



Pêches et Océans
Canada

Fisheries and Oceans
Canada

Sciences des écosystèmes
et des océans

Ecosystems and
Oceans Science

Secrétariat canadien des avis scientifique (SCAS)

Document de recherche 2022/069

Région de la capitale nationale

Évaluation des risques pour l'environnement posés par les poissons combattants GloFish^{MD} Electric Green^{MD}, Moonrise Pink^{MD} et Sunburst Orange^{MD} : trois lignées de poissons ornementaux transgéniques

Colin McGowan, Melissa Gagné 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

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 des avis scientifiques
200, rue Kent
Ottawa (Ontario) K1A 0E6

[http://www.dfo-mpo.gc.ca/csas-sccs/
csas-sccs@dfo-mpo.gc.ca](http://www.dfo-mpo.gc.ca/csas-sccs/csas-sccs@dfo-mpo.gc.ca)



© Sa Majesté le Roi du chef du Canada, représenté par le ministre du
ministère des Pêches et des Océans, 2022

ISSN 2292-4272

ISBN 978-0-660-45884-7 N° cat. Fs70-5/2022-069F-PDF

La présente publication doit être citée comme suit :

McGowan, C., Gagné, M. et Leggatt, R. 2022. Évaluation des risques pour l'environnement posés par les poissons combattants GloFish^{MD} Electric Green^{MD}, Moonrise Pink^{MD} et Sunburst Orange^{MD} : trois lignées de poissons ornementaux transgéniques. Secr. can. des avis. sci. du MPO. Document sci. 2022/069. vi + 37 p.

Also available in English:

McGowan, C., Gagné, M., and Leggatt, R. 2022. *Environmental Risk Assessment of the GloFish[®] Electric Green[®], Moonrise Pink[®], and Sunburst Orange[®] Bettas: Three Lines of Transgenic Ornamental Fish.* DFO Can. Sci. Advis. Sec. Res. Doc. 2022/069. vi + 33 p.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE D'ACRONYMES	v
RÉSUMÉ.....	vi
SOMMAIRE	1
RENSEIGNEMENTS DE BASE	1
LES ORGANISMES DÉCLARÉS.....	2
ÉVALUATION DU RISQUE ENVIRONNEMENTAL.....	2
Exposition.....	2
Danger	3
CONCLUSIONS RELATIVES AU RISQUE	3
PARTIE 1 : FORMULATION DU PROBLÈME.....	3
1.1. OBJET DE LA PARTIE 1	3
1.2. CONTEXTE LÉGAL, CADRE D'ÉVALUATION DU RISQUE ET PRISE DE DÉCISION RÉGLEMENTAIRE.....	4
1.3. CARACTÉRISATION DES ORGANISMES	4
1.3.1. Poisson combattant GloFish ^{MD} Electric Green ^{MD} (GBS2019)	5
1.3.2. Poisson combattant GloFish ^{MD} Moonrise Pink ^{MD} (PiBS2019).....	6
1.3.3. Poissons combattants GloFish ^{MD} Sunburst Orange ^{MD} (OBS2019).....	8
1.3.4. Effets pléiotropiques des transgènes d'une protéine fluorescente chez les autres poissons.....	9
1.3.5. Caractérisation par rapport aux poissons GloFish ^{MD} précédemment déclarés et évalués.....	11
1.4. CARACTÉRISATION DES ESPÈCES COMPARABLES	12
1.4.1. Statut taxonomique	12
1.4.2. Aire de répartition.....	12
1.4.3. Exigences physiques, chimiques et biologiques	13
1.4.4. Cycle biologique.....	14
1.4.5. Bagage génétique	14
1.4.6. Caractère envahissant	15
1.5. CARACTÉRISATION DU MILIEU RÉCEPTEUR POTENTIEL.....	15
PARTIE 2 : ÉVALUATION DU RISQUE ENVIRONNEMENTAL	17
2.1. OBJET DE LA PARTIE 2	17
2.2. ÉVALUATION DE L'EXPOSITION.....	17
2.2.1. Probabilité de rejet	18
2.2.2. Probabilité de survie.....	19
2.2.3. Probabilité de reproduction	19
2.2.4. Probabilité de prolifération et de dissémination	20
2.2.5. Conclusions.....	20
2.3. ÉVALUATION DES DANGERS	21
2.3.1 Dangers potentiels liés à la toxicité environnementale	23

2.3.2 Dangers potentiels liés à la transmission horizontale de gènes	23
2.3.3 Dangers potentiels liés aux interactions avec d'autres organismes.....	24
2.3.4 Dangers potentiels liés à l'hybridation avec des espèces indigènes	26
2.3.5 Potentiel d'agir comme vecteur de maladies	26
2.3.6 Impact potentiel sur du cycle biogéochimique	27
2.3.7 Effets potentiels sur l'habitat	28
2.3.8 Effets potentiels sur la biodiversité.....	28
2.3.9 Conclusions.....	28
2.4 ÉVALUATION DU RISQUE.....	30
2.4.1 Évaluation des risques liés aux poissons combattants GloFish ^{MD}	31
2.5 RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS	32
RÉFÉRENCES CITÉES	33

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 Variantes sélectionnées de Betta splendens. Variété blanche de B. splendens domestiqué mâle (A), B. splendens sauvage femelle (B), poissons combattants Electric Green ^{MD} mâle et femelle (respectivement, C et D), poissons combattants Sunburst Orange ^{MD} mâle et femelle (respectivement, E et F), poissons combattants Moonrise Pink ^{MD} mâle et femelle (respectivement, G et H). Toutes les images sont fournies par Spectrum Brands.....	5
Figure 1.2. Activité et survie du Betta splendens lors de baisses de température de 1 °C par jour (données non publiées du MPO).	14
Figure 2.1. Matrice de risques et échelle de spectres pour illustrer comment l'exposition et les dangers sont intégrés afin d'établir un niveau de risque dans l'évaluation du risque pour l'environnement. Les évaluations des risques associés aux composantes du danger évaluées selon l'évaluation de l'exposition sont désignées par les dangers : 1) liés à la toxicité environnementale; 2) liés à la transmission horizontale de gènes; 3) liés aux interactions avec d'autres organismes; 4) liés à l'hybridation; 5) en tant que vecteurs de maladies; 6) pour le cycle biogéochimique; 7) pour l'habitat; 8) pour la biodiversité.....	31

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1. Classement de la probabilité d'exposition de l'environnement canadien à des poissons génétiquement modifiés.....	17
Tableau 2.2. Classement de l'incertitude associée à la probabilité de la présence de l'organisme et à son devenir dans l'environnement canadien (exposition de l'environnement).....	18
Tableau 2.3. Classement du danger pour l'environnement découlant de l'exposition à l'organisme.....	21
Tableau 2.4. Classement du niveau d'incertitude associé au danger pour l'environnement.	22
Tableau 2.5. Sommaire de tous les classements et degrés d'incertitude pour les évaluations des risques environnementaux des lignées de poissons combattants GloFish ^{MD} actuellement déclarées, ainsi que des lignées de poissons-zèbres et tétras GloFish ^{MD} précédemment déclarées (MPO 2018, 2019, 2020a, 2020b). Le soulignement indique que l'évaluation actuelle diffère de l'évaluation précédente.	30

LISTE D'ACRONYMES

ACIA : Agence canadienne d'inspection des aliments

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

CRISPR : Courtes répétitions palindromiques regroupées et régulièrement espacées

DL₅₀ : Dose létale tuant 50 % d'une population

DL₁₀₀ : Dose létale tuant 100 % d'une population

eGFP : Protéine verte fluorescente améliorée

ETM : Erreur type de la moyenne

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*

njaf : Nombre de jours après la fécondation

pb : Paire de bases

PE : Protocole d'entente

RFP : Protéine rouge fluorescente

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

THG : Transmission horizontale de gènes

RÉSUMÉ

Conformément à la *Loi canadienne sur la protection de l'environnement* (LCPE), une déclaration en vertu du *Règlement sur les renseignements concernant les substances nouvelles* (organismes) [RRSN(O)] a été soumise par Spectrum Brands à Environnement et Changement climatique Canada (ECCC) pour l'importation de trois *Betta splendens* génétiquement modifiés appelés poissons combattants GloFish^{MD} Electric Green^{MD} (GBS2019), Moonrise Pink^{MD} (PiBS2019) et Sunburst Orange^{MD} (OBS2019) en vue de leur vente commerciale au Canada. L'évaluation du risque environnemental consistait à analyser les dangers potentiels, la probabilité d'exposition et les incertitudes connexes, pour parvenir à une conclusion sur le risque. L'évaluation de l'exposition environnementale a permis de conclure que la présence de GBS2019, de PiBS2019 et de OBS2019 dans l'environnement canadien, hormis les aquariums, devrait être rare, isolée et éphémère en raison de leur incapacité à survivre aux températures généralement basses dans les milieux d'eau douce canadiens en hiver. Par conséquent, la probabilité d'exposition de l'environnement canadien est considérée comme faible. L'incertitude associée à l'évaluation de l'exposition environnementale est faible au vu des données disponibles sur la tolérance de la lignée déclarée et des espèces comparables pertinentes à l'égard de la température, et du fait que malgré un long historique d'utilisation du *B. splendens* non transgénique en Amérique du Nord, le poisson ne s'y est jamais établi. L'évaluation du danger environnemental a permis de conclure que les dangers potentiels liés à la toxicité environnementale, aux interactions trophiques, à l'hybridation, aux maladies, à la biodiversité, au cycle biogéochimique et à l'habitat sont négligeables. La transmission horizontale de gènes représente un danger faible (c.-à-d. aucun effet nocif prévu). L'incertitude associée à l'indice des dangers pour l'environnement varie de négligeable à modérée en raison des données limitées sur les organismes substitués et déclarés, ou d'une certaine dépendance à l'égard de l'opinion d'experts et de preuves anecdotiques. L'utilisation d'ARN guide et de Cas9 pendant la création des lignées peut avoir entraîné des mutations non ciblées dans les populations de poissons combattants GloFish^{MD}, ce qui ajoute à l'incertitude de l'évaluation du risque, mais sans modifier les conclusions générales sur les dangers. Il existe un faible risque d'effets environnementaux négatifs selon les niveaux d'exposition prévus pour l'environnement canadien découlant de l'utilisation de GBS2019, de PiBS2019 et de OBS2019 comme poissons ornementaux d'aquarium ou à d'autres fins.

SOMMAIRE

RENSEIGNEMENTS DE BASE

Le 4 février 2021, Spectrum Brands (une division de GloFish LLC) a soumis trois 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 les poissons combattants GloFish^{MD} Electric Green^{MD}, Moonrise Pink^{MD} et Sunburst Orange^{MD}, ci-après appelés collectivement poissons combattants « GloFish^{MD} ». Ces poissons ornementaux sont des *Betta splendens* (combattants du Siam) domestiqués qui ont été génétiquement modifiés pour émettre une fluorescence de diverses couleurs dans les aquariums domestiques. Il est à noter que des évaluations des risques analogues ont été réalisées pour trois couleurs différentes de poissons-zèbres GloFish^{MD} (MPO 2020a, 2020b) et 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 ne soient produits ou importés au Canada, afin de déterminer s'ils sont « toxiques » ou susceptibles de le devenir avec le temps. En vertu de la LCPE (article 64), un organisme est considéré comme toxique s'il pénètre ou peut pénétrer dans l'environnement en quantité ou en concentration suffisantes pour 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. Quiconque propose d'importer ou de fabriquer un produit de biotechnologie qui est un animal vivant, tel qu'un poisson génétiquement conçu, doit fournir à ECCC les renseignements prescrits dans le RRSN(O) au moins 120 jours avant le début de l'importation ou de la fabrication de l'organisme. Ces renseignements sont utilisés pour réaliser une évaluation du risque environnemental et une évaluation des répercussions indirectes sur la santé humaine (risques pour la santé humaine découlant d'une exposition à l'organisme dans l'environnement) qui servent ensuite à déterminer si l'organisme est toxique ou peut le devenir au sens de la LCPE.

En vertu d'un protocole d'entente (PE) avec ECCC et Santé Canada (SC), le MPO fournit un avis scientifique sous la forme d'une évaluation du risque environnemental pour les poissons issus de la biotechnologie et visés par le RRSN(O). Ces conseils servent à éclairer l'évaluation des risques selon la LCPE menée par ECCC et SC. 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 effectué une évaluation du risque environnemental posé par les organismes déclarés en fonction de leur utilisation proposée. Dans le présent document, le risque est défini comme une fonction de la possibilité que l'environnement canadien soit exposé à l'organisme déclaré et de la possibilité que l'organisme déclaré représente un danger pour l'environnement canadien. Les évaluations de l'exposition et des dangers sont réalisées séparément, puis intégrées dans une évaluation du risque. L'incertitude liée aux évaluations de l'exposition et des dangers est déterminée et l'incertitude associée à l'évaluation du risque finale est analysée.

LES ORGANISMES DÉCLARÉS

Les trois souches de poissons combattants GloFish^{MD} sont des lignées indépendantes de morphes de couleur transgéniques diploïdes, hémizygotes ou homozygotes, génétiquement modifiés, du *B. splendens* domestiqué. Chaque lignée possède un transgène différent dont l'expression produit une coloration unique à la lumière naturelle et devient fluorescente sous lumière bleue ou UV. Les protéines sont exprimées dans la peau, la musculature, les nageoires, les yeux et probablement dans d'autres organes de l'organisme.

Dans toutes les lignées, l'ensemble des spécimens descendent d'un seul individu fondateur (F0) auquel le transgène a été micro-injecté au stade de la cellule unique. L'emplacement uniforme de l'insertion du ou des transgènes, le nombre de copies et la ségrégation mendélienne ont été examinés aux générations F2 et F3.

Les poissons combattants GloFish^{MD} sont vendus aux États-Unis depuis 2019 (GBS2019) et 2020 (PiBS2019 et OBS2019), sans incident. Le changement phénotypique ciblé est l'expression d'une couleur fluorescente unique formant de nouvelles variétés colorées destinées au marché de l'aquariophilie. Parmi les autres changements phénotypiques signalés par l'entreprise, mentionnons une tolérance au froid altérée et une réduction du succès de reproduction en concurrence avec les compétiteurs non transgéniques.

ÉVALUATION DU RISQUE ENVIRONNEMENTAL

L'évaluation du risque environnemental a été réalisée selon le scénario d'utilisation proposé par Spectrum Brands : l'importation des poissons combattants GloFish^{MD} au Canada par des grossistes pour distribution à des magasins d'aquariophilie de tout le pays, en vue de leur achat par les consommateurs canadiens pour leurs aquariums domestiques.

Exposition

Il est prévu que les poissons combattants GloFish^{MD} soient confinés dans des aquariums fixes à l'intérieur de bâtiments de grossistes, de magasins de vente au détail et de maisons de consommateurs. Selon les données historiques sur les poissons d'aquarium introduits dans des écosystèmes naturels au Canada et partout dans le monde, il est très probable que ces organismes soient introduits volontairement ou par inadvertance dans les écosystèmes d'eau douce du Canada. Compte tenu du nombre de poissons qui devraient être achetés par les consommateurs individuels, ces événements devraient être de très faible ampleur (p. ex. cinq poissons ou moins par rejet), bien que des rejets de plus grande ampleur ne puissent être exclus.

Compte tenu des préférences et des limites de température des *B. splendens* non transgéniques et déclarés, et de la température de l'eau enregistrée dans les réseaux d'eau douce au Canada, les poissons combattants GloFish^{MD} ne peuvent survivre pendant l'hiver dans les écosystèmes canadiens. En effet, aucune population de *B. splendens* non transgéniques établie à long terme n'a été signalée au Canada ou aux États-Unis, malgré des décennies de ventes et de commerce en Amérique du Nord, et quelques observations occasionnelles et éphémères dans la nature.

La présence des poissons combattants GloFish^{MD} 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**, compte tenu de la qualité des données disponibles sur les températures tolérées disponibles pour chaque lignée et les organismes substitués valides, ainsi que des données dont on dispose sur les paramètres environnementaux du milieu récepteur au Canada.

Danger

Le potentiel que les poissons combattants GloFish^{MD} présentent un danger pour les milieux canadiens a été examinée dans le contexte de la toxicité environnementale, de la transmission horizontale de gène (THG), des interactions avec d'autres organismes, y compris l'hybridation, en tant que vecteur de maladies et des répercussions sur le cycle biogéochimique, l'habitat et la biodiversité. Le *B. splendens* domestiqué est un petit poisson dont l'activité devrait être limitée en raison des basses températures de la plupart des saisons au Canada, et qui n'a pas d'antécédents de caractère envahissant au Canada, malgré son utilisation répandue dans le marché de l'aquariophilie. Aucun rapport ne fait état d'effets phénotypiques du transgène susceptibles d'accroître le potentiel de danger des poissons combattants GloFish^{MD} supérieur à celui du *B. splendens* domestiqué non transgénique, et rien n'indique qu'une transmission horizontale de gène potentielle puisse être nuisible pour l'environnement canadien.

Le classement des **dangers** particuliers examinés variait de **négligeable à faible**. Le niveau d'incertitude varie de **faible à modéré**, en raison du caractère limité des données propres aux organismes et des données directes sur les espèces comparables, de la variabilité des données concernant les modèles de substitution (poisson-zèbre RFP) et de la dépendance à l'égard de l'opinion des experts pour l'évaluation de certains dangers. La technologie utilisée lors de la création des lignées (édition génomique CRISPR-Cas9) peut avoir entraîné des mutations hors cible, ce qui contribue à l'incertitude concernant les modifications génétiques de l'organisme, mais ne modifie pas les conclusions générales sur le risque. Les poissons combattants GloFish^{MD} ne devraient pas présenter de dangers supplémentaires s'ils sont utilisés dans des applications autres que l'utilisation prévue de poissons ornementaux pour les aquariums domestiques.

CONCLUSIONS RELATIVES AU RISQUE

Le risque global pour l'environnement canadien posé par les poissons combattants GloFish^{MD} est jugé **faible**, et l'on ne s'attend pas à ce que les organismes déclarés causent des effets nocifs sur 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 de l'absence de données directes à propos de l'organisme déclaré ou d'une espèce comparable, rien ne semblait indiquer que les poissons combattants GloFish^{MD}, dans le cadre de l'utilisation proposée ou d'autres utilisations potentielles, pouvaient nuire à l'environnement canadien en cas d'exposition. Ces conclusions concordent avec les évaluations précédentes des lignées déclarées de poissons-zèbres et de tétras GloFish^{MD} (MPO 2018, 2019, 2020a, 2020b).

PARTIE 1 : FORMULATION DU PROBLÈME

1.1. OBJET DE LA PARTIE 1

La partie 1 de ce document expose la formulation du problème pour l'évaluation du risque environnemental réalisée en vertu de la *Loi canadienne sur la protection de l'environnement* (LCPE) pour les poissons combattants GloFish^{MD}, trois lignées de variantes génétiquement modifiées (GM) du *B. splendens* domestiqué, également connu sous le nom de combattant du Siam, déclarées par Spectrum Brands (une division de GloFish LLC) en vertu du *Règlement sur les renseignements concernant les substances nouvelles (organismes)* [RRSN(O)], en vue d'une utilisation dans le marché de l'aquariophilie. La formulation du problème permet de poser les fondements pour l'évaluation du risque en déterminant les objectifs de protection environnementale et la portée de l'étude. Elle permet de définir les objectifs de protection et les paramètres d'évaluation correspondant aux objectifs de protection légaux de la LCPE. En outre,

la formulation du problème permet la caractérisation des trois souches de poissons combattants GloFish^{MD}, des espèces de comparaison et du milieu récepteur potentiel canadien. La déclaration sur les poissons combattants GloFish^{MD} en vertu de la LCPE fait suite à des avis analogues pour trois lignées de poissons-zèbres GloFish^{MD} (MPO 2020a, 2020b) et six lignées de tétras GloFish^{MD} (MPO 2018, 2019).

Pour de plus amples renseignements sur la LCPE et le RRSN(O), y compris les directives relatives aux règlements, les indications détaillées sur l'information requise, l'obtention de dispenses, les nouvelles activités, les résultats des évaluations du risque et la gestion du risque, consulter la page [Substances nouvelles : biotechnologie, organismes vivants](#) du site Web d'Environnement et Changement climatique Canada (ECCC).

1.2. CONTEXTE LÉGAL, CADRE D'ÉVALUATION DU RISQUE ET PRISE DE DÉCISION RÉGLEMENTAIRE

Cette évaluation des risques est effectuée dans le contexte législatif de la LCPE et des exigences en matière d'information de 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 GM sont déterminés selon le paradigme classique de l'évaluation du risque, où le risque est directement lié à l'exposition et au danger de l'organisme. L'évaluation de l'exposition est fondée sur la probabilité et l'ampleur des rejets dans l'environnement ainsi que sur la probabilité et l'importance de la survie, de la reproduction, de l'établissement et de la dissémination de l'organisme et de ses descendants potentiels dans les milieux naturels du Canada. L'évaluation du danger est axée sur les répercussions possibles de l'organisme sur : 1) les proies, prédateurs et compétiteurs potentiels de l'organisme; 2) la diversité biologique; 3) l'habitat. Le degré d'incertitude pour la détermination de l'exposition et du danger est évalué et communiqué en fonction de son incidence sur l'évaluation finale du risque. Le MPO fournit des avis scientifiques sous forme d'évaluations des risques revues par les pairs à ECCC aux fins de la prise de décisions réglementaires en vertu de la LCPE, en fonction des risques pour l'environnement et de l'incertitude associée à la conclusion. Un aperçu détaillé du contexte juridique du processus d'évaluation du risque, du cadre d'évaluation du risque et du processus décisionnel réglementaire en vertu de la LCPE est fourni dans Leggatt *et al.* (2018a).

1.3. CARACTÉRISATION DES ORGANISMES

Dans ses déclarations actuelles, Spectrum Brands demande l'importation de trois nouvelles souches transgéniques de *B. splendens* des États-Unis, pour le marché de l'aquariophilie au Canada. Les noms commerciaux des organismes transgéniques sont : poisson combattant GloFish^{MD} Electric Green^{MD} (GBS2019), poisson combattant Moonrise Pink^{MD} (PiBS2019) et poisson combattant Sunburst Orange^{MD} (OBS2019). La figure 1.1 montre l'apparence physique des trois souches de poissons combattants GloFish^{MD} déclarées, ainsi qu'un morphe non transgénique à faible pigmentation du *B. splendens* domestiqué (génotype de base ou receveur de transgènes) et du *B. splendens* sauvage.

Bien que l'entreprise ait fourni plus de détails sur la structure, l'élaboration et la fonction des constructions transgéniques utilisées pour créer les poissons combattants GloFish^{MD} aux fins d'examen, ces renseignements sont considérés comme des renseignements commerciaux confidentiels et ne sont pas inclus dans ce rapport.



Figure 1.1 Variantes sélectionnées de *Betta splendens*. Variété blanche de *B. splendens* domestiqué mâle (A), *B. splendens* sauvage femelle (B), poissons combattants Electric Green^{MD} mâle et femelle (respectivement, C et D), poissons combattants Sunburst Orange^{MD} mâle et femelle (respectivement, E et F), poissons combattants Moonrise Pink^{MD} mâle et femelle (respectivement, G et H). Toutes les images sont fournies par Spectrum Brands.

1.3.1. Poisson combattant GloFish^{MD} Electric Green^{MD} (GBS2019)

1.3.1.1. Caractérisation moléculaire

Le GBS2019 est une souche de morphe blanche génétiquement modifiée de *B. splendens* domestiqué, qui possède de multiples copies d'un insert transgénique contenant des promoteurs issus d'un poisson qui dirigent l'expression de protéines exogènes. L'insert produit une coloration verte de l'organisme sous la lumière ambiante, et est fluorescente sous la lumière UV ou bleue. Le but de cette modification est de créer un nouveau phénotype de couleur verte de *B. splendens* pour le marché de l'aquariophilie.

1.3.1.1.1. Production de l'organisme déclaré

La cassette d'expression transgénique purifiée a été mélangée à une solution de protéine Cas9 et d'ARN guide, puis injectée dans des œufs nouvellement fécondés de *B. splendens*. La protéine Cas9, dirigée par l'ARN guide, devait couper les deux brins d'ADN à un site en amont d'un gène qui est le plus analogue au gène de la β -actine 2. La construction génique devait être insérée à cet endroit en raison des bras d'homologie inclus aux extrémités de la construction génique et du mécanisme de réparation de l'ADN de l'organisme dirigé par l'homologie de l'organisme.

Les détails supplémentaires fournis par l'entreprise qui décrivent le développement et l'analyse de la lignée pour confirmer que GBS2019 constitue une seule lignée homogène et que le squelette du vecteur n'a pas été incorporé avec les transgènes sont considérés comme des renseignements commerciaux confidentiels et ne peuvent être inclus dans ce rapport.

1.3.1.1.2. Caractérisation de l'intégrat transgénique

La séquence de la construction transgénique insérée dans le GBS2019 n'a pas été séquencée et l'emplacement précis de l'insert dans le génome de l'organisme est inconnu. Bien que les éléments utilisés dans la production du GBS2019, tels que la protéine Cas9 avec l'ARN guide et les régions homologues de poisson combattant à chaque extrémité de la construction, aient été inclus pour encourager l'insertion dirigée de la cassette dans le génome de poisson combattant, une analyse ultérieure (séquençage) de la région ciblée a indiqué que la construction avait été insérée ailleurs. Aucune donnée ne permet d'examiner si des mutations Cas9 non ciblées existent pour le GBS2019.

Les détails concernant l'analyse visant à confirmer que plusieurs copies de la cassette transgénique ont été incorporées à un seul emplacement d'insertion sont considérés comme des renseignements commerciaux confidentiels et ne peuvent être inclus dans ce rapport.

1.3.1.1.3. Hérité et stabilité du transgène

Comme le site d'insertion précis du transgène n'a pas été déterminé, on ne sait pas si le phénomène se produit dans un site stable du génome ou dans une région sujette au silençage. L'individu porteur d'un transgène silencieux ne présenterait pas de phénotype de couleur verte et serait donc retiré de la population.

L'entreprise maintient cette lignée de reproduction depuis plus de quatre générations et produit commercialement le GBS2019 depuis 2019. Au cours de cette période, ils ont observé que le phénotype fluorescent vert restait durable et stable d'une génération à l'autre.

1.3.1.1.4. Méthodes de détection des poissons GBS2019

Les individus GBS2019 se distinguent des *B. splendens* domestiqués non transgéniques par leur coloration verte uniforme phénotypique sous lumière naturelle et leur fluorescence sous lumière bleue ou UV. Le GBS2019 peut être différencié génétiquement par amplification PCR d'une section unique de la cassette, suivie d'une digestion par des enzymes de restriction pour générer des fragments uniques qui peuvent être séparés en une série de bandes qui distinguent le GBS2019 des autres poissons combattants transgéniques verts fluorescents s'ils sont porteurs d'une cassette différente.

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 une couleur verte lorsque le GBS2019 est exposé à la lumière ambiante et fluorescente sous lumière bleue ou UV. Ce nouveau phénotype de couleur se voit dans les muscles, la peau et les yeux. Spectrum Brands indique que les individus GBS2019 hémizygotes et homozygotes pour l'insert transgénique ne peuvent être distingués visuellement les uns des autres et sont tous destinés à la vente.

1.3.1.2.2. Effets phénotypiques non ciblés de la modification

Aucune étude officielle n'a comparé la susceptibilité potentielle aux maladies du GBS2019 avec celle du *B. splendens* non transgénique. Il n'existe pas non plus d'études formelles sur les effets non ciblés potentiels de la modification génétique sur le cycle de vie du GBS2019, les tolérances et les exigences environnementales, le métabolisme, la physiologie, l'endocrinologie ou le comportement; toutefois, il n'existe aucun rapport anecdotique. Des données confidentielles, soumises par l'entreprise dans le cadre de son dossier réglementaire, suggèrent que le GBS2019 n'est pas plus susceptible d'être invasif que les *Betta splendens* non transgéniques domestiqués.

1.3.2. Poisson combattant GloFish^{MD} Moonrise Pink^{MD} (PiBS2019)

1.3.2.1. Caractérisation moléculaire

Le PiBS2019 est une souche de morphe blanche génétiquement modifiée de *B. splendens* domestiqués, qui possède de multiples copies d'un insert transgénique contenant de promoteurs issus d'un poisson qui dirigent l'expression de protéines exogènes. L'insert produit une coloration rose de l'organisme sous la lumière ambiante et devient fluorescent sous lumière bleue. Le but de cette modification est de créer un nouveau phénotype de couleur rose de *B. splendens* pour le marché de l'aquariophilie.

1.3.2.1.1. Production de l'organisme déclaré

La cassette d'expression transgénique purifiée a été mélangée à une solution de protéine Cas9 et d'ARN guide, puis injectée dans des œufs nouvellement fécondés de *B. splendens*. La protéine Cas9, dirigée par l'ARN guide, devait couper les deux brins d'ADN à un site en amont d'un gène qui est le plus analogue au gène de la β -actine 2. La construction génique devait être insérée à cet endroit en raison des bras d'homologie inclus aux extrémités de la construction génique et du mécanisme de réparation de l'ADN de l'organisme dirigé par l'homologie de l'organisme.

Les détails supplémentaires fournis par la société qui décrivent le développement et l'analyse de la lignée pour confirmer que PiBS2019 constitue une seule lignée homogène et que le squelette du vecteur n'a pas été incorporé avec les transgènes, sont considérés comme des renseignements commerciaux confidentiels et ne peuvent être inclus dans ce rapport.

1.3.2.1.2. Caractérisation de l'intégrant transgénique

La séquence de la construction transgénique qui s'est insérée dans le PiBS2019 n'a pas été séquencée et l'emplacement précis de l'insert dans le génome de l'organisme est inconnu. Bien que les éléments utilisés dans la production du PiBS2019, tels que la protéine Cas9 avec l'ARN guide et les régions homologues de poisson combattant à chaque extrémité de la construction, aient été inclus pour encourager l'insertion dirigée de la cassette dans le génome de poisson combattant, une analyse ultérieure (séquençage) de la région ciblée a indiqué que la construction avait été insérée ailleurs. Aucune donnée ne permet d'examiner si des mutations Cas9 non ciblées existent pour le PiBS2019.

Les détails concernant l'analyse visant à confirmer que plusieurs copies de la cassette transgénique ont été incorporées à un seul emplacement d'insertion sont considérés comme des renseignements commerciaux confidentiels et ne peuvent être inclus dans ce rapport.

1.3.2.1.3. Hérité et stabilité du transgène

Comme le site d'insertion précis du transgène n'a pas été déterminé, il est impossible de déterminer si le phénomène se produit dans un site stable du génome ou dans une région sujette au silençage. L'individu porteur d'un transgène silencieux ne présenterait pas de phénotype de couleur rose et serait donc retiré de la population

Spectrum Brands maintient cette lignée de reproduction depuis plus de quatre générations et produit commercialement le PiBS2019 depuis 2020. Au cours de cette période, ils ont observé que le phénotype fluorescent rose restait durable et stable d'une génération à l'autre.

1.3.1.1.4. Méthodes de détection des poissons PiBS2019

Les individus PiBS2019 se distinguent facilement des *B. splendens* domestiqués non transgéniques par leur coloration rose uniforme phénotypique sous lumière naturelle et leur fluorescence sous lumière bleue ou UV. Le PiBS2019 peut être différencié génétiquement par amplification PCR et détection de fragments uniques de l'insert transgénique, suivie d'une digestion par des enzymes de restriction pour générer des fragments uniques qui peuvent être séparés en une série de bandes qui différencient le PiBS2019 des autres poissons combattants transgéniques roses fluorescents s'ils sont porteurs d'une cassette différente.

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 une couleur rose lorsque le PiBS2019 est exposé à la lumière ambiante et fluorescente sous lumière bleue ou UV, afin de créer une nouvelle variante de couleur vive pour le marché de l'aquariophilie. Ce nouveau

phénotype de couleur se voit dans les muscles ainsi que dans la peau et les yeux. Spectrum Brands rapporte que les individus PiBS2019 hémizygotes et homozygotes pour l'insert transgénique ne peuvent être distingués visuellement les uns des autres et sont tous destinés à la vente.

1.3.2.2. Effets phénotypiques non ciblés de la modification

Aucune étude officielle n'a comparé la susceptibilité potentielle aux maladies du PiBS2019 avec celle du *B. splendens* non transgénique. Il n'existe pas non plus d'études formelles sur les effets non ciblés potentiels de la modification génétique sur le cycle de vie du PiBS2019, les tolérances et les exigences environnementales, le métabolisme, la physiologie, l'endocrinologie ou le comportement; toutefois, il n'existe aucun rapport anecdotique ou autres d'effets non ciblés.

Des données confidentielles, soumises par la société dans le cadre de son dossier réglementaire, suggèrent que PiBS2019 n'est pas plus susceptible d'être invasif que les *Betta splendens* non transgéniques domestiqués.

1.3.3. Poissons combattants GloFish^{MD} Sunburst Orange^{MD} (OBS2019)

1.3.3.1. Caractérisation moléculaire

L'OBS2019 est une souche de morphe blanche génétiquement modifiée de *B. splendens* domestiqué, qui possède environ une copie d'un insert transgénique contenant de promoteurs issus d'un poisson qui dirigent l'expression de protéines exogènes. L'insert produit une coloration orange de l'organisme sous la lumière ambiante, et une fluorescence sous lumière bleue ou UV. Le but de cette modification est de créer un nouveau phénotype de couleur orange de *B. splendens* pour le marché de l'aquariophilie.

1.3.3.1.1. Production de l'organisme déclaré

La cassette d'expression transgénique purifiée a été mélangée à une solution de protéine Cas9 et d'ARN guide, puis injectée dans des œufs nouvellement fécondés de *B. splendens*. La protéine Cas9, dirigée par l'ARN guide, devait couper les deux brins d'ADN à un site en amont d'un gène qui est le plus analogue au gène de la β -actine 2. La construction génique devait être insérée à cet endroit en raison des bras d'homologie inclus aux extrémités de la construction génique et du mécanisme de réparation de l'ADN de l'organisme dirigé par l'homologie de l'organisme.

Les détails supplémentaires fournis par la société qui décrivent le développement et l'analyse de la lignée pour confirmer que PiBS2019 constitue une seule lignée homogène et que le squelette du vecteur n'a pas été incorporé avec les transgènes, sont considérés comme des renseignements commerciaux confidentiels et ne peuvent être inclus dans ce rapport.

1.3.3.1.2. Caractérisation de l'intégrant transgénique

La séquence de la construction transgénique qui s'est insérée dans l'OBS2019 n'a pas été séquencée et l'emplacement précis de l'insert dans le génome de l'organisme est inconnu. Bien que les éléments utilisés dans la production de l'OBS2019, tels que la protéine Cas9 avec l'ARN guide et les régions homologues de poisson combattant à chaque extrémité de la construction, aient été inclus pour encourager l'insertion dirigée de la cassette dans le génome de poisson combattant, une analyse ultérieure (séquençage) de la région ciblée a indiqué que la construction avait été insérée ailleurs. Aucune donnée ne permet d'examiner si des mutations Cas9 non ciblées existent pour l'OBS2019.

Les détails concernant l'analyse visant à confirmer que plusieurs copies de la cassette transgénique ont été incorporées à un seul emplacement d'insertion sont considérés comme des renseignements commerciaux confidentiels et ne peuvent être inclus dans ce rapport.

1.3.3.1.3. Hérité et stabilité du transgène

Comme le site d'insertion précis du transgène n'a pas été déterminé, il est impossible de déterminer si l'insertion se produit dans un site stable du génome ou dans une région sujette au silençage. L'individu porteur d'un transgène silencieux ne présenterait pas de phénotype de couleur orange et serait donc retiré de la population.

L'entreprise maintient cette lignée de reproduction depuis plus de quatre générations et produit commercialement l'OBS2019 depuis 2020. Au cours de cette période, ils ont observé que le phénotype fluorescent orange restait durable et stable d'une génération à l'autre.

1.3.3.1.4. Méthodes de détection des poissons OBS2019

Les individus OBS2019 se distinguent facilement des *B. splendens* domestiqués non transgéniques par leur coloration orange uniforme phénotypique sous lumière naturelle et leur fluorescence sous lumière bleue ou UV. Les OBS2019 peuvent être différenciés génétiquement par l'amplification PCR d'une section unique de la cassette, et la détection de fragments uniques après une digestion par des enzymes de restriction. Lorsqu'il est digéré par l'enzyme de restriction, le produit de la PCR peut être séparé en une série de bandes qui distinguent les OBS2019 des autres poissons combattants transgéniques orange fluorescents portant une cassette différente.

1.3.3.2. Caractérisation phénotypique

1.3.3.2.1. Effets phénotypiques ciblés de la modification

L'effet phénotypique ciblé de la modification génétique est la coloration orange lorsque l'OBS2019 est exposé à la lumière ambiante et sa fluorescence sous lumière bleue ou UV, créant ainsi une nouvelle variante de couleur vive pour le marché de l'aquariophilie. Ce nouveau phénotype de couleur se voit dans les muscles ainsi que dans la peau et les yeux. La société rapporte que les individus OBS2019 hémizygotes et homozygotes pour l'insert transgénique ne peuvent être distingués visuellement les uns des autres et sont tous destinés à la vente.

1.3.3.2.2. Effets phénotypiques non ciblés de la modification

Aucune étude officielle n'a comparé la susceptibilité potentielle aux maladies du OBS2019 avec celle du *B. splendens* non transgénique. Il n'existe pas non plus d'études formelles sur les effets non ciblés potentiels de la modification génétique sur le cycle de vie du OBS2019, les tolérances et les exigences environnementales, le métabolisme, la physiologie, l'endocrinologie ou le comportement; toutefois, il n'existe aucun rapport anecdotique ou autres d'effets non ciblés.

Des données confidentielles, soumises par dans le cadre de son dossier réglementaire, suggèrent qu'OBS2019 n'est pas plus susceptible d'être envahissant que les *Betta splendens* non transgéniques domestiqués.

1.3.4. Effets pléiotropiques des transgènes d'une protéine fluorescente chez les autres poissons

De nombreuses protéines fluorescentes, particulièrement la protéine verte fluorescente améliorée (eGFP), sont largement utilisées dans la recherche sur différents organismes, et on

dispose de certaines données pertinentes à l'évaluation du risque sur le poisson-zèbre transgénique à la protéine rouge fluorescente (RFP) et d'autres protéines fluorescentes.

Il a été observé que les poissons-zèbres porteurs d'un transgène RFP étaient moins tolérants au froid que les poissons-zèbres non transgéniques non apparentés, dans des études sous différentes températures d'acclimatation (Cortemeglia et Beitinger 2005, 2006 b), bien que les différences dans le bagage génétique de la souche et les conditions d'élevage (Schaefer et Ryan, 2006) préalables à l'expérimentation aient pu avoir une incidence sur la tolérance relative aux températures extrêmes. En outre, Leggatt *et al.* (2018b) ont signalé que le poisson-zèbre porteur du transgène eGFP dirigé par le promoteur de la protéine Fli-1 était moins tolérant au froid que la souche non transgénique de source; toutefois, deux autres lignées eGFP dirigées par d'autres promoteurs ne présentaient pas ce caractère. Cela indique que différentes lignées transgéniques peuvent présenter des réactions différentes aux facteurs de stress environnementaux extrêmes.

Aucun effet de la transgénèse des protéines fluorescentes n'a été observé sur la survie des poissons-zèbres exprimant la RFP par rapport aux poissons non transgéniques apparentés dans des conditions de laboratoire (Howard *et al.* 2015). Dans une population de poissons-zèbres eGFP, RFP, eGFP-RFP et non transgénique, la survie des poissons eGFP était plus faible. La survie des porteurs du transgène de la RFP ou du double transgène n'était toutefois pas affectée (Gong *et al.* 2003), ce qui indique que différents transgènes ou lignées transgéniques peuvent également avoir des effets différents sur la survie. Les croisements par paires avec des congénères non transgéniques ont abouti à une descendance moins fluorescente que prévu dans deux des six lignées de tétras GloFish^{MD} (MPO 2019), et deux des trois lignées de poissons-zèbres GloFish^{MD} (MPO 2020a,b), ce qui témoigne d'une diminution de la viabilité des gamètes ou des larves fluorescentes dans certains modèles fluorescents.

Les rapports décrivant les effets de la transgénèse RFP sur la vulnérabilité à la prédation présentent des résultats variés. Cortemeglia et Beitinger (2006a) ont constaté que les poissons-zèbres RFP et non transgéniques non apparentés faisaient l'objet d'une prédation égale. Hill *et al.* (2011) ont constaté que le poisson-zèbre GloFish^{MD} exprimant la RFP est deux fois plus vulnérable à la prédation que les poissons-zèbres capturés à l'état sauvage non apparentés. En revanche, Jha (2010) a découvert qu'une souche indienne de poisson-zèbre RFP domestiqué constituait une proie moins importante pour les tête-de-serpent capturées dans la nature que le poisson-zèbre de type sauvage capturé dans la nature. Les facteurs influençant la différence de vulnérabilité relative du poisson-zèbre RFP à la prédation ne sont pas connus, mais pourraient inclure des différences dans le bagage génétique ou l'histoire de l'élevage du poisson-zèbre transgénique et non transgénique, la préférence innée ou le cycle biologique des prédateurs utilisés, ou les conditions expérimentales (p. ex., la présence d'un abri pour les espèces-proies). Jha (2010) constate que les spécimens RFP sont plus agressifs que leurs congénères sauvages non apparentés, bien que cela puisse être dû à des différences de domestication ou d'élevage. Le tétra GloFish^{MD} Electric Green^{MD} ne différait pas des tétras non transgéniques quant à la réussite de la quête de nourriture ou aux degrés d'agressivité lors de tests de compétition liée à la quête de nourriture par paires (Leggatt et Devlin 2019).

Les effets déclarés de la RFP et d'autres transgènes fluorescents sur le succès ou les préférences de reproduction du poisson-zèbre varient également d'une étude à l'autre. Les poissons-zèbres RFP et non transgéniques atteignent la maturité à un âge semblable chez les femelles apparentées, et présentent une fécondité mâle et femelle comparable (Howard *et al.* 2015). Dans une population comprenant un nombre égal d'individus eGFP et de spécimens non transgéniques, les descendants eGFP n'affichaient ni avantage ni désavantage reproductif (Gong *et al.* 2003). En revanche, Owen et ses collaborateurs (2012) ont constaté que les femelles non transgéniques et exprimant la RFP (apparentées) préféraient toutes deux

s'associer aux mâles RFP plutôt qu'aux mâles non transgéniques, quel que soit le ratio de spécimens RFP et transgéniques dans leur cohorte d'élevage. Dans une autre étude, Howard *et al.* (2015) ont signalé un succès d'accouplement plus faible chez les mâles RFP et moins d'agressivité envers les poissons mâles et femelles par rapport aux mâles non transgéniques apparentés.

Snekser *et al.* (2006) rapportent que le transgène RFP n'influe pas sur les préférences des partenaires sociaux pour la formation de banc ou dans un contexte se prêtant à la reproduction chez des populations vraisemblablement non apparentées de poissons-zèbres RFP et non transgéniques. Howard *et al.* (2015) ont étudié le devenir du transgène RFP sur 15 générations dans le cadre d'une expérience de reproduction concurrentielle en série dans 18 populations de poisson-zèbre GloFish^{MD}. Dans toutes les populations, la fréquence du transgène RFP a diminué rapidement et la variante a été éliminée dans toutes les populations sauf une, ce qui indique un fort désavantage reproducteur associé au transgène RFP. Dans l'ensemble, les rapports sur les effets non ciblés dans d'autres modèles transgéniques de protéines fluorescentes ne sont pas cohérents et, pour la plupart, ces effets seraient considérés comme préjudiciables à l'organisme (p. ex., diminution de la tolérance au froid, du succès reproducteur).

1.3.5. Caractérisation par rapport aux poissons GloFish^{MD} précédemment déclarés et évalués

Les poissons combattants GloFish^{MD} ont été obtenus à l'aide de méthodes et de protocoles de tests semblables à ceux utilisés pour les lignées de poissons-zèbres GloFish^{MD} et de tétras GloFish^{MD} précédemment déclarés et évalués. Toutes les lignées de GloFish^{MD} déclarées précédemment ont été produites à l'aide de cassettes d'expression transgénique et d'éléments (promoteurs, séquences de terminaison) analogues, bien que les gènes pigmentaires varient selon la couleur du poisson. La production du poisson combattant GloFish^{MD} s'est différenciée par l'utilisation de bras d'homologie spécifiques à l'espèce incorporés dans la construction, et par l'utilisation de Cas9 avec un ARN guide spécifique à l'espèce inclus dans le mélange d'injection lors de la production des individus fondateurs de chaque lignée. Il s'agissait de diriger l'insertion spécifique du site de la construction dans le génome de poisson combattant, bien que la société ait indiqué que l'analyse de similarité de séquence spécifique du site a révélé que les transgènes ont été insérés dans un emplacement inconnu autre que celui ciblé (données non fournies).

L'utilisation d'ARN guide et de Cas9 pour diriger l'insertion de transgènes spécifiques à un site peut avoir entraîné des mutations non ciblées et involontaires au sein des populations de poissons combattants obtenues. L'analyse des séquences n'a trouvé aucun endroit du génome de poisson combattant publié présentant des correspondances exactes avec l'ARN guide (autre que le site prévu avec une paire de bases supplémentaire). Dans d'autres modèles, il a été démontré que l'ARN guide et la Cas9 se lient et coupent l'ADN génomique même en présence de mésappariements de 3 à 5 paires de bases entre l'ARN guide et l'ADN génomique (Zhang *et al.* 2015). Aucune donnée ne permet d'examiner si des mutations Cas9 non ciblées existent dans les populations de poissons combattants GloFish^{MD}. À notre connaissance, la possibilité que les mutations Cas9 non ciblées affectent les caractéristiques liées au risque chez les organismes supérieurs n'a pas été examinée et peut être propre à chaque cas.

Les tests de caractérisation moléculaire et phénotypique menés par la société étaient équivalents entre les lignées de GloFish^{MD} actuelles et celles précédemment déclarées, et les résultats des tests menés sur les poissons combattants GloFish^{MD} se recourent avec certaines ou toutes les lignées précédemment déclarées.

1.4. CARACTÉRISATION DES ESPÈCES COMPARABLES

Aux fins de cette évaluation des risques, le *B. splendens* domestiqué (le combattant du Siam) a été choisi comme comparateur. Le *B. splendens* est une espèce ornementale populaire qui est élevée, produite et commercialisée dans le monde entier. C'est l'un des poissons les plus fréquemment rencontrés dans le marché de l'aquariophilie. On le trouve par exemple dans 97 % des boutiques d'aquariophilie interrogées dans le nord-ouest des États-Unis (Strecker *et al.* 2011). Il a été domestiqué pour la première fois il y a environ 170 ans, dans ce qui est aujourd'hui la Thaïlande, où il était recherché pour la propension des mâles à se battre entre eux (Monvises *et al.* 2009). Les *B. splendens* actuellement commercialisés en aquarium sont considérés comme fortement domestiqués (Teletchea, 2016). La sélection subséquente a donné lieu à une variété impressionnante de couleurs, d'iridescences et de morphologies de nageoires qui ont fait de cette espèce un favori des aquariophiles. Plus récemment, l'intérêt pour la génétique du comportement agressif a fait du *B. splendens* une espèce modèle importante pour la recherche scientifique (Fan *et al.* 2018; Ramos et Goncalves 2019; Vu *et al.* 2020). Les populations sauvages de *B. splendens* dans leur aire de répartition naturelle sont actuellement en déclin en raison des effets découlant de l'activité humaine tels que la pollution, la destruction de l'habitat et l'introduction de souches domestiquées (Chailertit *et al.* 2014).

1.4.1. Statut taxonomique

Le *Betta splendens* est un poisson d'eau douce de la sous-famille des Macropodusinae, de la famille des Osphronemidae (également connus sous le nom de Gouramis). Il fait partie des quelque 55 espèces de poissons combattants qui ont été décrites en Asie du Sud-Est, le *B. splendens* étant l'une des plus répandues (Monvises *et al.* 2009). En tant que membres du sous-ordre des Anabantoidei (ordre des Perciformes), les poissons combattants possèdent un « organe labyrinthe », une structure très repliée située dans une cavité au-dessus des branchies, recouverte d'épithélium respiratoire et pouvant aider à la respiration accessoire (Ruber *et al.* 2006). Cet organe est utilisé pour générer des bulles lors de la construction d'un nid, et peut aider à la survie en présence d'une quantité limitée d'oxygène dissous. Le genre *Betta* peut être divisé en deux catégories : les espèces à incubation buccale, où le mâle protège les œufs fécondés en les gardant dans sa bouche, et les espèces à nid de bulles, où le mâle construit un nid de bulles dans lequel il peut incuber et protéger les embryons en développement. Bien que la majorité des espèces de poissons combattants soient des poissons à incubation buccale, le *B. splendens* se caractérise par ses nids de bulles (Ruber *et al.* 2006).

Il n'existe aucun rapport publié sur l'hybridation entre les espèces de poissons combattants dans la nature, ou en élevage; cependant, selon l'[International Betta Congress](#), les souches domestiquées de *B. splendens* actuelles ont été sélectionnées à partir des types sauvages de *Betta imbellis*, *Betta mahachaiensis*, *Betta samaragdina*, et du type sauvage original *B. splendens* (Goldstein 2015).

Depuis sa domestication, le *B. splendens* a été reproduit sélectivement pour des caractéristiques telles que la couleur et l'iridescence, la morphologie des nageoires et l'agressivité (Monvises *et al.* 2009). Aujourd'hui, il existe une grande variété de souches de *B. splendens* qui peuvent être achetées ou échangées, notamment les poissons combattants Black Orchid, Bumblebee, Half-moon Double Tail et le Rose Petal, pour n'en citer que quelques-uns (USFWS 2019).

1.4.2. Aire de répartition

Le *Betta splendens* est originaire du bassin du Mékong au Cambodge, au Laos, en Thaïlande et au Viet Nam. C'est l'espèce de *Betta* prédominante et largement répandue dans la plaine

centrale de la Thaïlande (Monvises *et al.* 2009). Des introductions de *B. splendens*, tant accidentelles qu'intentionnelles, ont eu lieu dans plusieurs pays, avec des populations établies signalées à Singapour, en République dominicaine, au Brésil, en Colombie (USFWS 2019) et en Australie (Hammer *et al.* 2019). Aux États-Unis, on a cru que *B. splendens* était établie en Floride, dans des plans d'eau adjacents à des piscicultures ornementales, mais il a été éradiqué par un froid extrême en 1977 (USFWS 2019). En outre, des signes indiquant une population reproductrice ont été observés dans le Connecticut en 1997, mais celle-ci n'a pas réussi à s'établir (voir Nico et Neilson 2018; USFWS 2019). Avant 1968, des introductions de *B. splendens* ont été effectuées dans les sources thermales du parc national de Banff en Alberta, au Canada (Renaud et Allister 1988), mais leur présence n'a pas été signalée depuis.

1.4.3. Exigences physiques, chimiques et biologiques

Le *B. splendens* sauvage est carnivore et se nourrit principalement de larves de moustiques et d'autres petits insectes aquatiques (Pleeging et Moons 2017). Son habitat de prédilection est constitué de petites étendues d'eau douce, comme celles des rizières, des étangs, des lagunes et des marais, avec une végétation abondante pour le protéger des prédateurs aviaires (Jaroensutasinee et Jaroensutasinee 2001; Monvises *et al.* 2009). Dans l'aquarium, le *B. splendens* préfère un pH neutre, tolère des taux d'oxygène dissous inférieurs à 2 ppm (bien qu'il préfère 5 à 7 ppm), et se développe mieux à des températures comprises entre 24 et 30 °C (Goldstein 2015). Goodrich et Taylor (1934) ont établi une température optimale de reproduction d'environ 27 °C, et ont observé que les mâles cessent de construire des nids de bulles lorsque la température chute en dessous de 25 °C. Dans la nature, l'habitat de nidification chez le *B. splendens* en Thaïlande a été décrit comme présentant de faibles pH (5,28 à 5,80) et taux d'oxygène dissous (0,00 à 7,39 ppm), une température élevée (27,00 à 31,50 °C), dans des profondeurs d'eau allant de 2,00 à 9,40 cm (Jaroensutasinee et Jaroensutasinee 2001). Il n'existe aucun document publié décrivant la capacité des poissons combattants à survivre en dehors de leur plage de température privilégiée, mais les données recueillies par la société déclarante indiquent qu'ils ne peuvent pas survivre en dessous de 6 °C lorsque les températures chutent rapidement (1 °C/30 min de 25 à 15 °C, avec des périodes d'incubation de 2 h à 17,5 et 15 °C, puis diminution de 0,25 °C/30 min à partir de 15 °C, voir section 1.3.1.2.2). Des données non publiées recueillies par le MPO indiquent que lorsque la température baisse lentement (1 °C/jour à partir de 20,5 °C), les poissons combattants ralentissent leur alimentation et leur activité vers 17 °C, cessent de s'alimenter vers 12,5 °C, cessent leur activité à 11,5 °C et perdent leur équilibre entre 11,2 et 8,0 °C (moyenne de 10,0 ± 1,2 °C, voir figure 1.2).

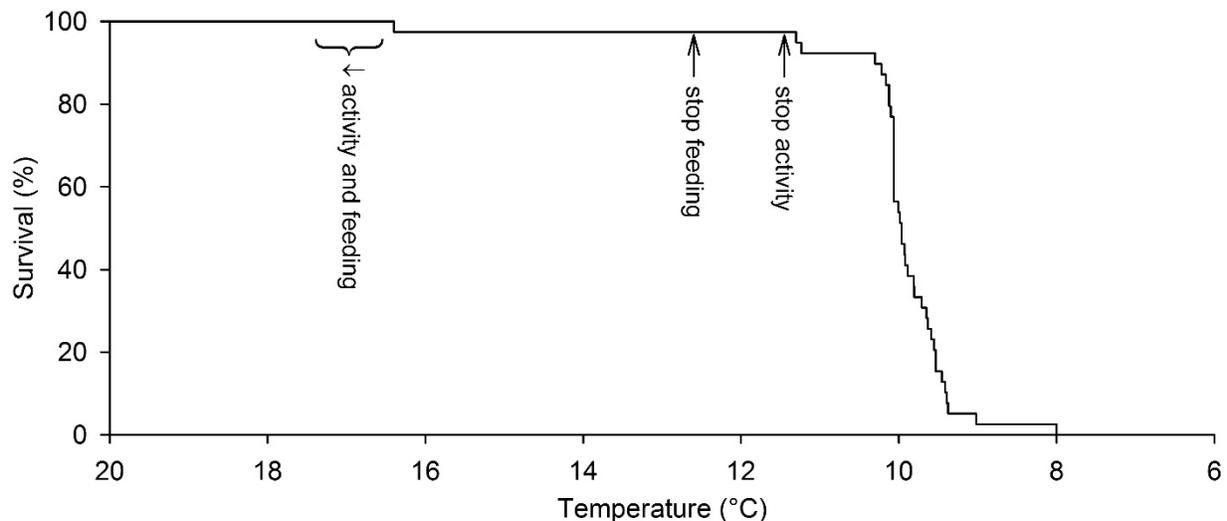


Figure 1.2. Activité et survie du *Betta splendens* lors de baisses de température de 1 °C par jour (données non publiées du MPO).

1.4.4. Cycle biologique

Le cycle biologique des poissons combattants à nids de bulles est décrit en détail par Goldstein (2015). Lorsqu'il est prêt à se reproduire, le mâle *B. splendens* construit un nid de bulles à la surface de l'eau et commence à courtiser une femelle. Les bulles sont générées par le mâle à l'aide de son organe labyrinthe, et sont recouvertes d'un mucus qui aide à lier le nid, et fournit aux œufs et aux larves une protection contre les microbes. Une fois qu'un partenaire a été choisi, le mâle enroule son corps autour de la femelle, l'incitant à libérer ses œufs. Dix à quarante œufs sont libérés à chaque étreinte jusqu'à ce que la femelle soit épuisée, un processus qui peut prendre plusieurs heures et donner lieu à environ 100 à 1000 œufs fécondés. La fécondation se fait à l'extérieur, le mâle saisissant les œufs lorsqu'ils tombent sur le substrat et les soulevant dans le nid où il peut les protéger des prédateurs et assurer leur développement. Lorsque la fraie est terminée, la femelle est chassée et le mâle se charge de défendre le nid. Les œufs éclosent après 24 à 36 heures d'incubation, puis restent dans le nid pendant deux ou trois jours, sous forme de larves, jusqu'à ce que leur sac d'œufs soit complètement adsorbé. Les alevins quittent le nid en tant que poissons nageant librement. Le dimorphisme sexuel est apparent après trois ou quatre mois et, bien que le taux de croissance du *B. splendens* soit très variable, les poissons peuvent devenir sexuellement matures en cinq mois et atteindre une longueur d'environ 7,5 cm (Watson *et al.* 2019).

1.4.5. Bagage génétique

Le *B. splendens* domestiqué est relativement bien caractérisé génétiquement, bien que les informations sur la structure génétique des populations sauvages soient limitées. Les premières études sur les poissons combattants domestiqués portaient sur la transmission de la couleur, de l'iridescence et de la morphologie des nageoires, ainsi que sur le mécanisme de détermination du sexe (Goodrich et Mercer 1934; Wallbrunn 1958; Lucas 1968). Bien que les mâles soient considérés par beaucoup comme le sexe hétérogamétique, les rapports sexuels réalisés à l'âge adulte sont variables et peuvent être considérablement différents de 50:50. Des études cytologiques chez le *B. splendens* ont établi un nombre de chromosomes diploïdes de 42 (Furgala-Selezniow *et al.* 2008), mais n'ont pas pu identifier un chromosome sexuel morphologiquement distinct, ce qui laisse croire que le sexe peut être déterminé par plusieurs

allèles répartis sur les autosomes, ou que des facteurs environnementaux agissent sur le développement du sexe (Kipouros *et al.* 2011). Plus récemment, Ramos et Goncalves (2019) ont constaté que la sélection axée sur l'agressivité chez les *B. splendens* mâles était corrélée à une forte agressivité des femelles, ce qui suggère des mécanismes génétiques et physiologiques communs à l'agressivité des mâles et des femelles.

La biologie moléculaire et la génomique sont également utilisées pour approfondir notre compréhension de la génétique chez le *B. splendens*. Khoo et ses collaborateurs (1997) ont utilisé la focalisation isoélectrique pour étudier la variation des protéines entre quatre souches de couleur différente de *B. splendens*, et ont trouvé un haut degré de similarité génétique entre les souches. Meejui *et al.* (2005) ont eu recours à l'électrophorèse des alloenzymes pour examiner différentes populations d'écloseries et les comparer à une population sauvage. Ils ont constaté que, même si la variabilité génétique était moindre dans les écloseries par rapport à la population sauvage, elle était encore suffisante pour permettre de détecter une structure génétique parmi ces populations.

Les données de séquences d'ADN mitochondrial ont été utilisées pour l'analyse phylogénétique et pour étudier la relation évolutive entre les espèces de *Betta* à incubation buccale et celles à nid de bulles (Ruber *et al.* 2004; Ruber *et al.* 2006). Ces études ont permis d'établir que les poissons combattants constituent un groupe monophylétique, bien que le trait d'incubation buccale se soit avéré polyphylétique et ait pu évoluer plus d'une fois au sein du genre. Afin de faciliter les études génétiques ultérieures, une séquence complète de l'ensemble du génome mitochondrial chez le *B. splendens* a été publiée par Prakhongcheep *et al.* (2018).

Fan et ses collaborateurs (2018) ont assemblé le premier génome de référence pour le *B. splendens* comme base pour l'étude du comportement agressif chez cette espèce. Cette carte de référence a été utilisée par Vu *et al.* (2020) au cours de leur étude de la transcriptomique cérébrale chez des paires de *B. splendens* mâles en combat. Ils ont constaté une synchronisation de l'expression des gènes entre les paires de combattants, ce qui entraîne une synchronisation par paire des gènes associés au transport des ions, à la fonction des synapses, ainsi qu'à l'apprentissage et à la mémoire. Amparyup et ses collaborateurs (2020) ont également utilisé la transcriptomique pour étudier la fonction immunitaire chez le *B. splendens*.

1.4.6. Caractère envahissant

Bien qu'il existe des exemples de populations établies de *B. splendens* dans diverses parties du monde (toutes tropicales), cette espèce n'a été signalée comme envahissante que dans le nord de l'Australie, où une population importante et étendue a persisté dans la rivière Adelaide pendant plusieurs années consécutives, avec un potentiel de propagation accrue (Hammer *et al.* 2019). On suppose ici une incidence sur les populations localisées de poissons et de têtards indigènes occupant des niches comparables, par le biais d'interactions agressives et d'une compétition pour l'espace et la nourriture, bien que les conséquences directes de l'introduction du poisson combattant n'aient pas été spécifiquement examinées (Hammer *et al.* 2019). Hill et ses collaborateurs (2017) ont estimé, en utilisant le protocole Fish Invasiveness Screening Kit (FISK), que le potentiel d'invasion du *B. splendens* dans la zone contiguë des États-Unis était faible.

1.5. CARACTÉRISATION DU MILIEU RÉCEPTEUR POTENTIEL

Bien que les profils de température annuels de nombreux lacs et cours d'eau du Canada varient, tout comme les températures minimales et maximales moyennes, la plupart atteignent 4 °C ou moins à un moment ou à un autre de l'année, et seuls quelques lacs isolés situés dans

le sud de la région côtière de la Colombie-Britannique affichent des températures minimales supérieures à cette valeur. Parmi ces derniers lacs, tous sauf un ont connu une température minimale inférieure à 6 °C, et le seul lac avec une température minimale supérieure à 6 °C (Cowichan Lake) a affiché une température minimale inférieure à 6 °C à l'occasion (voir Leggatt *et al.* 2018b). Il convient de noter que les enregistrements de température de ces lacs plus chauds sont souvent limités à une seule mesure par hiver, et les températures enregistrées peuvent ne pas représenter la température la plus froide ou la plus chaude obtenue pendant les mois d'hiver.

Compte tenu de ce qui précède, si un poisson introduit ne peut survivre à 4 °C ou moins, sa présence dans l'environnement canadien sera, au mieux, saisonnière avec de possibles poches localisées pouvant passer l'hiver (p. ex. effluents industriels, sources hydrothermales, etc., lacs isolés si le poisson peut survivre à des températures entre 4 et 6 °C). Précisons que les profils de température de nombreux systèmes d'eau douce peuvent présenter une certaine hétérogénéité. Par exemple, les contributions des eaux souterraines peuvent faire monter ou baisser les températures dans des zones localisées d'un plan d'eau, et les eaux près du rivage connaissent plus souvent des températures extrêmes que les eaux profondes. Les sources thermales et les effluents d'eau chaude peuvent entraîner la présence de zones localisées affichant tout au long de l'année des températures plus élevées que les températures canadiennes habituelles. De plus, les températures moyennes des eaux douces de surface au Canada augmentent en raison du changement climatique, et on prévoit qu'elles devraient connaître une hausse de 1,5 à 4,0 °C au cours des 50 prochaines années (MPO 2013). Par conséquent, le nombre de lacs dans lesquels des organismes ayant une tolérance modérée au froid sont susceptibles de survivre pourrait augmenter.

Une caractérisation plus détaillée des milieux récepteurs potentiels au Canada dans le contexte de l'introduction de poissons est présentée dans [Leggatt *et al.* \(2018a\)](#).

PARTIE 2 : ÉVALUATION DU RISQUE ENVIRONNEMENTAL

2.1. OBJET DE LA PARTIE 2

La partie 2 du présent document porte sur l'évaluation du risque environnemental réalisée en vertu de la *Loi canadienne sur la protection de l'environnement* (LCPE) pour les trois lignées de poissons combattants GloFish^{MD} décrites dans la première partie du document et déclarées par Spectrum Brands en vertu du *Règlement sur les renseignements concernant les substances nouvelles (organismes)*. Compte tenu des espèces comparables courantes et des similitudes physiologiques et écologiques entre les trois lignées, la section suivante examinera les toutes les lignées conjointement. Le format de l'évaluation des risques environnementaux suit celui qui a été utilisé pour les tétras GloFish^{MD} (MPO 2018, 2019) et les poissons-zèbres GloFish^{MD} (MPO 2020a, 2020b) précédemment déclarés. Sauf indication contraire, les résultats de l'évaluation actuelle sont équivalents à ceux des évaluations de GloFish^{MD} précédentes.

2.2. ÉVALUATION DE L'EXPOSITION

L'évaluation de l'exposition pour les trois organismes vivants aborde à la fois la probabilité qu'il pénètre dans l'environnement (rejet) et leur devenir une fois dans l'environnement. La probabilité et l'ampleur de l'exposition environnementale sont déterminées au moyen d'une évaluation approfondie 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 de la probabilité d'exposition de l'environnement canadien.

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

Probabilité d'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 et dans diverses régions

¹extrêmement improbable ou imprévisible

Étant donné le statut réglementaire des poissons GM soumis à une évaluation du risque environnemental en vertu de la LCPE, l'absence de données empiriques sur la survie, la valeur adaptative et la capacité de reproduction des poissons combattants GloFish^{MD} dans l'environnement naturel contribue à l'incertitude dans l'évaluation de l'exposition. L'incertitude quant au devenir environnemental d'un organisme ou l'échec de son confinement biologique et géographique peut dépendre de la disponibilité et de la qualité des données scientifiques sur les paramètres biologiques et écologiques de l'organisme, les substituts valides et le milieu récepteur. Le tableau 2.2 présente le 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 la présence de l'organisme et à son devenir dans l'environnement canadien (exposition de l'environnement).

Niveau d'incertitude	Renseignements disponibles
Négligeable	Données de grande qualité sur l'organisme (p. ex. stérilité, tolérance aux températures, valeur adaptative). Données relatives aux paramètres environnementaux du milieu récepteur et au point d'entrée. Preuve de l'absence d'effets 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 les organismes apparentés ou sur des substituts valides. Données sur les paramètres environnementaux du milieu récepteur. Compréhension des effets GxE possibles dans les 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 dans le 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 d'experts.

Toutes les évaluations précédentes des lignées de poissons-zèbres et tétras GloFish^{MD} déclarées et évaluées ont conclu à un faible indice d'exposition environnementale avec un faible niveau d'incertitude (MPO 2018, 2019, 2020a, 2020b). Aucune caractéristique moléculaire ou phénotypique connue chez les poissons combattants GloFish^{MD} ne suggère un indice différent de celui des lignées évaluées précédemment, et aucun nouvel ouvrage scientifique n'a été publié qui pourrait modifier les indices précédents. Par conséquent, les évaluations de l'exposition environnementale pour les poissons combattants GloFish^{MD} sont faibles, avec un faible niveau d'incertitude qui est cohérent avec les lignes déclarées précédemment. Des précisions soutenant cette conclusion suivent.

2.2.1. Probabilité de rejet

Bien que l'organisme soit destiné à la vente sur le marché des poissons ornementaux et que la plupart des amateurs qui achètent le produit suivent les instructions d'élimination recommandées par le détaillant ou la société elle-même, il est fort probable que les poissons combattants GloFish^{MD} seront introduits dans l'environnement canadien. Une fois l'organisme vendu au détail, il n'est plus sous le contrôle direct de l'importateur et aucune garantie ne peut être apportée quant au caractère approprié du confinement et de l'élimination par la suite. De nombreux poissons d'aquarium se sont établis dans des milieux naturels en Amérique du Nord; des rapports récurrents, bien qu'isolés, témoignent de la présence de poissons d'aquarium dans les eaux canadiennes et il y a lieu de croire que la libération de ces organismes dans l'environnement est une pratique courante et continue (Kerr et al. 2005; Rixon et al. 2005;

Marson et al. 2009; Strecker et al. 2011). Ceci concorde avec une forte probabilité de rejet de tétras et de poissons-zèbres GloFish^{MD} précédemment déclarés. La mesure dans laquelle l'environnement sera exposé aux poissons combattants GloFish^{MD} dépendra donc fortement de la capacité des poissons à survivre et à se reproduire dans les lacs et les rivières du Canada.

2.2.2. Probabilité de survie

Comme le *B. splendens* est une espèce tropicale, il ne devrait pas pouvoir survivre en région tempérée où la température de l'eau est inférieure à la température optimale pour sa survie. En effet, la température de l'eau est un facteur abiotique clé qui influe sur la survie et la reproduction de la plupart des populations de poissons d'eau douce; c'est aussi un facteur important dans la détermination de l'adéquation de l'habitat (Jobling 1981; Magnuson *et al.* 1979).

Dans l'aquarium, le *B. splendens* se développe mieux à des températures comprises entre 24 et 30 °C (Goldstein 2015, voir section 1.4.3).

Au cours d'expériences menées au MPO (voir section 1.4.3), lorsque la température de l'eau était abaissée relativement lentement (diminution de 1 °C/jour à partir de 20,5 °C), les *B. splendens* domestiqués non transgéniques ont cessé de s'alimenter vers 12,5 °C, et 100 % des poissons avaient perdu l'équilibre à 8 °C, bien que la majorité des poissons aient perdu l'équilibre entre 11,2 et 9,0 °C, avec une DL₅₀ de 9,91 ± 0,13 °C.

Tel que discuté dans la définition du problème (voir la section 1.5), il n'existe aucun lac connu au Canada qui demeure constamment au-dessus de 7 °C pendant une année entière, ou au-dessus de 6 °C sur plusieurs années, et presque tous ne demeurent pas au-dessus de 4 °C tout au long de l'année (à l'exception des sources chaudes et des effluents industriels).

Bien que les températures nécessaires à la survie des poissons combattants GloFish^{MD} soient possibles dans plusieurs lacs canadiens pendant l'été, il est extrêmement improbable que ceux-ci puissent survivre à l'hiver canadien. Au mieux, sa présence dans l'environnement serait saisonnière ou éphémère. Ceci est également appuyé par l'absence d'établissement de *B. splendens* après avoir observé leur présence dans des climats beaucoup plus chauds, comme en Floride, aux États-Unis (p. ex. en Floride, USFWS 2019).

Bien que les températures moyennes à la surface des eaux douces au Canada augmentent en raison du changement climatique, et qu'on prévoit une hausse de 1,5 à 4,0 °C au cours des 50 prochaines années (MPO, 2013), la majorité des systèmes d'eau douce qui présentent une couverture de glace importante en hiver devraient connaître une diminution du nombre de jours de glace (MPO 2013). Néanmoins, le maintien de toute couverture de glace en hiver entraînerait des températures égales ou inférieures à 4 °C à un certain moment au cours de l'hiver, ce qui empêcherait la survie à l'année des poissons combattants GloFish^{MD}.

Les données sur la tolérance au froid, combinées à l'absence d'établissement du *B. splendens* dans des régions plus chaudes que le Canada (p. ex. la Floride, USFWS 2019), suggèrent un potentiel de survie négligeable dans les eaux canadiennes, même avec la hausse des températures de l'eau associée au changement climatique.

2.2.3. Probabilité de reproduction

Même si les températures de l'eau au Canada limiteront la persistance de poissons combattants GloFish^{MD} dans l'environnement (voir la section 2.2.2), ceux-ci pourraient encore avoir le temps de se reproduire s'ils sont introduits au début d'une saison chaude. Par exemple, le lac Osoyoos de l'intérieur de la Colombie-Britannique est l'un des plus chauds au Canada l'été, sa température moyenne se situant entre 20 et 25 °C environ deux mois par année (de la

mi-juillet à la mi-septembre), les températures plus élevées (p. ex. 25 °C) étant limitées à une fenêtre encore plus courte (p. ex. de la fin juillet au début août; BCLSS 2013). Bien qu'il s'agisse d'une plage de température tolérable pour la survie des poissons combattants GloFish^{MD}, des températures plus chaudes (25-30 °C) sont préférables pour la reproduction (Goodrich et Taylor 1934, Goldstein 2015). Les poissons combattants pourraient potentiellement se reproduire dans des zones isolées d'eau chaude (p. ex., des sources chaudes), mais elles ne se sont pas établies lorsqu'elles ont été libérées dans une source chaude à Banff, en Alberta (voir USFWS, 2019).

2.2.4. Probabilité de prolifération et de dissémination

La capacité des poissons combattants GloFish^{MD} à proliférer et à se propager dans l'environnement canadien est empêchée par le fait que *B. splendens* ne peut survivre à l'hiver. Mentionnons que les poissons combattants GloFish^{MD} libérés occuperaient probablement des zones proches du rivage, d'après ce que l'on sait de l'habitat de prédilection de l'espèce sauvage dans la nature (voir la section 1.4.3). On s'attend à ce que ces zones présentent des variations de température plus extrêmes que les eaux profondes ou la partie médiane des lacs, où sont souvent prises les mesures de la température de l'eau (Trumpikas *et al.* 2015). Par conséquent, les températures hivernales périodiques peuvent donc être plus froides que ne l'indiquent les données enregistrées, ce qui réduirait d'autant plus le potentiel d'hivernage du poisson combattant GloFish^{MD}, bien que les poissons puissent se déplacer pour suivre des eaux plus chaudes lorsque les températures baissent. Les températures estivales plus chaudes dans ces zones peuvent augmenter le potentiel de frai d'une seule génération.

2.2.5. Conclusions

Compte tenu de l'analyse ci-dessus, la présence des poissons combattants GloFish^{MD} dans l'environnement canadien devrait être rare, isolée et éphémère. Par conséquent, la probabilité d'exposition des poissons combattants GloFish^{MD} à l'environnement canadien est classée **faible** selon le tableau 2.1. Le niveau d'incertitude associée à cette estimation est **faible** (tableau 2.2), compte tenu de la qualité des données (tolérance à la température) disponibles pour les poissons combattants GloFish^{MD} et les organismes substitués valides, ainsi que des preuves de faible variabilité et des données dont on dispose sur les paramètres environnementaux du milieu récepteur au Canada. Cet indice est conforme à l'indice d'exposition de faible intensité et à celui de faible incertitude attribué à trois lignées de poissons-zèbres GloFish^{MD} (MPO 2020a, 2020b) et à six lignées de tétras GloFish^{MD} (MPO 2018, 2019).

La société déclarante indique que la seule utilisation prévue de l'organisme déclaré est celle de poisson ornemental d'intérieur destiné aux aquariums domestiques fixes. Cependant, une fois ces poissons achetés par les consommateurs, d'autres usages non prévus ne peuvent être écartés (p. ex., l'élevage dans des étangs extérieurs, comme poisson-appât, etc.). Certaines utilisations non prévues pourraient mener à la libération de poissons combattants GloFish^{MD}, mais elles ne devraient pas modifier la capacité de cet organisme à passer l'hiver dans un environnement canadien ni le faible indice d'exposition environnementale à cet organisme.

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 potentiels sur l'environnement qui pourraient découler de l'exposition aux poissons combattants GloFish^{MD}. 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 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. Toute différence dans les paramètres de mesure est évaluée par rapport à la variation « normale », selon les études publiées et les opinions des experts.

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

Classement du danger	Évaluation
Négligeable	Aucun effet ¹
Faible	Aucun effet nocif ²
Modérée	Effets nocifs réversibles
Élevée	Effets nocifs irréversibles

¹Aucune réponse biologique au-delà de la variabilité naturelle n'est attendue. ²Effet 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.

L'incertitude entourant l'évaluation des dangers peut être importante en raison des lacunes évidentes dans les connaissances et des données empiriques insuffisantes sur le comportement et les effets du poisson combattant GloFish^{MD} lorsqu'il se trouve dans l'environnement naturel. Les paramètres d'évaluation de l'incertitude portent sur les effets potentiels sur l'environnement, qui peuvent s'appuyer fortement sur l'information et les données figurant dans la documentation scientifique publiée et évaluée par les pairs. Le tableau 2.4 décrit les classements relatifs à l'incertitude concernant les dangers potentiels posés par l'organisme dans l'environnement.

Tableau 2.4. Classement du niveau d'incertitude associé au danger pour l'environnement.

Classement du niveau d'incertitude	Renseignements disponibles
Négligeable	Données de grande qualité sur les organismes. Preuve de l'absence d'effets GxE ou parfaite compréhension de ces derniers dans les conditions environnementales pertinentes. Signes d'une faible variabilité.
Faible	Données de grande qualité sur les organismes apparentés ou sur des substituts valides. Compréhension des effets GxE dans les conditions environnementales pertinentes. Une certaine variabilité.
Modérée	Données limitées sur les organismes, les organismes apparentés ou les substituts valides. Compréhension limitée des effets GxE dans les conditions environnementales pertinentes. Lacunes dans les connaissances. Dépendance à l'égard de l'opinion d'experts.
Élevée	Importantes lacunes dans les connaissances. Dépendance importante à l'égard de l'opinion d'experts.

En ce qui concerne le niveau d'incertitude, la qualité des données renvoie aux données ou aux renseignements disponibles pour chaque paramètre examiné, à l'intégration de ces renseignements et à l'étendue des conditions expérimentales examinées, à la taille de l'échantillon, au caractère approprié des témoins, à l'analyse statistique ainsi qu'à la conception des expériences et à l'interprétation des résultats. La variabilité réfère à la gamme de différences phénotypiques entre les individus ou les souches du même environnement ainsi qu'à l'éventail de conditions physiques, chimiques et biologiques auxquelles un poisson génétiquement modifié peut être exposé dans le milieu récepteur. Les grands principes qui influencent sur le niveau d'incertitude dans les évaluations des dangers associés aux poissons génétiquement modifiés (p. ex., GxE, effets du bagage génétique, effets non ciblés ou pléiotropiques) sont exposés en détail dans Leggatt *et al.* (2018a) et Devlin *et al.* (2015).

L'utilisation proposée des poissons combattants GloFish^{MD} (importation et transport dans des conteneurs fixes, entreposage dans des aquariums fixes de grossistes et de détaillants, élevage dans des aquariums domestiques fixes) minimise les séquences des effets du poisson combattant GloFish^{MD} sur l'environnement canadien. La majorité des dangers posés par les poissons combattants GloFish^{MD} (p. ex., interactions avec d'autres organismes, conséquences sur le cycle biogéochimique, l'habitat et la biodiversité) seraient causés par une introduction directe du poisson dans des écosystèmes aquatiques naturels bien que certains dangers pourraient en découler indirectement, par le rejet d'eaux usées ou de carcasses dans l'environnement (p. ex., toxicité pour l'environnement, transmission horizontale de gènes, vecteur de maladies).

Les évaluations des lignées de poissons-zèbres et de tétras GloFish^{MD} précédemment déclarées et évaluées ont toutes abouti à des classements négligeables pour la plupart des voies de pénétration dans 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, 2020a, 2020b). Bien que le *B. splendens* diffère des espèces précédemment

déclarées *G. ternetzi* et *D. rerio* dans certains phénotypes (c.-à-d. l'agressivité, la construction de nids), aucune caractéristique moléculaire ou phénotypique connue des poissons combattants GloFish^{MD} dérivée des modifications génétiques ne suggère un classement différent de celui des lignées précédemment évaluées, et aucun nouvel ouvrage scientifique n'a été publié qui modifierait les indices précédents. Par conséquent, les évaluations des dangers posés par les poissons combattants GloFish^{MD} pour l'environnement correspondent à celles des poissons-zèbres et des tétras GloFish^{MD} précédemment déclarées. Des précisions soutenant ces conclusions suivent, et de plus amples détails sur chaque évaluation des risques sont disponibles dans Leggatt *et al.* (2018a).

2.3.1 Dangers potentiels liés à la toxicité environnementale

Les voies potentielles de toxicité environnementale comprennent l'exposition des écosystèmes aquatiques à l'animal en entier et à ses déchets, ainsi que son ingestion par des prédateurs. L'exposition de l'environnement aux protéines fluorescentes devrait être plus faible que l'exposition de la protéine aux lignées de poissons combattants GloFish^{MD}, bien que les différentes voies d'exposition ne soient pas nécessairement comparables. Les protéines fluorescentes sont souvent utilisées comme marqueurs neutres en recherche scientifique, et ce, chez une grande variété d'organismes; très peu d'effets toxiques ont été rapportés dans le cadre de cette utilisation (Stewart, 2006). Les rares effets négatifs relevés étaient généralement propres aux organismes transgéniques ayant un niveau d'expression élevé des transgènes fluorescents (Huang *et al.* 2000; Devgan *et al.* 2004; Guo *et al.* 2007). Les effets toxiques sur les organismes hôtes sont probablement dus à la production de protéines dans la cellule hôte et on ne s'attend pas à des effets semblables après l'exposition par contact ou par ingestion.

Les déclarations comprennent 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 à d'autres espèces de GloFish^{MD} contenant des transgènes codant les mêmes protéines que celles des lignées de poissons combattants GloFish^{MD} n'a été signalé. Par conséquent, le danger potentiel pour l'environnement lié à la toxicité des poissons combattants GloFish^{MD} est jugé négligeable. L'incertitude liée à ce classement est modérée, en raison des données directes limitées sur les organismes déclarés ou les organismes substitués, et du recours à des preuves anecdotiques et indirectes provenant d'autres organismes. Cela concorde avec le classement des évaluations des poissons-zèbres et des tétras GloFish^{MD} déclarés précédemment (MPO 2018, 2019, 2020a, 2020b), et aucune nouvelle donnée pertinente n'a été obtenue depuis les analyses des lignées GloFish^{MD} précédentes.

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 (les procaryotes) comprennent l'exposition à l'intestin, ou par les excréments, le mucus et d'autres déchets rejetés par le poisson dans l'eau. La construction transgénique ne contient pas d'éléments transposables qui pourraient accroître le potentiel d'absorption ou de mobilité de l'ADN vers un nouvel organisme. L'expression du transgène en un changement phénotypique nécessite une transmission concomitante d'éléments réglementaires. Une forte proximité des promoteurs aux transgènes du pigment pourrait accroître la probabilité de transmission concomitante et d'expression, mais les promoteurs des vertébrés présentent généralement une faible activité chez les procaryotes. De même, la présence identifiée du promoteur du bactériophage T3 dans

les constructions transgéniques des lignées actuelles et de certaines lignées déclarées antérieurement puisse accroître le potentiel de THG fonctionnelle, et il a été démontré que le promoteur du T3 entraîne l'expression de transgènes de la protéine fluorescente cnidaire chez *Escherichia coli* (Wu *et al.* 2015). Une étude récente a analysé le potentiel de THG de transgènes de protéines fluorescentes en utilisant des mouches des fruits génétiquement modifiées (transgéniques pour DsRed) et leur parasitoïde (Ramirez-Santos *et al.* 2018). Les auteurs n'ont trouvé aucune preuve de THG du transgène de la protéine fluorescente sur 16 générations d'élevage expérimental, tout en mettant en garde contre la possibilité que leur conception expérimentale n'ait pas permis de détecter des événements rares de THG ou de transfert de transgènes mutés.

Des gènes codants des protéines fluorescentes ont été introduits dans un large éventail d'organismes, et seuls quelques cas d'effet nocif découlant de l'introduction du transgène fluorescent ont été signalés. Il y a donc lieu de penser que l'introduction du transgène par THG dans un nouvel hôte ne devrait pas entraîner d'effet nocif, si elle se produit. Graham et Davis (2021) ont récemment démontré la THG d'un gène favorable à l'environnement (protéine antigèle) entre deux espèces de poissons à une échelle évolutive. Bien que cela démontre que la THG peut se produire entre des organismes d'un niveau trophique plus élevé, l'absence d'avantage lié à la valeur adaptative (p. ex. reproduction, tolérance au froid) conférée par les transgènes de protéines fluorescentes utilisés suggère que si une THG se produisait, elle se ferait probablement sur un seul organisme. 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** en raison de l'absence d'effets nocifs attendus liés à une telle introduction. Bien que les transgènes soient bien définis, la connaissance limitée de l'emplacement du transgène dans le génome du *B. splendens* ainsi que l'absence d'études sur la THG des transgènes et les conséquences qui en découlent donnent lieu à une **incertitude modérée**. Ces résultats concordent avec les évaluations antérieures des poissons-zèbres et des tétras GloFish^{MD}, bien que dans ce dernier groupe l'incertitude ait été jugée faible (MPO 2018, 2019, 2020a, 2020b). Ici, et pour les poissons-zèbres, l'indice d'incertitude a été augmenté pour mieux refléter l'absence ou le nombre limité d'études pertinentes sur la THG et les conséquences qui en découlent.

2.3.3 Dangers potentiels liés aux interactions avec d'autres organismes

Si des poissons combattants GloFish^{MD} sont relâchés dans l'environnement, ils pourraient interagir avec d'autres organismes présents dans les écosystèmes d'eau douce canadiens, dont des proies potentielles, compétiteurs et prédateurs. Les interactions trophiques du *B. splendens* sauvage dans son aire de répartition indigène ne sont pas bien documentées (voir la section 1.4.3). C'est le cas également des interactions trophiques du *B. splendens* non transgénique domestiqué échappé dans d'autres zones. Les données limitées décrites ci-dessous indiquent que le *B. splendens* non transgénique pourrait avoir un potentiel limité sur les espèces canadiennes par des interactions trophiques, et que les poissons combattants GloFish^{MD} auraient probablement un potentiel d'impact égal ou inférieur par des interactions trophiques.

Le *B. splendens* sauvage est carnivore et se nourrit principalement de larves de moustiques et d'autres petits insectes aquatiques (Pleeging et Moons 2017). Par conséquent, il peut affecter les populations localisées de petites proies ou de compétiteurs occupant des niches semblables au lieu de sa libération. Les *B. splendens* non transgéniques sont généralement décrits comme étant agressifs et ils interagissent mal avec d'autres espèces de poissons ornementaux. Ils pourraient entraîner des répercussions localisées sur des organismes occupant des niches semblables lorsqu'ils sont établis à l'extérieur de l'aire de répartition indigène, bien que cela

n'ait pas été directement étudié (Hammer *et al.* 2019). Les poissons combattants font partie des espèces de poissons tropicaux introduites dans une source thermale de Banff, en Alberta, où l'on pense que ces espèces ont contribué à l'extinction du naseux des rapides de Banff, bien que les poissons combattants ne figurent pas dans le groupe qui a contribué à l'extinction du naseux (Lanteigne 1988; Renaud et McAllister 1988). Dans les réseaux hydrographiques typiques du Canada, on s'attend à ce que l'activité et donc les niveaux d'alimentation du *B. splendens* soient faibles pendant la plupart des saisons en raison de l'activité limitée des poissons combattants à des températures inférieures à 17 °C (données non publiées du MPO).

Dans d'autres modèles transgéniques à protéine fluorescente, les tétras GloFish^{MD} Electric Green^{MD} affichaient un comportement agressif et une réussite dans la quête de nourriture comparables à ceux de leurs congénères non transgéniques dans des essais d'alimentation par paires (Leggatt et Devlin 2019). Quant au poisson-zèbre RFP, il présentait une agressivité et un succès reproducteur des mâles inférieurs à ceux de ses congénères non transgéniques (Howard *et al.* 2015). Ces résultats suggèrent que la transgénèse des protéines fluorescentes peut diminuer ou ne pas affecter la réussite compétitive chez les poissons tropicaux – bien que ces deux études portent sur des espèces généralement non agressives. Les informations anecdotiques fournies par la société déclarante indiquent qu'aucune différence de comportement n'a été détectée entre les poissons combattants GloFish^{MD} et les espèces non transgéniques dans l'industrie des animaux de compagnie.

Compte tenu des faibles températures prévues presque toute l'année dans les écosystèmes d'eau douce du Canada et de l'absence de preuves d'un comportement modifié par les modifications génétiques, les possibles répercussions négatives de la libération du nombre prévu de poissons combattants GloFish^{MD} sur les espèces aquatiques indigènes, par prédation ou compétition, devraient être négligeables presque toute l'année, et ne pas être plus importantes que celles des *B. splendens* non transgéniques.

Des poissons combattants GloFish^{MD} libérés constitueraient de nouvelles proies, et risquent donc aussi d'avoir une incidence sur les populations indigènes de prédateurs. Ils pourraient avoir un effet positif sur ces populations en fournissant une nouvelle source d'approvisionnement en nourriture, ou un effet négatif si l'ingestion de poissons combattants GloFish^{MD} cause des effets nocifs. Il s'agit d'une situation improbable, puisque les poissons combattants GloFish^{MD} ne sont pas censés être toxiques pour l'environnement (voir la section 2.3.1 ci-dessus). Bien que la pression exercée par la prédation sur les poissons combattants GloFish^{MD} par rapport aux *B. splendens* non transgéniques n'ait pas été signalée, les populations non transgéniques qui s'établissent dans la nature sont signalées comme ayant une couleur plus terne (Hammer *et al.* 2019), ce qui suggère que les espèces aux couleurs plus vives, comme les lignées de poissons combattants GloFish^{MD}, peuvent être plus sujets à des pressions sélectives telles que la prédation. Ce phénomène a également été observé chez d'autres espèces de poissons tropicaux d'ornement élevés pour leur couleur (Tuckett *et al.* 2021). L'effet de la transgénèse fluorescente dans un autre modèle transgénique (poisson-zèbre RFP) est contradictoire, le poisson-zèbre exprimant la RFP ayant une susceptibilité à la prédation supérieure (Hill *et al.* 2011), égale (Cortemiglia et Beitinger 2006a) ou inférieure (Jha 2010) par rapport aux poissons non apparentés non transgéniques. Ces résultats variables peuvent être dus à des différences dans l'historique d'élevage, le bagage génétique, les conditions expérimentales des études, ou les interactions GxE. Comme on ignore si l'une ou l'autre des études susmentionnées sur la vulnérabilité à la prédation peut s'appliquer aux poissons combattants GloFish^{MD} dans les environnements canadiens, il est impossible d'estimer avec une certitude raisonnable sa vulnérabilité par rapport à ses congénères non transgéniques. Cependant, en raison de l'absence de toxicité attendue résultant de l'ingestion de poissons combattants GloFish^{MD}, les lignées déclarées introduites aux échelles prévues ne

devraient pas constituer un danger pour les prédateurs indigènes, quelle que soit la vulnérabilité potentielle à la prédation.

Compte tenu de la faible activité du *B. splendens* dans les eaux plus froides et de l'absence de modifications constatées dans le comportement trophique des lignées déclarées, les poissons combattants GloFish^{MD} ne devraient pas affecter les interactions trophiques des organismes indigènes au-delà des fluctuations naturelles. Le danger qui leur est associé est donc **négligeable** par rapport à leurs homologues non transgéniques. Le manque d'études portant directement sur les risques liés aux poissons combattants GloFish^{MD}, les données disponibles limitées sur un substitut (poisson-zèbre RFP) et la mauvaise compréhension des interactions GxE dans l'agressivité et la susceptibilité à la prédation dans les modèles transgéniques fluorescents de substitution conduisent à un degré d'incertitude **modéré**. Cela concorde avec le classement des évaluations des poissons-zèbres et des tétras GloFish^{MD} déclarés précédemment (MPO 2018, 2019, 2020a, 2020b).

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

Le *Betta splendens* est un poisson d'eau douce de la sous-famille des Macropodusinae, de la famille des Osphronemidae (également connus sous le nom de Gouramis) qui est originaire d'Asie, et ne se trouve pas en Amérique du Nord. Bien que *B. splendens* compte de nombreuses espèces congénères dans son aire de répartition naturelle (Monvises *et al.* 2009), aucune n'est établie au Canada et aucun autre genre de la famille des Osphronemidae n'est indigène au Canada. Par conséquent, le risque que les poissons combattants GloFish^{MD} présentent un danger en raison d'une hybridation naturelle avec des poissons indigènes au Canada est négligeable. La haute qualité des données sur la répartition des espèces *Betta* et des genres apparentés conduit à une incertitude négligeable. Ceci concorde avec les conclusions sur les dangers que présentent les lignées de tétras GloFish^{MD}, bien que le degré d'incertitude des lignées Danio^{MD} soit plus élevé en raison de la présence d'espèces indigènes appartenant à la même famille que le *D. rerio* au Canada.

2.3.5 Potentiel d'agir comme vecteur de maladies

Les poissons ornementaux d'aquarium commerciaux sont souvent des vecteurs d'agents pathogènes, y compris de virus, de bactéries, de champignons ou de parasites (p. ex. Evans et Lester 2001; Rehulka *et al.* 2006; Whittington and Chong 2007; Hongslo et Jansson 2009; Rose *et al.* 2013).

De plus, tout agent pathogène dont les poissons combattants GloFish^{MD} seraient porteurs devrait être d'origine tropicale ou persister dans les eaux chaudes normalement présentes dans l'aquarium domestique (p. ex. 25-28 °C) et, par conséquent, pourrait avoir une capacité limitée de persister à l'intérieur ou à l'extérieur des poissons combattants GloFish^{MD} une fois libéré dans les milieux d'eau douce canadiens plus froids.

Le *B. splendens* ne figure pas sur la liste des quelques espèces tropicales vulnérables à des maladies d'importance majeure pour la santé des animaux aquatiques et l'économie canadienne, selon l'Agence canadienne d'inspection des aliments (ACIA) ([Espèces d'animaux aquatiques vulnérables](#)). Deux autres espèces de Gourami, le *Trichogaster pectoralis* et le *Trichogaster trichopterus* (également de la famille des Osphronemidae) sont répertoriées pour le syndrome ulcératif épizootique (*Aphanomyces invadans*), mais les espèces de *Betta* ne figurent pas sur la liste de l'ACIA des espèces connues pour être porteuses de cet agent pathogène ([Espèces vulnérables au syndrome ulcératif épizootique](#)). Comme le principal mode d'entrée au Canada du poisson combattant GloFish^{MD} proviendra des États-Unis, l'ACIA jouera un rôle déterminant dans la réglementation des agents pathogènes de l'espèce *B. splendens*

importés au Canada. Toute personne qui importe des animaux aquatiques figurant sur la liste des espèces vulnérables doit obtenir un permis d'importation relatif à la santé des animaux aquatiques, tandis que toutes les autres importations nécessitent une « déclaration » à la frontière.

La possibilité de modification de la capacité des poissons combattants GloFish^{MD}, ou de tout autre organisme fluorescent transgénique, à agir comme vecteur d'agents pathogènes n'a pas été examinée directement. Une vulnérabilité accrue aux maladies peut accroître la capacité d'un organisme à agir comme vecteur en augmentant sa propension à servir d'hôte et à libérer plus d'agents pathogènes. En revanche, cette vulnérabilité peut aussi réduire sa capacité vectorielle 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, il a été démontré que l'expression de la GFP diminue l'activation des lymphocytes T (Koelsch *et al.* 2013), induit la sécrétion de cytokine IL-6 (Mak *et al.* 2007), inhibe les voies de signalisation immunitaire (Baens *et al.* 2006), et modifie l'expression des gènes en jeu dans la fonction immunitaire (Coumans *et al.*, 2014) et la réponse au stress (Badrian et Bogoyevitch, 2007). De plus, Chou et ses collaborateurs (2015) ont signalé que des souris transgéniques pour le DsRed présentaient des modifications du nombre de certains globules blancs (lymphocytes et monocytes), mais pas d'autres.

Depuis 2003, de nombreuses autres espèces et lignées d'espèces fluorescentes transgéniques pour aquarium ont été élevées à l'échelle commerciale aux États-Unis. Spectrum Brands a fourni des déclarations de vétérinaires accrédités affirmant qu'ils n'avaient pas constaté d'augmentation de la vulnérabilité aux agents pathogènes ou de leur transmission dans aucune des lignées GloFish^{MD}, bien qu'aucune preuve empirique n'ait été fournie. Depuis des années, 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.

Par conséquent, il existe un potentiel **négligeable** que les poissons combattants GloFish^{MD} présentent une capacité altérée comme vecteur de maladie par rapport aux *B. splendens* non transgéniques. Puisque ce paramètre n'a pas été directement observé chez les poissons combattants GloFish^{MD}, qu'il existe peu de données sur un substitut et qu'on doit compter sur l'avis d'experts, le degré d'incertitude pour cette évaluation est **modéré**. Cela concorde avec le classement des évaluations des poissons-zèbres et des tétras GloFish^{MD} déclarés précédemment (MPO 2018, 2019, 2020a, 2020b).

2.3.6 Impact potentiel sur du cycle biogéochimique

Les poissons combattants GloFish^{MD} devraient contribuer aux cycles des éléments nutritifs au sein des habitats en ingérant des proies et d'autres aliments ainsi qu'en éliminant des déchets métaboliques (ammoniac et déjections). Les effets potentiels des protéines fluorescentes sur le métabolisme chez les poissons combattants GloFish^{MD}, et donc sur le cycle nutritif, n'ont pas été examinés. Dans un autre organisme modèle, les souris eGFP transgéniques ont subi des modifications du cycle de l'urée, du métabolisme de l'acide nucléique et des acides aminés ainsi que de leur utilisation de l'énergie (Li *et al.* 2013). Nous ne savons pas quels effets ces modifications pourraient avoir sur le cycle biogéochimique si les poissons combattants GloFish^{MD} subissaient les mêmes effets liés à l'expression génique du transgène fluorescent, mais la petite taille du *B. splendens* et le faible nombre d'individus susceptibles d'être introduits dans un écosystème indiquent que le danger pour le cycle biogéochimique est **négligeable** dans les environnements naturels, même avec des voies métaboliques modifiées. Le degré d'incertitude est **modéré** en raison du manque d'études portant expressément sur ce danger. Cela concorde avec le classement des évaluations des lignées de poissons-zèbres et des tétras GloFish^{MD} déclarés précédemment (MPO 2018, 2019, 2020a, 2020b).

2.3.7 Effets potentiels sur l'habitat

Le *B. splendens* est une petite espèce qui ne construit pas de structures susceptibles d'affecter l'habitat des autres espèces. Les poissons combattants mâles construisent des nids de bulles pour l'incubation des embryons, mais on s'attend à ce qu'ils soient éphémères par nature et aucun rapport connu ne fait état de conséquences négatives des nids de bulles sur l'habitat chez les *B. splendens* ou d'autres espèces qui en construisent. Goodrich et Taylor (1934) ont rapporté que les mâles cessent de construire des nids de bulles lorsque la température tombe en dessous de 25 °C, ce qui limiterait grandement les moments et les endroits où les poissons combattants rejetés peuvent construire des nids dans les eaux canadiennes. Aucun rapport, anecdotique ou autre, ne fait état d'une modification du comportement des poissons combattants GloFish^{MD}, par rapport aux *B. splendens* domestiqués, qui pourrait affecter la structure de l'habitat. Par conséquent, les poissons combattants GloFish^{MD} devraient avoir des effets **négligeables** sur l'habitat, et le niveau d'incertitude concernant ce classement est **faible**. Cela concorde avec le classement des évaluations des poissons-zèbres et des tétras GloFish^{MD} déclarés précédemment (MPO 2018, 2019, 2020a, 2020b).

2.3.8 Effets potentiels sur la biodiversité

La biodiversité peut être affectée par de nombreux facteurs, notamment par les espèces envahissantes et l'introduction de maladies. Malgré leur utilisation de longue date dans le commerce de poissons ornementaux destinés aux aquariums et comme modèles pour la recherche, aucun rapport ne fait état de *B. splendens* devenus envahissants dans les régions tempérées d'Amérique du Nord ou d'Europe. Hill *et al.* (2017) ont estimé que le risque d'invasion du *B. splendens* sur le territoire continental des États-Unis était faible, au moyen du protocole Fish Invasiveness Screening Kit (FISK). Dans les régions tropicales qui favorisent leur établissement, leurs occurrences n'ont pas été signalées comme envahissantes; bien que leur présence ait été postulée comme envahissante dans le nord de l'Australie, les conséquences biologiques de leur établissement restent à déterminer (Hammer *et al.* 2019). De plus, rien ne prouve que les lignées de poissons combattants GloFish^{MD} aient une aptitude accrue qui pourrait augmenter le caractère invasif par rapport aux espèces non transgéniques.

Comme indiqué précédemment, les poissons combattants GloFish^{MD} ne devraient pas affecter les espèces indigènes en raison d'interactions trophiques ou d'hybridation ni être un vecteur d'agents pathogènes au Canada; en outre, ils ne devraient pas perturber le cycle biogéochimique ni nuire à l'habitat. L'ajout de la construction transgénique et de la protéine fluorescente chez les poissons combattants GloFish^{MD} ne devrait pas causer de toxicité environnementale ou de dangers par l'intermédiaire de la THG du transgène. Dans l'ensemble, le danger que les poissons combattants GloFish^{MD} nuisent à la biodiversité des écosystèmes canadiens est **négligeable**. La dépendance à l'égard de données sur des espèces comparables pour le caractère envahissant et les effets sur la biodiversité entraîne un niveau d'incertitude **faible**. Cela concorde avec le classement des évaluations des poissons-zèbres et des tétras GloFish^{MD} déclarés précédemment (MPO 2018, 2019, 2020a, 2020b).

2.3.9 Conclusions

Les poissons combattants GloFish^{MD} ne devraient pas être dangereux pour l'environnement canadien. Il n'y a pas d'antécédents d'invasion par des poissons combattants non transgéniques en Amérique du Nord, malgré une utilisation très répandue. Il n'y a aucune preuve de toxicité environnementale associée aux constructions, et la majorité des autres modèles fluorescents ne font pas état de toxicité associée aux transgènes fluorescents. Il n'y a pas non plus d'indication d'effets potentiels sur l'environnement dus à la transmission du transgène à des espèces canadiennes indigènes par hybridation ou par THG. On ne recense

aucune différence chez les poissons combattants GloFish^{MD} et d'autres modèles de poissons fluorescents sur le plan de la survie, de la vulnérabilité aux maladies, du comportement ou des conditions d'élevage; on ne s'attend pas non plus à ce qu'ils puissent davantage agir comme vecteur de la maladie ou altérer le cycle biogéochimique.

Les dangers examinés ont été jugés négligeables à faibles (tableau 2.5), tandis que l'incertitude varie de négligeable à modérée, en raison du caractère limité des données propres aux poissons combattants GloFish^{MD}, des données directes limitées sur les espèces comparables, de la variabilité des données provenant de modèles substitués (p. ex., poisson-zèbre RFP) et du fait que l'évaluation de certains dangers repose fortement sur l'opinion d'experts. Les poissons combattants GloFish^{MD} ne devraient présenter aucun danger particulier outre que ceux associés à son utilisation prévue comme poisson d'ornement destiné aux aquariums fixes. Le classement des dangers correspond à celui évalué précédemment pour les poissons-zèbres et les tétras GloFish^{MD}, bien que l'incertitude diffère par rapport à celle évaluée pour les tétras GloFish^{MD} dans deux catégories de danger, en raison d'une reconnaissance accrue des limitations des données (par le biais de la THG), ou des différences dans les répartitions des familles (par l'hybridation, voir le tableau 2.5).

Tableau 2.5. Sommaire de tous les classements et degrés d'incertitude pour les évaluations des risques environnementaux des lignées de poissons combattants GloFish^{MD} actuellement déclarées, ainsi que des lignées de poissons-zèbres et tétras GloFish^{MD} précédemment déclarées (MPO 2018, 2019, 2020a, 2020b). Le soulignement indique que l'évaluation actuelle diffère de l'évaluation précédente.

Évaluation	Classement/Incertain		
	Poissons combattants GloFish ^{MD}	Poissons-zèbres GloFish ^{MD}	Tétras GloFish ^{MD}
Exposition	Faible/Faible	Faible/Faible	Faible/Faible
Dangers :			
1. Toxicité environnementale	Négligeable/Modérée	Négligeable/Modérée	Négligeable/Modérée
2. THG	Faible/Modérée	Faible/Modérée	Faible/ <u>Faible</u>
3. Interactions trophiques	Négligeable/Modérée	Négligeable/Modérée	Négligeable/Modérée
4. Hybridation	Négligeable/Négligeable	Négligeable/ <u>Modérée</u>	Négligeable/Négligeable
5. Vecteur de maladies	Négligeable/Modérée	Négligeable/Modérée	Négligeable/Modérée
6. Biogéochimie	Négligeable/Modérée	Négligeable/Modérée	Négligeable/Modérée
7. Habitat	Négligeable/Faible	Négligeable/Faible	Négligeable/Faible
8. Biodiversité	Négligeable/Faible	Négligeable/Faible	Négligeable/Faible
Risque pour l'environnement	Faible	Faible	Faible

2.4 ÉVALUATION DU RISQUE

Le risque est la probabilité qu'un effet nocif se produise en raison de l'exposition à un danger. L'évaluation du risque intègre la nature et la gravité de l'effet nocif, la probabilité que celui-ci se produise et le niveau d'incertitude associé à chaque conclusion. L'avis scientifique du MPO fourni à ECCC et à SC pour la prise de décisions réglementaires est fondé sur le risque global posé par l'organisme dans le contexte du scénario d'utilisation proposé par le déclarant et de tous les autres scénarios d'utilisation potentiels. La conclusion globale concernant le risque s'appuie sur le paradigme classique selon lequel le risque est proportionnel au danger et à l'exposition :

Risque \propto Exposition \times Danger

Pour chaque paramètre, le danger et l'exposition sont classés comme suit : négligeable, faible, modéré ou élevé, chacun d'eux ayant été analysé et associé à un degré d'incertitude. Le risque global est estimé en reportant le danger par rapport à l'exposition dans une matrice ou une carte des risques, comme le montre la figure 2.3. Bien que la matrice ne puisse être utilisée pour tirer une conclusion précise ou prendre une décision par rapport au risque, elle peut être utilisée pour faciliter la communication et la discussion. L'incertitude associée au niveau du risque global n'est pas estimée, l'incertitude liée aux évaluations du risque et de l'exposition étant abordée dans le cadre de la conclusion sur le risque.

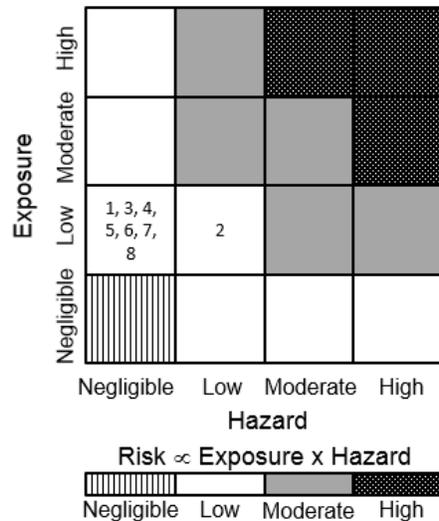


Figure 2.1. Matrice de risques et échelle de spectres pour illustrer comment l'exposition et les dangers sont intégrés afin d'établir un niveau de risque dans l'évaluation du risque pour l'environnement. Les évaluations des risques associés aux composantes du danger évaluées selon l'évaluation de l'exposition sont désignées par les dangers : 1) liés à la toxicité environnementale; 2) liés à la transmission horizontale de gènes; 3) liés aux interactions avec d'autres organismes; 4) liés à l'hybridation; 5) en tant que vecteurs de maladies; 6) pour le cycle biogéochimique; 7) pour l'habitat; 8) pour la biodiversité.

2.4.1 Évaluation des risques liés aux poissons combattants GloFish^{MD}

Selon l'évaluation de l'exposition, les poissons combattants GloFish^{MD}, utilisés dans le commerce des poissons ornementaux destinés aux aquariums ou à d'autres fins non prévues, seraient peu susceptibles d'être présents dans l'environnement canadien. Cette situation est attribuable à la forte probabilité de libération dans l'environnement d'un petit nombre de poissons en provenance d'aquariums domestiques, ainsi qu'à une probabilité négligeable des poissons combattants GloFish^{MD} de passer l'hiver dans les écosystèmes aquatiques canadiens. À ce titre, toute exposition des poissons combattants GloFish^{MD} aux écosystèmes d'eau douce canadiens serait isolée, rare et éphémère. La qualité des données démontrant l'intolérance au froid des poissons combattants GloFish^{MD} et des *B. splendens* domestiqués par rapport aux températures régnant dans les eaux douces canadiennes permet d'obtenir un faible degré d'incertitude pour le classement de ce danger.

L'évaluation des dangers a conclu que les poissons combattants GloFish^{MD} représentent un danger négligeable à faible pour l'environnement canadien, au vu de l'absence de dangers liés au *B. splendens* domestiqué, et de l'absence de preuve directe que le danger serait accru par la protéine fluorescente exprimée par rapport au *B. splendens* domestiqué. Le degré d'incertitude

lié à chaque paramètre de danger varie de négligeable à modéré, en raison du caractère limité des données propres aux poissons combattants GloFish^{MD} et des données directes sur les espèces comparables, de la variabilité des données concernant le modèle substitut (poisson-zèbre RFP) et de la dépendance à l'égard de l'opinion des experts pour l'évaluation de certains dangers.

D'après la matrice des risques de la figure 2.3, les poissons combattants GloFish^{MD}, s'ils sont utilisés dans le commerce de poissons ornementaux destinés aux aquariums ou à d'autres fins au Canada, représentent un **risque faible** pour l'environnement canadien. Selon les évaluations des dangers individuels, en fonction du degré d'exposition évalué, il n'y aura pas d'effets nocifs au-delà des variations naturelles attendues de l'environnement canadien. Les sources d'incertitude dans l'évaluation de l'exposition et des dangers pour l'environnement qui peuvent influencer sur le degré d'incertitude dans l'évaluation du risque environnemental comprennent l'absence de données directes sur les dangers de l'organisme déclaré et des espèces comparables, la variabilité des données tirées des substituts, et un important recours à l'opinion d'experts dans certains cas.

En dépit de l'incertitude modérée associée à certains paramètres individuels d'évaluation, rien n'indique pour le moment que les risques globaux posés par les poissons combattants GloFish^{MD} peuvent être plus élevés que le niveau faible de risque mesuré pour l'environnement canadien. Ces conclusions concordent avec le classement de danger faible des poissons-zèbres et des tétras GloFish^{MD} déclarés précédemment (MPO 2018, 2019, 2020a, 2020b).

2.5 RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

La présence de poissons combattants GloFish^{MD} dans des aquariums domestiques au Canada, ou leur utilisation non prévue, devrait entraîner des rejets fréquents à très petite échelle dans l'environnement canadien, bien qu'on ne puisse écarter la possibilité qu'ils y soient introduits de façon importante occasionnellement. Cependant, les données de haute qualité disponibles indiquent que les poissons combattants GloFish^{MD} n'ont pas la capacité d'hiverner dans la plupart des écosystèmes d'eau douce canadiens. Le niveau d'exposition potentielle est donc faible, tout comme le niveau d'incertitude qui y est associé. L'absence de preuves de dangers provenant d'espèces de comparaison non transgéniques, malgré leur utilisation extensive à long terme, ainsi que l'absence de preuves de dangers accrus liés aux poissons combattants GloFish^{MD} par rapport aux *B. splendens* domestiqués non transgéniques, indique un danger pour l'environnement canadien de négligeable à faible. En raison de l'absence ou du manque de données directes sur les dangers posés par les poissons combattants GloFish^{MD} ou les modèles de base, l'incertitude associée aux évaluations des dangers varie de négligeable à modérée. Le risque global des poissons combattants GloFish^{MD} pour l'environnement canadien est faible, et l'organisme déclaré ne devrait pas y provoquer d'effet nocif au niveau 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 de l'organisme déclaré ou d'une espèce comparable, rien ne semble indiquer que les poissons combattants GloFish^{MD}, dans le cadre de l'utilisation proposée ou d'autres utilisations potentielles, pourraient nuire à l'environnement canadien en cas d'exposition.

RÉFÉRENCES CITÉES

- Amparyup, P., Charoensapsri, W., Samaluka, N., Chumtong, P., Yocawibun, P., and Imjongjirak, C. 2020. Transcriptome analysis identifies immune-related genes and antimicrobial peptides in Siamese fighting fish (*Betta splendens*). *Fish Shellfish Immun.* 99:403-413.
- 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.
- BCLSS. 2013. Osoyoos Lake 2005-2011. British Columbia Lake Stewardship Society, Kelowna, BC, Kelowna, BC. p. 4.
- Chailertrit, V., Swatdipong, A., Peyachoknagul, S., Salaenoi, J., and Srikulnath, K. 2014. Isolation and characterization of novel microsatellite markers from Siamese fighting fish (*Betta splendens*, Osphronemidae, Anabantoidei) and their transferability to related species, *B. smaragdina* and *B. imbellis*. *Gen. Mol. Res.* 13(3):7157-7162.
- 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. Susceptibility of transgenic and wildtype zebra danios, *Danio rerio*, to predation. *Environ. Biol. Fish.* 76(1):93-100.
- Cortemeglia, C., and Beitinger, T.L. 2006b. Projected US distributions of transgenic and wildtype zebra danios, *Danio rerio*, based on temperature tolerance data. *J. Therm. Biol.* 31(5):422-428.
- 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.
- DFO. 2006. Proceedings of the expert panel meeting on the potential risks associated with horizontal gene transfer from novel aquatic organisms. *DFO Can. Sci. Advis. Sec. Proceed. Ser.* 2006/036: vi + 52 p.
- 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.

-
- Fan, G.Y., Chan, J.D., Ma, K.L., Yang, B.R., Zhang, H., Yang, X.W., Shi, C.C., Law, H.C.H., Ren, Z.T., Xu, Q.W., Liu, Q., Wang, J.H., Chen, W.B., Shao, L.B., Goncalves, D., Ramos, A., Cardoso, S.D., Guo, M., Cai, J., Xu, X., Wang, J., Yang, H.M., Liu, X., and Wang, Y.T. 2018. Chromosome-level reference genome of the Siamese fighting fish *Betta splendens*, a model species for the study of aggression. *Gigascience* 7(11):giy087.
- Furgala-Selezniow, G., Fopp-Bayat, D., Jankun, M., Krejszef, S., and Mamcarz, A. 2008. Note on the karyotype and NOR location of Siamese fighting fish *Betta splendens* (Perciformes, Osphronemidae). *Caryologia* 61(4):349-353.
- Goldstein, R.J. 2015. *The Betta Handbook*. Barron's, New York.
- Goodrich, H.B., and Mercer, R.N. 1934. Genetics and colors of the Siamese fighting fish, *Betta splendens*. *Science* 79(2049):318-319.
- Goodrich, H.B., and Taylor, H.C. 1934. Breeding reactions in *Betta splendens*. *Copia* 1934(4):165-166.
- 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.
- Graham, L.A., and Davies, P.L. (2021) Horizontal Gene Transfer in Vertebrates: A Fishy Tale. *TIGS* 37(6):501-503.
- Hammer, M.P., Simoes, M.N.S., Needham, E.W., Wilson, D.N., Barton, M.A., and Lonza, D. 2019. Establishment of Siamese Fighting Fish on the Adelaide River floodplain: the first serious invasive fish in the Northern Territory, Australia. *Biol. Invasions* 21(7):2269-2279.
- 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.
- Hill, J.E., Tuckett, Q.M., Hardin, S., Lawson, L.L., Lawson, K.M., Ritch, J.L., and Partridge, L. 2017. Risk screen of freshwater tropical ornamental fishes for the conterminous United States. *Trans. Am. Fish. Soc.* 146(5):927-938.
- 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.
- Jaroensutasinee, M., and Jaroensutasinee, K. 2001. Bubble nest habitat characteristics of wild Siamese fighting fish. *J. Fish Biol.* 58(5):1311-1319.
- 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.
- Kerr, S.J., Brousseau, C.S., and Muschett, M. 2005. Invasive aquatic species in Ontario. *Fisheries* 30(7):21-30.
-

-
- Khoo, G., Loh, E.Y.F., Lim, T.M., and Phang, V.P.E. 1997. Genetic variation in different varieties of Siamese fighting fish using isoelectric focusing of sarcoplasmic proteins. *Aquac. Int.* 5(6):537-549.
- Kipouros, K., Paschos, I., Gouva, E., Ergolavou, A., and Perdikaris, C. 2011. Masculinization of the ornamental Siamese fighting fish with oral hormonal administration. *Scienceasia* 37(3):277-280.
- 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.
- Lanteigne, J. 1988. Status of the Banff Longnose Dace, *Rhinichthys cataractae smithi*, in Canada. *Can. Field Nat.* 102(1):170-176.
- Leggatt, R.A., Johnson, N., and McGowan, C. 2018a. Environmental risk assessment of the Glofish® Electric Green® Tetra and the Glofish® Long-Fin Electric Green® Tetra: transgenic ornamental fish, imported to Canada, for sale in the pet trade. DFO Can. Sci. Advis. Sec. Res. Doc. 2018/049: xii + 54 pp.
- Leggatt, R.A. and Devlin, R.H. 2019. Fluorescent protein transgenesis has varied effects on behaviour and cold tolerance in a tropical fish (*Gymnocorymbus ternetzi*): implications for risk assessment. *Fish Physiol. Biochem.* 46:395-403.
- Leggatt, R.A., Dhillon, R.S., Mimeault, C., Johnson, N., Richards, J.G., and Devlin, R.H. 2018b. Low-temperature tolerances of tropical fish with potential transgenic applications in relation to winter water temperatures in Canada. *Can. J. Zool.* 96:253-260.
- 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.
- Lucas, G.A. 1968. A study of variation in the Siamese Fighting Fish, *Betta splendens*, with emphasis on color mutants and the problem of sex determination. Retrospective Theses and Dissertations, Iowa State University (<https://lib.dr.iastate.edu/rtd/3489>).
- Magnuson, J.J., Crowder, L.B., and Medvick, P.A. 1979. Temperature as an ecological resource. *Amer. Zool.* 19(1):331-343.
- 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: iv + 20 p.
- Meejui, O., Sukmanomon, S., and Na-Nakorn, U. 2005. Allozyme revealed substantial genetic diversity between hatchery stocks of Siamese fighting fish, *Betta splendens*, in the province of Nakornpathom, Thailand. *Aquaculture* 250(1-2):110-119.
- Merzlyak, E.M., Goedhart, J., Shcherbo, D., Bulina, M.E., Shcheglov, A.S., Fradkov, A.F., Gaintzeva, A., Lukyanov, K.A., Lukyanov, S., Gadella, T.W.J., and Chudakov, D.M. 2007. Bright monomeric red fluorescent protein with an extended fluorescence lifetime. *Nat. Methods* 4(7):555-557.
- Monvises, A., Nuangsaeng, B., Sriwattanarothai, N., and Panijpan, B. 2009. The Siamese fighting fish: Well-known generally but little-known scientifically. *Scienceasia* 35(1):8-16.

-
- 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 GlofishMD Electric GreenMD et du tétra à longues nageoires GlofishMD Electric GreenMD (*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. 2020a. Évaluation des risques pour l'environnement et des risques indirects pour la santé humaine posés par le danio (*danio rerio*) glofishMD sunburst orangeMD : un poisson d'ornement transgénique. Secr. can. de consult. sci. du MPO. Avis sci. 2020/015.
- MPO. 2020b. Évaluation des risques pour l'environnement et des risques indirects pour la santé humaine posés par le danio (*Danio rerio*) GlofishMD Cosmic BlueMD et Galactic PurpleMD : poissons d'ornement transgéniques. Secr. can. de consult. sci. du MPO, Avis sci. 2020/016.
- Nico, L., and Neilson, M. 2021, *Betta splendens* Regan, 1910: U.S. Geological Survey, Nonindigenous Aquatic Species Database, Gainesville, FL, <https://nas.er.usgs.gov/queries/FactSheet.aspx?speciesID=326>, Revision Date: 4/30/2018, Peer Review Date: 10/20/2015, Access Date: 3/11/2021
- Owen, M.A., Rohrer, K., and Howard, R.D. 2012. Mate choice for a novel male phenotype in zebrafish, *Danio rerio*. *Anim. Behav.* 83(3):811-820.
- Pleeging, C.C.F., and Moons, C.P.H. 2017. Potential welfare issues of the Siamese fighting fish (*Betta splendens*) at the retailer and in the hobbyist aquarium. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 86(4):213-223.
- Prakhongcheep, O., Muangmai, N., Peyachoknagul, S., and Srikulnath K. 2018. Complete mitochondrial genome of mouthbrooding fighting fish (*Betta pi*) compared with bubble nesting fighting fish (*B. splendens*), *Mitochondrial DNA Part B*, 3(1) 6-8.
- Ramirez-Santos, E., Rendon, P., Bourtzis, K., Schetelig, M.F., Caceres, C., Targovska, A., Rehling, T., Guillen-Navarro, G.K., Ruiz-Montoya, L., Toledo, J., and Liedo, P. 2018. Evaluation of horizontal gene transfer risk between the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata* (Tephritidae) and its parasitoid *Fopius ceratitivorus* (Braconidae). *PLoS ONE* 13(12): e0207999.
- Ramos, A., and Goncalves, D. 2019. Artificial selection for male winners in the Siamese fighting fish *Betta splendens* correlates with high female aggression. *Front. Zool.* 16:34(2019).
- 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.
- Renaud, C.B., and McAllister, D.E. 1988. Taxonomic status of the extinct Banff longnose dace, *Rhinichthys cataractae smithi*, of Banff national park, Alberta. *Environ. Biol. Fish* 23(1-2):95-113.
- 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.
- Ruber, L., Britz, R., and Zardoya, R. 2006. Molecular phylogenetics and evolutionary diversification of labyrinth fishes (Perciformes : Anabantoidei). *Syst. Biol.* 55(3):374-397.
- Ruber, L., Britz, R., Tan, H.H., Ng, P.K.L., and Zardoya, R. 2004. Evolution of mouthbrooding and life-history correlates in the fighting fish genus *Betta*. *Evolution* 58(4):799-813.
- Schaefer, J., and Ryan, A. 2006. Developmental plasticity in the thermal tolerance of zebrafish *Danio rerio*. *J. Fish Biol.* 69(3):722-734.
- Snekser, J.L., McRobert, S.P., Murphy, C.E., and Clotfelter, E.D. 2006. Aggregation behaviour in wildtype and transgenic zebrafish. *Ethology* 112:181-187.
- 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.
- Teletchea, F. 2016. Domestication level of the most popular aquarium fish species: is the aquarium trade dependent on wild populations? *Cybium* 40(1):21-29.
- 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 Research* 41:53-64.
- Tuckett, Q.M., Ressel, K.N., Ritch, J.L., Lawson, K.M., and Hill, J.E. 2021. Domestication and feralization influence the distribution and phenotypes of escaped ornamental fish. *Biol. Invasions* 23:1033-1047.
- USFWS. 2019. [Siamese Fighting Fish \(*Betta splendens*\) Ecological Risk Screening Summary](#). US Fish and Wildlife Service, June 2019
- Vu, T.D., Lwasaki, Y., Shigenobu, S.J., Maruko, A., Oshima, K., Lioka, E., Chao, L., Abe, T., Tamaki, S., Lin, Y.W., Chen, C.K., Lu, M.Y., Hojo, M., Wang, H.V., Tzeng, S.F., Huang, H.J., Kanai, A., Gojobori, T., Chiang, T.Y., Sun, H.S., Li, W.H., and Okada, N. 2020. Behavioral and brain- transcriptomic synchronization between the two opponents of a fighting pair of the fish *Betta splendens*. *Plos Genetics* 16(6): e1008831.
- Wallbrunn, H.M. 1958. Genetics of the Siamese fighting fish, *Betta splendens*. *Genetics* 43(3):289-298.
- Watson, C., DiMaggio, M., Hill, J., Tuckett, Q., and Yanong, R. 2019. Evolution, Culture, and Care for *Betta splendens*. University of Florida IFAS Extension FA212.
- 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.
- Zhang, X., Tee, L.Y., Wang, X., Huang, Q., and Yang, S. 2015 Off-target effects in CRISPR/Cas9-mediated genome engineering. *Mol. Ther.—Nucl. Acids* 4:e264.
-