Haut Conseil des Biotechnologies

COMITE SCIENTIFIQUE

AVIS

en réponse à la saisine du 12 octobre 2015 concernant l'utilisation de moustiques génétiquement modifiés dans le cadre de la lutte antivectorielle[1].

Paris, le 31 mai 2017

Le Haut Conseil des biotechnologies (HCB) a été saisi le 12 octobre 2015 par la ministre en charge de l'environnement d'une demande d'éclairage concernant l'utilisation de moustiques génétiquement modifiés dans le cadre de la lutte contre les populations de moustiques vecteurs d'agents pathogènes responsables de maladies.

Pour répondre à cette saisine, le Comité scientifique (CS)[2] du HCB s'est constitué un groupe de travail[3] d'experts sélectionnés pour leurs compétences dans les disciplines requises, placé sous la double égide du HCB et du Centre national d'expertise sur les vecteurs (CNEV).

Le présent avis a été élaboré sur la base du rapport de ce groupe de travail, sous la présidence de Jean-Christophe Pagès. Il a été adopté par voie électronique et transmis aux autorités compétentes le 31 mai 2017, et publié sur le site du HCB le 7 juin 2017.

[1] La saisine est reproduite dans l'Annexe 1.

[2] La composition du CS du HCB et les modalités de l'élaboration de l'avis sont indiquées dans l'Annexe 2.

[3] La composition du groupe de travail du CS et ses modalités de travail sont indiquées dans l'Annexe 3.

ABREVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

AIEA : Agence internationale de l'énergie atomique

AMM : autorisation de mise sur le marché

Anses : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

ARS : Agence régionale de santé

AW-IPM : *area-wide integrated pest management* (gestion intégrée des vecteurs à l'échelle d'un territoire)

Bti : *Bacillus thuringiensis israelensis*

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

CRISPR : *clustered, regularly interspaced, short palindromic repeats* (courtes répétitions palindromiques groupées et régulièrement espacées)

CHIKV : virus du chikungunya

CNEV : Centre national d'expertise sur les vecteurs

CRISPR : *clustered, regularly interspaced, short palindromic repeats* (courtes répétitions palindromiques groupées et régulièrement espacées)

CS : Comité scientifique du HCB

CEES : Comité économique, éthique et social du HCB

DENV : virus de la dengue

DROM-COM : Départements et régions d'outre-mer - Collectivités d'outre-mer

ECDC **:** *European Centre for Disease Prevention and Control* (Centre européen pour la prévention et le contrôle des maladies)

EFSA : *European Food Safety Authority* (Autorité européenne de sécurité des aliments)

EID **:** Entente Interdépartementale pour la démoustication

FAO : *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture)

FG : forçage génétique

GIV : gestion intégrée des vecteurs

GM : génétiquement modifié

gRNA : *guide RNA* (ARN guide)

GT : groupe de travail

HCB: Haut Conseil des biotechnologies

IC : incompatibilité cytoplasmique

InVS : Institut de veille sanitaire

IP : interférence avec le pathogène

LAV : lutte antivectorielle

na : non applicable

NHEJ : *Non homologous end joining* (ligation non homologue)

OGM : organisme génétiquement modifié

OMS : Organisation mondiale de la santé

RIDL : *release of insects carrying a dominant lethal gene or genetic system* (lâcher d'insectes porteurs d'un gène ou d'un sytème génétique létal dominant)

SIT : *sterile insect technique* (technique de l'insecte stérile)

TII : technique de l'insecte incompatible

TII-TIS : technique de l'insecte incompatible associée à une faible dose d'irradiation

TIS : technique de l'insecte stérile

WNV : *West Nile virus* (virus du *West Nile* ou du Nil occidental)

YFV : *Yellow fever virus* (virus de la fièvre jaune)

ZIKV : *Zika virus* (virus Zika)

GLOSSAIRE

Allochtone : une espèce est considérée allochtone dans une zone donnée si elle n'en est pas originaire, par opposition à une espèce autochtone.

Anthropophile : se dit d'un moustique qui préfère les êtres humains comme source de repas sanguin par rapport à d'autres animaux (McGraw and O'Neill, 2013).

Arbovirus : (contraction *de arthropod-borne virus*) virus transmis par des arthropodes.

Arthropodes : embranchement d'animaux invertébrés. Les arthropodes (du grec *arthron,* articulation*,* et *podos*, pied) sont caractérisés par un corps segmenté articulé, dont les segments sont munis d'appendices eux-mêmes articulés, et recouvert d'une cuticule rigide. Constituée de chitine dans la majorité des cas, cette cuticule joue le rôle d'un exosquelette, qui est renouvelé au moment des mues. Les arthropodes regroupent les sous-embranchements des hexapodes (dont les insectes), des crustacés, des chélicérates (dont les arachnides) et des myriapodes.

Autochtone : une espèce est considérée autochtone si elle est originaire de la zone considérée, par opposition à une espèce allochtone ou exotique ; un cas de maladie autochone se dit d'un hôte vertébré qui a contracté la maladie dans la zone considérée, par opposition à un cas importé ou introduit (CNEV).

Auto-dissémination : principe consistant à attirer un insecte vers un piège [de repos ou d'oviposition (ponte) dans le cas des moustiques] où il va se contaminer avec un biocide qu'il va lui-même transporter jusqu'à ses partenaires sexuels ou ses gîtes larvaires.

Auto-entretenue (traduction proposée pour la terminologie anglaise « *self-sustaining* ») : se dit d'une technique de lutte antivectorielle dont les effets se répandent dans l'espace et durent dans le temps, sans nécessiter d'intervention de maintenance. Dans le cas de techniques de lutte impliquant des lâchers d'insectes modifiés, la persistance dans le temps et la propagation dans l'espace de la modification sont fonction de l'équilibre entre la dynamique de propagation de la modification et l'éventuel désavantage sélectif qu'elle confère aux individus modifiés.

Auto-limitée (traduction proposée pour la terminologie anglaise « *self-limiting* ») : se dit d'une technique de lutte antivectorielle qui a des effets limités dans l'espace et le temps, à moins d'être entretenue. Dans le cas de techniques de lutte impliquant des lâchers d'insectes modifiés, la modification disparaît de la population à moins d'être maintenue ou réintroduite par des lâchers réguliers d'insectes modifiés.

Capacité vectorielle : efficacité avec laquelle une population de vecteurs peut transmettre un pathogène (Alphey, 2014). Somme de facteurs intrinsèques et extrinsèques, incluant la compétence vectorielle, la longévité, l'agressivité, l'abondance des vecteurs (Rodhain and Perez, 1985). Ce paramètre est indicatif du nombre d'infections qu'un vecteur va produire à partir d'un individu contagieux (Fontenille et al., 2009).

Compétence vectorielle : aptitude physiologique d'un vecteur individuel à héberger un pathogène et devenir infectieux (Alphey, 2014). Aptitude d'un insecte à s'infecter à partir d'un repas de sang pris sur un hôte infecté, à permettre le développement du pathogène, et à assurer sa transmission à un nouvel hôte (Tran et al., 2005). La compétence vectorielle dépend essentiellement de facteurs génétiques, du microbiote intestinal, et d'autres facteurs encore mal connus.

Conditions semi-contrôlées : systèmes expérimentaux confinés (cages dans des serres) placés dans l'environnement.

CRISPR-Cas9 : système enzymatique d'origine bactérienne, composé d'une endonucléase (Cas9) et de molécules d'ARN (CRISPR, tracr) qui définissent par complémentarité la séquence d'ADN reconnue et coupée par Cas9. Adapté comme outil de biologie moléculaire, ce système facilement programmable

permet d'effectuer des modifications ciblées (mutations ponctuelles ou insertions de transgènes) dans des sites précis d'un génome.

Elimination d'une population : objectif de stratégie de lutte antivectorielle. Nécessairement locale, l'élimination d'une population signifie la disparition, sur un territoire donné, d'une population isolée de vecteurs. Cette notion est à distinguer de l'éradication d'une espèce.

Endémie : persistance d'une maladie infectieuse au sein d'une population ou d'une région (Larousse).

Endémo-épidémie : une maladie infectieuse endémique est généralement latente, seuls quelques cas se déclarant sporadiquement. Elle peut néanmoins se manifester, épisodiquement, de façon plus dense, donnant lieu à une « endémo-épidémie » (Larousse médical).

Endophage : en entomologie, se dit d'un arthropode hématophage effectuant ses repas sanguins à l'intérieur de l'habitat de son hôte (Dictionnaire médical de l'Académie de Médecine).

Endophile : en entomologie, se dit d'un arthropode ayant pour gîtes de repos des abris constitués par l'habitat de son hôte comme l'intérieur des habitations, des étables ou des porcheries, des poulaillers, des terriers, etc. (Dictionnaire médical de l'Académie de Médecine).

Epidémie : développement et propagation rapide d'une maladie contagieuse, le plus souvent d'origine infectieuse, dans une population (Larousse). Dans le contexte de la lutte antivectorielle, le terme « épidémie » se réfère à la propagation d'une maladie à transmission vectorielle et non d'une maladie dite « contagieuse ».

Epizootie : épidémie qui frappe les animaux (Larousse).

Eradication d'une espèce : objectif de stratégie de lutte antivectorielle. Nécessairement globale, l'éradication d'une espèce signifie la disparition de tous les individus de l'espèce à l'échelle de la planète. Cette notion est à distinguer de l'élimination d'une population.

Exophage : en entomologie, se dit d'un arthropode hématophage effectuant ses repas sanguins à l'extérieur de l'habitat de son hôte (Dictionnaire médical de l'Académie de Médecine).

Exophile : se dit d'un arthropode qui vit à l'extérieur des habitations (Dictionnaire médical de l'Académie de Médecine).

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) (Lambrechts et al., 2008).

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

Gestion intégrée des vecteurs (GIV) : processus rationnel de prise de décisions dans la perspective d'une utilisation optimale des ressources affectées au contrôle des vecteurs (WHO, 2012). La gestion intégrée suppose une connaissance approfondie de l'écologie des populations cibles, de l'efficacité et des interactions entre méthodes de lutte, et des conséquences environnementales et économiques de la lutte à moyen et long terme.

Gîtes de repos : en entomologie, lieux où les adultes séjournent, soit après la prise de leur repas sanguin pour les arthropodes hématophages, soit après l'accouplement.

Gîtes larvaires : lieux où sont pondus les œufs et dans lesquels les larves et les nymphes se développent. Peuvent être d'origine naturelle ou anthropique (EID Mediterranée).

Glossines (mouches tsé-tsé) : insectes diptères du sous-ordre des brachycères, vecteurs de trypanosomiases humaine (maladie du sommeil) et animale (maladie qui rend le bétail anémique).

Hématophage : se dit des animaux qui se nourrissent du sang d'autres animaux vivants ; se dit d'un parasite ou d'un insecte vecteur de maladie parasitaire et qui se nourrit de sang (Larousse).

Hémizygote : une cellule ou un organisme diploïde est dit hémizygote pour un gène quand celui-ci est présent en une seule copie, sans correspondance dans un éventuel chromosome homologue (c'est le cas de la plupart des gènes sur les chromosomes sexuels X ou Y, mais aussi d'une cassette génétique intégrée *de novo* dans le génome). Si un organisme diploïde porte deux allèles différents d'un même gène à un locus donné (un allèle sur chacun des chromosomes homologues), il est dit hétérozygote pour ce gène ; s'il porte deux allèles identiques, il est dit homozygote. Un individu diploïde transgénique portant une copie d'un transgène est hémizygote. Il sera homozygote quand le transgène aura été acquis par les deux chromosomes homologues.

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 (Alphey, 2014) ; incapacité d'un embryon à se développer suite à l'accouplement entre un mâle infecté avec *Wolbachia* et une femelle non infectée (McGraw and O'Neill, 2013).

Insectes : classe d'animaux invertébrés, appartenant au sous-embranchement des hexapodes (caractérisés par trois paires de pattes) de l'embranchement des arthropodes. Il existe des insectes ailés et non ailés. Les insectes ailés regroupent plus de 25 ordres différents dont les diptères (caractérisés par une paire d'ailes), incluant les moustiques.

Insecte stérile : insecte qui ne produit pas de descendants viables ; insecte qui, à la suite d'un traitement spécifique, est incapable de se reproduire (FAO, 2015, 2016a).

Interférence avec le pathogène : phénomène par lequel *Wolbachia* peut diminuer la compétence vectorielle de certains moustiques pour des virus ou autres parasites (Moreira et al., 2009).

Homing endonuclease : protéines « à tête chercheuse » capables de reconnaître et cliver des séquences d'ADN spécifiques de 12-40 nucléotides, permettant au gène dont elles sont issues de s'y insérer (Belfort and Roberts, 1997).

Modification de population (traduction proposée pour la terminologie anglaise *« population replacement »*) : stratégie de lutte antivectorielle visant à réduire la capacité inhérente aux individus vecteurs d'une population à transmettre un pathogène donné. Il s'agit notamment de réduire la compétence vectorielle d'une population de vecteurs, sans nécessairement affecter la taille de la population, en contraste avec les stratégies de réduction de population (WHO, 2014).

Moustiques (*Diptera Culicidae*) : famille d'insectes, du sous-ordre des nématocères de l'ordre des diptères. La famille des moustiques comprend plus de 3500 espèces et est divisée en trois sous-familles : *Anophelinae*, *Culicinae*, *Toxorhynchitinae*. Il existe 112 genres de moustiques dont les plus connus sont *Anopheles* (de la sous-famille des *Anophelinae*), *Aedes* et *Culex* (de la sous-famille des *Culicinae*) (http://mosquito-taxonomic-inventory.info/).

Nuisant : en zoologie, désigne un arthropode qui pique sans transmettre de maladie. La notion de nuisance concerne la gêne, la spoliation sanguine, l'inflammation due à la piqûre ou la morsure, ou les conséquences allergiques ou dermatologiques liées au contact avec un arthropode (Duvallet et al., 2011).

Organisme génétiquement modifié : un organisme, à l'exception des êtres humains, dont le matériel génétique a été modifié d'une manière qui ne s'effectue pas naturellement par multiplication et/ou par recombinaison naturelle (extrait de la définition réglementaire de la directive 2001/18/CE, voir Annexe 13 du Rapport du GT pour la définition complète).

Palustre : qui se rapporte au paludisme (Larousse). Un accès palustre est une crise de paludisme.

Pénétrance : Proportion d'individus d'un génotype donné qui montrent le phénotype attendu de ce génotype.

Réduction de population (traduction proposée pour la terminologie anglaise *« population suppression »*) : stratégie de lutte antivectorielle visant à réduire la taille d'une population d'individus vecteurs sous le seuil requis pour la transmission d'un pathogène, sans affecter la compétence vectorielle des individus restants, en contraste avec les stratégies de modification de population (WHO, 2014).

Réservoir : être vivant qui héberge et assure la survie prolongée d'un agent pathogène transmissible à l'Homme (Larousse).

Satyrisme : stérilisation des femelles d'une espèce par des mâles d'une autre espèce suite à des accouplements interspécifiques non productifs. Ce phénomène peut être naturel – il s'observe naturellement entre *Aedes albopictus* et *Aedes aegypti* (Lima-Camara et al., 2013) et entre des espèces de tiques comme *Amblyomma variegatum* et *Amblyomma hebraeum* –, ou encouragé artificiellement par des lâchers de mâles d'une espèce dans l'habitat de l'autre espèce ciblée. On parle alors de satyrisation, qui est l'exploitation du phénomène de satyrisme en lutte antivectorielle. La satyrisation a été testée avec succès chez les glossines.

Self-limiting : voir auto-limitée.

Self-sustaining : voir auto-entretenue.

Seuil de Allee : seuil de densité de la population de vecteurs en dessous duquel celle-ci décline même en l'absence de lutte antivectorielle (Suckling et al., 2012).

Sexage : tri des individus en fonction de leur sexe.

Stades de développement des techniques de lutte antivectorielle : Phase I : expérimentation en conditions contrôlées en laboratoire ; Phase II : expérimentation en conditions dites semi-contrôlées (systèmes expérimentaux confinés placés dans l'environnement) et phase de caractérisation du terrain, de sélection du site pilote et de collecte de données entomologiques et épidémiologiques ; Phase III : expérimentation en conditions de terrain, à l'échelle de un ou plusieurs villages en milieu rural, ou de un ou plusieurs quarties en milieu urbain, en comparaison avec des sites témoin ; Phase IV : intervention en conditions opérationnelles de terrain, à large échelle, dans les conditions réelles d'application intégrant les méthodes classiques de lutte antivectorielle.

Stratégie de lutte antivectorielle : choix d'une technique ou d'une combinaison de techniques de lutte antivectorielle pour atteindre un objectif tel qu'une réduction, une élimination ou une modification d'une population de vecteurs, ou encore une éradication d'une espèce de vecteurs, chacun de ces objectifs étant définis séparément dans le glossaire. La stratégie inclut aussi le mode opératoire avec lequel la technique ou la combinaison de techniques va être mise en œuvre.

Sylvatique : se dit d'une maladie ou d'un virus qui concerne ou infecte des animaux sauvages dans la forêt (Vasilakis et al., 2011).

Sympatrique : se dit d'espèces voisines vivant dans la même région mais ne s'hybridant pas, généralement du fait de facteurs d'ordre génétique (d'après le Larousse).

Système vectoriel : système biologique complexe constitué de trois composantes : l'agent pathogène, l'arthropode vecteur (généralement plusieurs espèces), l'hôte vertébré (généralement plusieurs espèces), et de toutes les inter-relations qui se sont établies entre elles (Rodhain, 2015).

Technique de l'insecte incompatible : technique de lutte antivectorielle exploitant les propriétés d'induction d'incompatibilité cytoplasmique de *Wolbachia* et consistant à relâcher des mâles infectés par *Wolbachia* pour stériliser des femelles locales. L'incompatibilité cytoplasmique entre mâles et femelles s'exprime si les mâles sont infectés par *Wolbachia* alors que les femelles ne le sont pas ou s'ils sont infectés par une *Wolbachia* incompatible avec celle infectant les femelles (M. Weill).

Technique de l'insecte stérile : technique de lutte contre les organismes nuisibles faisant appel à un lâcher inondatif d'insectes stériles à l'échelle d'une zone pour réduire la reproduction d'une population naturelle de la même espèce (FAO, 2015).

Transfert horizontal de gènes : tout processus par lequel un organisme intègre, dans son génome, du matériel génétique d'un autre organisme, sans faire partie de la descendance de cet organisme (EFSA, 2013). En d'autres termes, un transfert horizontal de gènes résulte en l'intégration, dans un génome d'un organisme d'une espèce donnée, de matériel génétique issu d'un organisme d'une autre espèce.

Transfert vertical de gènes : tout processus par lequel un gène d'un organisme est transmis à sa descendance (EFSA, 2013). En d'autres termes, un transfert vertical de gènes résulte en la transmission de gènes d'un organisme à sa descendance.

Transgénique : se dit d'un organisme qui porte un transgène, c'est-à-dire une séquence insérée dans son génome par des techniques de biologie moléculaire.

Transinfection : transfert d'une infection bactérienne ou virale d'un hôte à un autre par microinjection (McGraw and O'Neill, 2013). Concernant *Wolbachia* : infection artificielle d'un nouvel hôte par injection de *Wolbachia*, soit dans des femelles adultes, soit dans le cytoplasme des œufs (Hughes and Rasgon, 2014).

Transmission verticale : transmission d'un agent pathogène dans la descendance d'une femelle infectée.

Transposon : élément génétique mobile qui a la capacité de se répliquer et de se recopier dans un génome (Tu and Coates, 2004).

Vecteur : organisme qui peut transmettre un pathogène entre deux hôtes (Alphey, 2014).

Vigueur (*fitness*) : en biologie évolutive, la vigueur ou *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) (Lambrechts et al., 2008).

Wolbachia : les *Wolbachia* (α-protéobactéries) sont des bactéries intracellulaires très fréquentes chez les arthropodes, transmises maternellement et qui altèrent la sexualité de leur hôte de différentes manières (mortalité des mâles ou leur féminisation, induction de parthénogenèse, ou encore incompatibilité cytoplasmique, exploitée dans la lutte antivectorielle). Toutes ces altérations de la reproduction de l'hôte favorisent la production de femelles porteuses de *Wolbachia*, le seul sexe transmetteur, ainsi que la propagation rapide des *Wolbachia* dans les populations hôtes (M. Weill).

Zoo-anthropophile : en entomologie, se dit d'un arthropode hématophage qui peut obtenir son repas de sang sur l'Homme et sur l'animal. On définit alors un degré anthropophile par estimation de la fréquence de ses repas sur l'Homme par rapport à celle sur animal.

Zoonose : infection ou maladie pouvant se transmettre naturellement des animaux vertébrés à l'Homme, et vice-versa (OMS).

RESUME[4]

Le Haut Conseil des biotechnologies (HCB) a été saisi le 12 octobre 2015 par la ministre en charge de l'environnement d'une demande d'éclairage concernant l'utilisation des moustiques génétiquement modifiés (GM) dans le cadre de la lutte antivectorielle contre les populations de moustiques vecteurs d'agents pathogènes. Le Comité scientifique (CS) du HCB a élaboré son avis sur la base du rapport d'un groupe de travail d'experts choisis pour leurs compétences dans les disciplines requises[5].

Un **état des lieux** de la situation des maladies vectorisées par les moustiques sur les territoires français de métropole et d'outre-mer (dengue, chikungunya, Zika, fièvre jaune, *West Nile*, paludisme et filarioses lymphatiques) a mis en évidence le **manque de thérapies et de vaccins** pour la plupart de ces maladies, et les **limites des méthodes classiques de lutte antivectorielle** contre les populations de moustiques vecteurs des agents pathogènes responsables de ces maladies. En complément aux recherches menées dans le domaine médical, il apparaît **essentiel d'explorer des techniques alternatives et/ou complémentaires aux méthodes de lutte antivectorielle existantes**.

L'avis du CS décrit les **techniques de lutte émergentes faisant appel à des moustiques GM**, l'état de leur recherche et de leur développement, et les résultats des premières expérimentations dans le monde. A ce jour, **une seule technique est développée à un niveau opérationnel, la technique RIDL** de la société Oxitec, qui vise à réduire une population de moustiques par des lâchers récurrents et massifs de mâles transgéniques stérilisants. Deux autres techniques en sont à un stade plus précoce de recherche et de développement et reposent sur un **« forçage génétique » (FG)**, visant à propager un caractère génétique dans une population naturelle, soit pour rendre les moustiques incapables de transmettre des agents pathogènes (FG à des fins de modification de population), soit pour éliminer cette population par propagation d'une stérilité (FG à des fins d'élimination de population).

Pour dégager les spécificités de ces techniques de lutte utilisant des moustiques GM, une **analyse transversale de l'ensemble des techniques existantes et émergentes** a été réalisée en termes d'objectifs visés, de potentiel d'efficacité et de durabilité, de contraintes techniques, et de risques pour l'environnement et la santé. Ont été considérées aussi bien des techniques de lutte antivectorielle classique (de type chimique, biologique, physique et environnemental), que des techniques émergentes basées sur des lâchers de moustiques, qu'ils soient GM (RIDL et différentes techniques de FG), ou non GM, irradiés (TIS ou technique de l'insecte stérile classique), ou porteurs de *Wolbachia*[6] (TII ou technique de l'insecte incompatible, et technique de propagation d'IP ou interférence avec le pathogène). Pour de nombreux points considérés, les techniques utilisant des moustiques GM ne constituent pas un bloc homogène et distinct des autres techniques, mais partagent des caractéristiques en commun avec différents sous-ensembles de techniques.

[4] Ce résumé ne se substitue pas à l'analyse développée dans cet avis.

[5] Groupe de travail placé sous la double égide du HCB et du Centre national d'expertise sur les vecteurs (CNEV).

[6] Bactérie intracellulaire naturellement répandue chez les arthropodes, dotée de propriétés spécifiques (incompatibilité cytoplasmique ou IC, et interférence avec le pathogène ou IP) exploitables en lutte antivectorielle.

Les techniques utilisant des moustiques GM sont toutes basées sur des lâchers de moustiques. Les **techniques basées sur des lâchers de moustiques**, qu'ils soient GM ou non, partagent :

- une **spécificité d'action** inédite pour une lutte antivectorielle, située au niveau de l'espèce de moustiques relâchés et des éventuelles espèces interfertiles. Cette spécificité est avantageuse pour **réduire l'impact direct de la lutte antivectorielle sur l'environnement et la santé**. Elle implique toutefois de **déployer autant d'interventions que d'espèces non interfertiles de moustiques vecteurs visés** ;
- la problématique associée à **l'éventuelle persistance et à l'éventuel caractère envahissant** des moustiques relâchés et des modifications qu'ils portent, laquelle se pose de manière différente selon l'objectif des techniques considérées (réduction *vs* modification, voir ci-dessous), et doit tenir compte des possibilités de fertilité résiduelle des mâles relâchés ;
- la problématique associée aux éventuels **lâchers de femelles**, accidentels ou intentionnels ;
- une efficacité qui dépend de la **compétitivité de terrain** des moustiques relâchés par rapport aux moustiques sauvages (nécessitant notamment des conditions d'élevage appropriées) ;
- une **meilleure efficacité à faible densité** de moustiques cibles, **nécessitant la combinaison de ces techniques avec des méthodes classiques de lutte**, telles que les biocides, efficaces à forte densité, ou leur utilisation hors des saisons de forte pullulation de moustiques endémiques ou dès les prémisses de l'établissement d'espèces invasives ;
- un **temps d'action de plusieurs mois** pour atteindre l'objectif visé, impliquant une **utilisation hors situation d'urgence sanitaire**, dans le cadre d'une gestion globale intégrée avec des techniques à efficacité quasi immédiate utilisables en situation de crise, comme les biocides ;
- des **contraintes techniques et logistiques** spécifiques aux élevages et aux lâchers de moustiques, variables selon la **biologie des espèces** de moustiques considérées (adaptation des protocoles), et selon les **stratégies de lutte** dans lesquelles elles s'inscrivent (taille de l'élevage, durée de maintenance, nécessité de séparer mâles et femelles).

Les techniques se distinguent selon les **objectifs visés** (réduction *vs* modification de population). Qu'elles utilisent des moustiques GM ou non, des lâchers de moustiques ou non, les **techniques de réduction de population** partagent :

- un **impact environnemental associé à la raréfaction de la population des moustiques cibles et dépendant du rôle de l'espèce ciblée dans l'écosystème**. Cet impact est variable selon, entre autres, le caractère autochtone ou invasif de l'espèce considérée, son milieu urbain ou naturel, l'existence de prédateurs spécialistes, le degré de réduction de la population (simple réduction, élimination locale, ou éradication de l'espèce[7]), la persistance des effets de la technique (fonction notamment de l'isolement de la zone traitée) et la spécificité de la technique (les techniques impliquant des lâchers de moustiques étant les plus spécifiques, voir supra). L'impact environnemental devra donc être évalué au cas par cas des techniques utilisées, des espèces et des régions ciblées ;

[7] L'objectif d'éradication d'une espèce, qui serait une spécificité des techniques de forçage génétique, est théorique à ce stade.

- la possibilité d'un **remplacement non intentionnel de la population ciblée par la population d'une autre espèce vectrice**, qui se pose d'autant plus que le degré de réduction de la population est important et qu'elle persiste dans le temps ;
- la **perte de l'immunité des populations humaines antérieurement exposées**, à considérer à l'aune du bénéfice obtenu par la disparition de la maladie.

Qu'elles utilisent des moustiques GM ou non, les **techniques de modification de population** partagent :

- un **moindre impact *a priori* en termes de risques environnementaux et sanitaires**, du fait qu'elles ne devraient pas affecter la densité des populations de moustiques. Une évaluation des risques associés à la modification effectuée est tout de même nécessaire ;
- la **persistance et le caractère plus ou moins envahissant des modifications induites**, avec la nécessité de considérer le devenir et l'effet à long terme des facteurs à l'origine de ces modifications (*Wolbachia*, transgènes), incluant leur transfert potentiel à d'autres espèces.

Deux autres ensembles de techniques peuvent être distingués selon qu'elles sont auto-limitées (avec des effets limités dans l'espace et le temps à moins d'être entretenues) ou auto-entretenues (dont les effets se répandent dans l'espace et durent dans le temps, sans nécessiter de maintenance).

Les **techniques auto-limitées**, qu'elles utilisent des moustiques GM ou non, des lâchers de moustiques ou non, partagent :

- l'avantage d'être **maîtrisables et adaptables** selon les résultats de surveillance,
- l'inconvénient de **nécessiter une maintenance contraignante sur le long terme**.

Les **techniques auto-entretenues**, qu'elles utilisent des moustiques GM ou non, partagent :

- l'avantage de **ne pas nécessiter de maintenance** et de grosses infrastructures,
- l'inconvénient d'être **très peu flexibles, voire sans possibilité de contrôle** (ex. propagation intentionnelle au sein d'une espèce).

Il existe un continuum de techniques entre ces deux pôles. De plus, les caractéristiques d'auto-limitation et d'auto-entretien peuvent varier pour une technique donnée selon la stratégie de lutte dans laquelle elle est employée (réduction ou élimination), ou selon les propriétés des souches de *Wolbachia* utilisées.

L'analyse des aspects évolutifs des techniques en termes de **pertes d'efficacité avec le temps** – (1) par développement de résistance à leur mode d'action, (2) par développement de résistance comportementale, ou (3) par dérive fonctionnelle –, et leurs conséquences en termes de risques environnementaux et sanitaires, se plient moins à une catégorisation par ensembles de techniques car ces évolutions découlent de mécanismes précis de fonctionnement de chaque technique.

Le CS souligne toutefois que les **techniques fonctionnant par le biais d'une cible génétique**, qu'elles utilisent des moustiques GM ou non, peuvent donner lieu à un **développement de résistance à leur mode d'action**. C'est le cas de certains biocides (dont l'efficacité est compromise dans des

populations entières de moustiques résistants) et des techniques de forçage génétique (ce qui en limiterait les propriétés invasives aujourd'hui). Les autres techniques, incluant les techniques RIDL, TIS, TII, et les autres techniques classiques de lutte, ont des mécanismes d'action n'impliquant pas de cible génétique, ou impliquant des cibles trop nombreuses pour permettre aisément un tel développement de résistance. Par ailleurs, d'après les caractéristiques propres à chaque technique, le **développement de résistances comportementales** est concevable pour la technique RIDL et les techniques utilisant *Wolbachia*, peu probable pour les techniques de FG. Enfin, les **risques de dérive fonctionnelle** sont plausibles pour RIDL et les techniques de FG, ainsi que pour les techniques utilisant *Wolbachia*. La durabilité des différentes techniques doit être évaluée en tenant compte de ces trois types possibles de pertes d'efficacité.

Ainsi, l'analyse du CS montre que pour de nombreux points considérés, les techniques utilisant des moustiques GM ne présentent pas de caractéristiques communes propres à leur caractère GM, mais se rapprochent différentiellement d'autres techniques de lutte selon les aspects considérés. Au-delà des caractéristiques partagées, les **techniques de forçage génétique présentent des caractéristiques propres,** qui ne se retrouvent chez aucune autre technique à ce jour, **associées à leurs propriétés invasives particulières**. Si les limites techniques des exemples d'application développés à ce jour permettent d'anticiper une interruption de la propagation des cassettes de forçage génétique, l'évaluation de futures applications devra prendre en compte le potentiel invasif particulier de ces techniques ainsi que les incertitudes associées à leur évolution sur le terrain, considérant les événements de spéciation, de réorganisation du génome, observés dans certains cas de forçages génétiques naturels.

Le CS du HCB a réfléchi aux **critères d'évaluation des risques des moustiques GM**. Si chaque nouveau dossier doit être évalué au cas par cas, le CS du HCB n'a pas identifié *a priori* de risque particulier pour l'environnement qui ne puisse être couvert par les critères généraux listés dans la directive 2001/18/CE, directive relative à la dissémination volontaire d'OGM dans l'Union européenne. Il souligne toutefois **des éléments radicalement nouveaux apportés par le forçage génétique**, considérant le caractère **intentionnellement invasif** de la modification recherchée, qui a le potentiel théorique d'atteindre tous les individus d'une espèce dans l'environnement, que ce soit pour l'éradiquer ou la modifier. Par dessein, la dissémination n'est pas limitée dans le temps ou l'espace. L'évaluation des risques associés au forçage génétique devra donc être adaptée à ce changement d'échelle et d'objectifs. Le CS conclut que **les critères listés dans la directive 2001/18/CE, réglementairement applicables à l'évaluation des risques pour l'environnement associés à une dissémination de moustiques GM dans l'Union européenne, sont scientifiquement pertinents et *a priori* suffisants pour l'évaluation des risques associés à l'utilisation de moustiques GM dans le cadre de la lutte antivectorielle**. Une **déclinaison particulière**, comme prévu par la directive, **devra être effectuée pour l'évaluation des risques associés aux techniques de forçage génétique**. Par ailleurs, quel que soit le statut réglementaire des insectes artificiellement infectés par des bactéries *Wolbachia* dans l'Union européenne, le CS estime qu'une évaluation selon des critères adaptés de la directive 2001/18/CE pourrait être réalisée de façon pertinente.

Enfin, le CS du HCB a mis en évidence **des intérêts et des limites à l'utilisation de moustiques GM sur le territoire français** dans le cadre de la lutte antivectorielle.

Au-delà des mécanismes moléculaires en jeu et de certaines spécificités qui en découlent, **la technique RIDL apparaît très proche des techniques TIS et TII**. Ces trois techniques pourraient être testées, de manière précautionneuse et étape par étape, dans l'objectif de contribuer à la lutte antivectorielle sur les territoires français, selon les vecteurs considérés[8], en combinaison avec les techniques classiques actuellement utilisées dans le cadre d'une gestion intégrée. **La mise en œuvre des techniques RIDL, TIS et TII permettrait notamment de réduire l'utilisation des insecticides**. Outre une réduction des risques d'exposition pour l'Homme et les écosystèmes, une moindre utilisation d'insecticides permise par la mise en œuvre de techniques basées sur des lâchers de moustiques préserverait leur efficacité en diminuant la pression de sélection de résistances associées. Cela permettrait ainsi de **réserver l'utilisation des insecticides à des cas spécifiques d'urgence sanitaire et d'épidémie**.

Les deux approches de forçage génétique discutées dans cet avis en sont toujours à un **stade précoce de développement**. Les recherches en cours visent, notamment, à réduire l'évolution de résistances au forçage génétique, à élaborer un mécanisme de forçage génétique dont la propagation serait limitée, et à concevoir des outils capables de contrecarrer un forçage génétique existant. Des recherches sont également en cours sur les modalités d'évaluation des effets sur le long terme du forçage génétique sur les écosystèmes. **A ce jour, le CS estime prématuré d'envisager une application de forçage génétique sur le terrain**. Concernant l'objectif de modification de population, l'approche alternative exploitant la propagation de l'IP *via Wolbachia* est déjà expérimentée sur le terrain quand bien même les mécanismes d'IP restent mal compris.

Le choix entre différentes techniques ou combinaisons de techniques de lutte devrait être guidé en fonction de l'objectif recherché, de la biologie et du comportement des vecteurs, du contexte épidémiologique, environnemental et socio-économique, incluant les ressources humaines et financières disponibles. Par cet éclairage sur les techniques de lutte émergentes basées sur des lâchers de moustiques, GM ou non, cet avis devrait permettre d'**enrichir l'information sur les nouvelles options à disposition des pouvoirs publics, pour éclairer la prise de décision dans une approche de gestion intégrée de la lutte antivectorielle**. L'intégration pratique de ces options à la palette d'outils de lutte actuellement utilisés, selon les contextes particuliers des différents territoires français, devrait mobiliser des connaissances complémentaires à l'expertise du HCB.

[8] Le CS note que, si la technique RIDL est la plus avancée en termes de développement, elle ne permet pas à ce jour de lutter contre d'autres vecteurs qu'*Aedes aegypti*, pour lesquels la technique TIS et la technique TII, éventuellement associée à des doses d'irradiation stérilisantes, pourraient être envisagées.

TABLE DES MATIERES

1. INTRODUCTION 17

1.1. SAISINE 17

1.2. DEFINITION DU PERIMETRE 17

1.3. MODALITES DE TRAITEMENT 18

1.4. LOGIQUE DE L'AVIS 18

2. ELEMENTS DE CONTEXTE 19

2.1. MALADIES VECTORISEES PAR LES MOUSTIQUES 19

2.2. MOYENS DE LUTTE FACE AUX MALADIES INFECTIEUSES VECTORISEES 22

2.2.1. Approches thérapeutiques 22

2.2.2. Moyens de prévention 22

2.2.2.1. Traitements préventifs 22

2.2.2.2. Vaccins 22

2.2.2.3. La lutte antivectorielle : définition, objectifs et stratégies 23

2.3. COMPLEXITE ET DIVERSITE DES SYSTEMES VECTORIELS EN JEU 23

2.3.1. Les systèmes vectoriels : définition et notions fondamentales pour la lutte antivectorielle 23

2.3.2. Caractéristiques bio-écologiques des moustiques vecteurs 25

2.3.2.1. Moustiques et moustiques vecteurs 25

2.3.2.2. Aires d'origine et biogéographie 25

2.3.2.3. Cycle de vie des vecteurs 26

2.3.2.4. Eléments d'écologie fonctionnelle 31

2.3.3. Caractéristiques associées aux agents pathogènes 32

2.3.4. Autres facteurs à prendre en compte 32

3. UTILISATION DE MOUSTIQUES GENETIQUEMENT MODIFIES DANS LE CADRE DE LA LUTTE ANTIVECTORIELLE 34

3.1. MODIFICATION GENETIQUE DES MOUSTIQUES ET POTENTIEL EN LUTTE ANTIVECTORIELLE 34

3.1.1. Développement de la transgenèse chez les moustiques et potentiel en lutte antivectorielle 34

3.1.1.1. Transgenèse par insertion de transposon 34

3.1.1.2. Espèces de moustiques transformées avec succès 34

3.1.1.3. Applications possibles en lutte antivectorielle 35

3.1.2. Utilisation de nucléases dirigées chez les moustiques et potentiel en lutte antivectorielle 36

3.1.2.1. CRISPR-Cas9 comme nouvel outil de modification génétique 36

3.1.2.2. Potentiel du système CRISPR-Cas9 en lutte antivectorielle 37
3.1.2.3. Le forçage génétique et ses applications en lutte antivectorielle 37
3.2. EXEMPLE 1 : TECHNIQUE RIDL D'OXITEC 39
3.2.1. Principe 39
3.2.2. Etat des lieux de la recherche et des techniques de production 39
3.2.3. Résultats des premières expérimentations dans le monde 41
3.2.4. Commercialisation 45
3.3. EXEMPLE 2 : FORÇAGE GENETIQUE A DES FINS D'ELIMINATION DE POPULATION 45
3.3.1. Principe 45
3.3.2. Etat des lieux de la recherche 45
3.4. EXEMPLE 3 : FORÇAGE GENETIQUE A DES FINS DE MODIFICATION DE POPULATION 46
3.4.1. Principe 46
3.4.2. Etat des lieux de la recherche 46
4. SPECIFICITES DES TECHNIQUES DE LUTTE ANTIVECTORIELLE UTILISANT DES MOUSTIQUES GENETIQUEMENT MODIFIES 48
4.1. PANORAMA DES TECHNIQUES DE LUTTE ANTIVECTORIELLE EXISTANTES 48
4.1.1. Utilisation de biocides 48
4.1.2. Lutte biologique 52
4.1.3. Lutte physique et environnementale 54
4.2. AUTRES TECHNIQUES EMERGENTES BASEES SUR DES LACHERS DE MOUSTIQUES 56
4.2.1. Technique de l'insecte stérile classique (TIS) 56
4.2.2. Techniques utilisant *Wolbachia* 58
4.2.2.1. Technique de l'insecte incompatible (TII) 58
4.2.2.2. Propagation d'une interférence avec le pathogène (IP) 59
4.2.2.3. Etat des lieux de la recherche et bilan des expérimentations 60
4.2.3. Techniques de paratransgenèse 65
4.3. COMPARAISON DES TECHNIQUES UTILISANT DES MOUSTIQUES GM AVEC LES AUTRES TECHNIQUES DE LUTTE 66
4.3.1. Objectifs visés 68
4.3.2. Potentiel d'efficacité et de durabilité 69
4.3.3. Contraintes techniques 82
4.3.4. Risques pour l'environnement et la santé 87
5. CRITERES D'EVALUATION DES RISQUES DES MOUSTIQUES GENETIQUEMENT MODIFIES 111
5.1. REMARQUES PRELIMINAIRES CONCERNANT LA REGLEMENTATION DES MOUSTIQUES GM 111
5.1.1. Réglementation applicable aux territoires français 111
5.1.2. Réglementation applicable aux techniques de lutte antivectorielle utilisant des moustiques GM 111

5.2. PROPOSITION DE CRITERES D'EVALUATION DES RISQUES DES MOUSTIQUES GM 111
5.2.1. Principes applicables selon la directive 2001/18/CE 112
5.2.2. Déclinaison des critères de la directive 2001/18/CE pour une utilisation de moustiques GM en lutte antivectorielle 112
5.2.3. Analyse et conclusion 117
5.3. PROLONGEMENT DE LA REFLEXION AUX AUTRES TECHNIQUES DE LUTTE EMERGENTES 118
6. INTERETS ET LIMITES DE L'UTILISATION DES MOUSTIQUES GENETIQUEMENT MODIFIES EN FRANCE 119
6.1. INTERETS ET LIMITES DE LA TECHNIQUE RIDL D'OXITEC 119
6.2. INTERETS ET LIMITES DU FORÇAGE GENETIQUE A DES FINS D'ELIMINATION DE POPULATION 124
6.3. INTERETS ET LIMITES DU FORÇAGE GENETIQUE A DES FINS DE MODIFICATION DE POPULATION 125
6.4. NECESSITE D'UNE GESTION INTEGREE DES VECTEURS 126
7. BIBLIOGRAPHIE 127
ANNEXE 1 : SAISINE 145
ANNEXE 2 : COMITE SCIENTIFIQUE DU HCB ET ELABORATION DE L'AVIS 148
ANNEXE 3 : GROUPE DE TRAVAIL DU CS ET ELABORATION DU RAPPORT 149

1. Introduction

1.1. Saisine

Le Haut Conseil des biotechnologies (HCB) a été saisi le 12 octobre 2015 par la ministre en charge de l'environnement d'une demande d'éclairage sur l'utilisation de moustiques génétiquement modifiés dans le cadre de la lutte antivectorielle. La saisine est reproduite en Annexe 1.

Partant du constat des limites des méthodes actuelles de lutte contre les moustiques vecteurs d'agents pathogènes responsables de maladies – méthodes principalement basées sur l'utilisation de substances chimiques insecticides –, la ministre note que le Gouvernement devrait examiner avec rigueur l'ensemble des options à sa disposition, incluant l'utilisation de populations de moustiques au patrimoine génétique modifié.

Dans ce contexte, la ministre demande un éclairage au HCB sur l'utilisation de moustiques génétiquement modifiés dans le cadre de la lutte antivectorielle. Selon les termes de la saisine, cet éclairage devra plus particulièrement viser à :

1) établir un état des lieux de la recherche et de la commercialisation des [moustiques] génétiquement modifiés ainsi que de leurs techniques de production en soulignant leurs spécificités par rapport aux techniques déjà utilisées,
2) préciser les critères applicables pour l'évaluation sanitaire et environnementale de ces [moustiques] au niveau international, européen et national (y compris DROM-COM),
3) déterminer les résultats des premières utilisations et expérimentations de [moustiques] génétiquement modifiés menées dans le monde,
4) indiquer quels pourraient être les bénéfices et les risques de l'utilisation des [moustiques] génétiquement modifiés pour la France, y compris les DROM-COM, notamment d'un point de vue socio-économique et éthique.

1.2. Définition du périmètre

Le HCB a précisé les contours de son périmètre de travail en réponse à la saisine :

- parmi les insectes vecteurs d'agents pathogènes, seuls les moustiques au sens strict du terme ont été considérés, à savoir les insectes de la famille des *Culicidae*. Des exemples se référant à des insectes d'autres familles ont toutefois été cités, en raison de l'importance de leur impact sanitaire et/ou socio-économique, ou quand ils ont été considérés pertinents pour le développement de stratégies de lutte antivectorielle mettant en œuvre des insectes au patrimoine génétique modifié ;
- toutes les méthodes (chimique, biologique, génétique, physique et environnementale) de lutte antivectorielle existantes ou en développement ont été considérées pour donner un éclairage comparatif le plus informatif possible en réponse aux différentes questions de la saisine, et en particulier à celle des bénéfices et des risques de l'utilisation des moustiques génétiquement modifiés, qui ne peut se traiter dans l'absolu ;
- la saisine a été considérée aux plans national, incluant les DROM-COM, européen et international ;
- le Comité scientifique (CS) du HCB a traité les aspects scientifiques et techniques de la saisine, tandis que le Comité économique, éthique et social (CEES) du HCB en a examiné les

aspects socio-économiques et éthiques. L'encadrement réglementaire des techniques de lutte a également été abordé par le CS du fait de son influence sur leur évaluation et sur la définition des critères d'évaluation des risques associés.

1.3. Modalités de traitement

Le CS du HCB a traité cette saisine en trois temps :

1) par la constitution d'un groupe de travail d'experts[9] dont les compétences réunies ont permis d'élaborer un rapport[10] qui couvre les différents aspects scientifiques et techniques des questions soulevées par la saisine, et apporte des éléments de contexte relatifs à l'utilisation des méthodes de lutte antivectorielle sur les territoires français ;

2) par la discussion du rapport du groupe de travail en séance du CS et plusieurs itérations entre le CS et le groupe de travail en vue de la clarification du rapport et de l'élaboration d'un avis[11] ;

3) par la préparation d'un projet d'avis plus ciblé en réponse aux questions de la saisine, élaboré à partir du rapport du groupe de travail et de compléments recherchés dans la littérature scientifique, auprès d'acteurs de la lutte antivectorielle et des membres du groupe de travail consultés en tant qu'experts quand c'était nécessaire. Le projet a été discuté en séance du CS et amendé selon le résultat de ces discussions et après vérification auprès des experts du domaine. L'avis finalisé a été adopté par le comité le 31 mai 2017[12].

En conséquence, le présent avis du CS s'appuie sur le rapport du groupe de travail et s'y réfère largement. Ce rapport est disponible sur le site Internet du HCB.

1.4. Logique de l'avis

En réponse aux questions de la saisine, le présent avis suit la logique suivante :

- le chapitre 1 d'introduction présente la saisine et son traitement au CS du HCB ;
- le chapitre 2 pointe les éléments de contexte clefs et les fondamentaux de la lutte antivectorielle développés dans le rapport du groupe de travail ;
- le chapitre 3 répond aux questions n° 1 et n° 3 de la saisine, présentant les techniques de lutte antivectorielle faisant appel à des moustiques GM, l'état des lieux de leur recherche et de leur développement, incluant les résultats des premières expérimentations dans le monde ainsi qu'un point sur leur commercialisation.
- le chapitre 4 complète la réponse à la question n° 1 de la saisine, mettant en exergue les spécificités des techniques de lutte antivectorielle utilisant des moustiques GM par rapport aux autres techniques de lutte, incluant les techniques déjà utilisées mais également d'autres techniques émergentes, en termes d'objectifs visés, de potentiel d'efficacité et de durabilité, de contraintes techniques et de risques pour l'environnement et la santé ;

---

[9] La composition du groupe de travail du CS et ses modalités de travail, incluant un séminaire de travail ouvert aux membres des deux comités du HCB et une audition des représentants de la firme britannique Oxitec, sont indiquées dans l'Annexe 3.

[10] Le rapport du groupe de travail du CS est disponible sur le site Internet du HCB et au lien : http://www.hautconseildesbiotechnologies.fr/sites/www.hautconseildesbiotechnologies.fr/files/file_fields/2017/05/31/rapportgtcshcbcnevadopte170523.pdf.

[11] Les travaux du groupe de travail et le rapport en cours d'élaboration ont été discutés par le Comité scientifique lors des séances du 24 mars, du 28 avril et du 22 juin 2016. Des points plus succints sur l'avancement du rapport ont été fournis lors des séances du 13 juillet et du 27 septembre. Le rapport en cours de finalisation a été présenté lors des séances du 27 octobre et du 15 décembre, et discuté en vue de l'élaboration d'un avis du CS le 26 janvier 2017.

[12] Le projet d'avis du CS a été discuté lors des séances du 25 février, du 28 mars, du 27 avril et du 24 mai 2017. Il a été adopté par voie électronique le 31 mai 2017.

- le chapitre 5 répond à la question n° 2 de la saisine par une proposition de critères d'évaluation des risques des moustiques GM en tenant compte des réglementations applicables sur les territoires français ;
- le chapitre 6 répond à la question n° 4 de la saisine en termes d'intérêts et limites des techniques de lutte antivectorielle utilisant des moustiques GM par rapport aux autres techniques de lutte sur les aspects scientifiques et techniques, sachant que le CEES complètera cette réflexion sur les aspects socio-économiques et éthiques.

2. Eléments de contexte

2.1. Maladies vectorisées par les moustiques

Les maladies vectorisées, ou maladies à transmission vectorielle, sont des maladies infectieuses transmises par des vecteurs. Ces vecteurs sont principalement des arthropodes hématophages, en majorité des insectes – incluant notoirement des moustiques, mais également des mouches et moucherons (phlébotomes, culicoïdes, simulies…), des puces, des poux et des punaises – ainsi que des arachnides comme les acariens, incluant les tiques.

- Fardeau mondial des maladies vectorisées par les moustiques :

Selon l'OMS, les maladies à transmission vectorielle sont responsables de plus de 17 % des maladies infectieuses et provoquent plus d'un million de décès chaque année dans le monde. Parmi les maladies transmises par les moustiques, les maladies parasitaires comme le paludisme ou la filariose lymphatique contribuent largement à la mortalité et à la morbidité pour cause infectieuse au plan mondial, même si les tendances sont à la baisse ; les maladies virales sont plus nombreuses, avec des épidémies et invasions de territoire plus fréquentes, mais leur impact demeure en deça (Rapport du GT, Tableau 1).

- Situation en France :

Parmi les nombreuses maladies spécifiquement vectorisées par des moustiques, on considèrera ici essentiellement les plus notables en matière d'impact en santé humaine et animale au niveau mondial, et/ou de présence en France métropolitaine ou ultramarine[13], à savoir principalement le paludisme, les filarioses lymphatiques, la dengue, le chikungunya, la fièvre jaune, la fièvre du Nil occidental, ainsi que la fièvre à virus Zika. Le rapport du GT décrit pour chacune d'entre elles la maladie, l'agent infectieux, le vecteur, le fardeau mondial, l'épidémiologie dans le monde et la présence sur le territoire français (Rapport du GT, sections 2.1.2. et 2.1.3., les cycles de transmission des arbovirus et les aires de distribution de ces maladies étant illustrés dans les Annexes 8 et 9 du rapport), information synthétisée dans les encadrés ci-après sur les maladies vectorisées par les moustiques en France.

Ces maladies concernent essentiellement la santé humaine. L'impact vétérinaire des maladies transmises par les moustiques *sensu stricto* est plus modeste, les agents pathogènes vectorisés par des tiques, moucherons piqueurs ou phlébotomes étant prépondérants en la matière ; il est développé dans l'Annexe 6 du rapport du GT.

[13] La France d'outre-mer rassemble des territoires situés dans le Pacifique (la Polynésie française, la Nouvelle Calédonie, Wallis-et-Futuna, ainsi que l'île de Clipperton), dans l'océan Indien (La Réunion et Mayotte, ainsi que certaines des îles appartenant aux TAAF, Terres australes et antarctiques françaises), en Amérique, avec les Antilles françaises (la Martinique, la Guadeloupe, Saint-Martin et Saint-Barthélémy), la Guyane française en Amérique du Sud, et Saint-Pierre-et-Miquelon en Amérique du Nord. A part Saint-Pierre-et-Miquelon, les TAAF et l'île de Clipperton, tous ces territoires sont concernés par les maladies vectorielles. L'Annexe 5 du rapport du groupe de travail apporte plus d'informations sur la situation géographique et le statut juridique des différents territoires d'outre-mer français.

Maladies vectorisées par les moustiques en France – 1. Les arboviroses

Les arboviroses désignent les maladies virales causées par des arbovirus, c.-à-d. des virus transmis par des arthropodes. Plus de 500 arbovirus sont répertoriés, un peu moins de la moitié sont transmis par les moustiques et une centaine infectent l'Homme. Les arboviroses présentes sur le territoire français sont décrites ci-dessous.

La dengue :

La dengue résulte d'une infection par l'un des quatre sérotypes d'un flavivirus (DENV, virus à ARN), transmis principalement par les moustiques *Aedes aegypti* mais aussi par d'autres *Aedes* vecteurs comme *Aedes albopictus*. Dans la majorité des cas, la maladie est bénigne, bien que très souvent temporairement invalidante du fait du cortège fièvre, nausées, douleurs musculaires et articulaires. Plus rarement, des formes hémorragiques graves pouvant conduire au décès sont observées. Depuis 2010, la France continentale a été touchée par une série d'épisodes qui, associés à une adaptation d'*Ae. albopictus* aux conditions locales, pourraient conduire à l'émergence d'épidémies. Près de 3,9 milliards de personnes, dans 128 pays, seraient exposées à l'infection par les virus de la dengue (Brady et al., 2012). Selon une estimation récente, on compterait 390 millions de cas de dengue par an, dont 96 millions présentent des manifestations cliniques (Bhatt et al., 2013). La dengue est endémo-épidémique dans les territoires français d'Amérique Centrale (Antilles françaises et Guyane française), dans l'océan Indien (La Réunion, Mayotte) et dans le Pacifique (Polynésie française, Nouvelle Calédonie (épisode épidémique en 2017), Wallis et Futuna).

Infections par le virus Zika :

Le virus Zika est un flavivirus (ZIKV, virus à ARN) transmis à l'Homme par les moustiques du genre *Aedes*, essentiellement *Ae. aegypti*, peut-être *Ae. albopictus* et d'autres espèces d'*Aedes* en cycle urbain. Il peut également être transmis par voie sexuelle, ou *in utero* en cas d'infection maternelle, ou lors de transfusion sanguine. Une infection antérieure par un DENV pourrait favoriser les infections par le virus Zika. La plupart des infections sont asymptomatiques. Toutefois, l'impact d'une infection fœtale sur le développement cérébral, pouvant conduire à une microcéphalie, et la survenue du syndrome de Guillain Barré chez certains malades, font de l'émergence de cette infection un enjeu important de santé publique. Une première épidémie importante a eu lieu en Polynésie Française en 2013-14 puis en Nouvelle Calédonie en 2014. Les Antilles françaises et la Guyane ont été touchées en 2016 dans la foulée de l'épidémie de 2015-16 au Brésil. Les différents modes de transmission du virus rendent possible sa transmission à partir de cas importés en Europe continentale, nonobstant la progression du vecteur (*Ae. albopictus*) lui-même.

Le chikungunya :

Le chikungunya est causé par un alphavirus (CHIKV, virus à ARN) transmis à l'Homme sur un mode épidémique par les moustiques du genre *Aedes*, principalement *aegypti* et *albopictus*. Trois génotypes circulent actuellement dans le monde. L'infection est le plus souvent symptomatique, associant des atteintes musculaires et articulaires douloureuses et invalidantes. Des formes avec une atteinte hépatique ou neurologique sévère sont également observées. Le virus est régulièrement observé lors d'épisodes épidémiques en Asie mais aussi en Afrique et sur le continent américain. L'adaptation du virus, par mutation de ses gènes d'enveloppe à un deuxième hôte (*Ae. albopictus*) de biotope différent, contribue à la diffusion des épidémies de CHIKV. Une première vague épidémique est survenue à La Réunion en 2005-2006, et à Mayotte en 2006. Des cas ont été décrits en France métropolitaine depuis 2010. En 2013, des cas autochtones de CHIKV sont détectés sur l'île de St Martin, cas qui se sont étendus à toutes les îles Caraïbes, y provoquant une épidémie majeure en 2014.

La fièvre jaune :

Le virus de la fièvre jaune est un flavivirus (YFV, virus à ARN). Il est transmis par *Ae. aegypti* ou *Ae. albopictus* en zone urbaine. Il existe deux cycles de transmission : urbain et sylvatique (enzootique avec les primates). La maladie humaine intervient quand l'Homme s'introduit dans le cycle sylvatique (plus rarement un primate peut conduire le virus en milieu urbain). L'infection est souvent pauci-symptomatique, simple syndrome grippal, mais elle peut être associée à la survenue d'un ictère (jaunisse), d'une atteinte rénale et d'une fièvre hémorragique graves avec une forte incidence de décès. Le YFV sévit principalement en Afrique et à un moindre degré en Amérique du sud. Pour les territoires français, seule la Guyane est concernée ; le dernier cas humain y a été rapporté en 1998, la vaccination étant obligatoire sur le territoire.

La fièvre du Nil occidental :

Le virus de la fièvre du Nil occidental est un flavivirus (WNV, virus à ARN) dont il existe trois génotypes associés à des infections chez l'Homme. Le WNV est transmis à l'Homme par piqûre de moustiques, plus de 60 espèces sont impliquées. Les moustiques du genre *Culex* (*restuans* et *pipiens* principalement) sont le vecteur de passage des oiseaux, réservoir principal, vers l'Homme. La maladie est associée le plus souvent à peu de symptômes, moins de 1 % des personnes infectées développent une forme clinique grave comprenant une atteinte neuro-invasive grevée de décès dans 20 % des cas. Le virus est présent sur tous les continents et a été associé à une série d'épidémies. Le WNV ré-émerge régulièrement dans les populations d'oiseaux, faisant craindre le développement de nouvelles épidémies chez l'Homme. Après une première épidémie en 1962, les épisodes sont rares en France métropolitaine, où l'on observe surtout des cas équins, dont la détection active une série de mesures de prévention en matière de santé publique. Le virus circule en Guadeloupe, sans que des cas humains n'aient été décrits.

Maladies vectorisées par les moustiques en France – 2. Les parasitoses

Les parasitoses sont des maladies causées par des parasites. Deux parasitoses sont causées par des parasites transmis par les moustiques : le paludisme, et les filarioses lymphatiques. Les deux sont présentes sur le territoire français.

Le paludisme :

Le paludisme reste l'une des maladies infectieuses de l'Homme les plus meurtrières au niveau mondial, avec 212 millions de cas et 429.000 morts en 2015, même si son incidence a baissé de 41 % et sa mortalité a décru de 62 % depuis 2000, notamment grâce à la lutte antivectorielle. Il est causé par un protozoaire du genre *Plasmodium*, parasite obligatoire intracellulaire, transmis par des moustiques du genre *Anopheles*, de différentes espèces selon les régions. En Afrique, les vecteurs majeurs sont *Anopheles gambiae*, *An. funestus* ; dans la région indo-asiatique : *An. stephensi*, *An. culicifacies*, *An. dirus* ; dans les Amériques *An. quadrimaculatu*s est un vecteur comme *An. hermsi*, *An. albimanus*, *An. darlingi*. Parmi les 156 espèces de plasmodium, cinq sont responsables du paludisme chez l'Homme : *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* et *P. knowlesi*. Responsable des formes cliniques les plus sévères, *P. falciparum* est aussi le plus répandu des plasmodium, dominant en Afrique, et présent en Asie et en Amérique du sud. *P. vivax, ovale* et *malariae* sont associés à des formes bénignes, parfois récurrentes par persistance du parasite dans le foie. Les infections à *P. knowlesi* sont anecdotiques. Les symptômes cliniques du paludisme associent des céphalées, des myalgies et des signes digestifs. L'accès palustre est une alternance de fièvre, tremblements et transpiration intense, reflétant le cycle du parasite qui se déroule dans les globules rouges et entraîne leur destruction. La forme grave du paludisme, le neuro-paludisme, peut être mortelle ; elle n'est observée qu'après infection par *P. falciparum*. Depuis sa disparition en métropole (derniers cas en Corse en 1970), les cas de paludisme y sont essentiellement importés, les patients revenant de pays impaludés et, plus rarement, les moustiques étant eux-mêmes importés (causant le paludisme dit d'aéroport). Le paludisme reste endémique en Guyane et à Mayotte.

Les filarioses lymphatiques :

Les filarioses sont dues à des infections par des filaires, qui sont des vers microscopiques de l'embranchement des Nématodes. Chez l'Homme, trois espèces de filaires sont à l'origine de filarioses lymphatiques : *Wuchereria bancrofti* (90 % des cas), *Brugia malayi* et *Brugia timori*, chacune transmise par des vecteurs différents, avec des spécificités propres à chaque territoire, résultant d'événements d'adaptations évolutives. Les vecteurs principaux sont des *Anopheles* (*An. gambiae* par exemple) ou des *Culex*. Le cycle sexué des vers limite l'impact de la forte capacité vectorielle des moustiques. Chez l'Homme, les filarioses lymphatiques ont une manifestation aiguë et chronique, mais au moins la moitié des patients atteints sont asymptomatiques. En phase aiguë, on observe des adénopathies avec inflammation et fièvre. La présence de microfilaires dans le sang altère à bas bruit les vaisseaux lymphatiques produisant une phase chronique. A cette phase, l'obstruction des vaisseaux lymphatiques bloque la circulation de la lymphe et conduit à un œdème. L'extrémité distale des membres affectés peut enfler démesurément et rester gonflée. En Asie, des formes pulmonaires, syndrome éosinophile pulmonaire, peuvent être observées. Sur les territoires français, l'agent retrouvé est *W. bancrofti*, vectorisé par des *Aedes* dans le Pacifique et des *Anopheles* dans l'océan Indien, *Culex quinquefasciatus* pouvant être un vecteur en zone urbaine. À Mayotte, considérée comme l'un des foyers les plus importants au monde il y a environ 40 ans, la filariose a considérablement régressé, même si la prévalence n'est pas mesurée précisément. À La Réunion, les campagnes antipalustres et l'élévation du niveau de vie ont sans doute largement contribué à une régression spectaculaire de la maladie, disparue depuis les années 1970.

- Moustiques vecteurs considérés dans l'avis :

Les espèces de moustiques responsables de la transmission des maladies pré-citées sur les différents territoires français sont essentiellement *Aedes albopictus*, *Aedes aegypti*, et différentes espèces de *Culex* et d'*Anopheles* (Rapport du GT, sections 2.1.2. et 2.1.3. Tableaux 3 et 6). Sachant qu'il existe plus de 3500 espèces de moustiques, le HCB a concentré sa réflexion sur la lutte contre les populations de ces espèces de moustiques vectrices présentes sur les différents territoires français.

- Autres voies de transmission :

Il est à noter que pour certaines de ces maladies, une dissémination des agents pathogènes par d'autres voies que la transmission vectorielle est possible : une transfusion sanguine[14] peut être à l'origine de cas secondaires (Dodd et al., 2015), mais son impact reste faible par rapport au nombre de cas transmis par des moustiques (Gray and Webb, 2014). Les transmissions par voie congénitale

[14] Des mesures préventives sont appliquées par les organismes de gestion de la transfusion, soit l'EFS (Etablissement français du sang) en France, sous l'autorité de la Direction Générale de la Santé. Ces mesures comprennent, selon les virus et leurs caractéristiques biologiques, le diagnostic systématique des dons, l'exclusion temporaire des dons au retour de zones à forte prévalence, et une décontamination des produits lorsque cela est possible.

et sexuelle sont également possibles pour le virus Zika (Foy et al., 2011; Weaver et al., 2016). Leur impact est difficile à mesurer aujourd'hui.

- Maladies vectorisées par d'autres vecteurs :

Enfin, de nombreuses maladies vectorielles transmises par d'autres vecteurs que des moustiques méritent également d'être signalées ici en raison de l'importance de leur impact sanitaire et/ou socio-économique, notamment en santé animale : en zone tempérée ou tropicale, les maladies transmises par les tiques et les culicoïdes (moucherons piqueurs) ont une importance majeure en santé animale. C'est par exemple le cas de la fièvre catarrhale ovine, dont l'épizootie majeure de 2006-2010 a entraîné des pertes économiques atteignant le milliard d'euros en France[15]. C'est également le cas du virus Schmallenberg, dont la propagation à grande vitesse en 2011 à partir des Pays-Bas a entraîné plusieurs milliers de foyers en France[16]. Ces deux arboviroses sont vectorisées par des culicoïdes. Ces maladies et leurs vecteurs ne seront pas considérés dans cet avis car ils sortent du périmètre de la saisine, ciblée sur les moustiques. Il faut toutefois garder à l'esprit qu'elles soulèvent les mêmes questions de lutte antivectorielle.

2.2. Moyens de lutte face aux maladies infectieuses vectorisées

Les moyens de lutte contre les maladies infectieuses vectorisées incluent les approches thérapeutiques et les moyens de prévention, dont la lutte antivectorielle.

2.2.1. Approches thérapeutiques

Parmi les maladies considérées, seuls le paludisme et les filarioses lymphatiques bénéficient de traitements thérapeutiques commercialisés, traitements pour lesquels des stratégies doivent être mises en œuvre pour limiter le risque de développement de résistance et gérer les conséquences associées (WHO, 2015). Un traitement est en phase clinique précoce pour le chikungunya. Aucun traitement probant n'est en vue pour les autres maladies (Rapport du GT, section 2.2.1.).

2.2.2. Moyens de prévention

2.2.2.1. Traitements préventifs

Concernant le paludisme, certaines des molécules utilisées à titre curatif dans le cadre des approches thérapeutiques peuvent également être utilisées à titre préventif (WHO, 2015). Ces approches sont toutefois essentiellement réservées aux expositions limitées dans le temps. Ainsi, les traitements préventifs contre le paludisme ne sont prescrits qu'aux personnes vivant en dehors des zones d'endémie et qui ne sont exposées que sur de courtes périodes ; ils ne sont pas appliqués aux populations autochtones du fait des effets secondaires que pourraient entraîner une prise chronique et du possible développement de résistances chez le parasite. Il n'existe pas de traitements préventifs contre les arboviroses aujourd'hui.

2.2.2.2. Vaccins

Seules deux de ces maladies bénéficient de vaccins commercialisés : la fièvre jaune, depuis les années 1940, et la dengue, dont la commercialisation du vaccin a débuté en 2016. La souche vaccinale actuellement utilisée contre la fièvre jaune étant une souche de virus atténuée, non dénuée d'effets secondaires indésirables, une souche vaccinale alternative a été développée à partir d'une souche inactivée ; elle n'est pas encore commercialisée (Monath et al., 2011; Pereira et al., 2015). Dans tous les cas, il faut noter que le nombre de doses vaccinales disponibles à tout moment

[15] https://www.anses.fr/fr/content/la-fi%C3%A8vre-catarrhale-ovine-fco-ou-bluetongue.

[16] http://agriculture.gouv.fr/maladies-animales-le-virus-de-schmallenberg.

reste un enjeu en cas de survenue d'une épidémie (Green, 2016; Kupferschmidt, 2016). Les vaccins pour les autres maladies sont en cours de développement (Rapport du GT, section 2.2.2.).

Dans ce contexte, la lutte antivectorielle s'inscrit comme moyen de prévention indispensable, complémentaire aux traitements préventifs et vaccins disponibles aujourd'hui, nécessaire pour pallier le manque de thérapies pour la plupart de ces maladies.

2.2.2.3. La lutte antivectorielle : définition, objectifs et stratégies

Dans son acception la plus large, la lutte antivectorielle comprend la lutte et la protection contre les arthropodes hématophages, vecteurs d'agents pathogènes pour l'Homme et les vertébrés, ainsi que leur surveillance (CNEV).

L'objectif général de la lutte antivectorielle est la réduction de la mortalité ou de la morbidité des maladies à transmission vectorielle. Elle vise les objectifs spécifiques suivants :

- à l'échelle individuelle, la protection contre les piqûres d'arthropodes infectants ;
- à l'échelle collective, la prévention ou la réduction de l'intensité de la transmission des agents pathogènes, en agissant sur quatre des paramètres clés de la capacité vectorielle que sont la densité des vecteurs, la longévité des vecteurs, le contact hôte-vecteur ainsi que la compétence vectorielle.

Les stratégies de lutte peuvent mettre en œuvre des méthodes ou techniques variées selon les vecteurs et selon les contextes épidémiologiques et socio-économiques :

- les méthodes existantes ont recours à des procédés de type chimiques, biologiques, physiques, environnementaux et sociaux. Elles incluent la lutte biocide – notamment à l'aide d'insecticides adulticides et larvicides –, la lutte biologique – à l'aide de prédateurs ou d'agents pathogènes de moustiques –, la lutte mécanique – par des méthodes de capture de vecteurs et de protection contre le contact hôte-vecteur (pièges, moustiquaires…) –, la lutte environnementale – visant à rendre l'environnement hostile au développement des populations de vecteurs (assèchement, drainage, élimination des gîtes…) et faisant appel à une part non négligeable d'éducation sanitaire et de mobilisation sociale (voir section 4.1.) ;
- les techniques émergentes ou en développement mettent en œuvre des procédés génétiques au sens large du terme[17]. Ces techniques incluent l'utilisation de moustiques génétiquement modifiés, objet de la saisine (présentées au chapitre 3), ainsi que d'autres techniques basées sur des lâchers de moustiques (présentées en section 4.2.).

2.3. Complexité et diversité des systèmes vectoriels en jeu

La mise en place d'une stratégie de lutte antivectorielle, avec le choix d'une technique particulière ou d'une combinaison de techniques de lutte antivectorielle, nécessite une bonne compréhension des systèmes vectoriels en jeu. Elle doit notamment tenir compte des caractéristiques du moustique vecteur ciblé et de l'influence de l'environnement sur la transmission de l'agent pathogène.

2.3.1. Les systèmes vectoriels : définition et notions fondamentales pour la lutte antivectorielle

Un système vectoriel est un système biologique complexe constitué de trois composantes : l'agent pathogène, l'arthropode vecteur (généralement plusieurs espèces), l'hôte vertébré (généralement plusieurs espèces), et de toutes les inter-relations qui se sont établies entre elles (Rodhain, 2015). Son fonctionnement est indissociable de l'environnement dans lequel il évolue.

[17] Dans le domaine de la lutte antivectorielle, la lutte dite génétique consiste en l'emploi de toutes les conditions et méthodes de traitement susceptibles de réduire le potentiel reproductif des formes nuisibles par une altération ou un remplacement du matériel héréditaire (Fontenille et al., 2009). Cette terminologie n'est pas utilisée dans la suite de l'avis.

La transmission d'un agent pathogène par un vecteur est un processus complexe, actif et spécifique, qui se déroule en trois phases :

1. l'infection du vecteur au cours d'un repas de sang[18] sur un vertébré infectant (c.-à-d. dans lequel l'agent pathogène est présent en quantité suffisante dans le sang) ;
2. le développement de l'agent pathogène[19] dans l'organisme du vecteur. C'est lors de cette phase que l'agent pathogène atteint le lieu de l'organisme du vecteur propice à sa transmission (les glandes salivaires ou le long des pièces buccales du moustique), et que le vecteur devient infectant. Une fois qu'un vecteur est devenu infectant, il le reste toute sa vie (excepté pour les filaires) ;
3. la transmission, par le vecteur infectant, de l'agent pathogène à un autre vertébré. Dans le cas des moustiques, la transmission de l'agent pathogène se fait par la salive, qui est injectée par l'arthropode au moment du repas sanguin. Un mécanisme différent est à l'œuvre pour les filaires, qui migrent le long des pièces buccales et pénètrent la peau au moment de la piqûre.

L'intervalle de temps entre l'acquisition de l'agent pathogène par le vecteur et le moment où ce dernier est en capacité d'en assurer la transmission est appelé période d'incubation extrinsèque. De durée variable selon les populations d'agents pathogènes, de vecteurs et d'hôtes vertébrés et selon l'environnement dans lequel ils interagissent, elle est généralement comprise entre 3 et 15 jours pour les agents pathogènes transmis par les moustiques ; pour un agent pathogène donné, elle varie selon des facteurs propres aux moustiques vecteurs ou selon des facteurs environnementaux (principalement la température) (voir section 2.3.3). La période d'incubation extrinsèque est une composante importante de l'épidémiologie : la somme de cette période et de la période d'incubation chez l'hôte vertébré constitue le délai minimal entre l'apparition des premiers symptômes du cas index et d'un cas secondaire. Si le vecteur ne survit pas assez longtemps pour assurer l'intégralité du processus d'incubation (du fait des limites de sa propre longévité, de conditions environnementales ou d'une technique de lutte antivectorielle), il ne sera pas en mesure de transmettre l'agent pathogène.

Seul un vecteur compétent vis-à-vis d'un agent pathogène donné pourra en assurer la transmission. La compétence vectorielle est l'aptitude d'un vecteur à s'infecter et assurer le développement et la transmission d'un pathogène (Tran et al., 2005) ; elle dépend essentiellement de facteurs intrinsèques, sous contrôle génétique (Tran et al., 2005), et peut être modulée par la flore intestinale (Carissimo et al., 2015; Gendrin et al., 2015; Richman et al., 1997) et d'autres facteurs encore mal connus.

L'efficacité d'une population de vecteurs à transmettre un pathogène correspond à la capacité vectorielle. Cette notion intègre des facteurs intrinsèques au vecteur (compétence vectorielle) et des facteurs extrinsèques, qui incluent l'efficacité de développement du pathogène en fonction de la température, les préférences trophiques (taux d'anthropophilie), la fréquence des repas sanguins, la longévité (fonction des conditions climatiques), ainsi que la densité de la population vectorielle (Rodhain, 2015; Rodhain and Perez, 1985). La connaissance de la capacité vectorielle d'une population de moustiques vecteurs pour un agent pathogène dans un environnement donné peut faciliter la détermination, comme objectif de lutte antivectorielle, d'une densité critique sous laquelle une endémie ne peut se maintenir.

[18] Le repas de sang, pris uniquement par les moustiques femelles après leur fécondation par des mâles, induit la vitellogenèse et la maturation des œufs (voir cycle de vie des moustiques).

[19] Le développement des agents pathogènes dans le vecteur se traduit différemment selon la nature des agents pathogènes (voir section 2.3.3. sur les caractéristiques associées aux agents pathogènes).

2.3.2. Caractéristiques bio-écologiques des moustiques vecteurs

2.3.2.1. Moustiques et moustiques vecteurs

La famille des moustiques (*Diptera Culicidae*) comprend plus de 3500 espèces et est divisée en trois sous-familles : *Anophelinae*, *Culicinae*, *Toxorhynchitinae*. Il existe 112 genres de moustiques dont les plus connus sont *Anopheles* (*Anophelinae*), *Aedes* et *Culex* (*Culicinae*) (http://mosquito-taxonomic-inventory.info/).

Dans le cadre de cette saisine, on se concentrera sur les caractéristiques des espèces de moustiques vectrices des agents causatifs des maladies sélectionnées en raison de leur impact au niveau mondial et/ou de leur présence sur les territoires français, à savoir le paludisme, la filariose lymphatique, la dengue, le chikungunya, la fièvre jaune, la fièvre du Nil Occidental ainsi que la fièvre à virus Zika :

- *Anopheles* spp. : vecteurs de l'agent du paludisme, *Plasmodium* spp.

  Près de 500 espèces différentes du genre *Anopheles* ont été décrites ; 68 d'entre elles peuvent transmettre le paludisme, 40 comme vecteurs principaux et 28 comme vecteurs secondaires. *Anopheles gambiae s.s.*[20] est considéré comme le plus important vecteur du paludisme en zone africaine. *Anopheles arabiensis* est une espèce morphologiquement indistinguable d'*An. gambiae s.s.* mais à la différence de celle-ci, elle peut s'éloigner de l'habitat humain et sévir en zone aride. *Anopheles albimanus* est considéré comme le moustique du paludisme dans le Nouveau Monde, et *Anopheles stephensi* en Asie, où il existe de très nombreux vecteurs.

  Au sein du complexe d'espèces *An. gambiae s.l.*, *An. gambiae s.s.* partage un certain degré d'interfertilité, même s'il semble limité, avec *An. coluzzii* (Coetzee et al., 2013) et avec *An. arabiensis* (Weetman et al., 2014). On note que, sur les territoires français, les risques de transfert de gènes entre moustiques de ces (sous-)espèces sont toutefois théoriquement inexistants car elles ne sont pas connues pour y cohabiter aujourd'hui[21].

- *Aedes aegypti* (groupe monophylétique[22]), communément appelé « moustique de la fièvre jaune » : vecteur majeur des arbovirus YFV, DENV, CHIKV et ZIKV ;

- *Aedes albopictus* (groupe monophylétique), communément appelé « moustique tigre » : vecteur majeur de CHIKV dans la région de l'océan Indien, vecteur secondaire de DENV et responsable des cas de transmission autochtone de DENV et CHIKV en Europe ; *Ae. albopictus* est aussi un vecteur compétent expérimentalement pour de nombreux autres virus, dont ZIKV, mais son rôle dans la transmission n'a pas été démontré sur le terrain ;

- *Culex pipiens* spp., notamment *Cx. pipiens pipiens*, moustique commun en Europe où il est vecteur de WNV, et *Cx. quinquefasciatus*, l'un des vecteurs des filaires lymphatiques à Mayotte. Ces deux espèces sont interfertiles mais ne cohabitent pas sur les territoires français.

2.3.2.2. Aires d'origine et biogéographie

Ae. aegypti et *Ae. albopictus*, vecteurs majeurs, primaires ou secondaires, des arbovirus transmis à l'Homme, sont des espèces de moustique invasives. Après une extension remarquable depuis quelques années depuis leurs aires d'origine respectives (Afrique et Asie), leur présence est maintenant répertoriée dans un très grand nombre de pays (Kraemer et al., 2015). La distribution

[20] *Anopheles gambiae s.l.* (*sensu lato*) constitue un complexe de plusieurs espèces cryptiques ou jumelles (indistinguables sur des critères morphologiques), incluant *An. gambiae s.s.* (*sensu stricto*), *An. arabiensis* et *An. coluzzi*.

[21] A La Réunion, de ces trois (sous-)espèces, seul *An. arabiensis* est présent, et sous forme de population résiduelle, en milieu rural, et à distance trop éloignée de l'aéroport pour une hybridation avec un moustique *An. gambiae* introduit par avion. A Mayotte, de ces trois (sous-)espèces, seul *An. gambiae s.s.* est présent. Il n'est pas implanté sur la zone de l'aéroport et des opérations de contrôle ont lieu autour de l'aéroport.

[22] *Aedes aegypti* constitue un groupe monophylétique dans le sens où il ne consiste qu'en une seule espèce.

mondiale d'*Ae. aegypti* est cependant restreinte aux zones climatiques tropicales, alors que dans les 30 dernières années, celle d'*Ae. albopictus* s'est étendue aux régions continentales tempérées. On notera en particulier la récente propagation d'*Ae. albopictus* en France, implanté en 2004 et présent dans 30 départements de la métropole en 2015 (InVS)[23]. Cette progression spectaculaire d'*Ae. albopictus* a notamment été permise par son adaptabilité aux climats froids, résultant de sa capacité à entrer en diapause hivernale au stade œuf (Lacour et al., 2015).

Le complexe d'espèces *Cx. pipiens* possède également une distibution mondiale. Alors que *Cx. quinquefasciatus* est essentiellement présent en zone tropicale, *Cx. p. pipiens* est présent en zone tempérée continentale, mais également dans certaines zones d'Afrique tropicale et méditerranéenne (Farajollahi et al., 2011).

A la différence des espèces d'*Aedes* et de *Culex*, peu nombreuses, chacune mondialement répandue et vectrice de nombreuses maladies, il existe de nombreuses espèces d'anophèles qui sont vectrices du même agent pathogène, *Plasmodium* spp., et sont localisées dans différentes régions du globe. Ainsi, chaque continent ou sous-région héberge un panel unique d'anophèles vecteurs (Sinka et al., 2012). Tous ne contribuent pas de manière similaire à la transmission du paludisme ; on parle d'espèces vectrices majeures et d'espèces vectrices mineures. Une espèce qualifiée d'espèce vectrice mineure peut toutefois avoir une importance épidémiologique à l'échelle locale.

2.3.2.3. Cycle de vie des vecteurs

Caractéristiques générales :

Toutes les espèces de moustiques ont un cycle de vie similaire, avec une phase aquatique et une phase aérienne.

La phase aquatique correspond à la vie larvaire et nymphale : quatre stades larvaires se succèdent, suivis de la formation d'une nymphe mobile mais qui ne se nourrit pas. La métamorphose se produit dans la nymphe qui va donner l'adulte ailé, mâle ou femelle. Dans les conditions habituelles de développement aquatique, les adultes mâles émergent avant les adultes femelles, qui peuvent ainsi être fécondées dès leur émergence. De manière générale, les femelles ne s'accouplent qu'une seule fois dans leur vie[24] et maintiennent le sperme vivant dans une spermathèque.

Une des caractéristiques des moustiques adultes est que seules les femelles ont besoin d'un repas de sang pour assurer la production de leur descendance. Les mâles se nourrissent de jus sucrés (nectar en particulier). La prise d'un repas de sang par une femelle induit la vitellogénèse et la maturation des œufs, qui seront pondus dans un intervalle de 48 h à 72 h après la prise du repas de sang pour la majorité des espèces. La durée entre le repas de sang et la ponte correspond à un cycle gonotrophique. La durée du cycle gonotrophique peut s'étendre au-delà de 72 h si les femelles n'ont pas trouvé un site adéquat pour pondre. Certaines espèces d'anophèles peuvent également prendre plusieurs repas de sang au cours d'un seul cycle gonotrophique. Les œufs sont pondus sur support humide (cas d'*Aedes*) ou directement à la surface de l'eau (cas de *Culex* et *Anopheles*).

[23] http://invs.santepubliquefrance.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Maladies-a-transmission-vectorielle/Chikungunya/Donnees-epidemiologiques/France-metropolitaine/Chikungunya-dengue-et-zika-Donnees-de-la-surveillance-renforcee-en-France-metropolitaine-en-2016.

[24] Le degré de monogamie semble variable selon les espèces, celui-ci étant très élevé pour *Ae. aegypti*, chez laquelle les femelles semblent majoritairement réfractaires à une insémination secondaire [Bargielowski, I., Alphey, L., and Koella, J.C. (2011). Cost of mating and insemination capacity of a genetically modified mosquito *Aedes aegypti* OX513A compared to its wild type counterpart. PLoS One *6*.] – une fraction de polyandrie a toutefois été rapportée en conditions semi-contrôlées –, tandis que les femelles *Ae. albopictus* semblent tolérer un degré non négligeable d'inséminations multiples [Boyer, S., Toty, C., Jacquet, M., Lemperiere, G., and Fontenille, D. (2012). Evidence of multiple inseminations in the field in *Aedes albopictus*. PLoS One *7*.].

Caractéristiques spécifiques :

Les différentes espèces étudiées des trois grands genres de moustiques (*Aedes, Culex, Anopheles*) se distinguent par les caractéristiques spécifiques décrites ci-dessous, synthétisées dans le Tableau 1. Ces caractéristiques sont déterminantes dans le choix des méthodes de lutte les plus appropriées selon les espèces ciblées.

a) leur mode de reproduction

Tandis que les anophèles et *Cx. pipiens/quinquefasciatus* s'accouplent dans des essaims, *Ae. aegypti* et *Ae. albopictus* s'accouplent fréquemment à proximité de l'hôte vertébré que les femelles recherchent pour leur repas de sang (Delatte et al., 2009; Ponlawat and Harrington, 2005). Les essaims se forment en des sites bien particuliers que les moustiques reconnaissent par des marques visuelles (Butail et al., 2013). Les essaims sont en général constitués d'une seule espèce, mais des essaims de plusieurs espèces peuvent se juxtaposer. Ces essaims sont constitués par les mâles et attirent les femelles par la fréquence vibratoire de leurs ailes. Les femelles qui entrent dans un essaim sont immédiatement attrapées par un mâle. Le couple tombe au sol où a lieu la copulation.

b) leur mode de ponte

Ae. aegypti et *Ae. albopictus* pondent généralement les œufs d'un même lot (cycle gonotrophique) par petites quantités et distribuent ainsi leurs œufs dans différents gîtes (Reiter et al., 1995). Par contre, les *Culex* déposent en une seule fois les œufs assemblés en « radeau » à la surface d'un gîte. De manière similaire, les anophèles déposent individuellement l'ensemble des œufs d'un même cycle gonotrophique au sein d'un même gîte.

c) leur milieu reproductif

Ae. aegypti et *Cx. pipiens* sont des moustiques urbains alors que les anophèles sont des moustiques ruraux dans leur grande majorité. Une exception notable est *An. stephensi* qui colonise des gîtes urbains. Cependant, les changements environnementaux et possiblement climatiques ont permis à *An. gambiae* (vecteur majeur en Afrique) de coloniser progressivement les milieux péri-urbains des mégapoles africaines (Fossog et al., 2013).

Ae. albopictus était associé aux lisières des forêts dans sa distribution tropicale initiale. La forme invasive de l'espèce tend à être également urbaine ou semi-urbaine (Delatte et al., 2009; Ponlawat and Harrington, 2005).

Ces espèces vectrices se différencient également par les caractéristiques de leurs gîtes larvaires. Ainsi, *Ae. aegypti* va pondre préférentiellement dans des eaux claires associées à de petits réceptacles générés par l'activité humaine : coupelle de pots de fleurs, boîtes de conserve, pneus usagés. *Ae. albopictus* pond préférentiellement dans les creux d'arbre. En zone urbanisée, il adopte des gîtes similaires à *Ae. aegypti*, bien que moins liés à l'Homme et plus proches des espaces verts (F. Rodhain, Audition publique OPECST 2016).

Cx. pipiens utilise des gîtes très chargés en matières organiques, pouvant également être très pollués. Des exemples type sont les égouts, caniveaux et fosses septiques.

A la diversité des espèces d'anophèles vecteurs de paludisme est également associée une diversité de gîtes, mais le point commun est une eau claire, non chargée en matières organiques et une exposition au soleil. Les gîtes varient, de grandes étendues d'eau de profondeur variable (rizières) à de petites collections d'eau (ornières et empruntes de pneu ou d'animaux). *An. stephensi* en zone urbaine peut également coloniser les canivaux profonds partiellement couverts ou encore les abreuvoirs du bétail.

d) leur mode de survie et longévité

La survie des moustiques adultes dépend des conditions climatiques et de l'accès à des zones de repos ou d'hibernation (pendant les hivers froids en zone continentale tempérée (« *overwintering* ») ; en saison sèche en zone subtropicale). A température élevée, la survie sera meilleure si l'humidité est également élevée. En dehors de leur période d'activité (accouplement, recherche de repas sanguin et recherche de gîtes de ponte), les moustiques recherchent des zones de repos humides et fraîches par rapport à la température ambiante.

Les *Aedes* ont la capacité de survivre de longues périodes grâce à la résistance de leurs œufs à la dessication. *Ae. albopictus* a la particularité de survivre en saison froide, soit par l'entrée en diapause hivernale de ses œufs (Pluskota et al., 2016), soit par la tolérance des adultes de certaines populations au froid (Site ECDC). Les *Culex* ont la capacité de survivre à l'état adulte pendant la saison froide dans des aires de repos choisies (ex. : métro, égouts, etc.). Les anophèles européens peuvent passer la saison froide soit à l'état adulte dans des refuges (ex. : étables) soit à l'état larvaire dans des eaux profondes gelées en surface par exemple (ex. : *An. plumbeus*). Des données récentes indiquent qu'*An. gambiae* adulte peut survivre en saison sèche en zone sahélienne, mais les gîtes de repos n'ont pas été identifiés (Adamou et al., 2011; Lehmann et al., 2010; Yaro et al., 2012).

La durée de vie d'un adulte femelle varie donc en fonction de la température et de l'humidité, indépendamment de tout prédateur. Il est usuel de considérer la durée de vie d'un moustique femelle à environ 30 jours. Pour les femelles qui hibernent, elle peut atteindre plusieurs mois. Pendant cette période, elles peuvent reprendre un ou plusieurs repas de sang pour recharger leurs réserves, repas non accompagné(s) de ponte. Si elles sont porteuses de pathogènes, elles peuvent alors contaminer leur hôte [cas connu du paludisme d'hiver en Europe au XIX^{e} et XX^{e} siècles ; (Bruce-Chwatt and De Zulueta, 1980)].

On note qu'un système de thermorégulation permet aux adultes femelles de maintenir leur température suite à l'absorption du sang de l'hôte vertébré, par l'évacuation d'une goutte d'urine mélangée à du sang de l'hôte (sorte de transpiration), de façon plus ou moins importante et plus ou moins rapide selon les espèces de moustiques (Lahondère and Lazzari, 2012). Toute altération de ce mécanisme complexe pourrait altérer la survie du moustique.

e) leurs préférences trophiques et diversités comportementales

Ae. aegypti et *Ae. albopictus* sont deux moustiques très anthropophiles, qui piquent à l'extérieur (exophagie) et se reposent soit à l'intérieur des maisons (endophilie) soit à l'extérieur (exophilie) (Delatte et al., 2009; Ponlawat and Harrington, 2005). *Ae. aegypti* présente deux pics d'agressivité : à l'aube et 2 heures avant le coucher du soleil. *Ae. albopictus* pique plutôt le jour (Site ECDC).

Culex pipiens/quinquefasciatus est zoo-anthrophile avec une préférence trophique nette pour les oiseaux (volailles en particulier). Son pic d'agressivité est nocturne et son comportement est principalement exophage.

Les anophèles sont des moustiques qui piquent la nuit. Les vecteurs de paludisme humain sont soit strictement anthropophiles (ex : *An. gambiae*, *An. coluzzi*) soit zoo-anthropophiles (ex : *An. arabiensis, An. funestus*). Ils peuvent être endophages et/ou exophages, et se reposer à l'intérieur ou à l'extérieur des habitations (endophiles/exophiles). Chaque espèce est caractérisée par son/ses pics d'agressivité nocturne. Cependant, suite à l'utilisation massive, par la population, de moustiquaires imprégnées d'insecticide à effet répulsif pour se protéger des piqûres nocturnes, certaines espèces d'anophèles ont récemment modifié leur pic d'agressivité et piquent soit plus tôt en soirée, soit plus tard en matinée (Moiroux et al., 2012; Sougoufara et al., 2014).

f) leur période d'abondance, capacité de dispersion et d'adaptation à de nouveaux environnements

La présence de moustiques est totalement dépendante de la présence d'eau servant de gîtes larvaires. Elle dépend également des conditions climatiques pour que les moustiques puissent assurer leur cycle de vie. Ainsi, en zone tropicale humide, les moustiques peuvent être présents tout au long de l'année. Cependant, ils sont sensibles aux fortes pluies qui ont pour effet de lessiver les gîtes larvaires, qui vont réapparaître sous forme de zones d'eau résiduelle. Cette situation concerne essentiellement les anophèles. Pour les moustiques urbains ou semi-urbains, tels qu'*Ae. aegypti* et *Ae. albopictus*, qui colonisent les gîtes créés par l'Homme (coupelles, pots de fleurs, gouttières mal entretenues, pneus, boîtes de conserve), leur présence dépend principalement des conditions de température, qui doit être supérieure à 20°C.

La dispersion d'*Ae. aegypti* et d'*Ae. albopictus* se fait essentiellement de proche en proche, du fait de leur comportement d'oviposition par distribution des œufs dans différents gîtes larvaires, par dispersion active à partir d'un point d'entrée. La colonisation de nouvelles aires par ces deux espèces est le résultat d'une dispersion passive *via* l'activité de l'Homme. Ainsi, les adultes sont capables d'être véhiculés (voiture, bus, avion…), mais la voie de dispersion majeure se fait à l'état d'œuf ou de larve, avec notamment le commerce de pneus usagés, qui constituent un gîte de ponte idéal pour ces deux espèces. On a ainsi observé des déplacements d'*Ae. albopictus* sur de très grandes distances (Lounibos, 2002).

La dispersion de *Cx. pipiens/quinquefasciatus* peut suivre les mêmes voies ; cependant c'est un moustique qui semble plus à même d'exploiter les vents portants, avec une migration autour de quelques kilomètres par génération (Jacquet et al., 2016; Lenormand et al., 1998).

La spécificité des gîtes larvaires des anophèles fait que le risque de dispersion à ce stade est limité. Par contre, les adultes peuvent, comme ceux des autres espèces de moustiques, être transportés, les véhicules devenant des gîtes de repos. Le paludisme d'aéroport s'explique par cette capacité. Cependant, leur dépendance biologique à des conditions environnementales spécifiques, ainsi que l'existence de barrières naturelles (zone arides, chaînes de montagne) n'ont pas permis leur implantation dans de nouvelles aires géographiques, à l'exception de l'établissement d'*An. gambiae* (*arabiensis*) au Brésil dans la période des années 1930 (Parmakelis et al., 2008; Soper, 1943). D'autres exemples de dissémination passive d'anophèles par les moyens de transport et son rôle dans la transmission du paludisme ont été rapportés (Giacomini and Brumpt, 1989).

Il est enfin notable que, du fait de la proximité de leurs gîtes vis-à-vis de leurs ressources, les *Aedes* se déplacent moins que les *Anopheles*, qui peuvent vivre dans des gîtes beaucoup plus éloignés des habitations. Les femelles anophèles parcourent de grandes distances en quête de ressources en sang, puis reviennent pondre dans leurs gîtes larvaires. De fait, en matière de dispersion intrinsèque, les moustiques *Ae. albopictus* parcourent en général moins de 100 m par jour (Niebylski and Craig Jr, 1994), *Ae. aegypti* entre 10 et 100 m en moyenne sur toute une vie (Winskill et al., 2015), tandis que les moustiques *An. gambiae* parcourent entre 350 et 650 m par jour (Costantini et al., 1996).

Ainsi, les capacités variables de dispersion des moustiques combinées aux changements climatiques sont susceptibles d'entraîner des déplacements de populations de moustiques plus ou moins importants selon leur dépendance biologique à des conditions environnementales spécifiques et leurs capacités d'adaptation à de nouveaux environnements.

Tableau 1. Caractéristiques bio-écologiques des espèces de moustiques reconnues comme vecteurs majeurs de pathogènes dans les territoires français.

	Aedes aegypti	***Aedes albopictus***	***Culex pipiens* spp.**	***Anopheles* spp.**
Nombre d'espèces	1 espèce	1 espèce	complexe d'espèces	des dizaines d'espèces vectrices parmi des centaines d'espèces
Possibilité d'interfertilité	fertile avec aucune autre espèce	fertile avec aucune autre espèce	*Cx. p. pipiens* et *Cx. quinquefasciatus* sont interfertiles.	interfertilité possible mais rare au sein de complexes d'espèces
Agents pathogènes vectorisés	YFV, DENV, CHIKV, ZIKV…	DENV, CHIKV, (YFV) (ZIKV ?)...	WNV, filaires…	*Plasmodium*, filaires
Aire d'origine et distribution géographique	origine africaine, répandu dans les régions tropicales et subtropicales	origine asiatique, répandu dans les régions tropicales, subtropicales et tempérées	*Cx. p. pipiens* : zones tempérées *Cx. quinquefasciatus* : origine Am. du nord, zones tropicales et suptropicales	Différentes espèces d'anophèles vecteurs selon les régions du monde, mais globalement très répandu
Accouplement	à proximité des hôtes	à proximité des hôtes	dans des essaims	dans des essaims
Ponte des œufs	un à un sur substrats humides inondables	un à un sur substrats humides inondables	en radeau à la surface de l'eau	en masse à la surface de l'eau
Gîtes larvaires	petits gîtes larvaires artificiels	petits gîtes larvaires naturels ; artificiels en zone urbaine	gîtes artificiels, de taille variable	Gîtes en majorité naturels, de taille variable
Qualité de l'eau	eau claire	eau claire	eau polluée, riche en substances organiques	eau claire, transparente (lumière)
Lieu de vie	domestique, urbain	péri-domestique, forme invasive urbaine ou semi-urbaine	domestique, urbains et ruraux	péri-domestique ruraux en majorité, cas péri-urbains
Gîtes de repos	plutôt endophile	exophile à tendance endophile	endophile ou exophile	endophile ou exophile
Préférences trophiques	très anthropophile	anthropophile en zone urbaine mais opportuniste	zoo-anthropophile (plutôt ornithophile)	anthropophiles ou zoo-anthropophiles
Lieux d'agressivité	exophage	exophage	principalement exophage	endophage et/ou exophage
Pics d'agressivité	crépuscule et aube	journée	nocturne	différents pics nocturnes, adaptables
Survie en saison sèche	supporte une dessication des œufs	supporte une dessication des œufs	non	généralement non mais cas possibles
Survie en saison froide	non	diapause hivernale des œufs (survie à l'état adulte dans certaines populations)	survie à l'état adulte	survie possible des anophèles européens à l'état adulte ou larvaire
Dispersion	active : invasif de proche en proche passive : transports, pneus…	active : invasif de proche en proche passive : transports, pneus…	active : faible passive : transports, vents portants…	limitée malgré des déplacements importants entre gîtes et ressources

2.3.2.4. Eléments d'écologie fonctionnelle

Dans l'anticipation d'une évaluation des risques pour l'environnement associés à une lutte antivectorielle dirigée contre une population de moustiques donnée, il est nécessaire d'avoir une bonne compréhension du rôle des moustiques ciblés dans les écosystèmes concernés par la lutte.

Parmi les plus de 3500 espèces de moustiques connues, certaines jouent un rôle important dans les écosystèmes. Par exemple, dans la toundra arctique[25], les moustiques peuvent être très nombreux et constituer la base de l'alimentation de certains oiseaux pendant leur migration. Ils peuvent également influencer les déplacements des caribous, dont les routes migratoires tendent à éviter les essaims (Culler et al., 2015). Dans la même région, certaines espèces du genre *Aedes* peuvent établir des associations spécifiques comme pollinisateurs d'orchidées (Gorham, 1976).

Cependant, pour la plupart des espèces, y compris les vecteurs majeurs de maladies, il est difficile d'établir *a priori* le rôle exact des moustiques dans les réseaux trophiques en l'absence d'études spécifiques.

De manière générale, on sait que les larves aquatiques filtrent des microorganismes de l'eau et qu'elles sont les proies de nombreux prédateurs, comme des poissons et des larves de libellules et d'autres insectes aquatiques (Culler and Lamp, 2009). Or, les larves de moustiques se développent dans des environnements aquatiques très divers, qui peuvent aller de petites poches temporaires dans la terre, des feuilles ou des éléments anthropiques, jusqu'à des corps d'eau permanents. Ces environnements et la communauté biotique associée à chacun varient grandement, impliquant que les rapports trophiques qui s'établissent avec les moustiques sont dépendants du contexte. Par exemple, la compétition entre espèces ainsi que la prédation varient selon un gradient de taille et de durée de l'habitat, devenant plus complexes dans les corps d'eau permanents et de grande étendue (Juliano, 2009).

Les moustiques adultes sont susceptibles de contribuer à la pollinisation des plantes du fait qu'ils se nourrissent du nectar des fleurs, et ils peuvent être les proies d'araignées, de batraciens, d'oiseaux et de chauves-souris (Medlock and Snow, 2008). Pour la plupart, ces prédateurs sont généralistes et ne dépendent pas exclusivement des moustiques pour leur subsistance, mais des associations spécifiques pourraient avoir lieu. Ainsi, en Afrique de l'Est, autour du Lac Victoria, il existe une espèce d'araignée, *Evarcha culicivora*, qui, au cours de son histoire évolutive, a développé une préférence pour les femelles d'*Anopheles* gorgées de sang (Nelson and Jackson, 2006).

Concernant les espèces vectrices, une évaluation au cas par cas et région par région, selon l'objectif de lutte antivectorielle, serait nécessaire pour appréhender l'impact écologique associé à une stratégie d'élimination d'une population de moustiques.

Les espèces vectrices adaptées à l'environnement urbain, comme *Ae. aegypti* et dans une moindre mesure *Ae. albopictus,* se développent dans des accumulations temporaires de petits volumes d'eau, où les interactions avec d'autres organismes, comme des espèces compétitrices ou prédateurs aquatiques, peuvent s'avérer rares. De même, on pourrait s'attendre à ce que les espèces invasives, comme *Ae. albopictus* et *Ae. aegypti*, en dehors de leur aire native de distribution, aient des relations moins profondes dans les réseaux trophiques que les espèces autochtones du fait d'une intégration plus récente dans les écosystèmes envahis. Les espèces autochtones, en revanche, entretiendraient des relations inter-spécifiques plus anciennes et complexes, comme c'est le cas de l'exemple des araignées ayant développé une préférence pour les *Anopheles* (Nelson and Jackson, 2006).

[25] Les moustiques de la toundra arctique ont une écologie très particulière, ce qui explique l'intérêt des chercheurs et le grand nombre de publications les concernant.

2.3.3. Caractéristiques associées aux agents pathogènes

On peut distinguer trois classes d'agents pathogènes, les arbovirus, les *Plasmodium* et les filaires, en matière de mode de développement dans le vecteur et de capacité à la transmission verticale. La transmission verticale permet au pathogène d'être directement transmis à la descendance d'une femelle moustique infectée. Le moustique vecteur peut alors constituer un réservoir naturel pour le pathogène, ce qui peut être épidémiologiquement important durant les périodes défavorables à sa transmission à un hôte vertébré.

Ces agents pathogènes possèdent comme points communs d'être ingérés à l'occasion d'une piqûre sur un hôte infecté présentant le pathogène en quantité suffisante dans le sang, et d'être *in fine* inoculés à un nouvel hôte à l'occasion d'une nouvelle piqûre du moustique en recherche d'un repas sanguin. Ils se distinguent dans les modalités des étapes intermédiaires de développement dans le moustique :

- les phases intra-moustique des arbovirus et des *Plasmodium* sont similaires dans le sens où ces pathogènes rencontrent les mêmes barrières physiques (épithélium intestinal et glandes salivaires) et passent par des étapes d'amplification. En plus de ces étapes d'amplification, les *Plasmodium* se distinguent des arbovirus par un cycle biologique complexe, diverses transformations du parasite et plusieurs stades successifs de développement, incluant une reproduction sexuée. Dans le cas des arbovirus, le moustique reste infecté toute sa vie et la transmission verticale (trans-ovarienne) est possible, mais détectée à très faible fréquence. Dans le cas des *Plasmodium*, le vecteur reste généralement infecté toute sa vie, mais la transmission verticale n'existe pas du fait de la complexité et des contraintes du développement biologique du parasite chez le moustique ;
- la situation est différente pour les filaires, qui ne passent pas par une phase d'amplification au sein du moustique mais par une phase d'invasion des muscles thoraciques et de mues avant d'être réinoculées par migration active le long des pièces buccales de l'insecte. Les filaires ne passent pas par une phase d'envahissement préalable des glandes salivaires. Il est fréquent que le vecteur redevienne sain après une infection par des filaires. Il n'y a jamais de transmission verticale.

Il est également notable que les différents agents pathogènes infectant les moustiques diffèrent par leur vitesse de développement. Ainsi, DENV atteint les glandes salivaires des moustiques (*Ae. aegypti* et *Ae. albopictus*) en 14 jours alors que CHIKV ne nécessite que 3 à 7 jours (Vazeille et al., 2013). Par ailleurs, les *Plasmodium* passent par des étapes de différentiation et nécessitent 7 à 14 jours avant que les sporozoïtes n'atteignent les glandes salivaires. Cependant, ces vitesses de développement sont dépendantes de facteurs intrinsèques liés aux moustiques et extrinsèques dépendant principalement de la température. Ainsi, à température élevée, les sporozoïtes de *P. falciparum* peuvent atteindre les glandes salivaires du moustique en 7 jours (Bourgouin et Boudin, observations personnelles). Les niveaux d'infectiosité et de développement d'un virus comme DENV peuvent également varier entre deux espèces de vecteur, comme *Ae. aegypti* et *Ae. albopictus*, ou deux populations d'une même espèce de vecteur.

2.3.4. Autres facteurs à prendre en compte

- Polymorphisme génétique des différentes composantes du système vectoriel

Comme mentionné plus haut, il est important de prendre en considération la diversité génétique des populations d'insectes vecteurs ciblés par une action de lutte antivectorielle. Cette diversité peut être intra-populationelle comme intra-espèce. La mise en évidence, en particulier chez les anophèles, d'espèces jumelles ou cryptiques[26] présentant des caractéristiques bio-écologiques et adaptatives

[26] Espèces qui ne se distinguent pas sur la base de critères morphologiques.

différentes peuvent impacter les résultats escomptés de techniques de lutte. Le polymorphisme génétique concerne aussi les agents pathogènes et les hôtes vertébrés, dont les hommes.

- Existence de réservoirs

L'existence de réservoirs de pathogènes et leur distribution doivent être prises en compte, notamment dans les situations de faible transmission ou de réémergence.

- Facteurs multiples influençant l'infection du vecteur

Selon les systèmes vectoriels, le risque de transmission d'un hôte à l'autre dépendra de l'accessibilité du pathogène pour le vecteur au niveau des capillaires sanguins, siège de la piqûre, et de sa concentration :

Dans le cas des arbovirus, la transmission ne pourra se faire que lorsque l'hôte porteur du virus est en phase virémique (présence du virus dans le sang). Cette phase peut être éphémère et de durée variable d'une espèce virale à l'autre. Les titres de virémie (concentration du virus dans le sang) peuvent également varier selon les hôtes, qui peuvent être plus ou moins efficaces pour l'amplification d'un virus donné. Ainsi, parmi les hôtes du virus du *West Nile*, l'oiseau est un amplificateur efficace tandis que l'Homme et le cheval constituent des culs-de-sac pour la transmission du virus (Gray and Webb, 2014). De leur côté, selon leur réceptivité pour un virus donné, les vecteurs ont la capacité de s'infecter à des titres de virémie variables. Enfin, on note que la phase virémique n'est pas nécessairement associée à des symptômes chez l'hôte. Des données récentes ont mis en évidence que des individus asymptomatiques pouvaient transmettre le virus de la dengue (Duong et al., 2015), ce qui pose des problèmes de surveillance épidémiologique.

Pour la transmission du paludisme, le prérequis est que l'hôte soit porteur de gamétocytes, dont la présence peut être détectée pendant plusieurs semaines après un accès palustre. Grâce aux technologies de biologie moléculaire, le portage de gamétocytes par les porteurs asymptomatiques est aujourd'hui très étudié de même que le rôle de ces porteurs asymptomatiques dans le maintien de la transmission de *Plasmodium*, en particulier dans les pays en phase de pré-élimination du paludisme.

La situation des filaires est également particulière. Selon les espèces et leur vecteur, certaines filaires ne sont présentes dans les capillaires sanguins qu'à certaines heures de la journée, correspondant aux heures de piqûre des moustiques vecteurs.

- Influence de l'environnement

L'efficacité d'un système vectoriel, et donc de la transmission d'un agent infectieux par un vecteur dans un environnement donné, sera notamment fonction de leurs interactions et des conditions biotiques (diversité d'hôtes, habitats larvaires…) et abiotiques (conditions météorologiques, climat…) de l'environnement dans lequel ils s'inscrivent.

- Système en évolution

Ces systèmes vectoriels sont en perpétuelle évolution sous la pression de modifications d'origine naturelle et/ou humaine. Face à la complexité des systèmes vectoriels, leur connaissance et leur compréhension sont nécessaires à la définition de mesures pertinentes de gestion du risque, parmi lesquelles la lutte antivectorielle.

Ainsi, la grande complexité et la diversité des systèmes vectoriels en jeu soulignent la nécessité d'adapter les stratégies de lutte au cas par cas des espèces de moustiques considérées, des agents pathogènes visés, ainsi que des caractéristiques de la population humaine à protéger, en prenant en compte l'environnement dans lequel ces trois composantes évoluent, incluant notamment le milieu et l'habitat concernés, le climat et la période de l'année.

3. Utilisation de moustiques génétiquement modifiés dans le cadre de la lutte antivectorielle

Ce chapitre vise à présenter l'utilisation de moustiques GM dans le cadre de la lutte antivectorielle à travers le potentiel de différentes techniques de modification génétique des moustiques et des exemples précis d'application de ces techniques. Les spécificités de ces techniques par rapport aux autres méthodes de lutte antivectorielle seront mises en évidence dans le chapitre suivant.

3.1. Modification génétique des moustiques et potentiel en lutte antivectorielle

Au-delà de son intérêt en recherche fondamentale, pour une meilleure compréhension de la biologie du moustique vecteur et de ses interactions avec hôtes et pathogènes, la modification génétique des moustiques peut être mise à profit dans le cadre de la lutte antivectorielle. Le développement, chez les moustiques, des techniques de transgenèse d'une part, et des techniques exploitant les nucléases dirigées d'autre part, permet d'envisager aujourd'hui deux grands types de stratégies de lutte antivectorielle : la réduction de la densité des populations de moustiques vecteurs, et la réduction de la compétence de ces moustiques pour transmettre les agents pathogènes.

3.1.1. Développement de la transgenèse chez les moustiques et potentiel en lutte antivectorielle

3.1.1.1. Transgenèse par insertion de transposon

L'application de la transgenèse aux moustiques, comme aux autres insectes, a initialement été permise par l'exploitation des propriétés naturelles des transposons. Les transposons sont des éléments génétiques mobiles qui possèdent la capacité naturelle de s'exciser, se transposer et se réintégrer dans le génome par l'activité d'une enzyme unique, la transposase (O'Brochta et al., 2014b). L'insertion d'un transgène d'intérêt au sein d'un transposon lui confère donc une capacité d'intégration au sein d'un génome (O'Brochta et al., 2014a). Un individu transgénique peut alors être produit par introduction, dans les lignées germinales de l'insecte, d'un plasmide portant un transposon incluant le transgène d'intérêt. Ceci peut se faire par microinjection d'embryon. Pour assurer la stabilité du transgène une fois inséré, des systèmes binaires ont été développés par lesquels la transposase peut être fournie de manière transitoire à partir d'un plasmide auxiliaire (Rubin and Spradling, 1982). Seuls le transgène d'intérêt – éventuellement associé à des gènes rapporteurs –, inséré à la place de la transposase, et les autres éléments structurels du transposon, sont alors intégrés dans le génome cible.

Plusieurs améliorations ont été apportées à ce système de base, comme la possibilité d'associer les transgènes d'intérêt à des promoteurs caractérisés pour leur activité spécifique à un stade de développement, à des tissus particuliers, ou à un sexe seulement (Hammond and Nolan, 2014). Une autre avancée technique, adaptée de travaux précurseurs accomplis chez la drosophile (Bischof et al., 2007), a été mise en place chez différentes espèces de moustiques pour cibler l'insertion du transposon dans un site d'atterrissage prédéterminé[27] (Labbé et al., 2010; Meredith et al., 2011; Meredith et al., 2013; Nimmo et al., 2006; Pondeville et al., 2014; Volohonsky et al., 2015).

3.1.1.2. Espèces de moustiques transformées avec succès

Toutes les espèces de moustiques ne sont pas équivalentes en termes de transformabilité. Concernant les espèces vectrices, *Ae. aegypti* est la première espèce de moustique à avoir été

[27] Le site d'atterrissage lui-même n'est toutefois pas sciemment ciblé au sein du génome ; il est sélectionné parmi différents sites d'atterrissage créés de manière aléatoire par l'insertion d'un transposon dans l'une de ses séquences cibles, présentes à une fréquence élevée dans le génome.

transformée génétiquement (Jasinskiene et al., 1998) et est réputée la plus facilement transformable. Des moustiques transgéniques de l'espèce *Ae. albopictus* ont été obtenus plus récemment, suite aux premiers impacts de l'espèce en santé publique (Labbé et al., 2010). *An. stephensi*, vecteur du paludisme en Inde, a été transformé avec succès pour la première fois en l'an 2000 (Catteruccia et al., 2000) et est aussi assez facilement transformable. *An. gambiae* est réputé le plus délicat à transformer : la première lignée transgénique a été obtenue en 2001 (Grossman et al., 2001). Une dizaine de laboratoires dans le monde maîtrise actuellement la transgenèse chez cette espèce. Une autre espèce d'anophèle, vecteur de *Plasmodium* (*Anopheles albminanus*), a également été transformée (Perera et al., 2002) ; en revanche, *Cx. pipiens* et *Cx. quinquefasciatus* semblent difficilement transformables, une seule équipe ayant rapporté la transformation génétique de *Cx. quinquefasciatus* (Allen and Christensen, 2004; Allen et al., 2001). Des facteurs limitants demeurent pour certaines espèces dont les embryons se prêtent difficilement à la microinjection ou qui s'adaptent mal aux conditions d'élevage et de manipulation en laboratoire.

3.1.1.3. Applications possibles en lutte antivectorielle

- *La transgenèse « simple »[28] peut-elle permettre de réduire la compétence vectorielle d'une population de moustiques sauvages ?*

Plusieurs souches de moustiques transgéniques résistantes à la transmission d'un pathogène ont été développées avec succès en laboratoire (Isaacs et al., 2012; Jupatanakul et al., 2017; Yamamoto et al., 2016). Cependant, toute stratégie visant à interférer avec la compétence vectorielle d'une population de moustiques vecteurs doit intégrer un mécanisme efficace de propagation de la modification dans la population sauvage. En l'absence d'un tel mécanisme, la fréquence du transgène dans la population ne serait que proportionnelle au(x) lâcher(s) de moustiques transgéniques effectué(s), et en l'absence de pression de sélection, le transgène serait amené à se diluer dans la population, voire à disparaître, par dérive génétique ou par contre-sélection s'il confère un désavantage sélectif aux moustiques qui le portent. En l'absence de mécanisme de propagation de la modification dans la population, cette stratégie n'est donc pas une option envisageable parmi les applications de la transgenèse « simple » du moustique.

- *La transgenèse « simple » peut-elle permettre de réduire la densité d'une population de moustiques sauvages ?*

Un transgène conférant une capacité stérilisante aux moustiques qui le portent peut être exploité en lutte antivectorielle dans une stratégie visant à réduire la densité de la population de moustiques sauvages par des lâchers inondatifs et récurrents de moustiques stérilisants. Plusieurs conditions doivent être remplies : outre le fait que les moustiques transgéniques doivent être sexuellement compatibles avec la population cible et compétitifs pour l'accouplement avec les moustiques sauvages, la stérilité génétique doit être conditionnelle, empêchant le développement de la descendance des moustiques transgéniques dans les conditions de terrain, tout en permettant la multiplication des moustiques dans l'élevage. Seul un exemple de cette stratégie a été développé à ce jour : il s'agit de la technique RIDL d'Oxitec appliquée à *Ae. aegypti*, présentée plus bas en Exemple 1 (section 3.2.).

- *La transgenèse « simple » peut-elle contribuer à la mise en œuvre d'autres techniques de lutte ?*

Comme expliqué plus loin, le sexage, ou séparation des individus selon leur sexe, constitue un verrou technologique de plusieurs techniques de lutte antivectorielle nécessitant un lâcher exclusif de mâles. Le développement de souches transgéniques facilitant le sexage serait un atout pour contribuer au succès de nombreuses techniques de lutte. Un exemple de développement d'une souche transgénique de sexage a été récemment publié pour la lucilie bouchère (Concha et al.,

[28] La terminologie de transgenèse « simple » recouvre la transgenèse qui résulte en une modification génétique non dotée de capacité de forçage génétique. Le forçage génétique est abordé en 3.2.2.3.

2016). Chez les moustiques, l'expression du gène *M* (*maleness*), récemment découvert chez les *Aedes* et *Anopheles*, pourrait être modulée par des promoteurs dépendants de la température en vue de créer de telles souches de sexage (Adelman and Tu, 2016; Hall et al., 2015; Krzywinska et al., 2016).

3.1.2. Utilisation de nucléases dirigées chez les moustiques et potentiel en lutte antivectorielle

L'étude des mécanismes de réparation de l'ADN a suggéré que, s'il était possible de provoquer une cassure du double brin de l'ADN à un site précis, l'activation des mécanismes endogènes de réparation pourrait permettre d'effectuer des modifications ciblées dans le génome. Deux types de nucléases dirigées, ou outils de coupure ciblée de l'ADN, ont vu le jour depuis les années 1990s : le premier type, représenté par les protéines à doigt de zinc (ZFN, *Zinc Finger Nucleases*) et les TALEN (*Transcriptor Activator Like Effector Nuclease*), repose sur de l'ingénierie protéique, le site de coupure étant déterminé par des protéines synthétiques de liaison spécifique ; le second, plus récent, repose sur de l'ingénierie nucléique, le site de coupure étant déterminé par une simple molécule d'ARN ; il est représenté par le système CRISPR-Cas9 et ses variations.

Bien que cet avis se focalise sur le système CRISPR-Cas9, les autres types de nucléases dirigées peuvent également être utilisés pour les mêmes applications, y compris de forçage génétique, avec une phase de développement toutefois plus longue et plus complexe. D'autres nucléases dirigées pourront également voir le jour à l'avenir.

3.1.2.1. CRISPR-Cas9 comme nouvel outil de modification génétique

Le système CRISPR-Cas9 est un système enzymatique découvert chez des procaryotes où il constitue un mécanisme d'immunité adaptative. L'intégration dans les génomes procaryotes de courtes séquences d'ADN provenant d'agents infectieux (ex. : bactériophages) leur permet de mémoriser les infections passées. En cas de nouvelle infection, l'agent infectieux récidiviste est éliminé par reconnaissance nucléique et coupure par l'endonucléase associée, Cas9 (Jinek et al., 2012). Récemment adapté comme outil de biologie moléculaire, ce système, facilement programmable, permet d'effectuer des modifications ciblées par coupure de l'endonucléase Cas9 dans un site précis du génome, défini par une molécule d'ARN construite à cette fin, appelée « ARN guide » (abrégé gRNA) (Jinek et al., 2012; Mali et al., 2013).

Dans ce site précis défini par l'ARN guide, le système CRISPR-Cas9 permet de générer des mutations ponctuelles, dirigées ou aléatoires, ou d'insérer des fragments d'ADN, incluant des transgènes. Suite à la coupure ciblée de l'ADN par Cas9, l'ADN peut être réparé de deux façons selon les mécanismes de réparation de l'ADN mis en œuvre par la cellule : une réparation par religation imprécise (*Non-Homologous End-Joining* ou NHEJ) pourra induire une mutation ponctuelle aléatoire, tandis qu'une réparation par recombinaison homologue avec une séquence présentant une forte similarité avec les séquences flanquant le site coupé résultera, selon la séquence homologue disponible et utilisée par la cellule, en une mutation dirigée ou une insertion d'ADN (Komor et al., 2017). La séquence homologue peut provenir de l'autre chromosome de la paire comme d'une matrice d'ADN exogène (Taning et al., 2017). Les travaux réalisés chez les moustiques montrent que la coupure du double brin de l'ADN y est le plus souvent réparée par recombinaison homologue (Gantz and Bier, 2015; Gantz et al., 2015; Hammond et al., 2016)[29], mais la variabilité observée suggère de déterminer le taux de religation imprécise pour chaque nouveau locus considéré.

[29] En fonction du locus testé, le taux de NHEJ varie de 1,2 à 15 % chez les mâles, et de 1,2 à 21 % chez les femelles (Hammond et al., 2016 ; Gantz et al., 2015). Ces deux publications se sont intéressées à 4 loci. Le taux de NHEJ sera à déterminer pour chaque nouveau locus considéré.

3.1.2.2. Potentiel du système CRISPR-Cas9 en lutte antivectorielle

Par rapport à la transgenèse par insertion de transposon, le système CRISPR-Cas9 permet :

- de s'affranchir de l'utilisation de séquences dérivées de transposons pour générer des moustiques transgéniques,
- de cibler les transgènes dans un locus précis du génome,
- de générer des mutations ciblées sans nécessairement insérer ou conserver des éléments transgéniques dans le génome (notamment envisageable pour une souche de sexage),

mais l'intérêt majeur de l'utilisation du système CRISPR-Cas9 dans la lutte antivectorielle réside dans la possibilité de créer un forçage génétique, permettant de propager une modification génétique au sein d'une population naturelle.

Toute application du système CRISPR-Cas9 ne mettant pas en œuvre cette possibilité de forçage génétique se heurtera aux mêmes limites que la transgenèse « simple » en termes d'utilisation en lutte antivectorielle, liées à l'absence de mécanisme de propagation de la modification dans la population.

3.1.2.3. Le forçage génétique et ses applications en lutte antivectorielle

Le forçage génétique, traduit de l'anglais « *gene drive* », consiste à augmenter l'héritabilité d'un élément génétique par rapport à l'héritabilité naturelle décrite par les lois de Mendel[30], conduisant de ce fait à l'accroissement de la fréquence de cet élément génétique dans la population, et ce, même s'il est associé à un certain coût génétique (Esvelt et al., 2014). Le forçage génétique est un phénomène qui existe dans la nature. Les éléments génétiques naturellement dotés de cette propriété sont dits « égoïstes »[31], ou d'héritabilité « super-mendélienne » (Burt, 2003; Hastings, 1994). Il est question ici d'exploiter le phénomène naturel ou d'en reconstituer le mécanisme pour propager des transgènes ou inactiver des gènes existants dans une population naturelle.

Depuis sa conceptualisation (Curtis, 1968), l'application du forçage génétique à la lutte antivectorielle a suscité de nombreuses recherches, notamment à travers l'utilisation de ces éléments génétiques naturellement dotés d'héritabilité super-mendélienne (Hastings, 1994), avec l'exemple particulier des *homing endonucleases* (Burt, 2003). L'utilisation pratique de ces dernières a permis de réaliser le premier forçage génétique de synthèse au sein d'une population de moustiques préalablement modifiés pour contenir la cible de l'endonucléase utilisée (Windbichler et al., 2011). L'adaptation de la spécificité de ces endonucléases à une séquence donnée présente dans une population naturelle est toutefois une entreprise laborieuse et chronophage.

Le système CRISPR-Cas9, par sa simplicité de programmation de spécificité, et la flexibilité de ses composantes fonctionnelles, offre de nouvelles options pour générer un forçage génétique dans une population naturelle. Les modalités d'utilisation de CRISPR-Cas9 à des fins de forçage génétique sont très spécifiques : pour générer un forçage génétique, à la différence d'une utilisation classique[32], les

[30] Selon les lois de Mendel, chez une espèce diploïde, un gène porté sur un seul chromosome (plus précisément un autosome, chromosome non sexuel) est transmis à la moitié de la descendance.

[31] La terminologie des « éléments génétiques égoïstes » reflète le fait que ces éléments (gène, fragment de gène, chromosomes ou lots de chromosomes) sont capables de se propager malgré le coût qu'ils peuvent infliger aux organismes. Elle n'a rien à voir avec l'utilisation du terme par Dawkins en 1976 dans son livre « *Selfish gene* », qui se voulait souligner la centralité du gène dans l'évolution, et qui se référait ainsi à tous les gènes. La terminologie ne se veut pas non plus associée à un quelconque jugement moral sur les éléments génétiques en question [Burt, A., and Trivers, R. (2006). Genes in conflict (Harvard University Press).].

[32] Pour générer une modification génétique sans forçage, il n'est pas nécessaire d'insérer les gènes codant l'endonucléase Cas9 et son ARN guide dans le génome : en pratique, ils peuvent être exprimés transitoirement, être apportés sous forme d'ARN, Cas9 peut être également apportée sous forme de protéine purifiée [Komor, A.C., Badran, A.H., and Liu, D.R. (2017). CRISPR-based technologies for the manipulation of eukaryotic genomes. Cell *168*, 20-36.]. S'ils sont insérés (éventuellement transitoirement avant d'être éliminés par ségrégation), dès lors qu'ils s'expriment, leur localisation importe peu au succès de leur utilisation, et ils ne nécessitent pas d'être insérés ensemble dans un même locus.

gènes codant Cas9 et son ARN guide ainsi que d'éventuels transgènes d'intérêt, comme des gènes effecteurs que l'on souhaite propager dans la population, doivent être très précisément insérés ensemble, au sein même du locus reconnu par l'ARN guide (l'insertion faisant disparaître cette cible) (Esvelt et al., 2014). En présence du chromosome transgénique, le chromosome homologue initialement non modifié sera coupé par Cas9 au locus cible, et se réparera par recombinaison homologue en recopiant la cassette Cas9-gRNA. Ceci se produira à chaque fécondation issue d'un accouplement entre un insecte sauvage et un insecte transgénique ; les chromosomes sauvages seront donc progressivement convertis en chromosomes transgéniques. Si ce mécanisme s'effectue efficacement dans les cellules germinales, en amont de la formation des gamètes, c'est l'ensemble de la descendance de l'individu qui héritera du transgène (Esvelt et al., 2014).

L'article apportant la preuve de concept du forçage génétique par l'utilisation de CRISPR-Cas9 chez la drosophile (Gantz and Bier, 2015) a mis en évidence le potentiel invasif de ce type de construction artificielle. Sur ce principe, plusieurs types d'intervention de lutte antivectorielle par forçage génétique sont envisageables, avec deux objectifs distincts :

1. un forçage génétique visant à éliminer une population de vecteurs. Deux stratégies sont actuellement considérées à cette fin, par le biais, respectivement :
    - de manipulation du sex ratio dans la population de moustiques cibles. Un exemple en cours de développement de cette stratégie a été rapporté par l'utilisation non pas de CRISPR-Cas9 mais d'un variant synthétique d'une *homing endonuclease* (Galizi et al., 2014) ;
    - de propagation d'une modification génétique inactivant un gène essentiel du moustique. Cette stratégie est actuellement testée par l'inactivation d'un gène de fertilité femelle (Hammond et al., 2016) ; elle est décrite en Exemple 2 ci-dessous (section 3.3.) ;
2. un forçage génétique visant à réduire la compétence vectorielle d'une population de vecteurs, c'est-à-dire visant à modifier la population dans le but de la rendre résistante à la transmission d'un pathogène. Ceci peut s'envisager par deux voies différentes :
    - soit par la propagation d'une modification génétique qui inactiverait un gène de l'insecte essentiel à sa compétence vectorielle, par exemple un gène de l'insecte essentiel au développement et/ou à la transmission du pathogène. Le facteur limitant, dans ce cas, est d'identifier un tel gène dont l'inactivation n'handicapera pas fortement l'insecte. Des essais sont en cours pour évaluer ce principe sur l'inactivation d'un récepteur des sporozoïtes de *Plasmodium* sur les glandes salivaires d'*An. gambiae* (Eric Marois, comm. pers.) ;
    - soit par la propagation d'un transgène effecteur conférant une résistance à la transmission du pathogène, ce qui peut se concevoir par deux modes d'action différents :
        - soit en interférant avec la compétence vectorielle des moustiques,
        - soit en s'attaquant directement au pathogène. Cette dernière stratégie, actuellement testée chez *An. stephensi* contre *Plasmodium* (Gantz et al., 2015), est décrite en Exemple 3 ci-dessous (section 3.4.).

Les exemples spécifiques d'application de chacune de ces techniques de modification génétique discutés dans l'avis sont présentés dans les sections suivantes.

3.2. Exemple 1 : Technique RIDL d'Oxitec

La technique RIDL d'Oxitec est la seule technique utilisant des OGM développée aujourd'hui à un niveau opérationnel en lutte antivectorielle. C'est un exemple d'application de la transgenèse « simple » des moustiques à la lutte antivectorielle.

3.2.1. Principe

Le principe utilisé par la technique RIDL d'Oxitec n'est fondamentalement pas nouveau. Il s'agit d'une déclinaison du principe de la technique de l'insecte stérile (TIS), développé et mis en œuvre depuis plusieurs décennies sur d'autres insectes que les moustiques.

Le principe fondamental de la TIS et des techniques dérivées consiste en des lâchers inondatifs et récurrents de mâles stériles ou stérilisants, qui entrent en compétition avec les mâles sauvages pour s'accoupler avec les femelles sauvages, conduisant à une réduction de la population cible, voire à une élimination de cette population lorsqu'elle est isolée.

Seuls les mâles sont relâchés car un lâcher de femelles risquerait (1) d'accroître la transmission de pathogènes[33] et (2) de diminuer l'efficacité de l'intervention en détournant certains mâles stériles de l'accouplement avec les femelles sauvages ciblées.

L'application classique de la TIS met en œuvre des mâles stérilisés par irradiation. Employée avec succès sur d'autres insectes dès les années 1950s (Enkerlin et al., 2015; Vargas-Teran et al., 2005; Vreysen et al., 2000; Wyss, 2006), son application est toujours en développement chez les moustiques (voir 4.2.1).

Les développements initiaux de la TIS classique chez les moustiques se sont heurtés à des difficultés spécifiques de mise en œuvre opérationnelle de l'irradiation et/ou d'impacts négatifs présumés associés à l'irradiation, ce qui a incité à la recherche de méthodes alternatives de stérilisation (Phuc et al., 2007). La technique RIDL (« *Release of Insects carrying a Dominant Lethal* », ou « lâcher d'insectes porteurs d'un caractère de létalité dominante »), a été conçue pour induire, par modification génétique, une létalité dominante et répressible.

Le caractère de létalité dominante, également associé aux mutations aléatoires stérilisantes induites par irradiation chez les moustiques TIS classiques, permet d'empêcher le développement de la descendance hybride des moustiques relâchés, qu'ils soient transgéniques ou irradiés, avec des moustiques sauvages. En revanche, contrairement aux mutations induites par irradiation chez les moustiques TIS classiques, la modification génétique des moustiques transgéniques ne peut être générée juste avant leur lâcher, ce qui pose le problème du développement et de la maintenance en élevage de moustiques porteurs d'un tel caractère de létalité. Dans ce cas, c'est la répressibilité du caractère transgénique de létalité en présence d'un antidote qui permet le développement normal des moustiques transgéniques, pour la production destinée à l'élevage autant que celle destinée aux lâchers.

3.2.2. Etat des lieux de la recherche et des techniques de production

Sur ce principe, Oxitec a développé plusieurs souches de moustiques *Ae. aegypti*, parmi lesquelles la souche OX513A[34]. Générés par la technique classique de transgenèse par insertion de transposon, les moustiques OX513A portent un transgène d'origine synthétique codant la protéine tTAV (*tetracycline*

[33] On rappelle que chez les moustiques, seules les femelles piquent et sont susceptibles de transmettre les pathogènes.

[34] Une autre souche, développée sur la base d'un phénotype empêchant la production de femelles reproductives (*flightless phenotype*) s'est avérée souffrir d'un coût en vigueur trop important pour envisager une stratégie efficace de reduction de population en conditions opérationnelles [Facchinelli, L., Valerio, L., Ramsey, J.M., Gould, F., Walsh, R.K., Bond, G., Robert, M.A., Lloyd, A.L., James, A.A., Alphey, L., *et al.* (2013). Field cage studies and progressive evaluation of genetically-engineered mosquitoes. Plos Neglected Tropical Diseases *7*.)]. D'autres souches de moustiques sont en cours de développement (Oxitec, comm. pers.).

repressible activator variant), fusion entre TetR (*Tet repressor protein* d'*Escherichia coli*), et VP16 (*virion protein 16 transcriptional activator* du *herpes simplex virus*), sous le contrôle de son propre site de liaison *tetOx7* d'*Escherichia coli*, et de séquences régulatrices de drosophile (Phuc et al., 2007). La protéine tTAV se caractérise par une activité de facteur de transcription qui stimule sa propre expression tout en perturbant l'expression de nombreux gènes des moustiques au point de provoquer leur mort [*transcriptional squelching* (Lin et al., 2007)]. Le système est régulé par un mécanisme dit *Tet-off*[35] : en l'absence de tétracycline, tTAV empêche le développement des moustiques transgéniques (la composante TetR de tTAV s'associant à *tetOx7* et induisant *via* VP16 la surexpression létale de tTAV) ; en présence de tétracycline, la tTAV est inactivée (TetR ayant plus d'affinité pour la tétracycline que pour *tetOx7*), la létalité associée au gène *tTAV* est alors réprimée, ce qui permet l'élevage de la souche en conditions artificielles supplémentées en tétracycline (Phuc et al., 2007).

En plus du transgène effecteur *tTAV*, les moustiques OX513A portent un marqueur de fluorescence, *DsRed2*, du corail *Discosoma*, permettant le suivi des moustiques transgéniques (Phuc et al., 2007).

Enfin, la lignée OX513A a été sélectionnée parmi différents transformants pour sa caractéristique de létalité tardive, la mort des moustiques OX513A survenant au stade de larve voire de nymphe (Phuc et al., 2007). La létalité tardive présente un intérêt pour les applications des stratégies de type TIS concernant des insectes dont la densité de population dépend de ressources limitées. C'est le cas des moustiques, dont le développement de la population est limité par la disponibilité en sites d'oviposition et en nutriments pour les larves. Ces ressources constituent ainsi des facteurs de compétition à des stades précoces de développement des moustiques. La létalité au stade embryonnaire, caractéristique de la TIS classique par irradiation, réduit l'impact de ces facteurs de compétition, ce qui peut conduire à des phénomènes de surcompensation. Par ces phénomènes, une réduction importante du potentiel de reproductivité des femelles ne se traduirait pas nécessairement par une réduction significative de la taille de la population cible et risquerait même d'établir un niveau d'équilibre populationnel plus élevé (Phuc et al., 2007). L'avantage que procurerait la létalité tardive en termes d'efficience de la stratégie de réduction de population a été clairement modélisé : le nombre de moustiques stériles qu'il serait nécessaire de relâcher par rapport au nombre de moustiques cibles sauvages pour éliminer une population est inférieur avec une létalité tardive par rapport à une létalité embryonnaire, et l'élimination est plus rapide à des ratios de lâcher efficaces dans les deux conditions (Phuc et al., 2007). Selon une modélisation supplémentaire, cet avantage persisterait même si les larves OX513A, avant leur mort, étaient jusqu'à 30 % moins compétitives que les larves sauvages (Phuc et al., 2007). Cet avantage de létalité tardive des moustiques OX513A par rapport à la létalité embryonnaire de la TIS classique reste à démontrer sur le terrain.

La lignée OX513A a également été sélectionnée sur la base d'une pénétrance élevée de son phénotype (c'est-à-dire sur le fait qu'une proportion élevée de moustiques transgéniques expriment effectivement le phénotype que le transgène est supposé leur conférer), pénétrance qui reste toutefois incomplète. Une pénétrance complète se traduirait par une létalité de 100 % des moustiques OX513A et de leur descendance hémizygote en l'absence de tétracycline. Or, en l'absence de tétracycline, 3 à 4 % des moustiques transgéniques survivent en laboratoire (Phuc et al., 2007). Cette proportion est réduite à 2 % dans l'environnement, sûrement du fait des conditions moins favorables qu'en laboratoire (Dr Hadyn Parry, communication au HCB lors de l'audition d'Oxitec). L'impact d'une létalité incomplète sur l'efficience de la stratégie de réduction de population a également été modélisé : s'il est d'autant plus significatif que le ratio de lâcher (ratio du nombre de moustiques relâchés sur le nombre de moustiques cibles de terrain) est bas, son impact sur l'efficacité de la stratégie reste négligeable aux ratios testés et pour des niveaux inférieurs à 5 % de survivants, valables donc pour la souche OX513A (Phuc et al., 2007).

[35] http://www.tetsystems.com/science-technology/ (consulté le 16 mars 2017).

La lignée transformée OX513A a fait l'objet de caractérisation en laboratoire. Comme attendu avec le système de régulation *Tet-Off*, aucune différence de survie n'a été détectée entre les moustiques OX513A et leurs équivalents non GM en présence de tétracycline, assurant leur production en conditions d'élevage supplémentées en tétracycline (Phuc et al., 2007). Testés dans des cages de laboratoire après introgression du transgène dans un fond génétique malaisien, les mâles OX513A se sont montrés capables d'inséminer autant de femelles que les mâles non GM au cours des premiers jours, même s'ils semblaient avoir une capacité d'insémination réduite sur la durée de leur vie et un coût d'accouplement accru par rapport aux mâles non GM quasi-isogéniques (Bargielowski et al., 2011). Ces résultats n'ont pas été jugés rédhibitoires pour une stratégie RIDL impliquant des lâchers fréquents et en excès de mâles OX513A sur le terrain, dans l'attente de l'évaluation de leur performance sur le terrain en compétition avec les mâles sauvages (Bargielowski et al., 2011).

Au-delà de la caractérisation des moustiques transgéniques en laboratoire et de l'évaluation de la compétitivité des moustiques dans l'environnement, les techniques de production, spécifiquement mentionnées dans la saisine, et de mise en œuvre des moustiques OX513A, sont critiques pour le succès de la stratégie sur le terrain. Plus généralement, cette dimension a été en grande partie considérée responsable des difficultés de mise en œuvre des stratégies de type TIS spécifiques aux moustiques par rapport à d'autres insectes. Un point sur leur développement a été publié par Carvalho *et al*. dans le cadre du déploiement des moustiques OX513A au Brésil, concernant notamment les méthodes de production larvaire, d'alimentation sanguine, et de séparation des mâles et femelles (Carvalho et al., 2014). Plus ou moins partagés par les différentes stratégies basées sur des lâchers de moustiques, les techniques de production des moustiques et les défis associés sont exposés de manière comparative dans la section 4.3.3. pour dégager les éventuelles spécificités associées aux moustiques GM.

De manière plus générale, les spécificités, les risques, les intérêts et les limites associés à cette technique sont développés dans la suite de l'avis (section 4.3. et chapitre 6).

3.2.3. Résultats des premières expérimentations dans le monde

Un dispositif d'évaluation par étape est mis en œuvre avant tout lâcher de moustiques de grande échelle sur le terrain. Les souches de moustiques sont d'abord évaluées en laboratoire (phase I), puis en conditions dites semi-contrôlées, consistant en des lâchers de moustiques au sein de systèmes confinés mimant leur environnement naturel, placés sur le terrain (phase II). Ces essais confinés permettent d'évaluer principalement la performance sexuelle des souches transgéniques et leur compétitivité pour l'accouplement avec les souches locales. La phase II inclut également une dimension de caractérisation du terrain, de sélection du site pilote, et de collectes de données entomologiques et épidémiologiques. Les essais pilotes en conditions de terrain, à l'échelle de un ou plusieurs villages en milieu rural, ou de un ou plusieurs quartiers en milieu urbain, peuvent alors avoir lieu pour évaluer l'efficacité des interventions en comparaison avec des sites témoins (phase III). La phase IV concerne les lâchers en conditions opérationnelles sur le terrain, à large échelle, dans les conditions réelles d'application intégrant les méthodes classiques de lutte antivectorielle.

Sur la base de ce schéma, suite à plusieurs études de caractérisation en laboratoire, les moustiques OX513A ont fait l'objet d'expérimentations dans l'environnement de phases II et/ou III en Malaisie (Lacroix et al., 2012; Lee et al., 2013), aux îles Caïmans (Harris et al., 2012; Harris et al., 2011), au Brésil (Carvalho et al., 2015) et au Panama (Gorman et al., 2016). Une expérimentation de phase IV est en cours au Brésil. Les expérimentations publiées sont décrites en annexe 11 du Rapport du GT.

A ce jour, les expérimentations réalisées en Malaisie se sont limitées à une caractérisation des souches transgéniques :

- en conditions semi-contrôlées, la compétitivité sexuelle de souches OX513A a été évaluée dans différentes combinaisons de fonds génétiques dans lesquels le transgène a été introgressé : entre mâles GM et non-GM, pour des femelles non-GM de même fond génétique (malaisien), et

entre mâles GM de fond génétique mexicain et mâles non-GM de fond génétique malaisien, pour des femelles non-GM de fond génétique malaisien. Les deux expériences révèlent que les mâles GM ont autant de chance que les mâles non-GM de s'accoupler avec des femelles non-GM, montrant que le transgène n'a pas d'impact négatif sur la performance sexuelle des mâles testés, et que l'utilisation de fonds génétiques différents n'impacte pas le résultat, au moins dans les combinaisons et conditions testées (Lee et al., 2013). Ceci a suggéré que l'approche RIDL pourrait être envisagée sans avoir à introgresser le transgène dans un fond génétique local (Lee et al., 2013).

- des lâchers de moustiques sur le terrain avaient pour objectif de tester la performance, dans l'environnement, des moustiques OX513A comparée à celle de moustiques non-GM quasi-isogéniques, dans le but d'identifier d'éventuels effets non intentionnels associés au transgène. Conçu comme première étape d'une stratégie précautionneuse d'expérimentation par étape, un lâcher de petite dimension a été réalisé en décembre 2010 dans une zone forestière inhabitée. Les conclusions de cet essai, placé dans un environnement atypique pour les moustiques *Ae. aegypti*, où aucune descendance des moustiques relâchés n'a été détectée, sont peu claires : si le transgène n'induit aucun effet négatif sur la longévité et la dispersion maximale des moustiques mâles dans ces conditions, la dispersion moyenne des moustiques GM pourrait être significativement réduite (Lacroix et al., 2012). Les auteurs estiment que la réduction observée ne serait *a priori* pas de nature à empêcher la faisabilité de la stratégie RIDL. Ceci doit être testé et ces expérimentations doivent être répétées dans un environnement plus adapté (Lacroix et al., 2012).

Les autres expérimentations publiées ont permis de tester la faisabilité et l'efficacité de l'approche RIDL pour la réduction d'une population de moustiques cibles dans différents environnements. Toutes ces expérimentations ont été réalisées avec une souche OX513A de fond génétique mexicain.

Les paramètres clefs évalués en préparation à ces expérimentations sont :

- la proportion de mâles transgéniques capturés dans des pièges d'adultes, qui permet d'estimer la **densité initiale de la population sauvage** selon le nombre de moustiques transgéniques relâchés,
- la proportion de larves transgéniques développées à partir des œufs collectés dans les pièges pondoirs, qui permet d'estimer le **taux d'accouplement** des femelles sauvages avec les mâles OX513A, correspondant au **taux de stérilité induite**.

Ces éléments permettent de définir la **compétitivité de terrain** des moustiques OX513A[36], et le nombre de moustiques à relâcher pour atteindre un objectif donné de réduction de population selon sa densité initiale.

Paramètre clef de la progression et du succès de la stratégie RIDL, la **densité de la population de moustiques** se mesure :

- soit indirectement, à partir d'un indice de pièges pondoirs mesurant la proportion de pièges contenant des œufs de la population cible,
- soit plus directement, à partir du nombre d'adultes de la population cible capturés dans des pièges d'adultes, qui devrait être corrigé en tenant compte de l'efficacité des pièges, estimée par le taux de recapture des mâles stériles.

La **réduction de la densité de la population de moustiques** se mesure à partir de ratio d'indices de pièges pondoirs et/ou de nombres d'adultes relevés dans la zone de lâcher à différents stades de l'expérimentation. La réduction relative de cette densité se déduit de la comparaison de ces ratios entre zone de lâcher et zone témoin.

La faisabilité de l'approche RIDL a été testée pour la première fois fin 2009 sur l'île de Grand Cayman, l'une des trois îles du territoire britannique d'outre-mer des îles Caïmans, situé dans les Caraïbes (Harris et al., 2011). Les paramètres de caractérisation de la population cible et de performance locale des moustiques, déterminés à partir de ce premier essai, ont permis de planifier le premier

[36] La compétitivité de terrain est déterminée par la formule suivante : C = PW/(S(1-P)), avec W : densité des mâles sauvages, S : densité des mâles stériles, et P : proportion d'accouplements stériles (proportion de larves fluorescentes dans le cas des moustiques OX513A) (Carvalho et al., 2015).

test de réduction de population de moustiques de terrain, réalisé de mai à octobre 2010 (Harris et al., 2012). Malgré des difficultés dans la production de moustiques, qui ont conduit à la restriction progressive de la superficie de l'essai de 55 ha à 16 ha, le potentiel de la stratégie a été validé, avec une réduction relative de la densité de la population de moustiques d'environ 80 % selon un indice de pièges pondoirs. Si 3,3 millions de moustiques GM ont été relâchés pendant une période de 23 semaines de manière relativement irrégulière[37], il a été estimé qu'un lâcher d'environ 3.500 mâles par hectare et par semaine, soit un ratio de 5:1, aurait suffi pour atteindre ce résultat. Par ailleurs, les auteurs soulignent que ce résultat pourrait être amélioré en situation (1) de moindres échanges avec les zones voisines (immigration de femelles fécondées par des moustiques sauvages / émigration de mâles GM ou de femelles fécondées par des mâles GM) – ce qui serait possible sur une zone plus large ou plus isolée –, (2) de moindre survie de population sous la forme d'œufs fécondés antérieurement aux lâchers – possible dans le cadre d'un programme opérationnel plus long –, et (3) d'association avec d'autres moyens de lutte pour réduire la densité de moustiques initiale (Harris et al., 2012).

L'expérimentation réalisée au nord-est du Brésil dans l'état de Bahia, de mai 2011 à octobre 2012, s'est également déroulée en plusieurs étapes : une étape préparatoire de 2 mois, pour évaluer les performances des moustiques lors d'une première série de lâchers et ainsi adapter la stratégie de réduction aux conditions locales, une étape de réduction de population d'un an, suivie d'une étape de maintenance de 3 mois (Carvalho et al., 2015). Comme aux îles Caïmans, les objectifs initiaux ont dû être restreints en cours d'expérimentation du fait de difficultés de production de moustiques en quantités nécessaires pour parvenir à réduire la population cible dans la zone visée. La zone de lâcher a ainsi été redimensionnée à mi-parcours, de 11 ha à 5,5 ha. Adaptée aux conditions locales, la stratégie RIDL a finalement été validée, avec une réduction de la densité de population d'*Ae. aegypti* d'environ 78 % selon un indice de pièges pondoirs, et 95 % selon les données de captures d'adultes, pour un total d'environ 15 millions de moustiques GM relâchés sur un an. Les auteurs estiment que des lâchers moyens de l'ordre de 29.000 moustiques mâles par hectare et par semaine auraient suffi pour atteindre ce résultat (Carvalho et al., 2015).

L'expérimentation réalisée au Panama à Arraijan, dans la banlieue de la ville de Panama, d'avril à octobre 2014, avait pour objectif supplémentaire d'évaluer l'effet d'une réduction de population d'*Ae. aegypti* sur une population coexistante *d'Ae. albopictus* (Gorman et al., 2016). Un total d'environ 4,2 millions de moustiques *Ae. aegypti* OX513A adultes mâles ont été relâchés sur une période de 6 mois sur une zone de 10 ha, soit une moyenne d'environ 15.700 adultes relâchés par hectare et par semaine. Alors que les pontes d'*Ae. aegypti* ont été réduites de 82 % en 116 jours et 93 % en 200 jours, il n'a pas été observé d'impact spécifique sur la dynamique de population d'*Ae. albopictus* comparé aux zones témoins pendant la durée de l'essai. Les auteurs soulignent toutefois qu'il pourrait être nécessaire d'examiner l'impact d'une réduction à plus long terme (Gorman et al., 2016). Cette expérimentation a également permis d'évaluer la persistance du transgène dans l'environnement après l'arrêt des lâchers : la proportion d'œufs contenant des larves transgéniques dans les pièges pondoirs a été réduite de 95 % en 28 jours. Aucune larve transgénique n'était détectable 84 jours après le dernier lâcher (Gorman et al., 2016).

On note que la compétitivité de terrain des moustiques OX513A varie selon ces expérimentations (C=0,059 aux îles Caïmans, C=0,03 au Brésil, et C=0,144 au Panama) (Carvalho et al., 2015; Gorman et al., 2016; Harris et al., 2012; Harris et al., 2011), ce qui n'est pas surprenant en soi vu qu'elle intègre de nombreux paramètres, incluant les conditions éventuellement variables de production de moustiques, et les migrations incontrôlables de moustiques vers et hors de la zone de lâcher. Ceci est

[37] Différents régimes de lâcher se sont succédés, à savoir : (1) sur 55 ha pendant 6 semaines : 1.400 (95 % CI : 990-1.800) mâles adultes relâchés / ha / sem ; (2) sur 32 ha pendant 6 semaines : 3.900 (95 % CI : 2.600-5.300) mâles adultes relâchés / ha / sem, (3) sur 16 ha pendant 11 semaines : 14.000 (95 % CI : 13.700-14.500) mâles adultes relâchés / ha / sem pendant les 3 premières semaines, suivi de 7.700 (95 % CI : 6.900-8.500) mâles adultes relâchés / ha / sem complétés par 4.900 (95 % CI : 3.800-6.000) nymphes mâles relâchées / ha / sem.

à distinguer de la compétitivité mesurée en conditions confinées, les moustiques OX513A s'y étant montrés aussi compétitifs que les mâles sauvages testés, quel que soit leur fond génétique, dans les expériences rapportées (Harris et al., 2011; Lee et al., 2013). Aucune donnée de compétitivité de terrain n'a été publiée pour l'utilisation de moustiques en TIS classique. On note toutefois que les données obtenues avec les moustiques OX513A sont dans la fourchette des valeurs observées pour d'autres insectes[38].

Ces expérimentations soulignent l'influence des conditions locales sur les moyens à déployer pour obtenir une réduction de population de moustiques par la mise en œuvre de la stratégie RIDL. Elles mettent également en évidence l'importance de la caractérisation initiale de la population cible et de son environnement, de la compétitivité de terrain des moustiques OX513A, du suivi de la progression de la réduction et de l'adaptabilité des lâchers selon les résultats obtenus et les aléas climatiques, ainsi que la nécessité de conditions stables sur le long terme de production de masse de moustiques pour transposer ces résultats à plus grande échelle.

On note par ailleurs que les expérimentations rapportées ont été évaluées avec des critères strictement entomologiques. Oxitec conclut néanmoins que les lâchers de moustiques au Brésil et au Panama ont réduit les populations de moustiques sous le seuil requis pour la transmission de la dengue (Carvalho et al., 2015; Gorman et al., 2016). Pour prédire l'impact des expérimentations sur la transmission de la dengue à partir d'indicateurs entomologiques, Oxitec a utilisé l'approche proposée par Focks *et al*., qui ont défini des seuils de transmission selon le nombre de nymphes par personnes (proxy de la population adulte de moustiques), la température ambiante, et l'immunité de la population (Focks et al., 2000). La validité opérationnelle de cette approche reste discutée du fait de la complexité des relations entre indicateurs entomologiques et épidémiologiques[39] (Bowman et al., 2014; Fontenille et al., 2009; Wijayanti et al., 2016) (voir Rapport du GT, Annexe 12).

Une expérimentation de plus grande ampleur est en cours dans une autre région du Brésil, à Piracicaba, dans l'Etat de São Paulo. Débutée en 2015 à l'échelle d'un quartier, cette expérimentation a été étendue en 2016 pour couvrir une zone de 12 km^2 concernant une population de 60.000 habitants (Servick, 2016). De phase IV, cette expérimentation pourrait permettre de recueillir des données épidémiologiques d'intérêt, permettant de mesurer l'efficacité des lâchers de moustiques OX513A sur la base d'un impact sur la transmission des maladies vectorisées par ces moustiques.

En conclusion, si les expérimentations d'Oxitec ont effectivement montré une efficacité locale et ponctuelle sur la réduction de populations de moustiques de terrain, l'efficacité de la technique sur la transmission de maladies vectorisées par ces moustiques, comme la dengue, zika, chikungunya ou la fièvre jaune, n'est pas encore avérée sur le terrain. Ceci n'est pas spécifique à la technique RIDL. A la connaissance des membres du groupe de travail, aucune des techniques émergentes de lutte antivectorielle impliquant des lâchers de moustiques n'a fait l'objet d'une surveillance

[38] C=0,3 à 0,5 pour les glossines au Sénégal [Bouyer, J., Seck, M.T., Pagabeleguem, S., Sall, A.A., Lo, M., Vreysen, M.J.B., Balenghien, T., and Lancelot, R. (2012). Study of the competitiveness of allochtonous sterile males during the tsetse eradication campaign in Senegal. In 18th Conférence E-sove 2012 (EID, CIRAD, IRD, Montpellier, France).] ; C=0,1 pour la lucilie bouchère [Mayer, D.G., Atzeni, M.G., Stuart, M.A., Anaman, K.A., and Butler, D.G. (1998). Mating competitiveness of irradiated flies for screwworm fly eradication campaigns. Prev Vet Med *36*, 1-9, Vreysen, M.J.B. (2005). Monitoring sterile and wild insects in area-wide integrated pest management programmes. In Sterile insect technique: Principles and practices in area-wide integrated pest management, V.A. Dyck, J. Hendrichs, and A.S. Robinson, eds. (Dordrecht, The Netherlands, Springer), pp. 325-362.], et C<0,01 pour la mouche des fruits méditerranéenne [Rendon, P., McInnis, D., Lance, D., and Stewart, J. (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, Shelly, T.E., McInnis, D.O., Rodd, C., Edu, J., and Pahio, E. (2007). Sterile insect technique and Mediterranean fruit fly (Diptera : tephritidae): Assessing the utility of aromatherapy in a Hawaiian coffee field. J Econ Entomol *100*, 273-282.]. Il faut toutefois souligner que la mouche des fruits méditerranéenne est connue pour avoir des compétitivités particulièrement basses en raison d'une cérémonie d'accouplement très complexe.

[39] Pour exemple, on peut souligner le cas emblématique de Singapour, où des épidémies importantes de dengue perdurent malgré les efforts considérables effectués pour réduire la population d'*Aedes*. Une chute des indices entomologiques ne s'est pas traduite par une baisse proportionnelle de l'incidence de la maladie, suggérant que la transmission du virus peut se poursuivre à des densités très faibles de populations de moustiques, difficilement détectées par les indices entomologiques.

épidémiologique à ce jour, contrairement à d'autres méthodes de lutte comme l'utilisation de moustiquaires imprégnées d'insecticide ou l'aspersion intra-domiciliaire d'insecticides, dont l'efficacité épidémiologique contre le paludisme a été démontrée (Lengeler, 2004; Pluess et al., 2010).

3.2.4. Commercialisation

Les moustiques RIDL n'ont pas été commercialisés à ce jour. Bien qu'Oxitec ait obtenu en 2014 une autorisation du CTNBio (Commission technique nationale de biosécurité) pour la dissémination sans contraintes des moustiques OX513A au Brésil – autorisation qui permet aujourd'hui la réalisation d'une expérimentation de grande ampleur dans l'Etat de São Paulo –, leur commercialisation ne peut se faire sans l'autorisation formelle de l'ANVISA (Agence nationale de surveillance sanitaire du Brésil), dont l'examen est actuellement retardé par l'élaboration d'un nouveau cadre réglementaire.

3.3. Exemple 2 : Forçage génétique à des fins d'élimination de population

3.3.1. Principe

Parmi les techniques possibles d'élimination de population par forçage génétique (voir 3.1.2.3), une technique consiste à propager l'inactivation d'un gène essentiel pour la fertilité femelle.

Le principe de cette technique repose sur un lâcher de mâles stérilisants, porteurs d'une cassette de forçage génétique qui confère un phénotype de stérilité femelle du fait de son insertion au sein d'un gène essentiel pour la fertilité femelle. Dès le premier accouplement avec des femelles sauvages, les mâles stérilisants initient la propagation, au sein de la population, de la stérilité femelle. Par forçage génétique dans les cellules germinales, les individus hémizygotes (F_1)[40], mâles et femelles, transmettent la cassette à l'ensemble de leur descendance. L'augmentation rapide de la fréquence de la cassette de forçage génétique conduit à la chute de l'effectif de la population du fait de la stérilité des femelles homozygotes.

Le succès de cette technique dépend, entre autres, de deux conditions :

1- la modification génétique doit induire une stérilité chez les femelles homozygotes tout en préservant la fertilité des femelles hémizygotes, ce qui permet d'assurer la transmission de la modification à la descendance ;

2- le forçage génétique doit avoir lieu uniquement dans les cellules germinales, en amont de la production de gamètes, ce qui permet à un individu hémizygote de transmettre la modification à l'ensemble de sa descendance tout en évitant d'altérer la fertilité des femelles hémizygotes par voie somatique.

3.3.2. Etat des lieux de la recherche

Une application de cette technique est en cours de développement chez le moustique *An. gambiae* (Hammond et al., 2016), principal vecteur du *Plasmodium* responsable du paludisme en Afrique subsaharienne et à Mayotte, et l'un des vecteurs des filaires responsables de la filariose lymphatique à Mayotte.

Trois gènes de fertilité femelle ont été testés, l'inactivation de chacun de ces gènes conduisant au phénotype caractéristique de stérilité femelle récessive recherchée.

[40] Les individus hémizygotes F_1 sont les individus hybrides issus de l'accouplement entre les mâles relâchés (homozygotes) porteurs de la cassette de forçage génétique et les femelles sauvages. Dans les générations suivantes, ce sont les individus hybrides issus de l'accouplement entre tout individu porteur de la cassette (mâle homozygote, mâle hémizygote ou femelle hémizygote) et tout individu sauvage. Les mâles homozygotes transmettent normalement la cassette à l'ensemble de leur descendance. Seules les femelles homozygotes sont stériles.

Selon le principe exposé ci-dessus, une cassette de forçage génétique a été insérée au sein de chacun de ces gènes, contenant : (1) le gène codant l'endonucléase Cas9 placé sous le contrôle d'un promoteur supposé être spécifique aux lignées germinales, (2) un ARN guide conçu pour diriger le clivage de l'endonucléase au site même conduisant à l'inactivation de chacun de ces gènes, sous le contrôle d'un promoteur ubiquitaire, et (3) un marqueur de fluorescence (Hammond et al., 2016).

Des tests de forçage génétique sur des populations de moustiques de laboratoire pour chacune des constructions ont confirmé le potentiel de cette stratégie, tout en mettant en évidence deux problèmes techniques à résoudre pour pouvoir envisager un déploiement efficace de la stratégie dans l'environnement : (1) le développement de résistances au forçage génétique et (2) une réduction drastique de la fertilité des femelles hémizygotes (Hammond et al., 2016).

Des solutions sont en voie de développement pour chacun de ces problèmes : le phénotype de résistance au forçage génétique, causé par l'activation de la voie de réparation de l'ADN par religation imprécise dans une fraction de la population, pourrait être contourné par l'utilisation de plusieurs ARN guides ciblant différentes séquences du gène à inactiver au sein de la même cassette ou l'utilisation de plusieurs cassettes de forçage génétique ; le problème de la réduction de la fertilité des femelles hémizygotes, causée par une expression somatique de la nucléase Cas9, semble déjà avoir été résolu par l'utilisation d'un promoteur plus spécifique aux lignées germinales (Austin Burt, comm. pers.).

Les spécificités, les risques, les intérêts et les limites associés à la technique d'élimination de population par forçage génétique sont développés dans la suite de l'avis (section 4.3. et chapitre 6).

3.4. Exemple 3 : Forçage génétique à des fins de modification de population

3.4.1. Principe

Parmi les différentes techniques envisageables pour rendre une population résistante à la transmission d'un agent pathogène par forçage génétique (voir 3.1.2.3), une technique consiste à propager un transgène effecteur qui va s'attaquer directement au pathogène.

Le principe de cette technique repose sur un lâcher de mâles qui, dès le premier accouplement avec des femelles sauvages, initient la propagation, au sein de la population, d'une cassette de forçage génétique conférant aux moustiques une résistance à la transmission du pathogène par le biais d'un transgène de « résistance » empêchant le pathogène de se développer au sein du moustique. Par forçage génétique dans les cellules germinales, les individus hémizygotes (F_1)[41] transmettent la cassette à l'ensemble de leur descendance. L'augmentation de la fréquence des individus porteurs du transgène de « résistance » dans la population de moustiques devrait se traduire par une réduction de la transmission du pathogène.

3.4.2. Etat des lieux de la recherche

Le facteur limitant de cette technique est d'identifier un gène de résistance efficace contre la transmission du pathogène ciblé, et qui ne risquerait pas de faciliter la transmission d'autres agents pathogènes. Le risque d'effet non anticipé sur d'autres microorganismes sera d'autant plus faible que le mode d'action du facteur de résistance est spécifique du pathogène.

Le principe de cette technique est actuellement testé chez *An. stephensi*, principal vecteur de *Plasmodium falciparum* en Asie (Gantz et al., 2015). Dans ce cas, le mécanisme de résistance mis en

[41] Les individus hémizygotes F_1 sont les individus hybrides issus de l'accouplement entre les mâles relâchés (homozygotes) porteurs de la cassette de forçage génétique et les femelles sauvages. Dans les générations suivantes, ce sont les individus hybrides issus de l'accouplement entre tout individu porteur de la cassette (mâle ou femelle, hémizygote ou homozygote) et tout individu sauvage. Les individus homozygotes transmettent normalement la cassette à l'ensemble de leur descendance.

œuvre est une construction synthétique conçue pour produire deux anticorps anti-*Plasmodium*, l'un dirigé contre la protéine Chitinase 1 d'oocinète de *Plasmodium*, et l'autre contre la protéine circumsporozoïte (Gantz et al., 2015). Contrairement aux moustiques femelles sauvages, dans des conditions représentatives d'une infection de terrain, les moustiques femelles transgéniques exprimant ces anticorps ne produisent pas de sporozoïtes de *P. falciparum* (la forme infectieuse du parasite) dans leurs glandes salivaires, et sont donc incapables de transmettre le parasite (Gantz et al., 2015).

Pour réaliser le forçage génétique, les moustiques ont été transformés avec une cassette de forçage génétique portant : (1) le gène codant l'endonucléase Cas9 placé sous le contrôle d'un promoteur supposé être spécifique aux lignées germinales, (2) un ARN guide conçu pour diriger le clivage de l'endonucléase au sein d'un gène dont le phénotype d'inactivation par insertion servira de marqueur supplémentaire du forçage (*kh*, yeux blancs), sous le contrôle d'un promoteur ubiquitaire, (3) un marqueur de fluorescence, et (4) les transgènes effecteurs codant les anticorps anti-*Plasmodium* (Gantz et al., 2015).

Testé en laboratoire, un fort taux de conversion génique a été observé dans les générations qui ont suivi le premier accouplement avec des femelles sauvages. Comme pour l'exemple de forçage génétique précédent, des solutions devront toutefois être apportées à un manque de spécificité tissulaire de l'expression de Cas9 et au développement de résistances par NHEJ (Gantz et al., 2015).

D'autres mécanismes spécifiques de résistance à la transmission d'un pathogène peuvent être envisagés, comme les ARN interférents (RNAi) spécifiques à un virus, obtenus par expression transgénique d'un fragment « en épingle à cheveux » dérivé du génome du virus à éliminer. Ce type d'approche pourrait déboucher sur une application contre les épidémies virales sous réserve de montrer que l'activation de la voie RNAi par le transgène abolit effectivement la transmission du virus ciblé. On peut s'interroger sur la possibilité que la voie RNAi devienne alors moins disponible pour attaquer d'autres virus vectorisés par la même espèce. Il sera donc important d'étudier au préalable la modification éventuelle de compétence vectorielle envers des virus non cibles. A l'inverse, il devrait être possible de combiner la résistance à plusieurs virus dans un seul transgène. De par sa spécificité, ce mécanisme ne bloquerait *a priori* pas l'émergence d'un arbovirus encore inconnu.

Les spécificités, les risques, les intérêts et les limites associés à la stratégie de modification de population par forçage génétique sont développés dans la suite de l'avis (section 4.3. et chapitre 6).

Ainsi, l'utilisation de moustiques GM est envisagée à travers différentes techniques pouvant s'inscrire dans différentes stratégies de lutte antivectorielle. Ces techniques sont mises en œuvre dans des exemples concrets d'application, à des stades différents de développement. Les spécificités, les risques, les intérêts et les limites des exemples présentés dans ce chapitre sont développés dans la suite de l'avis.

4. Spécificités des techniques de lutte antivectorielle utilisant des moustiques génétiquement modifiés

La saisine demande de souligner les spécificités des techniques de lutte antivectorielle utilisant des moustiques GM par rapport aux techniques déjà utilisées. Considérant l'esprit de la question, on se propose ici d'élargir la comparaison à d'autres techniques émergentes, voisines des techniques utilisant des moustiques GM. Après une présentation concise des techniques de lutte antivectorielle existantes et de ces autres techniques émergentes, on soulignera les spécificités des techniques utilisant des moustiques GM en termes d'objectifs visés, de potentiel d'efficacité et durabilité, de contraintes techniques, ainsi que de risques pour l'environnement et la santé.

4.1. Panorama des techniques de lutte antivectorielle existantes

4.1.1. Utilisation de biocides

Une grande partie des techniques de lutte antivectorielle mises en œuvre aujourd'hui est basée sur l'utilisation d'insecticides (adulticides et larvicides), de répulsifs, et d'appâts (couplés à des pièges). Qu'ils soient de nature chimique – d'origine végétale ou de synthèse –, ou de nature biologique, ces produits sont réglementés en tant que biocides dans l'Union européenne (UE, 2012)[42]. A ce titre, ils suivent le même processus d'autorisation de mise sur le marché, avec les mêmes exigences d'évaluation de leurs dangers, risques et efficacité. Les biocides et leur encadrement réglementaire sont extensivement décrits dans le rapport du GT (section 3.2.1.). On soulignera ici leurs usages et leurs limites.

1. Différents usages et objectifs des biocides en lutte antivectorielle

Adulticides

Les traitements adulticides ciblent les femelles adultes hématophages, seules à intervenir dans la transmission des agents pathogènes par les moustiques. Selon les méthodes utilisées, les objectifs des traitements adulticides sont de réduire leur densité, leur longévité ou le contact hôtes-vecteurs :

- les traitements par aspersion intra-domiciliaire à effet résiduel, appliqués sur les surfaces intérieures de l'habitat, ont pour but de réduire les densités des populations d'adultes, l'effet recherché étant surtout de réduire la longévité des femelles pour restreindre la période d'activité des femelles âgées, potentiellement les plus dangereuses pour la transmission d'agents pathogènes. Les aspersions intra-domiciliaires sont indiquées lorsque les vecteurs sont endophages (ils piquent de préférence à l'intérieur des habitations) ou endophiles (ils se reposent de préférence à l'intérieur des habitations après le repas sanguin). Leur persistance d'action varie de 2 à 6 mois selon le substrat et la formulation ;
- les pulvérisations spatiales visent à générer un brouillard de très fines gouttelettes qui tuent les insectes adultes par contact de manière quasi-instantanée et avec une très faible persistance d'action. Les pulvérisations spatiales sont principalement indiquées au cours des périodes épidémiques pour réduire rapidement les densités de moustiques adultes actifs et faire chuter la transmission ;
- enfin, les moustiquaires imprégnées d'insecticide associent à la barrière physique une protection chimique qui éloigne ou tue les vecteurs, même si le tulle est en partie endommagé. Elles sont

[42] Les biocides sont utilisés dans le cadre de la lutte chimique et pour une partie des applications de la lutte biologique. Ils sont traités ici dans une section à part entière pour insister sur l'importance de la réglementation sur leur utilisation en lutte antivectorielle. Dans le domaine de la lutte antivectorielle, la lutte chimique concerne l'emploi de produits chimiques, d'origine végétale ou de synthèse, en tant que répulsifs, attractifs (couplés à des pièges), ou insecticides (Fontenille, 2009). La lutte biologique est traitée en section 4.1.2..

aujourd'hui imprégnées industriellement de manière à garantir leur efficacité après 20 lavages et sur 3 années d'utilisation. Leur distribution à grande échelle s'est avérée d'une grande efficacité et constitue l'un des piliers du Plan Mondial d'Action contre le paludisme[43].

L'utilisation des adulticides est particulièrement contrainte et limitée dans l'Union européenne. Des quatre familles principales d'adulticides utilisées dans le monde (les pyréthrinoïdes et organochlorés d'une part, modulateurs des canaux sodium voltage dépendant, et les organophosphorés et carbamates d'autre part, inhibiteurs de l'acétylcholinestérase) (WHO, 2011), seule une quinzaine de molécules sont encore autorisées dans l'Union européenne, appartenant toutes à la famille des pyréthrinoïdes. Parmi celles-ci, la plus utilisée est la deltaméthrine. C'est également la molécule privilégiée par les opérateurs publics français de la lutte antivectorielle en raison de son profil environnemental, sanitaire et technologique. Les pyréthrines naturelles, autorisées en agriculture biologique, sont aussi parfois utilisées. Deltaméthrine et pyréthrines naturelles sont donc généralement mentionnées comme étant les principales substances actives autorisées, sinon les seules, à être utilisées en tant qu'adulticides par les opérateurs français, tant dans les arrêtés préfectoraux de démoustication que ceux de lutte antivectorielle[44].

Peu toxiques pour les mammifères, les pyréthrinoïdes le sont néanmoins pour les organismes aquatiques et les animaux à sang froid. Les traitements anti-adultes sont donc interdits sur ou à proximité immédiate des points d'eau, c.-à-d. les cours d'eau, les fossés, les plans d'eau permanents ou intermittents, ce qui inclut les zones humides (Code de l'environnement, code rural et code de la santé publique). L'emploi d'adulticides pyréthrinoïdes est donc restreint aux espaces naturels hors zones humides et aux milieux urbain et péri-urbain, sous réserve de respecter strictement un certain nombre de contraintes et de restrictions réglementaires et environnementales.

Larvicides

Les traitements larvicides visent à réduire la densité des populations de vecteurs. Ils sont appliqués contre les espèces qui présentent une phase aquatique au cours de leur cycle de développement, et dont les gîtes larvaires sont relativement stables, repérables et accessibles aux opérateurs.

Les larvicides peuvent également être utilisés indirectement, par auto-dissémination : placés dans des pièges de repos ou des pièges pondoirs sous forme de poudre, ils sont efficacement dispersés par les femelles adultes qui viennent se poser dans ces pièges. Cette stratégie s'est avérée très efficace avec du pyriproxifène (un analogue de l'hormone juvénile), à petite échelle, pour contrôler *Ae. aegypti* au Pérou (Devine et al., 2009) puis *Ae. albopictus* en Espagne (Caputo et al., 2012). Les femelles contaminées déposent le pyriproxifène dans leurs gîtes larvaires, ce qui réduit très fortement le taux d'émergence des moustiques adultes à partir des larves qui s'y trouvent. La différence d'attractivité entre les stations de dissémination et les gîtes naturels nécessite encore des études sur le terrain pour optimiser le nombre de pièges à l'hectare et son efficacité avant d'envisager une utilisation à grande échelle. De plus, étant donné le nombre élevé de pièges à poser par hectare, cette technologie n'est pas considérée rentable à ce jour.

Peuvent être utilisés comme larvicides :

- des produits de synthèse de type régulateurs de croissance, comme des analogues de l'hormone juvénile, qui perturbent le développement larvaire et empêchent la transformation en nymphe

[43] Le Plan d'action mondial contre le paludisme (GMAP pour Global Malaria action Plan) est une initiative du Partenariat Roll Back Malaria (RBM), l'organisme international de coordination de la lutte contre le paludisme (http://www.rollbackmalaria.org/microsites/gmap/1-1_001.html).

[44] La deltaméthrine et les autres substances actives pyréthrinoïdes encore sur le marché sont par ailleurs utilisées de manière diverse par les prestataires privés de dératisation, désinsectisation et désinfection, pour tout type d'usage de l'hygiène public (incluant les moustiques, mais aussi toutes les pestes domestiques, cafards, punaises, termites, etc.). Certaines de ces substances sont également commercialisées en libre-service dans les jardineries et les grandes surfaces, en conditionnements adaptés (fly-tox, tortillons, prises diffuseurs, etc.) pour l'usage domestique des particuliers.

ou en adulte, ou des analogues de l'ecdysone, qui inhibent la synthèse de la chitine au moment de la mue,

- des biocides biologiques, comme les spinosynes A et D produites par les bactéries actinomycètes *Saccharopolyspora spinosa*, efficaces contre le contrôle des larves de moustiques mais non sélectives (Hertlein et al., 2010), ou comme les cristaux protéiques formés par *Bacillus thuringiensis israelensis (Bti)* et *Lysinibacillus sphaericus* (*Lsph*, anciennement *Bacillus sphaericus* (*Bs*)), dont la toxicité larvaire est très spécifique de par leur mode d'action *via* des récepteurs suite à leur ingestion (Ben-Dov, 2014; Regis et al., 2001).

A ce jour, sont autorisés en tant que larvicides dans l'Union européenne trois régulateurs de croissance (le diflubenzuron, le pyriproxyfène et le S-méthoprène), et les bactéries entomopathogènes *Bti* et *Lsph*. Toutefois, les milieux naturels concernés par les opérations de démoustication font, dans leur grande majorité, l'objet de statuts de protection divers plus ou moins stricts. Au niveau européen, la directive Habitat (Natura 2000) impose de réaliser des études d'incidences. Plus localement, chaque Etat membre peut appliquer des règles particulières associées à des sites de protection labellisés. C'est le cas, en France, des réserves naturelles du Conservatoire du littoral, ou du Parc naturel régional de Camargue par exemple. Au crible de ces nouvelles exigences de protection environnementale, l'emploi du *Bti* est clairement privilégié dans les milieux naturels, les régulateurs de croissance étant généralement proscrits en raison de leur manque de sélectivité vis-à-vis des invertébrés aquatiques non-cibles et le *Lsph* étant par ailleurs très peu utilisé ou utilisé en association avec le *Bti*. En milieu urbain, l'ensemble des larvicides encore sur le marché est utilisé mais dans ce cas aussi, la plupart des opérateurs publics ont plutôt tendance à baser l'essentiel de leur stratégie sur le seul *Bti.*

Répulsifs

Utilisés dans le cadre de la protection personnelle antivectorielle, les répulsifs ont pour objectif de limiter le contact homme-vecteur [(Duvallet et al., 2011) ; Recommandations de bonne pratique clinique sur la « protection personnelle antivectorielle » établies par la Société de médecine des voyages et la Société française de parasitologie]. Il existe des répulsifs pour application cutanée ou pour imprégnation de vêtements, autres tissus ou moustiquaires. Les substances actives autorisées au niveau européen incluent le DEET (N1,N-diéthyl-m-toluamide) et le IR3535 (N-acétyl-N-butyl-β-alaninate d'éthyle). Les substances KBR3023 (carboxylate de secbutyl2-(2-hydroxyéthyl) pipéridine-1/Icaridine) et PMDRBO (mélange de cis- et trans-p-menthane-3,8 diol, ou 2-hydroxy-α,α,4-trimethylcyclohexanemethanol) sont en cours d'évaluation au niveau européen. On note par ailleurs que la perméthrine et la deltaméthrine, associée à la transtétramethrine, sont autorisées pour l'imprégnation de vêtements, tissus et moustiquaires. Les moustiquaires pré-imprégnées le sont avec de la perméthrine et de la cyperméthrine[45].

Appâts

Les appâts sont utilisés en association avec des systèmes de piégeage. Ils sont abordés dans le cadre de la lutte physique (section 4.1.3.)

2. Limites de l'utilisation des biocides

Les méthodes de contrôle des populations de vecteurs étant en grande partie basées sur l'utilisation des insecticides, les principaux obstacles auxquels se heurtent les programmes de lutte sont d'une part, le développement de résistances à des insecticides, et d'autre part, la réduction des molécules disponibles pour les traitements en santé publique.

[45] http://social-sante.gouv.fr/IMG/pdf/tableau_repulsif_recos_mars_2016.pdf.

L'impact de certains biocides sur la santé et l'environnement constitue également une limite de leur utilisation : l'évaluation réglementaire a fortement limité le nombre de biocides autorisés et a établi des règles contraignantes encadrant leur utilisation. La dimension de l'impact sanitaire des biocides sera davantage développée en comparaison à celui des techniques utilisant des moustiques GM et des autres techniques de lutte antivectorielle (voir section 4.3.4.).

Développement de résistances à des insecticides

La résistance d'une espèce cible peut être définie comme une diminution héréditaire de la sensibilité à un insecticide (Nauen, 2007). Au plan fondamental, il s'agit d'une adaptation au nouvel environnement, sélectionnée par la pression exercée par un ou plusieurs insecticides selon un processus de sélection naturelle. Les individus résistants sont porteurs d'une ou plusieurs mutations géniques (on parle d'allèles de résistance) codant des protéines qui interagissent avec l'insecticide. Ainsi, les protéines mutées empêchent l'insecticide d'atteindre sa cible, par exemple en le dégradant, ou en modifiant cette cible, permettant aux insectes porteurs de ces mutations de survivre à des doses d'insecticide normalement létales (Labbé et al., 2011). Les insecticides ne provoquent pas l'apparition de ces mutations directement, mais sélectionnent les individus qui les portent car ils sont aptes alors à survivre et à se reproduire en présence de ces insecticides. En conséquence, la fréquence de l'allèle ou des allèles de résistance augmente dans les populations exposées à l'insecticide au fur et à mesure des générations. Certaines espèces peuvent être résistantes à une très large gamme de composés, qu'ils soient d'origine chimique ou biologique.

L'extension des populations de vecteurs présentant des mécanismes de résistance multiple constitue une réelle menace pour les programmes de lutte. Les interactions entre plusieurs mécanismes de résistance ne sont pas forcément additives sur le phénotype (Raymond et al., 1989), mais peuvent engendrer de très fortes résistances par effet multiplicatif, comme cela est observé chez *Cx. quinquefasciatus* pour la mutation du gène *kdr* (protéine d'un canal à sodium) associée aux mutations du cytochrome P450s, avec des niveaux de résistance à la perméthrine pouvant être 10.000 fois plus élevés que chez les larves sensibles (Hardstone et al., 2009). Une baisse significative de l'efficacité des moustiquaires imprégnées et des aspersions intradomiciliaires a été observée au sud Bénin vis-à-vis des adultes d'*An. gambiae* présentant une résistance métabolique associée à la mutation de la cible des pyréthrinoïdes (N'Guessan et al., 2007). En Martinique, la résistance d'*Ae. aegypti*, vecteur de la dengue et du chikungunya, a atteint des niveaux tels que les pulvérisations spatiales de pyréthrinoïdes (deltaméthrine) et de pyréthrines sont devenues inefficaces pour réduire les densités de vecteurs (Marcombe et al., 2011).

Stratégies de gestion de la résistance et difficultés d'application

Afin de maintenir l'efficacité de la lutte antivectorielle, des stratégies de gestion de la résistance ont été développées. Elles consistent à utiliser plusieurs molécules à modes d'action différents pour réduire la pression de sélection qu'une seule molécule engendre, et réduire l'avantage sélectif des individus résistants lorsqu'un coût génétique est associé à la résistance. Ces stratégies sont basées sur l'utilisation séquentielle d'insecticides dans le temps (rotation) ou dans l'espace (mosaïques), ou sur l'association de plusieurs molécules en mélange. Dans la mesure où, en France, les opérateurs publics privilégient l'usage d'un seul adulticide (la deltaméthrine) et d'un seul larvicide (le *Bti*), ces stratégies de gestion de la résistance peuvent difficilement être mises en œuvre sur le territoire.

Une difficulté s'ajoute du fait qu'un même produit peut être utilisé en tant que biocide pour la lutte antivectorielle et en tant que produit phytopharmaceutique pour un usage agricole dans le cadre de différentes réglementations[46]. Il est donc nécessaire de prendre en compte l'usage agricole des

[46] Selon l'article 2 du règlement (UE) n° 528/2012, certains produits biocides peuvent être destinés à des usages qui relèvent du champ d'application d'autres réglementations. C'est notamment le cas de l'utilisation de biocides à des fins de protection des plantes, qui relève de la réglementation des produits phytopharmaceutiques (règlement (CE) n° 1107/2009 concernant la mise sur le marché des produits phytopharmaceutiques).

biocides dans la gestion du développement de résistance des moustiques. Idéalement, l'usage d'un même produit pour les deux objectifs devrait être harmonisé à l'échelle du territoire.

Paucité d'insecticides disponibles et développement limité

Si l'innovation phytopharmaceutique est relativement florissante dans le domaine agricole, force est de constater qu'aucune molécule nouvelle n'a été développée spécifiquement pour la santé publique ces 20 à 30 dernières années. Cette situation est liée à plusieurs facteurs, dont des facteurs réglementaires et économiques, comme l'augmentation des niveaux d'exigence règlementaire pour évaluer et limiter les effets non intentionnels en matière de toxicologie et d'écotoxicologie, l'hétérogénéité des réglementations d'un pays à l'autre – qui constitue un frein économique –, et la perspective d'un faible retour sur investissement au vu de la taille réduite du marché concerné.

La situation est particulièrement critique en termes d'insecticides disponibles en France, dont de nombreux départements et territoires sont situés en zone d'endémie (paludisme, dengue, chikungunya, Zika…). La recherche d'adulticides alternatifs, au(x) mode(s) d'action différent(s) de celui des seuls pyréthrinoïdes, est urgente pour rétablir l'efficacité de la lutte antivectorielle dans les DROM-COM où le vecteur *Ae. aegypti* est résistant, et pour prévenir ailleurs le risque de résistance à cette famille d'insecticides chez *Ae. albopictus*. Sollicitée en 2009, 2012 et 2015 par les ministères en charge de l'Environnement, de la Santé, du Travail, et dernièrement de l'Agriculture, l'Anses a émis trois avis qui s'inscrivent dans cet objectif (Anses, 2011, 2013, 2016).

Face à ce constat, il est nécessaire de développer des méthodes de lutte antivectorielle alternatives et/ou complémentaires à l'utilisation de biocides ; certaines sont déjà disponibles et mises en œuvre, comme la lutte biologique et la lutte physique et environnementale présentées ci-dessous.

4.1.2. Lutte biologique

Dans le domaine de la lutte antivectorielle, le principe de la lutte biologique est d'utiliser un « ennemi naturel » d'un arthropode pour en diminuer les populations et ainsi réduire les risques de transmission du pathogène. Parmi les ennemis naturels des moustiques, on peut distinguer les prédateurs et les pathogènes (Fontenille et al., 2009).

Prédateurs

- Poissons culicivores larvivores

L'utilisation de poissons consommateurs de larves de moustiques est efficace contre les moustiques vivant dans des collections d'eau permanentes et en nombre limité pour pouvoir en assurer le suivi. Des poissons larvivores de l'espèce *Aphanius dispar* ont ainsi été employés pour la lutte contre le paludisme à Djibouti, ou *Gambusia affinis* contre les larves d'*Anopheles sacharovi* en Grèce, d'*An. stephensi* en Inde, et de plusieurs espèces d'anophèles d'Afrique du Nord et du Moyen-Orient (Chandra et al., 2013; Collins and Paskewitz, 1995).

Concernant le territoire français, les Gambusies ont été introduites en Corse en 1924 et sur le territoire continental entre 1927 et 1931 pour lutter contre le paludisme (Walton et al., 2012). L'introduction de poissons larvivores exotiques, tels que les Gambusies, présente cependant le risque de créer un déséquilibre écologique du fait qu'ils restent en général des prédateurs non exclusifs dans le choix de leurs proies (Chandra et al., 2008). Dans le cadre de la démoustication en zone urbaine et de la lutte contre la nuisance liée aux *Aedes* stégomyiens, il est toutefois communément préconisé aux services techniques chargés de l'entretien des parcs municipaux contenant des pièces d'eau, et aux résidents possédant dans leur jardin une mare ou un petit bassin d'agrément, d'y mettre des poissons (carpe koï, poisson rouge, etc.) comme mesure efficace de contrôle.

- Copépodes

La lutte biologique contre les *Aedes* fait aussi appel à des copépodes du genre *Mesocyclops* (Howard, 2013). Ces crustacés prédateurs de 1 à 2 mm sont capables de tuer de 20 à 40 jeunes larves d'*Aedes* par jour. Leur utilisation par ensemencement des récipients de stockage d'eau à usage domestique peut réduire les densités larvaires de 95-100 % pendant plusieurs mois. Cette méthode est appliquée dans le cadre de programmes de lutte intégrée en Asie du Sud-Est (Vietnam, Thaïlande) (Kay and Nam, 2005; Kittayapong et al., 2006; Nam et al., 2012). Elle a également été testée en Floride (Baldacchino et al., 2015). Plus récemment, des essais semi-contrôlés sur le terrain avec l'espèce *Macrocyclops albidus* ont donné des résultats prometteurs pour contrôler *Ae. albopictus* en Italie (Veronesi et al., 2015). La présence de copépodes semble aussi attirer des moustiques femelles en quête de gîtes de ponte inoculés avec des copépodes ; des conteneurs maintenus en eau en permanence constitueraient donc des pièges à oviposition (Marten and Reid, 2007). Si les copépodes semblent un outil intéressant dans le cadre d'une lutte intégrée en zone urbaine, il faut prendre en compte qu'ils ne peuvent survivre si les conteneurs se dessèchent (Marten and Reid, 2007). L'utilisation de copépodes sur un territoire français de métropole ou d'outre-mer nécessiterait un volet de recherche préalable, incluant notamment l'identification d'une espèce qui soit à la fois prédatrice des moustiques ciblés, non vectrice d'agents pathogènes locaux, et autochtone, pour éviter l'introduction d'une espèce invasive et minimiser l'impact sur l'équilibre écologique local.

- *Toxorhynchites*

Il existe également des larves de moustiques prédatrices d'autres larves. Par exemple, les moustiques du genre *Toxorhynchites* présentent des larves très voraces qui se développent dans de petits gîtes comme les creux d'arbres ou les feuilles engainantes (gîtes inaccessibles aux autres méthodes et abritant d'importants vecteurs) ; certaines espèces s'élèvent et sont productibles en nombre. Ces moustiques ne sont pas hématophages. Cette méthode de lutte n'est pas pratiquée en Europe étant donné qu'il s'agit d'espèces d'origine tropicale et sub-tropicale. Des lâchers expérimentaux de *Toxorhynchites* ont été effectués en Polynésie française dans les années 1970s ; l'espèce s'est bien adaptée mais la réduction des populations d'*Ae. polynesiensis* et *aegypti* n'a pas été suffisante pour diminuer les transmissions respectives de filariose et de dengue (Rivière et al., 1979).

Pathogènes

Des bactéries, champignons et virus entomopathogènes ont été étudiés pour le contrôle des vecteurs.

- Bactéries entomopathogènes

Les bactéries *Bti* et *Lsph* sont d'efficaces larvicides, caractérisées par leur spécificité d'action. Homologuées en tant que produits biocides, leur utilisation et leurs modes d'action sont décrits dans la section sur l'utilisation des biocides (section 4.1.1.).

- Champignons entomopathogènes

L'infection des moustiques adultes par les spores de *Beauveria bassiana* et *Metarhizium anisopliae* entraîne leur mort en quelques jours, réduisant potentiellement de 80 fois la capacité des anophèles à transmettre *Plasmodium* sp. (Blanford et al., 2005). Les moustiques infectés deviennent aussi plus sensibles aux insecticides neurotoxiques, ce qui permet d'envisager leur utilisation en synergie avec les méthodes de lutte chimique (Farenhorst et al., 2009). La principale limitation à leur utilisation à grande échelle reste leur forte sensibilité aux facteurs abiotiques comme la température, l'humidité et le rayonnement ultra-violet, qui modifient leur infectiosité.

- Virus entomopathogènes

Les virus spécifiques d'insectes, densovirus ou baculovirus, ont également été évoqués mais les études n'en sont encore qu'au stade expérimental. Les densovirus sont des virus entomopathogènes très spécifiques : de nombreuses études de toxicité contre d'autres espèces animales ont été

réalisées et ont montré que l'infectiosité et la virulence des densovirus sont limitées au genre ou à la famille d'insectes dont ils ont été isolés. Par exemple, AeDNV (une espèce isolée d'une colonie de laboratoire de *Ae. aegypti*), est capable d'infecter les moustiques des genres *Aedes* et *Culex* uniquement, mais pas ceux du genre *Anopheles* (Carlson et al., 2006). Après transmission verticale de la femelle au gîte larvaire, le virus est multiplié localement par les larves. Lorsque la densité du virus est faible, les larves donnent naissance à des adultes infectés alors qu'avec l'augmentation de sa densité, une grande partie des larves meurent. Un gîte infecté le reste même suite à une dessication prolongée (plus d'un an) (Carlson et al., 2006). Une préparation d'AeDNV consistant de larves infectées d'*Ae. aegypti* dans une solution saline tamponée aux phosphates mélangée à du glycerol et connue sous le nom de "Viroden" (Buchatskiĭ et al., 1986) a été testée avec succès dans de larges zones géographiques en tant que pesticide microbien en Ukraine, Russie et Tadjikistan (Carlson et al., 2006).

N.B. Dans l'Union européenne, l'utilisation des agents entomopathogènes dans la lutte antivectorielle doit être encadrée sur le fondement de la réglementation biocide. Pour l'instant, seules les bactéries Bti et Lsph sont homologuées en tant que produits biocides et décrites en tant que tels dans la rubrique précédente.

4.1.3. Lutte physique et environnementale

Dans le domaine de la lutte antivectorielle, la lutte physique et environnementale a pour objectifs principalement l'élimination des gîtes larvaires, la modification des habitats favorables aux adultes, l'utilisation de pièges attractifs et la mise en place de protection physique empêchant le contact hôtes-vecteurs.

Lutte physique ou mécanique

La lutte physique ou mécanique regroupe les méthodes de capture des vecteurs au moyen de pièges (dans un but de diminution de l'abondance), les méthodes qui s'opposent au contact hôte/vecteur et, par extension, les méthodes d'évitement du contact avec l'hôte (Fontenille et al., 2009).

De nombreux types de pièges sont disponibles pour piéger les *Aedes*, ciblant soit les femelles gravides (pièges pondoirs), soit les femelles en recherche d'hôtes, tels que les pièges BG-Sentinel® (Biogents AG, Regensburg, Germany) ou Mosquito Magnet® (http://www.mosquitomagnet.com/) (Baldacchino et al., 2015). Ces pièges sont très utilisés non pour la lutte antivectorielle mais pour la surveillance passive, la détection des espèces inféodées aux micro-gîtes anthropiques ou l'étude de la dynamique des populations de vecteurs (Dowling et al., 2013).

Le piégeage de masse basé sur des attractants a été suggéré comme moyen pour réduire les populations adultes de moustiques (Kline, 2007). Plusieurs expériences visant à contrôler *Ae. aegypti* au moyen de pièges pondoirs létaux ont été menées avec plus ou moins de succès (Baldacchino et al., 2015). Le développement de stimulants d'oviposition pourrait conduire à un bien meilleur contrôle des populations au moyen de ce type de pièges. Des études ont démontré, notamment au Brésil et en Italie, que les BG-Sentinel®, seuls ou avec source de CO_2 ou l'attractif BG-Lure®, sont efficaces pour capturer *Ae. aegypti* ou *Ae. albopictus* (Baldacchino et al., 2015), sans démontrer toutefois une efficacité apte à réduire les populations à l'échelle d'une lutte antivectorielle.

Au final, la stratégie recourant au piégeage de moustiques adultes, utilisé soit de manière massive, avec une finalité de lutte communautaire, soit au sein même des habitations, avec une finalité de protection individuelle, n'est pas nouvelle, mais elle est remise au goût du jour, avec de nouveaux systèmes de piégeage en cours de développement, certains au stade de l'évaluation. Il s'agit de vérifier leur faisabilité et efficacité au cas par cas (espèces, biotopes, rural, urbain, importance des zones à protéger, aptitude des espèces à être attirées…), et ne pas exclure d'autres méthodes de lutte complémentaires comme la gestion de l'eau, la maîtrise des irrigations, le recours aux

traitements au *Bti*, etc. Il n'existe toutefois pas de preuve de concept en termes épidémiologiques sur l'efficacité du piégeage de moustiques comme outil de lutte antivectorielle aujourd'hui.

Les mesures de lutte physique à des fins de protection physique empêchant le contact hôtes-vecteurs consistent en la mise en place de grillage moustiquaire aux portes et fenêtres, pour réduire l'entrée des moustiques endophages, et en l'utilisation de moustiquaires comme moyen de protection individuelle. Utilisées depuis des siècles, ces dernières sont progressivement remplacées par des tissus imprégnés d'insecticide (voir section 4.1.1. sur l'utilisation des biocides).

Lutte environnementale

La lutte dite environnementale regroupe toutes les actions menées sur l'environnement pour le rendre hostile au développement des populations de vecteurs (Fontenille et al., 2009). Les mesures de gestion environnementale peuvent être temporaires ou définitives, et viser l'élimination de gîtes larvaires ou la perturbation des gîtes d'adultes.

Les modifications temporaires incluent l'utilisation de systèmes d'irrigation permettant un assèchement ponctuel des gîtes, empêchant les larves d'achever leur développement, l'élimination de plantes aquatiques (faucardage), réduisant les zones refuges larvaires des espèces qui ne supportent pas l'ensoleillement, ainsi que les actions de gestion quotidienne sur une base individuelle, collective ou publique. En effet, dans le cas des espèces de moustiques utilisant les collections d'eau d'origine anthropique (coupelles, boîtes de conserve, réserves d'eau…) comme *Ae. albopictus* et *Ae. aegypti*, la sensibilisation du public est indispensable pour limiter la disponibilité de ces habitats larvaires, soit par élimination mécanique, soit en recouvrant de façon étanche toute collection d'eau. Des mesures d'hygiène publique sont également nécessaires, la gestion des déchets ménagers étant extrêmement importante.

Les modifications définitives incluent l'assèchement des zones humides, la rénovation des fossés ou des canaux en béton pour éviter la stagnation des eaux, ou encore l'amélioration de l'habitat. Celle-ci couvre un ensemble de préconisations en vue d'adapter ou de modifier la conception ou la configuration du mobilier urbain, des ouvrages d'art, des réseaux d'assainissement et d'évacuation des eaux de pluie, des constructions et bâtiments de toute nature, afin d'éviter de créer des gîtes larvaires durables susceptibles d'accueillir et de permettre la prolifération des moustiques dans l'habitat humain, en particulier dans les milieux urbains et péri-urbains. Idéalement, une telle démarche devrait être conduite préventivement ; elle est actuellement essentiellement curative.

Au terme de ce panorama des techniques de lutte antivectorielle existantes, la remarque suivante de l'OMS mérite d'être soulignée : malgré l'application assidue des méthodes de lutte existantes, incluant les améliorations et l'usage étendu des moustiquaires imprégnées d'insecticide, les maladies transmises par les moustiques telles que la dengue ou le paludisme continuent de poser des défis majeurs de santé dans le monde (WHO, 2014). Les experts de l'OMS ont notamment indiqué qu'il ne fallait pas compter sur les outils existants pour éradiquer le paludisme. Les limites des méthodes de lutte actuelle incluent : l'impossibilité d'atteindre l'ensemble des gîtes larvaires et des sites de repos des adultes, le comportement des vecteurs, qui peuvent piquer à l'extérieur des habitations ou aux heures où la population n'est pas protégée par les moustiquaires, le développement de la résistance à des insecticides, des préoccupations concernant l'impact sur l'environnement et la santé associé aux insecticides, des questions d'infrastructure et de respect des recommandations des agents de la lutte antivectorielle (« *compliance* » dans le texte anglais), sans oublier la problématique importante du coût. Des techniques innovantes sont requises, qui permettraient des solutions rapides, efficaces, durables et rentables (WHO, 2014).

Le CS souligne que, s'il a examiné les techniques innovantes de lutte antivectorielle, il ne néglige pas l'utilisation adaptée des techniques classiques de lutte dans des combinaisons appropriées, ainsi que les aspects socio-économiques (traités par le CEES).

4.2. Autres techniques émergentes basées sur des lâchers de moustiques

Aux côtés des techniques émergentes de lutte antivectorielle basées sur l'utilisation de moustiques génétiquement modifiés se développent des techniques voisines, également basées sur des lâchers de moustiques.

4.2.1. Technique de l'insecte stérile classique (TIS)

Principe

Le principe de la TIS est ancien ; c'est le principe présenté en 3.2.1., mis en œuvre par la technique RIDL, visant une réduction de la densité voire une élimination d'une population de moustiques cibles par le biais de lâchers inondatifs et récurrents de moustiques mâles stériles. Dans l'application classique de la TIS, la stérilisation des mâles est induite peu avant leur lâcher, principalement par irradiation ionisante. Elle peut également l'être par des agents chimiques.

Historique général et cas particulier des moustiques

Conceptualisée dans les années 1950s (Knipling, 1955), la TIS classique a été mise en œuvre pour la première fois en 1955 (Bushland et al., 1955). Elle a depuis cumulé de nombreux succès, comme l'élimination de la lucilie bouchère (*Cochliomyia hominivorax*) d'Amérique du Nord et d'Amérique centrale entre 1957 et 2006 (Wyss, 2006) et de Libye en 1992 (Vargas-Teran et al., 2005), ou l'élimination des glossines (*Glossina* sp., plus communément appelées mouches tsé-tsé) de l'île de Zanzibar (Vreysen et al., 2000). Son utilisation actuelle principale concerne les insectes ravageurs des cultures, en particulier les mouches des fruits (Enkerlin et al., 2015).

La TIS classique figure néanmoins parmi les techniques émergentes de lutte antivectorielle contre les moustiques car son application aux moustiques est toujours en développement. Benedict et Robinson relatent les nombreuses tentatives de mise en œuvre de la technique sur différentes espèces de moustiques depuis le début des années 1960s (Benedict and Robinson, 2003). Quelles que soient les espèces de moustiques concernées, les échecs ont été attribués essentiellement à trois facteurs : (1) une production insuffisante de moustiques, due en partie à l'absence de souches de sexage (pour la séparation des mâles et des femelles), (2) une perte en vigueur des mâles stériles, (3) une immigration de moustiques sauvages dans les zones de lâcher (Benedict and Robinson, 2003).

Etat des lieux de la recherche

A part les aspects propres à l'irradiation elle-même, les difficultés associées aux techniques de production et de mise en œuvre des moustiques TIS sont communes à toutes les techniques impliquant des lâchers de moustiques et sont d'autant plus significatives que les techniques nécessitent des élevages de masse. L'amélioration récente des méthodes d'élevage de plusieurs espèces de moustiques des genres *Anopheles* et *Aedes*, mise au point à l'IPCL (Laboratoire FAO/AIEA de lutte contre des insectes) en collaboration avec de nombreux chercheurs au niveau international, profite ainsi à toutes ces techniques émergentes (Bourtzis et al., 2016; Lees et al., 2015). Les plus grands défis demeurent la mise au point d'une technique de sexage infaillible, ainsi que le développement de systèmes de lâchers aériens de moustiques (voir section 4.3.3.).

Par ailleurs, spécifiques à la TIS classique, les protocoles d'irradiation des moustiques avec une dose suffisante pour induire la stérilité complète sans réduire de manière significative les performances des mâles sont maintenant bien établis chez plusieurs espèces importantes. Des tests dans des grandes cages placées en laboratoire et dans l'environnement ont montré que les mâles stérilisés de plusieurs espèces étaient aussi compétitifs que les mâles non traités pour les femelles sauvages (Madakacherry et al., 2014; Oliva et al., 2012; Oliva et al., 2013; Yamada et al., 2014) – il est cependant nécessaire de confirmer leur compétitivité par des lâchers de terrain. De bon augure pour leur compétitivité sur le terrain, les mâles irradiés d'*An. arabiensis* lâchés au Soudan se sont montrés aptes à participer à des essaims de moustiques et à en initier de nouveaux (Ageep et al., 2014). Par

ailleurs, certains protocoles peuvent fixer intentionnellement un objectif de 95 % de stérilité pour favoriser la compétitivité des mâles, mais ce principe n'est pas recommandé par l'AIEA, qui préconise une stérilité complète des mâles relâchés (voir 4.3.4.).

Bilan sur le terrain

Bien qu'aucun projet de TIS classique n'ait encore atteint le stade de lâchers opérationnels pour un objectif de réduction ou d'élimination de population de moustiques à l'échelle d'un territoire, de nombreuses avancées au cours de la dernière décennie ont permis de valider la technique et d'initier plusieurs projets pilotes. La démonstration récente la mieux documentée du potentiel de la TIS classique contre les moustiques a été apportée par les essais pilotes sur *Ae*. *albopictus* en Italie entre 2005 et 2009 (Bellini et al., 2013)[47]. De nombreux essais de terrain s'annoncent, dans le cadre de projets de coopération technique avec l'AIEA, pour différentes espèces de moustiques, dans des environnements très variés de l'océan Indien, des Amériques, d'Afrique et d'Europe (voir rapport du GT, section 3.2.1 et Annexe 11). On peut en particulier souligner ici l'expérimentation de TIS réalisée en Allemagne (Rapport du GT, Annexe 11) pour éliminer les premiers moustiques invasifs *Ae. albopictus* dans le cadre d'un programme intégré de lutte en prévention à une invasion plus conséquente (Becker et al., 2017). Concernant les territoires français, aucun essai n'est prévu en métropole, malgré l'établissement effectif d'*Ae. albopictus* dans trente de ses départements ; des expérimentations préliminaires ont été réalisées en conditions semi-contrôlées à La Réunion en vue de renforcer la lutte contre *Ae. albopictus* dans les différentes îles de la région, *Ae. albopictus* étant responsable de l'épidémie majeure de chikungunya qui y a sévi entre 2005 et 2007 (Damiens et al., 2016; Oliva et al., 2012; Oliva et al., 2013).

Perspectives de développement : TIS couplée à l'auto-dissémination de larvicides

Il a récemment été proposé d'utiliser les mâles stériles pour contaminer spécifiquement les femelles sauvages avec des analogues de l'hormone de croissance comme le pyriproxifène (Bouyer and Lefrançois, 2014), permettant de transposer à grande échelle la méthode d'auto-dissémination de larvicides présentée plus haut (voir 4.1.3.). Cette méthode pourrait également être utilisée pour disséminer d'autres agents de contrôle biologique comme des bactéries, des virus ou des champignons, comme cela a été testé avec succès récemment chez les mouches des fruits (Flores et al., 2013). Un projet de recherche, récemment initié par le CIRAD et l'IRD (ERC REVOLINC), propose de tester cette technique contre *Ae. albopictus* avec des densovirus (Bouyer et al., 2016). Selon des modèles préliminaires, celle-ci pourrait permettre de diminuer de 10 à 100 fois la quantité de mâles stériles nécessaire pour éradiquer une population cible (Pleydell and Bouyer, 2016).

Ainsi, bien que le principe de la technique de l'insecte stérile (TIS) classique soit ancien et qu'il ait déjà été appliqué à d'autres insectes vecteurs ou ravageurs avec succès, son application à la réduction ou l'élimination de population de moustiques est toujours en développement. De nombreux essais de terrain sont en préparation de par le monde, en coopération technique avec l'AIEA, ciblant différentes espèces d'*Aedes* et des *Anopheles*. Concernant les territoires français, aucun essai n'est prévu en métropole ; un essai est en préparation à La Réunion contre *Ae. albopictus*.

[47] Les nymphes mâles stériles, triées par tamisage et lâchées dans cinq sites urbains entre 16 et 45 ha ont induit entre 18 et 68 % de stérilité dans les populations natives de moustiques, selon des mesures d'éclosion d'œufs. Les résultats de ces essais indiquent qu'il serait nécessaire d'induire un niveau minimal de stérilité des femelles de 81 % pour obtenir l'élimination de la population locale [Bellini, R., Medici, A., Puggioli, A., Balestrino, F., and Carrieri, M. (2013). Pilot field trials with *Aedes albopictus* irradiated sterile males in Italian urban areas. J Med Entomol *50*, 317-325.].

4.2.2. Techniques utilisant *Wolbachia*

Wolbachia

Les bactéries *Wolbachia pipientis* (Rickettsiaceae) sont des bactéries intracellulaires très fréquentes chez les arthropodes ; d'après les dernières estimations, 40 % des espèces d'arthropodes seraient infectées (Zug and Hammerstein, 2012).

Les *Wolbachia* infectent autant les mâles que les femelles, mais sont transmises exclusivement par voie maternelle. Dotées de diverses propriétés qui ont pour effet d'altérer la reproduction de leur hôte (ex : la mortalité des mâles ou leur féminisation, l'induction de parthénogenèse[48], ou encore l'incompatibilité cytoplasmique), les *Wolbachia* favorisent la production de femelles infectées et leur propre propagation dans les populations hôtes. En cela, *Wolbachia* fait partie des éléments dotés d'une héritabilité super-mendélienne, qui pourraient être exploités pour propager des caractères génétiques dans la population par forçage génétique[49] (voir section 3.1.2.3.).

Propriétés d'incompatibilité cytoplasmique (IC) et d'interférence avec le pathogène (IP)

Chez les moustiques, les *Wolbachia* sont généralement responsables d'incompatibilité cytoplasmique (IC)[50]. L'IC se caractérise par une mortalité conditionnelle des embryons issus d'un croisement entre un mâle infecté et une femelle non infectée, ou infectée par une souche de *Wolbachia* incompatible. Les mâles infectés ne peuvent donc avoir de descendance qu'avec des femelles infectées par une souche de *Wolbachia* compatible. A la différence des mâles, les femelles infectées sont capables de produire une descendance viable quel que soit le statut, infecté ou non, des mâles avec lesquels elles s'accouplent, sauf dans le cas particulier où ils sont infectés par une *Wolbachia* incompatible (on parle alors d'IC bi-directionnelle). C'est ainsi que l'IC favorise la reproduction des femelles infectées. Comme les *Wolbachia* sont exclusivement transmises par les femelles, l'IC favorise la propagation de leur propre infection dans la population de moustiques (Caragata et al., 2016).

Les bactéries *Wolbachia* peuvent également interférer avec la transmission, par certains moustiques, de certains virus ou autres parasites. En d'autres termes, elles interfèrent avec la compétence vectorielle de certains moustiques pour certains pathogènes. Ce phénotype est appelé interférence avec le pathogène (IP) (Moreira et al., 2009).

La capacité à générer des phénotypes d'IC et d'IP chez leurs hôtes fait de *Wolbachia* un potentiel outil de choix pour la lutte antivectorielle. Deux approches sont envisagées : la technique de l'insecte incompatible, et la propagation d'une interférence avec le pathogène, présentées ci-dessous.

4.2.2.1. Technique de l'insecte incompatible (TII)

Principe

La technique de l'insecte incompatible (TII) est une variante de la TIS qui découle exclusivement de la propriété d'IC de *Wolbachia*. Elle permet une réduction ou une élimination d'une population de moustiques cibles par l'intermédiaire de lâchers inondatifs et récurrents de moustiques mâles infectés par *Wolbachia*. A la différence de la TIS classique, ces moustiques ne sont pas stériles mais stérilisants de par leur incompatibilité avec les femelles locales : des mâles infectés par *Wolbachia* ne pourront avoir de descendance viable avec des femelles locales non infectées, ou infectées par une *Wolbachia* incompatible.

[48] A la connaissance des experts du groupe de travail, les phénomènes de parthénogenèse (reproduction à partir d'un gamète femelle non fécondé) et de mortalité ou féminisation des mâles n'ont pas été rapportés chez les moustiques.

[49] *Wolbachia* n'ayant pu être génétiquement transformée jusqu'à présent, elle n'a pu être considérée pour propager un transgène à ce jour.

[50] Une exception à cette règle a été identifiée : la souche de *Wolbachia* identifiée chez une fraction des moustiques de l'espèce *An. gambiae* ne semble pas provoquer d'IC envers les *An. gambiae* non infectés [Shaw, W.R., Marcenac, P., Childs, L.M., Buckee, C.O., Baldini, F., Sawadogo, S.P., Dabire, R.K., Diabate, A., and Catteruccia, F. (2016). *Wolbachia* infections in natural *Anopheles* populations affect egg laying and negatively correlate with *Plasmodium* development. Nature Communications *7*.].

Intérêt de combiner la TII avec la TIS : la stratégie TII-TIS

Dans le cas de la TIS classique et de RIDL, autre technique dérivée de la TIS, on a souligné l'importance de ne relâcher que des mâles, pour éviter d'augmenter la transmission de pathogènes d'une part et maximiser l'efficacité des interventions d'autre part (voir 3.2.1.). Dans le cas de la TII, c'est une condition impérative pour le fonctionnement même de la technique. En effet, un lâcher accidentel de femelles infectées par *Wolbachia* résulterait en une modification de la population locale dépourvue de ces bactéries plutôt qu'en une réduction de population, en conséquence de la possibilité d'accouplement fertile des femelles relâchées avec les mâles sauvages et de la propagation de *Wolbachia* qui s'en suivrait dans la population. Les méthodes actuelles de sexage ayant une fiabilité limitée, deux solutions ont été suggérées :

1- l'utilisation d'une incompatibilité cytoplasmique bi-directionnelle (les moustiques relâchés étant infectés par une souche de *Wolbachia* incompatible avec la souche infectant la population sauvage), qui permet de s'assurer que les femelles relâchées n'auront pas de descendance avec les mâles sauvages. On ne pourra toutefois pas empêcher les femelles relâchées de s'accoupler avec des mâles relâchés. Cette option n'est par ailleurs pas applicable à une population sauvage dépourvue de bactéries *Wolbachia* ;

2- comme alternative plus efficace, il est possible de combiner la TII avec une TIS à faibles doses d'irradiation pour stériliser les femelles sans avoir pour objectif de stériliser les mâles, dont la stérilisation requiert des doses plus élevées d'irradiation. Ainsi, le risque de lâcher accidentel de femelles fertiles est éliminé, alors que la stérilité mâle est assurée par le biais de l'IC induite par *Wolbachia*, possiblement renforcée par l'irradiation (Arunachalam and Curtis, 1985; Brelsfoard et al., 2009; Calvitti et al., 2015).

En comparaison avec l'utilisation de la TIS seule, la combinaison TII-TIS présente également l'avantage que les femelles accidentellement relâchées bénéficieront de l'effet d'IP éventuellement associé à *Wolbachia*, qui devrait réduire leur capacité à transmettre le pathogène. L'IP n'étant pas une propriété systématique, elle devra être vérifiée avant le lâcher. Il faudrait enfin pouvoir s'assurer de l'absence d'impact de l'irradiation sur les phénotypes d'IP et d'IC associés à *Wolbachia*, ce qui est difficilement réalisable par nature, chaque individu irradié étant unique. Des mutations aléatoires par irradiation pourraient affecter la capacité d'IC de *Wolbachia* – et donc le fonctionnement de la TII –, et la capacité d'IP de *Wolbachia* – et donc la compétence vectorielle des femelles accidentellement relâchées. Les femelles étant stériles, une éventuelle mutation non souhaitable chez *Wolbachia* n'aurait toutefois aucune chance de se propager dans l'environnement étant donné que les bactéries *Wolbachia* ne seraient pas transmises (si l'on suppose que la stérilité des femelles est de 100 %). En l'absence de méthode de sexage efficace à 100 %, l'AIEA préconise l'approche combinée TII-TIS plutôt que la TIS seule.

4.2.2.2. Propagation d'une interférence avec le pathogène (IP)

Principe

La technique de propagation d'une interférence avec le pathogène consiste à utiliser les bactéries *Wolbachia* pour modifier une population de moustiques dans le but de la rendre plus résistante à la transmission d'un pathogène donné. Elle s'apparente en cela à une technique de forçage génétique qui propagerait un facteur interférant avec la compétence vectorielle des moustiques (voir section 3.1.2.3.). Cette technique est basée à la fois sur les propriétés d'IC et d'IP de *Wolbachia*, l'IC conférant la capacité de propagation de *Wolbachia* au sein de la population, et l'IP fournissant le phénotype de résistance à la transmission du pathogène.

La technique repose sur des lâchers de moustiques mâles et femelles[51] infectés par une souche de *Wolbachia*. Dès les premiers accouplements avec des mâles sauvages, les femelles infectées initient la propagation de *Wolbachia* au sein de la population. Les lâchers sont poursuivis jusqu'à ce que la fréquence de l'infection par *Wolbachia* atteigne un seuil qui permette l'invasion de l'infection dans la population ciblée. L'augmentation de la fréquence de *Wolbachia* dans la population de moustiques devrait se traduire, *via* ses propriétés d'IP, par une réduction de la transmission du pathogène.

Pour assurer le succès de cette technique, la souche de *Wolbachia* utilisée doit respecter plusieurs conditions :

1- pour permettre l'invasion et le maintien de son infection dans la population de moustiques ciblées, elle doit être caractérisée par une IC élevée et stable, uni-directionnelle[52] avec les moustiques locaux, une transmission maternelle élevée, et un faible coût en vigueur vis-à-vis des moustiques hôtes ciblés ;

2- pour assurer la résistance à la transmission du pathogène sur la durée, elle doit être responsable d'une IP stable dans le temps et qui n'est pas significativement affectée par les conditions environnementales.

Ces conditions dépendent de la nature et de la stabilité de l'IC, de l'IP, de la transmission maternelle et du coût génétique possible de *Wolbachia* pour le moustique. Si les conditions concernant l'IC semblent relativement prévisibles, les autres sont plus délicates à anticiper et assurer sur la durée (voir ci-dessous).

On note qu'à la différence de toutes les autres techniques basées sur des lâchers de moustiques, celle-ci repose sur des lâchers de femelles, avec les éventuels risques de transmission de pathogènes associés (voir section 4.3.4.)

4.2.2.3. Etat des lieux de la recherche et bilan des expérimentations

Wolbachia chez les moustiques

Toutes les espèces de moustiques ne sont pas naturellement infectées par *Wolbachia*. Parmi les espèces vectrices discutées dans cet avis, *Ae. albopictus* et *Cx. pipiens* le sont (Caragata et al., 2016). Les moustiques du complexe *Cx. pipiens* sont infectés par diverses souches appartenant au clade *Wolbachia* *w*Pip (Atyame et al., 2014). Ces infections sont fixées (c.-à-d. tous les individus sont infectés à travers le monde) (Duron et al., 2005). De même, *Ae. albopictus* est bi-infecté par *w*AlbA et *w*AlbB quasiment partout dans le monde (Tortosa et al., 2010). Dans ces associations naturelles, les *Wolbachia* sont souvent en faible densité, peu coûteuses en valeur sélective, c'est-à-dire qu'elles n'altèrent pas excessivement l'aptitude des insectes à se reproduire, tout en étant responsables d'IC. Elles ne mènent cependant qu'à très peu d'IP (Zug and Hammerstein, 2015).

Transinfections de moustiques et effet sur les propriétés d'IC et d'IP

Les programmes pilotes de lutte antivectorielle menés en Australie et en Asie du Sud-Est font donc souvent appel à des transinfections, qui sont des infections artificielles d'un nouvel hôte non naturel par injection de *Wolbachia* dans des femelles adultes, ou plus efficacement dans le cytoplasme des œufs (Hughes and Rasgon, 2014). Il est également possible d'infecter un hôte non naturel avec

[51] On notera qu'un lâcher exclusif de femelles portant les bactéries *Wolbachia* conduirait également à une modification de la population locale dépourvue de ces bactéries en une population portant ces bactéries, avec de surcroît un fond génétique plus proche de la population de terrain que si des mâles sont également relâchés. Le tri n'étant toutefois pas nécessaire au succès de la stratégie de modification de population, il n'est pas mis en œuvre par souci d'éviter une contrainte technique significative. On note par ailleurs que le lâcher de mâles accélère le processus de modification de population, leur accouplement avec les femelles sauvages, dépourvues de *Wolbachia*, empêchant celles-ci d'avoir une descendance.

[52] Une IC uni-directionnelle est induite quand les moustiques relâchés sont porteurs de *Wolbachia* tandis que les moustiques sauvages ne sont infectés par aucune *Wolbachia*, par opposition à une IC bi-directionnelle, induite dans le cas où les moustiques sauvages sont infectés par une souche de *Wolbachia* incompatible avec la souche infectant les moustiques relâchés.

Wolbachia par introgression, s'il n'y a pas de barrière d'accouplement due à l'isolement reproductif des espèces[53]. Si l'hôte receveur est déjà naturellement infecté, il pourra soit être débarrassé de ses *Wolbachia* par traitements antibiotiques avant la transinfection, soit être superinfecté du fait de la transinfection artificielle d'une *Wolbachia* supplémentaire.

Ces transinfections peuvent être stables et héritables dans certains cas, mais sont souvent difficiles à établir et peuvent nécessiter une habituation des *Wolbachia* en culture sur des cellules du nouvel hôte pendant de nombreuses générations (Hughes and Rasgon, 2014), entraînant une possible dérive génétique des bactéries. Certaines transinfections de moustiques vecteurs se sont révélées impossibles et ce malgré de très nombreux essais, notamment celle d'*An. gambiae* vecteur de l'agent du paludisme (Hughes and Rasgon, 2014). L'influence du microbiote avec notamment le rôle de la bactérie *Asaia* a été montrée dans l'établissement de *Wolbachia* dans un nouvel hôte (Hughes et al., 2014; Rossi et al., 2015).

Dans tous les cas étudiés, la transinfection est responsable d'IC, et les effets de *Wolbachia* sont en général plus forts dans ces nouvelles associations « non naturelles », souvent corrélées à de fortes densités d'infection. Les possibilités d'évolution des densités et de l'IC sont abordées dans la section 4.3.4.. Le mécanisme moléculaire de l'IC est en cours d'élucidation (Beckmann et al., 2017; LePage et al., 2017).

En revanche, les propriétés d'IP, ainsi que le coût génétique infligé par *Wolbachia* au moustique hôte, sont variables selon la souche de *Wolbachia* transinfectée, l'hôte receveur, les pathogènes concernés et les conditions environnementales (Caragata et al., 2016). Dans certains cas, assez rares, les interactions moustiques/*Wolbachia* conduisent à une augmentation de l'intensité virale ou parasitaire. C'est le cas de *w*AlbB chez *Cx. tarsalis* qui augmente la sensibilité au virus West Nile (Dodson et al., 2014). Le mécanisme moléculaire de l'IP est encore mal compris et semble de nature multiple : les transinfections s'accompagnent de changements transcriptionnels extensifs chez l'hôte receveur avec augmentation de l'expression de gènes de l'immunité, variation d'activité mitochondriale, changements de méthylation de gènes, production accrue de dérivés toxiques d'oxygène (*reactive oxygen species*), qui pourrait être liée au métabolisme du fer, changements tous plus ou moins liés au phénotype d'IP (Brownlie et al., 2009; Caragata et al., 2016; Sicard et al., 2014). Par ailleurs, les *Wolbachia* et les virus sont connus pour être en compétition pour les lipides de l'hôte et d'autres ressources. Enfin, les *Wolbachia* produisent des petits ARN et modifient le profil des petits ARN de leur hôte, ce qui pourrait également participer à l'IP (Hussain et al., 2011; Woolfit et al., 2015).

Autres effets associés à Wolbachia éventuellement exploitables en lutte antivectorielle

Wolbachia et impact sur la longévité : certaines souches virulentes de *Wolbachia*, comme *w*MelPop, souche mutante originaire d'une drosophile de laboratoire, et ses dérivées, ont été proposées pour diminuer la durée de vie des moustiques vecteurs de maladies, les rendant ainsi incapables de transmettre les parasites (Sinkins and O'Neill, 2000). La lignée *w*MelPop exprimant également une IC complète, il a été suggéré qu'elle pourrait facilement envahir des populations naturelles et persister dans le temps (McMeniman et al., 2009). Cependant, l'infection avec *w*MelPop-CLA ayant des effets délétères majeurs sur ses hôtes, cet objectif a été estimé difficile à atteindre, en particulier en conditions de sécheresse (Yeap et al., 2011). Des essais de terrain effectués en Australie et au Vietnam ont montré que le coût génétique associé ne permettait pas à la souche de s'établir durablement dans les populations naturelles (Nguyen et al., 2015).

[53] L'introgression n'est pas considérée comme une transinfection [Hughes, G.L., and Rasgon, J.L. (2014). Transinfection: a method to investigate *Wolbachia*-host interactions and control arthropod-borne disease. Insect Mol Biol *23*, 141-151.], mais elle peut conduire aux mêmes propriétés : *Aedes polynesiensis*, vecteur des filaires *W. Bancrofti* et occasionnellement de DENV en Polynésie française, a en effet été infecté par introgression à partir d'une espèce interfertile, *Aedes riversi.* La souche de *Wolbachia* d'*Ae. riversi* a induit une IC chez *Ae. polynesiensis*, qui pourrait être exploitée dans le cadre d'une stratégie de réduction de population [Brelsfoard, C.L., Sechan, Y., and Dobson, S.L. (2008). Interspecific hybridization yields strategy for South Pacific filariasis vector elimination. Plos Neglected Tropical Diseases *2*.].

Bilan des premières expérimentations de TII et TII-TIS

La première expérimentation historique exploitant un phénotype d'IC date de 1967, alors que l'implication de *Wolbachia* dans le phénotype n'avait pas encore été élucidée : une IC bi-directionnelle naturelle entre deux populations de *Cx. quinquefasciatus* (alors dénommé *Culex pipiens fatigans*) du complexe *Cx. pipiens*, avait permis d'éliminer la population locale de moustiques vecteurs de filariose lymphatique dans un village isolé de Birmanie, suite à neuf semaines de lâchers inondatifs de mâles incompatibles (5.000 par jour) (Laven, 1967). Cet essai représente le premier succès d'une technique dérivée de la TIS appliquée aux moustiques (Benedict and Robinson, 2003).

Plus récemment, suite à la mise en évidence du rôle de *Wolbachia* dans l'IC, des souches spécifiques de *Wolbachia* ont été intentionnellement introduites dans des moustiques, que ce soit par introgression (Atyame et al., 2011; Brelsfoard et al., 2008) ou transinfection par microinjection (Calvitti et al., 2010), en vue d'une réduction ou élimination de population de moustiques vecteurs par des lâchers inondatifs de mâles infectés.

Des lâchers de petite échelle ont été effectués pour tester la technique de TII sur le terrain, (1) à partir de fin 2009 en Polynésie française sur *Aedes polynesiensis* (O'Connor et al., 2012), et (2) à partir de 2014 aux Etats-Unis sur *Ae. albopictus* (Mains et al., 2016) et *Ae. aegypti* (J. Gilles, comm. pers.). Bien qu'ils n'aient pas conduit à des éliminations complètes, ces essais pilotes ont induit des réductions de population d'autant plus significatives qu'ils étaient réalisés dans des conditions d'isolement (ex. des motus isolés en Polynésie française), et ont permis de vérifier expérimentalement que les bactéries *Wolbachia* ne s'établissaient pas à partir des mâles relâchés. Plus récemment, une expérimentation en Polynésie française, qui n'a pas encore fait l'objet de publication scientifique, semble avoir atteint en 7 mois une réduction de 95 % de la population d'*Ae. polynesiensis* d'un motu de 75 ha dans l'atoll de Tetiaroa[54] (voir Rapport du GT, Annexe 11).

D'autres applications de la TII sont en cours de développement, à des stades plus précoces d'expérimentation, en laboratoire ou en conditions semi-contrôlées, ou en cours d'expérimentation sur le terrain. Ainsi, une stratégie de lutte par TII est en développement à La Réunion pour une application dans plusieurs îles du Sud Ouest de l'océan Indien contre les moustiques *Cx. p. quinquefasciatus*, vecteurs de filaires et du virus responsable de la fièvre de la Vallée du Rift. Après introgression dans les populations locales de la souche *w*Pip(Is), provenant d'une population de *Cx. p. pipiens* de Turquie, les mâles infectés ont été testés en laboratoire et en conditions semi-contrôlées avec des résultats très prometteurs en termes d'IC et de compétitivité (Atyame et al., 2015; Atyame et al., 2011).

Par ailleurs, une stratégie de lutte par TII et/ou TII-TIS est en développement contre *Ae. albopictus* dans la Province de Guangzhou en Chine. Les moustiques *Ae. albopictus* étant naturellement infectés par deux souches de *Wolbachia* (*w*AlbA and *w*AlbB) (Bourtzis et al., 2014), une lignée triplement infectée (*w*AlbA, *w*AlbB and *w*Pip) a été développée. Cette lignée est totalement incompatible avec la souche naturelle doublement infectée et de surcroît réfractaire au virus de la dengue (Bourtzis et al., 2016). Des données en conditions semi-contrôlées suggèrent que cette triple infection n'induit qu'un coût génétique mineur chez *Ae. albopictus*, ce qui permet d'envisager de l'utiliser dans le cadre d'une approche TII-TIS (Zhang et al., 2015b).

L'approche TII-TIS, associant de faibles doses d'irradiation aux transinfections de *Wolbachia*, a été validée en laboratoire : des doses d'irradiation de 40 Gy ont complétement stérilisé des femelles *Ae. polynesiensis*, sans effet évident sur la survie ou la compétitivité des mâles (Brelsfoard et al., 2009) ; les mêmes doses d'irradiation ont toutefois eu des effets plus contrastés sur des mâles de *Cx. pipiens* selon les populations testées (Arunachalam and Curtis, 1985). Des études plus récentes ont permis

[54] http://www.tahiti-infos.com/L-experience-des-moustiques-steriles-a-Tetiaroa-est-concluante_a146430.html; http://www.ilm.pf/node/2508

d'analyser, en conditions semi-contrôlées, l'impact de la combinaison TII-TIS avec différentes doses d'irradiation sur la vigueur et la compétitivité des moustiques *Ae. albopictus* triplement infectés, ainsi que sur le moindre risque associé à un lâcher de femelles accidentel (Zhang et al., 2016; Zhang et al., 2015a; Zhang et al., 2015b). Les résultats étant prometteurs pour des doses d'irradiation réduites à 28 Gy, des essais pilotes de terrain ont été initiés pour tester cette approche sur des sites sélectionnés de la Province de Guangzhou (Bourtzis et al., 2016). La combinaison TII-TIS est également en cours d'évaluation sur le terrain en Thaïlande sur des moustiques *Ae. aegypti* doublement infectés avec *w*AlbA et *w*AlbB. Une autre expérimentation de TII-TIS est en projet à Singapour sur des moustiques *Ae. aegypti* infectés avec *w*AlbB, en comparaison avec l'utilisation de la TII seule[55] (voir Rapport du GT, Annexe 11).

Ainsi, les expérimentations exploitant *Wolbachia* à des fins de réduction ou élimination de population se multiplient, notamment en Asie et aux Etats-Unis, mais aussi dans le Pacifique, avec la Polynésie française, sur des populations d'*Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* et *Ae. polynesiensis*, inondées avec des mâles porteurs de différentes souches et combinaisons de souches de *Wolbachia*. Ces essais sont en passe de produire de nombreuses données qui permettront de mieux mesurer l'intérêt de la technique de l'insecte incompatible (TII), associée ou non à de faibles doses d'irradiation (TII-TIS), et de définir les conditions optimales de son application.

Bilan des premières expérimentations de propagation d'IP

Les techniques de modification de population de moustiques pour les rendre résistants à la transmission de pathogènes par l'intermédiaire de l'IP de *Wolbachia* sont testées dans plusieurs pays, incluant le Brésil, la Colombie, l'Indonésie, l'Australie et le Vietnam dans le cadre du programme *Eliminate Dengue*[56].

Il a été démontré en laboratoire que différentes souches de *Wolbachia* pouvaient non seulement protéger des infections par des arbovirus comme DENV, CHIKV (Moreira et al., 2009; Walker et al., 2011) et dernièrement ZIKV (Aliota et al., 2016; Dutra et al., 2016), mais aussi par des parasites comme les *Plasmodium spp.* (Bian et al., 2013; Caragata et al., 2016; Moreira et al., 2009). Il a de plus été mis en évidence que la souche de *Wolbachia w*Mel de *Drosophila melanogaster*, qui a pour effet d'interférer avec le développement du virus de la dengue dans *Ae. aegypti*, avait un coût génétique associé relativement bas et une bonne capacité de propagation en conditions semi-contrôlées (Walker et al., 2011). Sur cette base, il a été entrepris de tester la stratégie de modification de population par la propagation de *w*Mel dans deux populations cibles d'*Ae. aegypti* près de Cairns, dans le Queensland en Australie (Hoffmann et al., 2011).

Par le mécanisme d'IC, suite à des lâchers de moustiques mâles et femelles transinfectés avec *w*Mel, la bactérie a effectivement envahi les populations d'*Ae. aegypti* des zones ciblées et s'y est établie avec succès en quelques mois (Hoffmann et al., 2011). Des études suggèrent que les effets de *Wolbachia* sur l'hôte sont restés stables plus de deux ans après les derniers lâchers : les moustiques *Ae. aegypti* infectés avec *w*Mel collectés sur le terrain ont montré des taux limités d'infection, de réplication et de dissémination de virus de la dengue après exposition, en laboratoire, à trois sérotypes de dengue (DENV-1 à 3) (Frentiu et al., 2014). De plus, *w*Mel a conservé sa capacité à induire une IC totale avec les moustiques non infectés, même si elle est accompagnée d'un coût sur la fécondité (Hoffmann et al., 2014). L'infection par *Wolbachia* reste à des niveaux élevés dans les deux populations, entre 80 et 100 %, les individus non infectés étant attribués à des événements d'immigration. Ceci est encore vérifié cinq ans après les derniers lâchers (Communication S. O'Neill, Zika Summit, avril 2016, Paris). Cependant, considérant l'ensemble de ces données, Hoffmann et

[55] http://www.nea.gov.sg/public-health/environmental-public-health-research/wolbachia-technology/project-wolbachia-singapore.

[56] Le *Eliminate Dengue Program* est une collaboration internationale pour une recherche à but non lucratif menée par l'Université de Monash en Australie. La collaboration s'est élargie à plusieurs gouvernements, instituts de recherche et partenaires philantropiques de par le monde, incluant The Foundation for the National Institutes of Health (Grand Challenges in Global Health Initiative of the Bill & Melinda Gates Foundation) (http://www.eliminatedengue.com/program).

collègues ont conclu que les moustiques *Ae. aegypti* infectés par *w*Mel ne seraient pas capables d'envahir rapidement les zones voisines en raison de leur désavantage sélectif trop élevé (Hoffmann et al., 2014). Associé à un taux trop faible de dispersion de l'espèce, ce coût génétique empêche la population modifiée de moustiques *Ae. aegypti* d'atteindre la fréquence critique de fixation de la souche transinfectée [30 %, (Hoffmann et al., 2011)] dans les populations mitoyennes. La nécessité d'atteindre un seuil critique de densité relative initiale implique par ailleurs la nécessité d'un élevage de masse, même s'il reste moins conséquent que pour la TIS (voir section 4.3.3.).

En préparation à des essais de plus grande échelle au Brésil, la souche *w*Mel transinfectée dans les moustiques *Ae. aegypti* d'Australie a été introgressée par rétrocroisement chez des moustiques *Ae. aegypti* de la région de Rio de Janeiro. Des tests en laboratoire indiquent une forte IC, une transmission maternelle élevée, et peu d'impact sur la fécondité, dans cinq voisinages de Rio de Janeiro (Dutra et al., 2015). Un exercice de modélisation a permis de simuler la propagation de *Wolbachia* dans ces différents voisinages selon leurs caractéristiques socio-démographiques et leurs influences sur la taille de la population de moustiques préexistante, en vue d'optimiser les futures stratégies de lâchers de moustiques sur chaque site (Dutra et al., 2015).

Enfin, la faisabilité d'une stratégie exploitant une autre souche de *Wolbachia*, la souche *w*MelPop, qui réduit la longévité des *Ae. aegypti* infectés et réduit la réplication du virus de la dengue, a été testée en Australie et au Vietnam, où la dengue est endémique. Les résultats sont hétérogènes et dans tous les cas, l'infection de *w*MelPop ne se fixe pas dans la population du fait du coût génétique élevé associé (Nguyen et al., 2015). Cette souche ne peut donc être utilisée de façon durable dans le cadre d'une stratégie de modification de population (Nguyen et al., 2015).

Ainsi, plusieurs expérimentations de propagation d'une interférence avec le pathogène (IP) *via Wolbachia* ont été initiées dans le cadre du programme *Eliminate Dengue*, trois d'entre elles ayant fait l'objet de publication. L'ensemble des expérimentations vise à réduire la compétence vectorielle des populations naturelles d'*Ae. aegypti* pour différents arbovirus par leur transinfection avec différentes souches de *Wolbachia*. Ces essais ont démontré des capacités d'invasion et de fixation variables des souches de *Wolbachia* au sein des populations sauvages d'*Ae. aegypti* selon le coût génétique qu'elles infligent à leurs hôtes. Les résultats les plus prometteurs ont été obtenus avec *w*Mel, dont l'infection s'est durablement établie dans la population locale de moustiques près de Cairns, en Australie. Si des tests en laboratoire indiquent que les moustiques transinfectés collectés sur le terrain conservent une compétence vectorielle réduite pour la dengue plus de deux ans après les derniers lâchers, des résultats épidémiologiques sont attendus pour démontrer l'efficacité de la technique sur la transmission de la maladie. Des expérimentations sont en cours au Brésil, en Colombie, en Indonésie, en Australie et au Vietnam. Une expérimentation est prévue en Nouvelle Calédonie.

N.B. On note que d'autres bactéries que *Wolbachia* pourraient être exploitées pour la lutte antivectorielle : il a par exemple été démontré en laboratoire que l'ingestion de bactéries extracellulaires *Chromobacterium Csp_P.* par les moustiques *An. gambiae* et *Ae. aegypti* diminuait la compétence vectorielle respective des moustiques à *P. falciparum* et au virus de la dengue (Ramirez et al., 2014). Il s'agirait dans ce cas de mettre en œuvre des transinfections de nature non pas intracellulaire, comme pour *Wolbachia*, mais extracellulaire, et de concevoir des stratégies de lutte qui ne dépendent pas des caractéristiques d'IC spécifiques à *Wolbachia*.

4.2.3. Techniques de paratransgenèse

Une autre forme de lutte antivectorielle associée à des bactéries endo-cellulaires ou composant le microbiote du moustique est envisagée, basée sur l'utilisation de bactéries génétiquement modifiées, une technique appelée paratransgenèse (Favia, 2014; Lampe and Bongio, 2014; Weiss and Aksoy, 2014). La paratransgenèse consiste à modifier génétiquement non pas l'insecte vecteur de maladie lui-même, mais un microorganisme symbiotique hébergé dans ses tissus.

On peut envisager de faire exprimer à ce microorganisme une ou plusieurs molécules capables de neutraliser voire tuer le pathogène dans le moustique. Les défis à relever, sur l'exemple des moustiques, sont les suivants :

- pour l'espèce vectrice ciblée, identifier un microorganisme symbiotique associé de façon stable à l'espèce, verticalement transmissible, cultivable *in vitro* et transformable génétiquement. La bactérie *Asaia* est le microorganisme le plus étudié sous cet angle chez les anophèles, et pourrait servir aussi chez les *Aedes*. Une levure du genre *Wickerhamomyces* est un autre candidat. Les bactéries *Wolbachia*, intracellulaires et non cultivables *in vitro*, posent des problèmes techniques difficilement surmontables pour être envisagées pour la paratransgenèse à l'heure actuelle ;
- identifier une ou plusieurs protéines ou peptides capables de neutraliser ou tuer l'agent pathogène dans le moustique, qui peuvent être exprimés sous le contrôle d'un promoteur bien choisi et sécrétés en restant fonctionnels et en quantités suffisantes par le microorganisme choisi sans en affecter la viabilité. Des anticorps à chaîne unique ou de type compact (*nanobodies*), des peptides antimicrobiens, des composants du venin de certains arthropodes ayant montré une activité anti-parasitaire *in vitro* ou encore des ARN interférents sont envisagés. L'exploitation à cette fin de peptides antimicrobiens issus du système immunitaire des insectes lui-même pose le risque potentiel de sélectionner des pathogènes résistants à ces peptides, ce qui pourrait rendre la population naturelle du vecteur hyper-sensible à ces pathogènes ;
- réintroduire l'organisme génétiquement manipulé dans le moustique, vérifier l'efficacité du blocage de la transmission, trouver un moyen d'infecter les populations sauvages avec la bactérie génétiquement modifiée. Ce dernier point pourrait tirer parti du fait que les microorganismes envisagés sont viables dans des solutions sucrées telles que le nectar, ce qui permettrait la confection d'appâts sucrés contenant le microorganisme, la transmission verticale prenant ensuite le relais.

Il existe une recherche active sur la paratransgenèse comme outil de lutte contre les *Plasmodium* et les trypanosomes véhiculés en Afrique par la mouche tsé-tsé (*Glossina*) et en Amérique par les punaises (*Triatoma*). Par rapport à un insecte génétiquement modifié, l'introduction de bactéries génétiquement modifiées sur le terrain risque d'être moins bien contrôlable. La possibilité que des insectes non-cibles acquièrent le symbionte génétiquement modifié, qui se maintiendra ensuite chez ces insectes et dans l'environnement, est de probabilité élevée. La non-spécificité d'hôte d'une bactérie comme *Asaia* (Favia, 2014) pourrait cependant être considérée comme un avantage en matière d'efficacité, car permettant de cibler plusieurs vecteurs du paludisme simultanément, tandis que la transgénèse classique contraint de procéder espèce par espèce. Il faudrait toutefois considérer alors la problématique des risques associés à la dispersion accrue du microorganisme génétiquement modifié. Moins proche d'une application sur le terrain que les autres techniques émergentes, la technique de paratransgenèse n'est pas discutée davantage dans cet avis.

4.3. Comparaison des techniques utilisant des moustiques GM avec les autres techniques de lutte

Les techniques utilisant des moustiques GM considérées dans cette évaluation comparative sont la technique RIDL d'Oxitec, seule technique utilisant des moustiques transgéniques développée à un niveau opérationnel aujourd'hui, ainsi que les deux exemples de forçage génétique par CRISPR-Cas9 qui ont fait l'objet de publication aujourd'hui, l'un à des fins d'élimination, l'autre à des fins de modification de population, même s'ils ne sont qu'à un stade précoce de développement.

Pour garder l'analyse relativement synthétique tout en étant pertinente et informative en vue d'une mise en évidence des spécificités des techniques utilisant des moustiques GM, une sélection de techniques les plus représentatives possible des différentes catégories de techniques de lutte présentées en 4.1. et 4.2. a été effectuée, soit sur la base de leur utilisation effective en France (c'est le cas, pour la lutte biocide, des pyréthrinoïdes et des *Bti*), soit sur la base de leur considération dans les débats publics et/ou de projets qui ont fait l'objet de publications scientifiques (c'est le cas, pour la lutte biologique, des poissons culicivores comme exemple de prédateurs, ou des densovirus comme exemple de pathogènes). Les techniques émergentes impliquant des lâchers de moustiques, au cœur de la saisine aux côtés des moustiques GM, sont toutes considérées, à part les techniques de paratransgenèse, qui semblent plus éloignées d'une application.

Un tableau récapitulatif est proposé pour rappeler les modes d'action de ces différentes techniques et indiquer, pour information, leur cadre réglementaire (abordé en relation avec les critères d'évaluation des risques dans le chapitre 5), leur stade de développement[57] ainsi que leur échelle d'utilisation en Europe (Tableau 2)[58].

Les spécificités des techniques utilisant des moustiques GM ont été examinées dans la perspective d'un éclairage sur l'intérêt et les limites de leur utilisation dans le cadre de la lutte antivectorielle en France, en termes d'objectifs visés, de potentiel d'efficacité et de durabilité, de contraintes techniques ainsi que de risques pour l'environnement et la santé.

[57] Les différents stades de développement ont été présentés dans le cadre des essais de la technique RIDL (section 3.2.3.) et sont définis dans le glossaire.

[58] La mutagenèse ciblée est citée en tant qu'alternative GM non transgénique qui pourrait faire l'objet de développements rapides suite à l'avènement récent de nouveaux outils moléculaires. Elle est toutefois limitée par l'absence de mécanisme de propagation de la modification dans la population. Aucun projet n'y est associé aujourd'hui ; elle ne sera donc pas discutée davantage dans cet avis.

Tableau 2. Différentes techniques de lutte antivectorielle : mode d'action, objectif, réglementation, stade de développement et échelle d'utilisation en Europe.

Technique de lutte antivectorielle	Mode d'action	Objectif (effet sur la population)	Réglementation UE[3]	Stade de développement	Echelle d'utilisation en Europe
1. **Lutte physique et environnementale**					
1.1. Elimination des gîtes par mesures de gestion environnementale	Physique	Réduction	non réglementée	na	au cas par cas
1.2. Protection par mesures physiques	Physique	Réduction possible	non réglementée	na	urbain (*Aedes* spp.)
2. Lutte biocide					
2.1. Biocides adulticides - exemple des pyréthrinoïdes	Neurotoxicité	Réduction	Biocides	phase IV	urbain
2.2. Biocides larvicides - exemple de *Bti*	Cytotoxicité au niveau de l'épithélium intestinal	Réduction	Biocides	phase IV	rural et urbain
3. Lutte biologique					
3.1. Prédateurs - ex. des poissons culicivores larvivores	Prédation	Réduction	non réglementée	phase IV	peu utilisé
3.2. Pathogènes - ex. d'un virus entomopathogène, le densovirus	Pathogénicité	Réduction	Biocides	phase III	pas encore utilisé
4. TIS					
4. Technique de l'insecte stérile classique (TIS) par irradiation	Mâles rendus stériles par irradiation	Réduction / Elimination[1]	non réglementée	phase III	pas encore utilisé
5. Utilisation de *Wolbachia*					
5.1. Technique de l'insecte incompatible (TII)	Mâles stérilisants par incompatibilité cytoplasmique associée à *Wolbachia*	Réduction / Elimination[1]	à déterminer[4]	phase III	pas encore utilisé
5.2. Propagation d'une interférence avec le pathogène (IP)	Compétence vectorielle réduite associée à *Wolbachia*	Modification	à déterminer[4]	phase III-IV	pas encore utilisé
6. Modification génétique du moustique					
6.1. Transgenèse « simple » - exemple de la technique RIDL	Mâles stérilisants, porteurs d'un caractère de létalité répressible introduit par modification génétique	Réduction / Elimination[1]	OGM (transgénique)	phase III-IV	pas encore utilisé
6.2. Mutagenèse ciblée	Mutation d'un gène nécessaire à la transmission d'un pathogène	Modification partielle	Statut juridique en débat	jamais testé	pas encore utilisé
7. Modification et forçage génétique du moustique					
7.1. Forçage génétique à des fins d'élimination d'une population	Propagation par forçage génétique dans la population de moustiques cibles d'une modification génétique inactivant un gène essentiel pour la fertilité femelle	Elimination / Eradication[2]	OGM (transgénique)	phase I	pas encore utilisé
7.2. Forçage génétique à des fins de modification d'une population pour la rendre résistante à la transmission d'un pathogène donné	Propagation par forçage génétique dans la population de moustiques cibles, de deux modifications possibles : 1. un transgène conférant une résistance à la transmission du pathogène 2. une modification génétique inactivant un gène du moustique essentiel à sa compétence vectorielle	Modification	OGM (transgénique)	1. phase I 2. en projet	pas encore utilisé

[1] Elimination de population envisageable en cas de population isolée et/ou de traitement à grande échelle (voir l'exemple de l'élimination de la lucilie bouchère en Libye).

[2] Possibilité théorique d'éradication d'espèce.

[3] Dans l'Union européenne, la réglementation applicable concerne les biocides (règlement (UE) n° 528/2012) et les OGM (directive 2001/18/CE).

[4] La question du statut réglementaire des insectes transinfectés par *Wolbachia* dans l'Union européenne n'a pas encore été soulevée car aucune demande de dissémination n'y a été soumise à ce jour.

4.3.1. Objectifs visés

En dehors des techniques classiques qui visent la réduction du contact hôte-vecteur (ex : moustiquaires, répellents) ou la réduction de la longévité des vecteurs (ex : aspersion intra-domiciliaire de biocide), on peut distinguer deux grandes catégories de techniques de lutte antivectorielle selon leurs effets sur la population d'insectes ciblés (voir Tableau 3) :

1. les techniques qui permettent de réduire le nombre d'insectes vecteurs sur un territoire donné, sans affecter la compétence vectorielle des insectes restants (dites « techniques de réduction de population »).

   Selon leur potentiel, ces techniques peuvent s'inscrire dans le cadre de stratégies de lutte antivectorielle visant différents degrés de réduction de la population ciblée, l'objectif premier étant de réduire la population de vecteurs sous le seuil requis pour la transmission d'un pathogène donné. Sur cette base, on peut en pratique définir trois stratégies différentes de lutte antivectorielle selon le degré de réduction visé :

   - les **stratégies visant une réduction** de la densité d'une population sous le seuil requis pour la transmission d'un pathogène,
   - les **stratégies visant l'élimination** (locale) d'une population isolée de vecteurs,
   - les **stratégies visant l'éradication** (globale) d'une espèce de vecteurs.

   On retrouve dans cette grande catégorie la plupart des techniques de lutte antivectorielle existantes (les autres agissant sur le contact hôte-vecteur ou la longévité des vecteurs), et parmi les techniques émergentes ou en développement décrites dans ce document, toutes celles impliquant des lâchers de mâles stériles ou stérilisants, qu'elles utilisent des moustiques transgéniques (RIDL et forçage génétique à des fins d'élimination) ou non (TIS, TII), avec des objectifs possibles variables selon les techniques :

   - les techniques classiques de lutte visent une réduction de population ; elles ne peuvent viser une élimination de population sans association avec d'autres techniques en raison d'une moindre efficacité à faible densité de moustiques (voir section 4.3.2.) ;
   - les techniques émergentes RIDL, TIS et TII peuvent être mises en œuvre dans une stratégie de réduction ainsi que dans une stratégie d'élimination de population, leur efficacité augmentant à faible densité de moustiques (voir section 4.3.2.). En cas de forte densité, leur utilisation devra toutefois être précédée par une technique classique de lutte pour une meilleure efficience générale (voir section 4.3.2.) ; les risques associés à ces techniques dépendront donc du contexte de leur utilisation et notamment de la stratégie dans laquelle elles s'inscrivent, les risques associés à une réduction n'étant pas équivalents à ceux associés à une élimination de population (voir section 4.3.4.) ;
   - seules les techniques de forçage génétique ont le potentiel théorique d'éradiquer une espèce, même si une utilisation dans un contexte isolé pourra se limiter à l'élimination d'une population locale. Dans le cas, probable, d'une inactivation par développement de résistances (voir section 4.3.2.), une technique de forçage génétique sera bloquée au stade d'une simple réduction.

2. les techniques qui permettent de réduire la capacité inhérente aux individus d'une population à transmettre un pathogène, sans nécessairement affecter la densité de la population (dites « techniques de modification de population »).

   Ces techniques s'inscrivent dans le cadre des stratégies de lutte antivectorielle dites de modification de population. Comme pour la réduction, la modification de population peut s'effectuer à différentes échelles selon la possibilité de propagation de la modification.

On retrouve, dans cette catégorie, les techniques émergentes qui permettent de propager une nouvelle caractéristique dans la population cible. C'est le cas de la technique de propagation d'une IP par *Wolbachia* ou du forçage génétique à des fins de modification de population. Aucune technique existante n'a la capacité d'agir sur la compétence vectorielle des moustiques.

Tableau 3. Classement des techniques de lutte antivectorielle selon leur action sur la population et l'objectif de lutte visé – mise en évidence des techniques utilisant des moustiques transgéniques.

Mode d'action	**Techniques de réduction de population** Agissent sur la densité d'une population de vecteurs				**Techniques de modification de population** Agissent sur la capacité inhérente aux individus d'une population à transmettre un pathogène
		Réduction	Elimination	Eradication	
Stratégies / objectifs de lutte	- Stratégie de réduction de population - Stratégie d'élimination de population - Stratégie d'éradication d'une espèce				- Stratégie de modification de population
Techniques	- Lutte physique et environnementale[1]	x			- Propagation d'une nouvelle caractéristique dans la population cible interférant avec la capacité des moustiques à transmettre un pathogène par les techniques de : ○ Propagation d'une IP *via Wolbachia*[3] ○ **FG à des fins de modification de population**[4]
	- Lutte biocide[1]	x			
	- Lutte biologique[1]	x			
	- Techniques basées sur des lâchers de mâles stériles ou stérilisants :				
	○ TIS classique	x	x		
	○ **RIDL**	x	x		
	○ TII	x	x		
	○ **FG à des fins d'élimination ou d'éradication**	(x)[2]	x	x	

[1] Ces méthodes non "génétiques" peuvent aussi viser la réduction du contact entre le vecteur et son hôte ou la réduction de la longévité des vecteurs pour réduire l'intensité de la transmission des agents pathogènes. L'élimination d'une population de vecteurs avec ces techniques ne pourrait être obtenue qu'en association avec d'autres techniques.

[2] En cas d'inactivation du forçage génétique, une stratégie visant une élimination ou une éradication peut être involontairement bloquée au stade d'une simple réduction.

[3] Dans les essais actuels, l'infection par *Wolbachia* ne dépasse pas la zone de lâcher du fait du désavantage sélectif infligé au moustique par la souche de bactérie utilisée. Dans ce cas, *Wolbachia* se maintient dans la population locale mais ne se propage pas au-delà.

[4] En cas d'inactivation du forçage génétique, une stratégie visant une modification globale peut être involontairement bloquée au stade d'une modification de population locale. Par ailleurs, la modification d'une population isolée pourrait également être un objectif visé par l'application du forçage génétique, sous réserve d'accepter le risque que le forçage génétique s'étende au-delà de la zone ciblée.

Ainsi, les techniques de lutte antivectorielle utilisant des moustiques GM peuvent réaliser un objectif de réduction de population, comme de nombreuses techniques existantes et d'autres techniques émergentes. Elles se distinguent des techniques existantes par leur capacité à éliminer une population locale et par leur capacité à modifier une population de moustiques. Ces objectifs peuvent également être réalisés par d'autres techniques émergentes de lutte antivectorielle. Parmi ces techniques, seule la technique de forçage génétique pourrait théoriquement éradiquer une espèce de moustiques.

4.3.2. Potentiel d'efficacité et de durabilité

L'efficacité et la persistance des effets d'une technique sont idéalement mesurées par des indicateurs de surveillance entomologiques et épidémiologiques au cours de sa mise en œuvre (Rapport du GT, section 4.2 et Annexe 12). Elles peuvent également être caractérisées en amont par d'autres critères, incluant :

- le temps nécessaire pour atteindre l'objectif visé,

- la persistance des effets de la technique (l'effet est-il persistant ou une maintenance est-elle nécessaire ?),
- la propagation des effets de la technique (l'effet est-il limité dans l'espace ou peut-il se propager sans intervention supplémentaire ?),
- la flexibilité ou l'adaptabilité de la mise en œuvre de la technique selon les résultats de surveillance, voire la possibilité d'un arrêt de l'application de la technique et d'une réversibilité des effets induits, dans l'hypothèse où les données de surveillance mettraient en évidence des effets négatifs associés à la technique,
- l'efficacité pratique *versus* l'efficacité théorique (peut-il y avoir, dès la mise en œuvre de la technique, un écart entre l'efficacité observée et l'efficacité attendue d'après le principe de la technique ?),
- les possibilités de perte d'efficacité de la technique avec le temps, que ce soit par un développement de résistance chez les populations cibles, ou par une dérive de la technique ou une perte de fonctionnalité autre que par résistance des cibles,
- la compétitivité des mâles (l'efficacité des techniques impliquant des lâchers de mâles est-elle affectée par différentes aptitudes à la compétitivité des mâles relâchés ?),
- le potentiel d'efficacité selon la densité de la population cible (l'efficacité des techniques est-elle différentiellement affectée par la densité de la population cible ?),
- l'existence de facteurs externes pouvant influencer ou interférer avec le succès des techniques.

L'analyse de ces critères pour les différentes techniques de lutte considérées ont permis de dégager des spécificités ou des similarités des différents types de moustiques GM par rapport aux autres techniques de lutte. Cette analyse, présentée ci-dessous, est plus ou moins théorique selon les données disponibles pour chaque technique.

1. <u>Temps nécessaire pour atteindre l'objectif visé</u>

On peut distinguer ici les techniques de lutte dont les premiers effets observés, dans les quelques heures à quelques jours suivant la mise en œuvre de la technique, traduisent directement l'objectif visé par cette technique, des techniques dont les objectifs de réduction voire d'élimination de population s'obtiennent plusieurs mois après l'application de la technique. Le premier ensemble de techniques inclut les techniques existantes, comme la lutte par utilisation de biocides (les adultes et les larves meurent moins de 24 h après exposition aux pyréthrinoïdes et au *Bti*, respectivement) ou le biocontrôle, d'action plus ou moins rapide selon le nombre de prédateurs ou de pathogènes relâchés (les larves meurent quelques heures après exposition aux poissons culicivores et quelques jours après exposition aux densovirus). Le second regroupe les techniques émergentes impliquant des lâchers de moustiques, incluant les moustiques GM (le contrôle d'une population de moustiques sauvages est obtenu en quelques mois, cette durée variant selon de nombreux paramètres comme la zone ciblée, la densité initiale, le nombre de moustiques relâchés, etc.). Les techniques du premier ensemble seront les techniques à privilégier en situation de crise.

Les techniques utilisant des lâchers de moustiques GM, comme tous les autres lâchers de moustiques, ne peuvent donc être envisagées comme solution rapide à une situation de crise. Elles devront être intégrées à une gestion utilisant différentes combinaisons de techniques sur la durée.

2. <u>Persistance des effets de la technique</u> (l'effet est-il persistant ou une maintenance est-elle nécessaire ?)

Les caractéristiques locales, comme les aléas climatiques ou l'immigration de moustiques vecteurs dans la zone traitée, sont susceptibles d'affecter la persistance des effets de toutes les techniques de

lutte. Au-delà de cette dimension environnementale commune, les techniques de lutte antivectorielle peuvent être différenciées selon la persistance de leurs effets ou de leur action :

- les effets de certaines techniques ne sont pas persistants ; une maintenance est nécessaire pour assurer leur efficacité dans le temps. C'est le cas des actions temporaires de lutte physique et environnementale (comme l'élimination de gîtes larvaires), de l'utilisation de biocides chimiques (comme les pyréthrinoïdes), ou biologiques sans capacité multiplicative en conditions opérationnelles (comme le *Bti*) ;
- à l'opposé, certaines techniques ont un effet persistant. C'est le cas de modifications définitives de lutte physique et environnementale (ex : assèchement de zones humides) ;
- certaines ont un effet de persistance intermédiaire : le besoin de maintenance d'une lutte biologique est variable selon la capacité invasive des prédateurs et pathogènes utilisés. L'effet des densovirus peut durer plusieurs années.

Dans ce paysage, les techniques basées sur des mâles stériles ou stérilisants, qu'ils soient GM ou non, se distinguent par la variabilité de la persistance de leurs effets selon le contexte de leur utilisation :

- utilisées dans une stratégie de réduction, les techniques TIS, RIDL et TII auront une efficacité limitée dans le temps et nécessiteront une maintenance, tandis que dans une stratégie d'élimination, l'effet de ces techniques sera durable jusqu'à ré-immigration du vecteur sauvage dans la zone traitée. La persistance d'une élimination dépend alors du degré d'isolement de la zone traitée ;
- dans le cas d'une élimination locale par forçage génétique aussi, l'effet ne durera que jusqu'à ré-immigration du vecteur sauvage, la cassette de forçage génétique disparaissant avec la population de moustiques. Uniquement dans le cas, peu probable aujourd'hui, d'une éradication (globale) réalisée sans rebond de population, l'effet de la technique de forçage génétique serait durable et persistant. La technique d'élimination par forçage génétique n'apporte donc pas forcément de solution définitive contre les populations de vecteurs de pathogènes.

La persistance des effets des techniques de modification de population apportant une résistance à la transmission du pathogène dépend de la persistance de la modification dans la population et de la stabilité de son phénotype. La persistance de la modification dépend de l'équilibre entre son coût génétique et le mécanisme de sa transmission (Dans l'exemple de *w*MelPop, le coût génétique est tel que la bactérie ne peut persister dans la population, (Nguyen et al., 2015).) ; la stabilité de son phénotype dépend du mécanisme moléculaire sous-jacent et d'éventuelles évolutions dans le temps, et de la possibilité de développement de résistances au sein de la population de pathogènes :

- l'exemple publié de résistance à la transmission du *Plasmodium* par forçage génétique semble stable dans le temps une fois la modification établie dans la population, l'établissement de cette modification pouvant lui-même être partiel du fait de résistances au forçage génétique dans un premier temps (voir point 5 sur le développement de résistances, Gantz et al., 2015) ;
- en revanche, le phénotype d'IP associé à *Wolbachia* pourrait être sujet à des variations selon les conditions environnementales (Zug and Hammerstein, 2015). Il peut également faire l'objet de dérive fonctionnelle (réduction de densité, réduction de transmission maternelle, perte de *Wolbachia*) ou de développement de résistances au sein de la population de pathogènes (voir point 5 ci-dessous).

3. <u>Propagation des effets de la technique</u> *(l'effet est-il limité dans l'espace ou peut-il se propager sans intervention supplémentaire ?)*

Les techniques de lutte peuvent également être caractérisées par la propagation de leurs effets au-delà de la zone traitée ou de la zone de lâcher de moustiques.

Parmi les techniques existantes, seules les techniques de lutte biologique ont une capacité plus ou moins importante de dépasser la zone de traitement initiale selon la capacité de dissémination et d'invasibilité des prédateurs et pathogènes utilisés.

Parmi les techniques utilisant des moustiques GM, seules certaines techniques de forçage génétique ont la capacité théorique de propagation illimitée dans la population. En pratique, cette propagation sera probablement limitée en raison de développement de résistances associées à des mutations ou polymorphismes au niveau du site ciblé par l'ARN guide dans la population. Dans certains cas, cette limitation de la propagation du forçage génétique peut être considérée favorablement. Dans le cas contraire, des stratégies de conception technique adaptées pourraient permettre de réduire la probabilité de ces évolutions (voir plus bas, point 5 sur le développement de résistances).

La capacité de propagation d'une IP par *Wolbachia* dépend du coût génétique de *Wolbachia* sur les moustiques. En l'occurrence, la souche de *Wolbachia* actuellement testée par le programme *Eliminate Dengue* en Australie, *w*Mel, n'est pas capable de propagation au-delà de la zone de lâcher en raison du désavantage sélectif trop élevé qu'elle inflige au moustique hôte, même si elle persiste au sein de la zone de lâcher (Hoffmann et al., 2014).

Les autres techniques basées sur des lâchers de moustiques, essentiellement les lâchers de mâles stériles ou stérilisants, qu'ils soient GM ou non (TIS, RIDL, TII), n'ont pas la capacité de propager leur effet stérilisant au-delà des mâles relâchés (les possibilités d'échappement de la technique RIDL par pénétrance incomplète du trait, rappelées au point 4 ci-dessous, n'ont pas de conséquences en termes de diffusion d'un phénotype stérilisant à l'échelle de la population)[59].

-> Positionnement dans le continuum *self-limiting* / *self-sustaining*

Ces caractéristiques de persistance et de propagation des effets des techniques sont souvent agrégées dans les notions de *self-limiting* et *self-sustaining*, notions communément utilisées mais délicates à manier du fait de l'intégration de deux dimensions (le temps et l'espace), et donc de deux continuum. Deux ensembles de techniques de lutte antivectorielle peuvent ainsi être distingués selon leurs capacités de persistance et de propagation, certaines techniques pouvant être positionnées sur un continuum bi-dimensionnel entre ces deux extrêmes, que l'on propose de traduire en français par « auto-limitées » et « auto-entretenues » :

1) les techniques dites **auto-limitées (*self-limiting*)**, qui ont des effets limités dans l'espace et le temps à moins d'être entretenues.

   Dans le cas de techniques de lutte auto-limitées impliquant des lâchers d'insectes modifiés, la modification disparaît de la population à moins d'être maintenue ou réintroduite par des lâchers réguliers d'insectes modifiés.

   Peuvent être considérées comme auto-limitées l'ensemble des techniques de réduction de population regroupant les méthodes classiques de lutte antivectorielle (à part les modifications physiques définitives telles que les assèchements de zones humides, ou les techniques de biocontrôle comme les poissons culicivores ou les densovirus, qui présentent un certain degré de persistance sur le terrain (Carlson et al., 2006; Suchman et al., 2009)), ainsi que les techniques émergentes impliquant des lâchers de mâles stériles ou stérilisants, GM ou non, dans un cadre de réduction de population (TIS, TII, RIDL) ;

2) les techniques dites **auto-entretenues (*self-sustaining*)**, dont les effets se répandent dans l'espace et durent dans le temps sans nécessiter d'intervention de maintenance.

[59] La diffusion des effets des techniques est à distinguer des aspects de persistance ou de caractère invasif des éléments relâchés eux-mêmes, traités plus bas dans le point 4 sur l'efficacité pratique *vs* théorique en termes de fertilité résiduelle, et dans la section 3.5.3.4. en termes de risques.

Plus précisément, dans le cas de techniques de lutte impliquant des lâchers d'insectes modifiés, la persistance dans le temps et la propagation dans l'espace de la modification au sein de la population ciblée sont fonction de l'équilibre entre la dynamique de propagation de la modification et l'éventuel désavantage sélectif qu'elle confère aux individus modifiés.

Les techniques auto-entretenues concernent les techniques de modification de population, selon la capacité de propagation de la modification, et toutes les techniques de forçage génétique, qu'elles visent une modification, une élimination ou une éradication.

La technique de propagation de *Wolbachia* pour introduire une IP dans la population est un exemple de technique auto-entretenue pour lequel le coût génétique infligé par la bactérie au moustique peut être un frein à sa propagation (Hoffmann et al., 2014). Concernant la technique de modification de population par forçage génétique, la cassette de forçage génétique peut également échouer à envahir une population si le taux de conversion des chromosomes sauvages par forçage génétique est trop faible par rapport à un éventuel désavantage sélectif associé à la modification. Dans la plupart des cas cependant, la propagation théorique de la cassette de forçage génétique prévue par les modèles mathématiques est très rapide, même pour des coûts de vigueur considérables (Unckless et al., 2015).

La mise en œuvre de techniques de transgénèse « simple » (c.-à-d. sans forçage génétique) ou mutagenèse ciblée dans l'objectif d'une modification de population nécessiterait une maintenance lourde pour contrebalancer l'absence de sélection ou la contre-sélection naturelle de ces transgènes et mutations en l'absence de système de propagation ; ces techniques ne sont donc pas considérées comme auto-entretenues (ces cas de figure sont théoriques, aucune publication ne s'y rapporte).

La technique d'élimination ou éradication par forçage génétique peut, en revanche, être considérée auto-entretenue car dans ce cas, la cassette de forçage génétique devrait spontanément se propager dans la population et induire la stérilité des femelles homozygotes, ce qui devrait conduire *in fine* à l'élimination de la population.

Avantages et inconvénients des techniques auto-entretenues (*self-sustaining*) *vs* auto-limitées (*self-limiting*) et conséquences en termes de flexibilité et d'adaptabilité des différentes techniques :

Les techniques auto-entretenues ont l'avantage de ne pas nécessiter de maintenance et de grosses infrastructures, mais l'inconvénient d'être très peu flexibles, voire théoriquement incontrôlables et irréversibles dans l'éventualité où la propagation de *Wolbachia* ou de la cassette de forçage génétique considérée ne rencontrerait pas d'obstacles. On note que les exemples actuels de modification de population par IP *via Wolbachia* ne permettent pas de propagation du fait du coût génétique conféré par la souche de *Wolbachia* utilisée, associé à la faible capacité de dispersion de l'espèce de moustique transinfecté. Dans l'exemple d'*Ae. aegypti* transinfecté avec *w*Mel en Australie, la modification de population s'effectue et se maintient dans la zone de lâcher si les moustiques relâchés dépassent le seuil de densité relative intiale de 30 %, mais ne se propage pas au-delà (Hoffmann et al., 2011). Cette caractéristique limitante dans l'espace peut être considérée comme un inconvénient limitant la progression spontanée de l'IP dans la population de moustiques, mais également comme un avantage permettant de contrôler l'étendue des populations transinfectées avec *Wolbachia*.

A l'inverse, les techniques auto-limitées seront très lourdes à maintenir sur le long terme (voir les contraintes en termes d'élevage, 4.3.3.). On note que les techniques de TIS, TII et RIDL seront plus coûteuses dans le cadre d'une stratégie de réduction de population que dans le cadre d'une stratégie d'élimination de population. Ces techniques auto-limitées présentent un avantage du fait qu'elles seront maîtrisables et adaptables selon les résultats de surveillance.

En termes de surveillance, on note que les moustiques RIDL OX513A portent un marqueur fluorescent associé à la cassette génétique de létalité conditionnelle, ce qui permet un suivi efficace des moustiques transgéniques dans l'environnement et donne des possibilités d'adapter la mise en œuvre de la technique. Les moustiques TIS peuvent être couverts de poudre fluorescente à la sortie de l'élevage, ce qui permet également de les suivre et de moduler les lâchers en conséquence. Il ne serait toutefois pas possible de détecter leur éventuelle descendance dans l'environnement en cas de fertilité résiduelle. Les moustiques porteurs de *Wolbachia* peuvent être détectés par l'utilisation de marqueurs moléculaires associés à la bactérie *Wolbachia*. Enfin, les moustiques dotés de la propriété de forçage génétique publiés dans la littérature portent un marqueur fluorescent qui devrait également permettre de les suivre, sans toutefois donner de possibilités directes de modifier le déroulement de la stratégie.

4. Efficacité pratique vs efficacité théorique

L'efficacité réelle des différentes techniques de lutte antivectorielle peut s'écarter de leur efficacité théorique, attendue selon le principe de la technique, indépendemment des possibilités de perte d'efficacité des techniques associées à une évolution sur le terrain.

Ainsi, l'existence d'un éventuel taux de fertilité résiduelle doit être considérée pour les techniques basées sur des lâchers de mâles stériles ou stérilisants :

- concernant la technique RIDL, on a vu qu'il pouvait y avoir environ 2 % de survivants dans la descendance des moustiques OX513A dans l'environnement. Il s'agit ici d'un problème de pénétrance incomplète du trait, le transgène étant intact mais ne produisant pas le phénotype escompté. Cette occurrence est considérée suffisamment basse à chaque génération pour ne pas générer d'impact significatif sur l'efficacité de la technique (Phuc et al., 2007).
- pour la TIS aussi, on ne peut exclure la possibilité que des mâles irradiés non stériles soient relâchés. Un objectif de 95 % de stérilité pourrait même être volontairement fixé pour améliorer la compétitivité des mâles relâchés, ce qui n'est toutefois pas recommandé par l'AIEA en raison des risques potentiellement associés (voir section 4.3.4.) ;
- enfin, pour la TII, un taux de fertilité résiduelle des mâles relâchés porteurs de *Wolbachia* avec les femelles de terrain non infectées pourrait être observé en cas d'incompatibilité cytoplasmique incomplète. Il a récemment été montré en laboratoire que différents régimes de température pouvait réduire l'incompatibilité cytoplasmique induite par certaines *Wolbachia* (Ross et al., 2017) ;

Concernant le système expérimental d'éradication par forçage génétique proposé par Hammond et al. (2016), un défaut d'efficacité de propagation de la cassette de forçage a été observé, du fait d'une stérilité partielle des femelles hémizygotes pour la cassette, la propagation optimale étant basée sur le principe de la stérilité des seules femelles homozygotes (Hammond et al., 2016). Ce problème technique est en voie de résolution par l'augmentation de la spécificité tissulaire de Cas9 aux lignées cellulaires germinales (A. Burt, comm. pers.).

Concernant la technique de propagation d'une IP *via Wolbachia*, la transmission maternelle de certaines *Wolbachia* caractérisée en laboratoire pourrait être réduite sur le terrain en fonction des conditions environnementales, comme la température par exemple (Ross et al., 2017). Certaines *Wolbachia* étant plus sensibles que d'autres à ces fluctuations environnementales, ces nouvelles données devraient permettre de sélectionner les souches de *Wolbachia* utilisées pour les interventions sur le terrain en conséquence (Ross et al., 2017). On peut également envisager un impact des conditions environnementales sur l'efficacité de l'interférence de certaines *Wolbachia* avec la transmission des pathogènes par les moustiques (Zug and Hammerstein, 2015).

Le problème d'écart entre efficacité pratique et théorique n'est donc pas spécifique aux moustiques GM. Il se pose pour toutes les techniques émergentes à base de lâchers de

moustiques, avec des impacts variables sur l'efficacité des techniques sur le terrain. Il peut être associé (1) à l'existence d'un éventuel taux de fertilité résiduelle pour les techniques basées sur des lâchers de mâles stériles ou stérilisants, (2) à l'existence d'un éventuel défaut de propagation d'une cassette de forçage génétique ou de transmission de *Wolbachia* dans les stratégies de modification de population, ou (3) à une possible altération de l'efficacité d'IP chez certaines *Wolbachia* selon les conditions environnementales.

Les conséquences en termes de risques de ces différents écarts selon les techniques sont abordées dans la section 4.3.4..

5. Possibilités de perte d'efficacité de la technique avec le temps

La durabilité et/ou l'efficacité de ces techniques peuvent être limitées par un **développement de résistance dans les populations cibles**, ou par une **dérive de la technique par perte de fonctionnalité**. Ces possibilités dépendent du mode d'action des différentes techniques de lutte :

a. la perte d'efficacité par **développement de résistance** peut advenir si la technique de lutte fonctionne par le biais d'une cible génétique – chez les moustiques ou les pathogènes visés – cible pour laquelle il existerait des formes alléliques alternatives viables qui contourneraient le mécanisme de la technique.

   i. Dans le cas des techniques de réduction de population, les éventuels individus porteurs de ces formes alléliques alternatives deviennent majoritaires dans la population au fur et à mesure des générations et de l'application de ces techniques de lutte antivectorielle :

      - **biocides** : ce mécanisme de sélection de résistance chez les moustiques est une réalité pour de nombreux biocides de synthèse comme les pyréthrinoïdes. Un plan de gestion des résistances devrait être implémenté pour préserver l'efficacité de ces biocides dans le temps (voir section 4.1.1.). On pourrait également concevoir que les moustiques développent une résistance contre le mécanisme de pathogénicité des densovirus, même si, contrairement aux biocides de synthèse, ces derniers pourront évoluer en retour. En revanche, le développement de résistance des moustiques contre le *Bti* est très peu probable considérant qu'il contient six toxines larvicides qui ciblent différents récepteurs et dont certaines agissent de façon synergique (Ben-Dov, 2014)[60]. Pour le *Bti*, ce n'est donc pas l'absence de cibles mais le cumul de différentes cibles qui réduit considérablement la probabilité qu'un individu porte des allèles de résistance pour chacune des six toxines, étant donné que chacun de ces allèles ne constituerait pas un avantage sélectif en soi ;

      - les **techniques de forçage génétique** fonctionnent également par le biais d'une cible génétique, qui est la séquence reconnue par l'ARN guide associée aux séquences adjacentes. Ainsi, des individus de la population de terrain dont la séquence du locus ciblé par l'ARN guide serait différente de la séquence prédéfinie au point que le site ne serait pas coupé par l'endonucléase Cas9, ou dont les séquences adjacentes au locus ciblé par l'ARN guide seraient polymorphes au point que la recombinaison homologue, et donc l'insertion de la cassette transgénique, ne pourraient avoir lieu, seront réfractaires au forçage génétique. C'est également le cas des individus portant des mutations en ce site du fait d'une religation imprécise suite à une précédente coupure par Cas9. Dans le cadre du forçage génétique à but d'élimination ou éradication, la présence d'individus réfractaires en raison d'un polymorphisme génétique permettrait à la population de rebondir après réduction partielle.

[60] Plus précisément, *Bti* contient 4 toxines Cry majeures et au moins 2 toxines Cyt mineures, qui agissent de manière synergique avec les toxines Cry, et dont la présence diminue le risque de développement de résistance chez les cibles [Ben-Dov, E. (2014). *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and Its dipteran-specific toxins. Toxins *6*, 1222-1243.].

Concernant les individus mutés suite à une religation imprécise, deux cas se présentent selon les effets des mutations induites sur le gène de fertilité dans lequel est situé la séquence reconnue par l'ARN guide : seuls les individus porteurs de mutations qui ont préservé la fonction du gène pourront contribuer à un rebond de population, les autres seront voués à disparaître par sélection naturelle. Il est à noter que, si elle est considérée indésirable, cette possibilité d'interruption du forçage génétique peut être minimisée à l'avenir par l'utilisation simultanée de plusieurs cassettes de forçage génétique indépendantes et/ou l'utilisation simultanée de plusieurs ARN guides dans une même cassette ;

- **les techniques ne fonctionnant pas par le biais d'une cible génétique ne sont pas propices au développement de résistance au mode d'action de la technique**. C'est le cas de la mise en œuvre de mesures de gestion environnementale ou de protection physique[61], ainsi que de l'utilisation de prédateurs. C'est également le cas des techniques émergentes exploitant les lâchers de moustiques mâles TIS, TII ou RIDL OX513A : les premiers sont stérilisés par un mécanisme non spécifique d'irradiation ; les deuxièmes portent une bactérie *Wolbachia* générant une incompatibilité cytoplasmique conduisant à une impossibilité de produire une descendance avec tout moustique femelle dépourvu de cette même bactérie ; les troisièmes transmettent à leur descendance un facteur de létalité conditionnelle, qui fonctionne par le biais d'une répression non spécifique de la transcription [*transcriptional squelching* (Lin et al., 2007)] générée par la surexpression du transgène tTAV, elle-même permise par l'absence de tétracycline dans l'environnement, indépendamment des gènes des moustiques cibles. Il est donc improbable que les moustiques TIS, TII ou RIDL OX513A donnent lieu à un développement de résistance chez les cibles, à moins qu'une fraction de la population de femelles ciblées ne possède la caractéristique comportementale d'éviter, respectivement, les moustiques irradiés, les moustiques porteurs d'une bactérie *Wolbachia*, ou la souche génétique OX513A utilisée dans la technique RIDL, fraction qui serait sélectionnée au fur et à mesure des générations et de l'application de la technique. Cette hypothèse de **résistance dite comportementale** serait improbable pour les moustiques TIS considérant leur hétérogénéité extrême, l'irradiation générant des mutations aléatoires et différentes d'un individu à l'autre[62]. Concernant les moustiques porteurs de *Wolbachia*, il existe des phénotypes, notamment de coût, associés à *Wolbachia*, mais à ce jour pas de phénotypes associés qui soient reconnus et/ou évités par les moustiques non porteurs de *Wolbachia*, à la connaissance des experts du groupe de travail. Quant aux moustiques RIDL, il serait concevable que la souche d'élevage unique OX513A, actuellement utilisée par Oxitec sur tous les sites d'intervention, soit suffisamment différente des moustiques de terrain pour qu'elle soit évitée par une fraction de la population de moustiques ;

ii. Concernant les <u>techniques visant une modification de population</u>, deux types de résistance peuvent être envisagés : (1) une résistance à la modification elle-même, et (2) une résistance au phénotype recherché dans la population modifiée. Une pression de

[61] On a toutefois observé des cas de résistance comportementale chez des anophèles, par laquelle une fraction de la population piquant plus tôt ou plus tard que la majorité contourne l'usage des moustiquaires par les habitants, sans que l'on n'ait démontré jusqu'à présent s'il s'agissait de plasiticité comportementale ou de sélection d'allèles de résistance liés au comportement.

[62] On note toutefois qu'une telle résistance comportementale à été observée à l'encontre de mouches des fruits stériles [McInnis, D.O., Lance, D.R., and Jackson, C.G. (1996). Behavioral resistance to the sterile insect technique by Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) in Hawaii. Ann Entomol Soc Am *89*, 739-744.]. Cette observation est cependant difficilement transposable aux moustiques, l'accouplement des mouches des fruits impliquant une parade nuptiale complexe. Par ailleurs, les conditions d'élevage et les génotypes des mouches des fruits utilisés ont été adaptés de telle sorte que cette résistance comportementale n'est plus observée (K. Bourtzis, comm. pers.).

sélection plus ou moins forte s'exercera sur les individus réfractaires à la modification, selon le coût en vigueur (ou désavantage sélectif) associé. Une absence de coût résulterait en une simple coexistence de la population native réfractaire à la modification et de la population modifiée. Ces deux types de résistance peuvent être déclinés pour les techniques de propagation d'IP et de forçage génétique :

- concernant la **technique de propagation d'IP**, la modification de population est le résultat du phénomène d'incompatibilité cytoplasmique également à l'œuvre dans la technique TII (la modification de population résultant ici du fait que les femelles porteuses de *Wolbachia* sont également relâchées). Selon le raisonnement tenu plus haut sur la TII, une résistance à la modification de population par évitement des mâles porteurs de *Wolbachia* serait peu probable. Cependant, un contournement de l'effet d'IP désiré suite à la modification de population est théoriquement envisageable. Ce phénomène de résistance particulier pourrait advenir si la compétence vectorielle d'un moustique porteur de *Wolbachia* n'était pas affectée vis-à-vis de certaines souches de pathogène préexistantes sur le terrain (comme il serait attendu par IP, c.-à-d. par interférence avec le pathogène). Ces souches de pathogène « résistantes » à l'interférence seraient alors progressivement sélectionnées sur le terrain. Le mode d'action de l'IP n'étant pas élucidé, il n'est pas clair s'il fonctionne *via* une cible génétique chez le pathogène et si un tel polymorphisme de souche vis-à-vis du mécanisme de l'IP pourrait être facilement sélectionné ;
- concernant la **technique de forçage génétique visant une modification de population**, les possibilités développées plus haut de résistance au forçage en raison de polymorphismes ou de mutations chez les cibles s'appliquent également ici et conduiront à l'émergence d'individus réfractaires à la modification. Concernant le phénotype recherché après modification de la population de moustiques en une population plus résistante à la transmission du pathogène, la résistance conférée par le transgène pourrait être moins efficace que prévu vis-à-vis de certains isolats de pathogène de terrain. Un large spectre d'isolats devrait être testé pour s'assurer de l'efficacité de la technique. Si l'on considère l'exemple de la production d'anticorps dirigés contre le *Plasmodium* (Gantz et al., 2015), ce phénotype pourrait théoriquement être contourné par des souches de *Plasmodium* qui ne seraient pas reconnues par ces anticorps. Considérant que la molécule ciblée chez le *Plasmodium* présente très peu de variabilité naturelle, la sélection de souches de *Plasmodium* résistantes à cette technique de lutte est quasi nulle ou très peu probable.

Ainsi, alors que le risque de perte d'efficacité par développement de résistance au mode d'action des techniques est commun chez les biocides et en constitue l'une des limites majeures, il est improbable chez les moustiques GM RIDL, comme chez les autres techniques de lutte émergentes impliquant des lâchers de moustiques stériles ou stérilisants TIS et TII, car leurs modes d'action respectifs n'impliquent pas de cible génétique. Ceci pourrait conférer un avantage significatif à l'application de ces techniques émergentes sur la durée. On note toutefois la possibilité d'un développement de résistance comportementale contre les moustiques RIDL et éventuellement les moustiques porteurs de *Wolbachia*, bien que cela n'ait jamais été observé à ce jour, ce qui pourrait réduire la durabilité de ces techniques. A la différence des techniques de RIDL, TIS et TII, les techniques de forçage génétique fonctionnent par le biais d'une cible génétique et sont donc propices à un développement de résistance, que ce soit en raison de polymorphismes préexistants dans la population ou de mutations provoquées par religation imprécise dans la séquence reconnue par l'ARN guide. Des développements techniques pourraient toutefois permettre de minimiser ces évolutions de résistance dans le but d'obtenir une

élimination de population sans risque de rebond ou une modification complète de la population. Par ailleurs, le forçage génétique à des fins de modification de population, comme c'est le cas pour la technique de propagation d'IP *via Wolbachia*, pourrait théoriquement être sujet à un développement de résistance au phénotype recherché suite à la modification de la population, même si cette éventualité semble très peu probable dans le cas de l'exemple publié des anticorps dirigés contre *Plasmodium*.

b. certaines techniques de lutte antivectorielle pourraient également perdre de leur efficacité par **dérive de la technique ou perte de fonctionnalité :**

- le contrôle qualité des **biocides** de synthèse ne laisse pas entrevoir de possibilité d'une telle dérive intrinsèque mais pour certains biocides biologiques, comme les densovirus, une baisse de pathogénicité pourrait advenir en cas d'adaptation du virus à son moustique hôte (ce cas est intermédiaire entre le développement de résistance des moustiques, traité au point précédent, et une dérive fonctionnelle de la technique, puisqu'il implique une interaction et une co-évolution des deux organismes) ;

- concernant la technique **RIDL**, le système pourrait perdre sa fonctionnalité en cas de dérive génétique de *tTAV* pendant l'élevage en présence de tétracycline. Pour rappel, en l'absence de tétracycline, tTAV empêche le développement des moustiques transgéniques (tetR s'associant à tetO et induisant *via* VP16 la surexpression létale de tTAV) ; en présence de tétracycline, la létalité associée au gène *tTAV* est réprimée (la composante tetR de tTAV ayant plus d'affinité pour la tétracycline que pour tetO) ; la présence de tétracycline dans les élevages n'empêche toutefois pas la dérive génétique fonctionnelle de tTAV. En cas de perte de fonction, la descendance hémizygote héritant du gène *tTAV* muté resterait viable en l'absence de tétracycline. Oxitec teste la fonctionnalité de *tTAV* toutes les 6 générations. Aucune occurrence de perte de fonction n'a été détectée jusqu'à présent (Oxitec, comm. pers.). En cas de survie sur le terrain de moustiques porteurs d'une tTAV désactivée, ceux-ci seront néanmoins tout aussi sensibles que des moustiques sauvages à une nouvelle intervention à base de moustiques porteurs de tTAV fonctionnelle (la pleine fonctionnalité du système pourrait être rétablie par la purification de la souche OX513A *via* l'élimination des allèles non fonctionnels) ;

- une dérive fonctionnelle de la **TII** pourrait être observée en cas d'un lâcher accidentel important de femelles. La TII serait moins efficace pour obtenir une réduction de population, puisque les femelles porteuses de *Wolbachia* seraient compatibles avec les mâles du terrain[63]. On note que ce risque de perte d'efficacité dû à un lâcher de femelles serait réduit en cas d'utilisation d'une souche de moustiques bi-directionnellement incompatible avec les moustiques de terrain, et serait nul en cas de combinaison avec la TIS (voir section 4.2.2.1.) ;

- dans le cadre de la technique de **propagation de l'IP**, la population de terrain est modifiée en une population porteuse de *Wolbachia,* censée diminuer la compétence vectorielle des moustiques femelles. Théoriquement, cette technique pourrait dériver en cas de diminution de la densité voire de perte de *Wolbachia*. La perte de *Wolbachia* chez les populations transinfectées n'est pas documentée à la connaissance des experts du groupe de travail, mais elle devra être testée dans la descendance des populations modifiées, à différents âges et dans des conditions

[63] On observerait un remplacement partiel de population. La stratégie TII se transformerait partiellement en stratégie IP, sans que la propriété d'IP (interférence avec le pathogène) n'ait été nécessairement confirmée. Il faut souligner que cette propriété n'est pas commune.

variables de différents paramètres biotiques et abiotiques tels que la chaleur, l'infection ou la résistance à des insecticides, etc. Des variations de densités et de transmission maternelle de *Wolbachia* ont été observées en conditions expérimentales selon la température (Ross et al., 2017). Des évolutions de densité et de virulence de *Wolbachia* ont été rapportées en populations naturelles (Echaubard et al., 2010; Weeks et al., 2007). Une autre possibilité théorique de dérive fonctionnelle de la technique de propagation de l'IP concernerait une évolution des interactions entre *Wolbachia* et son hôte, conduisant à une éventuelle diminution progressive de la protection conférée aux moustiques par *Wolbachia* ;

- enfin, les techniques de **forçage génétique** pourraient être spontanément inactivées en cas de méthylation de la chromatine, inactivation par la voie des petits ARN interagissant avec Piwi (piRNA)[64], ou mutation de la cassette de forçage génétique. Dans les faits, l'inactivation par méthylation de la chromatine semble peu probable chez les moustiques, la méthylation n'ayant pas été détectée chez *Anopheles* et peu chez *Aedes*. Il semble toutefois que les transposons naturels et artificiels, auxquels une cassette de FG peut être assimilée en tant qu'élément exogène, puissent être inactivés par la voie des piRNA [E. Marois, données non publiées, et (Vodovar et al., 2012)]. Par ailleurs, d'autres voies épigénétiques d'inactivation pourraient être découvertes à l'avenir.

Ainsi, il existe une possibilité de dérive fonctionnelle de la technique RIDL, même si elle est contrôlable et rapidement corrigeable dans le temps. Les techniques de forçage génétique sont également susceptibles de perdre leur fonctionnalité avec le temps, ce qui est plus problématique pour la continuité de leur efficacité sur le terrain. Ce risque n'est pas particulier aux moustiques GM. Les techniques utilisant *Wolbachia* peuvent également dériver, pour d'autres raisons. On note que la technique TIS se distingue des autres techniques émergentes par une absence de risque identifié de dérive fonctionnelle.

Dans les deux cas, il est important de souligner que la **surveillance** permet de détecter la sélection et l'évolution de résistances dans la population des cibles ainsi que l'occurrence de perte de fonctionnalité des méthodes de lutte mises en œuvre, et permet d'adapter la technique de lutte appliquée en conséquence : **la mise en œuvre des techniques auto-limitées peut alors être stoppée et corrigée (ex : changement d'insecticide, arrêt de lâchers de moustiques) ; pour les techniques auto-entretenues, il s'agira non pas d'en stopper la mise en œuvre, ce qui, par définition, sera impossible, mais d'en imposer une autre (autre *Wolbachia*, autre forçage génétique, autres techniques, de mode d'action différent).**

N.B. Ces possibilités d'évolution de résistance chez les cibles ou de dérive de la technique par perte de fonctionnalité ont été examinées dans cette section en termes de perte de l'efficacité de la technique de lutte considérée. Les impacts potentiels associés en termes de risques pour la santé et l'environnement sont considérés dans la section 4.3.4..

6. Problématique de la compétitivité des mâles

Cette problématique concerne toutes les techniques impliquant des lâchers de mâles, dont les techniques utilisant des moustiques GM (RIDL et forçage génétique).

L'efficacité et l'efficience des techniques impliquant des lâchers de mâles peuvent varier selon la compétitivité des mâles relâchés vis-à-vis des femelles sauvages, c.-à-d. la probabilité

[64] La voie des petits ARN associés aux protéines Piwi constitue un mécanime naturel de silençage des transposons par interférence ARN. Chez l'anophèle, il existe un exemple de transgène inactivé par cette voie (laboratoire S. Blandin, E. Marois, comm. pers., article en préparation).

d'accouplement des mâles relâchés avec les femelles sauvages par rapport à celle des mâles sauvages.

En préalable, il est nécessaire de souligner l'importance de l'impact des conditions d'élevage de masse sur la compétitivité des mâles relâchés, quelles que soient les techniques mises en œuvre. En effet, qu'il s'agisse de la TIS, de TII, de la combinaison TII-TIS, de RIDL, voire de la propagation de l'IP, ces techniques requièrent un processus industriel d'élevage, avec des procédés de production qui peuvent s'avérer néfastes si la biologie de l'insecte n'est pas respectée. Il faut également noter que les différentes données disponibles dans la littérature ne sont pas toujours directement comparables, du fait des différentes modalités de mesure de compétitivité (ovitrap *versus* pièges à adultes), des différentes conditions d'essais (essais semi-contrôlés en serre, qui fournissent un indice de qualité de l'insecte, *versus* essais de terrain, qui intègrent de nombreux facteurs supplémentaires), des différentes espèces de moustiques étudiées, et enfin des différentes techniques mises en œuvre. Il est donc difficile de distinguer l'effet de l'élevage de masse de celui de l'irradiation, de *Wolbachia* ou de RIDL sur la compétitivité des mâles, et au final de comparer les différentes performances, en termes de compétitivité des mâles, de ces techniques entre elles.

On peut toutefois noter les points suivants :

- du fait des effets aléatoires de l'irradiation, on pourrait s'attendre à ce que la compétitivité des mâles irradiés relâchés dans la TIS soit systématiquement affectée, mais ce n'est pas toujours le cas, selon des données d'expérimentation en cages pour les moustiques, à évaluer sur le terrain, ou des données de terrain pour d'autres insectes (voir 4.2.1.) ;
- certaines souches de *Wolbachia* peuvent affecter la compétitivité des mâles infectés. Ce fut le cas de *w*MelPop chez *Ae. aegypti*, technique qui a précisément été abandonnée à cause des effets délétères qu'elle entraînait (voir 4.2.2.). D'autres souches, comme celle d'*Ae. riversi* après introgression dans *Ae. polynesiensis*, montrent un très faible impact sur la compétitivité de terrain des mâles infectés relâchés pour les femelles non infectées (C=0,68) (O'Connor et al., 2012) ;
- par ailleurs, du fait de la spécificité du transgène inséré, la technique RIDL ne laissait pas présager d'un impact quelconque sur la compétitivité des mâles transgéniques. Il a toutefois été constaté que les mâles de la lignée OX513A d'Oxitec n'avaient que 3 à 15 % des chances des mâles sauvages de s'accoupler avec les femelles sauvages (c.-à-d. C=0,03 à C=0,15). Cet écart ne serait pas associé à la technique transgénique en tant que telle, mais à l'adaptation de la lignée aux conditions d'élevage de masse. Il faut souligner que les moustiques OX513A se sont montrés aussi compétitifs que des moustiques non GM en conditions confinées (Harris et al., 2011; Lee et al., 2013), et que ce niveau de compétitivité de terrain n'est pas exceptionnel par rapport à des données obtenues avec d'autres insectes TIS [C=0,3 à 0,5 pour les glossines au Sénégal (Bouyer et al., 2012) ; C=0,1 pour la lucilie bouchère (Mayer et al., 1998; Vreysen, 2005), et C<0,01 pour la mouche des fruits méditerranéenne (Rendon et al., 2004; Shelly et al., 2007), celle-ci étant toutefois connue pour avoir des compétitivités particulièrement basses en raison d'une cérémonie d'accouplement très complexe] (voir 3.2.3.) ;
- enfin, les premiers exemples de mâles transgéniques dotés de la propriété de forçage génétique ne devraient pas être moins compétitifs que les mâles sauvages *a priori*, mais la compétitivité devra être testée au cas par cas des nouvelles lignées. La problématique de la compétitivité des mâles relâchés est toutefois moins importante pour le forçage génétique du fait de la propagation rapide du transgène dans le fond génétique de la population cible.

L'impact d'une faible compétitivité des mâles sur l'efficacité de telles techniques pourra être compensé par une augmentation de la quantité de mâles relâchés, ce qui aura pour répercussion de diminuer l'efficience de la technique et pourrait poser un problème de viabilité économique.

Cette problématique n'est pas spécifique aux techniques utilisant des moustiques GM, elle vaut pour toutes les techniques basées sur des lâchers de moustiques mâles.

7. Potentiel d'efficacité selon la densité de la population cible

Les différentes techniques de lutte peuvent présenter des efficacités très variables en fonction de la densité de la population cible :

a. les techniques classiques de lutte, comme les biocides, sont réputées avoir une efficacité indépendante de la densité de l'insecte cible. Cette efficacité théorique est cependant confrontée à plusieurs limites qui font qu'en pratique, leur efficacité diminue avec la densité de la population cible, qui diminue elle-même au cours d'un effort de lutte visant sa réduction. On peut citer comme contraintes pratiques réduisant cette efficacité :

   - la distribution agrégée (non continue) systématique des populations d'insectes et l'impossibilité d'atteindre l'ensemble des sites infestés, qui diminuent l'efficacité de certaines méthodes comme la pulvérisation d'aérosols d'insecticides par voie aérienne (Adam et al., 2013) ou les systèmes de piégeage attractifs toxiques, qui ne peuvent être posés dans l'intégralité de ces gîtes (Bouyer et al., 2013) ;
   - l'utilisation de prédateurs, parasitoïdes ou parasites, qui sont d'autant moins efficaces que la densité de la proie diminue (Krivan, 2007), les prédateurs non spécifiques se focalisant sur les espèces de proies les plus abondantes.

   Ces méthodes permettront donc une réduction initiale rapide des densités des populations de moustiques visées (souhaitable par exemple en cas de crise sanitaire) mais ont peu de chance d'aboutir à l'élimination de ces dernières ;

b. à l'inverse, les techniques de réduction comme la TIS, RIDL et TII seront d'autant plus efficaces que la densité des moustiques de terrain sera faible à nombre de moustiques lâchés constant, puisque le ratio de mâles stériles sur mâles sauvages que l'on peut imposer sera d'autant plus important que la population sera réduite par l'effort de lutte. Ces techniques impliquant des lâchers de moustiques ne pourront être utilisées efficacement en saison de pullulation des moustiques, à moins d'être précédées par des techniques efficaces à fortes densités comme l'utilisation de biocides. Les lâchers sont ensuite optimisés en fonction de la densité des moustiques sur le terrain, et adaptés selon les indicateurs d'efficacité de la technique dans le temps. En effet, un ratio insuffisant de mâles stériles pourrait entraîner une augmentation de la génération suivante d'adultes de moustiques en augmentant la survie larvaire du fait d'une diminution des densités larvaires dans les gîtes (par stérilisation d'une partie des œufs) et donc avoir un effet inverse à celui attendu. Cet effet, qualifié de surcompensation densité-dépendante, est classique chez les moustiques (White et al., 2010). On note que cet effet ne devrait pas être observé dans le cas de la stratégie RIDL du fait de la létalité tardive des larves (Phuc et al., 2007).

En d'autres termes, l'efficacité des méthodes classiques de lutte antivectorielle est indépendante de la densité au-delà d'un certain seuil de densité de la population des moustiques ciblés ; sous ce seuil, elle diminue avec la densité, jusqu'à s'annuler avant d'avoir pu conduire à une élimination. A l'inverse, les techniques de réduction comme la TIS, RIDL et la TII ne peuvent être efficaces que sous un certain seuil de densité de la population des moustiques ciblés (fonction du ratio entre le nombre de mâles relâchés et de mâles sauvages et de la compétitivité des mâles relâchés par rapport aux mâles sauvages) ; sous ce seuil, elles sont d'autant plus efficaces que la densité est faible, conduisant de ce fait à une élimination de la population (Feldmann and Hendrichs, 2001).

Par ailleurs, certaines méthodes environnementales, comme la réduction des gîtes larvaires, peuvent nécessiter un effort conséquent lorsque la disponibilité de ces derniers n'est pas limitante pour la population cible. Ainsi, si seuls 50 % des habitats larvaires sont utilisés par *Ae. albopictus* dans une

zone donnée, les réduire de 75 % ne réduira les gîtes larvaires occupés (et donc, à peu de choses près selon la qualité des gîtes, la population d'adultes) que de 50 %.

Ces différents profils d'efficacité des différentes techniques de lutte antivectorielle en fonction des contextes incitent à combiner les techniques compatibles et complémentaires dans une vision de lutte intégrée. Les techniques utilisant des moustiques GM seront ainsi utilement combinées à d'autres techniques de lutte.

8. Facteurs externes pouvant influencer ou interférer avec le succès des techniques

Des facteurs externes peuvent influencer ou interférer avec le succès de certaines techniques de lutte antivectorielle. Par exemple, les facteurs climatiques et météorologiques interférant avec la biologie et le cycle de vie des moustiques ciblés, ils doivent clairement être pris en compte dans toutes les techniques de lutte. Ces facteurs peuvent également interférer directement avec certaines techniques, comme l'application de biocides ou les lâchers de moustiques, qu'ils soient GM ou non.

Les pratiques agricoles locales peuvent affecter le succès et la durabilité de la lutte biocide. En effet, certaines pratiques agricoles font usage des mêmes molécules que les biocides à des fins de protection des plantes. Les utilisations de produits biocides et phytopharmaceutiques étant réglementées de manière indépendante (voir 4.1.1.), ceci pose un problème significatif de gestion du risque de développement de résistances des moustiques à ces molécules au niveau du territoire. Ce problème est accru du fait des différences d'échelles d'utilisation des produits entre les contextes de démoustication et d'utilisation agricole et du fait que les acteurs de la démoustication ignorent la plupart du temps les pratiques phytosanitaires alentour. Ces réglementations multiples pour de mêmes molécules posent un problème de fond pour les gestionnaires/acteurs locaux de la lutte antivectorielle pour la maîtrise des résistances des moustiques.

4.3.3. Contraintes techniques

Les contraintes techniques considérées dans cette section mettent en avant la problématique des élevages de moustiques pour les techniques de lutte antivectorielle impliquant des lâchers de moustiques, dont les moustiques GM.

Les techniques existantes de lutte ne sont certes pas dénuées, elles non plus, de contraintes techniques, contraintes qui peuvent être d'une toute autre nature. Ainsi, à titre d'information et de comparaison, les biocides nécessitent une production industrielle et un transport particulier sur les lieux d'application. Ils doivent être appliqués selon des modalités spécifiques de manipulation et de mise en œuvre au moyen de matériels et techniques d'épandage divers, et respectant les contraintes d'élimination des PPNU (produits phytosanitaires non utilisés) et des EPPV (emballages de produits phytosanitaires vides), l'ensemble de ces procédures étant adapté aux différentes caractéristiques de toxicité de ces biocides pour l'environnement et la santé.

Les contraintes techniques spécifiques associées à l'élevage et aux lâchers de moustiques incluent :

- la nécessité d'un élevage plus ou moins grand, et ses conséquences en termes d'infrastructures,
- la mise en place et le fonctionnement de l'élevage,
- la dépendance à des ressources biologiques comme le sang et problématiques associées (source, qualité),
- la séparation des individus selon leur sexe (nécessité, facilités),
- le système de lâcher de moustiques.

1. Nécessité d'un élevage plus ou moins grand et conséquences en termes d'infrastructures

Des élevages de moustiques sont nécessaires pour les techniques impliquant un lâcher de moustiques à plus ou moins grande échelle :

- des élevages de masse s'imposent pour toutes les techniques qui nécessitent des lâchers inondatifs récurrents avec un objectif de réduction (TIS, TII, RIDL), impliquant des infrastructures importantes et donc un investissement significatif ;
- les besoins en élevage sont beaucoup plus réduits pour les techniques de forçage génétique, qu'elles aient pour objectif une élimination ou une modification de population, du fait des caractéristiques intrinsèques d'invasibilité du transgène dont on souhaite la propagation. Un seul moustique pourrait en théorie suffire à initier la propagation du transgène par un forçage génétique médié par le système CRISPR-Cas9, même si en pratique, des lâchers plus conséquents sont prévus pour accélérer la propagation de la modification (Austin Burt, comm. pers.). Ces techniques pourraient *a priori* être mises en œuvre par un laboratoire pré-existant sans recourir à un investissement en infrastructure ;
- la technique de propagation d'une IP *via Wolbachia* a des besoins intermédiaires, cette technique ne nécessitant pas ou peu de maintenance selon l'échelle de la région ciblée après fixation de la souche sur le terrain. En pratique, cette fixation ne pourra s'effectuer que si les lâchers permettent de dépasser un seuil de densité relative initiale, qui dépend du coût génétique associé à *Wolbachia*. Ce seuil déterminera la taille de l'élevage requis ;
- on note que des élevages de moustiques sont également nécessaires pour la production de densovirus, disséminés ensuite sous forme de larves de moustiques tuées.

2. Mise en place et fonctionnement de l'élevage

Ces élevages sont plus ou moins aisés à mettre en place, et peuvent entraîner des conséquences préjudiciables à l'efficacité des techniques de lutte antivectorielle :

- leurs conditions de fonctionnement doivent être ajustées selon les espèces. Les protocoles sont en cours d'optimisation pour *Ae. aegypti* et *albopictus* et de développement pour les anophèles (Bourtzis et al., 2016) ;
- les élevages peuvent être mis en place plus ou moins rapidement selon les conditions requises par les différentes techniques. Idéalement, les lignées de moustiques relâchés devraient être aussi proches que possible des moustiques sauvages présents dans la zone ciblée, en particulier pour des objectifs de modification de population, pour lesquels le génome des moustiques d'élevage va s'hybrider avec celui des moustiques sauvages et contribuer à la population de la zone ciblée :
    - les moustiques irradiés (TIS) sont les plus rapides à produire à partir d'une souche locale[65]. Après une période minimale incompressible d'acclimatation à l'élevage, peu de générations de multiplication d'élevage sont nécessaires du fait du fort taux de fécondité des moustiques, ce qui minimise la dérive génétique qui pourrait être observée du fait de l'adaptation différentielle des génotypes aux conditions d'élevage ;
    - les moustiques transinfectés avec des bactéries *Wolbachia* (TII et IP) sont plus délicats à obtenir, et nécessitent souvent de nombreuses générations pour permettre à l'infection de s'établir, un processus qui est probablement associé à une co-adaptation génétique plus ou moins importante des moustiques et des bactéries. Repartir d'une souche locale de moustiques est donc moins évident et demande un

[65] Cette affirmation serait à nuancer pour les anophèles car toutes les espèces d'anophèles ne s'adaptent pas forcement bien à l'élevage, même au sein du complexe *An. gambiae*.

temps plus long de mise en place de la technique. Une alternative à la transinfection directe d'une souche locale consiste à croiser une souche dans laquelle l'infection est établie avec une souche locale, et de restaurer le fond génétique local par rétrocroisement (6 générations permettent de restaurer plus de 98 % du génotype local). Les bactéries *Wolbachia* recherchées peuvent ainsi être introgressées dans une souche locale en quelques mois. C'est ce qui a été fait, par 9 générations de back-cross, pour obtenir les lignées d'*Ae. aegypti w*Mel_Br destinées à être relâchées au Brésil à partir des lignées australiennes infectées avec *w*Mel (Dutra et al., 2015) ;

- les moustiques transgéniques posent le problème de manière encore plus accrue, une souche de moustiques locale n'étant pas nécessairement la plus propice aux conditions de laboratoire et de transformation génétique. De ce fait, la lignée OX513A d'*Ae. aegypti* a été initialement développée à partir de la souche de laboratoire Rockefeller. Constituée dans les années 1930s, cette souche est bien adaptée aux conditions de laboratoire, propice à la transformation, mais a perdu des traits d'adaption au terrain. En préparation aux lâchers de terrain, l'insertion a donc été introgressée dans une souche plus récemment constituée. De fond génétique mexicain, cette souche a été formée à partir de 20 femelles pour assurer un certain niveau de diversité génétique (Lee et al., 2013). La lignée OX513A résultante a été maintenue en laboratoire et en élevage depuis plus de 100 générations. Elle a été utilisée pour tous les essais de terrain rapportés, dans des conditions aussi diverses que la Malaisie, les îles Caïmans, le Brésil ou le Panama. Il en résulte (1) une bonne adaptation à des conditions d'élevage optimisées, (2) l'évaluation d'une même souche sur plusieurs années, ce qui permet de consolider sa caractérisation et de s'assurer de sa stabilité, mais (3) une possible réduction de compétitivité avec les mâles sauvages locaux (estimée entre 3 et 15 % selon les essais réalisés), qui n'est compensée que par le lâcher d'un nombre plus élevé de moustiques. Oxitec ne semble pas envisager une introgression de la cassette génétique RIDL dans des souches issues de populations locales. Les moustiques dotés de forçage génétique ont a *priori* les mêmes désavantages associés à la sélection de souches de moustiques adaptées au laboratoire et à la transformation génétique, mais le fond génétique de la souche importe moins puisque la cassette transgénique se répandra dans le fond génétique sauvage au fur et à mesure de la progression du forçage génétique. La cassette de forçage génétique pourra de toute façon être introgressée en laboratoire dans une souche locale avant le lâcher[66].

3. <u>Dépendance à des ressources biologiques comme le sang et problématiques associées</u>

Qui dit élevage de moustiques dit nécessité de fournir du sang, de façon à permettre la maturation des œufs chez les femelles fécondées. Cela pose les questions de la quantité et de la qualité du sang, et les questions associées à son origine et à sa stérilisation.

- Source : le sang peut provenir d'élevages dédiés, comme c'est le cas pour Oxitec, de banques de sang humain, comme dans le programme *Eliminate Dengue* pour les lâchers effectués en Australie, ou d'abattoirs, comme c'est souvent le cas pour les programmes de TIS. Les volumes de sang nécessaires ne sont pas si importants et ne sont pas à considérer comme un facteur bloquant : une femelle ne nécessite que quelques microlitres de sang pour pondre de 50 à 60 œufs (cas d'*Ae. albopictus*) ou de 60 à 80 œufs (cas d'*Ae. aegypti*). Un lâcher d'un million de mâles ne devrait pas nécessiter plus d'un litre de sang. Les méthodes de distribution de sang peuvent être optimisées pour réduire encore davantage ces volumes, par exemple par l'utilisation de membranes.

[66] Cette affirmation serait également à nuancer pour les anophèles.

- Qualité : il est impératif de contrôler la qualité du sang fourni à l'élevage. Le sang doit être stérilisé pour éliminer les bactéries qu'il contient et qui peuvent être nuisibles à l'élevage d'une part, mais aussi pour détruire des pathogènes pouvant potentiellement être transmis par les femelles relâchées d'autre part. L'absence de pathogènes dans le sang doit être garantie pour les techniques nécessitant un lâcher de femelles ou risquant un lâcher accidentel de femelles. Les moustiques relâchés sont le produit de la descendance de femelles d'élevage nourries avec du sang d'animaux d'élevage. Autrement dit, les femelles relâchées ne sont pas directement nourries de ce sang, mais leurs mères le sont. Ainsi, si le sang d'élevage était contaminé et qu'il n'était pas stérilisé, les femelles relâchées pourraient risquer de répandre un pathogène chez leurs hôtes dans l'environnement dans l'éventualité où elles en hériteraient de leur mère par transmission verticale.

La stérilisation du sang peut se faire selon différentes modalités :

- la stérilisation du sang par irradiation va de pair avec la mise en œuvre de la TIS car l'irradiateur utilisé pour irradier les moustiques peut également être utilisé pour stériliser le sang, à des doses de 1000 à 2000 Gy ;
- il faudrait vérifier le mode de stérilisation utilisé dans les élevages de moustiques dans les techniques utilisant *Wolbachia*, notamment les stratégies de modification de population, qui consistent en des lâchers de mâles et de femelles. Dans le cadre du *Eliminate Dengue Program* en Australie, le sang proviendrait de banques de sang humain ; il est donc testé pour son absence de pathogène ;
- la firme Oxitec indique avoir recours à une société privée qui lui fournit un sang certifié stérile, prélevé d'animaux élevés pour cet usage. Le contrôle qualité du sang utilisé dans les élevages de moustiques RIDL devra être examiné.

N.B. Des pistes alternatives de repas artificiels se développent. Leur efficacité pour la production d'œufs n'est pas encore optimale. La facilité à obtenir du sang animal incite peu à ces développements.

4. <u>Séparation des individus selon leur sexe (nécessité, facilités)</u>

Le sexage, ou séparation des individus selon leur sexe, est nécessaire pour les techniques faisant appel à des lâchers exclusifs de mâles. L'ensemble des techniques impliquant des lâchers inondatifs de mâles stériles ou stérilisants (TIS, TII, RIDL) est concerné. Les lâchers exclusifs de mâles sont également préférables pour les moustiques FG. En effet :

- pour les techniques TIS et RIDL, le sexage et la sélection exclusive de mâles permet d'une part, de maximiser la compétitivité des mâles relâchés pour l'accouplement avec des femelles sauvages, et d'autre part, d'éviter de relâcher des femelles piqueuses et potentiellement vectrices de pathogènes, même si elles n'ont pas la capacité de produire de descendance ;
- pour la technique TII, le sexage est non seulement important pour les raisons évoquées ci-dessus pour la TIS et RIDL, mais il est surtout essentiel pour éviter que les bactéries *Wolbachia* ne se propagent dans la population à partir de femelles relâchées, car les mâles relâchés ne peuvent stériliser que des femelles dépourvues de *Wolbachia*. L'utilisation d'une IC bi-directionnelle ou l'irradiation à faibles doses (TII-TIS) peuvent toutefois permettre de préserver la fonctionnalité de la technique en évitant que les femelles relâchées n'aient de descendance avec les mâles sauvages (4.2.2.1.) ;
- pour les moustiques FG, le lâcher de femelles est évité pour ne pas augmenter la population de femelles piqueuses et/ou potentiellement vectrices de pathogènes. On note que les techniques de FG ne nécessitent pas de lâchers massifs de moustiques en théorie ;

- la technique de propagation de l'IP est la seule technique reposant sur un lâcher de moustiques femelles. Comme les mâles peuvent également être relâchés, permettant ainsi d'accélérer la modification de la population (un accouplement entre les mâles relâchés porteurs de *Wolbachia* et les femelles sauvages empêchant celles-ci d'avoir une descendance), elle ne nécessite pas de sexage.

L'analyse des risques associés aux lâchers de femelles est réalisée dans la section 4.3.4.

Les facilités de sexage diffèrent selon les espèces :

- il existe un dimorphisme sexuel chez *Ae. aegypti* et *albopictus*, les nymphes mâles étant plus petites que les nymphes femelles, ce qui peut être exploité pour trier les nymphes par tamisage. Cependant, les systèmes de sexage disponibles sont encore lourds et peu efficients, et ne sont pas efficaces à 100 % [pour *Ae. albopictus*, l'équipe de Bellini rapporte un taux de récupération de seulement 30 % de mâles, avec un taux résiduel de 1,2 % de femelles (Bellini et al., 2013)] et devront être améliorés pour des lâchers à grande échelle. Après un tri mécanique des nymphes, Oxitec indique procéder à des contrôles avec l'objectif de ne pas relâcher plus de 0,2 % de femelles *Ae. aegypti* (Oxitec, 2016). Les lâchers aux îles Caïmans, au Brésil et au Panama, ont respectivement consisté en 99,93 % et plus de 99,97 % et 99,99 % de mâles (Carvalho et al., 2015; Gorman et al., 2016; Harris et al., 2012) ;
- ce dimorphisme est moins prononcé chez les anophèles, et leurs nymphes, moins rigides, supportent moins le séparateur utilisé pour les *Aedes* ; un développement technique important sera donc nécessaire pour séparer les mâles des femelles anophèles de manière efficace, même pour les essais de petite échelle. Concernant les moustiques transgéniques, des systèmes de marquage fluorescent différentiel des mâles et des femelles sont testés pour sélectionner les mâles par cytométrie en flux (COPAS, *Complex Object Parametric Analyzer and Sorter*).

Face à ces besoins, l'AIEA a entrepris de financer un projet de 5 ans (2013-2018) destiné à élaborer un système de sexage qui soit efficace et efficient pour permettre des lâchers de moustiques mâles à grande échelle (Gilles et al., 2014). D'autres initiatives sont en cours. Oxitec teste différents types d'innovations pour améliorer leur système de sexage interne (Hadyn Parry, communication au HCB lors de l'audition d'Oxitec). L'identification récente d'un gène contrôlant la production de moustiques mâles chez *An. gambiae* ouvre la possibilité de produire des moustiques transgéniques fournissant de manière conditionnelle uniquement des descendants mâles (Krzywinska et al., 2016).

5. Système de lâcher de moustiques

Il n'existe pas de système de lâcher de moustiques efficace à ce jour en raison de la faible dispersion naturelle des moustiques adultes, et de leur manque de robustesse (perte des pattes, déshydratation en cas de largages par hélicoptère ou avion), contrairement aux systèmes de lâcher développés pour d'autres insectes comme les glossines (mouches tsé-tsé) par exemple (Mubarqui et al., 2014). Ce point mérite d'être amélioré. Un système de lâcher de moustiques par des drones pourrait être étudié sous réserve d'une réglementation aéronautique appropriée sur le territoire français.

Ainsi, il existe d'importantes contraintes techniques d'infrastructures et de logistique associées aux élevages et aux lâchers de moustiques, qu'ils soient GM ou non. Ces contraintes varient selon les espèces de moustiques considérées – la biologie des espèces ayant une forte incidence sur les conditions d'élevage, la qualité desquelles est primordiale pour assurer la compétitivité des moustiques relâchés, et sur les techniques de sexage, verrou technologique majeur associé aux lâchers de moustiques. Elles varient également selon le nombre de moustiques à relâcher, déterminé par les techniques et les stratégies dans lesquelles elles s'inscrivent – les techniques TIS, RIDL et TII appliquées à des fins de réduction nécessitant des élevages de masse fonctionnels sur la durée pour assurer des lâchers inondatifs et récurrents (à nuancer quand ces mêmes techniques

sont utilisées à des fins d'élimination), la technique de propagation de l'IP nécessitant des élevages de taille et de durée intermédiaires variables selon le coût génétique associé à la souche de *Wolbachia* utilisée, et les techniques de forçage génétique nécessitant des élevages de taille réduite. On peut également souligner que la mise en place d'élevages à partir de moustiques locaux est plus ou moins aisée selon les techniques : elle sera plus simple et plus rapide pour des moustiques irradiés que pour des moustiques infectés avec *Wolbachia* et des moustiques GM. La mise en place de ces derniers peut être simplifiée et accélérée par introgression, dans des souches locales, respectivement de *Wolbachia* ou d'insert transgénique à partir de lignées initialement transinfectées ou transformées. Si cela semble être suivi dans le cadre du programme *Eliminate Dengue*, cela ne semble pas être la stratégie adoptée par Oxitec, qui a utilisé une lignée unique d'*Ae. aegypti* pour les différents lâchers qui ont fait l'objet de publication à ce jour, y compris dans des régions éloignées de l'origine du fond génétique de la lignée. Enfin, un élément primordial à souligner en termes de prévention de risques, commun à toutes les techniques impliquant des lâchers de moustiques, est le contrôle de la qualité du sang utilisé pour nourrir les femelles d'élevage, de façon à éviter tout risque d'introduction de pathogènes dans l'environnement en cas de lâcher de femelles.

4.3.4. Risques pour l'environnement et la santé

Avertissement :

(1) les éléments qui suivent concernant les risques potentiellement associés aux différentes techniques de lutte antivectorielle sont indicatifs et d'ordre général. Une évaluation formelle des risques associés à une technique donnée de lâchers de moustiques nécessiterait de disposer de données précises d'un dossier spécifique de demande d'autorisation de dissémination. En particulier, les critères définis pour l'utilisation de moustiques GM (voir Chapitre 5) devront être renseignés et évalués au cas par cas ;

(2) bien que ces éléments visent à mettre en évidence les différents risques associés aux différentes techniques de lutte antivectorielle, cette analyse soulignera également l'importance primordiale d'autres facteurs de variation déterminants dans l'évaluation de ces risques, comme l'espèce de moustiques ciblée (invasive, autochtone, endémique…), l'environnement concerné (urbain, rural…), sa situation géographique (plus ou moins isolée), l'objectif visé par la lutte (réduction, élimination, éradication, modification…), etc.

Dans l'objectif d'identifier d'éventuelles spécificités, en termes de risques, des techniques utilisant des moustiques GM par rapport aux autres techniques, les risques associés aux différentes techniques de lutte antivectorielle ont été évalués de manière transversale selon les entrées suivantes :

- le degré de spécificité des différents modes d'action des techniques considérées et ses conséquences en termes d'impact direct sur les organismes non cibles et la santé,
- les risques associés aux objectifs des stratégies de lutte (réduction, élimination, modification de population) plutôt qu'aux techniques elles-mêmes,
- les risques pour l'environnement et la santé en cas de perte d'efficacité d'une technique de lutte, par développement de résistances ou dérive fonctionnelle,
- les risques spécifiques associés aux lâchers de moustiques, qui pourraient découler d'une éventuelle persistance et d'un éventuel caractère envahissant des moustiques relâchés (ou d'éléments associés aux moustiques relâchés) d'une part, ou d'éventuels lâchers de femelles d'autre part.

Des questions supplémentaires spécifiques à des techniques de lutte ont ensuite été abordées :

- concernant les moustiques transgéniques : la question relative à d'éventuels nouveaux produits,

- concernant la technique RIDL : la question de l'utilisation de la tétracycline,
- concernant le forçage génétique : la question de l'activité de mutagenèse collatérale du système CRISPR-Cas9 et ses conséquences, le risque particulier de transfert d'une cassette de forçage génétique et ses conséquences, la question spécifique de l'éradication d'une espèce, le risque d'insertion d'un gène indésirable dans la cassette de FG, les risques imprévisibles et les moyens de s'en prémunir, et enfin les précautions à prendre pour la recherche,
- concernant l'utilisation de bactéries *Wolbachia* : le risque d'accroître la compétence vectorielle des moustiques pour la transmission de pathogènes locaux, et la possibilité de transfert horizontal de gènes de, vers et/ou *via Wolbachia* ou de transfert de *Wolbachia* entre espèces de moustiques.

1. *Spécificité du mode d'action des techniques et conséquences en termes d'impact direct sur les organismes non cibles et la santé*

Idéalement, une technique de lutte antivectorielle ne devrait affecter que les moustiques vecteurs ciblés par la lutte antivectorielle. Les différentes techniques étudiées ici présentent des niveaux de spécificité d'action différents. Un manque de spécificité pourra conduire à un impact direct sur d'autres organismes que les moustiques vecteurs ciblés par la lutte antivectorielle, dont l'Homme.

Les techniques qui fonctionnent par le biais d'un accouplement entre moustiques relâchés et moustiques de terrain (dont les techniques utilisant des moustiques GM) ont une spécificité d'action directe qui ne dépasse pas l'espèce concernée et d'éventuelles espèces interfertiles[67]. On peut à nouveau souligner ici que *Ae. aegypti* d'une part, et *Ae. albopictus* d'autre part, sont des groupes monophylétiques, dans le sens où ils ne consistent chacun qu'en une seule espèce. Ils présentent une forte barrière reproductive avec toute autre espèce de moustiques[68], assurant la spécificité d'action des techniques basées sur des lâchers d'*Ae. aegypti* ou *Ae. albopictus*. Ce n'est pas le cas pour les *Anopheles*, chez lesquels une éventuelle interfertilité au sein de complexes d'espèces, comme *An. gambiae*[69], devra être considérée dans une évaluation des risques. Parmi les techniques reposant sur des lâchers de moustiques, les techniques de forçage génétique ont une spécificité d'action encore plus stricte au sein de l'espèce, puisque seuls les individus portant une homologie avec la séquence ciblée par l'ARN guide et les séquences flanquantes pourront être modifiés puis transmettre le forçage génétique à leur tour. Le risque de perte d'efficacité de la technique associé à la présence d'individus polymorphes pour ces séquences et des solutions possibles pour contrer cette éventualité ont été abordés plus haut (voir 4.3.2).

La situation est plus hétérogène concernant la lutte biocide, dont la spécificité d'action dépendra des caractéristiques des biocides utilisés :

- les pyréthrinoïdes, comme la deltaméthrine, ne sont pas sélectifs. Modérément toxiques pour les mammifères et faiblement pour les oiseaux et les vers de terre, ils présentent une toxicité très élevée pour les organismes aquatiques même si, en cas d'exposition, une récupération de l'écosystème est attendue au bout de quelques mois. Ils sont également très toxiques pour les abeilles et les pollinisateurs (Afsset, 2007a). En termes sanitaires, la deltaméthrine présente une toxicité essentiellement aiguë (Afsset, 2007a). Plus récemment, un effet nocif sur le cerveau en développement a également été suggéré (Viel et al., 2015). Ces caractéristiques ont conduit à de

[67] Au sens strict de la définition de l'espèce, tout accouplement interfertile n'est possible qu'au sein de l'espèce, des « espèces » interfertiles devant en fait être considérées comme des sous-espèces.

[68] On note l'existence d'un phénomène de satyrisme entre *Ae. albopictus* et *aegypti*, par lequel les accouplements entre des mâles d'*Ae. albopictus* et des femelles d'*Ae. aegypti* résultent non pas en une descendance hybride mais en la stérilisation de ces dernières.

[69] Au sein du complexe d'espèces *An. gambiae s.l.,* des échanges génétiques ont été détectés sur le terrain entre *An. gambiae s.s.* et *An. coluzzii*. Une interfertilité est également décrite entre *An. gambiae s.s.* et *An. arabiensis* mais d'une ampleur très limitée. Ces trois espèces sont vectrices de *Plasmodium*.

fortes restrictions et précautions d'utilisation (voir 4.1.1) qui permettent en pratique de minimiser les risques associés ;

- l'activité du *Bti* semble essentiellement limitée à certaines familles des diptères du sous-ordre des nématocères, incluant les *Culicidae* (les moustiques) et les *Simulidae* (diptères responsables de l'onchocercose en Afrique) (Boisvert and Lacoursière, 2004; Boisvert and Boisvert, 2000) contre lesquelles il est utilisé. D'autres familles de diptères nématocères, comme les *Chironomidae* et *Tipulidae*, pouvant être à l'origine d'effets indirects sur la chaîne trophique selon certains auteurs (voir section sur les impacts indirects), ou certaines familles d'insectes d'autres ordres, comme les hétéroptères ou les trichoptères, peuvent également y être sensibles, mais à des doses d'utilisation bien supérieures à celles efficaces sur les *Culicidae* et de l'ordre de 5 à 1000 fois plus élevées que les doses opérationnelles (Boisvert et Boisvert, 2000). Ainsi, malgré leur sensibilité au *Bti*, plusieurs études n'ont pas détecté de perturbations des chironomes suite à des traitements au *Bti* (Duchet et al., 2015; Lagadic et al., 2016; Lundstrom et al., 2010; Vaughan et al., 2008). En termes sanitaires, le *Bti* se caractérise par une absence de toxicité aiguë, une toxicité modérée pour les organismes aquatiques, pas de toxicité directe pour les oiseaux, les mammifères et les abeilles (Afsset, 2007b). Un besoin de connaissances est toutefois souligné concernant l'impact sur les arthropodes du sol et la biodiversité aquatique, et la toxicité pour l'Homme, notamment chronique (Afsset, 2007b) ;
- les densovirus sont spécifiques d'une famille ou d'une sous-famille ; les densovirus utilisés contre les moustiques sont soit spécifiques de la famille des *Culicidae*, à savoir l'ensemble des espèces de moustiques, soit spécifiques de l'une ou l'autre des sous-familles de moustiques (*Culicinae* ou *Anophelinae*)[70] (Carlson et al., 2006).

On rappelle ici que la lutte biocide est réglementée différemment des OGM, sur le fondement du règlement (UE) n° 528/2012, qui prend en compte de manière appropriée la composante du spectre de toxicité et d'écotoxicité des biocides et prévoit des restrictions d'utilisation en conséquence.

Concernant le **contrôle biologique**, on note que les poissons culicivores comme les espèces de Guppy ou de Gambusie peuvent non seulement se nourrir de toutes larves de *Culicidae*, mais aussi d'une large gamme de zooplancton, d'insectes et de crustacés, voire même de juvéniles de poissons (y compris de leur propre espèce) se trouvant dans les milieux où ils sont introduits, les *Culicidae* ne constituant finalement qu'une petite fraction de leur régime, fraction qui de surcroît n'est pas préférentiellement choisie (El-Sabaawi et al., 2016; Fraval, 2002; Gkenas et al., 2012). De ce fait, au risque d'entraîner des déséquilibres écologiques prévisibles, leur utilisation devrait *a priori* être réservée à des milieux isolés colonisés essentiellement par les moustiques en zone urbaine.

Enfin, les techniques de **lutte physique et environnementale** ont des conséquences directes très variables sur l'environnement selon les mesures concernées : aux extrêmes, vider les coupelles d'eau pour éliminer les gîtes larvaires autour des maisons aura une action très spécifique des moustiques urbains *Aedes*, alors que, à l'opposé, assécher une zone humide pourra fortement perturber tout un écosystème local.

Il faut souligner que, **si la spécificité d'action d'une technique de lutte antivectorielle permet de réduire son impact sur l'environnement, elle ne va pas nécessairement dans le sens de l'efficacité de la lutte vis-à-vis d'une maladie** : une trop grande spécificité peut être préjudiciable à l'efficacité de la lutte vis-à-vis d'une maladie, et donc d'un pathogène donné. En effet, certains pathogènes peuvent être vectorisés par différentes espèces de moustiques. Par exemple, de nombreux virus transmis par *Ae. aegypti* le sont également par *Ae. albopictus* (voir 2.3.2). Dans les régions où ces

[70] Le densovirus *Aedes* Densonucleosis (AeDNV) est capable d'infecter plusieurs espèces des genres *Aedes*, *Culex*, et *Culiseta*, de la sous-famille des *Culicinae* ; en revanche, il n'est pas capable d'infecter *Anopheles maculipennis* de la sous-famille des *Anophelinae* [Carlson, J., Suchman, E., and Buchatsky, L. (2006). Densoviruses for control and genetic manipulation of mosquitoes. In Insect Viruses: Biotechnological Applications, Advances in Virus Research, pp. 361-392.].

deux espèces coexistent, une lutte par lâcher de moustiques *Ae. aegypti* ou *Ae. albopictus* ne ciblera que l'une ou l'autre de ces espèces. A l'inverse, une lutte contre *An. gambiae s.s.* (vecteur du paludisme) par lâcher de moustiques pourrait affecter les autres (sous-)espèces interfertiles du complexe *An. gambiae* également vectrices du paludisme comme *An. coluzzi*[71]. Cette moindre spécificité d'action pourra ainsi être bénéfique pour la lutte contre le paludisme. En matière de risques pour l'environnement, la spécificité d'une technique de lutte pour une espèce ou une sélection d'espèces de moustiques offre l'avantage de préserver l'existence d'autres populations de moustiques au sein de l'écosystème ciblé (voir plus loin).

Ainsi, par rapport aux techniques existantes, les techniques utilisant des moustiques GM, comme toutes les autres techniques impliquant des lâchers de moustiques, se caractérisent par une spécificité d'action inédite pour une lutte antivectorielle, située au niveau de l'espèce de moustiques. La spécificité d'action des techniques de forçage génétique peut être encore plus restreinte au sein de l'espèce selon la séquence cible définie par l'ARN guide. Cette spécificité des techniques basées sur des lâchers de moustiques est avantageuse pour réduire l'impact de la lutte antivectorielle sur l'environnement et la santé. Elle implique toutefois de déployer autant d'interventions particulières que d'espèces de moustiques vecteurs visées.

2. Risques associés aux objectifs des stratégies de lutte plutôt qu'aux techniques elles-mêmes

Selon leur objectif, les techniques de lutte antivectorielle peuvent conduire à la **réduction** (à différents degrés) ou à la **modification** de la population des cibles. La réduction, l'élimination ou la modification de la population de moustiques cibles auront des incidences caractéristiques sur l'environnement, quelles que soient les techniques utilisées.

a. La mise en œuvre des techniques de réduction de population, qu'elles impliquent des lâchers de moustiques ou non, devraient toutes nécessiter :

- *d'examiner le rôle écologique des populations ciblées, a fortiori en vue d'une élimination locale ou de l'éradication d'une espèce donnée (voir section sur le forçage génétique), en vue d'évaluer l'impact d'une réduction plus ou moins importante (selon l'efficacité de la technique) et plus ou moins durable (selon la durabilité de la technique) de la population de moustiques ciblés,*
- *d'examiner la spécificité de la technique de réduction et le risque que d'éventuelles populations d'organismes non-cibles soient non intentionnellement affectées,*
- *d'examiner la possibilité de remplacement non intentionnel de la population éliminée, considérant la niche écologique vacante, par exemple par une population de moustiques avec une compétence vectorielle plus préoccupante que celle de la population éliminée*,
- *d'examiner les conséquences d'une réduction ou d'une élimination de population de vecteurs en termes sanitaires.*

i. La réduction ou l'élimination d'une population d'une espèce d'insecte peut représenter un risque pour l'environnement lié au rôle que joue cette espèce dans l'écosystème, notamment *via* sa position dans la chaîne trophique.

La fonction écologique particulière des espèces de moustiques vecteurs considérées dans ce rapport ne semble documentée par aucune publication scientifique. Des éléments généraux d'écologie fonctionnelle des moustiques, et les particularités attendues pour les espèces

[71] On rappelle que cette interfertilité est toutefois très limitée. Plus généralement, les accouplements inter-(sub)spécifiques étant rares, l'effet sur les autres espèces du complexe sera faible, sauf dans le cas du forçage génétique où de rares hybrides, à condition que les séquences ciblées soient suffisamment proches pour être reconnues par l'ARN guide et permettre la recombinaison homologue, pourraient suffire à initier l'invasion dans une autre (sous-)espèce.

vectrices concernées de par leurs milieux de vie et/ou leurs propriétés invasives (voir 2.3.2.4) permettent d'indiquer que la réduction de la densité ou l'élimination d'une population d'une espèce de moustiques urbains et invasifs, comme *Ae. aegypti* et *Ae. albopictus*, aura un impact sur les écosystèmes plus limité que celle d'une espèce autochtone en milieux naturels, comme *An. gambiae.* Une éventuelle fonction acquise des moustiques invasifs pourra toutefois être envisagée dans le cadre d'une évaluation appropriée.

L'impact de la raréfaction des populations de moustiques sur les espèces qui en dépendent devra être envisagé. Il est rappelé que, du fait de son cycle de vie, le moustique occupe un habitat aquatique au stade larvaire, et terrestre au stade adulte. L'impact d'une réduction ou de l'élimination d'une population de moustiques aura essentiellement un effet *via* sa position au sein du réseau trophique :

- au stade adulte : parmi les prédateurs des moustiques, certains sont généralistes, ne dépendant pas exclusivement des moustiques pour leur subsistance – la réduction ou l'élimination de populations de moustiques aurait *a priori* un effet relativement limité sur ces prédateurs –, mais des associations spécifiques pourraient se développer. Seul un exemple d'une association préférentielle est documenté, celui d'une araignée, localisée autour du Lac Victoria, en Afrique de l'Est, qui a développé une préférence alimentaire marquée pour les femelles anophèles gorgées de sang (Nelson and Jackson, 2006). Une éventuelle disparition des anophèles dans la région pourrait alors affecter non seulement le régime alimentaire de ces araignées, mais également leur reproduction, la reconnaissance entre mâles et femelles étant influencée par des signaux chimiques associés à l'alimentation sanguine (Cross et al., 2009). Quels impacts auraient les différentes techniques de lutte antivectorielle sur cette araignée ? Les techniques existantes ne peuvent éliminer complètement une population de moustiques ; elles ne peuvent que réduire, de manière plus ou moins spécifique et plus ou moins durable, la densité de l'ensemble des populations de moustiques environnants. Quant aux techniques de lutte basées sur les lâchers de moustiques, elles ne ciblent qu'une seule espèce (ainsi que les éventuelles espèces interfertiles) ; elles ne pourraient donc éliminer l'ensemble des anophèles et priver ces araignées de leur régime de choix. Le cortège d'espèces présentes étant propre à une région particulière, il devra être examiné au cas par cas avant d'initier la réduction ou l'élimination d'une population donnée de moustiques vecteurs. Des centaines d'espèces de moustiques sympatriques sont présentes sous les tropiques[72]. Dans le cas de l'exemple de cette araignée, l'impact des différentes techniques considérées serait probablement limité. Plus généralement, une évaluation au cas par cas et région par région sera nécessaire pour évaluer l'impact environnemental d'une stratégie de réduction ou d'élimination d'une population donnée de moustiques ;
- au stade larvaire : les larves de moustiques sont à la fois des proies et des prédateurs. En tant que prédateurs, elles jouent un rôle important de régulation des communautés de protozoaires dans les milieux larvaires. La réduction de leur densité ou leur élimination pourrait donc impacter la composition spécifique de ces derniers, avec un effet cascade important sur la biomasse et la composition spécifique des bactéries dans ces milieux (Cochran-Stafira and von Ende, 1998; Pace et al., 1999). En tant que proies, elles entrent dans le régime alimentaire de nombreux organismes (insectes, poissons…). La réduction ou l'élimination locale d'une population d'une espèce de moustique pourra donc affecter d'autres organismes de l'environnement *via* un effet sur la chaîne trophique.

[72] Le site VectorMap http://vectormap.si.edu/MosquitoCountryList.htm répertorie des listes d'espèces de moustiques par pays.

Les techniques conduisant à une réduction de population (comme les biocides, mais également, de manière spécifique, les TIS, TII, RIDL) auront un impact plus ou moins transitoire, sur les communautés microbiennes et les organismes prédateurs de moustiques, selon le pourcentage de réduction atteint. Dans tous les cas, ceci s'applique aux milieux naturels, lieux de vie des moustiques anophèles, mais pas aux gîtes non permanents en milieux majoritairement urbains, où vivent *Ae. aegypti* et *albopictus*. Les communautés microbiennes et organismes prédateurs de moustiques de ces milieux naturels seraient d'autant plus affectés par une élimination que les espèces d'anophèles ciblées y sont endémiques ; on note toutefois que les techniques spécifiques d'une espèce épargneront les autres espèces de moustiques du milieu. *A contrario*, une élimination d'*Aedes* affectera d'autant moins les communautés microbiennes environnantes et leurs prédateurs que les espèces d'*Aedes* ciblées sont invasives en milieu urbain.

ii. La réduction ou l'élimination de la population d'un insecte vecteur entraîne la possibilité qu'une nouvelle espèce, elle-même vectrice de maladie, remplace la population réduite ou éliminée.

On note que les techniques classiques de lutte par réduction de population (utilisation de biocides par exemple) n'ont pas conduit à une telle observation. Ces techniques étant peu spécifiques, un remplacement entre espèces de moustiques était peu probable. Les techniques de réduction de population basées sur des lâchers de moustiques sont plus spécifiques. L'essai de la technique RIDL à Panama a été l'occasion de tester l'hypothèse du remplacement d'*Ae. aegypti* par *Ae. albopictus*. En l'occurrence, dans cet essai particulier, il n'a pas été détecté de hausse de la population d'*Ae. albopictus* suite à une réduction d'*Ae. aegypti*, mais des études devront être menées sur un plus long terme (Gorman et al., 2016). On note par ailleurs que des travaux de thèse documentent, à La Réunion, les capacités d'invasion d'*Ae. albopictus* en présence de l'espèce résidente *Ae. aegypti*, sans que cela ne soit clairement lié à une stratégie de lutte contre *Ae. aegypti* (Bagny, 2009). Il est toutefois suggéré que le déclin d'*Ae. aegypti* à La Réunion ait pu être déclenché par des interactions avec *Ae. albopictus*, et que des campagnes de lutte antivectorielle des années 1950 (non spécifiques donc) aient pu accélérer ce processus (Bagny et al., 2009). Dans ce cas, il est légitime de supposer que la mise en œuvre d'une technique de lutte antivectorielle spécifique d'*Ae. aegypti* favoriserait son remplacement par *Ae. albopictus*, et dans un contexte susceptible à la compétition entre larves de moustiques, favoriserait une accélération de l'invasion d'*Ae. albopictus*. Le rapport de forces entre *Ae. aegypti* et *Ae. albopictus* est en faveur d'*Ae. albopictus* dans les études citées ci-dessus effectuées à La Réunion, mais on ne peut anticiper qu'il en sera toujours ainsi pour d'autres populations de ces espèces dans d'autres contextes. Ainsi, dans les situations où *Ae. albopictus* et *Ae. aegypti* cohabitent, il semblerait plus prudent de recommander dans tous les cas la mise en œuvre simultanée de techniques de lutte ciblant chacune des deux espèces.

iii. Enfin, en termes sanitaires, suite à l'élimination d'une population de moustiques vecteurs d'une région donnée, les générations d'une population humaine qui n'auront pas été exposées à un pathogène seront complètement naïves, en termes immunitaires, si ce pathogène était à nouveau en circulation après immigration de nouveaux moustiques capables de le transmettre. Autrement dit, la perte d'immunité populationnelle liée à la diminution initiale de l'incidence de la maladie pourrait alors favoriser le retour de foyers épidémiques si la maladie réapparaissait. Un suivi rigoureux et des stratégies de gestion des risques doivent être mises en œuvre pour détecter et gérer de telles conséquences éventuelles de la lutte antivectorielle. La question de la perte d'immunité populationnelle devra être pesée à l'aune du bénéfice obtenu par la disparition de la maladie dans un premier temps.

Ainsi, les techniques visant un objectif de réduction de population ne sont pas nouvelles. La nouveauté associée aux lâchers de moustiques stériles ou stérilisants, dont les moustiques GM, réside dans leur spécificité et dans leur capacité à réduire la population de moustiques jusqu'à une possible élimination de population, qui a des effets plus durables qu'une simple réduction. On retiendra que la spécificité de ces techniques entraîne moins de risques sur les organismes non cibles et la santé. Toutefois, leur potentiel d'élimination oblige à explorer davantage le rôle écosystémique de l'espèce ciblée. L'impact de la réduction ou de l'élimination d'une population d'une espèce de moustiques *via* son positionnement dans la chaîne trophique, à l'état larvaire et à l'état adulte, devra être évalué au cas par cas et région par région. On peut anticiper que la réduction ou l'élimination d'une population d'une espèce de moustiques urbains et invasifs, comme *Ae. aegypti* et *Ae. albopictus*, aura un impact sur les écosystèmes plus limité que celles d'une espèce autochtone en milieux naturels, comme *An. gambiae*, même si une éventuelle fonction acquise des moustiques invasifs pourra être envisagée. Enfin, la spécificité et la durabilité de l'élimination obligent à considérer le potentiel remplacement de la population ciblée par une population d'une autre espèce vectrice, ainsi que la question de la perte d'immunité populationnelle. Dans les régions où *Ae. albopictus* et *Ae. aegypti* cohabitent, la mise en œuvre simultanée de techniques de lutte ciblant chacune des deux espèces permettrait de réduire le risque de remplacement de l'une par l'autre.

b. <u>Les techniques de modification de population nécessitent :</u>

- *d'évaluer les caractéristiques de la population modifiée en comparaison à la population native, notamment en termes de rôle écologique, de fitness, de compétence vectorielle et de nuisance. La réduction de la transmission du pathogène par la population de moustiques étant l'objectif précis de la technique de lutte, cette caractéristique devra être suivie dans l'environnement au fil des générations ;*
- *du fait de la persistance et du caractère envahissant des modifications appliquées à la population native, de considérer le devenir et l'effet à long terme des facteurs à l'origine de ces modifications (ex : les transgènes impliqués dans un forçage génétique visant une modification de population et les bactéries Wolbachia dans une technique propageant l'IP), ainsi que leur transfert vertical potentiel à d'éventuelles (sous-) espèces interfertiles ou leur transfert horizontal à d'autres organismes ou microorganismes.*

Suite aux expériences de modification de populations de moustiques par la technique IP diffusant une bactérie *Wolbachia* qui devait interférer avec la transmission de la dengue, aucune modification dans le rôle écologique de la population de moustiques ou leur nuisance n'a été rapportée à ce jour[73] (Communication S. O'Neill, Zika Summit, avril 2016, Paris). A Cairns en Australie, cinq ans après les lâchers de moustiques porteurs de *Wolbachia*, on observe que les bactéries *Wolbachia* se sont bien intégrées et stabilisées dans la population locale, qu'elles sont associées à une réduction de vigueur d'environ 15 %, et que le phénotype de diminution de la compétence vectorielle de la population pour le virus de la dengue s'est maintenu jusqu'à présent (Communication S. O'Neill, Zika Summit, avril 2016, Paris). Cependant, nous manquons actuellement de recul sur les effets potentiels à moyen ou long terme de cette stratégie.

La possibilité de modification de population est une nouveauté apportée par les techniques impliquant des lâchers de moustiques, transgéniques (par forçage génétique) et non transgéniques (*via Wolbachia*). Une modification de population entraîne *a priori* moins d'impact écosystémique qu'une réduction du fait de la stabilité de la densité des populations de moustiques ciblés. Cette affirmation est à nuancer selon l'impact des nouvelles caractéristiques de la population. L'effet de la modification devrait *a priori* être limité à une

[73] Il est à noter que le but de la modification de population est de réduire la transmission du pathogène, pas la nuisance des moustiques.

interférence avec la transmission du pathogène par le moustique, mais il doit être évalué plus globalement et sur la durée.

3. *Quels seraient les risques pour l'environnement et la santé si une technique de lutte cessait de fonctionner par perte d'efficacité ?*

On a vu dans la section 4.3.2. que l'efficacité des différentes techniques pouvait être plus ou moins limitée ou compromise en cas de développement de résistances chez les cibles ou de dérive technique par perte de fonctionnalité. Au-delà de la nécessité d'adapter les techniques de lutte antivectorielle en cas de détection d'une perte d'efficacité, on peut se poser la question des conséquences pour l'environnement et la santé des différents types de dérive de ces techniques, et mettre en évidence une éventuelle spécifité des techniques utilisant des moustiques GM :

a. **Risques associés aux possibilités de développement de résistance dans la population cible**

On a vu qu'un développement de résistance au mode d'action de la technique RIDL, comme pour la TIS et TII, était peu probable, à la différence de certains biocides, comme les pyréthrinoïdes ou les densovirus, des techniques de forçage génétique, et de l'IP propagée par *Wolbachia*, pour lesquels un développement de résistance doit être considéré du fait de leur mode d'action *via* des cibles génétiques.

Par ailleurs, des possibilités de développement de résistance comportementale peuvent être envisagées pour les différentes techniques basées sur des lâchers de moustiques. Quels sont les risques associés à ces développements de résistance ?

Résistances au mode d'action des techniques :

- le développement de résistance des moustiques à des **insecticides**, comme cela a été observé pour les **pyréthrinoïdes**, est un problème crucial pour la lutte antivectorielle, l'insecticide perdant progressivement son efficacité contre des populations entières de moustiques vecteurs. La résistance des moustiques à un insecticide n'a toutefois pas de conséquences directes en termes d'impact sur l'environnement. La détection de cette résistance conduira à ne plus utiliser cet insecticide en cas d'échec des mesures de gestion recommandées. Il pourrait toutefois y avoir des conséquences environnementales indirectes si cette résistance entraînait une augmentation des doses de l'insecticide concerné par la résistance dans un premier temps (dans la limite voire au-delà des doses maximales autorisées[74]), ou si elle nécessitait de recourir à d'autres molécules, ou d'autres moyens de lutte, qui pourraient éventuellement être plus préjudiciables à l'environnement. Il pourrait également y avoir un risque sanitaire accru dans l'éventualité où les moustiques sélectionnés comme résistants à un insecticide auraient une compétence vectorielle accrue pour un pathogène donné (Alout et al., 2013) ;
- de même, un développement de résistance des moustiques aux **densovirus** serait sans conséquence directe sur l'environnement. La technique de lutte serait stoppée et une autre serait mise en place (par exemple l'utilisation d'une autre souche de densovirus ou l'utilisation d'un cocktail de souches) ;
- concernant les techniques de **forçage génétique**, on a vu qu'elles pourraient perdre leur efficacité de propagation par développement de résistance en cas de polymorphisme génétique ou de mutations induites par religation imprécise dans la séquence reconnue par l'ARN guide (voir section 4.3.2). Deux cas doivent être distingués en termes d'évaluation des risques. Dans le cadre des techniques de forçage génétique visant

[74] Les doses homologuées sont déterminées en tenant compte d'un facteur de sécurité variable selon les produits. L'utilisation d'une dose supérieure à la dose homologuée est tolérée jusqu'à un dépassement de 20 %.

l'élimination ou l'éradication, un rebond éventuel de population à partir d'individus polymorphes ou mutés sans perte de fonctionnalité du gène de fertilité (voir section 4.3.2.) ne serait *a priori* pas dommageable pour l'environnement. Dans le cadre des techniques de forçage génétique visant une modification de population, les individus polymorphes ou mutés coexisteraient avec la population modifiée. Le forçage génétique ne serait pas aussi efficace qu'escompté mais cela ne constituerait pas pour autant un risque pour l'environnement. Toutefois, afin d'anticiper d'éventuelles conséquences indésirables, il serait intéressant d'examiner les conséquences de l'apparition de résistances aux forçages génétiques naturels (éléments génétiques dotés d'héritabilité super-mendélienne, voir 3.1.2.3.), même si les mécanismes moléculaires sur lesquels reposent ces derniers diffèrent. Un possible impact sur la dynamique des dérives génétiques de la population de moustiques ciblés, pouvant éventuellement conduire à des événements de spéciation, de réorganisation du génome, de changement de mode de reproduction, pourrait ainsi être considéré, comme cela est observé dans les systèmes naturels (Lindholm et al., 2016).

Enfin, concernant la possibilité de développement de résistance au phénotype recherché suite à la modification de la population par forçage génétique, par une sélection d'isolats de pathogène insensibles au mécanisme de résistance à la transmission du pathogène (événement de probabilité très faible si le mécanisme est très spécifique, comme c'est le cas des anticorps dirigés contre *Plasmodium*, voir section 4.3.2.), le forçage ne remplirait plus ses objectifs de lutte antivectorielle, mais cette évolution ne constituerait *a priori* aucun risque particulier pour l'environnement. Un risque sanitaire associé pourrait être considéré dans l'éventualité où des pathogènes sélectionnés comme insensibles au mécanisme de résistance propagé par forçage se trouvaient être plus virulents pour l'Homme. Une parade devrait alors être mise en œuvre pour éliminer les moustiques portant cette cassette de forçage génétique (voir plus bas, point 7) ;

- de même, en cas de sélection d'éventuelles souches de pathogène insensibles à une **IP** propagée par *Wolbachia*, la technique IP ne remplirait plus ses objectifs. En l'absence d'action correctrice, même si les lâchers étaient stoppés, la bactérie *Wolbachia* continuerait à se propager dans la population de moustiques (du moins si elle n'inflige pas un désavantage sélectif trop important à ses hôtes). Il n'y aurait *a priori* aucun risque particulier pour l'environnement mais il pourrait y avoir un risque sanitaire accru dans l'éventualité où les souches de pathogènes sélectionnées comme insensibles à l'IP seraient plus virulentes vis-à-vis de l'Homme ou des animaux. Il faudrait donc que les pathogènes soient régulièrement étudiés pour leur virulence. D'autres méthodes de lutte antivectorielle devraient alors être mises au point pour supprimer cette nouvelle population de moustiques ou la bactérie *Wolbachia* qu'elle héberge.

Ainsi, le développement de résistances au mode d'action des techniques est à surveiller en termes de risques dans l'éventualité d'une sélection de moustiques présentant une compétence vectorielle accrue parmi les moustiques sélectionnés comme résistants aux biocides, et dans l'éventualité d'une sélection de pathogènes plus virulents pour l'Homme et les animaux parmi les éventuels pathogènes sélectionnés comme insensibles à l'IP propagée par *Wolbachia* ou insensibles au mécanisme de résistance propagé par forçage génétique.

Résistances comportementales :

- le développement d'éventuelles résistances comportementales des moustiques de terrain aux moustiques irradiés, aux moustiques porteurs de *Wolbachia* ou aux moustiques génétiquement modifiés OX513A, dans le cadre des techniques **TIS, TII ou RIDL**, n'auraient également aucune conséquence pour l'environnement : les lâchers de

moustiques seraient arrêtés suite à la détection de ces résistances, les moustiques déjà relâchés n'auraient aucune descendance viable (de par leur caractéristique intrinsèque de stérilité ou capacité stérilisante d'une part, et la résistance comportementale des moustiques de terrain d'autre part) et leurs caractéristiques génétiques (fonds génétiques particuliers, mutations, bactérie *Wolbachia*, ou cassette transgénique) ne perdureraient pas dans l'environnement après leur décomposition suivant leur mort ;

- dans le cadre de la technique de **propagation d'IP**, une éventuelle résistance comportementale des moustiques de terrain aux moustiques porteurs de *Wolbachia* interromprait simplement la modification de la population et donc la propagation de *Wolbachia* sur le terrain, sans conséquences particulières pour l'environnement par rapport à une technique IP fonctionnelle, les individus porteurs de *Wolbachia* seraient simplement réduits à ne se reproduire qu'entre eux (*N.B.* si la résistance comportementale est fonction du fond génétique des moustiques relâchés, elle pourrait ne plus s'exprimer vis-à-vis des descendants hybrides porteurs de *Wolbachia* et la technique IP pourrait alors se poursuivre).

Ainsi, les possibilités de développement de résistances comportementales des moustiques de terrain aux moustiques relâchés n'entraîneraient *a priori* aucun risque particulier pour l'environnement.

b. **Risques associés aux possibilités de dérive fonctionnelle**

Des possibilités de dérive fonctionnelle ont été identifiées pour RIDL et les techniques de forçage génétique, ainsi que pour la TII. Y aurait-il des risques pour l'environnement ou la santé en cas de dérive fonctionnelle de ces techniques en cours de stratégie ?

- en cas de perte de fonctionnalité de la technique **RIDL** par dérive génétique de *tTAV*, la technique serait stoppée dès la détection du problème, des tests internes permettant de vérifier régulièrement la fonctionnalité de *tTAV* en plus de la surveillance opérée sur le terrain. Sur le terrain, la perte de fonction de *tTAV* conduirait à la survie de la descendance des moustiques mâles RIDL relâchés. Cette descendance contiendrait 50 % du génotype des moustiques RIDL et serait hémizygote pour la cassette transgénique contenant le gène *tTAV* non fonctionnel et un marqueur de suivi. Les gènes de la souche d'élevage et de la cassette transgénique ségrègeraient dans les générations suivantes. En termes de risques pour l'environnement, comparée aux moustiques RIDL relâchés, cette descendance aurait la particularité que des femelles porteraient la cassette transgénique non fonctionnelle, et que les individus transgéniques seraient fertiles. Si aucun risque ne semble *a priori* associé à une éventuelle dissémination des gènes du patrimoine génétique de la souche d'élevage de RIDL et de cette cassette dans l'environnement, une évaluation appropriée des risques associés (compétence vectorielle, avantage sélectif, toxicité…) devra être faite sur la base des informations du dossier du pétitionnaire. La sensibilité des moustiques RIDL aux insecticides utilisés localement et à d'autres méthodes de lutte alternatives devra de toute façon être vérifiée pour s'assurer de la possibilité d'éliminer ces moustiques en cas de perte de fonctionnalité du caractère de létalité de la lignée (une reprise de la stratégie RIDL resterait possible et efficace même contre les moustiques transgéniques disséminés, une fois la fonctionnalité de la souche transgénique rétablie) ;
- une éventuelle inactivation du **forçage génétique** par méthylation ou mutation de la cassette ou par des facteurs épigénétiques n'aurait aucune incidence particulière sur l'environnement ;
- on a vu enfin que la technique **TII** perdrait son efficacité en cas de lâcher accidentel de femelles, celles-ci pouvant alors se reproduire avec les mâles du terrain et entraîner une modification plutôt qu'une réduction de population. Il n'y aurait *a priori* pas de risques

particuliers pour l'environnement. En termes sanitaires, les femelles relâchées seraient piqueuses, présentant un risque d'introduction d'agents pathogènes nouveaux dans l'environnement en cas de contamination du sang utilisé dans l'élevage, ce qui souligne l'importance du contrôle qualité du sang qui nourrit les mères des moustiques lâchés (voir section 4.3.3.). Elles pourraient toutefois être moins vectrices que les moustiques femelles du terrain en cas de phénomène d'IP associé à la bactérie *Wolbachia* qu'elles hébergent. Par précaution, la compétence vectorielle des moustiques porteurs de *Wolbachia* vis-à-vis des pathogènes locaux devrait de toute façon être étudiée avant leur lâcher, même dans la perspective d'une TII. La question des lâchers de femelles est approfondie dans un paragraphe dédié, plus bas, dans le cadre des risques spécifiques aux lâchers de moustiques.

Ainsi, les possibilités de dérive fonctionnelle des techniques de lutte impliquant des lâchers de moustiques n'entraîneraient *a priori* aucune incidence particulière pour l'environnement par rapport à des techniques fonctionnelles de forçage génétique et de propagation d'une IP par *Wolbachia*. Concernant la technique RIDL, une dérive fonctionnelle de tTAV perdant son caractère de létalité dans la descendance transgénique entraînerait une dissémination, même limitée, de moustiques transgéniques dans l'environnement nécessitant une caractérisation de la souche relâchée, notamment en termes de compétence vectorielle pour écarter la possibilité d'une transmission accrue de pathogènes. Concernant la technique de TII, la qualité du sang utilisée dans l'élevage et la compétence vectorielle des femelles doit être caractérisée pour éviter une transmission accrue de pathogènes en cas de lâchers accidentels[75].

4. Risques spécifiques associés aux lâchers de moustiques

Avant la mise en œuvre de toute technique exploitant des lâchers de moustiques, qu'ils soient GM ou non, il est pertinent d'évaluer le rôle et l'impact écologique que pourraient avoir les moustiques relâchés selon le volume et la récurrence des lâchers, la capacité de persistance et de propagation des moustiques relâchés, leur fertilité et leur isolement reproductif, la valeur sélective de leur descendance éventuelle et sa capacité d'adaptation à un nouvel environnement, et d'autres caractéristiques incluant notamment leur compétence vectorielle en comparaison avec les populations de terrain. Le cas échéant, la stabilité d'un transgène ou d'une relation symbiotique avec *Wolbachia* devra être suivie au cours du temps.

a. Question de la persistance et du caractère envahissant

La question est pertinente pour tous les lâchers de moustiques, mais elle se pose différemment selon que l'objectif de la technique de lutte est une réduction, une élimination ou une modification de population :

- **concernant les techniques de réduction de population** TIS, TII, RIDL et le forçage génétique visant l'élimination d'une population ou l'éradication d'une espèce, il n'y a, à terme, pas de diffusion, dispersion ou propagation des moustiques relâchés et de leurs transgènes ou bactéries *Wolbachia* associées, le cas échéant :
  - pour la **TIS**, aucun matériel génétique n'est transmis ou ne se propage à la mort des mâles stériles. En cas de fertilité résiduelle (voir section 4.3.2., efficacité pratique *versus* efficacité théorique de principe), les éventuels mâles restés fertiles malgré l'irradiation pourront toutefois propager des mutations aléatoires. Dans une stratégie visant une élimination de population, ces mutations seront éliminées avec la population. Dans une stratégie visant une

[75] Ceci doit être considéré pour tout lâcher de moustiques femelles dans l'environnement. Le cas des lâchers accidentels de femelles est spécifiquement considéré pour la TII dans cette section car ils auraient la particularité d'être suivis d'un établissement de *Wolbachia* dans la population, ce qui entraverait l'efficacité de la technique.

réduction de population, plusieurs cas de figure se présentent selon les effets des mutations :

- si elles sont délétères, elles seront contre-sélectionnées à terme ;
- si elles n'ont pas d'effet sur la valeur sélective des moustiques, leur fréquence n'augmentera pas dans la population par rapport à leur fréquence initiale dans la population résiduelle de moustiques ;
- si elles confèrent un avantage sélectif aux moustiques, leur fréquence augmentera dans la population, et leur effet sera contre-productif pour la lutte antivectorielle, ce qui explique que l'AIEA recommande une stérilisation complète des mâles relâchés. En termes de risques spécifiques pour la santé, l'éventualité d'une combinaison stable de mutations qui confèrent un avantage sélectif aux moustiques avec des mutations qui confèrent une compétence vectorielle accrue pourrait être considérée, même si elle semble peu probable ;

- pour la **TII**, *Wolbachia* ne peut diffuser à partir des mâles relâchés, la transmission de *Wolbachia* étant uniquement maternelle[76]. Une diffusion de *Wolbachia* serait à considérer en cas de lâcher accidentel de femelles (voir point b ci-après). En cas de fertilité résiduelle, c'est-à-dire en cas d'IC incomplète (voir section 4.3.2., efficacité pratique *versus* efficacité théorique de principe, Ross et al., 2017), les mâles relâchés pourraient avoir une descendance avec les femelles de terrain. *Wolbachia* ne serait toujours pas transmise, mais le patrimoine génétique des mâles relâchés pourraient se répandre dans la population, ce qui serait sans effet si la souche utilisée pour la TII est la souche locale. Si ce n'est pas le cas, il faudrait s'assurer que la souche utilisée n'a pas une compétence vectorielle accrue par rapport à la souche de terrain ;
- pour **RIDL**, le transgène ne diffuse pas du fait de sa létalité dans la descendance des mâles relâchés. Les 2 % de taux de survie résiduelle causés par la pénétrance incomplète du trait n'entraînent pas de persistance des transgènes à terme, même si le patrimoine génétique hors transgènes de la souche de laboratoire dissémine faiblement.

  En effet, s'ils se reproduisent, ces 2 % de survivants, hémizygotes pour le transgène, transmettront leur patrimoine génétique à une petite fraction de la population naturelle. A moins qu'une mutation aléatoire ne l'ait rendu non fonctionnel, le transgène lui-même finira rapidement par disparaître, car sa létalité fonctionne dans les générations ultérieures. Ainsi, parmi les rares transgènes subsistant au-delà de la première génération de mâles relâchés sur le terrain, 98 % disparaîtront à leur tour à la génération suivante avec la mort des moustiques qui les portent, et ainsi de suite. En revanche, la progéniture n'héritant pas du transgène sera viable, et portera une moitié du matériel génétique de la souche de laboratoire, dont les variations génétiques (polymorphismes) sont potentiellement absentes du terrain considéré. Ceci ne devrait pas avoir d'autre conséquence que d'introduire une certaine variabilité génétique dans les populations naturelles (influx d'haplotypes de souches de laboratoire dans des zones où ces mêmes haplotypes étaient absents). Une recommandation qui en découle est que les souches de laboratoire utilisées pour les lâchers ne doivent pas être plus compétentes pour les pathogènes humains que les souches du terrain de l'intervention. Il est donc souhaitable d'évaluer régulièrement la compétence vectorielle de la souche transgénique, qui ne doit pas être supérieure à celle des moustiques de terrain, afin d'éviter le risque d'introduire des caractères qui pourraient augmenter le taux de transmission d'agents pathogènes par l'espèce.

[76] Vérifié expérimentalement par O'Connor, L., Plichart, C., Sang, A.C., Brelsfoard, C.L., Bossin, H.C., and Dobson, S.L. (2012). Open release of male mosquitoes infected with a *Wolbachia* biopesticide: Field performance and infection containment. Plos Neglected Tropical Diseases *6*.

En revanche, ceci serait à nuancer en cas de dérive génétique de la tTAV, pour laquelle le transgène non fonctionnel persiste (voir analyse des conséquences d'une perte d'efficacité ci-dessus) ;

- enfin pour le **forçage génétique** visant une élimination ou une éradication, la cassette de forçage diffuse dans un premier temps avant de disparaître à terme du fait de la stérilité des femelles homozygotes pour les transgènes. En cas d'inactivation du forçage génétique, des individus transgéniques hémizygotes pourraient subsister temporairement ; les transgènes pourraient alors être considérés comme des allèles délétères récessifs chez la femelle, qui seront progressivement éliminés des populations naturelles ;
- il est souligné que **la question de la persistance et du caractère envahissant des moustiques relâchés, de leurs transgènes ou des bactéries *Wolbachia* associées, ne se pose pas pour ces techniques de TIS, TII, RIDL et FG mentionnées ci-dessus quand elles sont utilisées dans un objectif d'élimination de population et que cet objectif est atteint**[77] ;

- **concernant les techniques de modification de population** par propagation de l'IP associée à *Wolbachia* ou par forçage génétique, la persistance et le caractère envahissant de la modification rendant la population résistante à la transmission du pathogène (*Wolbachia* pour la technique IP et la cassette génétique dans le cas du forçage génétique) sont des caractéristiques constitutives de ces techniques de lutte. Par ailleurs, le fond génétique des moustiques relâchés n'est pas transmis de façon super-mendelienne, contrairement aux bactéries *Wolbachia* ou à la cassette de forçage génétique elles-mêmes. Les bactéries *Wolbachia* d'une part et la cassette de forçage génétique d'autre part pourraient de toute façon être introgressées dans une souche de moustique locale avant d'être disséminées. Les lâchers correspondants sont par ailleurs de taille plus réduite que les lâchers massifs requis pour les stratégies de réduction ou élimination. On rappelle toutefois que la technique propageant l'IP associée à *Wolbachia* peut nécessiter un lâcher conséquent pour atteindre une densité relative initiale nécessaire pour contrecarrer le coût génétique associé à *Wolbachia*.

  Une évaluation des risques devra donc considérer le devenir et l'effet à long terme des transgènes du forçage génétique visant une modification de population d'une part, et des bactéries *Wolbachia* dans la technique de propagation de l'IP d'autre part, ainsi que la possibilité de leur transfert vertical potentiel à d'éventuelles (sous-)espèces interfertiles ou la possibilité d'un transfert horizontal à d'autres organismes ou microorganismes (la probabilité et les conséquences de tels transferts sont développés plus bas, dans les sections spécifiques aux techniques utilisant *Wolbachia* et au forçage génétique).

Ainsi, la question des risques associés à la persistance et au caractère envahissant de moustiques relâchés et de la modification qu'ils portent se pose différemment selon les techniques et les stratégies dans lesquelles elles sont appliquées. (1) Concernant les lâchers de mâles stériles et stérilisants, GM ou non, la question ne devrait théoriquement pas se poser. Toutefois, dans l'application pratique des techniques, il existe de possibles écarts à la théorie, qui se traduisent par une fertilité résiduelle de certains individus relâchés (voir section 4.3.2.). Cela n'aurait pas d'impact en cas d'élimination de population mais devrait être considéré en cas de réduction de population. (2) Concernant les lâchers de moustiques à des fins de modification de population (réduction de compétence vectorielle), ces caractéristiques sont consubstantielles aux techniques correspondantes, et nécessiteront une analyse de risques appropriée au préalable, et un dispositif de surveillance sur le long terme.

[77] Si l'objectif de l'élimination n'est pas atteint, le raisonnement développé pour une réduction de population s'applique.

b. Question des lâchers de femelles

Il faut également considérer les risques spécifiques associés à un lâcher de femelles, qu'il soit intentionnel, dans le cadre de la technique IP, ou accidentel, dans le cadre des techniques TIS, TII, RIDL et de forçage génétique (même si les techniques de forçage génétique ne requièrent que des lâchers de taille réduite et pourraient donc permettre un tri parfaitement sélectif des mâles).

Un lâcher accidentel de femelles peut résulter d'un sexage imparfait (voir section 4.3.3.). Les moustiques femelles sont piqueuses, et plus ou moins compétentes pour la transmission vectorielle de pathogènes locaux, plus ou moins fertiles, et éventuellement porteuses de nouveaux pathogènes acquis par le sang d'élevage par transmission verticale (risque évitable, voir section 4.3.3.) :

- la simple caractéristique de piqueuse renvoie à la question de la nuisance engendrée par les moustiques ;
- la compétence vectorielle des femelles éventuellement relâchées par rapport aux femelles sauvages doit être évaluée en prenant en compte les techniques mises en œuvre ;
- la fertilité des femelles dépend des techniques mises en œuvre ;
- la nécessité de stériliser et contrôler la qualité du sang utilisé dans les élevages pour prévenir une introduction de pathogènes dans l'environnement est développée dans la section 4.3.3..

Les caractéristiques des femelles à considérer en cas de lâcher, accidentel ou non, selon les techniques mises en œuvre, précédemment exposées dans les sections correspondantes, sont synthétisées dans le Tableau 4.

Tableau 4. Caractéristiques des femelles à considérer en cas de lâcher, accidentel ou intentionnel, dans le cadre de la mise en œuvre de techniques de lutte antivectorielle basées sur des lâchers de moustiques.

Technique de LAV	**Caractéristiques des femelles relâchées**			
	Nature du lâcher	**Nuisance**	**Compétence vectorielle**	**Fertilité**
TIS	Accidentel	Piqueuses	Vectrices	Stériles
RIDL	Accidentel	Piqueuses	Vectrices	Descendance non viable
TII (IC uni-directionnelle)	Accidentel	Piqueuses	*a priori* moins vectrices que TIS car IP probable[1]	Fertiles
TII (IC bi-directionnelle)	Accidentel	Piqueuses	*a priori* moins vectrices que TIS car IP probable[1]	Stériles avec les populations sauvages car IC (mais fertiles avec les mâles relâchés)
TII-TIS	Accidentel	Piqueuses	*a priori* moins vectrices que TIS car IP probable[1]	Stériles car irradiées
Propagation d'une IP	Intentionnel	Piqueuses	Pas vectrices pour les pathogènes ciblés car IP[2]	Fertiles (propagation intentionnelle de l'IP)
FG visant une élimination/éradication	Accidentel	Piqueuses	Vectrices	Homozygotes stériles, Hémizygotes fertiles (partiellement stériles dans l'exemple publié, la technique devant être optimisée)[3]
FG visant une modification de population (ex. anti-*Plasmodium*)	Accidentel	Piqueuses	Pas vectrices de *Plasmodium*	Fertiles

[1] La propriété d'IP n'est pas systématique, elle serait à vérifier dans ce cas ; [2] La propriété d'IP devrait être avérée dans le cas de la technique basée sur la propagation d'IP ; [3] La stérilité partielle des femelles hémizygotes est un problème en termes d'efficacité du forçage génétique, pas en termes de risques.

Ainsi, les femelles relâchées présentent des caractéristiques différentes de compétence vectorielle et de fertilité selon les techniques considérées, sans spécificité associée à un caractère GM. Les risques potentiels associés aux lâchers de femelles doivent être scrupuleusement évalués dans le cadre de la technique de propagation de l'IP *via Wolbachia* du fait de l'intentionnalité du lâcher, de la fertilité des femelles, et de l'incertitude associée à l'évolution du phénotype d'IP. Par ailleurs, les femelles relâchées présentent toutes la propriété d'être piqueuses, qui renvoie à la nécessité de garantir, en amont, l'absence de pathogènes dans le sang fourni à l'élevage.

5. Risques supplémentaires spécifiques aux moustiques transgéniques

Les moustiques relâchés exprimant de nouveaux produits devront être évalués au cas par cas en termes d'impact direct sur leurs prédateurs et de conséquences indirectes sur la chaîne trophique.

Concernant des effets sur la santé humaine et animale, la présence d'éventuels nouveaux produits dans la salive des moustiques transgéniques sera à évaluer au cas par cas en termes de toxicité et d'allergénicité pour les moustiques susceptibles de piquer.

En l'absence de données spécifiques nécessaires pour conduire cette analyse pour les exemples de moustiques GM présentés dans cet avis, on ne peut que souligner qu'elle devra être effectuée selon les critères d'évaluation des moustiques transgéniques développés dans le chapitre 5.

6. Risques supplémentaires spécifiques à la technique RIDL

Point spécifique associé à l'utilisation de tétracycline dans la technique RIDL :

La technique RIDL est basée sur un système dépendant de l'apport de tétracycline en élevage pour réprimer la létalité conférée par la construction génétique. Les bactéries du microbiote des moustiques d'élevage pourraient-elles développer une résistance à la tétracycline, et si c'était le cas, quelles en seraient les conséquences pour l'environnement ? Si certains articles ont suggéré que les bactéries de l'intestin des larves de moustiques étaient éliminées durant leur métamorphose en adultes (DeMaio et al., 1996; Gaio et al., 2011; Moll et al., 2001), des travaux plus récents montrent que l'intestin n'est pas complètement stérilisé à la métamorphose (Gimonneau et al., 2014; Tchioffo et al., 2016). Même si les adultes relâchés ne sont pas directement traités, leur flore intestinale peut donc être enrichie en espèces résistantes à la tétracycline, ce qui pourrait se vérifier par une analyse du microbiote de ces moustiques. Il pourrait ainsi y avoir un risque de dissémination de bactéries résistantes à la tétracycline dans l'environnement à partir des moustiques relâchés. Considérant que des bactéries résistantes à la tétracycline préexistent dans l'environnement (Nesme et al., 2014), cette dissémination ne constituerait *a priori* pas un risque particulier pour l'environnement. Il pourrait toutefois être intéressant de se pencher sur les voies particulières d'exposition, *via* les moustiques, à ces bactéries éventuellement résistantes à la tétracycline. Par ailleurs, l'eau provenant des élevages de moustiques doit être traitée dans des usines de traitement des eaux usées. Quel que soit le niveau de traitement appliqué localement, les eaux provenant d'établissements dispensant des soins médicaux ou vétérinaires contiendront des quantités d'antibiotiques toujours plus importantes que celles utilisées dans l'élevage de moustiques. L'utilisation de la tétracycline dans le système RIDL serait donc *a priori* sans conséquences particulières pour l'environnement.

7. Risques supplémentaires spécifiques au forçage génétique

Les problématiques spécifiques du forçage génétique sont liées au fait que la modification génétique qu'il confère est invasive (de façon intentionnelle mais incontrôlable) et imposée à l'échelle de la population (éventuellement de l'espèce). Elles sont également associées aux caractéristiques du système CRISPR-Cas9 actuellement exploité dans ces approches. On rappelle que ces techniques de forçage génétique nécessitent un lâcher de moustiques, et peuvent être utilisées pour des objectifs d'élimination de population voire d'éradication d'espèce comme pour des objectifs de modification de population.

Avant d'examiner les risques spécifiques associés au forçage génétique, on peut à nouveau souligner que le « risque » le plus plausible aujourd'hui est que ces approches soient moins efficaces que prévu (voir 4.3.2.). On a vu au point 3 ci-dessus que les risques de perte d'efficacité au cours de la mise en œuvre des techniques de forçage génétique n'étaient pas associés à un risque particulier pour l'environnement, mais qu'un risque sanitaire pouvait être considéré en cas d'une sélection de pathogènes plus virulents pour l'Homme et les animaux parmi les éventuels pathogènes qui pourraient être sélectionnés comme insensibles au mécanisme de résistance propagé par forçage génétique. D'autres conséquences éventuelles ont été évoquées sur la base des systèmes de forçage génétique naturels [voir point 3, (Lindholm et al., 2016)].

a. Activité de mutagenèse collatérale (ou hors-cible) du système CRISPR-Cas9 et conséquences

L'éventualité de coupures hors-cible par le système CRISPR-Cas9 utilisé dans le forçage génétique ne peut être exclue. Quelles seraient les conséquences de ces coupures hors-cible dans une stratégie de forçage génétique ?

Les coupures hors-cible pourraient-elles affecter ou dévoyer le mécanisme de forçage génétique lui-même ? Le forçage génétique ne peut fonctionner que si la séquence ciblée par l'ARN guide est encadrée par des séquences homologues aux séquences flanquant la cassette de forçage génétique dans le génome. Ainsi, une coupure hors-cible pourrait vraisemblablement induire une mutation par religation imprécise sans entraîner l'insertion de la cassette de forçage génétique par manque d'homologie entre les régions flanquant la cassette et les séquences entourant le site hors-cible[78]. La cassette de forçage génétique n'aurait pas plus de chance qu'une autre séquence d'ADN de s'insérer au site de coupure par recombinaison non-homologue. Dans cette hypothèse, l'insertion de la cassette de forçage génétique dans ce site n'entraînerait pas sa propagation. Le ciblage de plusieurs gènes d'une même famille peut être souhaitable ; l'ARN guide devra être conçu en connaissance de cause, en jouant sur la conservation des zones critiques (PAM et *seed*) de la séquence. Les coupures hors-cible non anticipées sur la base d'une telle homologie de séquence ne devraient donc pas conduire à l'insertion d'une cassette de forçage génétique mais à une religation imprécise par NHEJ, ce qui pourrait conduire à des mutations dans les séquences hors-cible.

Quel serait l'impact de ces mutations hors-cible en termes de risques ? La majorité de ces mutations devrait être sans effet pour les moustiques. Un effet délétère conduirait à la disparition des individus mutés par sélection naturelle. Il est enfin extrêmement improbable que de telles mutations confèrent aux moustiques un avantage sélectif, une amélioration de compétence vectorielle, ou encore une toxicité accrue pour leurs prédateurs. Quels en seraient les risques ? Deux cas doivent être distingués pour évaluer les risques associés à ces rares mutations : (1) dans le cadre d'un forçage génétique visant l'élimination, ces mutations n'interfèreraient pas avec l'élimination des moustiques par forçage génétique et disparaîtraient avec eux ; (2) dans le cadre d'un forçage génétique visant une modification de population, elles pourraient perdurer dans la nouvelle population et interférer avec l'intervention. Pour anticiper et prévenir une telle éventualité avant la mise en œuvre d'une telle stratégie de lutte antivectorielle, il faudrait procéder à la caractérisation phénotypique (notamment de la compétence vectorielle) d'une population de moustiques exposés à l'activité de Cas9 et du ou des ARN guides correspondants pendant plusieurs générations en confiné, et au séquençage d'un échantillon d'individus.

L'activité de mutagenèse collatérale pourra être minimisée par le choix d'une endonucléase plus performante que Cas9 et la conception d'un ou de plusieurs ARN guides les plus spécifiques

[78] La longueur sur laquelle doit s'étendre l'homologie des séquences flanquant la cassette génétique pour initier une recombinaison homologue n'est pas clairement déterminée, mais est estimé à environ quelques centaines de pb. En pratique, les chercheurs utilisent aujourd'hui entre 500 pb et 1,5 kb. Le degré d'imperfection d'homologie tolérée n'est pas connu. Quelques *mismatches* répartis le long de la séquence ne devraient pas empêcher la recombinaison. De petites insertions ou délétions seraient aussi certainement tolérées. On peut supposer que l'efficacité de la recombinaison baissera proportionnellement à l'augmentation de taille des délétions/insertions et à la diminution de l'homologie.

possibles. De nouvelles versions de la protéine Cas9 ont été développées pour réduire son activité collatérale de mutagenèse, comme la protéine SpCas9-HF1 (Kleinstiver et al., 2016), et eSpCas9 (Slaymaker et al., 2016). D'autres nucléases, équivalentes à Cas9 en termes fonctionnels, comme Cpf1 (Zetsche et al., 2015), pourraient également être utilisées à sa place si elles s'avèrent supérieures en termes de spécificité et d'efficacité. A l'inverse, toute mutation conduisant à une augmentation d'expression de l'endonucléase pourrait augmenter la fréquence de coupures hors-cible.

Ainsi, l'activité de mutagenèse collatérale de Cas9 n'interfèrera pas avec la propagation d'une cassette de FG, mais elle pourra générer des mutations hors-cibles. Ces mutations seront généralement éliminées dans le cadre d'une stratégie de FG à des fins d'élimination mais elles pourront perdurer dans le cadre d'une stratégie de FG à des fins de modification de population. L'éventualité de mutations indésirables pourra être en partie anticipée par des études préalables en confiné. Des nucléases moins sujettes à la mutagenèse collatérale sont en développement.

b. Risque de transfert d'une cassette de forçage génétique et ses conséquences

Le transfert horizontal d'une cassette de FG vers un autre insecte *via* un rétroélément ou un autre type de transposon est plausible, quoique de probabilité quasi nulle. A l'échelle de l'évolution, le transfert horizontal chez les insectes est une réalité. *A priori*, à cette échelle de millions d'années, une cassette de FG n'a pas une probabilité plus élevée qu'un gène quelconque de se transférer entre espèces. Deux cas se présentent :

1. après un transfert horizontal et une insertion aléatoire dans une nouvelle espèce hôte, une cassette de FG serait non fonctionnelle. En effet, chaque cassette de forçage génétique est conçue pour fonctionner uniquement dans l'espèce cible du fait du double verrouillage, (1) par la séquence spécifique des ARN guides permettant de cibler la coupure de l'ADN, et (2) par l'homologie des séquences flanquantes permettant l'insertion de la cassette de FG par recombinaison homologue. Suite à une insertion aléatoire, il n'y aurait pas de relation d'homologie entre la séquence de l'ARN guide, porté par la cassette, et les séquences flanquant le nouveau site d'insertion de la cassette, empêchant de ce fait la cassette de se propager par forçage génétique. Dans l'hypothétique nouvelle espèce hôte, les ARN guides pourraient alors soit ne pas trouver de séquences homologues, soit provoquer quelques mutations dans des zones d'homologie, sans que la cassette de forçage génétique ne puisse s'y insérer ;
2. dans l'éventualité où le transfert horizontal permettrait l'expression de l'ARN guide et de la protéine Cas9 avant toute insertion de la cassette de FG dans le génome de la nouvelle espèce, la cassette de FG pourrait être fonctionnelle, c'est-à-dire se recopier par recombinaison homologue. En effet, dans ce cas, l'ARN guide pourrait cibler l'insertion de la cassette dans un site propice à sa propagation. On note cependant que la propagation du forçage ne se poursuivrait dans les générations ultérieures que si ce transfert se réalisait dans des cellules précurseurs de gamètes (voir le chapitre 5 pour l'évaluation des risques associés au transfert horizontal).

Le transfert vertical d'une cassette de FG vers d'autres espèces est possible, à condition qu'elles soient interfertiles avec l'espèce d'origine. Les espèces interfertiles sont peu fréquentes chez les moustiques. L'exemple le mieux connu est l'interfertilité entre les sous-espèces *An. gambiae s.s.* et *An. coluzzi* ou *An. arabiensis* du complexe *An. gambiae s.l.* (voir section 2.3.2.1.). Suite à un transfert vertical, le forçage génétique peut être fonctionnel ou non dans la nouvelle (sous-)espèce, selon l'homologie des séquences ciblées par le forçage génétique. Cette stratégie peut se prévoir et se concevoir en amont. Si l'espèce interfertile considérée est également un vecteur, comme c'est le cas pour *An. gambiae* et *An. coluzzi,* toutes deux vectrices de *Plasmodium*, et si l'analyse de la fonction de cette espèce dans l'écosystème le permet, l'extension du forçage génétique sera souhaitable. Les ARN guides pourront être choisis pour fonctionner sur un gène cible commun aux deux espèces. Les risques associés à la modification de chacune des espèces devront être considérés. A l'inverse, si

l'extension du forçage génétique à une espèce interfertile n'est pas souhaitable, l'ARN guide pourra être conçu de manière plus spécifique, selon l'état des connaissances de la diversité allélique de ces gènes dans un complexe donné d'espèces interfertiles. La diversité allélique des espèces d'*Anopheles* vecteurs majeurs du paludisme est bien connue, grâce au séquençage du génome de 16 espèces (Neafsey et al., 2015). Pour d'autres complexes d'espèces qui pourraient éventuellement être ciblées, la connaissance de la diversité sera rarement disponible au préalable ; il serait recommandé de vérifier par séquençage la diversité allélique de la cible au sein d'éventuelles sous-espèces interfertiles. Le risque qu'un FG s'étende à d'autres espèces qu'on ne souhaite pas éliminer est très faible, du fait des barrières reproductives (barrières d'espèces). Si l'hybridation a tout de même lieu occasionnellement et donne des individus fertiles (pour des espèces très proches ou des entités jusqu'à présent considérées à tort comme des espèces distinctes), le FG ne s'étendra que si les cibles des ARN guides et leurs séquences flanquantes sont suffisamment proches pour être reconnues et permettre la recombinaison homologue, ce qui peut s'anticiper à partir d'une bonne connaissance des génomes.

Ainsi, un transfert horizontal de cassette de FG est possible quoique très peu probable par individu et par génération. Dans la plupart des cas, une cassette de FG ne sera pas fonctionnelle suite à un transfert horizontal dans une nouvelle espèce. Un transfert vertical dans des (sous-)espèces voisines interfertiles est plus probable. L'extension de la propagation d'une cassette de FG dans une espèce interfertile voisine peut se prévoir et se concevoir en amont, selon qu'elle est souhaitable ou non, lorsque le génome des deux espèces est connu.

c. La question spécifique de l'éradication d'une espèce

D'un point de vue technique, il est hautement improbable que l'objectif théorique d'éradication d'une espèce par forçage génétique soit réalisé aujourd'hui du fait de la forte probabilité de développement de résistances ou de dérives fonctionnelles au cours de l'application des techniques actuelles (voir section 4.3.2.). Tel qu'il est conçu aujourd'hui, il est probable que le forçage génétique pourra au mieux permettre d'éliminer une population locale. Des stratégies sont toutefois en cours de développement pour réduire les obstacles à la propagation du forçage génétique. *A contrario*, d'autres développement techniques sophistiqués visent à limiter activement la propagation du forçage génétique, ce qui permettrait d'éviter d'imposer une technique à des communautés qui ne l'auraient pas délibérément choisie en réduisant l'objectif à une élimination locale (Min et al., 2017b; Noble et al., 2016).

L'évaluation des risques associés à l'élimination locale d'une population de moustiques a été abordée au point 2 de cette section. La question du rôle qu'occupe l'espèce dans l'écosystème devra être posée au niveau global pour évaluer les conséquences de l'éradication hypothétique d'une espèce.

En termes de retour d'expérience sur des éliminations de population à grande échelle, on note que l'élimination en 1992 de la lucilie bouchère, espèce invasive, par la TIS d'un territoire de l'ordre de 40,000 km^2 autour de Tripoli en Libye a été un succès pour l'élevage et la protection des grands mammifères sauvages (Vargas-Teran et al., 2005). Les conséquences pour l'environnement n'ont pas été décrites. De même pour l'élimination *d'Ae. aegypti* d'Amérique[79] et d'Europe[80] au XX^{e} siècle, aucun rapport ne fait état de conséquences dommageables pour l'environnement associées à la

[79] Un programme d'éradication d'*Ae. aegypti* en Amérique Latine fut lancé en 1947. En 1962, 18 pays continentaux et plusieurs îles des Caraïbes avaient éliminé cette espèce de leur territoire, puis 3 autres pays après 1962. Une ré-invasion progressive s'est ensuite opérée à partir des pays qui n'avaient pas réussi cette élimination [Anonymous (1997). The feasibility of eradicating *Aedes aegypti* in the Americas. Rev Panam Salud Publica *1*.].

[80] *Ae. aegypti* a été introduit en Europe avant la fin du XVII^{e} siècle. Il était présent dans la quasi-totalité des pays du pourtour méditerranéen jusque dans les années 1950, après lesquelles les populations ont rapidement décliné sans que l'on ait clairement identifié les causes (amélioration des systèmes d'adduction d'eau, effet indirect des pulvérisations insecticides notamment contre les vecteurs du paludisme). Depuis 1960, il n'est plus détecté que très sporadiquement et seule la Turquie présenterait aujourd'hui un nombre limité de populations résiduelles [Schaffner, F., and Mathis, A. (2014). Dengue and dengue vectors in the WHO European region: past, present, and scenarios for the future. Lancet Infect Dis *14*, 1271-1280.].

disparition de cette espèce de moustique sur ces territoires. Les tentatives de réduction de population des anophèles vecteurs de paludisme en Afrique n'ont pas été suivies de conséquences négatives connues. Une élimination serait clairement souhaitable d'un point de vue sanitaire ; les conséquences pour l'environnement devraient en être examinées.

Pour *Ae. albopictus et aegypti*, espèces invasives, une approche d'élimination à grande échelle peut être envisagée dans les régions colonisées avec un niveau de préoccupations écologiques relativement faible considérant que ces moustiques n'appartiennent pas à l'écosystème natif, même s'il faudra tenir compte d'un possible rôle écologique local acquis par ces espèces après leur installation. En revanche, la place dans l'écosystème d'une espèce comme *An. gambiae* mérite d'être examinée de façon plus approfondie pour décider d'une lutte à visée d'élimination plutôt que de modification de population. L'espèce est-elle essentielle à la survie de certains prédateurs qui contribuent à limiter la prolifération d'autres espèces de moustiques vecteurs ou de ravageurs agricoles ? A notre connaissance, aucune publication scientifique ne fait état de l'existence de prédateurs spécialistes d'une espèce de moustiques en Afrique, ou dans les territoires français de La Réunion ou Mayotte, et la niche écologique laissée vacante devrait facilement être comblée par d'autres espèces (le nombre d'espèces de moustiques disponibles sous les tropiques étant au moins de plusieurs centaines, [(Foster and Walker, 2002) ; VectorMap http://vectormap.si.edu/]. De manière plus générale, une évaluation au cas par cas et région par région, selon l'objectif de lutte antivectorielle, serait nécessaire pour appréhender l'impact écologique associé à une stratégie d'élimination d'une population de moustiques.

d. Risque d'insertion d'un gène indésirable dans la cassette de FG

Pourrait-il y avoir un risque qu'un gène indésirable (gène de résistance à des insecticides, de sensibilité à un pathogène…) s'insère dans la cassette de FG et se propage avec elle ? Pour cela, deux événements devraient se réaliser : (1) ce gène indésirable devrait s'insérer dans un transposon ou un virus, et (2) ce transposon ou virus devrait s'insérer à son tour, sans l'inactiver, au sein de la cassette de FG.

Le premier événement serait d'une probabilité extrêmement faible, car il suppose qu'un tel gène s'excise du génome et se copie intact au sein d'un transposon ou virus. Si des mécanismes de ce type (plasmides conjugatifs et transposons transférant d'une espèce à l'autre des gènes de résistances à des antibiotiques, des facteurs de virulence...) sont connus chez les bactéries, ce n'est pas le cas chez les moustiques où ces gènes ne sont pas présents sur des plasmides conjugatifs ou associés à des transposons. Il est toutefois notable que le génome de certains moustiques, surtout les *Aedes*, est extrêmement riche en transposons [70 % du génome chez *Aedes*, 23 % chez *Anopheles* ; (Chen et al., 2015)] et que certains virus à ADN peuvent parfois intégrer des fragments génomiques de leurs hôtes.

Le second événement supposerait qu'un tel transposon ou virus recombinant porteur du gène indésirable s'installe, sans l'inactiver, dans une cassette de FG, et ce, dans des cellules de la lignée germinale, événement qui sera d'une extraordinaire rareté. En effet, la lignée germinale est physiologiquement réfractaire aux infections virales exogènes : les cellules germinales sont physiquement isolées des cellules somatiques, et possèdent des mécanismes spécifiques de silençage des acides nucléiques parasites, comme la voie des piwi RNA (Senti and Brennecke, 2010).

La probabilité qu'un gène indésirable se propage avec une cassette de FG est donc extrêmement faible. Ce risque pourrait toutefois être considéré à l'échelle de l'évolution d'une population de plusieurs millions d'individus.

e. Risques imprévisibles et moyens de s'en prémunir

Du fait de l'originalité du forçage génétique sur le plan moléculaire, dans un contexte où l'on dispose d'une connaissance partielle de la biologie des génomes, il est difficile d'anticiper tous les risques et d'imaginer tout ce qui pourrait faire évoluer défavorablement une intervention de forçage

génétique. Conscients de la nécessité de mettre en place des barrières au forçage génétique, certains scientifiques travaillent à mettre en place des parades (*reversal drives* ou techniques de contre-forçage). L'une de ces techniques, déjà testée chez la drosophile, est d'introduire un transgène porteur d'un ARN guide spécifique du gène Cas9, capable d'inactiver celui-ci (Wu et al., 2016). Cette approche constitue un moyen plausible de contrer l'expansion d'une cassette de forçage génétique. Sans forcément empêcher l'usage ultérieur d'une nouvelle cassette de forçage génétique, *via* un gène Cas9 recodé pour n'être plus ciblé par l'ARN guide « antidote », ou *via* un gène codant une protéine de fonction équivalente à Cas9 issue d'autres espèces de bactéries que *S. pyogenes*. La nécessité d'un recours à un tel « empilement technologique » semble peu probable mais il pourrait être recommandé de disposer de l'antidote à l'avance. Une autre approche envisagée est de générer des systèmes de forçage génétique particuliers dont la propagation serait génétiquement limitée dans la population (Min et al., 2017b), et qui permettrait de restaurer la population à son état sauvage en relâchant des moustiques sauvages en excès (Min et al., 2017a).

f. Précautions à prendre pour la recherche

Considérant le potentiel invasif du forçage génétique, les précautions à prendre pour la recherche ont été discutées dans plusieurs articles (Akbari et al., 2015; Esvelt et al., 2014; Oye et al., 2014). Elles reposent en particulier sur le confinement multiple et l'accès restreint aux insectes expérimentaux. Une des meilleures garanties de sécurité préconisées est que les expériences de forçage génétique en laboratoire soient effectuées dans une zone géographique où l'espèce étudiée ne peut se développer (cas d'*An. gambiae*, exigeant un climat tropical, dans les pays du Nord), ce qui garantit que des individus qui se seraient accidentellement échappés du confinement ne puissent ni s'établir, ni rencontrer des partenaires de reproduction. Les expériences préliminaires visant à tester l'intérêt d'un transgène pour la lutte peuvent également s'effectuer en l'absence de la composante de forçage génétique (Cas9 et ARN guide).

8. Risques supplémentaires spécifiques à l'utilisation de Wolbachia

a. Risque que la bactérie Wolbachia introduite dans la population ne confère une compétence vectorielle accrue pour la transmission de pathogènes locaux

Dans certains cas, assez rares, les interactions moustiques/*Wolbachia* conduisent à une augmentation de l'intensité virale ou parasitaire. C'est le cas de *w*AlbB chez *Cx. tarsalis* qui augmente la sensibilité au virus West Nile (Dodson et al., 2014), ou encore de *w*Flu chez *Ae. fluviatilis* qui augmente la charge en ookystes de *Plasmodium gallinaceum* (Baton et al., 2013). Dans ce dernier cas, l'augmentation n'a été montrée que dans deux expériences sur les quatre conduites au total. Jusqu'à présent, les mécanismes responsables de cette augmentation sont inconnus. Des facteurs environnementaux abiotiques peuvent influencer la nature et l'intensité de l'IP. Ainsi, dans le cas d'*An. stephensi* transinfecté avec *w*AlbB, une forte température (28°C) entraîne le blocage de *Plasmodium yoelii* alors qu'une température plus faible (24°C) a au contraire augmenté la charge parasitaire du moustique (Murdock et al., 2014). Les effets de l'environnement sur l'IP devraient donc être étudiés sur d'autres combinaisons *Wolbachia*/hôte/pathogènes avant d'envisager leur utilisation.

On a également vu différentes possibilités de pertes d'efficacité de la technique IP (possibilité que les moustiques évoluent et perdent leur infection par *Wolbachia* ou que la protection conférée aux moustiques par *Wolbachia* diminue avec le temps, possibilité de sélection de pathogènes insensibles à l'IP) (section 4.3.2.). En termes de risques, on a conclu qu'il était important de tester régulièrement les propriétés de virus nouvellement exposés à *Wolbachia*, et ce sous différentes conditions environnementales contrôlées pour s'assurer qu'ils ne deviennent pas plus virulents (voir plus haut).

b. Possibilité de transfert horizontal de gènes de, vers, et/ou via Wolbachia

On note qu'à l'échelle de l'évolution, les infections par *Wolbachia* sont un facteur possible de transfert horizontal de gènes (*via* un transfert latéral, qui est un transfert d'ADN entre un organisme symbionte et son hôte). Au moins deux phénomènes ont été documentés :

- une intégration de fragments de génome de *Wolbachia* dans le génome de l'arthropode hôte.

  Les transferts de gènes latéraux de *Wolbachia* à ses hôtes ont été rapportés dans de nombreux exemples, incluant des cas où les gènes transférés s'expriment au sein du génome de l'hôte, où ils semblent avoir acquis une nouvelle fonction (Hotopp et al., 2007). Ce phénomène a également été rapporté chez le moustique *Ae. aegypti* qui exprime des gènes provenant d'un transfert ancien de *Wolbachia*, alors que cette espèce de moustique est actuellement dépourvue de cette bactérie (Klasson et al., 2009). Ces échanges peuvent concerner de très larges segments génomiques, comme cela a été montré dans le génome de *Drosophila ananassae* (Klasson et al., 2014) ;

- une intégration au sein du génome de *Wolbachia* de gènes d'hôtes arthropodes *via* un phage spécifique à *Wolbachia*.

  Par exemple, dans la publication de Bordenstein et Bordenstein (2016), les phages WOVitA1 et WOCauB2/3, respectivement trouvés chez des *Wolbachia* de guêpe parasitoïde et de lépidoptère, sont porteurs de gènes d'origine eucaryote (dont un apparenté à des toxines d'arachnides, reflétant des changements d'hôtes de *Wolbachia* et de son phage au fil de leur évolution) (Bordenstein and Bordenstein, 2016). Les gènes eucaryotes cooptés par le phage semblent lui procurer des avantages fonctionnels. Lorsque le phage s'intègre au génome de *Wolbachia* (sous forme de prophage), ces gènes eucaryotes se retrouvent donc incorporés au génome de la bactérie. Les co-infections par plusieurs souches de *Wolbachia* sont une occasion d'échanges génétiques entre *Wolbachia via* les phages (Bordenstein and Bordenstein, 2016). Ces gènes pourraient également, en théorie, être transférés aux hôtes.

Ces exemples illustrent la possibilité d'échanges de gènes entre espèces à l'échelle évolutive. Il sera difficile d'en évaluer la fréquence statistique et les conséquences dans le cadre de transinfections artificielles de moustiques par *Wolbachia*, la rareté de ces événements empêchant leur étude en laboratoire. Alors que l'évolution rapide de résistances aux insecticides chez les moustiques liées à l'activité humaine (lutte antivectorielle, agriculture) est un exemple d'influence humaine directe, rapide et mesurable, on peut s'attendre à ce que l'effet éventuel de transinfections sur l'évolution future des génomes de moustiques par transfert horizontal reste très faible.

c. Possibilité de « transfert de Wolbachia » entre espèces de moustiques

Les bactéries *Wolbachia* sont transmises par les moustiques femelles à leur descendance. On peut donc supposer que ces bactéries restent spécifiques à une espèce donnée de moustiques.

Cependant, les génomes de *Wolbachia* portent la signature d'échanges entre des *Wolbachia* connues pour coloniser différentes espèces aujourd'hui (Baldo et al., 2006). Le mécanisme sous-jacent est inconnu, mais ces observations suggèrent que ces différentes *Wolbachia* auraient cohabité au sein du même hôte. Le mécanisme de transfert de bactéries *Wolbachia* entre différentes espèces est toutefois inconnu à ce jour.

Dans le but d'identifier des spécificités associées aux techniques utilisant des moustiques GM (la technique RIDL d'Oxitec et les techniques de forçage génétique à des fins d'élimination et à des fins de modification de population), une analyse comparative de différentes techniques de lutte antivectorielle a été réalisée. Cette analyse a pris en compte des techniques représentatives des principales catégories de lutte, aussi bien classiques (de type chimique, biologique, physique et environnementale), qu'émergentes (basées sur des lâchers de moustiques irradiés (TIS), porteurs de *Wolbachia* (TII, propagation d'IP), ou GM). L'analyse a essentiellement considéré les différents

objectifs que ces techniques permettent d'atteindre, leur potentiel d'efficacité et de durabilité, leurs contraintes techniques, ainsi que les risques pour l'environnement et la santé auxquelles elles peuvent être associées.

L'analyse a été conduite à un niveau qui met en évidence des spécificités pour chacune des techniques étudiées. Il est néanmoins possible d'en dégager les grandes tendances suivantes.

Les moustiques GM considérés dans l'analyse partagent une caractéristique commune : ils sont tous transgéniques et expriment de nouveaux produits, nécessitant une analyse de risques appropriée, menée au cas par cas des constructions génétiques. L'expression de nouveaux produits permet une autre propriété commune, qui est de pouvoir exprimer un marqueur moléculaire, utile au suivi des moustiques relâchés et de leur descendance transgénique.

A part cette caractéristique, il ressort de cette analyse que pour la majorité des points considérés, les techniques utilisant des moustiques GM ne constituent pas un bloc homogène et distinct des autres techniques, mais partagent des caractéristiques en commun avec différents sous-ensembles d'autres techniques.

Ainsi, l'ensemble des techniques basées sur des lâchers de moustiques, qu'ils soient GM ou non, partagent :

- **le même type de contraintes techniques, spécifiques aux élevages et aux lâchers de moustiques, avec des variations selon la biologie des espèces de moustiques considérées (adaptation des protocoles d'élevage), et selon les stratégies de lutte dans lesquelles elles s'inscrivent (adaptation de la taille et de la durée de fonctionnement des élevages, et éventuelle nécessité de sexage, verrou technologique majeur pour la plupart de ces techniques) ;**
- **la spécificité d'action de la lutte, située au niveau de l'espèce de moustiques relâchés et des éventuelles espèces interfertiles, spécificité associée à un impact environnemental et sanitaire direct minimal, et à la nécessité d'effectuer autant d'interventions que d'espèces non interfertiles vectrices d'un même agent pathogène dans une région donnée ;**
- **la problématique associée à l'éventuelle persistance et à l'éventuel caractère envahissant des moustiques relâchés et des modifications qu'ils portent, qui se pose de manière différente selon l'objectif des techniques considérées (réduction *vs* modification de population), et doit tenir compte des possibilités de fertilité résiduelle des mâles relâchés ;**
- **la problématique associée aux éventuels lâchers de femelles, avec des analyses variables selon l'objectif et les spécificités des techniques considérées ;**
- **une efficacité dépendant de la compétitivité des moustiques relâchés ;**
- **une meilleure efficacité à faible densité de moustiques cibles, nécessitant la combinaison de ces techniques avec des méthodes classiques de lutte, telles que les biocides, efficaces à forte densité, ou leur utilisation hors des saisons de forte pullulation de moustiques endémiques, ou en amont de l'établissement d'espèces invasives ;**
- **un temps d'action de plusieurs mois pour atteindre l'objectif visé, impliquant une utilisation hors situation d'urgence sanitaire, et une gestion intégrée avec des techniques à efficacité quasi immédiate, comme les biocides.**

D'autres caractéristiques indépendantes du caractère GM sont définies non par des techniques particulières mais par les objectifs qu'elles visent [réduction (à différents degrés) *vs* modification de population]. En termes d'objectifs, la technique RIDL d'Oxitec permet d'atteindre un objectif de réduction de population, comme des techniques classiques de lutte antivectorielle ; mais à la différence des techniques classiques, elle pourrait permettre, en théorie, de poursuivre cette réduction jusqu'à une élimination de population locale, comme le peuvent d'autres techniques

émergentes de lutte (TIS, TII) ; les techniques de FG permettent, d'une part, d'éliminer une population locale et en théorie d'éradiquer une espèce (la capacité d'éradication, spécifique à cette technique, reste toutefois irréalisable à ce jour du fait de développements prévisibles de résistance), et d'autre part, de modifier une population, comme la technique émergente de propagation d'une IP *via Wolbachia*.

Ainsi, l'ensemble des techniques permettant de réduire la densité d'une population de moustiques, qu'elles utilisent des moustiques GM (RIDL et FG à des fins d'élimination) ou non (TIS, TII, et des techniques de lutte biocide, biologique, physique et environnementale) partagent :

- **un impact environnemental associé à la raréfaction de la population des moustiques cibles et dépendant du rôle de l'espèce ciblée dans l'écosystème. Cet impact est variable selon, entre autres, le caractère autochtone *vs* invasif de l'espèce considérée, son milieu urbain *vs* naturel, l'existence de prédateurs spécialistes, le degré de réduction de la population (simple réduction *vs* élimination locale *vs* éradication de l'espèce, sachant que l'objectif d'éradication est théorique à ce stade, et que ce serait une spécificité de la technique de FG à des fins d'élimination), la persistance des effets de la technique (fonction de l'isolement de la zone traitée et des caractéristiques d'auto-entretien vs auto-limitation de la technique, voir ci-dessous) et la spécificité de la technique (les techniques impliquant des lâchers de moustiques étant les plus spécifiques, voir plus haut). Il devra donc être évalué au cas par cas des techniques utilisées, des espèces et des régions ciblées ;**
- **la possibilité d'un remplacement non intentionnel de la population ciblée par la population d'une autre espèce vectrice, qui se pose d'autant plus que le degré de réduction de la population est important et qu'elle persiste dans le temps ;**
- **la question de la perte de l'immunité des populations antérieurement exposées, à considérer à l'aune du bénéfice obtenu par la disparition de la maladie pour un temps.**

De leur côté, les techniques dont l'objectif est de modifier la compétence vectorielle d'une population (à savoir la technique de forçage génétique à des fins de modification, utilisant des moustiques GM, et la technique de propagation d'une IP *via Wolbachia*), partagent :

- **la caractéristique de modifier la compétence vectorielle de la population cible sans en réduire la densité (c'est du moins l'objectif recherché), impliquant *a priori* un moindre impact en termes de risques environnementaux et sanitaires mais nécessitant une évaluation d'impact globale et sur la durée ;**
- **la persistance et le caractère plus ou moins envahissant des modifications induites, avec la nécessité de considérer le devenir et l'effet à long terme des facteurs à l'origine de ces modifications (*Wolbachia*, transgènes), incluant leur transfert potentiel à d'autres espèces.**

Deux autres sous-ensembles de techniques présentent des caractéristiques qui s'opposent, alors qu'ils incluent chacun des techniques utilisant des moustiques GM : les techniques auto-limitées (qui ont des effets limités dans l'espace et le temps à moins d'être entretenues) d'une part, et les techniques auto-entretenues (dont les effets se répandent dans l'espace et durent dans le temps, sans nécessiter d'intervention de maintenance) d'autre part, sachant qu'il existe un continuum bi-dimensionnel (selon le temps et l'espace) de techniques entre ces deux extrêmes (voir section 4.3.2.). La technique RIDL fait partie des techniques auto-limitées, comme la technique TIS et TII et la plupart des techniques classiques de lutte antivectorielle (à part les modifications physiques définitives et certaines techniques de biocontrôle caractérisées par une persistance sur le terrain). Les techniques de FG font partie des techniques auto-entretenues, ainsi que, à des degrés variables selon la souche de *Wolbachia* utilisée, la technique de propagation d'IP *via Wolbachia*.

Ainsi, les techniques auto-limitées (dont la technique RIDL) partagent :

- **la propriété d'avoir des effets limités dans l'espace et le temps à moins d'être entretenues,**

- **l'avantage d'être maîtrisables et adaptables selon les résultats de surveillance,**
- **l'inconvénient de nécessiter une maintenance contraignante sur le long terme.**

A l'inverse, les techniques auto-entretenues (dont les techniques de FG) partagent :

- **la propriété d'avoir des effets qui se répandent (plus ou moins) dans l'espace et durent dans le temps,**
- **l'avantage de ne pas nécessiter de maintenance et de grosses infrastructures,**
- **l'inconvénient d'être très peu flexibles, voire théoriquement incontrôlables dans l'éventualité où la propagation de *Wolbachia* ou de la cassette de forçage génétique considérée ne rencontrerait pas d'obstacles.**

Ces caractéristiques peuvent varier pour une technique donnée selon la stratégie de lutte dans laquelle elle est employée (réduction *vs* élimination), ou selon les propriétés des souches de *Wolbachia* utilisées.

Les aspects évolutifs des techniques, en termes de pertes d'efficacité avec le temps (1) par développement de résistance au mode d'action des techniques, (2) par développement de résistance comportementale, ou (3) par dérive fonctionnelle, et leurs conséquences en termes de risques environnementaux et sanitaires, sont moins aisés à récapituler en termes d'ensembles de techniques car ils dépendent des mécanismes précis de fonctionnement de chaque technique.

On peut toutefois souligner deux nouveaux ensembles de techniques dont les caractéristiques s'opposent en termes de développement de résistance, alors qu'ils incluent chacun des techniques utilisant des moustiques GM : les techniques fonctionnant par le biais d'une cible génétique sont propices à un développement de résistance au mode d'action des techniques. Elles incluent certains biocides et les techniques de forçage génétique. Ce n'est pas le cas des autres techniques, incluant la technique RIDL, mais aussi la TIS, la TII, la propagation de l'IP *via Wolbachia* et les autres techniques classiques de lutte, qui ont des mécanismes d'action n'impliquant pas de cible génétique, ou impliquant des cibles trop nombreuses pour permettre un tel développement de résistance.

A l'inverse, d'après les caractéristiques propres à chaque technique, le développement d'une résistance comportementale est concevable pour la technique RIDL et les techniques utilisant *Wolbachia*, peu probable pour les techniques de FG. Enfin, les risques de dérive fonctionnelle sont plausibles pour RIDL et les techniques de FG, ainsi que pour les techniques utilisant *Wolbachia*. La technique TIS se distingue notablement des autres techniques de lutte par le fait qu'elle ne semble propice à aucune perte d'efficacité dans le temps.

Ainsi, cette analyse montre que pour la majorité des points considérés, les techniques utilisant des moustiques GM ne présentent pas de caractéristiques communes propres à leur caractère GM, mais se rapprochent différentiellement d'autres techniques de lutte selon les aspects considérés. L'analyse des intérêts et des limites (incluant les risques) de ces techniques sera donc également en partie valable pour des techniques n'utilisant pas nécessairement de moustiques GM.

Au-delà de ces points communs, les techniques de forçage génétique présentent des caractéristiques propres, qui ne se retrouvent chez aucune autre technique, associées aux propriétés invasives du système CRISPR-Cas9 utilisé dans une configuration *ad hoc*. Si les limites techniques associées aux exemples d'application développés à ce jour permettent d'anticiper une interruption de la propagation des cassettes de forçage génétique, l'évaluation de futures applications devra prendre en compte le potentiel invasif particulier de ces techniques, et les incertitudes associées à leur évolution sur le terrain. Le chapitre suivant traite des critères d'évaluation des risques des moustiques GM, et permettra de répondre, entre autres, à la question de l'adéquation du cadre actuel d'évaluation des risques aux spécificités des techniques de forçage génétique.

5. Critères d'évaluation des risques des moustiques génétiquement modifiés

La saisine demande spécifiquement au HCB de préciser « les critères applicables pour l'évaluation sanitaire et environnementale de ces insectes au niveau international, européen et national (y compris DROM-COM) », « ces insectes » se référant à des moustiques génétiquement modifiés.

Pour répondre à cette demande, il est nécessaire de se pencher au préalable sur la réglementation applicable à la dissémination d'OGM dans les différents territoires concernés. Considérant l'ampleur de la demande, le CS s'est plus particulièrement intéressé aux différents territoires français, métropolitain et ultramarins, dont les différents statuts conduisent à faire référence à la législation européenne et internationale.

5.1. Remarques préliminaires concernant la réglementation des moustiques GM

5.1.1. Réglementation applicable aux territoires français

La réglementation de l'Union européenne s'applique en métropole et aux régions dites ultra-périphériques, soit directement, soit après transposition réglementaire. Les régions ultra-périphériques (RUP) sont les territoires de l'Union européenne situés hors du « continent » européen. Les RUP françaises regroupent l'ensemble des Départements - Régions d'Outre-Mer (DROM : Guadeloupe, Guyane, Martinique, La Réunion, Mayotte) ainsi que la collectivité d'outre-mer (COM) Saint-Martin. La réglementation applicable aux autres territoires d'outre-mer est définie localement. Le sujet de leur réglementation fait l'objet d'un développement dans le rapport du GT du CEES.

Par ailleurs, la France et l'Union européenne font partie des signataires du Protocole de Cartagena sur la prévention des risques biotechnologiques relatif à la Convention sur la diversité biologique, qui définit notamment les mesures applicables aux mouvements transfrontières des « organismes vivants modifiés » (OVM, terminologie du protocole de Cartagena correspondant à la notion d'OGM, à quelques nuances de définitions réglementaires près, voir Annexes 13 et 14). Les territoires français qui ne font pas partie de l'Union européenne devront donc au moins appliquer le Protocole de Cartagena.

5.1.2. Réglementation applicable aux techniques de lutte antivectorielle utilisant des moustiques GM

L'utilisation de moustiques génétiquement modifiés dans l'environnement est réglementée par la directive 2001/18/CE, du moins quand leur statut d'OGM ne prête pas à confusion par rapport aux définitions de cette directive, par exemple s'ils sont transgéniques. Certaines techniques de modification génétique applicables aux moustiques font partie des techniques dont l'encadrement réglementaire est actuellement débattu à la Commission européenne (mutagenèse ciblée par CRISPR-Cas9). Par ailleurs, les modifications génétiques qui résultent en un forçage génétique soulèvent des questions radicalement nouvelles en termes de risques. L'élaboration d'une réglementation spécifique au forçage génétique fait l'objet de discussions au niveau international.

5.2. Proposition de critères d'évaluation des risques des moustiques GM

Pour définir des « critères applicables pour l'évaluation environnementale et sanitaire » de l'utilisation des moustiques GM en lutte antivectorielle, la démarche suivie a été de considérer les critères d'évaluation applicables à la dissémination d'OGM dans l'environnement selon la directive 2001/18/CE et le Protocole de Cartagena, en réfléchissant aux deux questions suivantes :

(1) quelles réalités ces critères permettent-ils de prendre en compte concernant les risques

associés aux moustiques GM ?

(2) ces critères sont-ils suffisants pour évaluer les risques associés aux moustiques considérés, et si non, lesquels devraient être ajoutés a priori ?

5.2.1. Principes applicables selon la directive 2001/18/CE

Principes applicables à l'évaluation des risques pour l'environnement selon la Directive 2001/18/CE, Annexe II :

1. Principe de l'évaluation au cas par cas
2. Principe de la comparaison à un équivalent non GM
3. Etapes de l'évaluation des risques : identification des caractéristiques pouvant avoir un effet négatif, leurs conséquences potentielles, la probabilité que chaque effet se produise, l'estimation des risques (la probabilité que l'effet se réalise et l'ampleur des conséquences, s'il se réalise), et la définition de stratégies de gestion des risques, le cas échéant
4. Informations à établir, le cas échéant (« *as appropriate* », c.-à-d. si nécessaire et pertinent), pour aider à conclure sur le risque environnemental de la dissémination d'un OGM autre qu'une plante supérieure (Annexe II, D.1) :
   - *i. Persistance et caractère envahissant*
   - *ii. Avantages et désavantages sélectifs*
   - *iii. Possibilité de transfert de gènes à d'autres espèces*
   - *iv. Interactions avec les organismes cibles et incidences potentielles sur l'environnement*
   - *v. Interactions avec les organismes non-cibles et incidences potentielles sur l'environnement*
   - *vi. Effets sur la santé humaine*
   - *vii. Effets sur la santé animale*
   - *viii. Effets sur les processus biogéochimiques*
   - ix. *Incidences sur l'environnement des techniques utilisées pour la gestion de l'OGM*

Concernant la dimension sanitaire de la question, il est à noter que les critères applicables pour l'évaluation sanitaire des OGM qui ne sont pas destinés à des fins alimentaires sont inclus dans les critères d'évaluation environnementale de la directive 2001/18/CE.

L'évaluation des risques à réaliser aux fins du Protocole de Cartagena (Annexe III) suit les mêmes grands principes que la directive 2001/18/CE ; les critères particuliers ne sont pas précisés, même si les points à examiner sont indiqués (les organismes récepteur, donneur, l'insert, etc.). Les critères listés par la directive 2001/18/CE ont donc été considérés comme base de réflexion.

5.2.2. Déclinaison des critères de la directive 2001/18/CE pour une utilisation de moustiques GM en lutte antivectorielle

Saisie par la Commission européenne, l'EFSA a établi en 2013 un document d'orientation pour l'évaluation des risques associés à la dissémination d'animaux GM dans l'Union européenne sur le fondement de la directive 2001/18/CE, incluant une section sur les moustiques GM (EFSA, 2013). Par ailleurs, conformément aux dispositions du Protocole de Cartagena sur la prévention des risques biotechnologiques, des critères d'évaluation des moustiques vivants modifiés ont été définis par la Convention sur la diversité biologique dans ses directives pour l'évaluation des risques posés par les organismes vivants modifiés (BCH, 2012). Ces rapports ont été pris en compte pour la rédaction de cette partie.

1. Concernant les principes d'évaluation énoncés dans la directive 2001/18/CE, le principe de l'évaluation au cas par cas reste entièrement pertinent pour l'utilisation de moustiques GM dans le cadre de la lutte antivectorielle et permettra notamment de considérer :
   - l'objectif et la méthode de lutte antivectorielle,
   - les caractéristiques bio-écologiques de l'espèce des moustiques ciblés,
   - les caractéristiques moléculaires, génétiques, phénotypiques des moustiques relâchés et de leur descendance éventuelle, ainsi que leur impact, intentionnel ou non intentionnel, sur l'écosystème,
   - les milieux récepteurs visés, l'échelle considérée, les barrières naturelles ou artificielles qui pourraient éventuellement limiter la dispersion d'une population de moustiques,
   - …
2. Le principe de la comparaison à un équivalent non GM est également pertinent, et permettra de prendre en compte, comme comparateurs, la lignée parentale non GM du moustique modifié, mais aussi le moustique ciblé dans la zone destinée à la dissémination. L'approche comparative de l'évaluation des risques devra ensuite être adaptée aux contextes et objectifs particuliers des différents types de techniques de lutte antivectorielle :
   i. dans le cas d'un objectif de réduction de population, l'impact des moustiques GM stériles ou stérilisants pourra être comparé à ceux d'autres méthodes de lutte visant la réduction, comme la lutte chimique ou biologique, ou certaines méthodes de lutte physique et environnementale ;
   ii. dans le cas d'un objectif de modification de population, l'impact associé à la nouvelle population de moustiques GM pourra être comparé à celui du moustique ciblé associé à son régime de gestion usuel, dans chaque milieu où la nouvelle population est susceptible de s'installer.
3. Les étapes classiques d'évaluation des risques sont également pertinentes à suivre pour l'évaluation des moustiques GM. L'analyse des caractéristiques génétiques et moléculaires des moustiques GM pourra classiquement inclure l'analyse de la construction génétique et la méthode de modification, le nombre de sites d'insertion et de copies du/des transgène(s), la structure et la séquence de l'insert, les régions flanquantes, l'analyse bioinformatique des ORFs[81], la stabilité et l'héritabilité du/des transgène(s) et du/des caractère(s) associé(s), ainsi que l'expression du/des transgène(s), en précisant si de nouvelles protéines sont présentes dans la salive des moustiques. Pour les approches de forçage génétique, des vérifications supplémentaires s'imposent : il s'agit notamment d'examiner la version de l'endonucléase utilisée et la spécificité des gRNA employés sur le génome de l'espèce-cible pour évaluer la probabilité de mutations collatérales et, le cas échéant, pouvoir estimer les conséquences associées ; il s'agit aussi d'examiner si les gRNA pourraient reconnaître des séquences dans le génome d'autres (sous-)espèces non-cibles en cas d'interfertilité. Les analyses comparatives incluront en particulier la comparaison de la sensibilité des moustiques GM à différents agents pathogènes et la compétence vectorielle associée, à celles des moustiques non GM et des moustiques ciblés dans la zone destinée à la dissémination.
4. Les critères listés dans la directive 2001/18/CE permettent de prendre en compte les aspects suivants de l'évaluation des risques de l'utilisation de moustiques GM dans le cadre de la lutte antivectorielle, étant entendu qu'ils devront être affinés au cas par cas des dossiers :
   i. Persistance et caractère envahissant

[81] ORF (*Open Reading Frame*) : cadre ouvert de lecture, détecté par des programmes bioinformatiques, correspondant à une séquence d'ADN qui peut coder, si elle est préalablement transcrite, un peptide ou une protéine.

La persistance et le caractère envahissant des moustiques GM relâchés et de leur éventuelle descendance au sein de la même espèce ou avec une (sous-)espèce interfertile, le cas échéant, témoignent de la dissémination des modifications génétiques. Peuvent être considérés ici les points suivants :

- les caractéristiques bio-écologiques de l'espèce de moustiques relâchés (et ciblés) et l'impact de la modification sur ces caractéristiques :
  - la biogéographie de l'espèce et l'impact potentiel de la modification,
  - le potentiel de survie, multiplication et dispersion de l'espèce et l'impact potentiel de la modification.

Les spécificités de la zone de dissémination ciblée et les barrières naturelles ou artificielles éventuelles considérant la bio-écologie de l'espèce ciblée peuvent être prises en compte dans cette analyse.

- la possibilité de transfert vertical de gènes :
  - au sein de la même espèce (et considérer l'impact de la modification sur la biologie reproductive),
  - avec des (sous-)espèces interfertiles : considérer l'isolement reproductif de l'espèce de moustique ciblée et l'impact éventuel de la modification.

Les caractéristiques de persistance et de caractère envahissant ne sont pas considérées comme des risques en tant que tels : leurs conséquences en termes de risques pour l'environnement devront être évaluées.

ii. Avantages et désavantages sélectifs

L'impact (avantage ou désavantage sélectif) conféré par la modification sur le moustique GM est évalué pour chaque paramètre considéré dans la liste de critères.

iii. Possibilité de transfert horizontal de gènes

Ce critère permet de prendre en compte les possibilités de transfert des transgènes à des organismes de l'environnement autres que ceux de la descendance des moustiques GM relâchés. Peuvent être considérés ici les points suivants :

- le transfert de transgènes à d'autres insectes, incluant d'autres espèces de moustiques (non compatibles sexuellement),
- le transfert de transgènes aux microorganismes du microbiote du moustique ou de l'environnement.

Cette analyse devra prendre en compte :

- les caractéristiques moléculaires des transgènes, incluant la présence d'éventuels éléments mobiles ou la présence d'homologies à des gènes bactériens,
- des mécanismes plausibles de transfert horizontal, *via* des intermédiaires biologiques entre insectes ou par recombinaison homologue chez des bactéries,
- l'exposition, aux moustiques GM, des organismes receveurs potentiels.

Si la possibilité d'un transfert horizontal de transgènes est identifiée, les conséquences sur l'environnement et la santé doivent ensuite être évaluées, en prenant en compte :

- la possibilité de transfert vertical ultérieur dans la descendance de l'organisme receveur, c.-à-d. la possibilité que le transfert horizontal atteigne les cellules germinales de l'organisme receveur,

- la possibilité de persistance chez des bactéries receveuses, c.-à-d. la possibilité que le transgène transféré ne confère pas de désavantage sélectif à ces bactéries,
- la possibilité d'expression des transgènes chez les organismes receveurs (ex : spécificité d'action d'un mécanisme de forçage génétique, spécificité des promoteurs, usage de codons, présence d'introns…),
- la prévalence du caractère dans les organismes receveurs et dans l'environnement receveur.

iv. Interactions avec les organismes cibles et incidences potentielles sur l'environnement

Les organismes cibles pouvant être définis ici comme les moustiques visés par la lutte antivectorielle mise en œuvre *via* des moustiques GM et, indirectement, les agents pathogènes qu'ils transmettent, les points suivants peuvent être considérés dans cette section :

- les conséquences de la dissémination des moustiques GM sur la population des cibles :
  - en cas de lâcher accomplissant l'objectif recherché (réduction, élimination ou modification d'une population voire éradication d'une espèce),
  - en cas de dérive génétique dans la population de moustiques GM relâchés,
  - en cas de lâcher non intentionnel de femelles,
- le risque, pour les non-cibles, découlant d'une modification ou de la réduction intentionnelle de la population des cibles (ce point est développé dans les interactions avec les organismes non-cibles),
- le risque de développement, chez les moustiques et les pathogènes cibles, de résistance au mécanisme de lutte antivectorielle mis en œuvre, que l'objectif soit une modification ou une réduction de population. Cette éventualité conduirait à une perte de l'efficacité de la technique de lutte mise en œuvre, dont les conséquences éventuelles sur l'environnement devront être évaluées.

v. Interactions avec les organismes non-cibles et incidences potentielles sur l'environnement

Les organismes non-cibles couvrent tous les organismes autres que les cibles intentionnelles de l'action des moustiques GM. Peuvent être considérés ici les points suivants :

- l'impact indirect des moustiques GM *via* la chaîne trophique sur les proies et prédateurs directs et indirects des organismes cibles, en cas de leur modification en une population non équivalente, ou de la réduction ou élimination de leur population (voire éradication de leur espèce), et les conséquences potentielles sur les services écosystémiques (pollinisation, lutte biologique…) éventuellement associés. Cette analyse doit notamment considérer :
  - si les moustiques cibles sont autochtones ou allochtones invasifs, l'élimination locale d'une espèce invasive pouvant éventuellement conduire à un retour à un état de l'écosystème prévalant avant son introduction,
  - s'il existe des prédateurs spécialistes des cibles dans la zone ciblée par la lutte antivectorielle,
  - s'il existe des prédateurs non spécialistes des cibles, mais dont la survie dépend temporairement des cibles (par exemple en saison humide), dans la zone ciblée par la lutte antivectorielle,
  - si le milieu ciblé est naturel ou fortement anthropisé ou urbanisé,
  - si l'effet recherché ou provoqué est temporaire ou permanent ;

- l'impact associé à une écotoxicité potentielle des moustiques GM et de leur éventuelle descendance pour des organismes non-cibles,
- le risque de remplacement non intentionnel de la population cible, si sa niche écologique est rendue partiellement ou totalement vacante par la lutte antivectorielle, par une population non équivalente, et les conséquences associées (ex. : émergence de vecteurs secondaires potentiellement préjudiciables),
- l'impact sur les populations d'éventuels hôtes des pathogènes vectorisés par les cibles, …

vi. Effets sur la santé humaine et animale

Considérant la spécificité des moustiques en tant qu'insectes nuisants et vecteurs d'agents pathogènes responsables de maladie, les éléments particuliers suivants peuvent être considérés dans cette section :

- l'impact sur la nuisance des moustiques GM et de leur éventuelle descendance par rapport à leurs cibles sauvages locales, pour les hommes et les animaux,
- l'impact sur la compétence vectorielle des moustiques GM et de leur éventuelle descendance par rapport à leurs cibles sauvages locales pour différents agents pathogènes,
- le risque de sélection de nouvelles souches de pathogènes que les moustiques GM seraient capables de transmettre et qui seraient plus virulentes que les souches initialement ciblées, en conséquence de la pression de sélection exercée par la technique appliquée,
- le risque d'augmentation de la population de femelles piqueuses, plus ou moins vectrices et plus ou moins fertiles, dans l'environnement, suite à un lâcher non intentionnel de femelles dans le cadre d'une stratégie nécessitant un lâcher exclusif de mâles et ses conséquences,
- le risque d'une perte d'efficacité de la technique de lutte antivectorielle, et ses éventuelles conséquences en termes de risque pour la santé,
- le risque d'introduction de nouveaux agents pathogènes dans l'environnement en conséquence de lâchers (intentionnels ou non intentionnels) de moustiques femelles infectés au cours de l'élevage,
- le risque indirect de perte d'immunité d'une population en cas de réduction d'incidence d'une maladie causée par un pathogène transmis par les moustiques cibles.

D'autres risques classiques pour la santé peuvent être considérés :

- le risque de toxicité des moustiques GM et de leur éventuelle descendance par rapport à leurs comparateurs non GM pour leurs prédateurs ou pour les hommes, par des voies d'exposition plausibles (ex : piqûre ou inhalation involontaire),
- le risque d'allergénicité associée à des moustiques GM et à leur éventuelle descendance par rapport à leurs comparateurs non GM en cas de piqûre de leurs hôtes ou *via* l'exposition des employés travaillant dans les élevages de production de ces moustiques GM,
- …

vii. Effets sur les processus biogéochimiques

Les microorganismes impliqués dans les processus biogéochimiques peuvent être considérés et traités comme des organismes non-cibles (voir critère ci-dessus). Peuvent également être considérés les points spécifiques suivants :

- la contribution accrue ou moindre des insectes, à leur mort, à la décomposition de la matière organique dans le sol et l'eau,
- la possibilité d'un impact sur la composition de la microflore du sol,
- la possibilité d'un impact de l'élimination d'une population de moustiques cibles sur l'équilibre microbiotique de son habitat (notamment au niveau larvaire dans le cas des espèces endémiques).
- …

viii. Incidences sur l'environnement des techniques utilisées pour la gestion de l'OGM

L'impact sur l'environnement des techniques de gestion requises par les techniques de lutte antivectorielle *via* l'utilisation de moustiques GM pourra être comparé à l'impact sur l'environnement des techniques de gestion requises par les techniques de lutte antivectorielle usuelles qu'elles sont destinées à compléter/remplacer.

5.2.3. Analyse et conclusion

Ces critères sont-ils suffisants pour évaluer les risques associés aux moustiques considérés, et si non, lesquels devraient être ajoutés a priori ?

Si chaque nouveau dossier doit être évalué au cas par cas, le CS du HCB, suite à l'analyse du groupe de travail, n'identifie *a priori* pas de risque particulier pour l'environnement qui ne puisse être couvert par les critères généraux listés dans la directive 2001/18/CE. Par ailleurs, indépendamment des critères définis par la directive 2001/18/CE, développés par l'EFSA dans son document d'orientation sus-mentionné (EFSA, 2013), et des critères d'évaluation définis conformément aux dispositions du Protocole de Cartagena par la Convention sur la diversité biologique dans ses directives pour l'évaluation des risques également sus-mentionnées (BCH, 2012), l'OMS a publié un rapport de recommandations pour l'évaluation des moustiques génétiquement modifiés incluant une section sur l'évaluation des risques (WHO, 2014). Selon les membres du groupe de travail, ce rapport n'inclut pas de critères d'évaluation des risques pour l'environnement qui ne soient couverts par la directive 2001/18/CE[82].

Si les critères généraux d'évaluation des risques conviennent, le CS du HCB, après le groupe de travail, souligne toutefois des éléments radicalement nouveaux apportés par le forçage génétique, considérant le caractère intentionnellement invasif et irréversible de la modification recherchée, qui a le potentiel théorique d'atteindre tous les individus d'une espèce dans l'environnement, que ce soit pour l'éradiquer ou la modifier. Par dessein, la dissémination n'est plus limitée dans le temps ou l'espace. L'évaluation des risques associés au forçage génétique devra donc être adaptée à ce changement d'échelle et d'objectifs. La gestion des risques associée devra également être adaptée. Il est rappelé qu'aucune technique de forçage génétique n'a encore atteint le stade d'aboutissement technique permettant d'envisager une dissémination dans l'environnement – les discussions en sont plutôt au stade des bonnes pratiques de recherche en milieu confiné, eu égard aux précautions à prendre pour éviter qu'une cassette de forçage génétique ne se dissémine non intentionnellement dans l'environnement. Des techniques capables de contrer ou limiter le forçage génétique, également en cours de développement, pourraient permettre d'éviter une dissémination éventuellement non souhaitable d'un tel système de modification de population.

En réponse à la question posée dans la saisine, on peut donc conclure que **les critères listés dans la directive 2001/18/CE, réglementairement applicables à l'évaluation des risques pour l'environnement associés à une dissémination de moustiques GM dans l'Union européenne, sont scientifiquement pertinents et *a priori* suffisants pour l'évaluation des risques associés à**

[82] On note que l'évaluation préconisée par le rapport de l'OMS prend en compte les bénéfices en plus des risques.

l'utilisation de moustiques GM dans le cadre de la lutte antivectorielle. Une déclinaison particulière, comme prévu par la directive, devra être effectuée pour l'évaluation des risques associés aux techniques de forçage génétique, qui pourrait faire l'objet d'un rapport plus approfondi.

Par ailleurs, au-delà de cette question sur les critères d'évaluation des risques posée par la saisine, on note que la possibilité de dissémination transfrontalière de moustiques GM pose un problème en matière de gestion. En effet, les mouvements transfrontaliers intentionnels et non intentionnels d'organismes vivant modifiés doivent actuellement être notifiés sur le fondement du Protocole de Cartagena, chaque partie (ou signataire du Protocole) étant tenue de prendre des mesures appropriées pour empêcher les mouvements transfrontaliers non intentionnels. Ceci étant difficilement réalisable pour des moustiques GM capables de propager une modification, cette question relève du niveau international et devrait susciter une harmonisation réglementaire supranationale.

5.3. Prolongement de la réflexion aux autres techniques de lutte émergentes

La TIS ne semble pas réglementée au niveau européen[83]. En l'occurrence, le lâcher de moustiques stérilisés par irradiation réalisé en Italie (Bellini et al., 2013) n'a pas nécessité d'autorisation ou d'évaluation de risques préalable (Bellini, communication personnelle). La publication correspondante fait référence aux normes internationales pour les mesures phytosanitaires de la FAO et de la Convention internationale pour la protection des végétaux, dans le cadre desquelles le lâcher d'insectes stériles est traité dans les directives pour l'exportation, l'expédition, l'importation et le lâcher d'agents de lutte biologique et autres organismes utiles (Bellini et al., 2013; FAO, 2016a, b). Les moustiques stérilisés par irradiation seraient donc considérés comme des agents de lutte biologique et la TIS s'apparenterait à du biocontrôle. La réglementation *ad hoc* au niveau français serait à clarifier.

Enfin, la question du statut réglementaire des insectes artificiellement infectés par *Wolbachia* n'a pas encore été soulevée dans l'Union européenne car aucune demande de dissémination n'y a été soumise à ce jour. Il est possible que, selon les définitions réglementaires de la directive 2001/18/CE, un moustique infecté de manière artificielle (transinfecté) par une bactérie endocellulaire puisse être considéré comme génétiquement modifié. Dans ce cas, l'utilisation de tels moustiques pourrait soit être soumise aux exigences réglementaires correspondantes, soit être exemptée du champ d'application de la directive après réflexion et décision au niveau communautaire. Il est également possible qu'une analyse juridique conclue à un statut de biocide pour *Wolbachia* utilisé ainsi en lutte antivectorielle. On note qu'au niveau international, l'utilisation de ces moustiques n'a pas été considérée comme relevant du champ d'application du Protocole de Cartagena à ce jour en raison de l'interprétation de la définition des OVM (Marshall, 2011). Il est intéressant de noter que *Wolbachia* est réglementée en tant que biopesticide aux Etats-Unis (Dobson et al., 2016) et en tant que substance vétérinaire en Australie (De Barro et al., 2011; Dobson et al., 2016).

Quel que soit le statut réglementaire des insectes artificiellement infectés par des bactéries *Wolbachia* dans l'Union européenne[84], le CS estime qu'une évaluation selon des critères adaptés de la directive 2001/18/CE pourrait être réalisée de façon pertinente.

[83] Selon la directive 2001/18/CE, les moustiques relâchés dans le cadre d'une stratégie de TIS classique sont stériles, et en tant que tels, ils ne correspondent pas à la définition réglementaire d'un organisme et donc d'un OGM. Quant aux éventuels moustiques irradiés qui auraient conservé leur fertilité, ils sont considérés OGM car leur matériel génétique a été modifié d'une manière qui ne s'effectue pas naturellement par multiplication et/ou par recombinaison naturelle ; ils sont cependant exemptés de l'application de la directive en tant que produits de mutagenèse qui n'ont pas impliqué l'utilisation de molécules d'acide nucléique recombinant.

[84] Le HCB a interrogé la Commission européenne sur le sujet dans un courrier datant du 2 juin 2016.

6. Intérêts et limites de l'utilisation des moustiques génétiquement modifiés en France

La question n° 4 de la saisine demande d' « indiquer quels pourraient être les bénéfices et les risques de l'utilisation des moustiques GM pour la France, y compris les DROM-COM, notamment d'un point de vue socio-économique et éthique ». Le CS se propose de souligner ici les intérêts et les limites de l'utilisation des moustiques GM concernant les aspects scientifiques et techniques.

L'analyse des spécificités des techniques utilisant les moustiques GM par rapport aux autres techniques de lutte antivectorielle (chapitre 4) permet d'en identifier les intérêts et limites, en termes d'objectifs visés, de potentiel d'efficacité et de durabilité, de contraintes techniques et de risques pour l'environnement et la santé. Plutôt que de reprendre l'analyse exhaustive des caractéristiques développées dans les chapitres précédents, on en soulignera ici les points saillants.

6.1. Intérêts et limites de la technique RIDL d'Oxitec

On rappelle que le HCB n'a pas été formellement saisi d'une évaluation des risques associés à la dissémination volontaire de moustiques RIDL. Aucun dossier ne lui a été soumis. Les éléments développés ici sont d'ordre indicatif et général.

La technique RIDL est une variante de la technique de l'insecte stérile classique visant la réduction ou l'élimination locale d'une population de moustiques. Les intérêts et limites de la technique sont discutés relativement aux caractéristiques des techniques permettant d'atteindre les mêmes objectifs, incluant des techniques existantes de lutte antivectorielle et d'autres techniques émergentes impliquant des lâchers de moustiques stériles ou stérilisants sans propriété de forçage génétique, à savoir les techniques TIS et TII.

La technique RIDL est basée sur des lâchers de moustiques d'une lignée transgénique stable et bien caractérisée, avec un mécanisme de létalité dominante induite bien défini. Pour comparaison, la technique TIS est basée sur des lâchers d'une diversité de moustiques stérilisés par irradiation ; la technique TII est basée sur des lâchers de moustiques de lignées transinfectées avec *Wolbachia,* stérilisants du fait de la propriété d'incompatibilité cytoplasmique conférée par la bactérie.

Pertinence de l'objectif visé pour les territoires français

La lignée OX513A, seule lignée développée aujourd'hui à un niveau opérationnel en application à la technique RIDL d'Oxitec, est une lignée d'*Ae. aegypti*, vecteur de nombreux arbovirus dont les virus de la dengue, chikungunya, Zika et la fièvre jaune. Cette espèce de moustiques n'est pas présente en métropole. Les territoires français qui pourraient bénéficier d'une lutte antivectorielle contre *Ae. aegypti* sont les Antilles françaises, la Guyane française, la Nouvelle Calédonie, la Polynésie française et Wallis-et-Futuna (en vecteur secondaire à *Ae. polynesiensis*), ainsi que Mayotte et La Réunion. La présence concomitante d'*Ae. albopictus* sur ces deux derniers territoires incite toutefois à s'assurer de pouvoir mettre en œuvre, simultanément à la lutte ciblée contre *Ae. aegypti*, un moyen de lutte aussi efficace contre *Ae. albopictus*, pour éviter le remplacement d'*Ae. aegypti* par *Ae. albopictus*. L'hypothèse du remplacement d'*Ae. aegypti* par *Ae. polynesiensis* pourrait aussi être considérée en amont d'une application de la technique RIDL en Polynésie française ou à Wallis-et-Futuna.

Pour comparaison, la technique TIS n'est pas limitée par une lignée spécifique d'une espèce donnée de moustiques. Elle pourrait théoriquement être mise en œuvre pour toute espèce de moustiques locaux, incluant les moustiques d'*Ae. albopictus* présents sur le territoire métropolitain, ou des anophèles vecteurs de paludisme et de filaires présents sur certains territoires d'outre-mer comme Mayotte. Concernant la technique TII, des lignées de moustiques transinfectées avec différentes souches de *Wolbachia* ont été développées pour *Ae. aegypti*, mais également *Ae. albopictus* et *Ae. polynesiensis*, avec notamment des essais prometteurs réalisés sur *Ae. polynesiensis* en Polynésie française.

Aptitudes de la technique et conséquences

La technique RIDL, comme les techniques TIS et TII, peut viser deux objectifs différents : un objectif de réduction de la densité d'une population de vecteurs, et un objectif d'élimination d'une population de vecteurs. Si le premier objectif peut être réalisé par des techniques existantes, ce n'est pas le cas du second. En matière de lutte contre les maladies vectorielles, l'élimination peut être préférable en ce qu'elle est plus durable, selon l'isolement de la zone d'intervention. Elle engendrera toutefois un risque éventuellement plus important pour l'environnement, selon le rôle de l'espèce ciblée dans l'écosystème. Le risque de remplacement non intentionnel par un autre vecteur sera accru. Les populations de la région traitée pourraient devenir plus sensibles à de nouvelles épidémies suite à une perte d'immunité, risque qui serait toutefois à considérer à l'aune du bénéfice obtenu par la disparition de la maladie pour un temps.

Spécificité d'action et conséquences en termes de risques et d'efficacité de la lutte antivectorielle

La technique RIDL, comme les techniques TIS et TII et toutes les techniques qui fonctionnent par le biais d'un accouplement entre moustiques relâchés et moustiques cibles sauvages, a une spécificité d'action directe qui ne dépasse pas l'espèce concernée et d'éventuelles espèces interfertiles. *Ae. aegypti* se caractérise par une forte barrière reproductive. Aucune autre espèce de moustiques n'est connue pour être sexuellement compatible avec elle. La lignée RIDL OX513A ciblera donc spécifiquement la réduction ou l'élimination des populations de moustiques *Ae. aegypti*, sans impact direct sur d'autres organismes de l'environnement ou sur la santé humaine. Ceci est à mettre en regard de l'impact variable, mais généralement plus important, des autres techniques de lutte sur l'environnement et la santé. Par exemple, la deltaméthrine, qui est l'insecticide adulticide le plus utilisé pour lutter contre les moustiques en France, a un mode d'action non sélectif. Elle présente une toxicité très élevée pour les organismes aquatiques ainsi que les abeilles et les pollinisateurs, ce qui conduit à de fortes restrictions et précautions d'utilisation.

Toutefois, si la spécificité d'action d'une technique de lutte antivectorielle permet de réduire son impact sur l'environnement, elle ne va pas nécessairement dans le sens de l'efficacité de la lutte vis-à-vis d'une maladie : une trop grande spécificité peut être préjudiciable à l'efficacité de la lutte vis-à-vis d'une maladie. En l'occurrence, de nombreux virus transmis par *Ae. aegypti* le sont également par *Ae. albopictus* et *Ae. polynesiensis*. Dans les régions où ces espèces coexistent, une lutte par lâcher de moustiques *Ae. aegypti* préservera les moustiques *Ae. albopictus* et *Ae. polynesiensis*. Une technique supplémentaire, ciblant *Ae. albopictus* ou *Ae. polynesiensis*, devra donc lui être associée.

Persistance et caractère envahissant

Le transgène des moustiques OX513A ne persiste pas dans l'environnement du fait de la létalité qu'il induit dans la descendance des mâles relâchés. Les individus transgéniques faiblement disséminés du fait de la pénétrance incomplète du trait sont bien caractérisés et n'entraînent pas de persistance du transgène à terme. Pour comparaison, dans le cadre de la TIS, les mutations ne persistent pas dans l'environnement du fait de la stérilité des moustiques relâchés. Les mutations aléatoires propagées en cas de fertilité résiduelle d'individus irradiés sont inconnues ; un risque associé à leur ségrégation dans la population est toutefois peu probable. Dans le cadre de la TII, *Wolbachia* ne peut se répandre dans la population à partir des mâles relâchés, même en cas de fertilité résiduelle dûe à une éventuelle IC incomplète, à moins d'un lâcher accidentel de femelles.

Durabilité, pertes d'efficacité et risques associés

Alors que le risque de perte d'efficacité par développement de résistance au mode d'action des techniques est commun chez certains biocides et en constitue l'une des limites majeures, il est improbable chez les moustiques RIDL, comme chez les techniques TIS et TII, car leurs modes d'action respectifs n'impliquent pas de cible génétique. Ceci pourrait conférer un avantage significatif en termes de durabilité de ces techniques émergentes.

Un développement de résistance comportementale des moustiques cibles sauvages contre les moustiques RIDL est toutefois concevable du fait de l'utilisation d'une lignée unique sur les différents sites d'intervention, même quand ils sont éloignés du lieu d'origine du fond génétique de la lignée. Si le développement d'une telle résistance pourrait compromettre l'efficacité de la technique RIDL dans une région donnée, il ne serait *a priori* pas associé à un risque pour l'environnement ou la santé.

Pour comparaison, les moustiques porteurs de *Wolbachia* utilisés dans la technique TII pourraient également faire l'objet de résistance comportementale. Un tel développement de résistance serait improbable contre les moustiques irradiés utilisés dans la technique TIS.

Enfin, la technique RIDL pourrait perdre sa fonctionnalité en cas de dérive génétique de *tTAV*. La fonctionnalité de tTAV fait l'objet de surveillance, une inactivation serait rapidement corrigeable dans le temps. Sur le terrain, la perte de fonction de *tTAV* conduirait à la survie de la descendance des moustiques mâles RIDL relâchés. Si aucun risque ne semble *a priori* associé à une éventuelle dissémination des gènes du patrimoine génétique de la souche d'élevage de RIDL et de cette cassette dans l'environnement, une évaluation appropriée des risques associés (compétence vectorielle, avantage sélectif, toxicité…) devra être faite sur la base des informations du dossier du pétitionnaire.

La technique TII pourrait également perdre sa fonctionnalité en cas de lâcher important de femelles. Aucun mécanisme biologique de perte de fonctionnalité n'a été identifié concernant la technique TIS.

Technique auto-limitée et conséquences

La technique RIDL, comme les techniques TIS et TII ainsi que de nombreuses techniques existantes de lutte, comme les biocides, est une technique dite auto-limitée, en ce que ses effets sont limités dans l'espace et le temps à moins d'être entretenue. De ce fait, la technique RIDL présente l'avantage d'être maîtrisable et adaptable selon les résultats de surveillance. A l'inverse, elle sera très lourde à maintenir sur le long terme. On note qu'elle sera plus coûteuse dans le cadre d'une stratégie de réduction de population que dans le cadre d'une stratégie d'élimination de population, qui bénéficierait d'une mise en œuvre plus limitée dans le temps.

Suivi - surveillance

En termes de surveillance, les moustiques RIDL portent un marqueur fluorescent associé à la cassette génétique de létalité conditionnelle, ce qui permet un suivi efficace des moustiques transgéniques dans l'environnement et donne des possibilités d'adapter la mise en œuvre de la technique. Ce dispositif de surveillance est plus efficace que celui des moustiques TIS, qui peuvent être couverts de poudre fluorescente à la sortie de l'élevage. Si le marquage des moustiques TIS permet également de les suivre et d'en moduler les lâchers en conséquence, il ne permet pas de détecter leur éventuelle descendance en cas de fertilité résiduelle, ni de distinguer les œufs descendant des moustiques TIS pour mesurer l'efficacité de la technique. Un marqueur moléculaire spécifique à *Wolbachia* peut être utilisé pour la TII.

Prescriptions / restrictions d'utilisation

La technique RIDL, comme les techniques TIS et TII, nécessite plusieurs mois pour réduire voire éliminer une population de moustiques, cette durée variant selon de nombreux paramètres comme la zone ciblée, la densité initiale de moustiques cibles, le nombre de moustiques relâchés, l'isolement, etc.. Par ailleurs, ces techniques ne sont pas efficaces à fortes densités de population de moustiques ciblés. Elles nécessitent la réduction préalable de la densité des moustiques par l'application des techniques classiques de lutte, réputées efficaces à fortes densités.

Ainsi, la technique RIDL, comme les autres techniques basées sur des lâchers de moustiques, ne peut être envisagée comme solution rapide à une situation de crise ou comme solution première face à une population de moustiques de forte densité. Elle devra être intégrée à une gestion utilisant différentes combinaisons de techniques sur la durée.

Contraintes techniques et logistiques

D'importantes contraintes techniques d'infrastructures et de logistique sont associées aux élevages et aux lâchers de moustiques pour l'application de la technique RIDL, comme pour la TIS et la TII. Appliquées à des fins de réduction de population, ces techniques nécessitent des élevages de masse fonctionnels et stables sur la durée pour assurer des lâchers inondatifs et récurrents (ceci serait à nuancer quand ces mêmes techniques sont utilisées à des fins d'élimination). La qualité des conditions d'élevage est primordiale pour assurer une bonne compétitivité des moustiques relâchés. Les techniques de sexage, indispensables pour éviter de relâcher des moustiques femelles (piqueuses, vectrices, mais sans possibilité de descendance) représentent un verrou technologique majeur associé aux lâchers de moustiques. Enfin, le contrôle de la qualité du sang utilisé pour nourrir les femelles d'élevage est essentiel en termes de prévention de risques, de façon à éviter tout risque d'introduction de pathogènes dans l'environnement en cas de lâcher accidentel de femelles.

Risques associés à un lâcher accidentel de femelles

Les femelles RIDL sont piqueuses, vectrices mais ne peuvent avoir de descendance viable. Un lâcher accidentel de femelles pourrait entraîner un risque d'introduction de pathogènes dans l'environnement, risque évitable par le contrôle qualité du sang fourni à l'élevage.

Pour comparaison, les femelles TIS sont également piqueuses, vectrices et stériles. Les femelles TII sont piqueuses, moins vectrices que la TIS en cas d'IP, et fertiles (mais stériles avec les mâles sauvages en cas d'IC bi-directionnelle ou entièrement stériles en combinaison avec la TIS (TII-TIS, c.-à-d. la TII associée à de faibles doses d'irradiation stérilisantes), qui est l'approche préconisée par l'AIEA en l'absence d'une technique parfaite de sexage). Un lâcher de femelles fertiles dans le cadre de la TII pourrait de surcroît compromettre la stratégie de lutte.

Efficacité entomologique vs épidémiologique

L'intérêt pour la technique RIDL est fondé sur la preuve de son efficacité, locale et ponctuelle, sur la réduction de populations de moustiques de terrain. L'efficacité de la technique sur la transmission de maladies vectorisées par ces moustiques, comme la dengue, Zika ou chikungunya, n'est pas encore avérée. C'est également le cas pour la TIS et la TII, à un stade moins avancé de développement.

Stade de développement

La technique RIDL a fait l'objet d'expérimentation de phase III et est en cours d'expérimentation de phase IV. Les résultats de cette expérimentation de plus grande échelle seront critiques pour tester la faisabilité de l'approche RIDL en conditions réelles. Pour comparaison, la TII a fait l'objet d'essais prometteurs à petite échelle, la TIS est moins avancée en termes de démonstration de réduction de populations de moustiques sur le terrain mais de nombreuses expérimentations sont projetées.

Les intérêts et limites notables de la technique RIDL découlant de cette analyse sont résumés dans l'encadré ci-après.

En conclusion, les techniques RIDL, TIS et TII sont des techniques voisines qui pourraient utilement être testées, de manière précautionneuse et étape par étape, dans l'objectif de contribuer à la lutte antivectorielle sur les territoires français, selon les vecteurs considérés, en combinaison avec les techniques classiques actuellement utilisées. Elles permettraient notamment de réduire l'utilisation des insecticides. Outre une réduction des risques d'exposition pour l'Homme et l'environnement, une moindre utilisation d'insecticides au profit de la mise en œuvre de techniques basées sur des lâchers de moustiques préserverait leur efficacité en diminuant la pression de sélection de résistances associées. Cela permettrait aussi de réserver l'utilisation des insecticides à des cas spécifiques d'urgence sanitaire et d'épidémie. La technique RIDL est la plus avancée mais ne permet pas à ce jour de lutter contre d'autres vecteurs qu'*Ae. aegypti*, pour lesquels la technique TIS et la technique TII, éventuellement associée à des doses d'irradiation stérilisantes, pourraient être envisagées.

Intérêts et limites de la technique RIDL sur l'exemple de la lignée OX513A[85]

Intérêts notables :

communs à RIDL TIS TII (techniques de l'insecte stérile/stérilisant) par rapport aux techniques classiques :

- Impact direct minimal sur l'environnement et la santé (du fait de la spécificité d'action)
- Impact indirect sur la chaîne trophique réduit par rapport à l'utilisation de biocides (l'espèce spécifiquement visée, *Ae. aegypti*, étant invasive et urbaine, inféodée à des gîtes artificiels)
- Objectif visé : réduction, mais aussi élimination possible en situation isolée
- Durabilité : développement de résistance au mode d'action de la technique improbable (mais autres mécanismes de pertes d'efficacité possibles pour RIDL et TII, voir limites)

commun à RIDL TIS TII et FG à des fins d'élimination (techniques de réduction basées sur des lâchers de moustiques) par rapport aux techniques de modification :

- Absence de persistance et de caractère envahissant (à part, pour RIDL TIS et TII, une faible proportion de dissémination associée à une possible fertilité résiduelle, sans conséquences significatives)

commun à RIDL TIS TII et la plupart des techniques classiques (techniques auto-limitées) par rapport aux techniques auto-entretenues (FG) :

- Maîtrisable et adaptable

spécifique à RIDL :

- Suivi par un marqueur moléculaire fluorescent (TII : marqueur moléculaire associé à *Wolbachia* ; TIS : poudre fluorescente)

Limites notables :

communes à RIDL TIS TII par rapport aux techniques classiques :

- Pas utilisable à fortes densités de populations de moustiques cibles
- Pas utilisable en urgence sanitaire
- Risque de remplacement non intentionnel de vecteur
- Nécessité de prévoir autant d'interventions que de vecteurs (du fait de la spécificité d'action)
- Besoin de grosses infrastructures et maintenance contraignante sur le long terme (techniques auto-limitées, à opposer au FG, technique auto-entretenue)
- (Plus efficace et plus durable en situation d'isolement de la population de moustiques ciblés)

communes à RIDL et TII :

- Risque de développement de résistance comportementale (perte d'efficacité, mais pas associé à un risque pour l'environnement) concevable pour RIDL et TII, peu probable pour la TIS
- Risque de dérive fonctionnelle possible pour RIDL (inactivation de la tTAV, perte d'efficacité rapidement détectable et corrigeable, *a priori* pas associé à un risque mais souche à évaluer en cas de dissémination). Risque aussi possible pour TII (lâcher accidentel de femelles) mais improbable pour TIS (à moins d'un problème avec la source d'irradiation)

Limites liées au stade d'avancement des techniques :

communes à RIDL TIS TII :

- Efficacité entomologique avérée seulement sur le court terme et à petite échelle
- Efficacité épidémiologique non encore avérée
- Technique de sexage à améliorer

[85] Les risques associés aux nouveaux produits résultant de l'expression des transgènes seront à analyser sur la base d'un dossier de demande d'autorisation de dissémination. En l'absence de données spécifiques, le CS du HCB n'a pas considéré ce point dans cette analyse.

6.2. Intérêts et limites du forçage génétique à des fins d'élimination de population

Les intérêts et limites du forçage génétique à des fins d'élimination de population sont discutés sur la base de l'exemple présenté dans la section 3.3. et évalué dans le chapitre 4. Cet exemple, développé chez l'espèce de moustique *An. gambiae*, principal vecteur du *Plasmodium* responsable du paludisme en Afrique subsaharienne, est encore à un stade de recherche, mais a vocation à être appliqué. D'autres vecteurs pourront être ciblés par la même technique à l'avenir.

Cette technique n'a pas d'équivalent à ce jour ; elle s'apparente à une variante auto-entretenue des techniques de l'insecte stérile. Son originalité provient de son aptitude à propager une stérilité dans une population de moustiques cibles à partir d'un nombre réduit de lâchers de mâles stérilisants.

Pertinence de l'objectif visé pour les territoires français

L'espèce visée par l'application en cours de développement, *An. gambiae*, est présente sur un seul territoire français, Mayotte, où elle est vectrice de *Plasmodium* et de filaires. L'espèce de moustique *An. arabiensis*, encore présente à La Réunion à un niveau résiduel, pourrait également être ciblée par un lâcher de moustiques *An. gambiae* du fait de leur interfertilité ; le paludisme et la filariose lymphatique n'y ont toutefois plus été décrits depuis les années 1970s. La Guyane française est encore touchée par le paludisme (*P. vivax*), mais l'espèce vectrice, *An. darlingi*, n'est pas sexuellement compatible avec *An. gambiae*.

Aptitudes de la technique

De par son mécanisme invasif, la technique de forçage génétique a le potentiel théorique d'éradiquer une espèce. Son utilisation dans un contexte isolé pourrait limiter l'élimination à une population locale. A ce stade de développement technique, il est toutefois prévisible que la propagation de la stérilité serait limitée par le développement de résistances dans la population cible, ce qui conduirait à une simple réduction transitoire de population. Les conséquences d'une réduction ou d'une élimination relatives au rôle qu'occupe l'espèce dans l'écosystème et à son remplacement éventuel, sont les mêmes que celles décrites pour RIDL, TIS et TII. Le forçage génétique pose en plus la question des conséquences d'une possible éradication d'une espèce, à évaluer à un niveau global.

Les intérêts et les limites de l'approche de forçage génétique à des fins d'élimination ont pu être identifiés sur la base de l'analyse développée dans les chapitres précédents.

Les intérêts incluent :

- une élimination théoriquement illimitée des moustiques vecteurs de la même espèce,
- la possibilité de traiter une zone à grande échelle à partir d'un nombre réduit de lâchers,
- l'absence de besoin de maintenance et de grosses infrastructures d'élevage,
- la durabilité (à nuancer selon le développement de résistances),
- la spécificité d'action, limitée à l'espèce ciblée, ce qui réduit les risques sur les organismes non cibles et la santé,
- la possibilité de suivi par un marqueur moléculaire.

Les limites incluent :

- le manque de flexibilité et de possibilité de contrôle,
- le développement de résistances, prévisible au stade actuel de développement des techniques,
- la possibilité de transfert d'une cassette de forçage génétique et ses conséquences,

- l'impact de l'élimination de populations de moustiques de l'espèce ciblée sur la chaîne trophique, en particulier pour une espèce endémique en milieu naturel,
- la possibilité d'un remplacement de l'espèce ciblée par une autre espèce vectrice,
- la question de la perte de l'immunité des populations de la région traitée,
- l'incapacité à répondre à une situation de crise sanitaire du fait de la durée nécessaire pour atteindre un seuil d'élimination de moustiques apte à réduire la transmission de la maladie,
- l'incertitude associée à l'évolution du mécanisme de forçage génétique sur le terrain.

6.3. Intérêts et limites du forçage génétique à des fins de modification de population

Les intérêts et limites du forçage génétique à des fins de modification de population sont discutés sur la base de l'exemple présenté dans la section 3.4. et évalué dans le chapitre 4. Cet exemple est développé à un stade de recherche, chez le moustique *An. stephensi*, principal vecteur du *Plasmodium* responsable du paludisme en Asie. D'autres vecteurs pourront être ciblés par la même technique à l'avenir.

A la différence des techniques précédentes, celle-ci permet de réduire la compétence vectorielle des moustiques, sans affecter la densité de la population. La technique de propagation de l'IP *via Wolbachia* vise le même objectif et a déjà fait l'objet d'expérimentations de terrain.

Pertinence de l'objectif visé pour les territoires français

L'espèce visée par l'exemple de forçage génétique en cours de développement, *An. stephensi*, n'est présente sur aucun territoire français. Les expérimentations de propagation de l'IP *via Wolbachia* visent les moustiques *Ae. aegypti*. Les territoires français qui pourraient en bénéficier sont les mêmes que ceux concernés par la lignée OX513A de la technique RIDL (voir 6.1.).

Aptitudes de la technique

Dans cet exemple, la technique de forçage génétique permet de propager, dans la population ciblée, une résistance à la transmission du pathogène, par le biais d'un transgène qui empêche le pathogène de se développer au sein du moustique.

Les intérêts et les limites de l'approche de forçage génétique à des fins de modification ont pu être identifiés sur la base de l'analyse développée dans les chapitres précédents.

Les intérêts incluent :

- la propagation dans la population cible d'un facteur héritable permettant de réduire la compétence vectorielle des moustiques,
- l'absence d'impact, *a priori*, sur la densité de la population des moustiques cibles, ce qui réduit le risque d'impact sur la chaîne trophique,
- la possibilité de traiter une zone à grande échelle à partir d'un nombre réduit de lâchers,
- l'absence de nécessité de maintenance et de grosses infrastructures d'élevage,
- la durabilité (à nuancer selon le développement de résistances),
- la spécificité d'action, limitée à l'espèce ciblée, ce qui réduit les risques sur les organismes non cibles et la santé,
- la possibilité de suivi par un marqueur moléculaire,
- l'absence de persistance du transgène dans l'environnement.

Les limites incluent :

- le manque de flexibilité et de possibilité de contrôle,
- le développement de résistances à la propagation du transgène, prévisible au stade actuel de développement des techniques,
- l'impact d'une pression de sélection sur les pathogènes,
- la question de la persistance du transgène dans l'environnement,
- la possibilité de transfert d'une cassette de forçage génétique et ses conséquences,
- la question de la perte de l'immunité des populations de la région traitée,
- l'incapacité à répondre à une situation de crise sanitaire du fait de la durée nécessaire pour rendre la population résistante à la transmission de la maladie,
- l'incertitude associée à l'évolution du mécanisme de forçage génétique sur le terrain.

Les deux approches de forçage génétique discutées dans cet avis font toujours l'objet de développements. Ils visent, notamment, à réduire l'évolution de résistances au forçage génétique, à élaborer un mécanisme de forçage génétique dont la propagation serait limitée, et à concevoir des outils capables de contrecarrer un forçage génétique existant. Par ailleurs, des recherches sont en cours sur les modalités d'évaluation des effets sur le long terme du forçage génétique sur les écosystèmes. A ce jour, il est prématuré d'envisager une application de forçage génétique sur le terrain.

Concernant l'objectif de modification de population, l'approche alternative exploitant la propagation de l'IP *via Wolbachia* est déjà expérimentée sur le terrain quand bien même les mécanismes d'IP restent mal compris.

6.4. Nécessité d'une gestion intégrée des vecteurs

Il existe ainsi de nombreuses techniques de lutte dont le choix devrait être guidé en fonction de critères liés à l'efficacité recherchée sur les composantes de la capacité vectorielle, à la biologie des vecteurs et à leur comportement, au contexte épidémiologique (transmission saisonnière, prolongée ou situation épidémique), environnemental et socio-économique, incluant les ressources humaines et financières disponibles. De plus, ces méthodes doivent être acceptées par la communauté pour que les mesures soient mises en œuvre le plus efficacement possible. Elles doivent également avoir un impact minimal sur l'environnement, ce qui peut se traduire dans l'acceptabilité mais aussi dans les modalités de mise en œuvre (co-conception des innovations avec les bénéficiaires).

L'OMS propose une stratégie de gestion intégrée des vecteurs, définie comme « un processus rationnel de prise de décisions dans la perspective d'une utilisation optimale des ressources affectées au contrôle des vecteurs » (WHO, 2012). Son objectif est d'améliorer l'efficacité et l'efficience des interventions des programmes nationaux de contrôle des vecteurs tout en limitant l'impact écologique et en réduisant, autant que possible, le recours aux insecticides. Elle prend en compte le fait que dans une même région, un même vecteur peut transmettre plusieurs agents pathogènes ou qu'une même méthode de lutte peut contrôler plusieurs vecteurs transmettant des pathogènes différents. Le choix raisonné d'un nombre limité d'interventions permet ainsi de lutter dans certains cas contre plusieurs maladies à la fois. La gestion intégrée des vecteurs repose sur 5 éléments clés : (1) une forte collaboration intra secteur de la santé et intersectorielle, (2) une approche intégrée du contrôle des maladies à transmission vectorielle, (3) des prises de décisions basées sur des éléments concrets, (4) une sensibilisation, une mobilisation sociale, et un cadre législatif, ainsi que (5) un renforcement des capacités (voir Rapport du GT, chapitre 5).

L'ensemble des techniques de lutte antivectorielle pourra donc être considéré dans le cadre de la gestion intégrée des vecteurs, et la décision d'appliquer une technique plutôt qu'une autre ou d'en combiner certaines pourra être déterminée selon des critères précis (WHO, 2012). Les différentes situations et systèmes vectoriels rencontrés sur les territoires français devraient être caractérisés selon ces critères, lesquels devront tenir compte de la distinction entre situations d'anticipation ou de réaction à une urgence sanitaire. La réflexion devra être complétée par la prise en compte d'éléments socio-économiques et éthiques (voir recommandation du CEES).

Par cet éclairage sur les techniques de lutte antivectorielle utilisant des moustiques génétiquement modifiés et d'autres techniques émergentes basées sur des lâchers de moustiques, cet avis devrait permettre d'enrichir les options à disposition des pouvoirs publics dans leur approche intégrée de la lutte antivectorielle. L'intégration pratique de ces options à la palette d'outils de lutte actuellement utilisés, selon les contextes particuliers des différents territoires français, devrait mobiliser des connaissances complémentaires à l'expertise du HCB.

Les techniques développées dans le cadre de la lutte antivectorielle ciblant les moustiques pourront être considérées contre d'autres vecteurs d'agents pathogènes responsables de maladies qui ont un impact significatif en santé humaine et animale. En santé végétale, la lutte contre les vecteurs de maladies ou les ravageurs de cultures pourrait également bénéficier d'approches comparables.

7. Bibliographie

Adam, Y., Cecchi, G., Kgori, P.M., Marcotty, T., Mahama, C.I., Abavana, M., Anderson, B., Paone, M., Mattioli, R., and Bouyer, J. (2013). The sequential aerosol technique: A major component in an integrated strategy of intervention against riverine tsetse in Ghana. Plos Neglected Tropical Diseases *7*.

Adamou, A., Dao, A., Timbine, S., Kassogue, Y., Yaro, A.S., Diallo, M., Traore, S.F., Huestis, D.L., and Lehmann, T. (2011). The contribution of aestivating mosquitoes to the persistence of *Anopheles gambiae* in the Sahel. Malaria journal *10*.

Adelman, Z.N., and Tu, Z.J. (2016). Control of mosquito-borne infectious diseases: sex and gene drive. Trends Parasitol *32*, 219-229.

Afsset (2007a). Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail relatif à l'évaluation comparée des risques et de l'efficacité des produits de lutte antivectorielle adulticide dans le cadre de la lutte contre l'épidémie de Chikungunya. Saisine Afsset n° 2006/002 (Afsset).

Afsset (2007b). Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail relatif à l'évaluation comparée des risques et de l'efficacité des produits de lutte antivectorielle larvicide dans le cadre de la lutte contre l'épidémie de Chikungunya. Saisine Afsset n° 2006/008 (Afsset).

Ageep, T.B., Damiens, D., Alsharif, B., Ahmed, A., Salih, E.H.O., Ahmed, F.T.A., Diabate, A., Lees, R.S., Gilles, J.R.L., and El Sayed, B.B. (2014). Participation of irradiated *Anopheles arabiensis* males in swarms following field release in Sudan. Malaria journal *13*.

Akbari, O.S., Bellen, H.J., Bier, E., Bullock, S.L., Burt, A., Church, G.M., Cook, K.R., Duchek, P., Edwards, O.R., Esvelt, K.M.*, et al.* (2015). Safeguarding gene drive experiments in the laboratory. Science *349*, 927-929.

Aliota, M.T., Peinado, S.A., Velez, I.D., and Osorio, J.E. (2016). The *w*Mel strain of *Wolbachia* reduces transmission of Zika virus by *Aedes aegypti*. Scientific Reports *6*.

Allen, M.L., and Christensen, B.M. (2004). Flight muscle-specific expression of *act88F*: GFP in transgenic *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera : Culicidae). Parasitol Int *53*, 307-314.

Allen, M.L., O'Brochta, D.A., Atkinson, P.W., and Levesque, C.S. (2001). Stable, germ-line transformation of *Culex quinquefasciatus* (Diptera : Culicidae). J Med Entomol *38*, 701-710.

Alout, H., Ndam, N.T., Sandeu, M.M., Djegbe, I., Chandre, F., Dabire, R.K., Djogbenou, L.S., Corbel, V., and Cohuet, A. (2013). Insecticide resistance alleles affect vector competence of *Anopheles gambiae s.s*. for *Plasmodium falciparum* field isolates. PLoS One *8*.

Alphey, L. (2014). Genetic control of mosquitoes. Annu Rev Entomol *59*, 205-224.

Anonymous (1997). The feasibility of eradicating *Aedes aegypti* in the Americas. Rev Panam Salud Publica *1*.

Anses (2011). Avis relatif à la recherche d'insecticides potentiellement utilisables en lutte antivectorielle. Saisine n° 2009-SA-0338. Rapport d'expertise collective (Maisons-Alfort, Anses).

Anses (2013). Avis relatif à la recherche d'insecticides potentiellement utilisables en lutte antivectorielle (Classement des 32 substances actives sélectionnées par l'analyse multicritère SIRIS en trois classes selon le niveau de connaissances sur leur efficacité contre les moustiques). Saisine n° 2012-SA-0028 (Maisons-Alfort, Anses).

Anses (2016). Avis relatif à l'actualisation de substances actives et produits biocides potentiellement intéressants pour une utilisation en lutte anti-vectorielle (LAV). Saisine n° 2015-SA-0169 (Maisons-Alfort, Anses).

Arunachalam, N., and Curtis, C.F. (1985). Integration of radiation with cytoplasmic incompatibility for genetic-control in the *Culex pipiens* complex (Diptera: Culicidae). J Med Entomol *22*, 648-653.

Atyame, C.M., Cattel, J., Lebon, C., Flores, O., Dehecq, J.S., Weill, M., Gouagna, L.C., and Tortosa, P. (2015). *Wolbachia*-based population control strategy targeting *Culex quinquefasciatus* mosquitoes proves efficient under semi-field conditions. PLoS One *10*.

Atyame, C.M., Labbe, P., Dumas, E., Milesi, P., Charlat, S., Fort, P., and Weill, M. (2014). *Wolbachia* divergence and the evolution of cytoplasmic incompatibility in *Culex pipiens*. PLoS One *9*.

Atyame, C.M., Pasteur, N., Dumas, E., Tortosa, P., Tantely, M.L., Pocquet, N., Licciardi, S., Bheecarry, A., Zumbo, B., Weill, M*., et al.* (2011). Cytoplasmic incompatibility as a means of controlling *Culex pipiens quinquefasciatus* mosquito in the islands of the South-Western Indian Ocean. Plos Neglected Tropical Diseases *5*.

Bagny, L. (2009). Caractérisation de l'invasion d'Aedes albopictusen présence d'Aedes aegypti à la Réunion et à Mayotte. Thèse de l'Université de La Réunion. Directeur de thèse Serge Quilici et co-directeur de thèse D. Fontenille.

Bagny, L., Delatte, H., Quilici, S., and Fontenille, D. (2009). Progressive decrease in *Aedes aegypti* distribution in Reunion Island since the 1900s. J Med Entomol *46*, 1541-1545.

Baldacchino, F., Caputo, B., Chandre, F., Drago, A., della Torre, A., Montarsi, F., and Rizzoli, A. (2015). Control methods against invasive *Aedes* mosquitoes in Europe: a review. Pest Manage Sci *71*, 1471-1485.

Baldo, L., Hotopp, J.C.D., Jolley, K.A., Bordenstein, S.R., Biber, S.A., Choudhury, R.R., Hayashi, C., Maiden, M.C.J., Tettelin, H., and Werren, J.H. (2006). Multilocus sequence typing system for the endosymbiont *Wolbachia pipientis*. Appl Environ Microbiol *72*, 7098-7110.

Bargielowski, I., Alphey, L., and Koella, J.C. (2011). Cost of mating and insemination capacity of a genetically modified mosquito *Aedes aegypti* OX513A compared to its wild type counterpart. PLoS One *6*.

Baton, L.A., Pacidonio, E.C., Goncalves, D.D., and Moreira, L.A. (2013). *w*Flu: characterization and evaluation of a native *Wolbachia* from the mosquito *Aedes fluviatilis* as a potential vector control agent. PLoS One *8*.

BCH (2012). Biosafety Clearing-House. Secretariat to the Convention on Biological Diversity: Guidance on risk assessment of living modified organisms. Montreal, QC: Available at: http://bch.cbd.int/protocol/guidance_risk_assessment.

Becker, N., Schon, S., Klein, A.M., Ferstl, I., Kizgin, A., Tannich, E., Kuhn, C., Pluskota, B., and Jost, A. (2017). First mass development of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae)-its surveillance and control in Germany. Parasitol Res *116*, 847-858.

Beckmann, J.F., Ronau, J.A., and Hochstrasser, M. (2017). A *Wolbachia* deubiquitylating enzyme induces cytoplasmic incompatibility. Nature microbiology *2*, 17007-17007.

Belfort, M., and Roberts, R.J. (1997). Homing endonucleases: keeping the house in order. Nucleic Acids Res *25*, 3379-3388.

Bellini, R., Medici, A., Puggioli, A., Balestrino, F., and Carrieri, M. (2013). Pilot field trials with *Aedes albopictus* irradiated sterile males in Italian urban areas. J Med Entomol *50*, 317-325.

Ben-Dov, E. (2014). *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and Its dipteran-specific toxins. Toxins *6*, 1222-1243.

Benedict, M.Q., and Robinson, A.S. (2003). The first releases of transgenic mosquitoes: an argument for the sterile insect technique. Trends Parasitol *19*, 349-355.

Bhatt, S., Gething, P.W., Brady, O.J., Messina, J.P., Farlow, A.W., Moyes, C.L., Drake, J.M., Brownstein, J.S., Hoen, A.G., Sankoh, O*., et al.* (2013). The global distribution and burden of dengue. Nature *496*, 504-507.

Bian, G.W., Joshi, D., Dong, Y.M., Lu, P., Zhou, G.L., Pan, X.L., Xu, Y., Dimopoulos, G., and Xi, Z.Y. (2013). *Wolbachia* invades *Anopheles stephensi* populations and induces refractoriness to *Plasmodium* infection. Science *340*, 748-751.

Bischof, J., Maeda, R.K., Hediger, M., Karch, F., and Basler, K. (2007). An optimized transgenesis system for *Drosophila* using germ-line-specific phi C31 integrases. Proc Natl Acad Sci U S A *104*, 3312-3317.

Blanford, S., Chan, B.H.K., Jenkins, N., Sim, D., Turner, R.J., Read, A.F., and Thomas, M.B. (2005). Fungal pathogen reduces potential for malaria transmission. Science *308*, 1638-1641.

Boisvert, J., and Lacoursière, J.O. (2004). Le *Bacillus thuringiensis israelensis* et le contrôle des insectes piqueurs au Québec. Québec, ministère de l'Environnement, Document préparé par l'Université du Québec à Trois Rivières pour le ministère de l'Environnement du Québec, pp. 101.

Boisvert, M., and Boisvert, J. (2000). Effects of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* on target and nontarget organisms: a review of laboratory and field experiments. Biocontrol Sci Technol *10*, 517-561.

Bordenstein, S.R., and Bordenstein, S.R. (2016). Eukaryotic association module in phage WO genomes from *Wolbachia*. Nature Communications *7*.

Bourtzis, K., Dobson, S.L., Xi, Z.Y., Rasgon, J.L., Calvitti, M., Moreira, L.A., Bossin, H.C., Moretti, R., Baton, L.A., Hughes, G.L*., et al.* (2014). Harnessing mosquito-*Wolbachia* symbiosis for vector and disease control. Acta Trop *132*, S150-S163.

Bourtzis, K., Lees, R.S., Hendrichs, J., and Vreysen, M.J.B. (2016). More than one rabbit out of the hat: Radiation, transgenic and symbiont-based approaches for sustainable management of mosquito and tsetse fly populations. Acta Trop *157*, 115-130.

Bouyer, J., Chandre, F., Gilles, J., and Baldet, T. (2016). Alternative vector control methods to manage the Zika virus outbreak: more haste, less speed. Lancet Global Health *4*, E364-E364.

Bouyer, J., and Lefrançois, T. (2014). Boosting the sterile insect technique to control mosquitoes. Trends Parasitol *30*, 271-273.

Bouyer, J., Seck, M.T., Pagabeleguem, S., Sall, A.A., Lo, M., Vreysen, M.J.B., Balenghien, T., and Lancelot, R. (2012). Study of the competitiveness of allochtonous sterile males during the tsetse eradication campaign in Senegal. In 18th Conférence E-sove 2012 (EID, CIRAD, IRD, Montpellier, France.).

Bouyer, J., Seck, M.T., and Sall, B. (2013). Misleading guidance for decision making on tsetse eradication: Response to Shaw et al. (2013). Prev Vet Med *112*, 443-446.

Bowman, L.R., Runge-Ranzinger, S., and McCall, P.J. (2014). Assessing the relationship between vector indices and dengue transmission: A systematic review of the evidence. Plos Neglected Tropical Diseases *8*.

Boyer, S., Toty, C., Jacquet, M., Lemperiere, G., and Fontenille, D. (2012). Evidence of multiple inseminations in the field in *Aedes albopictus*. PLoS One *7*.

Brady, O.J., Gething, P.W., Bhatt, S., Messina, J.P., Brownstein, J.S., Hoen, A.G., Moyes, C.L., Farlow, A.W., Scott, T.W., and Hay, S.I. (2012). Refining the global spatial limits of dengue virus transmission by evidence-based consensus. Plos Neglected Tropical Diseases *6*.

Brelsfoard, C.L., Sechan, Y., and Dobson, S.L. (2008). Interspecific hybridization yields strategy for South Pacific filariasis vector elimination. Plos Neglected Tropical Diseases *2*.

Brelsfoard, C.L., St Clair, W., and Dobson, S.L. (2009). Integration of irradiation with cytoplasmic incompatibility to facilitate a lymphatic filariasis vector elimination approach. Parasites & vectors *2*.

Brownlie, J.C., Cass, B.N., Riegler, M., Witsenburg, J.J., Iturbe-Ormaetxe, I., McGraw, E.A., and O'Neill, S.L. (2009). Evidence for metabolic provisioning by a common invertebrate endosymbiont, *Wolbachia pipientis*, during periods of nutritional stress. PLoS Path *5*.

Bruce-Chwatt, L., and De Zulueta, J. (1980). The rise and fall of malaria in Europe: a historico-epidemiological study. 1st ed. Oxford: Oxford University Press.

Buchatskiĭ, L.P., Kuznetsova, M.A., Lebedinets, N.N., and Kononko, A.G. (1986). Development and basic properties of the viral preparation viroden. Vopr Virusol *32*, 729-733.

Burt, A. (2003). Site-specific selfish genes as tools for the control and genetic engineering of natural populations. Proc Biol Sci *270*, 921-928.

Burt, A., and Trivers, R. (2006). Genes in conflict (Harvard University Press).

Bushland, R.C., Lindquist, A.W., and Knipling, E.F. (1955). Eradication of screw-worms through release of sterilized males. Science *122*, 287-288.

Butail, S., Manoukis, N.C., Diallo, M., Ribeiro, J.M.C., and Paley, D.A. (2013). The dance of male *Anopheles gambiae* in wild mating swarms. J Med Entomol *50*, 552-559.

Calvitti, M., Marini, F., Desiderio, A., Puggioli, A., and Moretti, R. (2015). *Wolbachia* density and cytoplasmic incompatibility in *Aedes albopictus*: Concerns with using artificial *Wolbachia* infection as a vector suppression tool. PLoS One *10*.

Calvitti, M., Moretti, R., Lampazzi, E., Bellini, R., and Dobson, S.L. (2010). Characterization of a new *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae)-*Wolbachia pipientis* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) symbiotic association generated by artificial transfer of the *w*Pip strain from *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). J Med Entomol *47*, 179-187.

Caputo, B., Lenco, A., Cianci, D., Pombi, M., Petrarca, V., Baseggio, A., Devine, G.J., and della Torre, A. (2012). The ''Auto-Dissemination'' Approach: A Novel Concept to Fight *Aedes albopictus* in Urban Areas. PloS Negl Trop Dis *6*, e1793.

Caragata, E.P., Dutra, H.L.C., and Moreira, L.A. (2016). Exploiting intimate relationships: Controlling mosquito-transmitted disease with *Wolbachia*. Trends Parasitol *32*, 207-218.

Carissimo, G., Pondeville, E., McFarlane, M., Dietrich, I., Mitri, C., Bischoff, E., Antoniewski, C., Bourgouin, C., Failloux, A.-B., Kohl, A.*, et al.* (2015). Antiviral immunity of *Anopheles gambiae* is highly compartmentalized, with distinct roles for RNA interference and gut microbiota. Proc Natl Acad Sci U S A *112*, E176-E185.

Carlson, J., Suchman, E., and Buchatsky, L. (2006). Densoviruses for control and genetic manipulation of mosquitoes. In Insect Viruses: Biotechnological Applications, Advances in Virus Research, pp. 361-392.

Carvalho, D.O., McKemey, A.R., Garziera, L., Lacroix, R., Donnelly, C.A., Alphey, L., Malavasi, A., and Capurro, M.L. (2015). Suppression of a field population of *Aedes aegypti* in Brazil by sustained release of transgenic male mosquitoes. PLoS Negl Trop Dis *9*, e0003864.

Carvalho, D.O., Nimmo, D., Naish, N., McKemey, A.R., Gray, P., Wilke, A.B.B., Marrelli, M.T., Virginio, J.F., Alphey, L., and Capurro, M.L. (2014). Mass production of genetically modified *Aedes aegypti* for field releases in Brazil. Jove-Journal of Visualized Experiments.

Catteruccia, F., Nolan, T., Loukeris, T.G., Blass, C., Savakis, C., Kafatos, F.C., and Crisanti, A. (2000). Stable germline transformation of the malaria mosquito *Anopheles stephensi*. Nature *405*, 959-962.

Chandra, G., Bhattacharjee, I., Chatterjee, S.N., and Ghosh, A. (2008). Mosquito control by larvivorous fish. Indian J Med Res *127*, 13-27.

Chandra, G., Ghosh, A., Bhattacharjee, I., and Ghosh, S.K. (2013). Use of larvivorous fish in biological and environmental control of disease vectors. In Biological and environmental control of disease vectors (CAB International, Oxfordshire, UK,), pp. 25-41.

Chen, X.G., Jiang, X.T., Gu, J.B., Xu, M., Wu, Y., Deng, Y.H., Zhang, C., Bonizzoni, M., Dermauw, W., Vontas, J.*, et al.* (2015). Genome sequence of the Asian Tiger mosquito, *Aedes albopictus*, reveals insights into its biology, genetics, and evolution. Proc Natl Acad Sci U S A *112*, E5907-E5915.

Cochran-Stafira, D.L., and von Ende, C.N. (1998). Integrating bacteria into food webs: Studies with *Sarracenia purpurea inquilines*. Ecology *79*, 880-898.

Collins, F.H., and Paskewitz, S.M. (1995). Malaria: current and future prospects for control. Annu Rev Entomol *40*, 195-219.

Concha, C., Palavesam, A., Guerrero, F.D., Sagel, A., Li, F., Osborne, J.A., Hernandez, Y., Pardo, T., Quintero, G., Vasquez, M.*, 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*.

Costantini, C., Li, S.G., Torre, A.D., Sagnon, N.F., Coluzzi, M., and Taylor, C.E. (1996). Density, survival and dispersal of *Anopheles gambiae* complex mosquitoes in a West African Sudan savanna village. Med Vet Entomol *10*, 203-219.

Cross, F.R., Jackson, R.R., and Pollard, S.D. (2009). How blood-derived odor influences mate-choice decisions by a mosquito-eating predator. Proc Natl Acad Sci U S A *106*, 19416-19419.

Culler, L.E., Ayres, M.P., and Virginia, R.A. (2015). In a warmer Arctic, mosquitoes avoid increased mortality from predators by growing faster. Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences *282*.

Culler, L.E., and Lamp, W.O. (2009). Selective predation by larval *Agabus* (Coleoptera: Dytiscidae) on mosquitoes: support for conservation-based mosquito suppression in constructed wetlands. Freshwat Biol *54*, 2003-2014.

Curtis, C.F. (1968). Possible use of translocations to fix desirable genes in insect pest populations. Nature *218*, 368-&.

Damiens, D., Lebon, C., Wilkinson, D.A., Dijoux-Millet, D., Le Goff, G., Bheecarry, A., and Gouagna, L.C. (2016). Cross-mating compatibility and competitiveness among *Aedes albopictus* strains from distinct geographic origins implications for future application of SIT programs in the South West Indian Ocean islands. PLoS One *11*.

De Barro, P.J., Murphy, B., Jansen, C.C., and Murray, J. (2011). The proposed release of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti* containing a naturally occurring strain of *Wolbachia* pipientis, a question of regulatory responsibility. J Verbrauch Lebensm *6*, 33-40.

Delatte, H., Gimonneau, G., Triboire, A., and Fontenille, D. (2009). Influence of temperature on immature development, survival, longevity, fecundity, and gonotrophic cycles of *Aedes albopictus*, vector of chikungunya and dengue in the Indian Ocean. J Med Entomol *46*, 33-41.

DeMaio, J., Pumpuni, C.B., Kent, M., and Beier, J.C. (1996). The midgut bacterial flora of wild *Aedes triseriatus*, *Culex pipiens*, and *Psorophora columbiae* mosquitoes. Am J Trop Med Hyg *54*, 219-223.

Devine, G.J., Perea, E.Z., Killeen, G.F., Stancil, J.D., and Clark, S.J. (2009). Using adult mosquitoes to transfer insecticides to *Aedes aegypti* larval habitats. Proc Natl Acad Sci U S A *106*, 11530-11534.

Dobson, S.L., Bordenstein, S.R., and Rose, R.I. (2016). *Wolbachia* mosquito control: Regulated. Science *352*, 526.

Dodson, B.L., Hughes, G.L., Paul, O., Matacchiero, A.C., Kramer, L.D., and Rasgon, J.L. (2014). *Wolbachia* enhances West Nile virus (WNV) infection in the mosquito *Culex tarsalis*. Plos Neglected Tropical Diseases *8*.

Dowling, Z., Armbruster, P., LaDeau, S.L., DeCotiis, M., Mottley, J., and Leisnham, P.T. (2013). Linking mosquito infestation to resident socioeconomic status, knowledge, and source reduction practices in suburban Washington, DC. EcoHealth *10*, 36-47.

Duchet, C., Franquet, E., Lagadic, L., and Lagneau, C. (2015). Effects of *Bacillus thuringiensis israelensis* and spinosad on adult emergence of the non-biting midges *Polypedilum nubifer* (Skuse) and *Tanytarsus curticornis* Kieffer (Diptera: Chironomidae) in coastal wetlands. Ecotoxicol Environ Saf *115*, 272-278.

Duong, V., Lambrechts, L., Paul, R.E., Ly, S., Lay, R.S., Long, K.C., Huy, R., Tarantola, A., Scott, T.W., Sakuntabhai, A*., et al.* (2015). Asymptomatic humans transmit dengue virus to mosquitoes. Proc Natl Acad Sci U S A *112*, 14688-14693.

Duron, O., Lagnel, J., Raymond, M., Bourtzis, K., Fort, P., and Weill, M. (2005). Transposable element polymorphism of *Wolbachia* in the mosquito *Culex pipiens*: evidence of genetic diversity, superinfection and recombination. Mol Ecol *14*, 1561-1573.

Dutra, H.L.C., dos Santos, L.M.B., Caragata, E.P., Silva, J.B.L., Villela, D.A.M., Maciel-de-Freitas, R., and Moreira, L.A. (2015). From lab to field: The influence of urban landscapes on the invasive potential of *Wolbachia* in Brazilian *Aedes aegypti* mosquitoes. Plos Neglected Tropical Diseases *9*.

Dutra, H.L.C., Rocha, M.N., Dias, F.B.S., Mansur, S.B., Caragata, E.P., and Moreira, L.A. (2016). *Wolbachia* blocks currently circulating Zika virus isolates in Brazilian *Aedes aegypti* mosquitoes. Cell Host & Microbe *19*, 771-774.

Duvallet, G., Boulanger, N., Chandre, F., de Verdiere, N.C., Consigny, P.H., Delaunay, P., Depaquit, J., Doudier, B., Franc, M., Moulin, F.*, et al.* (2011). Personal protection against biting insects and ticks (PPAV working groups). Parasite *18*, 93-109.

Echaubard, P., Duron, O., Agnew, P., Sidobre, C., Noel, V., Weill, M., and Michalakis, Y. (2010). Rapid evolution of *Wolbachia* density in insecticide resistant *Culex pipiens*. Heredity *104*, 15-19.

EFSA (2013). EFSA GMO Panel (EFSA Panel on Genetically Modified Organisms). Guidance on the environmental risk assessment of genetically modified animals. EFSA Journal *11(5): 3200*, 190 pp.

El-Sabaawi, R.W., Frauendorf, T.C., Marques, P.S., Mackenzie, R.A., Manna, L.R., Mazzoni, R., Phillip, D.A.T., Warbanski, M.L., and Zandonà, E. (2016). Biodiversity and ecosystem risks arising from using guppies to control mosquitoes. Biol Lett *12*.

Enkerlin, W., Gutierrez-Ruelas, J.M., Cortes, A.V., Roldan, E.C., Midgarden, D., Lira, E., Lopez, J.L.Z., Hendrichs, J., Liedo, P., and Arriaga, F.J.T. (2015). Area freedom in Mexico from Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae): a review of over 30 years of a successful containment program using an integrated area-wide SIT approach. Fla Entomol *98*, 665-681.

Esvelt, K.M., Smidler, A.L., Catteruccia, F., and Church, G.M. (2014). Concerning RNA-guided gene drives for the alteration of wild populations. eLife, e03401.

Facchinelli, L., Valerio, L., Ramsey, J.M., Gould, F., Walsh, R.K., Bond, G., Robert, M.A., Lloyd, A.L., James, A.A., Alphey, L.*, et al.* (2013). Field cage studies and progressive evaluation of genetically-engineered mosquitoes. Plos Neglected Tropical Diseases *7*.

FAO (2015). NIMP 5 : Glossaire des termes phytosanitaires. In Normes internationales pour les mesures phytosanitaires (Rome, Italie, Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture).

FAO (2016a). ISPM 3 : Guidelines for the export, shipment, import and release of biological control agents and other beneficial organisms. In International standards for phytosanitary measures (Rome, Italy, Food and Agriculture Organization of the United Nations and International Plant Protection Convention), pp. 16.

FAO (2016b). NIMP 3 : Directives pour l'exportation, l'expédition, l'importation et le lâcher d'agents de lutte biologique et autres organismes utiles. In Normes internationales pour les mesures phytosanitaires (Rome, Italie, Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture), pp. 16.

Farajollahi, A., Fonseca, D.M., Kramer, L.D., and Kilpatrick, A.M. (2011). "Bird biting" mosquitoes and human disease: A review of the role of Culex pipiens complex mosquitoes in epidemiology. Infection Genetics and Evolution *11*, 1577-1585.

Farenhorst, M., Mouatcho, J.C., Kikankie, C.K., Brooke, B.D., Hunt, R.H., Thomas, M.B., Koekemoer, L.L., Knols, B.G.J., and Coetzee, M. (2009). Fungal infection counters insecticide resistance in African malaria mosquitoes. Proc Natl Acad Sci U S A *106*, 17443-17447.

Favia, G. (2014). Asaia paratransgenesis in mosquitoes. In Transgenic insects: techniques and applications, M.Q. Benedict, ed. (Wallingford, Oxfordshire, UK, CABI), pp. 227-238.

Feldmann, U., and Hendrichs, J. (2001). Integrating the sterile instect technique as a key component of area-wide tsetse and trypanosomiasis intervention. In PAAT Tecnical and Scientific Series, Number 3 (Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy).

Flores, S., Campos, S., Villaseñor, A., Valle, Á., Enkerlin, W., Toledo, J., Liedo, P., and Montoya, P. (2013). Sterile males of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) as disseminators of *Beauveria bassiana* conidia for IPM strategies. Biocontrol Science and Technology *23*, 1186-1198.

Focks, D.A., Brenner, R.J., Hayes, J., and Daniels, E. (2000). Transmission thresholds for dengue in terms of *Aedes aegypti* pupae per person with discussion of their utility in source reduction efforts. Am J Trop Med Hyg *62*, 11-18.

Fontenille, D., Lagneau, C., Lecollinet, S., Lefait-Robin, R., Setbon, M., Tirel, B., and Yébakima, A. (2009). La lutte antivectorielle en France. Disease vector control in France. Expertise collégiale (Marseille, IRD).

Fossog, B.T., Antonio-Nkondjio, C., Kengne, P., Njiokou, F., Besansky, N.J., and Costantini, C. (2013). Physiological correlates of ecological divergence along an urbanization gradient: differential tolerance to ammonia among molecular forms of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. BMC Ecol *13*.

Foster, G.A., and Walker, E.D. (2002). Mosquitoes (Culicidae). In Med Vet Entomol, G. Mullen, and L. Durden, eds. (Burlington MA., Academic Press), pp. 203-262.

Fraval, A. (2002). Elles aussi, elles aiment les insectes... Les Gambusies. Insectes *125*, 14-16.

Frentiu, F.D., Zakir, T., Walker, T., Popovici, J., Pyke, A.T., van den Hurk, A., McGraw, E.A., and O'Neill, S.L. (2014). Limited dengue virus replication in field-collected *Aedes aegypti* mosquitoes infected with *Wolbachia*. Plos Neglected Tropical Diseases *8*.

Gaio, A.D., Gusmao, D.S., Santos, A.V., Berbert-Molina, M.A., Pimenta, P.F.P., and Lemos, F.J.A. (2011). Contribution of midgut bacteria to blood digestion and egg production in *aedes aegypti* (diptera: culicidae) (L.). Parasites & vectors *4*.

Galizi, R., Doyle, L.A., Menichelli, M., Bernardini, F., Deredec, A., Burt, A., Stoddard, B.L., Windbichler, N., and Crisanti, A. (2014). A synthetic sex ratio distortion system for the control of the human malaria mosquito. Nature Communications *5*.

Gantz, V.M., and Bier, E. (2015). The mutagenic chain reaction: A method for converting heterozygous to homozygous mutations. Science *348*, 442-444.

Gantz, V.M., Jasinskiene, N., Tatarenkova, O., Fazekas, A., Macias, V.M., Bier, E., and James, A.A. (2015). Highly efficient Cas9-mediated gene drive for population modification of the malaria vector mosquito *Anopheles stephensi*. Proc Natl Acad Sci U S A *112*, E6736-E6743.

Gendrin, M., Rodgers, F.H., Yerbanga, R.S., Ouedraogo, J.B., Basanez, M.-G., Cohuet, A., and Christophides, G.K. (2015). Antibiotics in ingested human blood affect the mosquito microbiota and capacity to transmit malaria. Nature Communications *6*.

Giacomini, T., and Brumpt, L. (1989). Dissémination passive d'Anophèles par les moyens de transport; son rôle dans la transmission du paludisme (revue historique). Revue d'histoire de la pharmacie *77e année n°281-282. Bicentenaire de la naissance de Joseph Pelletier (1788-1842) et 75e anniversaire de la fondation de la Société d'histoire de la Pharmacie*, 163-174.

Gilles, J.R.L., Schetelig, M.F., Scolari, F., Marec, F., Capurro, M.L., Franz, G., and Bourtzis, K. (2014). Towards mosquito sterile insect technique programmes: Exploring genetic, molecular, mechanical and behavioural methods of sex separation in mosquitoes. Acta Trop *132*, S178-S187.

Gimonneau, G., Tchioffo, M.T., Abate, L., Boissiere, A., Awono-Ambene, P.H., Nsango, S.E., Christen, R., and Morlais, I. (2014). Composition of *Anopheles coluzzii* and *Anopheles gambiae* microbiota from larval to adult stages. Infection Genetics and Evolution *28*, 715-724.

Gkenas, C., Oikonomou, A., Economou, A., Kiosse, F., and Leonardos, I. (2012). Life history pattern and feeding habits of the invasive mosquitofish, *Gambusia holbrooki,* in Lake Pamvotis (NW Greece). Journal of Biological Research-Thessaloniki *17*, 121-136.

Gorham, J.R. (1976). Orchid pollination by *Aedes* mosquitoes in Alaska. Am Midl Nat *95*, 208-210.

Gorman, K., Young, J., Pineda, L., Màrquez, R., Sosa, N., Bernal, D., Torres, R., Soto, Y., Lacroix, R., Naish, N.*, et al.* (2016). Short-term suppression of *Aedes aegypti* using genetic control does not facilitate *Aedes albopictus*. Pest Manage Sci *72*, 618-628.

Gray, T.J., and Webb, C.E. (2014). A review of the epidemiological and clinical aspects of West Nile virus. International journal of general medicine *7*, 193-203.

Green, A. (2016). Yellow fever continues to spread in Angola. Lancet *387*, 2493-2493.

Grossman, G.L., Rafferty, C.S., Clayton, J.R., Stevens, T.K., Mukabayire, O., and Benedict, M.Q. (2001). Germline transformation of the malaria vector, *Anopheles gambiae*, with the *piggyBac* transposable element. Insect Mol Biol *10*, 597-604.

Hall, A.B., Basu, S., Jiang, X.F., Qi, Y.M., Timoshevskiy, V.A., Biedler, J.K., Sharakhova, M.V., Elahi, R., Anderson, M.A.E., Chen, X.G.*, et al.* (2015). A male-determining factor in the mosquito *Aedes aegypti*. Science *348*, 1268-1270.

Hammond, A., Galizi, R., Kyrou, K., Simoni, A., Siniscalchi, C., Katsanos, D., Gribble, M., Baker, D., Marois, E., Russell, S.*, et al.* (2016). A CRISPR-Cas9 gene drive system-targeting female reproduction in the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae*. Nat Biotechnol *34*, 78-83.

Hammond, A., and Nolan, T. (2014). Sex-, tissue- and stage-specific transgene expression. In Transgenic insects: techniques and applications, M.Q. Benedict, ed. (Wallingford, Oxfordshire, UK, CABI).

Hardstone, M.C., Leichter, C.A., and Scott, J.G. (2009). Multiplicative interaction between the two major mechanisms of permethrin resistance, *kdr* and cytochrome P450-monooxygenase detoxification, in mosquitoes. J Evol Biol *22*, 416-423.

Harris, A.F., McKemey, A.R., Nimmo, D., Curtis, Z., Black, I., Morgan, S.A., Oviedo, M.N., Lacroix, R., Naish, N., Morrison, N.I.*, et al.* (2012). Successful suppression of a field mosquito population by sustained release of engineered male mosquitoes. Nat Biotechnol *30*, 828-830.

Harris, A.F., Nimmo, D., McKemey, A.R., Kelly, N., Scaife, S., Donnelly, C.A., Beech, C., Petrie, W.D., and Alphey, L. (2011). Field performance of engineered male mosquitoes. Nat Biotechnol *29*, 1034-U1109.

Hastings, I.M. (1994). Selfish DNA as a method of pest control. Philos Trans R Soc Lond Ser B-Biol Sci *344*, 313-324.

Hertlein, M.B., Mavrotas, C., Jousseaume, C., Lysandrou, M., Thompson, G.D., Jany, W., and Ritchie, S.A. (2010). A review of spinosad as a natural product for larval mosquito control. J Am Mosq Control Assoc *26*, 67-87.

Hoffmann, A.A., Iturbe-Ormaetxe, I., Callahan, A.G., Phillips, B., Billington, K., Axford, J.K., Montgomery, B., Turley, A.P., and O'Neill, S.L. (2014). Stability of the *w*Mel *Wolbachia* infection following invasion into *Aedes aegypti* populations. Plos Neglected Tropical Diseases *8*.

Hoffmann, A.A., Montgomery, B.L., Popovici, J., Iturbe-Ormaetxe, I., Johnson, P.H., Muzzi, F., Greenfield, M., Durkan, M., Leong, Y.S., Dong, Y.*, et al.* (2011). Successful establishment of *Wolbachia* in *Aedes* populations to suppress dengue transmission. Nature *476*, 454-U107.

Hotopp, J.C.D., Clark, M.E., Oliveira, D., Foster, J.M., Fischer, P., Torres, M.C., Giebel, J.D., Kumar, N., Ishmael, N., Wang, S.L.*, et al.* (2007). Widespread lateral gene transfer from intracellular bacteria to multicellular eukaryotes. Science *317*, 1753-1756.

Howard, A.F.V. (2013). Control with arthropods In Biological and environmental control of disease vectors, M.M. Cameron, and L.M. Lorenz, eds. (Wallingford, UK, CABI), pp. 10-24.

Hughes, G.L., Dodson, B.L., Johnson, R.M., Murdock, C.C., Tsujimoto, H., Suzuki, Y., Patt, A.A., Cui, L., Nossa, C.W., Barry, R.M*., et al.* (2014). Native microbiome impedes vertical transmission of *Wolbachia* in *Anopheles* mosquitoes. Proc Natl Acad Sci U S A *111*, 12498-12503.

Hughes, G.L., and Rasgon, J.L. (2014). Transinfection: a method to investigate *Wolbachia*-host interactions and control arthropod-borne disease. Insect Mol Biol *23*, 141-151.

Hussain, M., Frentiu, F.D., Moreira, L.A., O'Neill, S.L., and Asgari, S. (2011). *Wolbachia* uses host microRNAs to manipulate host gene expression and facilitate colonization of the dengue vector *Aedes aegypti*. Proc Natl Acad Sci U S A *108*, 9250-9255.

Isaacs, A.T., Jasinskiene, N., Tretiakov, M., Thiery, I., Zettor, A., Bourgouin, C., and James, A.A. (2012). Transgenic *Anopheles stephensi* coexpressing single-chain antibodies resist *Plasmodium falciparum* development. Proc Natl Acad Sci U S A *109*, E1922-E1930.

Jasinskiene, N., Coates, C.J., Benedict, M.Q., Cornel, A.J., Rafferty, C.S., James, A.A., and Collins, F.H. (1998). Stable transformation of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*, with the *Hermes* element from the housefly. Proc Natl Acad Sci U S A *95*, 3743-3747.

Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., and Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. Science *337*, 816-821.

Juliano, S.A. (2009). Species interactions among larval mosquitoes: Context dependence across habitat gradients. In Annu Rev Entomol, pp. 37-56.

Jupatanakul, N., Sim, S., Anglero-Rodriguez, Y.I., Souza-Neto, J., Das, S., Poti, K.E., Rossi, S.L., Bergren, N., Vasilakis, N., and Dimopoulos, G. (2017). Engineered *Aedes aegypti* JAK/STAT pathway-mediated immunity to dengue virus. Plos Neglected Tropical Diseases *11*, e0005187.

Kay, B., and Nam, V.S. (2005). New strategy against *Aedes aegypti* in Vietnam. Lancet *365*, 613-617.

Kittayapong, P., Chansang, U., Chansang, C., and Bhumiratana, A. (2006). Community participation and appropriate technologies for dengue vector control at transmission foci in Thailand. J Am Mosq Control Assoc *22*, 538-546.

Klasson, L., Kambris, Z., Cook, P.E., Walker, T., and Sinkins, S.P. (2009). Horizontal gene transfer between *Wolbachia* and the mosquito *Aedes aegypti*. BMC Genomics *10*.

Klasson, L., Kumar, N., Bromley, R., Sieber, K., Flowers, M., Ott, S.H., Tallon, L.J., Andersson, S.G.E., and Hotopp, J.C.D. (2014). Extensive duplication of the *Wolbachia* DNA in chromosome four of *Drosophila ananassae*. BMC Genomics *15*.

Kleinstiver, B.P., Pattanayak, V., Prew, M.S., Tsai, S.Q., Nguyen, N.T., Zheng, Z., and Joung, J.K. (2016). High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. Nature *529*, 490-495.

Kline, D.L. (2007). Semiochemicals, traps/targets and mass trapping technology for mosquito management. J Am Mosq Control Assoc *23*, 241-251.

Knipling, E.F. (1955). Possibilities of insect control or eradication through the use of sexually sterile males. J Econ Entomol *48*, 459-462.

Komor, A.C., Badran, A.H., and Liu, D.R. (2017). CRISPR-based technologies for the manipulation of eukaryotic genomes. Cell *168*, 20-36.

Kraemer, M.U.G., Sinka, M.E., Duda, K.A., Mylne, A., Shearer, F.M., Brady, O.J., Messina, J.P., Barker, C.M., Moore, C.G., Carvalho, R.G*., et al.* (2015). The global compendium of *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* occurrence. Scientific Data *2*, 150035.

Krivan, V. (2007). The Lotka-Volterra predator-prey model with foraging-predation risk trade-offs. Am Nat *170*, 771-782.

Krzywinska, E., Dennison, N.J., Lycett, G.J., and Krzywinski, J. (2016). A maleness gene in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. Science *353*, 67-69.

Kupferschmidt, K. (2016). Yellow fever outbreak triggers vaccine alarm. Science *352*, 128-129.

Labbé, G.M., Nimmo, D.D., and Alphey, L. (2010). *piggybac*- and PhiC31-mediated genetic transformation of the Asian tiger mosquito, *Aedes albopictus* (Skuse). PLoS Negl Trop Dis *4*, e788.

Labbé, P., Alout, H., Djogbénou, L., Pasteur, N., and Weill, M. (2011). Evolution of resistance to insecticide in disease vectors. In Genetics and Evolution of Infectious Disease, M. Tibayrenc, ed. (London, Elsevier), pp. 363-409.

Lacour, G., Chanaud, L., L'Ambert, G., and Hance, T. (2015). Seasonal synchronization of diapause phases in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). PLoS One *10*.

Lacroix, R., McKemey, A.R., Raduan, N., Wee, L.K., Ming, W.H., Ney, T.G., Rahidah, A.A.S., Salman, S., Subramaniam, S., Nordin, O.*, et al.* (2012). Open field release of genetically engineered sterile male *Aedes aegypti* in Malaysia. PLoS One *7*.

Lagadic, L., Schafer, R.B., Roucaute, M., Szocs, E., Chouin, S., de Maupeou, J., Duchet, C., Franquet, E., Le Hunsec, B., Bertrand, C.*, et al.* (2016). No association between the use of *Bti* for mosquito control and the dynamics of non-target aquatic invertebrates in French coastal and continental wetlands. Sci Total Environ *553*, 486-494.

Lahondère, C., and Lazzari, C.R. (2012). Mosquitoes cool down during blood feeding to avoid overheating. Curr Biol *22*, 40-45.

Lambrechts, L., Koella, J.C., and Boëte, C. (2008). Can transgenic mosquitoes afford the fitness cost? Trends Parasitol *24*, 4-7.

Lampe, D.J., and Bongio, N.J. (2014). Paratransgenesis in mosquitoes and other insects: microbial ecology and bacterial genetic considerations. In Transgenic insects: techniques and applications, M.Q. Benedict, ed. (Wallingford, Oxfordshire, UK, CABI), pp. 208-226.

Laven, H. (1967). Eradication of *Culex pipiens fatigans* through cytoplasmic incompatibility. Nature *216*, 383-&.

Lee, H.L., Vasan, S., Ahmad, N.W., Idris, I., Hanum, N., Selvi, S., Alphey, L., and Murad, S. (2013). Mating compatibility and competitiveness of transgenic and wild type *Aedes aegypti* (L.) under contained semi-field conditions. Transgenic Res *22*, 47-57.

Lees, R.S., Gilles, J.R.L., Hendrichs, J., Vreysen, M.J.B., and Bourtzis, K. (2015). Back to the future: the sterile insect technique against mosquito disease vectors. Current Opinion in Insect Science *10*, 156-162.

Lehmann, T., Dao, A., Yaro, A.S., Adamou, A., Kassogue, Y., Diallo, M., Sekou, T., and Coscaron-Arias, C. (2010). Aestivation of the African malaria mosquito, *Anopheles gambiae* in the Sahel. Am J Trop Med Hyg *83*, 601-606.

Lengeler, C. (2004). Insecticide-treated bed nets and curtains for preventing malaria. Cochrane Database of Systematic Reviews.

LePage, D.P., Metcalf, J.A., Bordenstein, S.R., On, J.M., Perlmutter, J.I., Shropshire, J.D., Layton, E.M., Funkhouser-Jones, L.J., and Beckmann, J.F. (2017). Prophage WO genes recapitulate and enhance *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility. Nature *543*, 243-+.

Lima-Camara, T.N., Codeco, C.T., Honorio, N.A., Bruno, R.V., Peixoto, A.A., and Lounibos, L.P. (2013). Male accessory gland substances from *Aedes albopictus* affect the locomotor activity of *Aedes aegypti* females. Mem Inst Oswaldo Cruz *108*, 18-25.

Lin, H., McGrath, J., Wang, P., and Lee, T. (2007). Cellular toxicity induced by SRF-mediated transcriptional squelching. Toxicol Sci *96*, 83-91.

Lindholm, A.K., Dyer, K.A., Firman, R.C., Fishman, L., Forstmeier, W., Holman, L., Johannesson, H., Knief, U., Kokko, H., Larracuente, A.M.*, et al.* (2016). The ecology and evolutionary dynamics of meiotic drive. Trends Ecol Evol *31*, 315-326.

Lounibos, L.P. (2002). Invasions by insect vectors of human disease. Annu Rev Entomol *47*, 233-266.

Lundstrom, J.O., Schafer, M.L., Petersson, E., Vinnersten, T.Z.P., Landin, J., and Brodin, Y. (2010). Production of wetland Chironomidae (Diptera) and the effects of using *Bacillus thuringiensis israelensis* for mosquito control. Bull Entomol Res *100*, 117-125.

Madakacherry, O., Lees, R.S., and Gilles, J.R.L. (2014). *Aedes albopictus* (Skuse) males in laboratory and semi-field cages: Release ratios and mating competitiveness. Acta Trop *132*, S124-S129.

Mains, J.W., Brelsfoard, C.L., Rose, R.I., and Dobson, S.L. (2016). Female adult *Aedes albopictus* suppression by *Wolbachia*-infected male mosquitoes. Scientific Reports *6*.

Mali, P., Yang, L., Esvelt, K.M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J.E., Norville, J.E., and Church, G.M. (2013). RNA-guided human genome engineering via Cas9. Science *339*, 823-826.

Marcombe, S., Darriet, F., Tolosa, M., Agnew, P., Duchon, S., Etienne, M., Tcha, M.M.Y., Chandre, F., Corbel, V., and Yebakima, A. (2011). Pyrethroid resistance reduces the efficacy of space sprays for dengue control on the island of Martinique (Caribbean). Plos Neglected Tropical Diseases *5*.

Marshall, J.M. (2011). Commentary: The Cartagena Protocol in the context of recent releases of transgenic and Wolbachia-infected mosquitoes. AsPac J Mol Biol Biotechnol *19*, 93-100.

Marten, G.G., and Reid, J.W. (2007). Cyclopoid copepods. J Am Mosq Control Assoc *23*, 65-92.

Mayer, D.G., Atzeni, M.G., Stuart, M.A., Anaman, K.A., and Butler, D.G. (1998). Mating competitiveness of irradiated flies for screwworm fly eradication campaigns. Prev Vet Med *36*, 1-9.

McGraw, E.A., and O'Neill, S.L. (2013). Beyond insecticides: new thinking on an ancient problem. Nature Reviews Microbiology *11*, 181-193.

McInnis, D.O., Lance, D.R., and Jackson, C.G. (1996). Behavioral resistance to the sterile insect technique by Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) in Hawaii. Ann Entomol Soc Am *89*, 739-744.

McMeniman, C.J., Lane, R.V., Cass, B.N., Fong, A.W.C., Sidhu, M., Wang, Y.F., and O'Neill, S.L. (2009). Stable introduction of a life-shortening Wolbachia infection into the mosquito *Aedes aegypti*. . Science *323*, 141-144.

Medlock, J.M., and Snow, K.R. (2008). Natural predators and parasites of British mosquitoes - a review. European Mosquito Bulletin *25*.

Meredith, J.M., Basu, S., Nimmo, D.D., Larget-Thiery, I., Warr, E.L., Underhill, A., McArthur, C.C., Carter, V., Hurd, H., Bourgouin, C.*, et al.* (2011). Site-specific integration and expression of an anti-malarial gene in transgenic *Anopheles gambiae* significantly reduces *Plasmodium* infections. PLoS One *6*, e14587.

Meredith, J.M., Underhill, A., McArthur, C.C., and Eggleston, P. (2013). Next-generation site-directed transgenesis in the malaria vector mosquito *Anopheles gambiae*: self-docking strains expressing germline-specific phiC31 integrase. PLoS One *8*, e59264.

Min, J., Noble, C., Najjar, D., and Esvelt, K. (2017a). Daisy quorum drives for the genetic restoration of wild populations. bioRxiv.

Min, J., Noble, C., Najjar, D., and Esvelt, K.M. (2017b). Daisyfield gene drive systems harness repeated genomic elements as a generational clock to limit spread. bioRxiv.

Moiroux, N., Gomez, M.B., Pennetier, C., Elanga, E., Djenontin, A., Chandre, F., Djegbe, I., Guis, H., and Corbel, V. (2012). Changes in *Anopheles funestus* biting behavior following universal coverage of long-lasting insecticidal nets in Benin. J Infect Dis *206*, 1622-1629.

Moll, R.M., Romoser, W.S., Modrzakowski, M.C., Moncayo, A.C., and Lerdthusnee, K. (2001). Meconial peritrophic membranes and the fate of midgut bacteria during mosquito (Diptera : culicidae) metamorphosis. J Med Entomol *38*, 29-32.

Moreira, L.A., Iturbe-Ormaetxe, I., Jeffery, J.A., Lu, G.J., Pyke, A.T., Hedges, L.M., Rocha, B.C., Hall-Mendelin, S., Day, A., Riegler, M*., et al.* (2009). A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, chikungunya, and *Plasmodium*. Cell *139*, 1268-1278.

Mubarqui, R.L., Perez, R.C., Angulo Kladt, R., Zavala Lopez, J.L., Parker, A., Seck, M.T., Sall, B., and Bouyer, J. (2014). The smart aerial release machine, a universal system for applying the sterile insect technique. Plos ONE *9*, e103077.

Murdock, C.C., Blanford, S., Hughes, G.L., Rasgon, J.L., and Thomas, M.B. (2014). Temperature alters *Plasmodium* blocking by *Wolbachia*. Scientific Reports *4*.

N'Guessan, R., Corbel, V., Akogbeto, M., and Rowland, M. (2007). Reduced efficacy of insecticide-treated nets and indoor residual spraying for malaria control in pyrethroid resistance area, Benin. Emerging Infect Dis *13*, 199-206.

Nam, V.S., Yen, N.T., Due, H.M., Tu, T.C., Thang, V.T., Le, N.H., San, L.H., Loan, L.L., Vu, T.Q.H., Ly, H.K.K*., et al.* (2012). Community-based control of *Aedes aegypti* by using Mesocyclops in Southern Vietnam. Am J Trop Med Hyg *86*, 850-859.

Nauen, R. (2007). Insecticide resistance in disease vectors of public health importance. Pest Manage Sci *63*, 628-633.

Neafsey, D.E., Waterhouse, R.M., Abai, M.R., Aganezov, S.S., Alekseyev, M.A., Allen, J.E., Amon, J., Arca, B., Arensburger, P., Artemov, G*., et al.* (2015). Highly evolvable malaria vectors: The genomes of 16 Anopheles mosquitoes. Science *347*.

Nelson, X.J., and Jackson, R.R. (2006). A predator from East Africa that chooses malaria vectors as preferred prey. PLoS One *1*.

Nesme, J., Cecillon, S., Delmont, T.O., Monier, J.M., Vogel, T.M., and Simonet, P. (2014). Large-scale metagenomic-based study of antibiotic resistance in the environment. Curr Biol *24*, 1096-1100.

Nguyen, T.H., Le Nguyen, H., Nguyen, T.Y., Vu, S.N., Tran, N.D., Le, T.N., Vien, Q.M., Bui, T.C., Le, H.T., Kutcher, S*., et al.* (2015). Field evaluation of the establishment potential of *w*melpop *Wolbachia* in Australia and Vietnam for dengue control. Parasites & vectors *8*.

Niebylski, M.L., and Craig Jr, G.B. (1994). Dispersal and survival of Aedes albopictus at a scrap tire yard in Missouri. J Am Mosq Control Assoc *10*, 339-343.

Nimmo, D.D., Alphey, L., Meredith, J.M., and Eggleston, P. (2006). High efficiency site-specific genetic engineering of the mosquito genome. Insect Mol Biol *15*, 129-136.

Noble, C., Min, J., Olejarz, J., Buchthal, J., Chavez, A., Smidler, A.L., DeBenedictis, E.A., Church, G.M., Nowak, M.A., and Esvelt, K.M. (2016). Daisy-chain gene drives for the alteration of local populations. bioRxiv.

O'Brochta, D.A., George, K., and Xu, H. (2014a). Transposon-based technologies for insects. In Transgenic insects: techniques and applications, M.Q. Benedict, ed. (Wallingford, Oxfordshire, UK, CABI), pp. 18-.

O'Brochta, D.A., George, K., and Xu, H. (2014b). Transposons for insect transformation. In Transgenic insects: techniques and applications, M.Q. Benedict, ed. (Wallingford, Oxfordshire, UK, CABI), pp. 1-17.

O'Connor, L., Plichart, C., Sang, A.C., Brelsfoard, C.L., Bossin, H.C., and Dobson, S.L. (2012). Open release of male mosquitoes infected with a *Wolbachia* biopesticide: Field performance and infection containment. Plos Neglected Tropical Diseases *6*.

Oliva, C.F., Jacquet, M., Gilles, J., Lemperiere, G., Maquart, P.O., Quilici, S., Schooneman, F., Vreysen, M.J.B., and Boyer, S. (2012). The sterile insect technique for controlling populations of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) on Reunion Island: Mating vigour of sterilized males. PLoS One *7*.

Oliva, C.F., Maier, M.J., Gilles, J., Jacquet, M., Lemperiere, G., Quilici, S., Vreysen, M.J.B., Schooneman, F., Chadee, D.D., and Boyer, S. (2013). Effects of irradiation, presence of females, and sugar supply on the longevity of sterile males *Aedes albopictus* (Skuse) under semi-field conditions on Reunion Island. Acta Trop *125*, 287-293.

Oye, K.A., Esvelt, K., Appleton, E., Catteruccia, F., Church, G., Kuiken, T., Lightfoot, S.B., McNamara, J., Smidler, A., and Collins, J.P. (2014). Regulating gene drives. Science *345*, 626-628.

Pace, M.L., Cole, J.J., Carpenter, S.R., and Kitchell, J.F. (1999). Trophic cascades revealed in diverse ecosystems. Trends Ecol Evol *14*, 483-488.

Parmakelis, A., Russello, M.A., Caccone, A., Marcondes, C.B., Costa, J., Forattini, O.P., Sallum, M.A.M., Wilkerson, R.C., and Powell, J.R. (2008). Short report: Historical analysis of a near disaster: *Anopheles gambiae* in Brazil. Am J Trop Med Hyg *78*, 176-178.

Perera, O.P., Harrell, R.A., and Handler, A.M. (2002). Germ-line transformation of the South American malaria vector, *Anopheles albimanus*, with a *piggyBaclEGFP* transposon vector is routine and highly efficient. Insect Mol Biol *11*, 291-297.

Phuc, H.K., Andreasen, M.H., Burton, R.S., Vass, C., Epton, M.J., Pape, G., Fu, G.L., Condon, K.C., Scaife, S., Donnelly, C.A*., et al.* (2007). Late-acting dominant lethal genetic systems and mosquito control. BMC Biol *5*.

Pleydell, D., and Bouyer, J. (2016). The boosted sterile insect approach: a synergystic association for integrated vector eradication? in prep.

Pluess, B., Tanser, F.C., Lengeler, C., and Sharp, B.L. (2010). Indoor residual spraying for preventing malaria. Cochrane Database of Systematic Reviews.

Pluskota, B., Jost, A., Augsten, X., Stelzner, L., Ferstl, I., and Becker, N. (2016). Successful overwintering of *Aedes albopictus* in Germany. Parasitol Res *115*, 3245-3247.

Pondeville, E., Puchot, N., Meredith, J.M., Lynd, A., Vernick, K.D., Lycett, G.J., Eggleston, P., and Bourgouin, C. (2014). Efficient Phi C31 integrase-mediated site-specific germline transformation of *Anopheles gambiae*. Nature Protocols *9*, 1698-1712.

Ponlawat, A., and Harrington, L.C. (2005). Blood feeding patterns of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Thailand. J Med Entomol *42*, 844-849.

Ramirez, J.L., Short, S.M., Bahia, A.C., Saraiva, R.G., Dong, Y.M., Kang, S., Tripathi, A., Mlambo, G., and Dimopoulos, G. (2014). Chromobacterium Csp_P reduces malaria and dengue infection in vector mosquitoes and has entomopathogenic and *in vitro* anti-pathogen activities. PLoS Path *10*.

Raymond, M., Heckel, D.G., and Scott, J.G. (1989). Interactions between pesticide genes: model and experiment. Genetics *123*, 543-551.

Regis, L., Silva-Filha, M.H., Nielsen-LeRoux, C., and Charles, J.F. (2001). Bacteriological larvicides of dipteran disease vectors. Trends Parasitol *17*, 377-380.

Reiter, P., Amador, M.A., Anderson, R.A., and Clark, G.G. (1995). Dispersal of *Aedes aegypti i*n an urban area after blood feeding as demonstrated by rubidium-marked eggs. Am J Trop Med Hyg *52*, 177-179.

Rendon, P., McInnis, D., Lance, D., and Stewart, J. (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.

Richman, A.M., Dimopoulos, G., Seeley, D., and Kafatos, F.C. (1997). *Plasmodium* activates the innate immune response of *Anopheles gambiae* mosquitoes. EMBO J *16*, 6114-6119.

Rivière, F., Pichon, G., Duval, J., Thiriel, R., and Toudic, A. (1979). Introduction de *Toxorhynchites (Toxorhynchites) amboinensis* (Doleschall, 1857) *(Diptera, Culicidae)* en Polynésie Française. Cah ORSTOM, sér Ent méd et Parasitol *XVII*, 225-234.

Rodhain, F. (2015). Le parasite, le moustique, l'Homme et les autres. Essai sur l'éco-épidémiologie des maladies à vecteurs. (Paris, Docis).

Rodhain, F., and Perez, C. (1985). Précis d'entomologie médicale et vétérinaire: notions d'épidémiologie des maladies à vecteurs (Maloine).

Ross, P.A., Wiwatanaratanabutr, I., Axford, J.K., White, V.L., Endersby-Harshman, N.M., and Hoffmann, A.A. (2017). *Wolbachia* infections in *Aedes aegypti* differ markedly in their response to cyclical heat stress. PLoS Path *13*, e1006006.

Rossi, P., Ricci, I., Cappelli, A., Damiani, C., Ulissi, U., Mancini, M.V., Valzano, M., Capone, A., Epis, S., Crotti, E*., et al.* (2015). Mutual exclusion of *Asaia* and *Wolbachia* in the reproductive organs of mosquito vectors. Parasites & vectors *8*.

Rubin, G.M., and Spradling, A.C. (1982). Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. Science *218*, 348-353.

Schaffner, F., and Mathis, A. (2014). Dengue and dengue vectors in the WHO European region: past, present, and scenarios for the future. Lancet Infect Dis *14*, 1271-1280.

Senti, K.A., and Brennecke, J. (2010). The piRNA pathway: a fly's perspective on the guardian of the genome. Trends Genet *26*, 499-509.

Servick, K. (2016). *News* - Brazil will release billions of lab-grown mosquitoes to combat infectious disease. Will it work? Science *13 october 2016*.

Shaw, W.R., Marcenac, P., Childs, L.M., Buckee, C.O., Baldini, F., Sawadogo, S.P., Dabire, R.K., Diabate, A., and Catteruccia, F. (2016). *Wolbachia* infections in natural *Anopheles* populations affect egg laying and negatively correlate with *Plasmodium* development. Nature Communications *7*.

Shelly, T.E., McInnis, D.O., Rodd, C., Edu, J., and Pahio, E. (2007). Sterile insect technique and Mediterranean fruit fly (Diptera : tephritidae): Assessing the utility of aromatherapy in a Hawaiian coffee field. J Econ Entomol *100*, 273-282.

Sicard, M., Dittmer, J., Greve, P., Bouchon, D., and Braquart-Varnier, C. (2014). A host as an ecosystem: *Wolbachia* coping with environmental constraints. Environ Microbiol *16*, 3583-3607.

Sinka, M.E., Bangs, M.J., Manguin, S., Rubio-Palis, Y., Chareonviriyaphap, T., Coetzee, M., Mbogo, C.M., Hemingway, J., Patil, A.P., Temperley, W.H*., et al.* (2012). A global map of dominant malaria vectors. Parasites & vectors *5*.

Sinkins, S.P., and O'Neill, S.L. (2000). *Wolbachia* as a vehicle to modify insect populations. In Insect transgenesis: methods and applications, H. A.M., and J. A.A., eds. (Boca Raton, FL, CRC Press), pp. 271-287.

Slaymaker, I.M., Gao, L.Y., Zetsche, B., Scott, D.A., Yan, W.X., and Zhang, F. (2016). Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. Science *351*, 84-88.

Soper, F.L. (1943). *Anopheles gambiae* in Brazil: 1930-1940 (New York, Rockefeller Foundation).

Sougoufara, S., Diedhiou, S.M., Doucoure, S., Diagne, N., Sembene, P.M., Harry, M., Trape, J.F., Sokhna, C., and Ndiath, M.O. (2014). Biting by *Anopheles funestus* in broad daylight after use of long-lasting insecticidal nets: a new challenge to malaria elimination. Malaria journal *13*.

Suchman, E.L., Piper, J., De Valdez, M.W., Kleker, B., Neeper, L., Plake, E., Black, W.C., and Carlson, J. (2009). *Aedes aegypti* densonucleosis virus amplifies, spreads, and reduces host populations in laboratory cage studies. J Med Entomol *46*, 909-918.

Suckling, D.M., Tobin, P.C., McCullough, D.G., and Herms, D.A. (2012). Combining tactics to exploit Allee effects for eradication of alien insect populations. J Econ Entomol *105*, 1-13.

Taning, C.N.T., Van Eynde, B., Yu, N., Ma, S., and Smagghe, G. (2017). CRISPR/Cas9 in insects: Applications, best practices and biosafety concerns. J Insect Physiol *98*, 245-257.

Tchioffo, M.T., Boissiere, A., Abate, L., Nsango, S.E., Bayibeki, A.N., Awono-Ambene, P.H., Christen, R., Gimonneau, G., and Morlais, I. (2016). Dynamics of bacterial community composition in the malaria mosquito's epithelia. Frontiers in microbiology *6*.

Tortosa, P., Charlat, S., Labbe, P., Dehecq, J.S., Barre, H., and Weill, M. (2010). *Wolbachia* age-sex-specific density in *Aedes albopictus*: A host evolutionary response to cytoplasmic incompatibility? PLoS One *5*.

Tran, A., Biteau-Coroller, F., Guis, H., and Roger, F. (2005). Modélisation des maladies vectorielles. Epidémiol et santé anim *47*, 35-51.

Tu, Z., and Coates, C. (2004). Mosquito transposable elements. Insect Biochem Mol Biol *34*, 631-644.

UE (2012). Règlement (UE) n° 528/2012 du Parlement européen et du Conseil du 22 mai 2012 concernant la mise à disposition sur le marché et l'utilisation des produits biocides. Journal officiel de l'Union européenne *L167*, 1-123.

Unckless, R.L., Messer, P.W., Connallon, T., and Clark, A.G. (2015). Modeling the manipulation of natural populations by the Mutagenic Chain Reaction. Genetics *201*, 425-431.

Vargas-Teran, M., Hofmann, H.C., and Tweddle, N.E. (2005). Impact of screwworm eradication programmes using the sterile insect technique. In Sterile insect technique: Principles and practices in area-wide integrated pest management, V.A. Dyck, J. Hendrichs, and A.S. Robinson, eds. (Dordrecht, The Netherlands, Springer), pp. 629-650.

Vasilakis, N., Cardosa, J., Hanley, K.A., Holmes, E.C., and Weaver, S.C. (2011). Fever from the forest: prospects for the continued emergence of sylvatic dengue virus and its impact on public health. Nature Reviews Microbiology *9*, 532-541.

Vaughan, I.P., Newberry, C., Hall, D.J., Liggett, J.S., and Ormerod, S.J. (2008). Evaluating large-scale effects of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* on non-biting midges (Chironomidae) in a eutrophic urban lake. Freshwat Biol *53*, 2117-2128.

Vazeille, M., Yebakima, A., Lourenco-de-Oliveira, R., Andriamahefazafy, B., Correira, A., Rodrigues, J.M., Veiga, A., Moreira, A., Leparc-Goffart, I., Grandadam, M.*, et al.* (2013). Oral receptivity of *Aedes aegypti* from Cape Verde for yellow fever, dengue, and chikungunya viruses. Vector-Borne and Zoonotic Diseases *13*, 37-40.

Veronesi, R., Carrieri, M., MacCagnani, B., Maini, S., and Bellini, R. (2015). *Macrocyclops albidus* (Copepoda: Cyclopidae) for the biocontrol of *Aedes albopictus* and *Culex pipiens* in Italy. J Am Mosq Control Assoc *31*, 32-43.

Viel, J.F., Warembourg, C., Le Maner-Idrissi, G., Lacroix, A., Limon, G., Rouget, F., Monfort, C., Durand, G., Cordier, S., and Chevrier, C. (2015). Pyrethroid insecticide exposure and cognitive developmental disabilities in children: The PELAGIE mother-child cohort. Environ Int *82*, 69-75.

Vodovar, N., Bronkhorst, A.W., van Cleef, K.W.R., Miesen, P., Blanc, H., van Rij, R.P., and Saleh, M.C. (2012). Arbovirus-derived piRNAs exhibit a ping-pong signature in mosquito cells. PLoS One *7*.

Volohonsky, G., Terenzi, O., Soichot, J., Naujoks, D.A., Nolan, T., Windbichler, N., Kapps, D., Smidler, A.L., Vittu, A., Costa, G.*, et al.* (2015). Tools for *Anopheles gambiae* transgenesis. G3 (Bethesda) *5*, 1151-1163.

Vreysen, M.J.B. (2005). Monitoring sterile and wild insects in area-wide integrated pest management programmes. In Sterile insect technique: Principles and practices in area-wide integrated pest management, V.A. Dyck, J. Hendrichs, and A.S. Robinson, eds. (Dordrecht, The Netherlands, Springer), pp. 325-362.

Vreysen, M.J.B., Saleh, K.M., Ali, M.Y., Abdulla, A.M., Zhu, Z.R., Juma, K.G., Dyck, V.A., Msangi, A.R., Mkonyi, P.A., and Feldmann, H.U. (2000). *Glossina austeni* (Diptera : Glossinidae) eradicated on the Island of Unguja, Zanzibar, using the sterile insect technique. J Econ Entomol *93*, 123-135.

Walker, T., Johnson, P.H., Moreira, L.A., Iturbe-Ormaetxe, I., Frentiu, F.D., McMeniman, C.J., Leong, Y.S., Dong, Y., Axford, J., Kriesner, P.*, et al.* (2011). The *w*Mel *Wolbachia* strain blocks dengue and invades caged *Aedes aegypti* populations. Nature *476*, 450-U101.

Walton, W.E., Henke, J.A., and Why, A.M. (2012). *Gambusia Affinis* (Baird & Girard) and *Gambusia Holbrooki* Girard (mosquitofish). In A handbook of global freshwater invasive species, R.A. Francis, ed., pp. 261-273.

Weeks, A.R., Turelli, M., Harcombe, W.R., Reynolds, K.T., and Hoffmann, A.A. (2007). From parasite to mutualist: Rapid evolution of *Wolbachia* in natural populations of *Drosophila*. PLoS Biol *5*, 997-1005.

Weiss, B.L., and Aksoy, S. (2014). Tsetse paratransgenesis : a novel strategy for reducing the spread of African trypanosomiasis. In Transgenic insects: techniques and applications, M.Q. Benedict, ed. (Wallingford, Oxfordshire, UK, CABI), pp. 250-262.

White, S.M., Rohani, P., and Sait, S.M. (2010). Modelling pulsed releases for sterile insect techniques: fitness costs of sterile and transgenic males and the effects on mosquito dynamics. J Appl Ecol *47*, 1329-1339.

WHO (2011). Global insecticide use for vector-borne disease control. A 10 year assessment (2000–2009). Fifth Edition (Geneva, Switzerland, World Health Organization), pp. 33.

WHO (2012). Handbook for Integrated Vector Management (Geneva, Switzerland, World Health Organization), pp. 78.

WHO (2014). Guidance framework for testing of genetically modified mosquitoes (Geneva, Switzerland, World Health Organization), pp. 159.

WHO (2015). Guidelines for the treatment of malaria - 3rd edition (Geneva, Switzerland, Guidelines for the treatment of malaria), pp. 317.

Wijayanti, S.P.M., Sunaryo, S., Suprihatin, S., McFarlane, M., Rainey, S.M., Dietrich, I., Schnettler, E., Biek, R., and Kohl, A. (2016). Dengue in Java, Indonesia: Relevance of mosquito indices as risk predictors. Plos Neglected Tropical Diseases *10*.

Windbichler, N., Menichelli, M., Papathanos, P.A., Thyme, S.B., Li, H., Ulge, U.Y., Hovde, B.T., Baker, D., Monnat, R.J., Burt, A*., et al.* (2011). A synthetic homing endonuclease-based gene drive system in the human malaria mosquito. Nature *473*, 212-217.

Winskill, P., Carvalho, D.O., Capurro, M.L., Alphey, L., Donnelly, C.A., and McKemey, A.R. (2015). Dispersal of engineered male *Aedes aegypti* mosquitoes. Plos Neglected Tropical Diseases *9*.

Woolfit, M., Algama, M., Keith, J.M., McGraw, E.A., and Popovici, J. (2015). Discovery of putative small non-coding RNAs from the obligate intracellular bacterium *Wolbachia pipientis*. PLoS One *10*.

Wu, B., Luo, L.Q., and Gao, X.J.J. (2016). Cas9-triggered chain ablation of *cas9* as a gene drive brake. Nat Biotechnol *34*, 137-138.

Wyss, J.H. (2006). Screwworm eradication in the Americas. In Tropical Veterinary Diseases: Control and Prevention in the Context of the New World Order (first published in 2000) (Annals of the New York Academy of Sciences), pp. 186-193.

Yamada, H., Vreysen, M.J.B., Gilles, J.R.L., Munhenga, G., and Damiens, D.D. (2014). The effects of genetic manipulation, dieldrin treatment and irradiation on the mating competitiveness of male *Anopheles arabiensis* in field cages. Malaria journal *13*.

Yamamoto, D.S., Sumitani, M., Kasashima, K., Sezutsu, H., and Matsuoka, H. (2016). Inhibition of malaria infection in transgenic anopheline mosquitoes lacking salivary gland cells. PLoS Path *12*.

Yaro, A.S., Traore, A.I., Huestis, D.L., Adamou, A., Timbine, S., Kassogue, Y., Diallo, M., Dao, A., Traore, S.F., and Lehmann, T. (2012). Dry season reproductive depression of *Anopheles gambiae* in the Sahel. J Insect Physiol *58*, 1050-1059.

Yeap, H.L., Mee, P., Walker, T., Weeks, A.R., O'Neill, S.L., Johnson, P., Ritchie, S.A., Richardson, K.M., Doig, C., Endersby, N.M*., et al.* (2011). Dynamics of the "popcorn" *Wolbachia* infection in outbred *Aedes aegypti* informs prospects for mosquito vector control. Genetics *187*, 583-U346.

Zetsche, B., Gootenberg, J.S., Abudayyeh, O.O., Slaymaker, I.M., Makarova, K.S., Essletzbichler, P., Volz, S.E., Joung, J., van der Oost, J., Regev, A*., et al.* (2015). Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. Cell *163*, 759-771.

Zhang, D.J., Lees, R.S., Xi, Z.Y., Bourtzis, K., and Gilles, J.R.L. (2016). Combining the sterile insect technique with the incompatible insect technique: III-Robust mating competitiveness of irradiated triple *Wolbachia*-infected *Aedes albopictus* males under semi-field conditions. PLoS One *11*.

Zhang, D.J., Lees, R.S., Xi, Z.Y., Gilles, J.R.L., and Bourtzis, K. (2015a). Combining the sterile insect technique with *Wolbachia*-based approaches: II-A safer approach to *Aedes albopictus* population suppression programmes, designed to minimize the consequences of inadvertent female release. PLoS One *10*.

Zhang, D.J., Zheng, X.Y., Xi, Z.Y., Bourtzis, K., and Gilles, J.R.L. (2015b). Combining the sterile insect technique with the incompatible insect technique: I-impact of *Wolbachia* infection on the fitness of triple- and double-infected strains of *Aedes albopictus*. PLoS One *10*.

Zug, R., and Hammerstein, P. (2012). Still a host of hosts for *Wolbachia*: Analysis of recent data suggests that 40% of terrestrial arthropod species are infected. PLoS One *7*.

Zug, R., and Hammerstein, P. (2015). Bad guys turned nice? A critical assessment of *Wolbachia* mutualisms in arthropod hosts. Biological Reviews *90*, 89-111.

Annexe 1 : Saisine

Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

MINISTÈRE DE L'ÉCOLOGIE, DU DÉVELOPPEMENT DURABLE
ET DE L'ÉNERGIE

La ministre

Paris, le 12 OCT. 2015

Madame la Présidente,

La récurrence des épidémies de maladies vectorielles transmises par les moustiques (dengue, chikungunya,...) est établie, principalement dans les DOM. Le moustique « tigre », vecteur du chikungunya, est par ailleurs désormais implanté en métropole.

La lutte anti-vectorielle appelle une combinaison d'actions de toutes natures, dont la mise en place de bonnes pratiques par les citoyens et des stratégies de destruction des larves et adultes résiduels.

La destruction des larves et des adultes s'appuie principalement sur des substances chimiques insecticides.

La palette de molécules disponibles, efficaces et ne présentant pas de danger sanitaire important pour les populations, est néanmoins réduite. Seule une molécule « larvicide » et une molécule « adulticide » sont autorisées en France, même si quelques autres molécules autorisées dans d'autres pays d'Europe sont en cours d'examen par l'Anses.

Le développement de résistances à la molécule adulticide a été d'ores et déjà constaté dans certaines régions. Le malathion a été utilisé ces derniers mois en Guyane, mais son usage a cessé suite à son classement par le CIRC (centre international de la recherche sur le cancer, dépendant de l'Organisation mondiale de la santé OMS) comme « cancérogène probable » en mars 2015.

Madame Christine NOIVILLE
Haut Conseil des Biotechnologies
244 boulevard Saint-Germain
75007 PARIS 07

Hôtel de Roquelaure – 246, boulevard Saint-Germain – 75007 Paris – Tél : 33 (0)1 40 81 21 22
www.developpement-durable.gouv.fr

Dans ce contexte, le Gouvernement doit examiner avec rigueur toutes les options à sa disposition. L'une d'entre elles consiste à introduire des populations de moustiques disposant d'un patrimoine génétique modifié par rapport à celui des populations de moustiques Aedes aegypti présents sur notre territoire et principaux vecteurs de la dengue et de la fièvre jaune.

L'introduction de moustiques au patrimoine génétique modifié vise à réduire la survivance de la descendance des adultes vecteurs de maladies. Elle est testée dans différentes régions du globe.

Ainsi, il existe par exemple des moustiques génétiquement modifiés tels que ceux développés par la société Oxytec. Le génome de ces moustiques est modifié pour y insérer un gène qui sera transmis à la descendance et stoppera le développement larvaire, entrainant ainsi la diminution des populations de moustiques. La société a procédé à des essais sur le terrain au Brésil, au Panama, aux îles Caïman et en Malaisie. Elle indique disposer de résultats probants assurant une réduction de plus de 90% des populations. Toutefois certaines associations de protection de l'environnement se sont montrées critiques considérant que la technologie ne serait efficace qu'avec des nombres de lâchers de moustiques trop importants, et donc peu réalistes. Le Gouvernement de Malaisie aurait d'ailleurs abandonné l'idée de recourir à cette technologie après des essais menés en 2010, la jugeant peu efficace et trop coûteuse. Par ailleurs, la stratégie même de suppression de population est sujette à critique dans la mesure où elle pourrait entrainer le développement d'autres familles de moustiques qui pourraient également être porteuses d'agents pathogènes.

Une autre stratégie, développée par la Fondation Oswaldo Cruz basée à Rio de Janeiro, consiste à "immuniser" les populations de moustiques Aedes Aegypti en les infectant artificiellement par une bactérie Wolbachia les rendant réfractaires au virus de la dengue. Des expérimentations actuellement en cours en Australie, au Vietnam, en Indonésie et au Brésil laisseraient entrevoir des premiers résultats prometteurs. Si cette technique a l'avantage de ne pas laisser de niche écologique vacante, en remplaçant les populations vectrices de pathogènes par des populations non vectrices, le risque pourrait être que ces populations deviennent plus compétentes pour transmettre d'autres agents pathogènes.

Dans ce contexte, je souhaite disposer de votre éclairage concernant l'utilisation de moustiques génétiquement modifiés dans le cadre de la stratégie de lutte anti vectorielle.

Le Haut Conseil des Biotechnologies établira un état des lieux de la recherche et de la commercialisation de ces insectes génétiquement modifiés ainsi que des techniques de production de ces insectes génétiquement modifiés et leurs spécificités par rapport aux techniques déjà utilisées.

Le Haut Conseil des Biotechnologies précisera quels sont les critères applicables pour l'évaluation sanitaire et environnementale de ces insectes au niveau international, européen et national (y compris DROM-COM).

Enfin, le Haut Conseil des Biotechnologies déterminera les résultats des premières utilisations et expérimentations menées dans le monde et indiquera quels pourraient être les bénéfices et les risques de l'utilisation de ces insectes génétiquement modifiés pour la France, y compris les DROM-COM, notamment d'un point de vue socio-économique et éthique.

Je souhaite que vous puissiez nous faire part de vos résultats pour le mois de mars 2016.

Je vous prie d'agréer, Madame la Présidente, l'expression de mes salutations les meilleures.



Ségolène ROYAL

Annexe 2 : Comité scientifique du HCB et élaboration de l'avis

Le Comité scientifique (CS) du HCB est un comité pluridisciplinaire composé de personnalités scientifiques nommées au titre de leur(s) spécialité(s) en relation avec les missions du HCB.

La composition du CS est indiquée ci-dessous par ordre alphabétique des noms de famille. Ayant évolué pendant les travaux du HCB, elle est précisée sur toute la durée de l'élaboration de cet avis :

- composition en vigueur suite au décret de nomination des membres du HCB du 30 décembre 2014 et à la loi du 2 décembre 2015 :

  Claude Bagnis, Avner Bar-Hen, Marie-Anne Barny, Philippe Berny, Yves Bertheau (démissionnaire depuis le 3 février 2016), Pascal Boireau, Thierry Brévault, Bruno Chauvel, Denis Couvet, Elie Dassa, Hubert De Verneuil, Nathalie Eychenne, Claudine Franche, Philippe Guerche, Joël Guillemain, Guillermina Hernandez-Raquet, André Jestin, Bernard Klonjkowski, Marc Lavielle, Valérie Le Corre, Olivier Lemaire, Didier Lereclus, Rémi Maximilien, Eliane Meurs, Nadia Naffakh, Didier Nègre, Jean-Louis Noyer, Sergio Ochatt, Jean-Christophe Pagès, Daniel Parzy, Catherine Regnault-Roger, Michel Renard, Patrick Saindrenan, Pascal Simonet, Marie-Bérengère Troadec, Bernard Vaissière, Jean-Luc Vilotte.

- composition en vigueur suite à l'arrêté du 10 avril 2017 portant nomination des membres du HCB, publié le 28 avril 2017 :

  Frédérique Angevin, Claude Bagnis, Avner Bar-Hen, Marie-Anne Barny, Pascal Boireau, Thierry Brévault, Bruno Chauvel, Cécile Collonnier, Denis Couvet, Elie Dassa, Hubert De Verneuil, Barbara Demeinex, Claudine Franche, Philippe Guerche, Joël Guillemain, Guillermina Hernandez-Raquet, Jamal Khalife, Bernard Klonjkowski, Marc Lavielle, Valérie Le Corre, François Lefèvre, Olivier Lemaire, Didier Lereclus, Rémi Maximilien, Eliane Meurs, Nadia Naffakh, Didier Nègre, Jean-Louis Noyer, Sergio Ochatt, Jean-Christophe Pagès, Xavier Raynaud, Catherine Regnault-Roger, Michel Renard, Tristan Renault, Patrick Saindrenan, Pascal Simonet, Marie-Bérengère Troadec, Bernard Vaissière, Jean-Luc Vilotte.

Les membres du CS du HCB remplissent annuellement une déclaration publique d'intérêts. Ils sont également interrogés sur l'existence d'éventuels conflits d'intérêts avant l'examen de chaque dossier. Aucun membre du CS n'a déclaré avoir de conflits d'intérêts qui auraient pu interférer avec l'élaboration de cet avis.

Cet avis a été élaboré par le CS du HCB à partir du rapport d'un groupe de travail d'experts (voir Annexe 3) sous la présidence du Dr Jean-Christophe Pagès, la vice-présidence du Dr Pascal Boireau et du Dr Claudine Franche, et la coordination scientifique de Catherine Golstein.

Les travaux du groupe de travail et le rapport en cours d'élaboration ont été discutés par le CS lors des séances du 24 mars, du 28 avril et du 22 juin 2016. Des points plus succints sur l'avancement du rapport ont été fournis lors des séances du 13 juillet et du 27 septembre. Le rapport en cours de finalisation a été présenté lors des séances du 27 octobre et du 15 décembre, et discuté en vue de l'élaboration d'un avis du CS le 26 janvier 2017. Le projet d'avis du CS a été discuté lors des séances du 25 février, du 28 mars, du 27 avril et du 24 mai 2017. L'avis finalisé a été adopté par voie électronique le 31 mai 2017.

Annexe 3 : Groupe de travail du CS et élaboration du rapport

Le groupe de travail du CS est composé essentiellement d'experts externes au HCB, sélectionnés pour leurs compétences dans les disciplines *a priori* requises pour le traitement de la saisine. Des experts supplémentaires ont été sollicités pour en compléter les compétences. Le groupe de travail inclut notamment le directeur du Centre national d'expertise sur les vecteurs (CNEV). Le CNEV est une structure multidisciplinaire permettant de mobiliser rapidement et efficacement, dans une perspective d'aide à la décision, l'ensemble de l'expertise et des compétences françaises dans les domaines de l'entomologie médicale et vétérinaire, de la lutte antivectorielle et des sciences humaines et sociales appliquées à la lutte antivectorielle. Le HCB et le CNEV ont convenu de placer le groupe de travail du CS sous l'égide des deux institutions.

Composition du groupe de travail :

Catherine Bourgouin, Institut Pasteur de Paris, Unité Génétique Fonctionnelle des Maladies Infectieuses -CNRS URA 3012

Jérémy Bouyer, CIRAD, UMR CIRAD-INRA Contrôle des Maladies Animales Exotiques et Emergentes, Chef de l'équipe vecteurs, Directeur de Recherches NICETT & Union Africaine, Ethiopie

Fabrice Chandre, CNEV (Le Centre National d'Expertise sur les Vecteurs) et IRD,Directeur CNEV, Maladies infectieuses et vecteurs : écologie, génétique, évolution et contrôle MIVEGEC (UM-CNRS 5290-IRD 224)

Jérémie Gilles, FAO-AIEA (l'Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture et l'Agence Internationale de l'énergie atomique), Chef de la section moustiques du laboratoire FAO-AIEA Insect Pest Control à Vienne

Christophe Lagneau, EID Méditerranée : (Entente interdépartementale pour la démoustication du littoral méditerranéen), Directeur recherche & développement

Eric Marois, Université de Strasbourg, IBMC, Réponse Immunitaire et Développement chez les Insectes (RIDI)

Mylène Weill, Université Montpellier 2 - CNRS, Directeur de recherche CNRS Institut des Sciences de l'Evolution de Montpellier (ISEM)

Co-rapporteurs :

Pascal Boireau, Vice-président du Comité scientifique du HCB, Directeur du Laboratoire de santé Animale de l'Anses,

Jean-Christophe Pagès, Président du Comité scientifique du HCB, Directeur recherche et innovation à l'EFS

Coordinateur scientifique : Catherine Golstein, responsable scientifique au HCB.

Le groupe de travail a fait appel aux experts supplémentaires suivants à l'occasion du séminaire de lancement et pour compléter ses compétences au fur et à mesure que de nouvelles questions le nécessitaient :

Pierre Gallian, EFS (Etablissement français du sang), Référent activité Qualification Biologique du Don & Référent Virus Emergents

Marianne Maquart, CNR Arbovirus, IRBA (Centre National de Référence des Arbovirus, Institut de recherche Biomedicale des Armées), Responsable adjoint du CNR des arbovirus

Bernard Cazelles, ENS (Ecole normale supérieure), MR 7625 CNRS-UPMC-ENS équipe : Eco-Evolution Mathématique

Claudio Lazzari, Université François Rabelais de Tours Institut de Recherche sur la Biologie de l'Insecte (IRBI), Professeur au Département de biologie animale et de génétique

Marie-Claire Paty, de l'Institut de veille sanitaire (InVS), a également été consultée ponctuellement.

Les membres du groupe de travail ont rempli une déclaration publique d'intérêts et un engagement de confidentialité.

Modalités d'élaboration du rapport :

Le groupe de travail du CS s'est réuni les 2, 3 et 4 mars 2016. La première journée de travail a pris la forme d'un séminaire de travail ouvert aux membres des deux comités du HCB et du groupe de travail *ad hoc* du CEES. A travers un programme composé principalement d'interventions des experts du groupe de travail du CS, complété de deux interventions sur les aspects socio-économiques de la saisine, le séminaire de lancement avait un triple objectif : (1) présenter le contexte des épidémies vectorielles et la problématique de la lutte antivectorielle, (2) faire un état des lieux des différentes stratégies de lutte antivectorielle, leurs spécificités et leurs limites éventuelles, (3) faire émerger les questions et thématiques qui devront être traitées dans les groupes de travail de chacun des comités.

Des représentants[86] de la firme britannique Oxitec (récemment devenue filiale de la firme américaine de biotechnologies Intrexon) ont été conjointement auditionnés le 3 mars 2016 par les groupes de travail des deux comités. L'objectif de cette audition était de considérer les activités de recherche et développement, les évaluations des risques effectuées dans le cadre de demandes de mise sur le marché ou d'essais sur le terrain de moustiques génétiquement modifiés et les retours des différentes expérimentations dans le monde de la première et encore unique société à ce jour à proposer la commercialisation de moustiques génétiquement modifiés pour des objectifs de lutte antivectorielle.

Le groupe de travail du CS a complété la préparation du rapport les 3 et 4 mars 2016 en réfléchissant aux différents critères pertinents à évaluer pour les différentes stratégies de lutte antivectorielle, et sur la question plus précise de l'évaluation des risques des moustiques GM, abordée sous l'angle de la directive 2001/18/CE. Une première évaluation comparative a été ébauchée. Un temps d'échange a été ménagé pour répondre aux questions des membres du groupe de travail du CEES.

Le rapport du groupe de travail a été élaboré, discuté et finalisé entre les membres du GT par voie électronique. Il a également bénéficié, par le biais de son coordinateur, d'interactions avec le Comité scientifique. Le rapport est disponible sur le site Internet du HCB[87].

[86] Ont été auditionnés Dr Hadyn Parry, *Chief executive officer* et Dr Andrew McKemey, *Head of field operations*. Dr Camilla Beech, *Head of regulatory affairs*, n'a pu participer à ces auditions du fait d'un empêchement de dernière minute.

[87] http://www.hautconseildesbiotechnologies.fr/sites/www.hautconseildesbiotechnologies.fr/files/file_fields/2017/05/31/rapportgtcshcbcnevadopte170523.pdf.