Pêches et Océans Canada
Fisheries and Oceans Canada

Sciences des écosystèmes et des océans
Ecosystems and Oceans Science

Secrétariat canadien de consultation scientifique (SCCS)

Document de recherche 2021/005

Région de la capitale nationale

Évaluation des risques pour l'environnement posés par le danio GloFish[MD] Galactic Purple[MD] et Cosmic Blue[MD]: Poissons d'ornement transgéniques

Colin McGowan et Rosalind Leggatt

Pêches et Océans Canada
Sciences de l'aquaculture, de la biotechnologie et de la santé des animaux aquatiques
200, rue Kent
Ottawa (Ontario) K1A 0E6

Janvier 2021

Avant-propos

La présente série documente les fondements scientifiques des évaluations des ressources et des écosystèmes aquatiques du Canada. Elle traite des problèmes courants selon les échéanciers dictés. Les documents qu'elle contient ne doivent pas être considérés comme des énoncés définitifs sur les sujets traités, mais plutôt comme des rapports d'étape sur les études en cours.

Publié par :

Pêches et Océans Canada
Secrétariat canadien de consultation scientifique
200, rue Kent
Ottawa (Ontario) K1A 0E6

http://www.dfo-mpo.gc.ca/csas-sccs/
csas-sccs@dfo-mpo.gc.ca

© Sa Majesté la Reine du chef du Canada, 2021
ISSN 2292-4272

La présente publication doit être citée comme suit :

McGowan, C., et Leggatt, R. 2021. Évaluation des risques pour l'environnement posés par le danio GloFish[MD] Galactic Purple[MD] et Cosmic Blue[MD]: Poissons d'ornement transgéniques. Secr. can. de consult. sci. du MPO. Doc. de rech. 2021/005. viii + 35 p.

Also available in English:

McGowan, C., and Leggatt, R. 2021. Environmental Risk Assessment of the GloFish® Galactic Purple® and Cosmic Blue® Danios: Transgenic Ornamental Fish. DFO Can. Sci. Advis. Sec. Res. Doc. 2021/005. viii + 32 p.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ viii
SOMMAIRE 1
RENSEIGNEMENTS DE BASE 1
LES ORGANISMES DÉCLARÉS 2
ÉVALUATION DES RISQUES POUR L'ENVIRONNEMENT 2
Exposition 2
Danger 3
CONCLUSIONS SUR LE RISQUE 3
PARTIE 1 : FORMULATION DU PROBLÈME 4
1.1 OBJET DE LA PARTIE 1 4
1.2 CONTEXTE JURIDIQUE, CADRE D'ÉVALUATION DES RISQUES ET PROCESSUS DÉCISIONNEL RÉGLEMENTAIRE 4
1.3 CARACTÉRISATION DES ORGANISMES 5
1.3.1 Danio Cosmic Blue[MD] (bz2019) 5
1.3.2 Danio Galactic Purple[MD] (PZ2019) 8
1.3.3 Caractérisation par rapport aux GloFish[MD] déclarés et évalués précédemment 11
1.3.4 Caractérisation des organismes déclarés – Sommaire 11
1.4 CARACTÉRISATION DES ESPÈCES COMPARABLES 11
1.5 CARACTÉRISATION DU MILIEU RÉCEPTEUR POTENTIEL 12
PARTIE 2 : ÉVALUATION DES RISQUES POUR L'ENVIRONNEMENT 13
2.1 OBJET DE LA PARTIE 2 13
2.2 ÉVALUATION DE L'EXPOSITION 13
2.2.1 Probabilité de rejet 14
2.2.2 Probabilité de survie 15
2.2.3 Probabilité de reproduction 17
2.2.4 Probabilité de prolifération et de dissémination 18
2.2.5 Conclusions de l'évaluation de l'exposition 18
2.3 ÉVALUATION DES DANGERS 19
2.3.1 Dangers potentiels liés à la toxicité pour l'environnement 21
2.3.2 Dangers potentiels liés à la transmission horizontale de gènes 21
2.3.3 Dangers potentiels liés aux interactions avec d'autres organismes 22
2.3.4 Risques potentiels liés à l'hybridation avec des espèces indigènes 24
2.3.5 Dangers potentiels en tant que vecteur de maladies 24
2.3.6 Impact potentiel sur le cycle biogéochimique 26
2.3.7 Dangers potentiels pour l'habitat 26
2.3.8 Dangers potentiels pour la biodiversité 26
2.3.9 Conclusions de l'évaluation des dangers 27
2.4 ÉVALUATION DU RISQUE 27
2.4.1 Évaluation des risques posés par le PZ2019 et le BZ2019 28

2.5 SOMMAIRE ET CONCLUSIONS.....30
RÉFÉRENCES CITÉES 31

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 : Certaines variétés du Danio rerio vendues dans les commerces du poisson d'ornement partout dans le monde (A, B), et les variétés transgéniques déclarées et disponibles actuellement uniquement aux États-Unis (C, D). Le danio rayé (A), le danio doré (B), le danio Cosmic Blue[MD] (C) et le danio Galactic Purple[MD] (D). Images obtenues auprès de PetSmart (A), All Pond Solutions (B), Tampa Bay Cichlids (C) et Liveaquaria.com (D).....5

Figure 2.1 : Survie et changements d'activité et de niveau d'alimentation chez la variété dorée non transgénique lorsque les températures sont abaissées progressivement de 20 °C à un rythme de 1 °C par jour (40 poissons zèbres, *Danio rerio*, répartis dans deux bassins). Figure modifiée de Leggatt et al. (2018a). 16

Figure 2.2 : Survie lors d'une exposition progressive au froid de trois lignées de poisson zèbre (*Danio rerio*) porteuses du transgène (y1, mi2001, zp4) de la protéine fluorescente verte (GFP) et de leur lignée progénitrice non transgénique (AB, type sauvage). La température a été abaissée de 28 à 12 °C à un taux d'environ 1 °C par jour, puis de 12 à 5,1 °C à un taux d'environ 0,1 °C par jour (80 poissons zèbres par lignée, répartis dans quatre bassins). Figure modifiée de Leggatt et al. (2018a). 16

Figure 2.3 : Matrice des risques pour illustrer comment l'exposition et le danger sont intégrés pour établir un niveau de risque dans l'évaluation des risques pour l'environnement. Les évaluations des risques associées aux composantes de danger au niveau d'exposition évalué sont désignés par des chiffres : 1) risques liés à la toxicité pour l'environnement; 2) risques liés à la transmission horizontale de gènes; 3) risques liés aux interactions avec d'autres organismes; 4) risques liés à l'hybridation; 5) risques en tant que vecteur de maladies; 6) risques pour le cycle biogéochimique; 7) risques pour l'habitat; 8) risques pour la biodiversité. 29

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1 : Classement de la probabilité d'exposition de l'environnement canadien aux poissons génétiquement modifiés.....13

Tableau 2.2 : Classement de l'incertitude associée à la probabilité de présence de l'organisme et à son devenir dans l'environnement canadien (exposition de l'environnement).....14

Tableau 2.3 : Classement du danger pour l'environnement découlant de son exposition à l'organisme.....20

Tableau 2.4. Classement de l'incertitude associée au danger pour l'environnement.....20

Tableau 2.5 : Sommaire de tous les classements et des cotes d'incertitude des évaluations des risques pour l'environnement posés par les lignées de poisson zèbre visées par la présente déclaration (BZ2019, PZ2019), d'une lignée de poisson zèbre déclarée précédemment (YZ2018) et de six lignées de tétras GloFish[MD] déjà déclarées (MPO 2018, 2019, 2020). Le texte Italique indique les différences entre les évaluations précédentes et l'évaluation actuelle. 28

LISTE DES ACRONYMES

ACIA : Agence canadienne d'inspection des aliments

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : ARN messager

DL_{50} : Dose létale qui tue 50 % d'une population

DL_{100} : Dose létale qui tue 100 % d'une population

eGFP : Protéine verte fluorescente améliorée

GFP : Protéine verte fluorescente

GM : Génétiquement modifié

GxE : Interaction génotype-environnement

kb : Kilobase – 1 000 paires de bases d'ADN

LCPE : *Loi canadienne sur la protection de l'environnement* (1999)

pb : Paire de bases

RFP : Protéine rouge fluorescente

RRSN(O) : *Règlement sur les renseignements concernant les substances nouvelles* (organismes)

THG : Transmission horizontale de gènes

UAS : Séquence d'activation en amont

UV : Rayons ultraviolets

VVPC : Virus de la virémie printanière de la carpe

GLOSSAIRE

Cassette : Fragment d'ADN portant un ou plusieurs gènes d'intérêt, y compris les séquences régulatrices requises pour l'expression (p. ex. les séquences de promoteur et de terminaison).

Construction : Séquence d'ADN recombinant, construite artificiellement, codant un ou plusieurs gènes d'intérêt, y compris les séquences régulatrices nécessaires à leur expression, destinée au transfert dans une cellule cible.

Cycle biologique : Séquence des événements, à partir des origines en tant que zygote jusqu'à la mort d'un individu; les étapes par lesquelles un organisme passe entre la production de gamètes par une génération et la production de gamètes par la génération suivante.

Danger : Possibilité de provoquer un effet nocif.

Devenir : Résultat final ou résultats attendus d'un développement normal.

Diversité : Nombre absolu d'espèces dans un assemblage, une communauté ou un échantillon; richesse en espèces; une mesure du nombre d'espèces et de leur abondance relative dans une communauté, un assemblage ou un échantillon; le fait d'être varié ou différent.

Diversité biologique : Telle que définie dans la *Loi canadienne sur la protection de l'environnement*, variabilité des organismes vivants de toute origine, y compris, sans limiter le caractère général de ce qui précède, les écosystèmes terrestres et aquatiques ainsi que les autres écosystèmes marins et les complexes écologiques dont ils font partie. La présente définition vise également la diversité intraspécifique et interspécifique, ainsi que celle des écosystèmes.

Écosystème : Comme défini dans la LCPE, complexe dynamique formé de communautés de plantes, d'animaux et de micro-organismes et de leur environnement non vivant qui, par leur interaction, forment une unité fonctionnelle.

Effet nocif : Effet négatif immédiat ou à long terme sur la structure ou la fonction de l'écosystème, y compris la diversité biologique.

Espèce d'ornement : Tous les petits animaux aquatiques vivants de la classe des poissons qui sont des animaux domestiques ou utilisés à des fins décoratives.

Exposition : Probabilité que l'organisme entre en contact avec des espèces ou des composantes environnementales sensibles au Canada.

Fluorescent : Substance absorbant la lumière associée à une longueur d'onde courte et qui émet de la lumière liée à une longueur d'onde plus longue.

Génétiquement modifié : Modification délibérée des caractéristiques d'un organisme par la manipulation artificielle de son matériel génétique.

G0 : L'individu fondateur dans lequel la construction transgénique a été micro-injectée pour la première fois au stade de la cellule unique.

Hybridation : Croisement d'individus de composition génétique différente, appartenant habituellement à des souches ou des espèces différentes.

Incertitude : Manque de connaissance de la valeur réelle d'un paramètre résultant soit du hasard, soit d'une incomplétude, soit des deux.

Interactions génotype-environnement (GxE) : Comment le génotype interagit avec l'environnement pour modeler le phénotype observé; réactions morphologiques, physiologiques

ou comportementales de deux génotypes ou plus selon les fluctuations environnementales; plasticité.

Introduction : Arrivée d'un nouvel organisme vivant dans l'environnement aquatique canadien à la suite de son rejet au Canada ou de son immigration d'autres pays.

Invasivité : Propriété d'un organisme qui est arrivé, s'est établi et s'est propagé dans un nouvel écosystème aquatique et qui a des conséquences néfastes sur les ressources naturelles de l'écosystème aquatique indigène ou sur l'utilisation de la ressource par l'homme.

Paramètre d'évaluation : Entités écologiques susceptibles de subir des dommages en cas d'exposition à un agent de stress et qui doivent être protégées pour atteindre les objectifs de protection fixés.

Persiste : Survit jusqu'au stade de la reproduction.

Pression de prédation : Effets de la prédation sur la dynamique d'une population de proies.

Risque : Probabilité qu'un effet nocif se produise en raison d'une exposition à un danger. Le risque intègre la nature et la gravité de l'effet nocif ainsi que la probabilité que celui-ci se réalise.

Substance toxique inscrite à la LCPE : Substance ou organisme qui pénètre ou peut pénétrer dans l'environnement en une quantité ou concentration ou dans des conditions de nature à : a) avoir ou pouvoir avoir, immédiatement ou à long terme, un effet nocif sur l'environnement ou sur la diversité biologique; b) mettre en danger ou pouvoir mettre en danger l'environnement essentiel pour la vie; ou c) constituer ou pouvoir constituer un danger au Canada pour la vie ou la santé humaines.

Transgénique : Organisme contenant du matériel génétique dans lequel l'ADN d'un organisme sans lien a été introduit de façon artificielle.

Transmission horizontale de gènes : Transmission de gènes entre organismes autrement que par la reproduction sexuelle ou asexuée classique.

Les sources utilisées pour les définitions de ce glossaire sont Lincoln *et al*. 1988; Burgman 2005; Kapuscinski *et al*. 2007; Mair *et al*. 2007; Levin 2009; Moon *et al*. 2010.

RÉSUMÉ

Conformément à la Loi canadienne sur la protection de l'environnement (LCPE), deux avis ont été soumis en vertu du Règlement sur les renseignements concernant les substances nouvelles (organismes) [RRSN(O)] par GloFish LLC à Environnement et changement climatique Canada (ECCC) pour le *Danio rerio* génétiquement modifié (danio GloFish^{MD} Cosmic Blue^{MD} (BZ2019) et danio GloFish^{MD} Galactic Purple^{MD} (PZ2019)). L'évaluation des risques pour l'environnement a été réalisée et comprenait une analyse des dangers potentiels, des probabilités d'exposition et des incertitudes associées pour parvenir à des conclusions sur les risques. Les évaluations ont été comparées avec celles du danio GloFish^{MD} Sunburst Orange^{MD} (YZ2018) précédemment notifiées. L'évaluation de l'exposition environnementale a conclu que la présence du BZ2019 et du PZ2019 dans l'environnement canadien, en dehors des aquariums, devrait être rare, isolée et éphémère en raison de leur incapacité à survivre aux basses températures hivernales typiques des environnements d'eau douce du Canada. Par conséquent, la probabilité d'exposition du BZ2019 et du PZ2019 à l'environnement canadien est faible. L'incertitude associée à cette estimation de l'exposition environnementale est faible, compte tenu des données disponibles sur la tolérance à la température des lignées notifiées et des espèces comparables pertinentes et de l'absence d'établissement du *Danio rerio* non transgénique en Amérique du Nord, malgré une longue histoire d'utilisation. L'évaluation des dangers environnementaux a conclu que les dangers du BZ2019 et du PZ2019 associés à la toxicité environnementale, aux interactions trophiques, à l'hybridation, au vecteur de maladie, à la biodiversité, au cycle biogéochimique et à l'habitat sont négligeables. La transmission horizontale de gènes présente un danger faible (c'est-à-dire aucun effet nocif prévu). Les niveaux d'incertitude, associés aux cotes de danger environnemental, varient de faibles à modérés en raison des limitations et de la qualité des données pour les organismes notifiés et de substitution, ou d'une certaine dépendance à l'égard des avis d'experts et des preuves anecdotiques. Il existe un faible risque d'effets environnementaux négatifs aux niveaux d'exposition prévus pour l'environnement canadien en raison de l'utilisation du BZ2019 et du PZ2019 comme poissons d'aquarium ornementaux ou d'autres utilisations potentielles.

SOMMAIRE

RENSEIGNEMENTS DE BASE

Le 8 mai 2019, GloFish LLC a présenté deux dossiers réglementaires (déclarations) à Environnement et Changement climatique Canada (ECCC) en vertu du *Règlement sur les renseignements concernant les substances nouvelles (organismes)* [RRSN(O)] de la *Loi canadienne sur la protection de l'environnement, 1999* (LCPE 1999) pour le danio GloFish^{MD} Galactic Purple^{MD} et le danio GloFish^{MD} Cosmic Blue^{MD}. Ces poissons d'ornement sont des poissons zèbres dorés (*Danio rerio*) qui ont été génétiquement modifiés afin d'émettre différentes couleurs fluorescentes en vue de leur utilisation dans les aquariums domestiques. Il est à noter que des évaluations des risques similaires ont été menées au sujet du danio GloFish^{MD} Sunburst Orange^{MD} (MPO 2020), ainsi que de six couleurs différentes de tétras GloFish^{MD} (MPO 2018, 2019).

Les dispositions de la LCPE relatives à la biotechnologie adoptent une approche préventive en matière de pollution, en exigeant la déclaration et l'évaluation de tous les nouveaux organismes vivants issus de la biotechnologie, y compris les poissons génétiquement modifiés, avant qu'ils soient produits ou importés au Canada, afin de déterminer s'ils sont « toxiques » ou s'ils peuvent le devenir. En vertu de la LCPE (article 64), un organisme est considéré comme toxique s'il pénètre ou peut pénétrer dans l'environnement en une quantité ou concentration ou dans des conditions de nature à : a) avoir, immédiatement ou à long terme, un effet nocif sur l'environnement ou sur la diversité biologique; b) mettre en danger ou pouvoir mettre en danger l'environnement essentiel pour la vie; ou c) constituer ou pouvoir constituer un danger au Canada pour la vie ou la santé humaines. Toute personne proposant d'importer ou de produire un produit animal vivant issu de la biotechnologie au Canada, y compris un poisson génétiquement modifié, doit fournir à ECCC les renseignements indiqués dans le RRSN(O) au moins 120 jours avant le début de l'importation ou de la production de l'organisme en question. Ces renseignements sont utilisés pour réaliser une évaluation des risques pour l'environnement et une évaluation des répercussions indirectes sur la santé humaine (risque à la santé humaine si l'environnement est exposé à l'organisme) qui servent ensuite à déterminer si l'organisme est toxique ou peut le devenir en vertu de la LCPE.

En vertu d'un protocole d'entente avec ECCC et Santé Canada (SC), pour les produits du poisson issus de la biotechnologie et relevant du RRSN(O), le MPO fournit un avis scientifique sous la forme d'une évaluation des risques pour l'environnement. Cet avis appuie l'évaluation du risque réalisée par ECCC et SC en vertu de la LCPE. Conformément à cette entente, le ministre de l'Environnement et du Changement climatique reçoit un avis scientifique du MPO et a la responsabilité de prendre la décision réglementaire définitive en ce qui concerne l'utilisation du poisson déclaré.

C'est dans ce contexte que le MPO a procédé à une évaluation des risques pour l'environnement posés par les organismes déclarés dans le cadre de l'utilisation proposée. Ici, le risque est défini comme une fonction de la possibilité que les environnements canadiens soient exposés à l'organisme déclaré, et de la possibilité que l'organisme déclaré présente des dangers pour l'environnement canadien. Les évaluations de l'exposition et des dangers sont menées séparément, puis intégrées dans une évaluation des risques. L'incertitude liée aux évaluations de l'exposition et des dangers est déterminée, et l'incertitude associée à l'évaluation finale des risques est discutée.

LES ORGANISMES DÉCLARÉS

Les deux souches de poisson zèbre GloFish[MD] sont des lignées indépendantes de morphes de couleur transgéniques diploïdes, hémizygotes ou homozygotes, génétiquement modifiés, du poisson zèbre doré (*D. rerio*). Chaque lignée possède un transgène différent dont l'expression donne une couleur unique à la lumière naturelle et devient fluorescente à la lumière bleue ou UV. Les effets de la protéine s'expriment dans la peau, la musculature, les nageoires, les yeux et probablement dans certains organes de l'organisme.

Pour chaque lignée, tous les individus sont les descendants d'un seul individu fondateur (G0), le transgène étant micro-injecté au stade de la cellule unique. L'emplacement uniforme de l'insert, le nombre de copies et la ségrégation mendélienne ont été examinés à la génération F2.

Le danio Cosmic Blue[MD] (BZ2019) et le danio Galactic Purple[MD] (PZ2019) sont commercialisés aux États-Unis (sauf en Californie) depuis 2010 et 2011, respectivement, et en Californie depuis 2015, sans incident. Le changement phénotypique ciblé est la présence d'une coloration fluorescente unique sous la forme de nouveaux morphes de couleur, destinés au commerce des aquariums ornementaux. L'entreprise a constaté d'autres changements phénotypiques imprévus, comme une légère diminution de la tolérance au froid et une réduction du succès de la reproduction en concurrence avec les fratries non transgéniques.

ÉVALUATION DES RISQUES POUR L'ENVIRONNEMENT

L'évaluation des risques pour l'environnement est réalisée en fonction du scénario proposé par GloFish LLC, soit l'importation du BZ2019 et du PZ2019 au Canada par des grossistes-détaillants, les poissons zèbres étant ensuite distribués à des magasins de vente au détail de tout le pays pour être achetés par des consommateurs canadiens pour leurs aquariums domestiques.

Exposition

Il est prévu que le BZ2019 et le PZ2019 soient confinés dans des aquariums fixes à l'intérieur de bâtiments de grossistes-détaillants, de magasins et de maisons de consommateurs. En fonction des dossiers de l'historique sur les poissons d'aquarium introduits dans des écosystèmes naturels canadiens et du monde entier, il est très probable que le BZ2019 et le PZ2019 soient introduits volontairement ou par inadvertance dans les écosystèmes d'eau douce du Canada. Compte tenu du nombre prévu de poissons achetés par des consommateurs, de tels événements devraient se produire de très faible ampleur (p. ex. cinq poissons ou moins par rejet), bien qu'il ne soit pas impossible que des rejets de plus grande ampleur aient lieu.

Sur la base des préférences et des limites de température de *D. rerio* non transgénique et déclaré, ainsi que de la température de l'eau enregistrée dans les réseaux d'eau douce au Canada, le BZ2019 et le PZ2019 pourraient survivre dans les écosystèmes canadiens pendant l'été, le printemps et l'automne, mais pas pendant l'hiver. En effet, il n'existe aucun rapport de populations établies de *D. rerio* non transgénique au Canada ou aux États-Unis, bien que ces poissons soient vendus depuis des décennies en Amérique du Nord et que des occurrences temporaires aient été signalées à l'occasion.

La présence du BZ2019 et du PZ2019 dans l'environnement canadien devrait être rare, isolée et éphémère. Par conséquent, la probabilité d'**exposition** de l'environnement canadien est considérée comme **faible**. L'**incertitude** associée à cette estimation est **faible** étant donné la qualité des données sur la tolérance à la température disponibles pour chaque lignée et des

organismes de substitution valides et des données recueillies sur les paramètres environnementaux du milieu récepteur canadien.

Danger

Le potentiel que le BZ2019 et le PZ2019 posent des dangers pour les environnements canadiens a été examiné en fonction de la toxicité environnementale, de la transmission horizontale de gènes, des interactions avec d'autres organismes, y compris l'hybridation, en tant que vecteur de maladies, ainsi que des impacts sur le cycle biogéochimique, l'habitat et la biodiversité. Le *D. rerio* non transgénique est un petit poisson non agressif dont l'activité devrait être limitée en raison des basses températures pendant la plupart des saisons au Canada. Il n'a pas d'historique d'invasivité au Canada ou dans le monde, malgré son utilisation répandue dans le commerce d'espèces destinées aux aquariums. Il n'existe pas de rapports sur des effets phénotypiques du transgène susceptibles d'accroître le potentiel de danger du BZ2019 ou du PZ2019 au-delà de celui posé par le *D. rerio* non transgénique, et aucune preuve que la transmission potentielle de gènes aura des conséquences néfastes sur l'environnement canadien.

Le classement des **dangers** examinés allait de **négligeable à faible**. **L'incertitude** varie de **faible à modérée**, en raison du peu de données propres aux organismes, des données directes limitées sur les espèces comparables, des données variables provenant des modèles de substitution (poisson zèbre porteur du transgène de la protéine fluorescente rouge, RFP), et de la dépendance à l'égard des opinions d'experts pour l'évaluation de certains dangers. Le BZ2019 et le PZ2019 ne devraient pas présenter de dangers supplémentaires s'ils sont utilisés dans des applications autres que l'utilisation prévue de poissons d'ornement destinés aux aquariums domestiques.

CONCLUSIONS SUR LE RISQUE

Le risque global pour l'environnement canadien posé par le BZ2019 et le PZ2019 est considéré comme **faible**, et l'on ne s'attend pas à ce que les organismes déclarés causent des effets nocifs dans les environnements canadiens au seuil d'exposition évalué. Alors que le niveau d'incertitude associé à certains dangers est modéré en raison du caractère limité ou inexistant de données directes à propos des organismes déclarés ou d'une espèce comparable, rien ne semble indiquer que le BZ2019 et le PZ2019, dans le cadre de l'utilisation proposée ou d'autres utilisations potentielles, pourraient nuire à l'environnement canadien en cas d'exposition. Ces conclusions concordent avec les évaluations précédentes des lignées de poissons zèbres et de tétras GloFish[MD] déclarées (MPO 2018, 2019, 2020).

PARTIE 1 : FORMULATION DU PROBLÈME

1.1 OBJET DE LA PARTIE 1

La partie 1 du présent document expose la formulation du problème pour l'évaluation des risques pour l'environnement qui sera réalisée en vertu de la *Loi canadienne sur la protection de l'environnement* (LCPE), en ce qui concerne les poissons zèbres GloFish[MD] Galactic Purple[MD] (PZ2019) et Cosmic Blue[MD] (BZ2019), les variantes génétiquement modifiées du poisson zèbre doré (*Danio rerio*), également connu sous le nom de danio, déclarées par GloFish LLC en vertu du *Règlement sur les renseignements concernant les substances nouvelles (organismes)* [RRSN(O)] en vue d'une utilisation dans le commerce d'espèces destinées aux aquariums. La formulation du problème permet de jeter les fondements de l'évaluation du risque en déterminant les objectifs de protection environnementale et la portée de l'étude. Elle permet aussi de définir les objectifs de protection et les paramètres d'évaluation conformes aux objectifs de protection prévus dans la LCPE. La formulation du problème fournit également une caractérisation des deux souches de poisson zèbre GloFish[MD], des espèces comparables et du milieu récepteur potentiel au Canada. La déclaration du PZ2019 et du BZ2019 au titre de la LCPE fait suite à des déclarations similaires antérieures de GloFish[MD] relatives au poisson zèbre Sunburst Orange[MD] (YZ2018) et à six lignées de tétras GloFish[MD]. La présente évaluation fait suite aux évaluations précédentes (MPO 2018, 2019, 2020) et précise les renseignements susceptibles de modifier les conclusions de l'évaluation par rapport aux conclusions précédentes.

De plus amples informations sur la LCPE et le RRSN(O), y compris des orientations sur les règlements, des orientations détaillées sur les exigences en matière d'information, l'utilisation des dérogations, les nouvelles activités importantes, les résultats de l'évaluation des risques et la gestion des risques sont disponibles sur la page Biotechnologie du site Web d'Environnement et Changement climatique Canada (ECCC).

1.2 CONTEXTE JURIDIQUE, CADRE D'ÉVALUATION DES RISQUES ET PROCESSUS DÉCISIONNEL RÉGLEMENTAIRE

Un aperçu détaillé du contexte juridique du processus d'évaluation des risques, du cadre d'évaluation des risques et du processus décisionnel réglementaire en vertu de la LCPE est fourni dans Leggatt *et al.* (2018b). En résumé, l'évaluation des risques est menée dans le cadre législatif de la LCPE et des exigences en matière d'information énoncées à l'annexe 5 du RRSN(O). Les risques potentiels pour l'environnement canadien qui peuvent être associés à l'importation ou à la fabrication de poissons génétiquement modifiés sont déterminés conformément au paradigme classique d'évaluation des risques, où le risque est directement lié à l'exposition et au danger que pose l'organisme. L'évaluation de l'exposition repose sur la probabilité et l'ampleur du rejet dans l'environnement, ainsi que sur la probabilité et l'ampleur de la survie, de la reproduction, de l'établissement et de la propagation de l'organisme et de ses descendants potentiels dans l'environnement canadien. L'évaluation des dangers met l'accent sur le potentiel d'impact de l'organisme sur : (1) les proies, les prédateurs et les concurrents potentiels de l'organisme; (2) la diversité biologique; (3) l'habitat. Le niveau d'incertitude pour la détermination de l'exposition et du danger est évalué et communiqué en tant qu'impact à l'évaluation finale des risques. Le MPO fournit à ECCC un avis scientifique sous la forme d'évaluations du risque pour l'environnement examinées par les pairs en vue du processus décisionnel réglementaire aux termes de la LCPE, en fonction du risque pour l'environnement et de l'incertitude associée à la conclusion.

1.3 CARACTÉRISATION DES ORGANISMES

Dans les présentes déclarations, GloFish LLC demande l'importation de deux nouvelles souches transgéniques de poisson zèbre (*D. rerio*) en provenance des États-Unis, pour le commerce d'espèces destinées aux aquariums au Canada. Les noms commerciaux des organismes transgéniques sont poisson zèbre Galactic Purple^{MD} et poisson zèbre Cosmic Blue^{MD}. La figure 1.1 illustre l'apparence physique des deux souches de poisson zèbre GloFish^{MD} déclarées, ainsi que du poisson zèbre non transgénique domestiqué (également connu sous le nom de danio rayé ou danio zébré), ainsi que le poisson zèbre doré non transgénique (également connu sous le nom de danio doré), un morphe faiblement pigmenté du danio rayé.

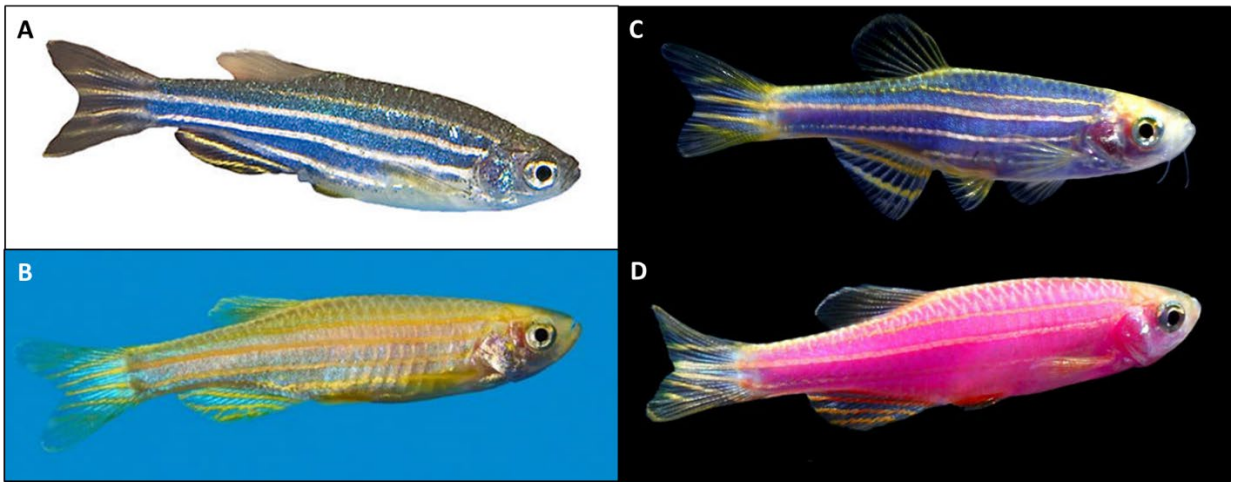


Figure 1.1 : Certaines variétés du Danio rerio *vendues dans les commerces du poisson d'ornement partout dans le monde (A, B), et les variétés transgéniques déclarées et disponibles actuellement uniquement aux États-Unis (C, D). Le danio rayé (A), le danio doré (B), le danio Cosmic Blue^{MD} (C) et le danio Galactic Purple^{MD} (D). Images obtenues auprès de PetSmart (A), All Pond Solutions (B), Tampa Bay Cichlids (C) et Liveaquaria.com (D).*

1.3.1 Danio Cosmic Blue^{MD} (bz2019)

1.3.1.1 Caractérisation moléculaire

Le BZ2019 est un poisson zèbre doré (*D. rerio*) génétiquement modifié qui possède des copies multiples de deux constructions transgéniques contenant les transgènes d'une protéine fluorescente bleue ou d'une protéine non fluorescente, respectivement. Les constructions génétiques complètes utilisées dans le BZ2019, y compris les gènes et les composantes régulatrices, sont les mêmes que celles utilisées pour le tétra Cosmic Blue^{MD} évalué précédemment (MPO 2019). Le matériel génétique inséré entraîne une coloration bleue du BZ2019 sous la lumière ambiante et une coloration bleue fluorescente sous la lumière UV. Cette modification a pour objet de créer un nouveau phénotype de couleur bleue pour l'espèce *D. rerio* pour le commerce d'espèces destinées aux aquariums.

Bien que l'entreprise ait fourni plus de détails sur la structure, l'élaboration et la fonction de la construction transgénique utilisée pour créer le BZ2019 aux fins de l'examen, ces renseignements sont considérés comme des renseignements commerciaux confidentiels et ne peuvent être inclus dans ce rapport.

1.3.1.1.1 Production de l'organisme déclaré

Les cassettes d'expression transgénique purifiées décrites ci-dessus ont été injectées dans des œufs nouvellement fécondés de poisson zèbre doré (*D. rerio*) non transgénique. Des lots aléatoires de descendants F1 ont été produits à partir du croisement par paires d'un seul individu fondateur de la mosaïque bleue (c'est-à-dire un G0) avec plusieurs poissons zèbres dorés non transgéniques. Les individus transgéniques ont été identifiés par la présence de fluorescence bleue et élevés jusqu'à maturité. À maturité, les poissons F1 transgéniques ont été croisés avec des poissons zèbres dorés non transgéniques pour produire une population de poissons F2 distincte pour la fluorescence et la couleur, qui est devenue la population fondatrice utilisée pour la propagation de la lignée. Les poissons F2 ont également servi à générer les informations concernant les caractéristiques moléculaires et physiques de l'organisme.

La confirmation que tous les poissons F2 contiennent des sites d'insertion homogènes et constituent une seule lignée homogène a été réalisée par clivage enzymatique et analyse par transfert de Southern de tous les poissons F2. Une analyse visant à vérifier que le squelette du vecteur n'était pas incorporée dans l'organisme a été effectuée sur des poissons de génération F2 par PCR, en utilisant des amorces spécifiques à quatre endroits différents du squelette du vecteur. Aucun vecteur n'a été détecté, mais un promoteur de l'ARN polymérase du bactériophage T3 a été identifié dans les séquences des deux constructions transgéniques, ce qui suggère qu'une partie du squelette du vecteur était présente dans les constructions transgéniques purifiées finales. Une nouvelle analyse des lignées précédemment déclarées a confirmé que ce promoteur T3 est également présent dans les séquences de construction des tétras GloFish[MD] Electric Green[MD], Cosmic Blue[MD] et Galactic Purple[MD].

La poursuite de la lignée BZ2019 a été assurée par un élevage en lots dans des populations composées d'un mélange d'individus hémizygotes et homozygotes pour le transgène, les poissons zèbres dorés non transgéniques étant retirés de la population à mesure de leur apparition. Le stock de géniteurs de BZ2019 est maintenu séparément par deux producteurs de poissons d'aquarium en Floride.

1.3.1.1.2 Caractérisation du transgène intégré

La séquence des constructions géniques telles qu'elles sont insérées dans le BZ2019 n'a pas été déterminée, et l'emplacement précis des insertions dans le génome de l'organisme n'a pas été présenté. Le croisement de poissons de la génération F2, hémizygotes pour le transgène, avec des poissons non transgéniques a produit environ 50 % de descendants transgéniques quatre jours après la fécondation. Cela indique soit un seul lieu d'insertion des transgènes, soit plusieurs sites d'insertion qui sont étroitement liés à la ségrégation mendélienne.

Le nombre de copies du transgène a été estimé par PCR quantitative en temps réel (qPCR) sur le BZ2019 hémizygote de génération F2, et une analyse compétitive de la PCR a permis d'estimer le ratio d'une construction par rapport à l'autre. Les résultats indiquent que plusieurs copies des deux cassettes transgéniques ont été incorporées dans le génome du poisson BZ2019.

1.3.1.1.3 Hérédité et stabilité du transgène

L'emplacement précis de l'insertion du transgène est inconnu et il est impossible de déterminer si le transgène est inséré dans un emplacement stable du génome ou dans une zone sujette au silençage (Uh *et al*. 2006). Dans d'autres organismes transgéniques, le nombre élevé de copies des protéines fluorescentes insérées a entraîné un silençage génique par modification épigénétique. Par exemple, chez le poisson zèbre contenant un transgène de la protéine fluorescente verte motivé par la séquence d'activation en amont (UAS), un silençage

transgénérationnel du transgène était plus probable lorsque le nombre de copies était relativement élevé (p. ex. quatorze copies) que faible (p. ex. quatre copies, Akitake *et al*. 2011). Le potentiel de réactivation après un tel silençage n'est pas connu.

La progéniture issue d'accouplements par paires uniques d'individus hémizygotes F2 avec des poissons non transgéniques n'était pas significativement différente de 50 % de fluorescence dans la plupart des familles, ce qui indique que les constructions sont probablement héritées comme un seul locus. Cependant, dans l'ensemble, la proportion de descendants fluorescents était légèrement, mais significativement inférieure à 50 %. Le génotype des descendants non fluorescents n'ayant pas été déterminé, il est impossible de conclure si ce pourcentage inférieur est dû à une diminution de la viabilité des gamètes ou des larves fluorescentes, ou au silençage du transgène chez certains individus. La stabilité génétique n'a été examinée qu'à une seule génération et n'a pas été démontrée sur plusieurs générations.

1.3.1.1.4 Méthodes de détection des poissons BZ2019

Les individus BZ2019 se distinguent facilement des poissons zèbres dorés non transgéniques par leur coloration phénotypique bleue sous la lumière naturelle/normale. Bien que sa coloration soit similaire à celle du poisson zèbre rayé non transgénique, le BZ2019 peut être distingué par sa fluorescence sous la lumière bleue ou UV. Aucune espèce de cyprinidé non transgénique connue ne présente une coloration bleue fluorescente similaire, ce qui rend les individus BZ2019 facilement distinguables phénotypiquement des autres espèces non transgéniques, sauf en cas de silençage génique. Les poissons BZ2019 peuvent également être distingués génétiquement par amplification PCR et détection de fragments uniques qui résultent de la digestion par une enzyme de restriction de l'insert transgénique.

1.3.1.2 Caractérisation phénotypique

1.3.1.2.1 Effets phénotypiques ciblés de la modification

L'effet phénotypique ciblé de la modification génétique est que le BZ2019 apparaisse bleu à la lumière ambiante. Ce nouveau phénotype de couleur est présent dans les muscles, la peau et les yeux. En ce qui a trait à l'insertion du transgène, GloFish LLC signale que les BZ2019 hémizygotes et homozygotes ne peuvent être distingués l'un de l'autre sur le plan phénotypique et que les deux sont offerts sur le marché.

1.3.1.2.2 Effets phénotypiques non ciblés de la modification

GloFish LLC indique deux effets non ciblés dans les poissons BZ2019 : la diminution de la progéniture fluorescente dans les essais par paires avec des poissons non transgéniques, et la réduction du succès de la reproduction en cas de concurrence avec des fratries non transgéniques pour les partenaires. Dans les essais par paires, la proportion globale de descendants fluorescents était inférieure aux 50 % attendus, ce qui suggère une viabilité réduite des gamètes ou des larves contenant le transgène fluorescent (hémizygotes) par rapport à ceux qui ne contiennent pas le transgène, ou le silençage du transgène chez certains individus. Dans les essais de succès de la reproduction en situation de concurrence, la proportion de descendants bleus était plus importante que prévu dans certains essais, mais globalement, et pour la plupart des essais, elle était sensiblement plus faible que le résultat attendu du seul assortiment aléatoire, ce qui permet de penser que le BZ2019 pourrait être désavantagé sur le plan de la reproduction par rapport au poisson zèbre non transgénique. Cette différence demeurait considérable lorsque la viabilité réduite des gamètes ou larves bleues était prise en compte ($p < 0,001$).

L'entreprise a effectué un test de tolérance aux basses températures en comparant la capacité de survie du BZ2019 hémizygote à celle des poissons zèbres dorés non transgéniques pendant

une baisse de température. Toutefois, une analyse des données fournies par la société a révélé que la différence de tolérance au froid entre les deux groupes était insignifiante (p = 0,800), tandis que la différence de DL_{50} entre les génotypes était très faible (0,12 °C). La DL_{100} (dose létale à laquelle 100 % des poissons sont morts) des deux génotypes était semblable et variait de 4,5 à 5,0 °C entre les essais.

Le déclarant a soumis un rapport de diagnostic examinant la nécropsie, la microbiologie et l'histologie du BZ2019. Hormis la présence de parasites nématodes dans deux des six poissons, qui n'est pas liée à la nature transgénique des poissons, aucun résultat habituel n'a été signalé. Les poissons BZ2019 n'ont pas été comparés à des fratries non transgéniques.

Aucune étude formelle n'a comparé la sensibilité potentielle aux maladies des BZ2019 à celle de souches non transgéniques. Il n'existe pas non plus de telles études pour les effets non ciblés potentiels de la modification génétique sur le cycle biologique (autre que le succès de la reproduction), les tolérances et les exigences relatives à l'environnement (autres que la tolérance aux températures basses), le métabolisme, la physiologie, l'endocrinologie et le comportement. Toutefois, il n'y a aucun rapport anecdotique ou autre sur des effets non ciblés autres que ceux susmentionnés.

1.3.1.2.3 Effets pléiotropiques des transgènes de la protéine fluorescente chez d'autres poissons zèbres

Un aperçu détaillé des effets pléiotropiques des transgènes de la protéine fluorescente qui ont été observés chez d'autres poissons zèbres est présenté dans Noble-Brzezinski *et al.* (2021).

1.3.2 Danio Galactic Purple^{MD} (PZ2019)

1.3.2.1 Caractérisation moléculaire

Le PZ2019 est un « poisson zèbre doré » génétiquement modifié qui possède une seule zone d'insertion contenant plusieurs copies d'une cassette d'expression. Cette modification génétique se traduit par une coloration mauve de l'organisme sous la lumière blanche ambiante, et une coloration mauve fluorescente sous la lumière UV. Cette modification génétique a pour but de créer un nouveau phénotype de couleur chez le *D. rerio*; ce nouvel organisme est destiné au commerce des poissons ornementaux d'aquarium (figure 1.1).

Bien que l'entreprise ait fourni plus de détails sur la structure, l'élaboration et la fonction de la construction transgénique utilisée pour créer le BZ2019 aux fins de l'examen, ces renseignements sont considérés comme des renseignements commerciaux confidentiels et ne peuvent être inclus dans ce rapport.

1.3.2.1.1 Production de l'organisme déclaré

La cassette d'expression transgénique purifiée a été injectée dans des œufs nouvellement fécondés de poisson zèbre doré. Un seul individu fondateur (G0) a été identifié par son phénotype (couleur mauve) et a été croisé séparément avec plusieurs poissons zèbres dorés non transgéniques pour produire plusieurs descendants F1. Un lot d'alevins F1 exprimant la couleur mauve a été élevé jusqu'à maturité, puis croisé avec des poissons zèbres dorés non transgéniques pour produire une population de poissons F2.

La confirmation que tous les poissons F2 contiennent des sites d'insertion homogènes et constituent une seule lignée homogène a été réalisée par clivage enzymatique et analyse par transfert de Southern. Sur les 133 poissons F2 qui ont été analysés, quatre présentaient une autre lignée génétique et n'ont pas été utilisés pour la propagation de la lignée PZ2019 ou pour d'autres analyses.

La confirmation que le squelette du vecteur n'était pas incorporée dans l'organisme a été effectuée sur plusieurs poissons de la génération F2 par PCR en utilisant des amorces spécifiques pour quatre endroits différents de le squelette du vecteur. Comme pour le BZ2019, un promoteur du bactériophage T3 a été identifié en amont du promoteur de bêta-actine aviaire, ce qui indique qu'une partie de le squelette du vecteur était présente dans la construction finale insérée.

La poursuite de la lignée PZ2019 a été assurée par un élevage en lots dans des populations composées d'un mélange d'individus hémizygotes et homozygotes pour le transgène, les poissons zèbres dorés non transgéniques étant retirés de la population à mesure de leur apparition. Le stock de géniteurs de PZ2019 est maintenu séparément par deux producteurs de poissons d'aquarium en Floride.

1.3.2.1.2 Caractérisation du transgène intégré

La séquence de la cassette telle qu'elle est insérée dans le génome du PZ2019 n'a pas été déterminée, et l'emplacement précis de l'insert dans le génome du PZ2019 est inconnu.

Le nombre de copies de transgènes a été estimé par PCR quantitative en temps réel (qPCR) sur six PZ2019 hémizygotes de la génération F2. Les résultats indiquent que plusieurs copies des constructions transgéniques ont été incorporées dans le génome du poisson PZ2019.

1.3.2.1.3 Hérédité et stabilité du transgène

L'emplacement précis de l'insertion du transgène n'a pas été déterminé et on ne sait pas si le transgène est inséré dans un emplacement stable du génome ou dans une zone sujette au silençage. En cas de silençage de l'expression du transgène chez un individu, celui-ci ne présenterait pas la coloration mauve et serait, par conséquent, retiré de la population reproductrice et supprimé. Quatre individus F2 présentaient d'autres profils de bandes sur le transfert de Southern et n'ont pas été utilisés pour la propagation de la lignée. Deux de ces poissons avaient des profils de bandes distinctement différents de ceux de tous les autres poissons F2, dénotant des sites d'intégration différents au stade G0. Cependant, les deux autres affichaient des profils de bandes similaires à ceux utilisés pour la propagation de la lignée, mais il manquait une bande à l'un et l'intensité était plus faible chez l'autre. Ces deux poissons auraient également pu être le résultat d'intégrations différentes au stade G0, mais cela pourrait également être indicatif d'une perte potentielle du nombre de copies du transgène entre les stades G0 et F2 et d'une éventuelle instabilité de la lignée.

La progéniture issue d'accouplements par paires uniques entre individus hémizygotes F2 et poissons non transgéniques n'était pas significativement différente de 50 % de fluorescence dans la plupart des familles, ce qui montre que la construction est probablement héritée comme un seul locus. Cependant, dans l'ensemble, la proportion de descendants fluorescents était légèrement, mais significativement inférieure à 50 %. Le génotype des descendants non fluorescents n'ayant pas été déterminé, il est impossible de conclure si ce pourcentage inférieur est dû à une diminution de la viabilité des gamètes ou des larves fluorescentes, ou au silençage du transgène chez certains individus. L'hérédité et la stabilité n'ont pas été examinées dans les générations suivantes.

1.3.2.1.4 Méthodes de détection des poissons PZ2019

Les individus PZ2019 se distinguent facilement des poissons zèbres non transgéniques par leur coloration mauve uniforme à la lumière naturelle et leur coloration fluorescente à la lumière bleue ou UV. Aucune espèce connue de poisson zèbre ne présente une coloration similaire, ce qui rend les individus PZ2019 faciles à distinguer des poissons zèbres non transgéniques. Les poissons PZ2019 peuvent également être distingués génétiquement par amplification PCR et

détection de fragments uniques qui résultent de la digestion par une enzyme de restriction de l'insert transgénique.

1.3.2.2 Caractérisation phénotypique

1.3.2.2.1 Effets phénotypiques ciblés de la modification

L'effet phénotypique ciblé de la modification génétique est que le PZ2019 apparaisse mauve à la lumière ambiante. Ce nouveau phénotype de couleur est présent dans les muscles, la peau et les yeux. En ce qui a trait à l'insert transgénique, GloFish LLC signale que les PZ2019 hémizygotes et homozygotes ne peuvent être distingués l'un de l'autre sur le plan phénotypique et que les deux sont offerts sur le marché.

1.3.2.2.2 Effets phénotypiques non ciblés de la modification

GloFish LLC indique deux effets non ciblés dans les poissons PZ2019 : la diminution de la progéniture fluorescente dans les essais par paires avec des poissons non transgéniques, et une réduction du succès de la reproduction en cas de concurrence avec des fratries non transgéniques pour les partenaires. Dans les essais par paires, la proportion globale de descendants fluorescents était inférieure aux 50 % attendus, ce qui suggère une viabilité réduite des gamètes ou des larves contenant le transgène fluorescent par rapport à ceux qui ne contiennent pas le transgène, ou le silençage du transgène chez certains individus. Dans les essais de succès de la reproduction en situation de concurrence, la proportion observée de descendants transgéniques (mauves) était nettement inférieure à la proportion attendue de l'assortiment aléatoire seul (0,3661 contre 0,4375, respectivement, $p<0,001$), ce qui permet de penser que le PZ2019 pourrait être désavantagé sur le plan de la reproduction par rapport au poisson zèbre non transgénique; cependant, au niveau des individus, la moitié des groupes n'affichait aucune différence marquée. Cette différence globale demeurait considérable lorsque la viabilité réduite des gamètes ou larves mauves était prise en compte ($p < 0,001$). Les effets de la modification génétique sur les autres phénotypes, notamment la survie, la fécondité et le comportement, n'ont pas fait l'objet d'un examen formel.

Le déclarant a également examiné la tolérance aux températures plus basses du PZ2019 par rapport au poisson zèbre doré non transgénique, mais n'a pas trouvé de différence significative dans la DL_{50} ($p=0,300$). La DL_{100} (dose létale à laquelle 100 % des poissons sont morts) des deux génotypes était semblable et variait de 4,6 à 4,8 °C entre les essais.

Le déclarant a soumis un rapport de diagnostic examinant la nécropsie, la microbiologie et l'histologie du PZ2019. Aucun résultat habituel n'a été présenté, bien que les poissons PZ2019 n'aient pas été comparés à des fratries de poissons non transgéniques.

Aucune étude formelle n'a comparé la sensibilité potentielle aux maladies des PZ2019 à celle de souches non transgéniques. Il n'existe pas non plus de telles études pour les effets non ciblés potentiels de la modification génétique sur le cycle biologique (autre que le succès de la reproduction), les tolérances et les exigences relatives à l'environnement (autres que la tolérance aux températures basses), le métabolisme, la physiologie, l'endocrinologie et le comportement. Toutefois, il n'y a aucun rapport anecdotique ou autre sur des effets non ciblés autres que ceux susmentionnés.

1.3.2.2.3 Effets pléiotropiques des transgènes de la protéine fluorescente chez les poissons zèbres

Un aperçu détaillé des effets pléiotropiques des transgènes de la protéine fluorescente qui ont été observés chez d'autres poissons zèbres est présenté dans Noble-Brzezinski *et al.* (2021).

1.3.3 Caractérisation par rapport aux GloFish^{MD} déclarés et évalués précédemment

Le BZ2019 et le PZ2019 ont été produits selon les mêmes méthodes et protocoles d'essai que les lignées de danio et de tétra GloFish^{MD} déclarées et approuvées précédemment. Toutes les lignées de danio et de tétra GloFish^{MD} déclarées antérieurement et à l'heure actuelle ont utilisé des cassettes et des éléments d'expression du transgène similaires (séquences de promoteurs et de terminaison), bien que les gènes des pigments varient d'une couleur à l'autre. Les essais de caractérisation moléculaire et phénotypique effectués par l'entreprise ont été identiques pour les lignées GloFish^{MD} actuelles et celles qui ont déclarées précédemment, et les résultats du BZ2019 et du PZ2019 recoupent une partie ou la totalité des lignées déjà déclarées (voir le tableau 1.1). Une exception à cette règle est le nombre estimé de copies des constructions transgéniques insérées, tel que déterminé par PCR quantitative, et la lignée génétique spécifique telle que déterminée par les transferts de Southern, bien que les profils des bandes des lignées déclarées ici se situent dans lagamme des lignées précédentes (tableau 1.1).

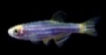
1.3.4 Caractérisation des organismes déclarés – Sommaire

Les caractérisations moléculaires et phénotypiques du BZ2019 et du PZ2019 se situent dans la gamme des lignées de danio et de tétra GloFish^{MD} déjà déclarées et évaluées (voir le tableau 1.1). La caractérisation des deux lignées a été bien décrite en ce qui concerne la fonction des constructions transgéniques, la lignée génétique des poissons géniteurs, l'effet phénotypique ciblé (couleur) et certains effets non ciblés (tolérance au froid, reproduction). Toutefois, des incertitudes subsistent concernant certains aspects de la caractérisation moléculaire (p. ex. la stabilité de la lignée, le nombre de copies) et de la caractérisation phénotypique (p. ex. les effets sur la résistance aux maladies, le comportement, d'autres caractéristiques qui peuvent influencer la valeur adaptative ou le risque potentiel), ce qui donne une incertitude globale modérée dans la caractérisation du BZ2019 et du PZ2019. Cette incertitude équivaut à l'incertitude de la caractérisation des danios et tétras GloFish^{MD} déjà déclarés et évalués, bien que l'incertitude soit moindre dans certaines caractéristiques des lignées actuelles par rapport à certaines lignées précédentes (c'est-à-dire la lignée génétique par rapport au YZ2018).

1.4 CARACTÉRISATION DES ESPÈCES COMPARABLES

Aux fins de la présente évaluation, on a utilisé le poisson zèbre domestiqué non transgénique ou le poisson zèbre sauvage comme espèce comparable à l'organisme déclaré. Il s'agit de la même espèce comparable que celle utilisée pour le YZ2018 précédemment déclaré (danio GloFish^{MD} Sunburst Orange^{MD}). Un aperçu détaillé du poisson zèbre est fourni dans Noble-Brzezinski *et al.* (2021).

*Tableau 1.1 : Sommaire de la caractérisation de toutes les lignées GloFish[MD] déclarées en vertu de la LCPE pour la vente au Canada dans les commerces du poisson d'ornement. * indique des différences significatives (p<0,05). Les données sont présentées sous forme de moyenne ± l'erreur-type de la moyenne, le cas échéant.*

Caractérisation	BZ2019	PZ2019	YZ2018	BT2018	OT2018	PiT2018	PuT2018	RT2018	CGT2016
									
Nom commercial	Danio Cosmic Blue[MD]	Danio Galactic Purple[MD]	Danio Sunburst Orange[MD]	Tétra Cosmic Blue[MD]	Tétra Sunburst Orange[MD]	Tétra Moonrise Pink[MD]	Tétra Galactic Purple[MD]	Tétra Starfire Red[MD]	Tétra Galactic Green[MD]
Espèce	*Danio rerio*	*D. rerio*	*D. rerio*	*Gymno-corymbus ternetzi*	*G. ternetzi*	*G. ternetzi*	*G. ternetzi*	*G. ternetzi*	*G. ternetzi*
Variété à longue nageoire présente	Non	Non	Non	Non	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
% de descendants fluorescents dans les croisements par paires avec des poissons non transgéniques (=différence par rapport aux 50 % attendus)*	47,1±1,1*	47,4±0,9*	48,2±0,6	48,4±0,6*	49,2±0,4	46,5±1,4*	48,0±1,6	50,0±1,2	50,2±1,9
% de descendants fluorescents en situation de concurrence pour la reproduction avec des poissons non transgéniques (=différence par rapport aux 40 ou 43,75 % attendus)*	40,2±4,4*	38,6±3,1*	20,5±4,2*	38,6±3,2	35,9±3,2*	35,1±3,9	39,4±4,6	19,0±5,7*	24v9±5,1*
DL_{50} des poissons déclarés par rapport aux poissons non transgéniques pendant la baisse de température	5,66 contre 5,54 ºC*	5,71 contre 5,52 ºC	5,87 contre 5,56 ºC*	8,02 contre 7,64 ºC*	9,07 contre 8,95 ºC*	8,03 contre 7,95 ºC	7,28 contre 7,08 ºC*	7,78 contre 7,31 ºC*	8,11 contre 7,94 ºC*
Présence de poissons homozygotes	Oui	Oui	Oui	Non	Oui	Non	Non	Oui	Oui
Date de production commerciale – États-Unis	2010	2011	2012	2014	2013	2013	2013	2014	2012
Approuvé pour la vente au Canada	2019	2019	2019	2018	2018	2018	2018	2018	2017

1.5 CARACTÉRISATION DU MILIEU RÉCEPTEUR POTENTIEL

Une description détaillée des milieux récepteurs potentiels au Canada, pertinents pour l'introduction de poissons tropicaux d'eau douce, est présentée dans Leggatt *et al.* (2018b).

PARTIE 2 : ÉVALUATION DES RISQUES POUR L'ENVIRONNEMENT

2.1 OBJET DE LA PARTIE 2

La partie 2 de ce document comprend l'évaluation des risques pour l'environnement réalisée en vertu de la *Loi canadienne sur la protection de l'environnement* (LCPE) en ce qui concerne les deux lignées de poissons GloFish[MD] qui sont décrites dans la première partie de ce document, et qui ont été déclarées par GloFish LLC en vertu du *Règlement sur les renseignements concernant les substances nouvelles (organismes)*. Étant donné les espèces comparables communes et les similitudes physiologiques et écologiques entre les deux lignées, la section suivante examinera les deux en même temps. Le format de l'évaluation des risques pour l'environnement suit celui utilisé pour les tétras GloFish[MD] (MPO 2019) et les danios GloFish[MD] Sunburst Orange[MD] (MPO 2020) déjà déclarés et les résultats de l'évaluation actuelle sont équivalents à ceux des évaluations précédentes des poissons GloFish[MD], sauf indication contraire.

2.2 ÉVALUATION DE L'EXPOSITION

L'évaluation de l'exposition pour les deux organismes vivants aborde tant la probabilité de les voir pénétrer dans l'environnement (rejet) que leur devenir une fois dans l'environnement. La probabilité et l'ampleur de l'exposition environnementale sont déterminées au moyen d'une évaluation exhaustive qui détaille le potentiel de rejet, de survie, de persistance, de reproduction, de prolifération et de propagation dans l'environnement canadien. Le tableau 2.1 présente le classement des probabilités d'exposition de l'environnement canadien.

Tableau 2.1 : Classement de la probabilité d'exposition de l'environnement canadien aux poissons génétiquement modifiés.

Classement de l'exposition	**Évaluation**
Négligeable	Aucune présence; aucune observation dans l'environnement canadien[1]
Faible	Présence rare, isolée ou éphémère
Modérée	Présence fréquente, mais seulement à certaines périodes de l'année ou dans des régions isolées
Élevée	Présence fréquente tout au long de l'année ou dans des régions diffuses

[1]Extrêmement improbable ou imprévisible

En raison du statut réglementaire des poissons génétiquement modifiés étudiés dans le cadre d'une évaluation des risques pour l'environnement réalisée en vertu de la LCPE, les données empiriques insuffisantes sur la survie, la valeur adaptative et la capacité de reproduction du BZ2019 et du PZ2019 dans l'environnement naturel contribueront à l'incertitude de l'évaluation de l'exposition. L'incertitude associée au devenir d'un organisme dans l'environnement ou à une défaillance du confinement biologique ou géographique peut dépendre de la disponibilité et de la validité de l'information scientifique sur les paramètres biologiques et écologiques de l'organisme, des substituts valides et du milieu récepteur. Le tableau 2.2 présente un classement de l'incertitude associée à la probabilité de présence de l'organisme et à son devenir dans l'environnement canadien.

Tableau 2.2 : Classement de l'incertitude associée à la probabilité de présence de l'organisme et à son devenir dans l'environnement canadien (exposition de l'environnement).

Classement de l'incertitude	Renseignements disponibles
Négligeable	Données de grande qualité sur l'organisme (p. ex. stérilité, tolérance aux températures, valeur adaptative). Données sur les paramètres environnementaux du milieu récepteur et au point d'entrée. Preuve de l'absence d'interactions génotype-environnement (GxE) ou parfaite compréhension de ces derniers dans les différentes conditions environnementales pertinentes. Signes d'une faible variabilité.
Faible	Données de grande qualité sur des organismes apparentés ou des substituts valides. Données sur les paramètres environnementaux du milieu récepteur. Compréhension des effets possibles des interactions génotype-environnement dans les différentes conditions environnementales pertinentes. Signes de variabilité.
Modérée	Données limitées sur l'organisme, les organismes apparentés ou les substituts valides. Données limitées sur les paramètres environnementaux du milieu récepteur. Lacunes dans les connaissances. Dépendance à l'égard de l'historique d'utilisation ou l'expérience avec des populations dans d'autres zones géographiques dont les conditions environnementales sont semblables à celles du Canada ou meilleures.
Élevée	Importantes lacunes dans les connaissances. Dépendance importante à l'égard de l'opinion des experts.

Toutes les évaluations précédentes des lignées de danios et de tétras GloFish^{MD} déclarées et évaluées ont conclu à une faible exposition de l'environnement avec une faible incertitude (MPO 2018, 2019, 2020). Aucune caractéristique moléculaire ou phénotypique connue du BZ2019 ou du PZ2019 ne suggère un classement différent de celui des lignées précédemment évaluées (y compris une autre lignée de poisson zèbre, YZ2018), et aucune nouvelle publication scientifique ne permet de modifier les classements précédents. Par conséquent, les évaluations de l'exposition environnementale pour le BZ2019 et le PZ2019 sont faibles, avec une incertitude faible qui est conforme aux lignées déjà déclarées. Les détails à l'appui de cette conclusion suivent.

2.2.1 Probabilité de rejet

Bien que l'organisme soit destiné à la vente sur le marché des poissons d'ornement et que la plupart des amateurs qui achètent le produit suivent les instructions d'élimination recommandées par le détaillant ou l'entreprise elle-même, il est malgré tout fort probable que des BZ2019 et des PZ2019 seront introduits dans l'environnement canadien. Une fois l'organisme vendu au détail, il n'est plus sous le contrôle direct de l'importateur; il n'y a donc aucune garantie que les poissons seront adéquatement confinés et éliminés par la suite. De nombreux poissons d'aquarium se sont établis dans des milieux aquatiques naturels en Amérique du Nord, et il semble que le rejet de poissons d'aquarium dans l'environnement est

une pratique courante et continue, comme en témoignent les cas récurrents, mais isolés de poissons d'aquarium observés dans les eaux canadiennes (Kerr *et al*. 2005; Rixon *et al*. 2005; Marson *et al*. 2009; Strecker *et al*. 2011). Cela correspond à une forte probabilité de rejet des tétras GloFish[MD] et des danios GloFish[MD] Sunburst Orange[MD] déclarés précédemment. La mesure dans laquelle le BZ2019 et le PZ2019 pourraient être exposés à l'environnement dépendra donc fortement de leur capacité à survivre et à se reproduire dans les lacs et les rivières du Canada.

2.2.2 Probabilité de survie

En tant qu'espèce tropicale, le poisson zèbre ne devrait pas pouvoir survivre dans une région tempérée où les températures de l'eau sont inférieures aux températures optimales pour sa survie. La température de l'eau est un facteur abiotique clé ayant des répercussions tant sur la survie que sur la reproduction de la plupart des populations de poissons d'eau douce, et il s'agit d'un déterminant puissant du caractère propice d'un habitat (Magnuson *et al*. 1979; Jobling 1981). La température optimale pour l'élevage du poisson zèbre est de 26 à 28,5 °C, mais il peut tolérer une large gamme de températures dans son milieu naturel, allant de 6 °C en hiver à plus de 38 °C en été (Spence *et al*. 2008; López-Olmeda et Sánchez-Vázquez 2011; Arunachalam *et al*. 2013; Little *et al*. 2013). Le poisson zèbre adulte non transgénique et le poisson zèbre transgénique (avec un gène codant pour une protéine fluorescente) survivent tous deux dans une large gamme de températures en laboratoire, respectivement de 5,3 à 41,7 °C et de 5,6 à 41,4 °C, respectivement, lors d'essais de tolérance aux températures extrêmes (Essner 2003; Cortemeglia et Beitinger 2005, 2006a; Schaefer er Ryan 2006). Les données recueillies par le MPO font état d'une plage de tolérance aux températures minimales de 6,6 à 4,8 °C pour le poisson zèbre doré (DL_{50} = 5,59, voir la figure 2.1), tandis que les lignées non transgéniques et transgéniques produites pour la recherche perdent leur équilibre en moyenne entre 5,38 et 5,90 °C (voir la figure 2.2, Leggatt *et al*. 2018a). Ces données montrent que le poisson zèbre tolère toujours des températures minimales moyennes autour de 5 °C, quel que soit le génotype, lorsque la température baisse relativement rapidement dans des conditions de laboratoire (c'est-à-dire de 1 °C par jour ou plus). Des études sur le terrain ont confirmé que les poissons zèbres non transgéniques et transgéniques ne survivraient pas dans des eaux dont la température est inférieure ou égale à 5 °C (Cortemeglia *et al*. 2008; Ribas et Piferrer 2014). De même, lorsque les poissons ont été retirés pendant les essais de température et acclimatés à des températures basses et constantes, les poissons zèbres non transgéniques et trois lignées de poissons zèbres transgéniques fluorescents ont survécu et se sont remis de quatre mois d'élevage à 8 °C, mais n'ont pas pu survivre au-delà d'une semaine d'élevage à 6 °C. Cela indique qu'en dépit des tolérances signalées aux alentours de 5 °C, la limite effective de tolérance au froid des protéines fluorescentes transgéniques et non transgéniques du poisson zèbre se situe probablement entre 6 et 8 °C exclusivement (Leggatt *et al*. 2018a), bien que la tolérance à la température puisse varier selon le stade biologique.

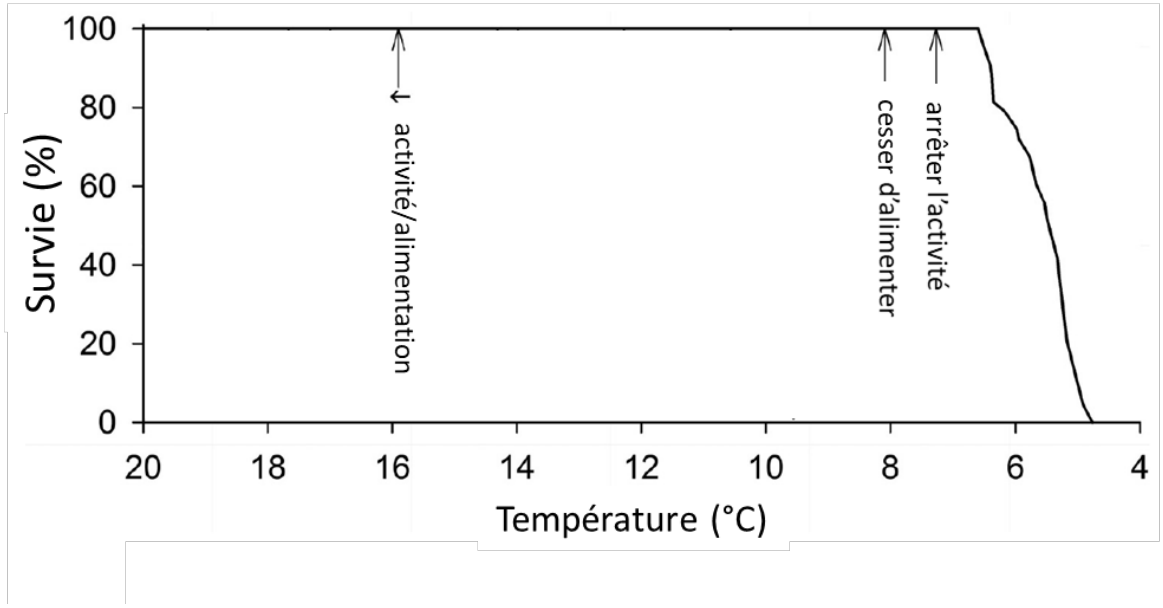


Figure 2.1 : Survie et changements d'activité et de niveau d'alimentation chez la variété dorée non transgénique lorsque les températures sont abaissées progressivement de 20 °C à un rythme de 1 °C par jour (40 poissons zèbres, Danio rerio, répartis dans deux bassins). Figure modifiée de Leggatt et al. (2018a).

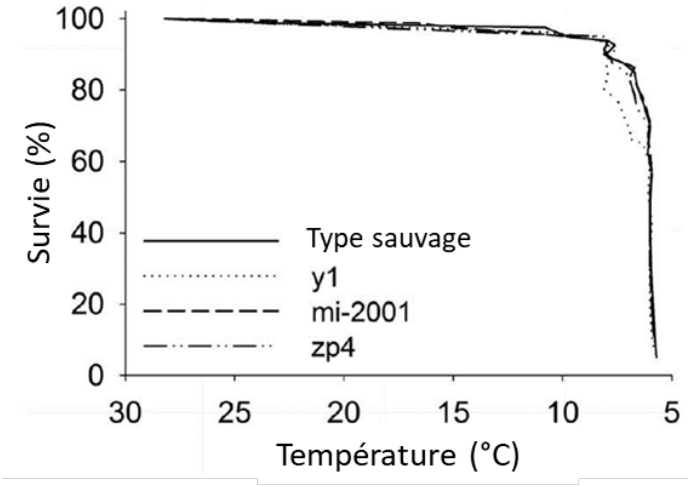


Figure 2.2 : Survie lors d'une exposition progressive au froid de trois lignées de poisson zèbre (Danio rerio) porteuses du transgène (y1, mi2001, zp4) de la protéine fluorescente verte (GFP) et de leur lignée progénitrice non transgénique (AB, type sauvage). La température a été abaissée de 28 à 12 °C à un taux d'environ 1 °C par jour, puis de 12 à 5,1 °C à un taux d'environ 0,1 °C par jour (80 poissons zèbres par lignée, répartis dans quatre bassins). Figure modifiée de Leggatt et al. (2018a).

GloFish Technologies a également mené des recherches sur la tolérance aux températures plus basses des poissons zèbres dorés, BZ2019 et PZ2019, et a fourni les données de ses expériences dans son dossier de déclaration. Ces expériences ont montré que le BZ2019 (DL_{50}=5,66 °C) et le PZ2019 (DL_{50}=5,71 °C) présentaient tous deux une tolérance aux basses températures plus élevée que le poisson zèbre doré non transgénique (DL_{50}=5,54-5,52 °C)

lorsque les températures chutent rapidement à un taux de 0,5-1 °C par heure (une différence de 0,12-0,19 °C, voir les figures 1.6, 1.11), bien que cela ne soit significatif que pour le BZ2019. Bien que la température létale inférieure observée se situe entre 4,4 et 7,9 °C, le changement rapide de température peut ne pas être représentatif d'un réseau naturel. Indépendamment de la différence de méthodologie et de résultats, lorsque ces études sont prises ensemble, il est raisonnable de conclure que le poisson zèbre doré, le BZ2019 et le PZ2019 ne peuvent pas survivre à des températures inférieures à 4 °C, et ne peuvent probablement pas survivre à long terme à 6 °C ou moins.

Il n'y a aucun lac connu au Canada dont l'eau demeure constamment au-dessus de 7 °C pendant une année entière, ou au-dessus de 6 °C sur plusieurs années, et la température de presque tous les lacs ne reste pas au-dessus de 4 °C tout au long de l'année. Par conséquent, même si les températures nécessaires à la survie du BZ2019 et du PZ2019 sont possibles pour plusieurs lacs canadiens au printemps, à l'été et à l'automne, il est très peu probable que le BZ2019 et le PZ2019 puissent survivre à l'hiver canadien. Au mieux, leur présence dans l'environnement serait saisonnière ou éphémère. Cette affirmation est encore étayée par l'absence d'établissement du poisson zèbre après des observations dans des climats beaucoup plus chauds (p. ex. en Floride, aux États-Unis, où les températures sont généralement supérieures à 8 °C toute l'année, voir plus loin).

Les températures moyennes de la surface dans l'eau douce au Canada se réchauffent sous l'effet des changements climatiques mondiaux, et devraient augmenter de 1,5 à 4,0 °C dans les 50 prochaines années (MPO 2013). L'augmentation des températures de l'eau en hiver dans les quelques lacs isolés où la couverture de glace est rare dans le sud-ouest de la Colombie-Britannique pourrait accroître la possibilité de survie en hiver dans ces lacs isolés. Toutefois, dans la majorité des réseaux d'eau douce où la couverture de glace est importante en hiver, les changements climatiques devraient réduire le nombre de jours de glace (MPO 2013), mais les températures devraient toujours être égales ou inférieures à 4 °C à un moment donné pendant l'hiver, ce qui empêcherait la survie à l'année du BZ2019 et du PZ2019. De même, en Floride, Tuckett *et al*. (2017) ont observé que le poisson zèbre survivait dans des réseaux naturels où la température de l'eau variait de 8,7 °C à 32,5 °C (moyenne de 21,7 °C), mais seulement à proximité immédiate (<500 m) des installations d'aquaculture d'ornement desquelles ils s'étaient probablement échappés. Les auteurs avancent que le manque de dispersion observé peut être le résultat d'une eau relativement froide dans la Floride subtropicale, de poissons prédateurs et d'autres facteurs liés à l'habitat physique ou biologique. Les données sur la tolérance au froid, combinées à l'absence d'établissement du poisson zèbre dans des régions plus chaudes que le Canada, suggèrent un potentiel limité de survie dans les eaux canadiennes, même avec les températures de l'eau plus élevées associées aux changements climatiques.

2.2.3 Probabilité de reproduction

Bien que les températures de l'eau au Canada limitent la persistance des BZ2019 et PZ2019 introduits dans l'environnement (voir la section 2.2.2), ceux-ci pourraient néanmoins avoir le temps de se reproduire s'ils sont introduits au début de la saison chaude. Par exemple, le lac Osoyoos, dans l'intérieur de la Colombie-Britannique, est l'un des lacs les plus chauds du Canada en été, avec une température moyenne comprise entre 20 et 25 °C pendant environ deux mois de l'année (de la mi-juillet à la mi-septembre), les températures plus élevées (p. ex. 25 °C) étant limitées à une période encore plus courte (p. ex. fin juillet – début août, BCLSS 2013). Si cette plage de températures est idéale pour la survie du poisson zèbre, des températures plus élevées (27-30 °C) sont plus propices à la reproduction (López-Olmeda et Sánchez-Vázquez 2011). Le poisson zèbre peut frayer à des températures plus basses, mais des températures inférieures à 24 °C peuvent réduire l'incidence de la reproduction, induire des

défauts de développement chez la progéniture et fausser le sex-ratio chez la progéniture (Schirone et Gross 1968; Barrionuevo et Burggren 1999; Hallare *et al*. 2005; Sfakianakis *et al*. 2012). Il a également été démontré que les indices saisonniers, les indices diurnes et la disponibilité de la nourriture ont une influence sur la fraie et le succès de la reproduction du poisson zèbre.

Le poisson zèbre est un reproducteur prolifique et la fraie peut avoir lieu tous les 4 à 7 jours, la progéniture arrivant à maturité en seulement 2,5 mois dans des conditions de laboratoire idéales. Cependant, l'absence ou la prévalence limitée de températures idéales pour la reproduction au Canada indiquent que la reproduction serait limitée à une courte période pendant une partie de l'été, quel que soit l'âge au moment de l'introduction. Par exemple, un BZ2019 ou un PZ2019 introduit dans le lac Osoyoos au début du mois de juillet aurait deux mois dans un nouvel environnement pour trouver l'habitat et les ressources nécessaires à la reproduction, ainsi que des congénères avec lesquels se reproduire, et la période des températures de fraie optimales pourrait ne durer que quelques semaines. Bien que les œufs fécondés qui ne sont pas consommés par des prédateurs puissent éclore relativement rapidement (3 à 7 jours, Kimmel *et al*. 1995; Lawrence 2007), la progéniture n'arrivera pas à maturité avant l'arrivée de températures plus fraîches à la fin de l'été et ne survivra pas à l'hiver. La diminution du succès de la reproduction en situation de concurrence pour le PZ2019 et le BZ2019 indique que ces lignées n'ont pas un potentiel de reproduction plus grand que les poissons zèbres non transgéniques. Même si des possibilités isolées de reproduction dans l'environnement canadien peuvent se produire, cette reproduction ne pourrait jamais se traduire par la présence de plus de deux générations dans le milieu en même temps.

Des hybrides interspécifiques ont été signalés entre *D. rerio* et *Danio albolineatus* (synonyme de *Brachydanio albolineatus*, nom commun danio perlé, Axelrod et Vorderwinkler 1976), mais l'hybride F1 est stérile. Plusieurs genres de la famille des cyprinidés sont présents au Canada, mais on ne sait pas s'ils pourraient se reproduire avec le poisson zèbre ou produire une progéniture fertile.

2.2.4 Probabilité de prolifération et de dissémination

Le BZ2019 et le PZ2019 ne peuvent proliférer et se disséminer dans l'environnement canadien, puisque le poisson zèbre ne peut survivre à l'hiver. Il convient de noter que les spécimens de BZ2019 et PZ2019 relâchés occuperaient probablement des zones proches du rivage, d'après ce que l'on sait des préférences en matière d'habitat du type sauvage (voir la section 1.4.3). Ces zones présentent sans doute des variations de températures plus extrêmes que les eaux profondes ou la partie médiane des lacs, où la température de l'eau est souvent mesurée (Trumpikas *et al*. 2015). Par conséquent, les températures hivernales pourraient être plus froides que celles qu'indiquent les données enregistrées, risquant de réduire davantage le potentiel d'hivernage du BZ2019 et du PZ2019, même si les poissons peuvent se déplacer en suivant les eaux plus chaudes lorsque les températures baissent. Les températures estivales plus chaudes dans ces régions peuvent augmenter le potentiel de fraie sur une seule génération.

2.2.5 Conclusions de l'évaluation de l'exposition

Compte tenu de l'analyse qui précède, la présence du BZ2019 et du PZ2019 dans l'environnement canadien devrait être rare, isolée et éphémère. Par conséquent, la probabilité d'exposition de l'environnement canadien au BZ2019 et au PZ2019 est évaluée comme **faible** selon le tableau 2.1. L'incertitude associée à cette estimation est **faible** (tableau 2.2), compte tenu de la qualité des données (températures tolérées) disponibles sur le BZ2019 et le PZ2019 et sur les substituts valides, des signes d'une faible variabilité, ainsi que des données dont on

dispose sur les paramètres environnementaux du milieu récepteur au Canada. Ce classement est conforme à l'exposition faible avec une faible incertitude attribuée au danio Sunburst Orange[MD] (MPO 2020) et aux six lignées de tétras GloFish[MD] (MPO 2018, 2019).

L'entreprise déclarante indique que la seule utilisation prévue de l'organisme déclaré est celle de poisson d'ornement d'intérieur destiné aux aquariums domestiques fixes. Toutefois, une fois les poissons achetés par les consommateurs, il n'est pas possible d'écarter d'autres utilisations non prévues (p. ex. élevage dans des étangs en plein air, comme poissons appâts, etc.). Bien que certaines de ces utilisations non prévues puissent mener au rejet de BZ2019 et de PZ2019, elles ne devraient pas modifier la capacité des organismes à survivre à l'hiver dans les milieux canadiens, ni modifier autrement le classement de faible exposition de l'environnement aux organismes.

L'évolution des courbes de température de l'eau liée aux changements climatiques mondiaux pourrait accroître l'incertitude concernant l'évaluation de la capacité de l'organisme déclaré à survivre, à se reproduire, à proliférer et à se disséminer dans les écosystèmes d'eau douce canadiens.

2.3 ÉVALUATION DES DANGERS

L'évaluation des dangers examine les impacts possibles de l'exposition au BZ2019 et au PZ2019 dans l'environnement. Le processus d'identification des dangers tient compte des voies possibles des dommages, y compris ceux liés à la toxicité environnementale (c.-à-d. le potentiel d'être toxique), à la transmission de gènes, aux interactions trophiques, en tant que vecteur d'agents pathogènes, ainsi qu'à la capacité d'influer sur les composantes de l'écosystème (p. ex. habitat, cycle nutritif, biodiversité). Dans le tableau 2.3, le classement de la gravité des conséquences biologiques est décrit en fonction de la gravité et de la réversibilité des effets sur la structure et la fonction de l'écosystème. Les différences dans les paramètres de mesure sont évaluées par rapport à une variation « normale », d'après les études publiées et les opinions des experts.

En raison d'un manque de données empiriques sur le comportement et la valeur adaptative du BZ2019 et du PZ2019 dans l'environnement naturel, il faut porter une grande attention aux facteurs d'incertitude dans le cadre de l'évaluation des dangers. L'incertitude entourant l'évaluation des dangers peut être importante en raison des lacunes évidentes dans les connaissances et de l'insuffisance des données empiriques sur le comportement et les effets du BZ2019 et du PZ2019 lorsqu'ils sont dans l'environnement naturel. Les critères d'évaluation de l'incertitude portent sur les effets potentiels sur l'environnement, qui peuvent reposer en grande partie sur des informations et des données trouvées dans la documentation scientifique publiée et examinée par des pairs. Le tableau 2.4 décrit le classement des incertitudes entourant les dangers potentiels de l'organisme dans l'environnement.

En ce qui concerne l'incertitude, la qualité des données fait référence aux données ou informations disponibles pour chaque paramètre examiné, à l'intégration de ces informations et à l'étendue des conditions expérimentales examinées, à la taille de l'échantillon, à la pertinence des témoins, à l'analyse statistique, ainsi qu'au plan expérimental et aux interprétations des résultats. La variabilité concerne à la fois la gamme des différences phénotypiques entre les individus ou les souches dans un même environnement, ainsi que l'éventail des conditions physiques, chimiques et biologiques que peut rencontrer un poisson génétiquement modifié dans l'environnement récepteur. Les grands principes qui influencent l'incertitude dans l'évaluation des dangers que posent les poissons génétiquement modifiés (p. ex. les interactions génotype-environnement (GxE), les effets du bagage génétique, les effets non ciblés/pléiotropiques) sont détaillés dans Leggatt *et al*. (2018b) et Devlin *et al*. (2015).

Tableau 2.3 : Classement du danger pour l'environnement découlant de son exposition à l'organisme.

Classement du danger	**Évaluation**
Négligeable	Aucun effet[1]
Faible	Aucun effet nocif[2]
Modéré	Effets nocifs réversibles
Élevé	Effets nocifs irréversibles

[1]Aucune réponse biologique (au-delà de la variabilité naturelle) n'est attendue. [2]Effet nocif : effet négatif immédiat ou à long terme sur la structure ou la fonction de l'écosystème, y compris la diversité biologique (au-delà de la variabilité naturelle).

Tableau 2.4. Classement de l'incertitude associée au danger pour l'environnement.

Classement de l'incertitude	**Renseignements disponibles**
Négligeable	Données de grande qualité sur le BZ2019 et le PZ2019. Preuve de l'absence des interactions génotype-environnement (GxE) ou parfaite compréhension de ces derniers dans les différentes conditions environnementales pertinentes. Signes d'une faible variabilité.
Faible	Données de grande qualité sur des organismes apparentés du BZ2019 et du PZ2019 ou des substituts valides. Compréhension des effets des interactions GxE dans les conditions environnementales pertinentes. Une certaine variabilité.
Modérée	Données limitées sur le BZ2019 et le PZ2019, des organismes apparentés du BZ2019 et du PZ2019 ou des substituts valides. Compréhension limitée des effets des interactions génotype-environnement dans les différentes conditions environnementales pertinentes. Lacunes dans les connaissances. Dépendance à l'égard de l'opinion des experts.
Élevée	Lacunes importantes dans les connaissances. Dépendance importante à l'égard de l'opinion des experts.

L'utilisation proposée du BZ2019 et du PZ2019 au Canada (c'est-à-dire l'importation et le transport dans des conteneurs statiques, la conservation dans des réservoirs statiques chez les grossistes et les détaillants, l'élevage dans des réservoirs statiques dans des aquariums domestiques) n'entraîne que des séquences des effets minimales sur les environnements canadiens. La majorité des dangers posés par le BZ2019 et le PZ2019 (p. ex. interactions avec d'autres organismes, vecteur de maladies, conséquences sur le cycle biogéochimique, l'habitat et la biodiversité) serait causée par une introduction directe du BZ2019 ou du PZ2019 dans des

écosystèmes aquatiques naturels, mais des dangers indirects pourraient découler de rejets d'eaux usées ou de carcasses (p. ex. toxicité pour l'environnement, transmission horizontale de gènes).

Pour les précédentes déclarations de lignées de danios et de tétras GloFish[MD], toutes les évaluations ont conclu à des classements négligeables pour la plupart des types de dangers pour l'environnement et à des classements de danger faible pour la transmission horizontale de gènes (THG), avec une incertitude allant de négligeable à modérée (MPO 2018, 2019, 2020). Aucune caractéristique moléculaire ou phénotypique connue du BZ2019 ou du PZ2019 ne suggère un classement différent de celui des lignées précédemment évaluées (y compris une autre lignée de poisson zèbre, YZ2018), et aucune nouvelle publication scientifique ne permet de modifier les classements précédents. Par conséquent, les évaluations des dangers posés par le BZ2019 et le PZ2019 pour l'environnement correspondent à celles de la lignée YZ2018 déjà déclarée et à celles des tétras GloFish[MD] déclarés auparavant, à l'exception de deux différences dans l'incertitude mentionnées dans l'évaluation du YZ2018. Les détails à l'appui de ces conclusions sont donnés plus loin, et chaque évaluation des dangers est décrite de manière détaillée dans Leggatt *et al*. (2018b).

2.3.1 Dangers potentiels liés à la toxicité pour l'environnement

Les voies potentielles de toxicité pour l'environnement comprennent une exposition des écosystèmes aquatiques à l'animal entier et à ses déjections, ainsi que son ingestion par des prédateurs. L'exposition de l'environnement aux protéines fluorescentes devrait être plus faible que l'exposition du BZ2019 et du PZ2019 aux protéines, même si différentes voies d'exposition ne sont pas forcément comparables. Les protéines fluorescentes sont communément utilisées par la recherche scientifique en tant que marqueurs neutres chez de nombreux organismes; cette utilisation n'a fait l'objet que de très peu de signalements de toxicité (Stewart 2006). Les quelques signalements d'effets négatifs sont généralement propres aux organismes transgéniques ayant un niveau d'expression particulièrement élevé des transgènes fluorescents (Huang *et al*. 2000; Devgan *et al*. 2004; Guo *et al*. 2007). Les effets toxiques pour les organismes hôtes sont probablement dus à la production de la protéine à l'intérieur de la cellule hôte et ne devraient pas avoir les mêmes effets en cas d'exposition par contact ou par ingestion.

La déclaration comprend un rapport analysant l'allergénicité de la séquence d'acides aminés de la protéine fluorescente sur Allermatch. Cette analyse n'a révélé aucune similitude fonctionnelle avec des séquences d'acides aminés allergènes connues pour les humains. Après plusieurs années de production commerciale aux États-Unis, aucun effet toxique découlant d'une exposition au BZ2019 ou au PZ2019 n'a été signalé. Par conséquent, le danger potentiel pour l'environnement lié à la toxicité du BZ2019 ou du PZ2019 pour l'environnement est jugé **négligeable**. L'incertitude liée à ce classement est **modérée**, en raison du manque de données directes concernant les organismes déclarés ou des substituts de ceux-ci, ainsi que du recours à des données empiriques et à des preuves indirectes concernant d'autres organismes. Ce classement concorde avec ceux de l'évaluation du poisson zèbre YZ2018 et de six lignées de tétras GloFish[MD] (MPO 2018, 2019, 2020) déjà déclarés.

2.3.2 Dangers potentiels liés à la transmission horizontale de gènes

La transmission horizontale de gènes consiste en l'échange non sexuel de matériel génétique entre des organismes de la même espèce ou d'espèces différentes (MPO 2006). Les voies d'exposition de l'ADN transgénique libre à de nouveaux organismes (vraisemblablement des procaryotes) sont l'exposition à l'intérieur des intestins du BZ2019 ou du PZ2019 par les excréments, le mucus et d'autres déchets rejetés dans l'eau par le poisson. La construction

transgénique ne contient pas d'éléments transposables qui pourraient augmenter le potentiel d'absorption/mobilité de l'ADN dans un nouvel organisme, bien que des éléments transposables soient présents dans le génome du poisson zèbre (p. ex. Hagemann et Hammer 2006). L'expression du transgène en un changement phénotypique nécessite une transmission concomitante d'éléments régulateurs. Une forte proximité des promoteurs aux transgènes du pigment pourrait accroître la probabilité de leur transmission concomitante et de leur expression, mais les promoteurs des vertébrés présentent généralement une faible activité chez les procaryotes. La présence identifiée du promoteur du bactériophage T3 dans les constructions transgéniques de la lignée actuelle et de certaines lignées déclarées précédemment peut augmenter le risque de transmission horizontale des gènes fonctionnelle, et il a été démontré que le promoteur entraîne l'expression de TagBFP chez *Escherichia coli* (Wu *et al*. 2015). De plus, le site de liaison ribosomique en amont de aeCP597 peut accroître le risque d'expression en cas de transmission horizontale de gènes.

Des gènes codants pour des protéines fluorescentes ont été introduits dans un large éventail d'organismes et, pour la plupart, aucun effet nocif du transgène fluorescent introduit n'a été signalé. Cela indique que l'introduction du transgène par THG dans un nouvel hôte ne devrait pas avoir d'effets nocifs. Même si l'introduction d'un transgène fluorescent par THG dans un nouvel organisme présent dans un environnement canadien ne peut être exclue, le danger est jugé **faible,** car on ne prévoit pas qu'une telle introduction aura des effets nocifs. Bien que le transgène soit bien défini, l'incertitude est **modérée** en raison de la connaissance limitée de l'emplacement du transgène dans le génome du poisson zèbre et de l'absence d'études sur la THG du transgène et ses conséquences. Ce classement concorde avec l'évaluation précédente du danio GloFish^{MD} Sunburst Orange^{MD} (YZ2018), et avec celui évalué pour six lignées de tétras GloFish^{MD}, bien que dans ce dernier groupe, l'incertitude ait été évaluée comme faible (MPO 2018, 2019, 2020). Le classement de l'incertitude a été relevé dans l'évaluation actuelle et dans celle du YZ2018 afin de mieux refléter le manque d'études pertinentes sur la transmission horizontale de gènes et ses conséquences.

2.3.3 Dangers potentiels liés aux interactions avec d'autres organismes

Si des BZ2019 ou des PZ2019 sont relâchés dans l'environnement, ils pourraient interagir avec d'autres organismes des écosystèmes d'eau douce canadiens, y compris avec des proies potentielles, des concurrents et des prédateurs. Les interactions trophiques du type sauvage de *D. rerio* dans son aire de répartition indigène ne sont pas bien documentées, pas plus que celles des formes non transgéniques ornementales de *D. rerio* ou de BZ2019 ou PZ2019 fugitifs dans d'autres régions. Selon les données limitées décrites ci-après, le poisson zèbre non transgénique pourrait avoir un potentiel limité d'impact sur des espèces canadiennes par des interactions trophiques; le potentiel d'impact du BZ2019 et du PZ2019 par des interactions trophiques serait égal ou inférieur à celui du poisson zèbre non transgénique.

Le poisson zèbre est omnivore et se nourrit de zooplancton, de phytoplancton, d'insectes et de larves d'insectes, de vers et de petits crustacés et de poissons à l'état larvaire. Ainsi, il peut avoir un impact sur des populations localisées de petits organismes proie ou de concurrents occupant des niches semblables à l'endroit où il a été rejeté. Le poisson zèbre non transgénique est généralement décrit comme un poisson « pacifique », et interagit bien avec les autres espèces de poissons d'ornement. Bien qu'il puisse tolérer une large gamme de températures, le poisson zèbre doré non transgénique réduit son activité et son alimentation à environ 16 °C, et arrête de se nourrir et d'être actif en dessous de 8 °C (Leggatt *et al*. 2018a, voir la figure 2.2). De ce fait, les niveaux d'activité et d'alimentation du poisson zèbre devraient être faibles pendant la plupart des saisons dans les eaux tempérées du Canada. Les recherches menées par GloFish Technologies démontrent que le BZ2019 est nettement moins

tolérant au froid que les fratries non transgéniques, ce qui pourrait limiter encore davantage l'alimentation et les activités concurrentielles de cette lignée si elle était relâchée dans les eaux canadiennes, bien que les différences de tolérance au froid puissent ne pas être significatives sur le plan fonctionnel (c.-à-d. que la DL_{50} ne différait que de 0,12 °C). Dans d'autres modèles de transgènes de protéines fluorescentes, une étude inédite du MPO a montré que les tétras GloFish[MD] Electric Green[MD] affichaient un comportement agressif et un succès de quête de nourriture semblables à ceux de fratries non transgéniques lors d'essais d'alimentation (Leggatt, comm. pers.), tandis que les poissons zèbres porteurs du transgène de la protéine fluorescente rouge présentaient une agressivité et un succès d'accouplement plus faibles que les fratries non transgéniques (Howard *et al*. 2015), ce qui permet de penser que la transgenèse des protéines fluorescentes peut limiter ou ne pas influencer le succès concurrentiel chez les poissons tropicaux. En revanche, Jha (2010) a signalé que les poissons zèbres domestiqués porteurs du transgène de la protéine fluorescente rouge étaient plus agressifs que les poissons zèbres non transgéniques de type sauvage non apparentés capturés dans le milieu naturel – bien que ces résultats aient pu être influencés par le bagage génétique entre autres facteurs (p. ex. l'historique d'élevage), car selon certains rapports, la domestication augmenterait l'agressivité des poissons (Einum et Fleming 1997). En plus de cinq ans d'utilisation commerciale dans le commerce d'espèces destinées aux aquariums, il n'existe aucun rapport connu, anecdotique ou autre, selon lequel le BZ2019 et le PZ2019 auraient des niveaux d'activité ou un comportement différents de ceux du *D. rerio* non transgénique. Compte tenu des basses températures prévues dans les réseaux d'eau douce canadiens pendant la majeure partie de l'année, le potentiel d'impact des BZ2019 et PZ2019 rejetés sur les espèces aquatiques indigènes par l'acquisition de proies et la concurrence devrait être négligeable pendant la majeure partie de l'année, et ne devrait pas être plus important que celui du danio doré non transgénique.

Des BZ2019 et PZ2019 relâchés pourraient aussi constituer de nouvelles proies, et avoir ainsi un impact sur les populations indigènes de prédateurs. Ils pourraient avoir un effet positif sur ces populations en leur offrant une nouvelle source d'approvisionnement en nourriture, ou un effet négatif si leur ingestion a des effets nocifs sur les prédateurs. On ne pense pas que ce serait le cas, car le BZ2019 et le PZ2019 ne devraient pas être toxiques pour l'environnement (voir la section 2.3.1 ci-dessus). Bien que la pression de prédation sur le BZ2019 et le PZ2019 par rapport au *D. rerio* non transgénique n'ait pas été signalée, l'effet de la transgenèse fluorescente dans un autre modèle transgénique (poisson zèbre porteur du transgène de la protéine fluorescente rouge) est contradictoire, ce dernier affichant une sensibilité à la prédation plus élevée (Hill *et al*. 2011), égale (Cortemeglia et Beitinger 2006b) ou plus faible (Jha 2010) à celle des poissons non transgéniques non apparentés. Ces résultats variables peuvent être dus à des différences dans l'historique de l'élevage, le bagage génétique, les conditions expérimentales entre les études ou les interactions génotype x environnement. On ne sait pas si l'une des études susmentionnées pourrait être s'appliquer à la vulnérabilité à la prédation du BZ2019 et du PZ2019 dans les environnements canadiens et, par conséquent, il n'est pas possible d'estimer la vulnérabilité à la prédation du BZ2019 et du PZ2019 par rapport à leurs homologues non transgéniques avec une certitude raisonnable. Cependant, comme on ne prévoit pas de toxicité découlant de l'ingestion de BZ2019 ou de PZ2019, les lignées déclarées ne devraient pas constituer un danger en tant que proies pour les prédateurs indigènes, quelle que soit la sensibilité potentielle à la prédation.

Compte tenu du comportement non agressif du poisson zèbre, de sa faible activité dans les eaux plus froides et de l'absence de modifications constatées dans le comportement trophique des lignées déclarées, le BZ2019 et le PZ2019 ne devraient pas influencer les interactions trophiques des organismes indigènes au-delà des fluctuations naturelles, avec un danger **négligeable** associé par rapport aux homologues non transgéniques. L'absence d'études

examinant directement les dangers posés par le BZ2019 et le PZ2019, les données disponibles limitées sur un substitut valide (poisson zèbre porteur du transgène de la protéine fluorescente rouge) et la mauvaise compréhension du rôle des interactions GxE dans la susceptibilité à l'agression et à la prédation dans un autre modèle de poisson zèbre transgénique fluorescent donnent lieu à un niveau **modéré** d'incertitude. Ce classement concorde avec ceux de l'évaluation du poisson zèbre YZ2018 et de six lignées de tétras GloFish[MD] (MPO 2018, 2019, 2020) déjà déclarés.

2.3.4 Risques potentiels liés à l'hybridation avec des espèces indigènes

Le poisson zèbre tropical d'eau douce appartient à la famille des cyprinidés et son aire de répartition géographique indigène se trouve dans le sous-continent indien, dans les bassins fluviaux du Gange et du Brahmapoutre, dans le nord-est de l'Inde, au Bangladesh et au Népal (Spence *et al*. 2008; Lessman 2011). Le genre *Danio* est commun à plusieurs autres espèces (Fang 2003). Les poissons zèbres se reproduisent de façon aléatoire et pourraient donc s'hybrider avec des espèces apparentées qui frayent au même moment et au même endroit. Le déclarant indique que des hybrides interspécifiques ont été signalés entre *D. rerio* et *D. albolineatus* (synonyme *Brachydanioalbolineatus*, nom commun danio perlé, Axelrod et Vorderwinkler 1976), qui est également originaire du sous-continent indien. Bien qu'on ait observé l'hybridation de deux espèces semblables, l'hybride F1 est stérile.

Même si aucune espèce de *Danio* n'est indigène au Canada, il existe plusieurs genres de poissons de la famille des cyprinidés, mais on ne sait pas s'ils pourraient se reproduire avec succès avec le poisson zèbre. Des hybrides intergénériques ont été observés pour deux genres de cyprinidés en Europe (Hayden *et al*. 2010), et dans la famille de poissons des Mormyridés, la survie des hybrides intergénériques était liée à la distance phylogénétique des parents (c'est-à-dire qu'une plus grande distance phylogénétique entraînait une diminution de la viabilité et une augmentation des malformations, Kirschbaum *et al*. 2016). Il y a peu de chance que des croisements se produisent, étant donné la probable différence phylogénétique et la différentiation adaptative entre les genres de cyprinidés indigènes au Canada et le poisson zèbre. Toute hybridation intergénérique serait stérile, comme c'est le cas de l'hybridation avec *Danio albolineatus*, une espèce qui est plus proche du poisson zèbre. Le BZ2019 et le PZ2019 présenteraient un potentiel d'hybridation encore plus faible que les poissons zèbres non transgéniques étant donné leur succès de reproduction réduit. Par conséquent, le potentiel de danger du BZ2019 et du PZ2019 découlant d'une hybridation viable avec des poissons indigènes au Canada est **négligeable**. Les données de grande qualité sur l'aire de répartition des cyprinidés et le manque de données sur le potentiel d'hybridation intergénérique entraînent une incertitude **modérée** associée à ce classement. Ce classement correspond à celui des évaluations pour le poisson zèbre YZ2018 déclaré précédemment (MPO 2020), bien que l'évaluation des six lignées de tétras GloFish[MD] ait conclu à un potentiel négligeable avec une incertitude négligeable en raison du manque d'espèces indigènes canadiennes dans la famille des tétras (MPO 2018, 2019).

2.3.5 Dangers potentiels en tant que vecteur de maladies

Les poissons d'ornement d'aquarium commerciaux sont souvent des vecteurs d'agents pathogènes, y compris des virus, des bactéries, des champignons et des parasites (p. ex. Evans et Lester 2001; Řehulka *et al*. 2006; Whittington et Chong 2007; Hongslo et Jansson 2009; Rose *et al*. 2013). Dans ses déclarations, GloFish LLC a fourni des sommaires des examens diagnostiques effectués par le Fish Disease Diagnostic Lab, de l'université de la Floride, pour le PZ2019 et le BZ2019. Tous les résultats des nécropsies étaient normaux, à l'exception de la présence d'un faible nombre de nématodes (espèces non spécifiées) dans

deux des six BZ2019 examinés. Il est toutefois précisé que ce résultat n'est pas lié à la nature transgénique du BZ2019. Aucune croissance bactérienne n'a été observée dans les échantillons de cerveau et de rein postérieur, et l'examen histologique des principaux organes n'a révélé aucune lésion pathologique chez les poissons examinés. Il convient de noter que l'histologie des poissons examinés n'a pas été comparée directement à celle des poissons non transgéniques et que l'examen portait spécifiquement sur les lésions pathologiques macroscopiques et les signes de maladie.

Les agents pathogènes sont courants chez les poissons tropicaux d'eau douce utilisés comme poissons d'ornement, dont le poisson zèbre, qui figure parmi quelques rares espèces (p. ex. le poisson rouge, le gobie *Glossogobius giuris*, le guppy et le gourami bleu) pouvant avoir des répercussions importantes sur la santé des animaux aquatiques et sur l'économie canadienne selon l'Agence canadienne d'inspection des aliments (ACIA). En 2012, l'ACIA a inscrit le poisson zèbre sur sa liste d'espèces d'animaux aquatiques vulnérables parce qu'il pourrait être un vecteur de la virémie printanière de la carpe (VPC), une maladie hémorragique des poissons à nageoires d'eau douce. Cependant, aucune infection naturelle à la VPC n'a été signalée chez le poisson zèbre, y compris à l'état sauvage, dans le milieu des amateurs et en laboratoire (Hanwell *et al*. 2016). Comme le principal mode d'entrée du BZ2019 et du PZ2019 sera l'importation des États-Unis, l'ACIA jouera un rôle crucial dans la réglementation des agents pathogènes de l'espèce *Danio rerio* qui sont importés au Canada. De plus, tout agent pathogène risquant d'être hébergé par le BZ2019 et le PZ2019 devrait être d'origine tropicale ou persister dans les eaux chaudes normalement présentes dans un aquarium domestique (p. ex. 25 à 28 °C) et, par conséquent, pourrait avoir une capacité limitée de persister à l'intérieur ou à l'extérieur lorsque les BZ2019 et les PZ2019 seraient relâchés dans des milieux d'eau douce canadiens plus froids. Le poisson zèbre peut être infecté par des agents pathogènes qu'on trouve en eau froide dans le cadre de procédures expérimentales (p. ex. la VPC), mais on ignore sa vulnérabilité aux agents pathogènes présents au Canada dans des conditions naturelles.

La possibilité de modification de la capacité du BZ2019 et du PZ2019, ou d'autres organismes fluorescents transgéniques, à agir comme vecteur d'agents pathogènes n'a pas été examinée. Une vulnérabilité accrue aux maladies peut augmenter la capacité du poisson à agir en tant que vecteur, car il peut contenir et propager plus d'agents pathogènes. En revanche, cette vulnérabilité peut aussi réduire sa capacité à agir comme vecteur, si l'organisme succombe rapidement à la maladie. Certaines études réalisées avec des modèles de cellules fluorescentes cultivées utilisées en recherche ont révélé une possible modification de la vulnérabilité aux maladies. Par exemple, l'expression de la protéine de fluorescence verte réduisait l'activation des cellules T (Koelsch *et al*. 2013), entraînait la sécrétion de cytokine IL-6 (Mak *et al*. 2007), bloquait les voies de signalisation immunitaires (Baens *et al*. 2006) et modifiait l'expression des gènes de la fonction immunitaire (Coumans *et al*. 2014) et de la réponse au stress (Badrian et Bogoyevitch 2007). De même, Chou *et al*. (2015) ont signalé que chez les souris porteuses du transgène de la protéine DsRed, le nombre de certains globules blancs (lymphocytes et monocytes) était modifié, mais pas d'autres. Le BZ2019 et le PZ2019 sont élevés à l'échelle commerciale aux États-Unis depuis 2010 et 2011, respectivement, tout comme de nombreuses autres espèces et lignées transgéniques fluorescentes d'aquarium depuis 2003. Dans les déclarations de ses tétras GloFish^{MD}, GloFish LLC a fourni des déclarations de vétérinaires indiquant qu'ils n'avaient pas constaté d'augmentation de la sensibilité aux agents pathogènes ou de la transmission de ceux-ci dans une quelconque lignée GloFish^{MD}, mais aucune preuve empirique n'a été donnée. Le poisson zèbre fluorescent a été utilisé à grande échelle aux fins de la recherche en laboratoire, sans qu'aucun effet sur la vulnérabilité aux maladies n'ait été signalé. Howard *et al*. (2015) ont suivi en laboratoire le poisson zèbre non transgénique et porteur du transgène de la protéine fluorescente rouge dans

18 populations sur 15 générations et n'ont pas constaté de différence de survie entre les poissons transgéniques et non transgéniques. On peut en déduire un potentiel **négligeable** que les capacités du BZ2019 et du PZ2019 à agir en tant que vecteurs soient modifiées par rapport aux poissons zèbres non transgéniques. Étant donné que ce point n'a pas été examiné directement pour le BZ2019 et le PZ2019, que les données sur un substitut valide sont limitées et que l'on se fie à l'opinion d'experts, le niveau d'incertitude pour ce classement est **modéré**. Ce classement concorde avec ceux de l'évaluation du poisson zèbre YZ2018 et de six lignées de tétras GloFish[MD] (MPO 2018, 2019, 2020) déjà déclarés.

2.3.6 Impact potentiel sur le cycle biogéochimique

On s'attend à ce que le BZ2019 et le PZ2019 contribuent aux cycles des éléments nutritifs dans les habitats par l'ingestion de proies et d'autres aliments et le rejet de déchets (ammoniac et matières fécales). Les effets potentiels de la protéine fluorescente présente chez le BZ2019 et le PZ2019 sur leur métabolisme, et donc sur le cycle des éléments nutritifs, n'ont pas été examinés. Dans un autre modèle d'organisme, il s'est avéré que des souris eGFP transgéniques présentaient des modifications au niveau du cycle de l'urée, du métabolisme de l'acide nucléique et de l'aminoacide et de l'utilisation de l'énergie (Li *et al*. 2013). Nous ne savons pas quels effets ces modifications pourraient avoir sur le cycle biogéochimique si le BZ2019 et le PZ2019 avaient les mêmes influences découlant de l'expression génique du transgène fluorescent, mais la petite taille du poisson zèbre et le faible nombre de spécimens qui pourraient se trouver dans un écosystème semblent indiquer que le danger pour le cycle biogéochimique dans un environnement naturel sera négligeable, même en cas de modification des voies métaboliques. Le niveau d'incertitude est **modéré** en raison du manque d'études portant expressément sur ce danger. Ce classement concorde avec ceux de l'évaluation du poisson zèbre YZ2018 et de six lignées de tétras GloFish[MD] déjà déclarés (MPO 2018, 2019, 2020).

2.3.7 Dangers potentiels pour l'habitat

Le poisson zèbre est un petit poisson qui ne construit pas de nid ni d'autres structures pouvant avoir des répercussions sur les habitats d'autres espèces. Le BZ2019 et le PZ2019 sont utilisés à des fins commerciales dans le commerce de poissons d'ornement destinés aux aquariums depuis 2006-2011, et aucun rapport, isolé ou autre, n'indique qu'ils ont des comportements qui diffèrent de ceux du poisson zèbre doré, et qui risquent d'avoir une incidence sur la structure de l'habitat. Par conséquent, le BZ2019 et le PZ2019 devraient avoir des effets **négligeables** sur l'habitat compte tenu de la **faible** incertitude associée à ce classement. Ce classement concorde avec ceux de l'évaluation du poisson zèbre YZ2018 et de six lignées de tétras GloFish[MD] (MPO 2018, 2019, 2020) déjà déclarés.

2.3.8 Dangers potentiels pour la biodiversité

De nombreux facteurs, notamment par les espèces envahissantes et l'introduction de maladies, peuvent avoir des effets négatifs sur la biodiversité. Malgré l'utilisation de longue date du poisson zèbre dans le commerce des poissons d'ornement destinés aux aquariums et comme modèle pour la recherche, et sa présence répétée dans des réseaux naturels, il n'a jamais été signalé comme devenant envahissant en Amérique du Nord, en Europe ou ailleurs dans le monde. Comme indiqué précédemment, le BZ2019 et le PZ2019 ne devraient pas avoir d'impact négatif sur les espèces indigènes par des interactions trophiques ou hybrides, ni jouer un rôle de vecteur pour des agents pathogènes au Canada, avoir des effets sur le cycle biogéochimique ou nuire à l'habitat. L'ajout de la construction transgénique et de la protéine fluorescente dans le BZ2019 et le PZ2019 ne devrait pas causer de toxicité environnementale

ou de dangers par la transmission horizontale de gènes du transgène, ni accroître les dangers possibles par des interactions avec les espèces indigènes. Dans l'ensemble, le BZ2019 et le PZ2019 posent un danger **négligeable** d'effet négatif sur la biodiversité des écosystèmes canadiens. L'utilisation de données sur l'invasivité et les effets sur la biodiversité d'espèces comparables entraîne un niveau d'incertitude **faible** pour ce classement. Ce classement concorde avec ceux de l'évaluation du poisson zèbre YZ2018 et de six lignées de tétras GloFish[MD] (MPO 2018, 2019, 2020) déjà déclarés.

2.3.9 Conclusions de l'évaluation des dangers

Le BZ2019 et le PZ2019 ne devraient pas être dangereux pour les environnements canadiens. Ces espèces n'ont pas d'historique d'invasivité malgré leur utilisation répandue. Il n'existe aucune preuve de toxicité environnementale associée à la construction transgénique, et la majorité des autres modèles fluorescents ne montrent aucune toxicité liée aux transgènes fluorescents. Il n'y a pas non plus d'indication d'effets possibles sur l'environnement dus à la transmission du transgène à des espèces canadiennes indigènes par l'hybridation ou par la transmission horizontale de gènes. Aucune différence n'a été signalée pour le BZ2019 et le PZ2019 ou les autres poissons fluorescents en ce qui concerne la survie, la vulnérabilité aux maladies et l'élevage, et, ils ne devraient pas avoir de capacité modifiée d'agir comme vecteurs de maladies ou de nuire au cycle biogéochimique.

Les dangers examinés sont classés de négligeable à faible (tableau 2.5), et l'incertitude de faible à modérée en raison des données limitées propres au BZ2019 et au PZ2019, des données directes limitées sur les espèces comparables, des données variables provenant de modèles de substitution (comme le poisson zèbre porteur du transgène de la protéine fluorescente rouge) et du fait que l'évaluation de certains dangers dépend de l'opinion des experts. Le PZ2019 et le BZ2019 ne devraient pas poser de dangers uniques au-delà de ceux concernant leur utilisation prévue comme poissons d'ornement dans un aquarium statique. Le classement des dangers est conforme à celui qui a été évalué précédemment pour le poisson zèbre YZ2018 et six lignées de tétras GloFish[MD], bien que l'incertitude diffère de celle évaluée pour les tétras GloFish[MD] dans deux catégories de dangers en raison des limitations des données (liées à la THG), qui sont davantage reconnues, ou des différences dans les distributions des familles (par l'hybridation, voir le tableau 2.5).

2.4 ÉVALUATION DU RISQUE

Le risque représente la probabilité qu'un effet nocif se produise en raison d'une exposition à un danger. L'évaluation du risque intègre la nature et la gravité des effets nocifs, la probabilité que ceux-ci se produisent et l'incertitude associée à chaque conclusion. L'avis scientifique du MPO transmis à ECCC et à SC aux fins de décision réglementaire est fondé sur le risque global lié à l'organisme, réalisé dans le contexte du scénario d'utilisation proposé par le déclarant et de tous les autres scénarios d'utilisation potentiels. Une conclusion globale concernant le risque s'appuie sur le paradigme classique suivant, où le risque est proportionnel au danger et à l'exposition :

$$\text{Risque} \propto \text{Exposition} \times \text{Danger}$$

Pour chaque paramètre d'évaluation, le danger et l'exposition sont classés comme suit : négligeable, faible, modéré ou élevé, et comprennent une analyse de l'incertitude pour les deux. Le risque global est estimé en illustrant le danger par rapport à l'exposition, au moyen d'une matrice ou d'une carte des risques, comme le montre la figure 2.3. Cette matrice ne peut pas être utilisée comme un outil permettant d'établir une conclusion ou une décision distincte sur le risque, mais peut faciliter la communication et la discussion. L'incertitude associée au

classement global du risque n'est pas estimée, mais l'incertitude des évaluations des dangers et de l'exposition est examinée dans le contexte d'une conclusion finale sur le risque.

Tableau 2.5 : Sommaire de tous les classements et des cotes d'incertitude des évaluations des risques pour l'environnement posés par les lignées de poisson zèbre visées par la présente déclaration (BZ2019, PZ2019), d'une lignée de poisson zèbre déclarée précédemment (YZ2018) et de six lignées de tétras GloFish^MD déjà déclarées (MPO 2018, 2019, 2020). Le texte Italique indique les différences entre les évaluations précédentes et l'évaluation actuelle.

Évaluation	**Classement / Incertitude**		
	BZ2019 et PZ2019	**YZ2018**	**Tétras GloFish^MD**
Exposition	**Faible / Faible**	**Faible / Faible**	**Faible / Faible**
Dangers :			
1. Toxicité pour l'environnement	Négligeable / Modérée	Négligeable / Modérée	Négligeable / Modérée
2. THG	Faible / Modérée	Faible / Modérée	Faible / *Faible*
3. Interactions trophiques	Négligeable / Modérée	Négligeable / Modérée	Négligeable / Modérée
4. Hybridation	Négligeable / Modérée	Négligeable / Modérée	Négligeable / *Négligeable*
5. Vecteur de maladies	Négligeable / Modérée	Négligeable / Modérée	Négligeable / Modérée
6. Cycle biogéochimique	Négligeable / Modérée	Négligeable / Modérée	Négligeable / Modérée
7. Habitat	Négligeable / Faible	Négligeable / Faible	Négligeable / Faible
8. Biodiversité	Négligeable / Faible	Négligeable / Faible	Négligeable / Faible
Risques pour l'environnement	**Faible**	**Faible**	**Faible**

2.4.1 Évaluation des risques posés par le PZ2019 et le BZ2019

L'évaluation de l'exposition a conclu que le BZ2019 et le PZ2019, utilisés dans le commerce de poissons d'ornement destinés aux aquariums ou à d'autres fins non prévues, présenteraient une faible probabilité de présence dans l'environnement canadien. En effet, il est très probable qu'un petit nombre d'individus en provenance d'aquariums domestiques seront rejetés dans l'environnement, mais la probabilité que le BZ2019 et le PZ2019 puissent survivre à l'hiver dans les milieux aquatiques canadiens est négligeable. Ainsi, l'exposition des écosystèmes d'eau douce canadiens au BZ2019 ou au PZ2019 devrait être isolée, rare et éphémère. La qualité des données démontrant le manque de tolérance au froid du BZ2019, du PZ2019 et du poisson

zèbre doré, en ce qui concerne les températures des eaux douces au Canada, se traduit par une faible incertitude pour le classement de ce danger.

L'évaluation du danger a permis de conclure que le BZ2019 et le PZ2019 présentent des dangers jugés de négligeables à faibles pour l'environnement canadien, au vu de l'absence de dangers associés au poisson zèbre doré, et de l'absence de preuve directe démontrant que les protéines fluorescentes exprimées augmenteraient le danger par rapport au poisson zèbre doré. L'incertitude associée aux différentes composantes du danger varie de faible à modérée, en raison des données limitées propres au BZ2019 et au PZ2019, des données directes limitées sur les espèces comparables, des données variables du modèle de substitution (poisson zèbre porteur du transgène de la protéine fluorescente rouge) et du recours à l'avis d'experts pour l'évaluation de certains dangers.

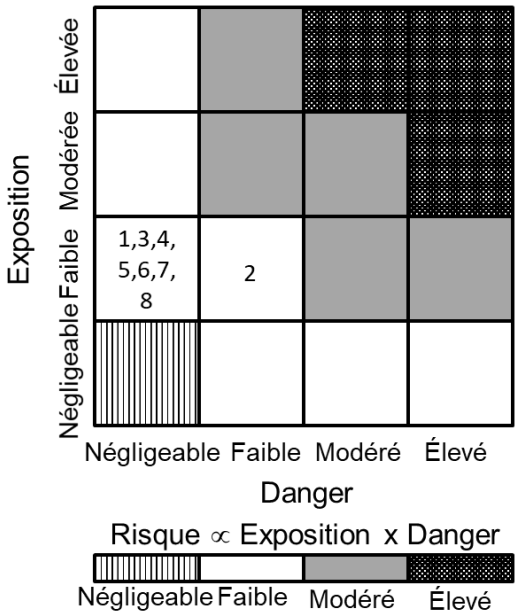


Figure 2.3 : Matrice des risques pour illustrer comment l'exposition et le danger sont intégrés pour établir un niveau de risque dans l'évaluation des risques pour l'environnement. Les évaluations des risques associées aux composantes de danger au niveau d'exposition évalué sont désignés par des chiffres : 1) risques liés à la toxicité pour l'environnement; 2) risques liés à la transmission horizontale de gènes; 3) risques liés aux interactions avec d'autres organismes; 4) risques liés à l'hybridation; 5) risques en tant que vecteur de maladies; 6) risques pour le cycle biogéochimique; 7) risques pour l'habitat; 8) risques pour la biodiversité.

Selon la matrice des risques présentée sur la figure 2.3, le BZ2019 et le PZ2019 utilisés dans le commerce d'espèces destinées aux aquariums ou à d'autres fins au Canada présentent un **faible risque** pour les environnements canadiens. Les différents dangers ne devraient pas avoir d'effets nocifs au-delà des fluctuations naturelles sur les environnements canadiens, dans les limites du niveau d'exposition évalué. Les sources d'incertitude dans les évaluations de l'exposition et des dangers pour l'environnement qui peuvent influer sur l'incertitude dans l'évaluation des risques pour l'environnement sont l'absence de données traitant directement des dangers de l'organisme déclaré et des espèces comparables, la variabilité des données provenant d'organismes de substitution et, dans certains cas, le recours à des avis d'experts.

Malgré l'incertitude modérée qui entoure certains des éléments de l'évaluation, rien ne prouve actuellement que les classements du risque global posé par le BZ2019 et le PZ2019 pourraient être supérieurs au classement faible du risque pour les environnements canadiens. Ce

classement correspond à celui de l'évaluation de risque faible pour le poisson zèbre YZ2018 et six lignées de tétras GloFish[MD] déjà déclarés (MPO 2018, 2019, 2020, voir le tableau 2.5).

2.5 SOMMAIRE ET CONCLUSIONS

L'utilisation du BZ2019 et du PZ2019 dans des aquariums domestiques au Canada ou à d'autres fins non prévues devrait entraîner des rejets fréquents et de très petits nombres de ces poissons dans l'environnement canadien, bien que l'on ne puisse exclure la possibilité de rejets occasionnels de grande ampleur. Les données de grande qualité disponibles indiquent que le BZ2019 et le PZ2019 ne sont pas capables d'hiverner dans les écosystèmes d'eau douce canadiens. L'exposition est ainsi considérée comme faible, avec une incertitude faible. L'absence de preuves des dangers associés aux espèces comparables non transgéniques, malgré leur utilisation répandue de longue date, de même que l'absence de preuves de l'augmentation des dangers posés par le BZ2019 et le PZ2019 par rapport aux poissons zèbres non transgéniques, donnent un classement négligeable à faible du danger pour les écosystèmes canadiens. En raison du manque de renseignements directs sur les dangers des modèles de base ou du BZ2019 et du PZ2019, ou de leur caractère limité, l'incertitude entourant les évaluations des dangers allait de faible à modérée. Dans l'ensemble, le risque global pour l'environnement canadien posé par le BZ2019 et le PZ2019 est considéré comme faible, et l'on ne s'attend pas à ce que les organismes déclarés causent des effets nocifs dans les environnements canadiens au seuil d'exposition évalué. Alors que le niveau d'incertitude associé à l'estimation de certains dangers est modéré en raison du caractère limité ou inexistant de données directes à propos des organismes déclarés ou d'une espèce comparable, rien ne semble indiquer que le BZ2019 et le PZ2019, dans le cadre de l'utilisation proposée ou d'autres utilisations potentielles, pourraient nuire à l'environnement canadien en cas d'exposition.

RÉFÉRENCES CITÉES

Akitake, C.M., Macurak, M., Halpern, M.E., and Goll, M.G. 2011. Transgenerational analysis of transcriptional silencing in zebrafish. Dev. Biol. 352(2): 191-201.

Arunachalam, M., Raja, M., Vijayakumar, C., Malaiammal, P., and Mayden, R.L. 2013. Natural history of zebrafish (*Danio rerio*) in India. Zebrafish 10(1): 1-14.

Axelrod, H.R., and Vorderwinkler, W. 1976. Encyclopedia of Tropical Fishes with Special Emphasis on Breeding. T.F.H. Plublishing, Neptune City, NJ.

Badrian, B., and Bogoyevitch, M.A. 2007. Changes in the transcriptional profile of cardiac myocytes following green fluorescent protein expression. DNA Cell Biol. 26(10): 727-736.

Baens, J., Noels, H., Broeckx, V., Hagen, S., Fevery, S., Biliau, A.D., Vankelecom, H., and Marynen, P. 2006. The dark side of EGFP: Defective polyubiquitination. PLoS ONE 1(1): e54.

Barrionuevo, W.R., and Burggren, W.W. 1999. O_2 consumption and heart rate in developing zebrafish (*Danio rerio*): influence of temperature and ambient O_2. Am. J. Physiol. 276(2): R505-R513.

BCLSS. 2013. Osoyoos Lake 2005-2011. British Columbia Lake Stewardship Society, Kelowna, BC. 4 pp.

Burgman, M. 2005. Risk and Decisions for Conservation and Environmental Managers. Cambridge University Press. 504 p.

Chou, C.J., Peng, S.Y., Wan, C.H., Chen, S.F., Cheng, W.T.K., Lin, K.Y., and Wu, S.C. 2015. Establishment of a DsRed-monomer-harboring ICR transgenic mouse model and effects of the transgene on tissue development. Chinese J. Physiol. 58(1): 27-37.

Cortemeglia, C., and Beitinger, T.L. 2005. Temperature tolerances of wild-type and red transgenic zebra danios. Trans. Am. Fish. Soc. 134(6): 1431-1437.

Cortemeglia, C., and Beitinger, T.L. 2006a. Projected US distributions of transgenic and wildtype zebra danios, *Danio rerio*, based on temperature tolerance data. J. Therm. Biol. 31(5): 422-428.

Cortemeglia, C., and Beitinger, T.L. 2006b. Susceptibility of transgenic and wildtype zebra danios, *Danio rerio*, to predation. Environ. Biol. Fish. 76(1): 93-100.

Cortemeglia, C., Beitinger, T.L., Kennedy, J.H., and Walters, T. 2008. Field confirmation of laboratory-determined lower temperature tolerance of transgenic and wildtype zebra danios, *Danio rerio*. Am. Midl. Nat. 160(2): 477-479.

Coumans, J.V.F., Gau, D., Polijak, A., Wasinger, V., Roy, P., and Moens, P.R. 2014. Green fluorescent protein expression triggers proteome changes in breast cancer cells. Exp. Cell Res. 320: 33-45.

Devgan, V., Rao, M.R.S., and Seshagiri, P.B. 2004. Impact of embryonic expression of enhanced green fluorescent protein on early mouse development. Biochem. Biophys. Res. Comm. 313(4): 1030-1036.

Devlin, R.H., Sundström, L.F., and Leggatt, R.A. 2015. Assessing ecological and evolutionary consequences of growth-accelerated genetically engineered fishes. BioScience 65(7): 685-700.

Einum, S., and Fleming, I.A. 1997. Genetic divergence and interactions in the wild among native, farmed and hybrid Atlantic salmon. J. Fish Biol. 50: 634-651.

Essner, J.J. 2003. Temperature Sensitivity of Fluorescent Transgenic Zebrafish. Discovery Genomics, Inc., Minneapolis, MN.

Evans, B.B., and Lester, R.J.G. 2001. Parasites of ornamental fish imported into Australia. Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol. 21(2): 51-55.

Fang, F. 2003. Phylogenetic analysis of the asian cyprinid genus *Danio* (Teleostei, Cyprinidae). Copeia. 4: 714-728.

Gerlai, R. 2013. Antipredatory behavior of Zebrafish: Adaptive function and a tool for translational research. Evol. Psychol. 11(3): 591-605.

Guo, J.K., Cheng, E.C., Wang, L., Swenson, E.S., Ardito, T.A., Kashgarian, M., Cantley, L.G., and Krause, D.S. 2007. The commonly used beta-actin-GFP transgenic mouse strain develops a distinct type of glomerulosclerosis. Trans. Res. 16(6): 829-834.

Hagemann, S., and Hammer, S.E. 2006. The implications of DNA transposons in the evolution of *P* elements in zebrafish (*Danio rerio*). Genomics 88(5): 572-579.

Hallare, A.V., Schirling, M., Luckenbach, T., Köhler, H.R., and Triebskorn, R. 2005. Combined effects of temperature and cadmium on developmental parameters and biomarker responses in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. J. Therm. Biol. 30(1): 7-17.

Hanwell, D., Hutchinson, S.A., Collymore, C., Bruce, A.E., Louis, R., Ghalami, A., Allison, W.T., Ekker, M., Eames, B.F., Childs, S., Kurrasch, D.M., Gerlai, R., Thiele, T., Scott, I., Ciruna, B., Dowling, J.J., McFarlane, S., Huang, P., Wen, X.Y., Akimenko, M.A., Waskiewicz, A.J., Drapeau, P., Babiuk, L.A., Dragon, D., Smida, A., Buret, A., O'Grady, E., Wilson, J., Sowden-Plunkett, L., and Tropepe, V. 2016. Restrictions on the importation of Zebrafish into Canada associated with Spring Viremia of Carp Virus. Zebrafish 13: S153-S163.

Hayden, B., Pulcini, D., Kelly-Quinn, M., O'grady, M., Caffrey, J., McGrath, A., and Mariani, S. 2010. Hybridisation between two cyprinid fishes in a novel habitat: genetics, morphology and life-history traits. BMC Evol. Biol. 10: 169.

Hill, J.E., Kapuscinski, A.R., and Pavlowich, T. 2011. Fluorescent transgenic zebra danio more vulnerable to predators than wild-type fish. Trans. Am. Fish. Soc. 140(4): 1001-1005.

Hongslo, T., and Jansson, E. 2009. Health survey of aquarium fish in Swedish pet-shops. Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol. 29(5): 163-174.

Howard, R.D., Rohrer, K., Liu, Y., and Muir, W.M. 2015. Mate competition and evolutionary outcomes in genetically modified zebrafish (*Danio rerio*). Evolution 69(5): 1143-1157.

Huang, W.Y., Aramburu, J., Douglas, P.S., and Izumo, S. 2000. Transgenic expression of green fluorescence protein can cause dilated cardiomyopathy. Nat. Med. 6(5): 482-483.

Jha, P. 2010. Comparative study of aggressive behaviour in transgenic and wildtype zebrafish *Danio rerio* (Hamilton) and the flying barb *Esomus danricus* (Hamilton), and their susceptibility to predation by the snakehead *Channa striatus* (Bloch). Ital. J. Zool. 77(1): 102-109.

Jobling, M. 1981. Temperature tolerance and the final preferendum--rapid methods for the assessment of optimum growth temperatures. J. Fish Biol. 19: 439-455.

Kapuscinski, A.R., Hayes, K.R., Li, S., and Dana, G. 2007. Environmental Risk Assessment of Genetically Modified Organisms. Methedologies for Transgenic Fish Vol. 3. CABI publishing.

Kerr, S.J., Brousseau, C.S., and Muschett, M. 2005. Invasive aquatic species in Ontario. Fisheries 30(7): 21-30.

Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., and Schilling, T.F. 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. Dev. Dyn. 203: 253-310.

Kirschbaum, F., Nguyen, L., Baumgartner, S., Chi, H.W.L., Wolfart, R., Elarbani, K., Eppenstein, H., Korniienko, Y., Guido-Böhm, L., Mamonekene, V., Vater, M., and Tiedemann, R. 2016. Intragenus (*Campylomormyrus*) and intergenus hybrids in mormyrid fish: Physiological and histological investigations of the electric organ ontogeny. J. Physiol. (Paris) 110: 281-301.

Koelsch, K.A., Wang, Y., Maier-Moore, J.S., Sawalha, A.H., and Wren, J.D. 2013. GFP affects human T cell activation and cytokine production following *in vitro* stimulation. PLoS ONE 8(4): e50068.

Lawrence, C. 2007. The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): a review. Aquaculture 269(1-4): 1-20.

Leggatt, R.A., Dhillion, R.S., Mimeault, C., Johnson, N., Richards, J.G., and Devlin, R.H. 2018a. Low-temperature tolerances of tropical fish with potential transgenic applications in relation to winter water temperatures in Canada. Can. J. Zool. 96: 253-260.

Leggatt, R. Johnson, N. et McGowan, C. 2018b. Évaluation du risque environnemental pour le tétra GloFish[MD] Electric Green[MD] et le tétra à longues nageoires GloFish[MD] Electric GreenMD : des poissons d'ornement transgéniques importés au Canada pour le commerce des animaux domestiques. Secr. can. de consult. du MPO. Avis. de rech. 2018/049. xiv + 61 p.

Lessman, C.A. 2011. The Developing Zebrafish (*Danio rerio*): A vertebrate model for high-throughput screening of chemical libraries. Birth Defects Res. C 93(3): 268-280.

Levin, S.A. 2009. Princeton Guide to Ecology. Princeton University Press, Princeton, NJ. 848 p.

Li, H., Wei, H., Wang, Y., Tang, H., and Wang, Y. 2013. Enhanced green fluorescent protein transgenic expression *in vivo* is not biologically inert. J. Proteome Res. 12(8): 3801-3808.

Lincoln, R.G., Boxshall, G., and Clark, P. 1988. A Dictionary of Ecology, Evolution and Systematics. 2nd ed. Cambridge University Press.

Little, A.G., Kunisue, T., Kannan, K., and Seebacher, F. 2013. Thyroid hormone actions are temperature-specific and regulate thermal acclimation in zebrafish (*Danio rerio*). BMC Biol. 11: 26.

López-Olmeda, J.F., and Sánchez-Vázquez, F.J. 2011. Thermal biology of zebrafish (*Danio rerio*). J. Therm. Biol. 36(2): 91-104.

Magnuson, J.J., Crowder, L.B., and Medvick, P.A. 1979. Temperature as an ecological resource. Amer. Zool. 19(1): 331-343.

Mair, G.C., Nam, Y.K., and Solar, I.I. 2007. Risk management: reducing risk through confinement of transgenic fish. *In* Environmental Risk Assessment of Genetically Modified Organisms. Methodologies for Transgenic Fish. *Edited by* A.R. Kapuscinski and K.R. Hayes and S. Li and G. Dana. CABI Publishing. pp. 209-238.

Mak, G.W.-Y., Wong, C.-H., and Tsui, S.K.-W. 2007. Green fluorescent protein induces the secretion of inflammatory cytokine interleukin-6 in muscle cells. Anal. Biochem. 362: 296-298.

Marson, D., Cudmore, B., Drake, D.A.R., and Mandrak, N.E. 2009. Summary of a survey of aquarium owners in Canada. Can. Manuscr. Rep. Fish. Aquat. Sci. 2905.

Moon, D.C., Moon, J., and Keagy, A. 2010. Direct and indirect interactions. Nat. Edu. Know. 3(10): 50.

MPO, 2006. Compte rendu de la réunion des experts sur les risques potentiels liés à la transmission horizontale de gènes de nouveaux organismes aquatiques. Secr. can. de consult. sci. du MPO, Compte rendu 2006/036.

MPO. 2013. Évaluation fondée sur les risques des impacts et des menaces que les changements climatiques présentent pour l'infrastructure et les systèmes biologiques qui relèvent du mandat de Pêches et Océans Canada – Grand bassin aquatique d'eau douce. Secr. can. de consult. sci. du MPO, Rép. des Sci. 2013/011.

MPO. 2018. Évaluation des risques pour l'environnement et des risques indirects pour la santé humaine du tétra Glofish[MD] Electric Green[MD] et du tétra à longues nageoires Glofish[MD] Electric Green[MD] (*Gymnocorymbus ternetzi*) : un poisson d'ornement transgénique. Secr. can. de consult. sci. du MPO. Avis sci. 2018/027.

MPO. 2019. Évaluation des risques pour l'environnement et des risques indirects pour la santé humaine posés par les tétras glofishmd (*gymnocorymbus ternetzi*) : cinq lignées de poissons d'ornement transgéniques. Secr. can. de consult. sci. du MPO, Avis sci. 2019/002.

MPO. 2020. Évaluation des risques pour l'environnement et des risques indirects pour la santé humaine posés par le danio (danio rerio) glofish[MD] sunburst orange[MD] : un poisson d'ornement transgénique. Secr. can. de consult. sci. du MPO. Avis sci. 2020/015.

Noble-Brzezinski, S., Leggatt, R., Johnson, N., et McGowan, C. 2021. Évaluation des risques pour l'environnement posés par le danio Sunburst Orange[MD] : des poissons d'ornement transgéniques importés au Canada pour le commerce des animaux domestiques. Secr. can. de consult. sci. du MPO. Doc. de rech. 2021/013. En presse.

Řehulka, J., Kaustová, J., and Řehulková, E. 2006. Causal agents of mycobacterial diseases in freshwater ornamental fish and their importance for human health in the Czech Republic. Acta Vet. Brno 75: 251-258.

Ribas, L., and Piferrer, F. 2014. The zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism, with emphasis on applications for finfish aquaculture research. Rev. Aquacult. 6(4): 209-240.

Rixon, C.A.M., Duggan, I.C., Bergeron, N.M.N., Ricciardi, A., and Macisaac, H.J. 2005. Invasion risks posed by the aquarium trade and live fish markets on the Laurentian Great Lakes. Biodivers. Conserv. 14(6): 1365-1381.

Rose, S., Hill, R., Bermudez, L.E., and Miller-Morgan, T. 2013. Imported ornamental fish are colonized with antibiotic-resistant bacteria. J. Fish Dis. 36(6): 533-542.

Schaefer, J., and Ryan, A. 2006. Developmental plasticity in the thermal tolerance of zebrafish *Danio rerio*. J. Fish Biol. 69(3): 722-734.

Schirone, R.C., and Gross, L. 1968. Effect of temperature on early embryological development of the zebra fish, *Brachydanio rerio*. J. Exp. Zool. 169(1): 43-52.

Sfakianakis, D.G., Leris, I., Mylonas, C.C., and Kentouri, M. 2012. Temperature during early life determines sex in zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton, 1822). J Biol Res-Thessalon 17: 68-73.

Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., and Smith, C. 2008. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. Biol. Rev. Camb. Philos. Soc. 83(1): 13-34.

Stewart, C.N. 2006. Go with the glow: fluorescent proteins to light transgenic organisms. Trends Biotechnol. 24(4): 155-162.

Strecker, A.L., Campbell, P.M., and Olden, J.D. 2011. The aquarium trade as an invasion pathway in the Pacific Northwest. Fisheries 36(2): 74-85.

Trumpikas, J., Shuter, B.J., Minns, C.K., and Cyr, H. 2015. Characterizing patterns of nearshore water temperature variation in the North American Great Lakes and assessing sensitivities to climate change. Great Lakes Res. 41: 53-64.

Tuckett, Q.M., Ritch, J.L., Lawson, K.M., and Hill, J.E. 2017. Landscape-scale survey of non-native fishes near ornamental aquaculture facilities in Florida, USA. Biol. Invasions 19: 223-237.

Uh, M., Khattra, J., and Devlin, R.H. 2006. Transgene constructs in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) are repeated in a head-to-tail fashion and can be integrated adjacent to horizontally-transmitted parasite DNA. Transgen. Res. 15(6): 711-727.

Whittington, R.J., and Chong, R. 2007. Global trade in ornamental fish from an Australian perspective: The case for revised import risk analysis and management strategies. Prev. Vet. Med. 81(1-3): 92-116.

Wu, F., Rijn, E.V., Van Schie, B.G.C., Keymer, J.E., and Dekker, C. 2015. Multi-color imaging of the bacterial nucleoid and division proteins with blue, orange, and near-infrared fluorescent proteins. Front. Microbiol. 6: 607.