTTCAGGGATTCATCCAGRAGTTTCTCTAGAAATTTCTTCACGAGATTTTCYAGGAATTTTCACYGRGG
ACTCTTCCAGGAATTCCTATGGGGATTCCTCAAGGAGTTCTTTTGGATATTTTTCARCATTTTTTTGAGGTG
ATTCCTCTGAGTGAAAATGAATTTCTCCAGGTGCTMCTMRAGGAATGTTTTCTGGGATTCCTCTCGGAAT
ATCACCRGGAACYCAACTTTGMAAATTTCTCAACGGGACACCTCCAAGAAGTCCCACTAAAGGKTTTCCTC
CRGGAATTTTCGGAGATGAGGAAKTCCACRGGTCATGTCRRTCGATCCTGAGCGACCATTTCAAAAATATCT
GAAACTTTTRCWYWGKTTTCCAATTTTCATCTAAATCGTCATTTTTTCGATATCAAACCTTCATATTCACTCAM
AGYTAATTTTTCAGAAGGGTGATRCTAAAACAGCTCAAAAATATTCWAAAAGCTGTACRGCAAGAAAACG
GATTTTTTCGATTGTTTRTATAGATTTTCAAKMAAAGTTAGATAACTAAATGATGATTCCTTAGAAAATATGC
ACACTGTAAAAAATTTATTTTTTTTACTTAAAATATGATTTTTGTCTCAYAAAAACTCAAATATCTCAAACCC
CTATCTTTTTTACCAACGTTAATTTTTTKGGAATAGCGCYTTTATATCAGCTATCTACACCATAAGAATTT
TGATGATGGTAAACTGATAAACAAAAAAGTTATGACATTTCAAACATTTTACAATTTTTTACATTTAGTAAC
AAAAAAAATTTTTTCTGTGTAAATTTATTTTGAGAATTATTTTTTGATGCTGATTTYATTGTAAARKYTAC
CGCCTRAGATTAAACAAGTTGTTTTTCATGAAGTACTTTTGTGTTGAATTATTCWKMAATTTCTATAGTATCT
ATTTGAAACTTRGAGCGCGATCGAGTGTTTTGATCAAAAATATTGARAGTGTCATACTTTWTATWRTACGT
GACTGGTGAAAAAATCCCTTGATAATGGTGTGAAAAGCTGTTGATTATAAGAAAAATGGAATTAACCTTA
TTTTTAAGACAAAAGCTGTATAATAAAGTTTTATATACGCGTATWCGTCTAGTTTATCTTCAAAAAAATAC
CTCTTAGAGAACAGACTTTTATGATCGGAAGAATGCGAGTAACTTCAACAACAACAAATGCATGAGAGTTA
CCTACCACGTGAGAAATCCATCGCCAGTTCACACTACCCCCACACCTGGTGGAAATGTTTCAYGAAATAC
TGCGATGTGCAATATCGTCATCCAGAAGGCGCTAAKTARTGAAACGTCAAACGCAAGAAAAAATGATGGGC
ACTCTTCTAGKTATGAWAACYACAACCAAGATTCAAAATGATCGTTAAARKSRTGGTCARTRRAAATTTTC
GTCAGTGTTACRTTTTGTTTGTCTGTATACATACCATGACAATGCTCACGAAAAAGCTAAAAAAAAAAAAAAT
ACTACCGCTATGGATAKTAATAGTAAATTTTTCTTCAGCCAAGCARSCAACACCAAACCTAGTCAGTTAAA
ACTAATAGAGTGATTTTTGTTTTATTATAATCTAACGAACAAGCATGAGMCAGTCGCTTTCTCAAAAAGGTC
TTCCAACCTCAACTCTCTCTTGTAGACCGTTTTGATGAAAAAAAATGATCAAAGGAGTTACGAAATCTCACC
GAAAGCASCATAGATAATCTAGAAAGAGACTGGTTATGCTSCAAATTGAATCCAAATTTACGCATTTGCAC
GTCCTGCCGTCTAGACTTTGTRSAARCRRGCCATCTGTATATCATCAGTAAAGCAGGGGCGTAGGAAGTT
CGAAAACGACAACAACCTGAGAAATTGCCAGAAGTGCTAAGTGCAGAGAGTCATGTCACCGTACCRTCAGCA
GYGACATCAGTTTAAACAATTAATCACGCCCCTTTTTCAAAAATGCTTTGWKATATACTTCAACATCTATRC
CCATTTYMATATTTTTAACGTTGYWRARCACGTTTTCAACATTCRTTTTGAAGAAGGAAAAACTTGWYMT
CAAATGTAACAGCAAAATAATGGAATAMWYGACTAATGCGCAGGAAGCTGTGGCTKTKMWAAAATCGGAAC
ATTACTGTACATATAATATACATAATACATAATAAAAAACRGCTTGTTTTTRCTCACGCAAAGGCCATTAACA
ATAAAATCAGCATCAAGCTGCGATTTTCMGSCGAAATAACACTAAAAAAAAAAAAAATTATTACTAAATGTAAA
AATTGTGAAATGTTTGAATTGTCATAACTTTTTGTTTATTAGTTTATCATCACCAAATTTTTATRGTAGAT
TGCTAATACAATGGACCGTTTTCCCTAAAAAATTGCGTTGGTAAAAAGATAGGGTTTTGAAATATTTGAG
TTTTTTGTGACAAAATGATATTTTTTAATGTTAAAAAAGATTTTTTTTTCACAGTGTATATTTTCTTARRR

Annexes

ATCACCATTTAGTTATCTAACTTTGCTGAACAATAAAAATCAGCATCAAACCTTGCGATTTCTGACCGAGAAT
AATTTACACAGAAAAAATATTTACCAAATGTGAAAWTKGYRAAATGTTTGAAATGTTATAACTTTTTTGT
TTATTAGTTTACCATCACYRAATTTTTATGGTAGATTGCTAATACAATGGACCGTCTTCCTMWAAAAATT
GCGTTGGTAAAAGATAGGGTTTTKRGATATTTGAGTTTTTTGTGACAAAAATGATATTTTATTATTA
AAGATGTTTTTTTTCACAGTGTATATTTTCATAGGAATCACCATTTAGTTATCTAACTTTGCTGAAAAAT
TCATAGCAATCRRWYGAACCATTTTGAAARCWKTACCAGATTTTGAATATTATTGAACCATTTTTCACATA
CACCTTTTCGAAAAGTTGAGTCGTGRTTCAAAATAAAAATTTGATATCGAAAAATGGCGATTTAGATGGAA
CTGAAAAACTGYWRARAKTTCAGTTCATAAAGAAARTCATGAATTAATAATTTCCCTTAATTTTGATGCTGT
TRCTTKGAATCGCTCAGAYYWCTCAGGACATCCTTCAGGGATTCTTTCAGGAAGCCCTCSGGGATTCTTCC
TTGTTTTCCACCAAGAAATCCTCMAAAAATTTCCCGGAGATTCTATAGAGATACCTTCGGGGAAATCTAC
TGGAATTCACCTCAGGATTTTTTTCCAGGAATGCCTCTGTGGATAACTCCAGGAATTTCTCTACAGATATT
CACTCMGRYATTCCTCGAGTAATTTGTTTCGAGGATTCTCCCAAGAATTTCTCTAGGGATAACTCCARGAAT
TCCTCACGGGGACTCTCTTAGGGTTCTCTGAAAAATTTCTCAAAAAATTTCCAYSAGGAATTCCTCCAC
GAATTCCTTCRGGTAGTTCTCCAGCATTATATAGAGATTCTTCCRGAATTTCTCTGTTATTTCCCA
GATATTACTCCGGGAATCCTCCATAAAATTCCTCCGAGGATTCCTCCAGGGAATCCACCGGGGATTCTTTCA
AGGGACTCCACCTGGGATTCCTCCAAAACTCTTCTCTCCCGARAATCCGCCAGGGTTTCTCTGAGAAATTT
TYCGMGAGATTTCTCCAGGRGTTCCACTGGAAAGTCTTCTGGAGATAACTCCAAGATTTCTCTCCGAGGAT
TTCACCGGGGATTTCTTAAGAGCTCCTCGGAGAATCACTCCASAAGTTTTCTCCGAGGATTCAGGGATTTCT
ATTAGAGATTTTCTTCAGGATCGAAACGTTGGCAATGGTATAAATTTATCAACGCTTTTTTTCGTGACTGG
MAAGCCGAAAAACTCATAACTCTCTTCAGGTATTCCTCAACTTGAAGCAATCCTCATTGGAAKTTCTGAAG
TAATCCCTGGAGAAATTCAGGAATAATTCCCGGAGGAACCTCTWMAGAAATCCCTAGAGGAATTCCTGGA
GTTATCTCCAGAGGAATTGCTGGAACGATCCCTGGAATGGCTGAGATRCCCRGAGGAACCTCTTGAGGA
ATTTCTGGAGAAATCCGCGGTGTAATTTCTRGAGGAGTCGCTGGAGGACTTCYGRCGGAATCCCCAGTGAA
CACTMSAGGAGTCCCCAAAGGGAATTCCTGGRRATGTCTCRGAGAAATTCGTGGAGGAATTCCTCCAGGAA
ATTCCAGATATTCTTAAGAAATTAATTCAGGAATTCATTTAGAGGTTCTGCAGAGAATCCTTCTAAACAT
GACTTCAGAACTTCTTMRGGGATTCTCCAGGAATTCCTTCAGAGATTCTTTCGAAATTCCTTTGAAGATT
CCTCCCAGGAAATTCCTCCGGAGATATCTGCAGGATTTTATTCAAAGATTTCTCCAAGAAKTACTCAGART
YCCGGATAAGGAGAGTTCGACTGTTGCGATCTATAGAGCTATTAWTTCTGTRTTRSAGTCTTGGGGAAC
AATCGATAGTTTAAAGATTTTTCCCTTTTTTTTCTAAAACTATCAKTTTAAATCCCCATGCCGAAGTGCAG
TAGCTCTCCAGAATTCCTCCAGAAATTCCTCAAGAACTTTCTTCCGGRGATTCTTCAAGGGATTCTTCCA
GGAATTCCTTTCATGGGTTTTCTCCATAAATTCRTCCGRGGATTCTTCCAAGARATCCTGCKGGAATTCGTT
CAGATATTTCTTCAGGGAATCCTCCAGAAATACCTWSCAGWGATTCCATCTGGARTCCCTTTAGAAATTCA
SMTCARRRATTCTCTCGAGGRAGTTCTTCCAGRRATTACAGCWYKAGGATCCTATCAAAGAAATTCCTTCMGR
GATTCTTCTGGAATTCMTTCARGRAKTYCTCCAGAATTTTTTTCAGAAATCCTTCCGGAATTCCTTTGRRR
ATTCYYCAGGAATTTCTTCCGRGGATACCTCCACGAATTTATTAGAGATTCTTCCAGGAACTCCTTCAGG
GAATTACTCAATTCCTCCCAGGGWTYCCTTCARGGATTCTTGCAGGAATTT

Annexe 5 : Informations supplémentaires à la discussion générale

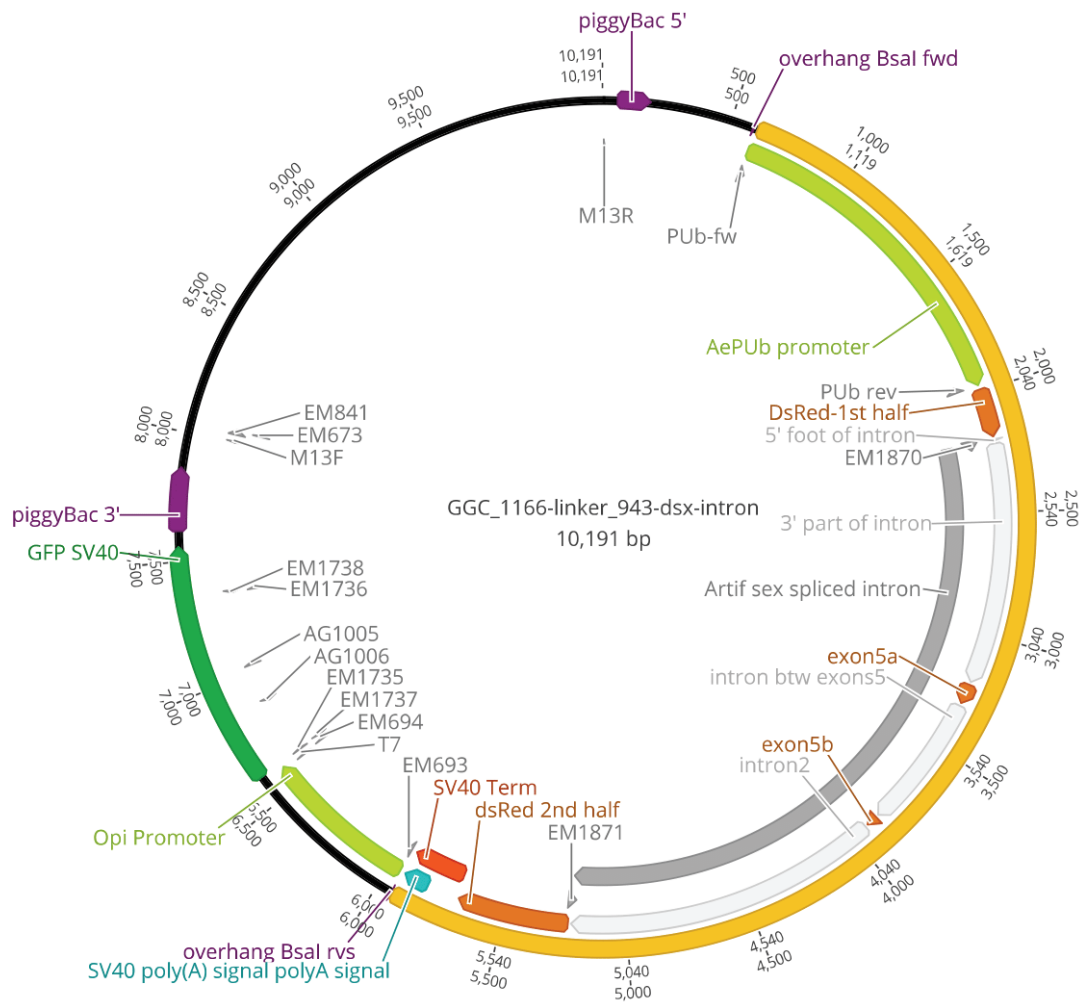


Figure A5-1 : Carte du plasmide ayant servi à la construction des lignées transgéniques de conditionnement de l'expression d'un gène de fluorescence par l'intron du gène *doublesex* chez *Aedes albopictus*. Carte générée sur Geneious.

Données A5-1 : Séquence de l'intron raccourci de *doublesex* ayant servi à la construction des lignées transgéniques. L'intron mâle spécifique (composé en réalité de 2 exons et 3 introns) a été raccourci au niveau de l'intron compris entre les exons 4 et 5a du gène *doublesex*. Les 15 bp surlignées en gris correspondent au pied 5' de l'intron situé entre l'exon 4 et l'exon 5a, tandis que la séquence non surlignée qui suit correspond aux 1000 bp à l'extrémité 3' de cet intron. Les séquences en gras correspondent aux exons 5a et 5b, respectivement. La séquence entre les exons 5a et 5b correspond à l'intron des exons 5, tandis que la séquence qui suit l'exon 5b correspond à l'intron compris entre les exons 5b et 6.

GTATGGGGGTGACGGTTTCAGCATGTTTCAGACGGGTATTAGAATATTCAATAGG
CTTTCAGGTGTTTCAAGGGGTGTTTTAGAGGCGTTTGAAGACGGGGGCTTCGGAA
GCTCTCAAGTGAGTTTCACTGGGGTTTCAGAGGCGTATCAATGGGTTTCAGAATG
TTTCAGGAGGTTTCAGAGGCGTTTCAGTATATTTTCAGAGGGTTTAGAGGAGGGTT
TAGGGGGCTTCGGAAAGCTCTCTAGTTCACTCCAAAGGACTAGAGGGAGAATTTTA
GAGGTATTTAAAGGCGTTTCAATGCATTTTCAGGGCGTTTTAGAAAAGTATTACAG
GGCTTCAAAGGCTTCTCAGGTGAGATTCAGGAGTTGTTTTGAAGGTGTTTCACGG
CATTTTCAGTGCGTTTCAGAAGAGTTCACAGGGCTTTAGGGAGTTTCGGGAGTAAT
GAGTTTCACGGGGGTCTCGATCCATATTAATGCGTTTCAACGAGTTTCAGGGCGC
TTCAGGAGGTTTTAGAGACGTTTTAGAGGCTGGAGGTTTTTATGAGGTGTTTTAG
AGGCGTTCAAGGCGTTTTAGCGCGTTCGATTTTCAGTGGGTGTTTTAGAGGCGTTTC
ATGGCGTTCCAGAAGATTTTCAGAGGTGCTTTAGGGGCAGGAAACAAGTTATGCTA
CTTATCAACAACCCACTGCAAACCAACCAACATCAATCTACTCAGTCTCGTTCAGC
GAGAACTGCTGTAGCAACGAAACAAACAGCACACCGTCCCGAGCAGTACAAACC
AAACGTCATGTTGTACATTCCACCATATCCGTTGACAAATCTCCTGGTCCACCGA
AACTCTAGAGACCATTCAACAAGCGTCGTAGCATTAGAGGAGGGCTGAAGGGGAA
AGGTTGGGAGACTAGTCAAAAATGCTTCATCATTTGTGGGTGGTCCCTAAGGGCC
CTCCGGGCCTCAGAAAAGCAGTATTAATCAACGAAGTTCCTGTCCCGACATCCGA
CCGATCCAAGTCCGAAAATTTTCAGGTCAAGCCGTGGTAAATGAATACTCTCG
ACTGCACAACCTGAACATGTTTCGACGGTGTGGAGCTGCGCAGTACGACACG
CCAATCCGGGTGATAGACTTTTTATACGATCAGTACGATCAACTACGCAGCAGC
ATCAGCGAAGGTGCAACCGAAACAAGAATAAAGCCACGAAGAGATCTGACTGAC
GCAATAAAAGTAAAAGAAGAAGAAGCAACAGAAGATATCATAGGAACATC
GCAAATCTACAAAGCATAACGGAAAACCCGCAAGTTCAAACCTAGTGATTAGTGT
AAGTCGAATGAAATGTGGTATCTAGATTTTTTTTCGAGGTTCTGTTACACAATGTAC
GCGATCGTGAGTGTTACCGGTGGTCGTCTGCGCCTGCGCCACGAAGGAATCGAA
TTTAAGCCATCAAATTGCGAACAGAAAGCCCAACCGGTACGCGGAGAATGTCTA
GGTCATTACAAGCTTCCATAGCATCCCCGATTGAAATTTGATTAACGGATGCTGG
AAACAGCTCCGTCGATGGGCTTTCAACCGAGGAAGGATGATCAAGTACGAAGCT
TATCTTGCCCCGAATCGATGTCTGCAAATTTGTATTTTTCCTTCTCTGTTGCATGAA
CTCGACGAACTCCGAATCGAAATGGACGATCACAGTGCAAATGCTGTTCAACAA
TAACAGCGAACTGCAGCCATTCTGGGGCTACCACGTGTAGCTCTACTTGTGAG
ATAGCGTTCCTAAAGAGTGTGAAAGTGCAAACAAGTGATGAAATCAATAGTGCA
AAGCAAGTTAAGTGGGAAGAGTGTCACTGCGAACAACTGGAGTACTTATCTTTTT
TTTATTGAGTGTGTTTCGGAAGCCAAACCGTGTTCCATCTGCCAGAGAAAACGAC
AGCAGAACCATCATCATGGATAGCCGGAAGTCAACAGCGCTCCGGTCCAGCAAT
CTACAACCTAGCAGCCTCATCAATCAAGTCAACAACCTACAACCGTATAAAGTCC

AGTTTCTGACTTCGGTCGGATTTCGGGTAGTCTGAGCGATCTGACTAATTTATCTCT
CTGTAGAATCGGTAGATGCCTGCTGCCAAAAACGGCTGCGACAGGTACTACTGCA
TTGGAAGCTTTGGACGACCCACGTTGCTGGGTCTAGCCTTGGAATGCGGGTCCT
TCCACCGAATAGGAGACTGCCGCTTCAGCGTCCATCGCACGCTCCCATTTCCGTC
CAACTTCGGAAGCTGACGATTTAAGCCTGAATGAATTCGGATCTTTGAGTGCTCT
CTCGGACCAACATAAGTACCAAAATTCAGAAGCAAACTGATTCTGCTTAAATCG
TTTCTTCCATTGGGATCGATATCGGAACCTGCGTGGACTCCTCGGAGCGGTTTCCC
TATTTGGCGTTTGGCGAACTACAATACTGGTAAAGATACCAAATGGAATTGGT
CTACACGTCACATTTCTGGAGTAATTCTGATTGGGGTTTCGTGGAAGAATTCTCAC
AGGAATTCGAGGAGCGATCCCCAAAGAATCCAGATGGGGAATTCATATCGAGGT
TGAAGAAGGAAGTTTTTGGTGGGATATCTTAAGTCATTCAAGCAGAATACCTAGAC
GAATACTTGTCTGGTTTTTGTGCATGAATACCTGTCAAGATATCTGACAAAATTTCT
GGGAGGGCTCCGTGCGGTATTGCCTATGCAGTGATGGAATCAACCAACCAAAGG
TAAGTACACGGCTTCTGCTCCCAACATCGATATCTGGGATCATCAACAGACCAAC
ATGTCGTTGACCTCTACGAAAAACGCACGAAGCAAGCATTCCAAGGAAAATCCA
AACAACTGGTATTGTTCAAACCTTCATATTTGTTTATGATATCAAAATTCAATGAAA
AGGCATTGGATACAATTCGGCATTTCGGTATTCCAACACAAACAAATTCTTGTATT
GAACGCCTAATGATATGTATTTCTTGTATTGGCCCCATTCCCTCTTTTCTTCTCCAT
AACCAAATTAATCAAAATGTAG

Données A5-2 : Paramètres implémentés et calculés pour la comparaison des coûts relatifs à l'élevage de masse des *Aedes* selon le mode de sexage choisi

Parameter	Manual	Automated	GSS	GSS-CS
Production goal				
Weekly pupal production level for release (Mpp/week)	21	21	21	21
Number of weeks with releases per year (week/year)	52	52	52	52
Mass rearing process (Colony production)				
Egg hatching (Meggs/day)	36.64	15.7	12.63	13.83
L1 seedlings of trays (trays/day)	1731	742	299	327
Feeding larvae (trays/day)	10386	4452	1794	1962
Tilting after first pupation (trays/day)	1731	742	299	327
Sorting	1731	742	299	327
Loading of larvae (colony cages /days)	44	19	15	17
Blood feeding (cages/day)	418	181	143	162
Eggs Collection (colony cages/day)	205	89	70	79
Production parameters				
Biological parameters				
Egg hatching rate	0.85	0.85	0.85	0.85
Survival L1 to pupae	0.86	0.86	0.86	0.86
Pupae male recovery first sorting	0.78	0.78	0.97	0.97
Pupae male recovery second sorting	0.15	0.15	0	0
Pupae male recovery third sorting	0.04	0.04	0	0
Overall pupae male recovery	0.97	0.97	0.97	0.97
Pupae female recovery first sorting	0.26	0.26	1	1
Pupae female recovery second sorting	0.35	0.35	0	0
Pupae female recovery third sorting	0.36	0.36	0	0
Overall pupae female recovery	0.97	0.97	1	1
Number of tilting	1	1	1	1
Survival pupae to flying male	0.95	0.95	0.95	0.95
Survival pupae to flying female	0.95	0.95	0.95	0.95
Average number of eggs per female for the first gonotrophic cycle	30	30	30	30
Average number of eggs per female for the second gonotrophic cycle	20	20	20	20
Average number of eggs per female for the third gonotrophic cycle	10	10	10	10
Average ovipositing rate during oviposition period (colony cages)	4.3	4.3	4.3	4.3
Days until the first egg-laying	8	8	8	8
Duration of gonotrophic cycle (days)	7	7	7	7

Annexes

Number of gonotrophic cycles before discarding Colony cages	3	3	3	3
Duration of oviposition period (Colony cages) - days	14	14	14	14
Duration of cages (preoviposition + oviposition) - days	22	22	22	22
Duration of males holding before release (days)	4	4	4	4
Duration of the larval cycle until first day of pupation (days)	8	8	8	8
Eggs density (eggs/mL)	91000	91000	91000	91000
Pupae density (pp/L)	333333	333333	333333	333333
Capacity of main equipment				
Density of larvae in the colony larval trays (larvae/mL)	3	3	3	3
Dimensions of colony larval tray (mL)	6000	6000	6000	6000
Number of L1 to be seeded per larval tray (Colony) - L1/tray	18000	18000	18000	18000
Number of larval trays / rack (Colony)	48	48	48	48
Height of tray columns (cm)	170	170	170	170
Free space between trays (cm)	2.5	2.5	2.5	2.5
Vertical resting place for adults in MO cages (cm ² /adult)	1	1	1	1
Vertical net in MO cages (cm ² /cage)	9600	9600	9600	9600
Number of male adults in M-O cages at the release center (male/MP cage)	9600	9600	9600	9600
Number of pupae to be loaded in M-O cages at the release center (pp/MO cage)	10105	10105	10105	10105
Vertical resting place for adults in colony cages (cm ² /adult)	1.2	1.2	1.2	1.2
Vertical net in colony cages (cm ²)	22000	22000	22000	22000
Number of adults in colony cages (adults/colony cage)	18333	18333	18333	18333
Sex ratio for Colony (Male:Female)	3.4	3.4	3.4	3.4
Number of females in colony cages (female/colony cage)	14167	14167	14167	14167
Number of female pupae per colony cage (pp/colony cage)	14912	14912	14912	14912
Rearing tasks schedule				
Frequency of blood feeding (days)	2	2	2	2
Frequency of egg collection (during oviposition period) - days	3	3	3	3

Annexes

Number of feeding rounds per blood membrane	5	5	5	5
Frequency of Colony cage washing (reading cycle)	1	1	1	1
Frequency of MO cage washing (holding cycle)	1	1	1	1
Release facility				
Target number of male pupae per week (pp/week)	21	21	21	21
Weekly production of flying males for release (adult males/week)	19.95	19.95	19.95	19.95
Number of cage units required for male holding to be loaded every day (cages/day)	297	297	297	297
Total number of cages permanently in use in the emergence center (cages)	1188	1188	1188	1188
Number of irradiation operations per day (operations/day)	20	20	20	20
Mass rearing facility				
Target number of male pupae per week (pp/week)	21	21	21	21
Number of male pupae to be produced per day (Mpp/day)	3	3	3	3
Increase factor for the maintenance of the mother colony	1.05	1.05	1.05	1.15
Eggs to be hatched per week (Meggs/week)	256.0	109.9	88.4	96.8
Eggs to be hatched per day (Meggs/day)	37.0	15.7	12.6	13.8
Number of larval trays to be loaded with L1 per day (trays/day)	1731	742	299	327
Number of larval trays to be loaded after the first sorting (trays/day)	0	0	0	0
Number of larval trays to be loaded after the second sorting (trays/day)	0	0	0	0
Number of trays to be sorted every day (trays/day)	1731	742	299	327
Number of trays to be loaded every day (trays/day)	1731	742	299	327
Number of ovipositing females in the colony	8549825	3664211	2946479	3227096
Number of pre-ovipositing females in the colony	4885614	2093835	1683702	1844055
Number of females to be replaced everyday	610702	261729	210463	230507

Annexes

Number of colony cages to be blood-fed per day (cages/day)	475	204	164	179
Number of colony cages to be loaded per day (cages/day)	44	19	15	17
Total number trays permanently in use in the larval room	13848	5936	2392	2616
Total number of racks permanently in use in the larval room	296	128	56	56
Pre-oviposition cages permanently in use for egg production (cages)	352	152	120	136
Oviposition cages permanently in use for egg production (cages)	616	266	210	238
Total number of cages permanently in use for egg production (Preoviposition+Oviposition)	968	418	330	374
Diet formula				
Larval diet (%)				
Beef liver powder	35	35	35	35
Tuna meal	50	50	50	50
Brewer yeast	15	15	15	15
BSF yeast	0	0	0	0
Concentration in water	4	4	4	4
Larval feeding regime				
Ration per one larva on day 1 (mg/larva)	0.11	0.11	0.11	0.11
Ration per one larva on day 2 (mg/larva)	0.22	0.22	0.22	0.22
Ration per one larva on day 3 (mg/larva)	0.44	0.44	0.44	0.44
Ration per one larva on day 4 (mg/larva)	0.44	0.44	0.44	0.44
Ration per one larva on day 5 (mg/larva)	0.33	0.33	0.33	0.33
Ration per one larva on day 6 and after (mg/larva)	0.11	0.11	0.11	0.11
Weight of larval diet ingredients added per tray on day 1 (g/tray)	1.98	1.98	1.98	1.98
Weight of larval diet ingredients added per tray on day 2 (g/tray)	3.96	3.96	3.96	3.96
Weight of larval diet ingredients added per tray on day 3 (g/tray)	7.92	7.92	7.92	7.92
Weight of larval diet ingredients added per tray on day 4 (g/tray)	7.92	7.92	7.92	7.92
Weight of larval diet ingredients added per tray on day 5 (g/tray)	5.94	5.94	5.94	5.94

Annexes

Weight of larval diet ingredients added per tray on day 6 (g/tray)	1.98	1.98	1.98	1.98
Weight of larval diet ingredients added per tray on day 7 after 1st sorting (g/tray)	1.98	1.98	1.98	1.98
Weight of larval diet ingredients added per tray on day 8 after 2nd sorting (g/tray)	1.98	1.98	1.98	1.98
Adult diet				
<i>Composition (%)</i> :				
Sugar	10	10	10	10
Water	90	90	90	90
<i>Dosage (kg/cage or L/cage)</i>				
Weight of sugar / cage unit (Colony)	0.03	0.03	0.03	0.03
Weight of sugar / cage unit (Male Only)	0.1	0.1	0.1	0.1
Volume of water / cage unit (Colony)	0.27	0.27	0.27	0.27
Volume of water / cage unit (Male Only)	0.9	0.9	0.9	0.9
Replenishment of water in adult cages	5	5	5	5
<i>Blood feeding</i>				
Average Blood dose necessary per female per feed (mg/female/intake)	1.5	1.5	1.5	1.5
Volume of blood per casing (mL/casting)	106.25	106.25	106.25	106.25
Blood for colony females per cage per feeding day (mL/cage/day)	22	22	22	22
Diet requirements (daily)				
<i>Ingredients required for larval diet (kg/day or L/day)</i>				
Beef liver powder	18	8	3	3
Tuna meal	26	11	4	5
Brewer yeast	8	3	1	1
BSF	0	0	0	0
Larval diet solution	1285	551	222	243
Water (including the initial load of trays)	11671	5003	2016	2205
<i>Ingredients required for Adults Colony (kg/day or L/day)</i>				
Water for adult colony	52	23	18	20
Water for release males	267	267	267	267
total water	320	290	285	287
Sugar for adult colony	6	3	2	2
Sugar for release males	30	30	30	30
total sugar	36	32	32	32
Blood	8	4	3	3
total blood	8	4	3	3

<i>Ingredients storage required (m2)</i>				
Beef liver powder	11	5	2	3
Tuna meal	16	7	3	3
Brewer yeast	5	2	1	1
BSF	0	0	0	0
Sugar	11	10	10	10
Rearing equipment				
<i>Larval equipment</i>				
Total number of trays permanently in use in the larval rooms	13848	5936	2392	2616
Oversize factor	1.3	1.3	1.3	1.3
Total number of larvae trays required	18003	7717	3110	3401
Total number of racks permanently in use in the larval room	296	128	56	56
Oversize factor	1.2	1.2	1.2	1.2
Total number of racks required	356	154	68	68
<i>Cages for Colonies</i>				
Total number of cages permanently in use in the adults room (Preoviposition+Oviposition)	968	418	330	374
Oversize factor	1.2	1.2	1.2	1.2
Total number of colony cages required	1161.6	501.6	396	448.8
<i>Cages for Release Males</i>				
Total number of cages permanently in use in the Male Only room	1188	1188	1188	1188
Oversize factor	1.3	1.3	1.3	1.3
Total number of colony cages required	1544	1544	1544	1544
<i>Other equipment</i>				
Irradiator				
Number of insects to be irradiated per day (Mpp)	3	3	3	3
Number of insects per irradiation operation (Male Onlypp/operation)	150000	150000	150000	150000
Duration of one irradiation operation (h/operation)	0.35	0.35	0.35	0.35
Number of irradiation operations per day	20	20	20	20
Workload (h/day)	7	7	7	7
Maximum time available for the task (h/day)	12	12	12	12
Backup equipment	no	no	no	no
Number of units	1	1	1	1

Annexes

Workload per equipment unit (h/day)	7	7	7	7
Sex sorter (for GSSs COPAS parameter)				
Number of pupae (males+females) to be sexed per day (Mpp/day)	22.89	9.81	3.95	4.32
Overall male recovery	0.3	0.7	0.7	0.7
Sexing throughput (Mpp/h)	0.1	0.2	0	0
Workload (h/day)	229	49	0	0
Maximum time available for the task	5	5	5	5
Backup equipment	yes	yes	no	no
Number of units	47	11	0	0
Workload per equipment unit (h/day)	4.9	4.5	0	0
L1 counter (for GSSs COPAS parameters)				
Number of trays to be seeded per day	1731	742	299	327
Capacity	20	20	12	12
Workload (h/day)	86.6	37.1	24.9	27.3
Maximum time available for the task	4	4	7	7
Backup equipment	yes	yes	yes	yes
Number of units	23	11	5	5
Workload per equipment unit (h/day)	3.8	3.4	5.0	5.5
Larval diet mixer				
Volume of diet to be prepared per day (L/day)	1285	551	222	243
Capacity (L/operation)	40	40	40	40
Number of batches per day	33	14	6	7
Duration of one batch (h/operation)	0.25	0.25	0.25	0.25
Workload (h/day)	8.25	3.5	1.5	1.75
Maximum time available for the task (h/day)	3	3	3	3
Backup equipment	no	no	no	no
Number of units	3	2	1	1
Workload per equipment unit (h/day)	2.8	1.8	1.5	1.8
Adult diet mixer				
Volume of diet to be prepared per day (L/day)	320	290	285	287
Capacity (L/operation)	20	20	20	20
Number of batches per day	16	15	15	15
Duration of one batch (h/operation)	0.25	0.25	0.25	0.25
Workload (h/day)	4	4	4	4
Maximum time available for the task (h/day)	3	3	3	3
Backup equipment	no	no	no	no

Annexes

Number of units	2	2	2	2
Workload per equipment unit (h/day)	2.0	1.9	1.9	1.9
Larval diet feeder				
Number of trays to be fed per day	10386	4452	1794	1962
Capacity (trays/h)	45	45	45	45
Workload (h/day)	230.8	98.9	39.9	43.6
Maximum time available for the task (h/day)	4	4	4	4
Backup equipment	yes	yes	yes	yes
Number of units	59	26	11	12
Workload per equipment unit (h/day)	4.0	3.8	3.6	3.6
Blood feeders				
Number of cages to be fed per day	418	181	143	162
Capacity (cages/h)	2	2	2	2
Workload (h/day)	209.0	90.3	71.3	80.8
Maximum time available for the task (h/day)	6	6	6	6
Backup equipment	yes	yes	yes	yes
Number of units	36	17	13	15
Workload per equipment unit (h/day)	5.8	5.3	5.5	5.4
Tray washing machine in mass rearing facility				
Number of trays to be washed per day	1731	742	299	327
Capacity (trays/h)	200	200	200	200
Workload (h/day)	8.7	3.7	1.5	1.6
Maximum time available for the task (h/day)	6	6	6	6
Backup equipment	no	no	no	no
Number of units	2	1	1	1
Workload per equipment unit (h/day)	4.3	3.7	1.5	1.6
Cage washing machine in MFR				
Number of cages to be washed per day	44	19	15	17
Capacity (cages/h)	5	5	5	5
Workload (h/day)	8.8	3.8	3	3.4
Maximum time available for the task (h/day)	6	6	6	6
Backup equipment	no	no	no	no
Number of units	2	1	1	1
Workload per equipment unit (h/day)	4.4	3.8	3	3.4
Cage washing machine in RF				

Annexes

Number of cages to be washed per day	297	297	297	297
Capacity (cages/h)	10	10	10	10
Workload (h/day)	29.7	29.7	29.7	29.7
Maximum time available for the task (h/day)	6	6	6	6
Backup equipment	no	no	no	no
Number of units	5	5	5	5
Workload per equipment unit (h/day)	5.9	5.9	5.9	5.9
Environmental conditions (holding time in days)				
Adult area (Colony)	22	22	22	22
Larval area	8	8	8	8
Larval trays	8	8	8	8
M-O release cages	4	4	4	4
Water requirements (L/day)				
Water for larval trays initial loading	10386	4452	1794	1962
Water for larval trays feeding solution	1285	551	222	243
Water for adults colony cages	52	23	18	20
Water for adults male only cages	267	267	267	267
Trays wahing	866	371	150	164
Colony cage washing	88	38	30	34
Male only cage washing	891	891	891	891
Room cleaning	5534	2637	1349	1432
Area requirements (m2)				
Mass rearing facility				
Larval development	684	296	131	131
Tray loading (working area)	71	31	13	13
Larval - pupal sorting (working area)	68	30	13	13
Pupal sex sorting (working area)	68	30	0	0
Pre-oviposition + Oviposition	511	221	174	197
Cage loading (working area)	19	8	7	7
Diet preparation	10	10	10	10
Tray washing	15	15	15	15
Cage washing and drying	15	15	15	15
QC lab	20	20	20	20
Irradiation room	15	15	15	15
Workshop	20	20	20	20
Warehouse	20	20	20	20
Storage of ingredients	129	72	48	51
Offices	30	30	30	30
WC	30	30	30	30
Corridors	173	86	56	59
Total MRF	1898	948	617	647
Release facility				

Annexes

Adults room	167	167	167	167
Chilling room	32	32	32	32
Cage loading (working area)	15	15	15	15
QC lab	20	20	20	20
Adults packaging for release (working area)	15	15	15	15
Diet preparation (working area)	15	15	15	15
Warehouse	10	10	10	10
Offices	15	15	15	15
WC	18	18	18	18
Corridors	31	31	31	31
Total	338	338	338	338
Construction cost (€)				
Mass rearinf facility (expected lifespan: 20 years)				
Office, labs, WC, irradiation room, corridors	416360	286740	241634	245701
Rearing rooms	1742074	773520	441475	470410
Storage, warehouse	149000	92000	68000	71000
Subttal	2307433	1152260	751110	787111
Release facility (expected lifespan: 20 years)				
Office, labs, WC, irradiation room, corridors,	148031	148031	148031	148031
Chilling room	64152	64152	64152	64152
Rearing rooms	236154	236154	236154	236154
Storage, warehouse	10000	10000	10000	10000
Total	458337	458337	458337	458337
Workload (h/day)				
Mass rearing facility				
Egg hatching	2	2	2	2
Hanging trays in the racks	16.7	7.2	3.2	3.2
L1 dosage in larval trays	9.3	4.0	1.8	1.8
Tray loading with L4 (after sorting)	0.0	0.0	0.0	0.0
Larval feeding	9.3	4.0	1.8	1.8
Tray tilting	37.0	16.0	7.0	7.0
Pupae sex sorting	228.9	49.1	33.9	33.9
Tray washing	8.7	3.7	1.5	1.6
Irradiation	7.0	7.0	7.0	7.0
Packing insects for irradiation	0.0	0.0	0.0	0.0
Colony cage loading	8.8	3.8	3.0	3.4
Colony cage blood feeding	20.9	9.0	7.1	8.1
Egg collection	10.3	4.4	3.5	4.0
Egg storage				
Colony cage washing	8.8	3.8	3.0	3.4
Larval diet preparation	5.0	2.1	0.9	1.1
Adult diet preparation	0.3	0.2	0.1	0.2
Blood collection	5.0	5.0	5.0	5.0

Annexes

Blood doses preparation	8.0	3.5	2.7	3.1
Total	386.0	124.8	83.4	86.4
Release facility				
Cage loading (MO)	29.7	29.7	29.7	29.7
Adult diet preparation	1.4	1.4	1.4	1.4
Cage chilling	29.7	29.7	29.7	29.7
Adult collection	44.6	44.6	44.6	44.6
Adult packing for releases	29.7	29.7	29.7	29.7
Cage washing	11.9	11.9	11.9	11.9
Total	147.0	147.0	147.0	147.0
Staff requirement				
Mass rearing facility				
Rearing labourers	89	29	21	21
Team leaders	9	3	3	3
Quality control manager	1	1	1	1
Quality control technician	9	3	2	2
Maintenance manager	1	1	1	1
Maintenance officer	4	1	0	0
Administration	5	1	1	1
Manager	1	1	1	1
Release facility				
Rearing labourers	34	34	34	34
Team leaders	3	3	3	3
Quality control	1	1	1	1
Quality control technician	1	1	1	1
Maintenance	1	1	1	1
Maintenance officer	1	1	1	1
Administration	1	1	1	1
Manager	1	1	1	1
Total	162	83	73	73
Equipment budget (€)				
Mass rearing facility				
Larval trays	900150	385850	155500	170050
Racks for larval trays	2848000	1232000	544000	544000
Cages for Colonies	290400	125400	99000	112200
Irradiator	250000	250000	250000	250000
Sex sorter	470000	110000	0	0
L1 counter (or COPASs)	92000	44000	500000	500000
Larval diet mixer	9000	6000	3000	3000
Adult diet mixer	4000	4000	4000	4000
Larval diet feeder	135000	60000	27000	27000
Blood feeders	36000	17000	13000	15000
Tray washing machine in mass rearing facility	40000	20000	20000	20000
Cage washing machine in mass rearing facility	40000	20000	20000	20000

Annexes

Equipment for basic QC lab	12000	12000	12000	12000
Workshop equipment	25000	25000	25000	25000
Blood storage (freezers...)	5000	5000	5000	5000
Subtotal	5156550	2316250	1677500	1707250
<i>Release facility</i>				
Cages for Release Males	308880	308880	308880	308880
Cage washing machine in release facility	100000	100000	100000	100000
Equipment for basic QC lab	6000	6000	6000	6000
Workshop equipment	10000	10000	10000	10000
Subtotal	424880	424880	424880	424880
Total	5581430	2741130	2102380	2132130
Diet cost (€/year)				
<i>Larval diet</i>				
Beef liver powder	130994	56151	22627	24746
Tuna meal	62129	26632	10732	11737
Brewer yeast	16842	7219	2909	3182
BSF powder	0	0	0	0
Water (including the initial load of trays)	3022	1440	736	782
<i>Adult Diet</i>				
Sugar for adult colony	16802	15241	14991	15116
Blood	6126	2645	2088	2367
Total diet cost	232916	109329	54084	57929
<i>Other consumable</i>				
Radiation dosimeters	10920	10920	10920	10920
Consumables without inventoring (lab consumables, fluorescent dye, ec)	49368	24050	13001	13770

Résumé

Aedes albopictus et *Aedes aegypti* sont deux espèces de moustiques invasives, vectrices de nombreux pathogènes et contre lesquelles les méthodes de lutte antivectorielle classiques sont peu efficaces. La Technique de l'Insecte Stérile en est une alternative durable et efficace reposant sur des lâchers répétés de grands nombres de moustiques mâles stérilisés par irradiation. Pour cela une méthode de séparation des sexes est nécessaire. Actuellement, les méthodes employées exploitent le dimorphisme de taille entre nymphes mâles et femelles, conduisant à un rendement faible, à un taux d'erreur élevé et à un gaspillage de ressources lié à l'élevage des larves femelles.

Dans cette thèse, je me suis attachée à proposer une méthode de sexage résolvant ces problèmes. Pour ce faire, j'ai, dans un premier temps, inventorié les différentes méthodes de sexage développées au cours des 15 dernières années chez les Diptères. Parmi les approches prometteuses identifiées, j'ai retenu le développement de souches de sexage génétique basées sur l'intégration d'un transgène de fluorescence au sein des loci sexuels. Aussi, dans un deuxième temps, j'ai étudié chez *Aedes albopictus* le rôle et le fonctionnement de *Nix*, le gène de la masculinisation situé au cœur du locus M. Pour ce faire, j'ai construit des plasmides et généré des lignées de moustiques transgéniques exprimant les quatre isoformes principales de *Nix*, associées à des marqueurs fluorescents. J'ai ainsi pu démontrer que *Nix* était suffisant à conférer une masculinisation complète, produisant des pseudo-mâles fertiles, capables de voler et exprimant différenciellement les gènes *myo-sex* et *myo-fem* de façon similaire aux mâles naturels, malgré une certaine réduction de leur compétitivité. Par ailleurs, j'ai également observé une intégration préférentielle des constructions transgéniques à proximité du locus M par un phénomène de « transposon homing ». Ainsi, dans un troisième chapitre, je présente deux souches de sexage génétiques pour *Aedes albopictus* et deux pour *Aedes aegypti* obtenues par « transposon homing », par transgénèse aléatoire et par transgénèse ciblée. Ces souches permettent de séparer les mâles des femelles au stade de larve néonate à l'aide d'un cytomètre en flux adapté. Elles peuvent être utilisées pour trier des mâles transgéniques directement, ou combinées pour obtenir des mâles non-transgéniques. Elles permettent en outre de diminuer la contamination par des femelles et d'augmenter le rendement en mâles.

Ainsi, au cours de cette thèse j'ai construit des souches de sexage génétique pour deux vecteurs d'importance médicale, *Aedes albopictus* et *Aedes aegypti*. Ces travaux devraient contribuer à améliorer le rapport coût-efficacité de la Technique de l'Insecte Stérile, et ainsi rendre cette méthode plus accessible.

Abstract

Aedes albopictus and *Aedes aegypti* are invasive mosquito species, vectors of numerous pathogens and against which conventional vector control methods are not very effective. The Sterile Insect Technique is a sustainable and powerful alternative based on repeated releases of large populations of male mosquitoes. For this, a sex separation method is required. Currently employed methods exploit the size dimorphism between male and female pupae, leading to low efficiency, high error rates and a waste of resources spent on rearing also the female larvae.

The aim of my thesis, was to propose a sexing method addressing these problems. For this purpose, I first compared the different sexing methods developed during the past 15 years for Diptera. Among the promising approaches identified, I selected the development of genetic sexing strains based on the integration of a fluorescence transgene within the sex loci. In the second chapter, I studied the role and function of *Nix*, the masculinization gene located at the core of the M locus, in *Aedes albopictus*. To this end, I constructed plasmids and generated transgenic mosquito lines expressing the four main isoforms of the gene, labelled with fluorescence markers. I demonstrated that *Nix* is sufficient for complete masculinization, producing fertile and flight-capable pseudo-males that expressed the sex-specific *myo-sex* and *myo-fem* genes similarly to wild-type males, albeit their mating competitiveness was somewhat reduced. Furthermore, I also observed preferential integration of transposons near the M locus by transposon homing. Thus, in the third chapter, I present two genetic sexing strains for *Aedes albopictus* and two for *Aedes aegypti* obtained by transposon homing, random transgenesis and targeted transgenesis. These allow the separation of males from females at the neonate larval stage using a suitable flow cytometer. These strains can be used directly to sort transgenic males, or combined to obtain non-transgenic males. They also enable a reduction of the female contamination rate and increase the male recovery rate.

Thus, during this thesis I have developed genetic sexing strains for two vectors of medical importance, *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. This work will contribute to improve the cost-effectiveness of the Sterile Insect Technique, and thus make this method more accessible.