



Pêches et Océans
Canada

Fisheries and Oceans
Canada

Sciences des écosystèmes
et des océans

Ecosystems and
Oceans Science

Secrétariat canadien des avis scientifiques (SCAS)

Document de recherche 2022/077

Région de la capitale nationale

Évaluation du risque pour l'environnement posé par les barbus (*Puntigrus tetrazona*) GloFish^{MD} Starfire Red^{MD}, Electric Green^{MD}, Sunburst Orange^{MD} et Galactic Purple^{MD} : des poissons d'ornement transgéniques

Charise Dietrich, Rosalind Leggatt et Colin McGowan

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



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

ISSN 2292-4272

ISBN 978-0-660-46102-1 N° cat. Fs70-5/2022-077F-PDF

La présente publication doit être citée comme suit :

Dietrich, C., Leggatt, R. et McGowan, C. 2022. Évaluation du risque pour l'environnement posé par les barbus (*Puntigrus tetrazona*) GloFish^{MD} Starfire Red^{MD}, Electric Green^{MD}, Sunburst Orange^{MD} et Galactic Purple^{MD} : des poissons d'ornement transgéniques. Secr. can. des avis sci. du MPO. Doc. de rech. 2022/077. vii + 38 p.

Also available in English:

Dietrich, C., Leggatt, R., and McGowan, C. 2022. Environmental Risk Assessment of the GloFish® Starfire Red®, Electric Green®, Sunburst Orange®, and Galactic Purple® Barbs (Puntigrus tetrazona): Transgenic Ornamental Fishes. DFO Can. Sci. Advis. Sec. Res. Doc. 2022/077. vii + 34 p.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES ACRONYMES ET SIGLES	vi
RÉSUMÉ.....	vii
1. INTRODUCTION	1
2. CARACTÉRISATION DES ORGANISMES DÉCLARÉS.....	2
2.1. BARBUS ELECTRIC GREEN ^{MD} (GB2011).....	2
2.1.1. Caractérisation moléculaire.....	2
2.1.2. Caractérisation phénotypique	3
2.2. BARBUS STARFIRE RED ^{MD} (RB2015)	4
2.2.1. Caractérisation moléculaire.....	4
2.2.2. Caractérisation phénotypique	5
2.3. BARBUS SUNBURST ORANGE ^{MD} (OB2019)	5
2.3.1. Caractérisation moléculaire.....	5
2.3.2. Caractérisation phénotypique	6
2.4. BARBUS GALACTIC PURPLE ^{MD} (PB2019)	7
2.4.1. Caractérisation moléculaire.....	7
2.4.2. Caractérisation phénotypique	8
2.5. EFFETS PLÉIOTROPIQUES DES TRANSGÈNES FLUORESCENTS CHEZ LES AUTRES POISSONS	8
2.6. CARACTÉRISATION RELATIVE AUX POISSONS GLOFISH ^{MD} DÉJÀ ÉVALUÉS	10
3. CARACTÉRISATION DU COMPARATEUR.....	12
3.1. STATUT TAXONOMIQUE	12
3.2. RÉPARTITION	12
3.3. HABITAT	12
3.4. TOLÉRANCES PHYSIOLOGIQUES.....	13
3.4.1. Oxygène.....	13
3.4.2. Température.....	13
3.4.3. pH et dureté de l'eau.....	13
3.4.4. Salinité	14
3.5. MORPHOLOGIE, CYCLE BIOLOGIQUE ET CROISSANCE	14
3.6. BAGAGE GÉNÉTIQUE	15
3.7. CARACTÈRE ENVAHISSANT	15
3.8. INTERACTIONS TROPHIQUES (RÉGIME ALIMENTAIRE, PROIES, CONCURRENTS, PRÉDATEURS).....	16
4. ÉVALUATION DU RISQUE POUR L'ENVIRONNEMENT.....	16
4.1. ÉVALUATION DE L'EXPOSITION	16
4.1.1. Caractérisation de l'environnement récepteur	18
4.1.2. Probabilité de dissémination	18
4.1.3. Probabilité de survie.....	19

4.1.4. Probabilité de reproduction	20
4.1.5. Probabilité de prolifération et de dissémination	20
4.1.6. Conclusions.....	20
4.2. ÉVALUATION DES DANGERS	21
4.2.1. Dangers possibles liés à la toxicité environnementale.....	23
4.2.2. Dangers possibles liés à la transmission horizontale de gènes	23
4.2.3. Dangers possibles liés aux interactions avec d'autres organismes	24
4.2.4. Dangers possibles liés à l'hybridation avec des espèces indigènes.....	25
4.2.5. Dangers possibles en tant que vecteurs de maladies.....	26
4.2.6. Dangers potentiels pour le cycle biogéochimique	26
4.2.7. Dangers potentiels pour l'habitat.....	27
4.2.8. Dangers potentiels pour la diversité biologique	27
4.2.9. Conclusions.....	27
4.3. ÉVALUATION DU RISQUE.....	29
4.3.1. Évaluation du risque posé par les barbus GloFish ^{MD}	30
4.3.2. Résumé et conclusions	31
RÉFÉRENCES CITÉES	31

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Quelques variantes de *Puntigrus tetrazona*. *P. tetrazona* domestique commun (A), *P. tetrazona* domestique albinos (B), barbus Electric Green^{MD} (C), barbus Sunburst Orange^{MD} (D), barbus Starfire Red^{MD} (E) et barbus Galactic Purple^{MD}(F). Toutes les images ont été fournies par Spectrum Brands, à l'exception de B qui provient de Petco.com.2

Figure 2. Matrice de risques et échelle de spectres pour illustrer comment l'exposition et le danger sont intégrés afin d'établir un niveau de risque dans l'évaluation du risque pour l'environnement. Les évaluations du risque associé aux composantes du danger évaluées selon l'évaluation de l'exposition sont désignées par les dangers : 1) liés à la toxicité environnementale; 2) liés au transfert horizontal de gènes; 3) liés aux interactions avec d'autres organismes; 4) liés à l'hybridation; 5) en tant que vecteurs d'agents pathogènes; 6) pour le cycle biogéochimique; 7) pour l'habitat; 8) pour la biodiversité.....30

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Caractérisation des lignées de poissons GloFish^{MD} déclarées en vertu de la LCPE pour la vente au Canada dans le commerce des poissons ornementaux. 11

Tableau 2. Classement de la probabilité d'exposition de l'environnement canadien à des poissons génétiquement modifiés..... 17

Tableau 3. 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)..... 17

Tableau 4. Classement du danger pour l'environnement découlant de l'exposition à l'organisme.21

Tableau 5. Classement du niveau d'incertitude associé au danger pour l'environnement.22

Tableau 6. Résumé de tous les classements et niveaux d'incertitude pour l'évaluation du risque pour l'environnement posé par les lignées de barbus GloFish^{MD} actuellement déclarées, ainsi que par les lignées de poissons zèbres, tétras et bettas GloFish^{MD} précédemment déclarées (MPO 2018, 2019, 2020a, 2020 b, 2021). Les soulignements représentent les différences entre les évaluations précédentes et actuelles.28

LISTE DES ACRONYMES ET SIGLES

ACIA : Agence canadienne d'inspection des aliments

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique

ARNg : ARN guide

ARNm : ARN messenger

Cas9 : protéine 9 associée à CRISPR

CLMz : chaîne légère de la myosine du poisson zèbre

CRISPR : courte répétition palindromique groupée et régulièrement espacée

DL₅₀ : dose létale (température) tuant 50 % de la population

DL₁₀₀ : dose létale (température) tuant 100 % de la population

ECCC : Environnement et Changement climatique Canada

eGFP : protéine verte fluorescente améliorée

ETM : erreur type de la moyenne

GxE : interactions génotype-environnement

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

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

pb : Paire de bases

MPO : Pêches et Océans Canada

RFP : protéine rouge fluorescente

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

SC : Santé Canada

THG : transmission horizontale de gènes

µS/cm : microsiemens par centimètre

RÉSUMÉ

Conformément à la *Loi canadienne sur la protection de l'environnement*, un avis en vertu du *Règlement sur les renseignements concernant les substances nouvelles (organismes)* a été soumis par Spectrum Brands à Environnement et Changement climatique Canada pour l'importation de quatre lignées de barbus tigres (*Puntigrus tetrazona*) génétiquement modifiés appelés barbus GloFish^{MD} Electric Green^{MD} (GB2011), Starfire Red^{MD} (RB2015), Sunburst Orange^{MD} (OB2019) et Galactic Purple^{MD} (PB2019) en vue de leur vente commerciale au Canada. L'évaluation du risque pour l'environnement a analysé 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 du GB2011, du RB2015, du OB2019 et du PB2019 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 des lignées déclarées et des espèces comparables pertinentes à l'égard de la température, et du fait que malgré un long historique d'utilisation du *P. tetrazona* non transgénique en Amérique du Nord, le poisson ne s'y est jamais établi. L'évaluation du risque pour l'environnement 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). Les niveaux d'incertitude liés au classement des dangers pour l'environnement varient de faible à modéré en raison des limitations des données sur les organismes substitués déclarés, ou d'une certaine dépendance à l'égard de l'opinion d'experts et de preuves anecdotiques. L'utilisation de CRISPR lors de la création de l'OB2019 et du PB2019 pourrait avoir entraîné des mutations imprévues dans les populations de barbus GloFish^{MD}, ajoutant à l'incertitude dans l'évaluation des dangers, mais sans modifier les conclusions globales sur le risque. Il existe un faible risque d'effets environnementaux négatifs selon les niveaux d'exposition prévus pour l'environnement canadien découlant de l'utilisation du GB2011, du RB2015, du OB2019 et du PB2019 comme poissons d'ornement d'aquarium ou d'autres utilisations possibles.

1. INTRODUCTION

Le 21 janvier 2022, Spectrum Brands (une division de GloFish LLC) a soumis quatre dossiers réglementaires (avis) 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) pour les barbus GloFish^{MD} Electric Green^{MD}, Starfire Red^{MD}, Sunburst Orange^{MD} et Galactic Purple^{MD}; ci-après dénommés collectivement « les barbus GloFish^{MD} ». Ces poissons ornementaux sont des *Puntigrus tetrazona* (barbus tigres, anciennement *Puntius tetrazona*) domestiqués qui ont été génétiquement modifiés pour fluorescer différentes couleurs dans les aquariums domestiques. Des évaluations du risque analogues ont été réalisées pour six couleurs différentes de tétras GloFish^{MD} (MPO 2018, 2019), trois couleurs différentes de poissons zèbres GloFish^{MD} (MPO 2020a, 2020b) et trois couleurs différentes de bettas GloFish^{MD} (MPO 2021).

Les dispositions de la LCPE relatives à la biotechnologie adoptent une approche préventive en matière de pollution, en exigeant de déclarer et d'évaluer 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 biologique d'un animal vivant, y compris du 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 (risque à la santé humaine si l'environnement est exposé à l'organisme) qui servent ensuite à déterminer si l'organisme est toxique ou peut le devenir au sens de la LCPE.

En vertu d'un protocole d'entente avec ECCC et Santé Canada (SC), pour les produits du poisson issus de la biotechnologie et relevant du RRSN(O), le MPO fournit un avis scientifique sous la forme d'une évaluation du risque pour l'environnement. Cet avis sert à éclairer l'évaluation du risque selon la LCPE menée par ECCC et Santé Canada. Conformément à cette entente, le ministre d'ECCC 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 la présente évaluation du risque pour l'environnement posé par les organismes déclarés en fonction de leur utilisation proposée. Dans le présent document, le risque est défini comme une fonction du potentiel que les environnements canadiens soient exposés à l'organisme déclaré et du potentiel que l'organisme déclaré représente un danger pour l'environnement canadien. Les évaluations de l'exposition et des dangers sont réalisées séparément, puis intégrées à l'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.

2. CARACTÉRISATION DES ORGANISMES DÉCLARÉS

Dans ses déclarations actuelles, Spectrum Brands demande à pouvoir importer quatre nouvelles souches transgéniques de *P. tetrazona* des États-Unis, pour le marché de l'aquariophilie au Canada. Les noms commerciaux des organismes transgéniques sont les barbus GloFish^{MD} Electric Green^{MD} (GB2011), Starfire Red^{MD} (RB2015), Sunburst Orange^{MD} (OB2019) et Galactic Purple^{MD} (PB2019). La figure 1 montre l'apparence physique des quatre souches de barbus de GloFish^{MD} déclarées ainsi qu'un barbus tigre domestique albinos non transgénique (*P. tetrazona*) [génotype de base ou receveur de transgènes] et le *P. tetrazona* domestique commun.

Bien que plus de détails sur la structure, l'élaboration et la fonction de la construction transgénique utilisées pour créer les bettas GloFish^{MD} aient été fournis par l'entreprise à des fins d'examen, ces renseignements sont considérés comme des renseignements commerciaux confidentiels et ne sont pas inclus dans le présent document.

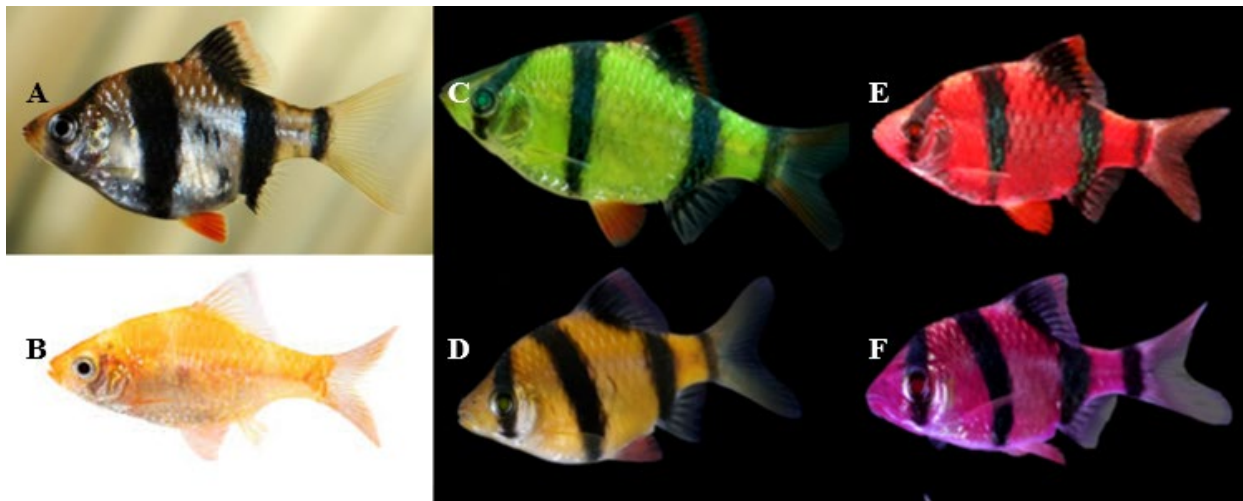


Figure 1. Quelques variantes de *Puntigrus tetrazona*. *P. tetrazona* domestique commun (A), *P. tetrazona* domestique albinos (B), barbus Electric Green^{MD} (C), barbus Sunburst Orange^{MD} (D), barbus Starfire Red^{MD} (E) et barbus Galactic Purple^{MD} (F). Toutes les images ont été fournies par Spectrum Brands, à l'exception de B qui provient de Petco.com.

2.1. BARBUS ELECTRIC GREEN^{MD} (GB2011)

2.1.1. Caractérisation moléculaire

Le GB2011 est un barbus tigre (*P. tetrazona*) génétiquement modifié qui possède plusieurs copies d'une insertion de transgènes. La modification génétique entraîne une coloration verte omniprésente de l'organisme sous la lumière blanche ambiante et un vert fluorescent sous la lumière ultraviolette (figure 1). Cette modification génétique a pour but de créer un nouveau phénotype chez *P. tetrazona*; ce nouvel organisme est destiné au marché des aquariums d'ornement.

2.1.1.1. Production de l'organisme déclaré

La cassette purifiée d'expression transgénique a été injectée dans des œufs nouvellement fertilisés de *P. tetrazona* albinos.

D'autres détails fournis par l'entreprise qui décrivent l'élaboration et l'analyse de la lignée pour confirmer que le GBS2019 constitue une seule lignée homogène et que l'ossature de vecteur

n'a pas été incorporée avec les transgènes sont considérés comme des renseignements commerciaux confidentiels et ne sont pas déclarés ici.

2.1.1.2. Caractérisation de l'intégrant transgénique

La séquence de la cassette insérée dans le génome du GB2011 n'a pas été déterminée, et l'emplacement précis de l'insérat dans le génome du GB2011 est inconnu.

Les détails concernant l'analyse visant à confirmer que de multiples copies de la cassette d'expression transgénique ont été incorporées à un seul site d'insertion sont considérés comme des renseignements commerciaux confidentiels et ne sont pas mentionnés ici.

2.1.1.3. Transmission 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 lieu stable du génome ou dans une région sujette à l'extinction génique. 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 GB2011 depuis 2012. Au cours de cette période, elle a observé que le phénotype fluorescent vert restait durable et stable d'une génération à l'autre.

2.1.1.4. Méthodes de détection du transgène

Les individus GB2011 se distinguent des *P. tetrazona* domestiques non transgéniques par leur coloration verte uniforme sous lumière naturelle et leur fluorescence sous lumière bleue ou ultraviolette. Le GB2011 peut être identifié 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 GB2011 des autres bettas transgéniques verts fluorescents s'ils sont porteurs d'une cassette différente.

2.1.2. Caractérisation phénotypique

2.1.2.1. Effets phénotypiques ciblés de la modification

L'effet phénotypique recherché de la modification génétique est une couleur verte lorsque le GB2011 est exposé à la lumière ambiante et fluorescente sous lumière bleue ou ultraviolette. Ce nouveau phénotype de couleur se voit dans les muscles, la peau et les yeux. Le déclarant rapporte que les individus GB2011 hémizygotes et homozygotes pour l'insérat transgénique ne peuvent être distingués les uns des autres par leur phénotype et sont tous destinés à la vente.

2.1.2.2. Effets phénotypiques additionnels de la modification

Aucune étude officielle n'a comparé la sensibilité potentielle aux maladies du GB2011 et des souches non transgéniques. Il n'existe pas non plus d'étude officielle sur les effets non ciblés potentiels de la modification génétique sur le cycle de vie (autres que le succès reproducteur et la survie des juvéniles), les tolérances et les exigences environnementales (autres que la tolérance aux températures basses), le métabolisme, la physiologie, l'endocrinologie ou le comportement; toutefois, il n'existe pas de signalement anecdotique ou autre d'effets non ciblés autres que ceux énumérés ci-dessus.

2.2. BARBUS STARFIRE RED^{MD} (RB2015)

2.2.1. Caractérisation moléculaire

Le RB2015 est un barbus tigre (*Puntigrus tetrazona*) génétiquement modifié qui contient de multiples copies d'une insertion de transgènes. La modification génétique entraîne une coloration rouge omniprésente de l'organisme sous la lumière blanche ambiante et un rouge fluorescent sous la lumière ultraviolette (figure 1). Cette modification génétique a pour but de créer un nouveau phénotype chez *P. tetrazona*; ce nouvel organisme est destiné au marché des aquariums d'ornement.

2.2.1.1. Production de l'organisme déclaré

La cassette purifiée d'expression transgénique a été injectée dans des œufs nouvellement fertilisés de *P. tetrazona* albinos.

D'autres détails fournis par l'entreprise qui décrivent l'élaboration et l'analyse de la lignée pour confirmer que le RB2015 constitue une seule lignée homogène et que l'ossature de vecteur n'a pas été incorporée avec les transgènes sont considérés comme des renseignements commerciaux confidentiels et ne sont pas déclarés ici.

2.2.1.2. Caractérisation de l'intégrant transgénique

La séquence de la cassette insérée dans le génome du RB2015 n'a pas été déterminée, et l'emplacement précis de l'insérat dans le génome du RB2015 est inconnu.

Les détails concernant l'analyse visant à confirmer que de multiples copies de la cassette d'expression transgénique ont été incorporées à un seul site d'insertion sont considérés comme des renseignements commerciaux confidentiels et ne sont pas mentionnés ici.

Le nombre de copies transgènes a été estimé au moyen de la PCR quantitative (qPCR) en temps réel. Les résultats indiquent qu'il y a de multiples copies de la construction transgénique qui ont été intégrées au génome du poisson RB2015.

2.2.1.3. Transmission 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 lieu stable du génome ou dans une région sujette à l'extinction génique. L'individu porteur d'un transgène silencieux ne présenterait pas de phénotype de couleur rouge et serait donc retiré de la population.

L'entreprise maintient cette lignée de reproduction depuis plus de quatre générations et produit commercialement le RB2015 depuis 2016. Au cours de cette période, elle a observé que le phénotype fluorescent rouge restait durable et stable d'une génération à l'autre.

2.2.1.4. Méthodes de détection du transgène

Les individus RB2015 se distinguent des *P. tetrazona* domestiques non transgéniques par leur coloration rouge uniforme sous lumière naturelle et leur fluorescence sous lumière bleue ou ultraviolette. Le RB2015 peut être identifié génétiquement par amplification PCR de fragments uniques de l'insertion de transgènes, 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 RB2015 des autres barbus transgéniques rouges fluorescents s'ils sont porteurs d'une cassette différente.

2.2.2. Caractérisation phénotypique

2.2.2.1. Effets phénotypiques ciblés de la modification

L'effet phénotypique recherché de la modification génétique est une couleur rouge lorsque le RB2015 est exposé à la lumière ambiante et fluorescente sous lumière bleue ou ultraviolette. Ce nouveau phénotype de couleur se voit dans les muscles, la peau et les yeux. Spectrum Brands indique que les individus RB2015 hémizygotes et homozygotes pour l'insérat transgénique ne peuvent être distingués les uns des autres par leur phénotype et sont tous destinés à la vente.

2.2.2.2. Effets phénotypiques additionnels de la modification

Les effets de la modification génétique sur les autres phénotypes, dont la capacité de survie, n'ont pas fait l'objet d'un examen officiel.

Aucune étude officielle n'a comparé la sensibilité potentielle aux maladies du RB2015 et des souches non transgéniques. Il n'existe pas non plus d'étude officielle sur les effets phénotypiques imprévus potentiels de la modification génétique sur le cycle de vie (autres que le succès reproducteur), les tolérances et les exigences environnementales (autres que la tolérance aux températures basses), le métabolisme, la physiologie, l'endocrinologie ou le comportement; toutefois, il n'existe pas de signalement anecdotique ou autre d'effets phénotypiques imprévus.

Les données confidentielles, soumises par l'entreprise dans son dossier réglementaire, suggèrent que le PiBS2019 n'est pas plus susceptible d'être envahissant que le *P. tetrazona* domestique non transgénique.

2.3. BARBUS SUNBURST ORANGE^{MD} (OB2019)

2.3.1. Caractérisation moléculaire

L'OB2019 est un barbus tigre (*Puntigrus tetrazona*) génétiquement modifié qui possède un seul site d'insertion qui contient plusieurs copies d'une construction transgénique en tandem issue d'un poisson. La modification génétique entraîne une coloration orange omniprésente de l'organisme sous la lumière blanche ambiante et un orange fluorescent sous la lumière ultraviolette (figure 1). Cette modification génétique a pour but de créer un nouveau phénotype chez *P. tetrazona*; ce nouvel organisme est destiné au marché des aquariums d'ornement.

2.3.1.1. Production de l'organisme déclaré

La cassette purifiée d'expression transgénique a été injectée dans des œufs nouvellement fertilisés de *P. tetrazona* albinos avec la protéine Cas9 et un ARN guide (ARNg).

D'autres détails fournis par l'entreprise qui décrivent l'élaboration et l'analyse de la lignée pour confirmer que l'OB2019 constitue une seule lignée homogène et que l'ossature de vecteur n'a pas été incorporée avec les transgènes sont considérés comme des renseignements commerciaux confidentiels et ne sont pas déclarés ici.

2.3.1.2. Caractérisation de l'intégrant transgénique

La séquence de la cassette insérée dans le génome de l'OB2019 n'a pas été déterminée, et l'emplacement précis de l'insérat dans le génome de l'OB2019 est inconnu.

Il n'existe aucune donnée permettant de déterminer s'il existe des mutations hors cible ou sur cible dans l'OB2019 à la suite de la tentative d'édition de gènes CRISPR.

Les détails concernant l'analyse visant à confirmer que de multiples copies de la cassette d'expression transgénique ont été incorporées à un seul site d'insertion sont considérés comme des renseignements commerciaux confidentiels et ne sont pas mentionnés ici.

2.3.1.3. Transmission 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 lieu stable du génome ou dans une région sujette à l'extinction génique. 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'OB2019 depuis 2020. Au cours de cette période, elle a observé que le phénotype fluorescent orange restait durable et stable d'une génération à l'autre.

2.3.1.4. Méthodes de détection du transgène

Les individus OB2019 se distinguent des *P. tetrazona* domestiques non transgéniques par leur coloration orange uniforme sous lumière naturelle et leur fluorescence sous lumière bleue ou ultraviolette. Les OB2019 peuvent être identifiés 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'ils sont digérés par l'enzyme de restriction, les fragments peuvent être séparés en une série de bandes qui distinguent les OB2019 des autres barbus transgéniques orange fluorescents s'ils portent une cassette différente.

2.3.2. Caractérisation phénotypique

2.3.2.1. Effets phénotypiques ciblés de la modification

L'effet phénotypique recherché de la modification génétique est une couleur orange lorsque l'OB2019 est exposé à la lumière ambiante et fluorescente sous lumière bleue ou ultraviolette. Ce nouveau phénotype est présent dans les muscles, la peau et les yeux. Le déclarant rapporte que les individus OB2019 hémizygotés et homozygotés pour l'insertion de transgènes peuvent être distingués les uns des autres par leur phénotype et sont tous destinés à la vente.

2.3.2.2. Effets phénotypiques additionnels de la modification

Les effets de la modification génétique sur les autres phénotypes, dont la capacité de survie, n'ont pas fait l'objet d'un examen officiel.

Aucune étude officielle n'a comparé la sensibilité potentielle aux maladies de l'OB2019 et des souches non transgéniques. Il n'existe pas non plus d'étude officielle sur les effets non ciblés potentiels de la modification génétique sur le cycle biologique (autres que le succès reproducteur), les tolérances et les exigences environnementales (autres que la tolérance aux températures basses), le métabolisme, la physiologie, l'endocrinologie ou le comportement; toutefois, il n'existe pas de signalement anecdotique ou autre d'effets non ciblés autres que ceux énumérés ci-dessus.

Les données confidentielles, soumises par l'entreprise dans son dossier réglementaire, suggèrent que l'OB2019 n'est pas plus susceptible d'être envahissant que le *P. tetrazona* domestique non transgénique.

2.4. BARBUS GALACTIC PURPLE^{MD} (PB2019)

2.4.1. Caractérisation moléculaire

Le PB2019 est un barbus tigre (*P. tetrazona*) génétiquement modifié qui possède un seul site d'insertion qui contient plusieurs copies d'une construction transgénique. La modification génétique entraîne une coloration violette omniprésente de l'organisme sous la lumière blanche ambiante et un violet fluorescent sous la lumière ultraviolette (figure 1). Cette modification génétique a pour but de créer un nouveau phénotype chez *P. tetrazona*; ce nouvel organisme est destiné au marché des aquariums d'ornement.

2.4.1.1. Production de l'organisme déclaré

La cassette purifiée d'expression transgénique a été mélangée à une solution de protéine Cas9 et d'ARNg, puis injectée dans des œufs nouvellement fécondés de *P. tetrazona*. La protéine Cas9, dirigée par l'ARNg, 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.

D'autres détails fournis par l'entreprise qui décrivent l'élaboration et l'analyse de la lignée pour confirmer que le PB2019 constitue une seule lignée homogène et que l'ossature de vecteur n'a pas été incorporée avec les transgènes sont considérés comme des renseignements commerciaux confidentiels et ne sont pas déclarés ici.

2.4.1.2. Caractérisation de l'intégrant transgénique

La séquence de la cassette insérée dans le génome du PB2019 n'a pas été déterminée, et l'emplacement précis de l'insérat dans le génome du PB2019 est inconnu.

Bien que les éléments utilisés dans la production de l'OB2019, tels que la protéine Cas9 et l'ARNg et les régions homologues, aient été inclus pour encourager l'insertion dirigée de la cassette dans le génome de barbus tigre, 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'OB2019.

Les détails concernant l'analyse visant à confirmer que de multiples copies de la cassette d'expression transgénique ont été incorporées à un seul site d'insertion sont considérés comme des renseignements commerciaux confidentiels et ne sont pas mentionnés ici.

2.4.1.3. Transmission 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 lieu stable du génome ou dans une région sujette à l'extinction génique. L'individu porteur d'un transgène silencieux ne présenterait pas de phénotype de couleur violette et serait donc retiré de la population.

L'entreprise maintient cette lignée de reproduction depuis plus de quatre générations et produit commercialement le PB2019 depuis 2020. Au cours de cette période, elle a observé que le phénotype fluorescent violet restait durable et stable d'une génération à l'autre.

2.4.1.4. Méthodes de détection du transgène

Les individus PB2019 se distinguent des *P. tetrazona* domestiques non transgéniques par leur coloration violette uniforme sous lumière naturelle et leur fluorescence sous lumière bleue ou ultraviolette. Les PB2019 peuvent être identifiés 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 PB2019 des autres barbus tigrés transgéniques violets fluorescents s'ils portent une cassette différente.

2.4.2. Caractérisation phénotypique

2.4.2.1. Effets phénotypiques ciblés de la modification

L'effet phénotypique recherché de la modification génétique est une couleur violette lorsque le PB2019 est exposé à la lumière ambiante et fluorescente sous lumière bleue ou ultraviolette. Ce nouveau phénotype de couleur se voit dans les muscles, la peau et les yeux. L'entreprise indique que les individus PB2019 hémizygotes et homozygotes pour l'insérat transgénique ne peuvent être distingués les uns des autres par leur phénotype et sont tous destinés à la vente.

2.4.2.2. Effets phénotypiques additionnels de la modification

Les effets de la modification génétique sur les autres phénotypes, dont la capacité de survie, n'ont pas fait l'objet d'un examen officiel. Aucune étude officielle n'a comparé la sensibilité potentielle aux maladies du PB2019 et des souches non transgéniques. Il n'existe pas non plus d'étude officielle sur les effets non ciblés potentiels de la modification génétique sur le cycle de vie (autres que le succès reproducteur), les tolérances et les exigences environnementales (autres que la tolérance aux températures basses), le métabolisme, la physiologie, l'endocrinologie ou le comportement; toutefois, il n'existe pas de signalement anecdotique ou autre d'effets non ciblés autres que ceux énumérés ci-dessus.

2.5. EFFETS PLÉIOTROPIQUES DES TRANSGÈNES FLUORESCENTS CHEZ LES AUTRES POISSONS

De nombreuses protéines fluorescentes, particulièrement la protéine verte fluorescente enrichie (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, 2006a), bien que les différences dans le bagage génétique de la souche et les conditions d'élevage (Schaefer et Ryan 2006) préalables à l'expérience aient pu avoir une incidence sur la tolérance relative aux températures extrêmes. En outre, Leggatt *et al.* (2018 b) ont signalé que le poisson zèbre porteur du transgène de l'eGFP dirigé par le promoteur de la protéine Fli-1 était moins tolérant au froid que la souche non transgénique de source. Leggatt *et al.* (2018 b) ont également signalé deux autres lignées eGFP dirigées par d'autres promoteurs qui ne présentaient pas une tolérance réduite au froid. Cela indique que différentes lignées transgéniques peuvent présenter des réactions différentes à des facteurs de stress environnementaux extrêmes. Cinq des six tétras GloFishMD déclarés précédemment, trois lignées de poissons zèbres GloFishMD déclarés précédemment et deux des trois lignées de bettas GloFishMD ont également été

signalées comme présentant une tolérance au froid réduite (MPO 2018, 2019, 2020a, 2020 b, 2021).

Aucun effet de la transgénèse de la protéine de fluorescence 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 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, tableau 1), 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 (2006 b) 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 non transgéniques non apparentés. En revanche, Jha (2010) a découvert qu'une souche indienne de poisson zèbre RFP domestique constituait une proie moins importante pour les têtes-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, 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, ainsi qu'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 al.* (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 apparentés de poissons zèbres RFP et non transgéniques. Jiang *et al.* (2011) ont signalé des différences selon le sexe dans la préférence non transgénique du vairon de Chine (*Tanichthys albonubes*) pour les congénères non transgéniques ou transgéniques RFP, où les mâles non transgéniques avaient tendance à préférer les bancs et les femelles transgéniques, tandis que les femelles non transgéniques

préféraient les mâles non transgéniques et n'avaient aucune préférence pour le type de bancs. Howard *et al.* (2015) ont étudié le devenir des spécimens porteurs 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 pléiotropiques 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, diminution du succès reproducteur).


2.6. CARACTÉRISATION RELATIVE AUX POISSONS GLOFISH^{MD} DÉJÀ ÉVALUÉS

Les barbus tigrés 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, de tétras et de bettas GloFish^{MD} précédemment déclarés et évalués. Toutes les lignées de poissons GloFish^{MD} déclarées précédemment ont été produites à l'aide de cassettes d'expression de transgènes et d'éléments (promoteurs, séquences de terminaison), bien que les gènes pigmentaires varient selon la couleur du poisson, et seules les lignées de bettas ont inclus des bras d'homologie propres à l'espèce dans la construction pour promouvoir l'insertion dirigée sur place à l'aide de la protéine Cas9 et d'un ARNg.

L'utilisation d'un ARNg et de la Cas9 pour diriger l'insertion de transgènes spécifiques à un site peut avoir entraîné des mutations involontaires au sein des populations de barbus obtenues. Dans d'autres modèles, il a été démontré que l'ARNg et la Cas9 se lient et coupent l'ADN génomique même en présence de mésappariements de trois à cinq paires de bases entre l'ARNg et l'ADN génomique (Zhang *et al.* 2015). Aucune donnée ne permet de déterminer s'il existe des mutations Cas9 sur cible ou hors cible dans les populations de barbus tigrés GloFish^{MD}. Les effets mutagènes théoriques potentiels de la séquence d'ARNg utilisée ont été examinés à l'aide de CRISPR (Concordet et Haeussler 2018) et à l'aide de l'assemblage du génome de *P. tetrazona* GCA_018831695.1/ASM1883169v1 (comm. pers. K.W. Wellband, Pêches et Océans Canada, Vancouver Ouest, C.-B.). L'ARNg utilisé aurait une faible affinité sur cible en raison d'un certain nombre de caractéristiques (p. ex., faible pourcentage de teneur en GC, nombre élevé de bases T près de l'extrémité 3 pieds, autres bases G à l'extrémité 5 pieds du promoteur T7), ce qui pourrait expliquer pourquoi il n'a pas réussi à intégrer le transgène au site cible. Il y avait certains sites non ciblés ayant une affinité modérée à faible avec l'ARNg calculé (voir l'annexe 1), bien que les conséquences phénotypiques des mutations dans ces sites, le cas échéant, ne soient pas connues.

Des tests de caractérisation moléculaire et phénotypique semblables ont été effectués par l'entreprise pour les lignées de poissons GloFish^{MD} actuelles et celles précédemment déclarées, et les résultats des tests menés sur les barbus GloFish^{MD} se recourent avec certaines ou toutes les lignées précédemment déclarées (voir tableau 1).

Tableau 1. Caractérisation des lignées de poissons GloFishMD déclarées en vertu de la LCPE pour la vente au Canada dans le commerce des poissons ornementaux.

Caractérisation	GB20	RB2015	OB2019	PB2019	GBS2019	PiBS2019	OBS2019	BT2018	OT2018	PiT2018	PuT2018	RT2018	CGT2016	YZ2018	BZ2019	PZ2019
																
Nom commercial	Barbus Electric Green ^{MD}	Barbus Starfire Red ^{MD}	Barbus Sunburst Orange ^{MD}	Barbus Galactic Purple ^{MD}	Betta Electric Green ^{MD}	Betta Moonrise Pink ^{MD}	Betta Sunburst Orange ^{MD}	Tétra Cosmic Blue ^{MD}	Tétra Sunburst Orange ^{MD}	Tétra Moonrise Pink ^{MD}	Tétra Galactic Purple ^{MD}	Tétra Starfire Red ^{MD}	Tétra Electric Green ^{MD}	Danio SunBurst Orange ^{MD}	Danio Cosmic Blue ^{MD}	Danio Galactic Purple ^{MD}
Présence de la variante à longues nageoires	oui	oui	oui	non	Oui ²	Oui ²	Oui ²	non	oui	oui	oui	oui	oui	non	non	non
Présence de poissons homozygotes	oui	oui	oui	oui	oui	oui	oui	non	oui	non	non	oui	oui	oui	oui	oui
Date d'autorisation d'utilisation –États-Unis/Canada	2012/en cours d'examen	2016/en cours d'examen	2020/en cours d'examen	2020/en cours d'examen	2019/2021	2020/2021	2020/2021	2014/2018	2013/2018	2013/2018	2013/2018	2014/2018	2012/2017	2012/2019	2010/2019	2011/2019

3. CARACTÉRISATION DU COMPARATEUR

Aux fins de cette évaluation du risque, le *Puntigrus tetrazona* (barbus tigre) domestique a été choisi comme comparateur. *P. tetrazona* est une espèce ornementale populaire qui est élevée, produite et commercialisée dans le monde entier.

3.1. STATUT TAXONOMIQUE

Les premiers efforts visant à combiner les descriptions redondantes des espèces et les tentatives plus récentes de résoudre le vaste genre *Puntigrus* diversifié en plus petits clades ont mené à de nombreuses nouvelles désignations taxonomiques du barbus tigre, sans consensus actuel (Kottelat 2013; Ren 2015). Le barbus tigre fait partie de la famille des cyprinidés et a été décrit pour la première fois par l'ichtyologiste hollandais Pieter Bleeker pendant qu'il explorait la région de Palembang, à Sumatra, en 1855 sous le nom de *Capoeta tetrazona* (Kottelat 2013). Depuis, le nom scientifique a subi de nombreuses itérations, notamment : *Puntius tetrazona*, *Barbus tetrazona*, *Systemus tetrazona*, *Systemus sumatranus* et *Systemus sumatrensis* (Froese et Pauly 2019). Parmi ceux-ci, *Puntius tetrazona* est encore largement utilisé au sein de la communauté scientifique, bien que les sources taxonomiques recommandent désormais *Puntigrus tetrazona* (Kortmulder comm. pers.; Kortmulder et Robbers 2017; Kottelat 2013). D'autres taxonomistes recommandent de reprendre le nom de genre *Systemus* (Pethiyagoda *et al.* 2012; Rainboth 1996). Les noms courants utilisés pour le barbus tigre comprennent le barbus de Sumatra et le barbus de Partbelt (Nico *et al.* 2019).

3.2. RÉPARTITION

Les barbus tigres sont probablement natifs de Sumatra et de Bornéo (Froese et Pauly 2019; Kortmulder 1972; Kottelat 1992; Sakurai *et al.* 1993; Tan 2012; Welcomme 1988). Bien que des occurrences aient été signalées dans d'autres régions d'Asie, dont la Thaïlande, la Malaisie et le Cambodge (Frankel, 1998; Naiman et Pister, 1974; Tamaru *et al.* 1998), il est probable qu'au moins certains de ces enregistrements fassent référence à des congénères morphologiquement semblables, en particulier l'ancienne sous-espèce *P. partipentazona*. Certains de ces enregistrements peuvent également représenter des populations non indigènes de barbus tigres ou de nouvelles libérations; pour plus de détails sur la présence du barbus tigre hors de son aire de répartition naturelle, voir la section 3.7.

3.3. HABITAT

On trouve généralement les barbus tigres dans les eaux peu profondes (environ deux pieds) et le long des berges des ruisseaux forestiers et des affluents à débit modéré, avec des substrats de sable ou de roches ou de galets de différentes tailles (Kortmulder 1972; Tamaru *et al.* 1998). Leur tolérance à la température les limite aux climats tropicaux, où ils préfèrent les habitats à végétation dense, ce qui est probablement lié à leur stratégie de reproduction consistant à déposer leurs œufs sur de la végétation submergée (Innes 1979). Ils ont été signalés dans des eaux claires et troubles, ainsi que dans des lacs marécageux soumis à de fortes fluctuations du niveau et de la qualité de l'eau, ce qui indique que les barbus tigres sauvages peuvent être tolérants à la modification de la qualité de l'eau (Tamaru *et al.* 1998; Vajargah et Rezaei, 2015).

3.4. TOLÉRANCES PHYSIOLOGIQUES

3.4.1. Oxygène

Il existe peu d'études expérimentales sur les besoins en oxygène dissous des barbus tigres en captivité, et aucune étude de ce genre n'a été réalisée pour les populations sauvages. Toutefois, les lacs où se trouvent des barbus tigres contiennent souvent des marécages et les niveaux d'oxygène sont généralement faibles (Kortmulder, 1982). Dans le cadre d'une expérience sur l'hypoxie, les barbus tigres juvéniles exposés pendant 24 heures à 4 mg/L d'oxygène dissous affichaient une survie variant d'environ 40 % à plus de 90 % selon le taux d'huile de lin supplémentaire (Abolhasani *et al.* 2014). Des études expérimentales non liées aux besoins en oxygène et à l'hypoxie ont révélé que les concentrations d'oxygène dans les aquariums de barbus tigres étaient supérieures à 5,5 mg/L (Chapman 1997), 6,0 à 7,8 mg/L (Ling *et al.* 1991), 6,4 mg/L (Abolhasani *et al.* 2014) et 7 à 9 mg/L (Abdallah *et al.* 2015).

3.4.2. Température

Les barbus tigres sont considérés comme une espèce sténotherme qui ne peut survivre que dans une plage de températures environnementales restreinte (Yanar *et al.* 2019). Bien que Innes (1979) ait recommandé l'entretien des barbus tigres d'ornement à des températures entre 21,1 et 26,7 °C (70 et 80 °F), Tamaru *et al.* (1998) ont recommandé une plage de températures légèrement moins grande (22 à 25 °C). Les barbus tigres semblent préférer des températures légèrement plus élevées (23 à 28 °C) pendant la reproduction (Tamaru *et al.* 1998). Dans ses demandes de brevet pour le « poisson d'ornement fluorescent transgénique vert » (Blake *et al.* 2016a) et le « poisson d'ornement fluorescent transgénique rouge » (Blake *et al.* 2019), GloFish LLC recommande des températures de l'eau de 75 à 85 °F (environ 23,9 à 29,4 °C) pendant la fraie du barbus tigre non transgénique.

Des études contrôlées récentes ont permis de définir les tolérances de température auparavant inconnues pour les barbus tigres. Leggatt *et al.* (2018) ont constaté que la température à laquelle 50 % des individus subissaient une perte d'équilibre (DL_{50}) était de 13,20 °C, et que la température minimale létale chronique (TLC_{min}) moyenne était de 13,36 °C, lorsqu'ils étaient acclimatés initialement à 20 °C. Une autre étude a révélé que lorsqu'ils étaient acclimatés à des températures comprises entre 20 °C et 28 °C, la température minimale critique (TC_{min}) pour les barbus tigres variait entre 11,66 et 13,94 °C, et la température maximale critique (TC_{max}) variait entre 34,54 et 39,91 °C (Yanar *et al.* 2019). Les différences de tolérance au froid signalées entre les études lorsqu'ils étaient acclimatés à 20 °C peuvent être dues à des procédures expérimentales différentes (c.-à-d. le taux de baisse de la température), ainsi qu'à des variations potentielles de l'historique d'élevage ou de la génétique de base (Saillant *et al.* 2008; Schaefer et Ryan 2006; Tuckett *et al.* 2016). Le taux de récupération des essais différait également d'une étude à l'autre, soit 100 % après l'essai TC_{min} (Yanar *et al.* 2019) et 0 % après l'essai TLC_{min} (Leggatt *et al.* 2018 b). Pendant les baisses lentes de température (c.-à-d. 1 °C par jour), les barbus tigres ont diminué leur activité à 19 °C, ont diminué leur alimentation en dessous de 17 °C, et ont cessé de s'alimenter et d'être actifs en dessous de 14 °C (Leggatt *et al.* 2018 b). De plus, Liu *et al.* (2020) ont rapporté des dommages tissulaires importants dans le cerveau, les branchies, le foie et les muscles des barbus tigres lorsque la température a été abaissée à 13 °C.

3.4.3. pH et dureté de l'eau

Le barbus tigre tolère une plage de pH de 6,5 à 7,5 (Tamaru *et al.* 1998; Vajargah et Rezaei 2015), mais semble préférer une eau légèrement acide (Sakurai *et al.* 1993), en particulier lors de la reproduction. Dans les demandes de brevet pour le « poisson d'ornement fluorescent

transgénique vert » (Blake *et al.* 2016a) et le « poisson d'ornement fluorescent transgénique rouge » (Blake *et al.* 2019), dans des milieux contrôlés (aquarium), les barbus tigres prospèrent dans l'eau avec une dureté de 100 à 250 ppm CaCO₃ (Tamaru *et al.* 1998).

3.4.4. Salinité

Bien qu'aucune donnée ne soit disponible pour les milieux naturels, des études expérimentales donnent un aperçu des préférences et des tolérances de salinité des barbus tigres. Abolhasani *et al.* (2014) ont constaté que le taux de survie des barbus tigres juvéniles était supérieur à 80 % après 24 h à 6 ppt de salinité dans un régime contrôlé, et après 24 h à 10 ppt de salinité dans le cas d'un régime enrichi en huile de lin, tandis que Tamaru *et al.* (1998) suggèrent qu'une salinité allant jusqu'à 9 ppt peut être avantageuse pour réduire le stress des barbus tigres élevés commercialement. Dans ses demandes de brevet pour le « poisson d'ornement fluorescent transgénique vert » (Blake *et al.* 2016a) et le « poisson d'ornement fluorescent transgénique rouge » (Blake *et al.* 2019), GloFish LLC affirme que la faible salinité (conductivité de 100 à 200 µS/cm) favorise la fraie chez les barbus tigres non transgéniques.

3.5. MORPHOLOGIE, CYCLE BIOLOGIQUE ET CROISSANCE

Le barbus tigre tient son nom des quatre barres noires qui contrastent fortement avec sa couleur de fond. *P. tetrazona* est une petite espèce dont la longueur standard est de 2,4 à 4,7 cm (Kortmulder 1972; Taki *et al.* 1978). Son corps est rhomboïdal et sa couleur de fond à l'état sauvage varie d'argentée à jaune brunâtre (Kortmulder 1972; Tan 2012). D'autres variations de couleur ont été créées par sélection artificielle, y compris les variants vert et albinos (Tamaru *et al.* 1998).

Les barbus tigres mâles et femelles peuvent parfois être distingués morphologiquement selon la couleur et la forme du corps (Kortmulder 1972; Tamaru *et al.* 1998). Les femelles ont généralement un contour plus complet et une queue et des nageoires transparentes, tandis que les mâles ont deux stries rouges distinctes de la base aux pointes de la nageoire (Innes 1979; Kortmulder 1972). Les mâles sont en moyenne plus rouges que les femelles, bien que l'intensité des autres formes rouges puisse se chevaucher entre les sexes (Takahashi et Shimizu 1983). Pendant la reproduction, les marques rouges deviennent plus intenses chez les mâles et moins intenses chez les femelles (Kortmulder 1972; Takahashi et Shimizu 1983).

Les barbus tigres atteignent généralement une maturité sexuelle à une longueur de deux à trois centimètres, soit environ six à sept semaines après l'éclosion (Tamaru *et al.* 1998). Les gonades de *P. tetrazona* se développent initialement sous forme d'ovaires; chez les mâles, il y a ensuite une dégénérescence des tissus ovariens et un développement normal des testicules 50 jours après l'éclosion (Devlin et Nagahama 2002; Takahashi et Shimizu 1983).

Les barbus tigres mâles sont de nature territoriale par intermittence; ils ne protègent leur territoire que pendant la fraie et se rassemblent en bancs souvent le même jour (Kortmulder 1972). Avant l'accouplement, les mâles font des parades nuptiales, pourchassent les femelles et pincet agressivement leurs nageoires (Innes 1979; Kortmulder 1972). Au cours de la parade nuptiale, il arrive que les mâles mordent les nageoires anales des femelles au point de les tuer (Innes 1979). Après la parade nuptiale, le mâle étreint la femelle qui dépose un à trois œufs à la fois sur des plantes à feuilles larges, où il les fertilise immédiatement (Tamaru *et al.* 1998). Les femelles peuvent produire de 200 à 500 œufs par fraie et frayer à des intervalles d'environ deux semaines (Tamaru *et al.* 1998). Les barbus tigres mâles et femelles aiment manger le frai (Innes 1979). Les œufs éclosent deux ou trois jours après la fertilisation et les larves nagent librement une fois le sac vitellin consommé, environ trois ou quatre jours après l'éclosion

(Kortmulder 1972; Tamaru *et al.* 1998). Les barbus tiges ont une durée de vie de six ans dans un aquarium (Vajargah et Rezaei 2015).

3.6. BAGAGE GÉNÉTIQUE

Plusieurs études ont examiné l'héritage de diverses caractéristiques de pigmentation chez les barbus tiges au moyen d'une analyse phénotypique des croisements dirigés. Bien que Frankel (1998) ait constaté que la longueur des anneaux soit contrôlée par deux loci géniques additifs et que le nombre d'anneaux est sous simple hérédité mendélienne monogénique avec cinq anneaux dominants sur quatre anneaux, l'étude a fondé ses conclusions sur des croisements entre des sous-espèces apparentées qui se distinguent depuis en tant qu'espèces distinctes (Frankel 1998). Sheriff (1999) a indiqué que dans les croisements des barbus tiges « normaux », « verts » et « jaunes », le phénotype de couleur « normale » est dominant et le phénotype « vert » présente des preuves d'interactions épistatiques. Des lignées de barbus tiges albinos ont été créées par la reproduction sélective des variations de couleurs mutantes naturelles (Kortmulder 1972). Les barbus tiges provenant d'aquariums sont considérés comme entièrement domestiqué (c.-à-d. élevés pour des objectifs précis) [Teletchea 2016].

Bien que des éléments fonctionnels (actifs) transposables aient été identifiés chez des cyprinidés apparentés, y compris d'autres *Puntigrus* spp. (Ishiyama *et al.* 2017), cela n'a pas été examiné spécifiquement chez les barbus tiges. Aucune étude n'a été trouvée concernant la génétique de la population de barbus tiges.

3.7. CARACTÈRE ENVAHISSANT

Aucune population établie de barbus tiges n'a été signalée sur le continent nord-américain, probablement en raison des limites de tolérance à la température de l'espèce (Tamaru *et al.* 1998); toutefois, une population établie de barbus tiges a été signalée dans l'est de Porto Rico depuis 1995 (Nico *et al.* 2019). Bien qu'il existe des populations établies d'espèces apparentées de barbus (*Puntigrus*) à Porto Rico et en Australie, aucun impact écologique n'a été recensé (Hill *et al.* 2014).

Bien que des occurrences de barbus tiges dans la partie continentale des États-Unis (Floride, Texas, Californie et Wyoming) aient été signalées depuis les années 1970 (Howells 2001; Naiman et Pister 1974; Nico *et al.* 2019; Welcomme 1988), aucun rapport ne fait état d'établissement ou de reproduction, même avec la découverte d'un mâle et d'une femelle sexuellement matures aux environs d'une source d'eau chaude aux températures idéales pour le frai (Dill et Cordone 1997; Naiman et Pister 1974). Tuckett *et al.* (2017) ont capturé 163 individus de deux variétés dans un rayon de 500 m des bassins d'aquaculture extérieurs en Floride, bien qu'aucun poisson n'ait été capturé à plus de 500 m des installations de provenance. Malgré le grand nombre de poissons capturés, les auteurs ont attribué ces individus à des libérations récentes et non à des établissements, probablement en raison de l'absence de juvéniles dans l'échantillon (Shafland *et al.* 2008).

Plusieurs études récentes ont utilisé le protocole Fish Invasiveness Screening Kit (FISK) [Copp *et al.* 2005] pour évaluer le caractère envahissant du barbus tigre. Bien que les résultats du FISK dans les climats méditerranéens varient de 5 à 11,3 (risque moyen) [Perdikaris *et al.* 2016; Range 2013] et aient évalué le potentiel d'envahissement du barbus tigre comme étant faible à moyen (résultats : -2,5 à 1,8) en Floride subtropicale (Hill *et al.* 2014; Hill *et al.* 2017; Lawson 2014), le risque d'envahissement serait probablement beaucoup plus faible dans les climats tempérés.

Marcot *et al.* (2019) ont proposé un système d'aide à la décision pour évaluer le caractère envahissant des poissons d'eau douce fondé, en partie, sur un modèle modifié d'évaluation du

risque pour les espèces nuisibles de poissons d'eau douce (Freshwater Fish Injurious Species Risk Assessment Model ou FISRAM); selon la probabilité dominante de leur modèle FISRAM, les barbus tigres ne sont pas envahissants aux États-Unis.

3.8. INTERACTIONS TROPHIQUES (RÉGIME ALIMENTAIRE, PROIES, CONCURRENDS, PRÉDATEURS)

Les barbus tigres sont connus pour manger des plantes, des crustacés et des détritiques (Mills et Vevers 1989). Plus récemment, les barbus tigres ont été reconnus comme des prédateurs efficaces des larves de moustiques dans des conditions de laboratoire et de semi-liberté (Barik *et al.* 2018).

Les barbus tigres sont agressifs et affichent souvent des comportements agonistes envers leurs congénères et les gros poissons (Innes 1979; Kortmulder 1972; Sakurai *et al.* 1993). Kortmulder (1972) rapporte la « persécution » par des barbus tigres d'un cichlidé (*Cichlasoma severum*) introduit dans le même aquarium, y compris le fait de mordre et de déchirer les nageoires du cichlidé et la poursuite de ce dernier lorsqu'il a tenté de s'échapper. Un comportement semblable, quoique moins grave, a été observé chez une espèce de barbus plus grande (*Barbus schwanenfeldi*) [Kortmulder 1972]. Innes (1979) a observé un comportement semblable chez les barbus tigres à l'égard des espèces de poissons qui se déplacent lentement et dont les nageoires sont fluides, y compris les bettas, les anges de mer et les guppys. Sakurai *et al.* (1993) ont également noté un comportement semblable.

4. ÉVALUATION DU RISQUE POUR L'ENVIRONNEMENT

Cette évaluation du risque est effectuée dans le contexte de la LCPE et des exigences en matière d'information de l'annexe 5 du RRSN(O). Le risque pour l'environnement canadien qui peut être associé à l'importation ou à la fabrication de poissons génétiquement modifiés est déterminé 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 libérations 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 risque est axée sur les répercussions possibles de l'organisme sur : (1) les proies, prédateurs et compétiteurs potentiels de l'organisme, (2) la diversité biologique et (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 du risque revues par les pairs à ECCC aux fins de la prise de décisions réglementaires en vertu de la LCPE, en fonction du risque 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).

4.1. ÉVALUATION DE L'EXPOSITION

L'évaluation de l'exposition pour les quatre organismes vivants aborde à la fois la probabilité qu'ils pénètrent dans l'environnement (libération) 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 libération, de survie, de persistance, de reproduction, de prolifération et de propagation dans l'environnement canadien. Le tableau 2 présente le classement de la probabilité d'exposition de l'environnement canadien.

Tableau 2. 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

¹ Extrêmement improbable ou imprévisible

Étant donné le statut réglementaire des poissons génétiquement modifiés soumis à une évaluation du risque pour l'environnement en vertu de la LCPE, l'absence de données empiriques sur la survie, la valeur adaptative et la capacité de reproduction des barbus 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 3 présente le classement de l'incertitude associée à la probabilité de présence de l'organisme et à son devenir dans l'environnement canadien.

Tableau 3. 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 sur les paramètres environnementaux du milieu récepteur. Preuve de l'absence d'interactions génotype-environnement (GxE) ou parfaite compréhension de leurs effets 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 possibles des GxE 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, de tétras et de bettas GloFish^{MD} déclarées et évaluées ont conclu à un faible indice d'exposition environnementale avec un faible niveau d'incertitude (MPO 2018, 2019, en cours d'examen). Aucune caractéristique moléculaire ou phénotypique connue chez les barbus GloFish^{MD} ne suggère un classement différent de celui des lignées évaluées précédemment, et aucun nouvel ouvrage scientifique n'a été publié qui pourrait modifier les classements précédents. Par conséquent, l'évaluation de l'exposition environnementale pour les barbus GloFish^{MD} est faible, avec un faible niveau d'incertitude qui est cohérent avec les lignées déclarées précédemment. Des précisions soutenant cette conclusion suivent.

4.1.1. Caractérisation de l'environnement récepteur

Leggatt *et al.* (2018a) offrent une caractérisation des milieux récepteurs potentiels au Canada dans le contexte de l'introduction de poissons. L'accent est mis sur la température de l'eau en tant que facteur abiotique clé qui influe sur la survie et la production de la plupart des populations de poissons d'eau douce; c'est aussi un facteur important dans la qualité de l'habitat (Amiro 2006; Elliott et Elliott 2010; Jobling 1981; Magnuson *et al.* 1979).

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. De ces derniers lacs, tous sauf un affichent une température minimale inférieure à 6 °C (voir Leggatt *et al.* 2018b), bien que les enregistrements de température de ces lacs plus chauds soient souvent limités à une seule mesure par hiver, et que les températures enregistrées ne représentent pas nécessairement la température la plus froide obtenue pendant les mois d'hiver.

Au cours de l'été, de nombreux lacs canadiens peuvent atteindre des températures de surface supérieures à 20 °C. Toutefois, seulement quelques plans d'eau ont été observés à plus de 25 °C. Par exemple, sur les 83 lacs surveillés dans le cadre du programme d'intendance et de surveillance des lacs de la Colombie-Britannique (British Columbia Lake Stewardship and Monitoring Program), 67 lacs ont atteint des températures maximales de l'eau de surface supérieures à 20 °C pendant l'été, mais seulement 6 ont atteint des températures supérieures à 25 °C ([BCLSS](#), consulté le 17 mars 2022). Les exceptions à ce qui précède sont des poches très localisées et isolées d'eau chaude générées par les sources chaudes ou les effluents industriels qui peuvent fournir refuge à des espèces de poissons ayant une tolérance limitée au froid (Peterson *et al.* 2005; Renaud et McAllister 1988).

Précisons que les profils de température de nombreux plans d'eau douce présentent 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 des rives connaissent plus souvent des températures extrêmes que les eaux profondes. Aussi, la température moyenne des eaux douces de surface au Canada augmente en raison des changements climatiques, et elle devrait connaître une hausse de 1,5 à 4,0 °C au cours des 50 prochaines années (MPO 2013). Ce changement pourrait augmenter le nombre de lacs où les organismes ayant une tolérance modérée au froid peuvent survivre.

4.1.2. Probabilité de dissémination

Bien que les organismes soient destinés à la vente sur le marché des poissons d'ornement et que les amateurs suivent les instructions d'élimination recommandées par le détaillant ou l'entreprise elle-même, il est fort probable que les barbus GloFish^{MD} seront introduits dans

l'environnement canadien. Une fois que les organismes sont vendus au détail, ils ne sont 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 signalements 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 qui se déroule en continu (Kerr *et al.* 2005; Marson *et al.* 2009; Rixon *et al.* 2005; Strecker *et al.* 2011). Ceci concorde avec une forte probabilité de libération des tétras, des poissons zèbres et des bettas GloFish^{MD} précédemment déclarés. La mesure dans laquelle l'environnement sera exposé aux barbus GloFish^{MD} dépendra donc fortement de la capacité de ces poissons à survivre et à se reproduire dans les lacs et les rivières du Canada.

4.1.3. Probabilité de survie

Comme *P. tetrazona* 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. 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 un aquarium, les barbus tigres sont généralement maintenus à des températures comprises entre 21 et 27 °C (voir la section 3.4.2). Dans une expérience récente, lorsque *P. tetrazona* a été acclimaté à 20 °C et que les températures ont baissé de 0,3 °C par heure, la TC_{min} observée était de 11,66 ± 0,86 °C (Yanar *et al.* 2019). Leggatt *et al.* (2018b) ont constaté que lorsque des barbus tigres domestiqués étaient acclimatés à 20 °C et que la température baissait de 1 °C par jour, la température à laquelle 50 % des individus subissaient une perte d'équilibre (DL₅₀) était de 13,20 °C et la TLC_{min} moyenne de *P. tetrazona* était de 13,36 ± 0,02 °C.

Comme discuté dans la section 4.1.1, 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 de ceux où il y a des sources chaudes et des effluents industriels).

Bien que les températures nécessaires à la survie des barbus GloFish^{MD} soient possibles pour plusieurs lacs canadiens pendant de courtes périodes de l'été, il est très peu probable que les barbus GloFish^{MD} puissent survivre à l'hiver canadien et que leur occurrence dans l'environnement soit saisonnière ou éphémère. Cette situation est également appuyée par l'absence d'établissement de *P. tetrazona* malgré les phénomènes observés dans des climats beaucoup plus chauds (p. ex., Floride, Tuckett *et al.* 2017, voir la section 3.7).

Soulignons toutefois que la température moyenne des eaux douces de surface au Canada augmente en raison des changements climatiques, et qu'elle devrait connaître une hausse de 1,5 à 4,0 °C au cours des 50 prochaines années (MPO 2013). Bien que la majorité des réseaux d'eau douce qui présentent une couverture de glace importante en hiver devraient connaître une diminution du nombre de jours de glace (MPO 2013), 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 barbus GloFish^{MD}.

Les données sur la tolérance au froid, combinées à l'absence d'établissement du *P. tetrazona* en Amérique du Nord, suggèrent un potentiel de survie négligeable dans les eaux canadiennes, même avec la hausse des températures de l'eau associée au changement climatique.

4.1.4. Probabilité de reproduction

Même si les températures de l'eau au Canada limiteront la persistance de barbus GloFish^{MD} dans l'environnement (voir la section 5.1.3), 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 à 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; site [BCLSS](#) consulté le 17 mars 2022). Bien qu'il puisse s'agir d'une plage de températures tolérable pour la survie des barbus GloFish^{MD}, des températures supérieures (23 à 28 °C) sont idéales pour la reproduction (Tamaru *et al.* 1998). De plus, le barbus tigre a un comportement reproductif complexe, avec des parades nuptiales et des poursuites (voir la section 3.5). S'il y avait un partenaire et un habitat convenables pour la reproduction, la descendance qui en résulterait périrait au froid de l'hiver avant d'atteindre sa maturité.

Les barbus pourraient se reproduire dans des zones isolées d'eau chaude (p. ex., sources chaudes). Toutefois, il n'y a eu aucune observation d'occurrences de barbus dans les sources chaudes, et il n'y a aucune preuve de reproduction où les barbus tigres persistent dans les effluents des piscicultures ornementales (Tuckett *et al.* 2017).

4.1.5. Probabilité de prolifération et de dissémination

Les barbus GloFish^{MD} ne peuvent proliférer et se disséminer dans l'environnement canadien, puisque *P. tetrazona* ne peut survivre à l'hiver (voir la section 4.1.3). Mentionnons que les barbus GloFish^{MD} libérés occuperaient probablement des zones proches des rives, d'après ce que l'on sait de l'habitat de prédilection de l'espèce sauvage dans la nature (voir la section 3.3). On s'attend à ce que ces zones présentent des variations de température plus grandes 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 être plus froides que ne l'indiquent les données enregistrées, ce qui réduirait d'autant plus le potentiel d'hivernage des barbus GloFish^{MD}, bien que les poissons puissent se déplacer pour suivre des eaux plus chaudes lorsque la température baisse. Les températures estivales plus chaudes dans ces zones peuvent augmenter le potentiel de fraie d'une seule génération.

4.1.6. Conclusions

Compte tenu de l'analyse ci-dessus, la présence des barbus GloFish^{MD} dans l'environnement canadien devrait être rare, isolée et éphémère. Par conséquent, la probabilité d'exposition de l'environnement canadien aux barbus GloFish^{MD} est considérée comme faible selon les critères de classement indiqués au tableau 10. Le niveau d'incertitude associée à cette estimation est faible (voir le tableau 3 pour les critères de classement), compte tenu de la qualité des données (tolérance à la température) disponibles pour les barbus 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. Ce classement est conforme au classement de faible exposition avec une faible incertitude conclu pour six lignées de tétras GloFish^{MD} (MPO 2018, 2019), trois lignées de poissons zèbres GloFish^{MD} (MPO 2020a, 2020b) et trois lignées de bettas GloFish^{MD} (MPO 2021).

Selon l'entreprise déclarante, l'unique utilisation prévue des organismes déclarés est comme poissons d'ornement pour les aquariums intérieurs, statiques et domestiques. Cependant, une fois ces poissons achetés par les consommateurs, les autres utilisations non prévues ne

peuvent être écartées (p. ex., élevage dans des étangs extérieurs, utilisation comme poissons d'appât). Certaines utilisations non prévues pourraient mener à la libération de barbus GloFish^{MD}, mais elles ne modifieront pas la capacité de ces organismes à passer l'hiver dans un environnement canadien ni le faible indice d'exposition environnementale à ces organismes.

L'évolution des courbes de température de l'eau liée au changement climatique mondial n'accroît pas l'incertitude concernant l'évaluation de la capacité des organismes déclarés à survivre, à se reproduire, à proliférer et à se disséminer dans les écosystèmes d'eau douce canadiens.

4.2. ÉVALUATION DES DANGERS

L'évaluation des dangers examine les répercussions potentielles sur l'environnement qui pourraient découler de l'exposition aux barbus GloFish^{MD}. Le processus de détermination 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 4, 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 d'experts.

Tableau 4. 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
Modéré	Effets nocifs réversibles
Élevé	Effets nocifs irréversibles

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

² Effet nocif : effet négatif immédiat ou à long terme sur la structure ou la fonction de l'écosystème, y compris la diversité biologique au-delà de la variabilité naturelle.

L'incertitude entourant l'évaluation des dangers est importante en raison des lacunes dans les connaissances et des données empiriques insuffisantes sur le comportement et les effets des barbus 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 5 décrit les classements relatifs à l'incertitude concernant les dangers potentiels posés par les organismes dans l'environnement.

Tableau 5. 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 de GxE ou parfaite compréhension de leurs effets 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 des GxE dans les conditions environnementales pertinentes. Signes d'une certaine variabilité.
Modéré	Données limitées sur les organismes, les organismes apparentés ou les substituts valides. Compréhension limitée des GxE dans les conditions environnementales pertinentes. Lacunes dans les connaissances. Dépendance à l'égard de l'opinion d'experts.
Élevé	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 parmi 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 le niveau d'incertitude dans les évaluations du risque associé 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 barbus GloFish^{MD} (importation et transport dans des conteneurs fixes, entreposage dans des aquariums fixes de grossistes et de détaillants, élevage dans des aquariums personnels fixes) minimise les séquences des effets des barbus GloFish^{MD} sur l'environnement canadien. La majorité des dangers posés par les barbus GloFish^{MD} (p. ex., interactions avec d'autres organismes, conséquences sur le cycle biogéochimique, l'habitat et la biodiversité) serait causée par une libération directe de poissons 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).

Toutes les évaluations des lignées de tétras, de poissons zèbres et de bettas GloFish^{MD} précédemment déclarées ont abouti à un indice de danger négligeable pour la plupart des voies de pénétration dans l'environnement et à un indice de danger faible pour la transmission horizontale de gènes (THG), avec une incertitude allant de négligeable à modérée (MPO 2018, 2019, 2020a, 2020 b, 2021). Bien que *P. tetrazona* diffère des espèces précédemment déclarées *G. ternetzi* et *D. rerio* dans certains phénotypes (c.-à-d. l'agressivité, le comportement reproducteur; il est semblable au *B. splendens* dans ces caractéristiques), aucune caractéristique moléculaire ou phénotypique connue des barbus 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 classements précédents. Par conséquent, les évaluations du risque pour l'environnement posé par les barbus GloFish^{MD} suivent celles des tétras, des poissons zèbres et des bettas GloFish^{MD} précédemment déclarées. Des précisions soutenant ces conclusions suivent, et de plus amples détails sur chaque évaluation du risque sont disponibles dans Leggatt *et al.* (2018a).

4.2.1. Dangers possibles 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 des lignées de barbus GloFish^{MD} aux protéines, 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 signalements 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 aux barbus GloFish^{MD} ou à tout autre poisson GloFish^{MD} contenant des transgènes codant les mêmes protéines que celles des lignées de barbus GloFish^{MD} n'a été signalé au Canada et aux États-Unis. Par conséquent, le danger potentiel pour l'environnement lié à la toxicité des barbus 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 de tétras, de poissons zèbres et de bettas GloFish^{MD} déclarés précédemment (MPO 2018, 2019, 2020a, 2020 b, 2021). Aucune nouvelle donnée pertinente n'est devenue disponible depuis l'analyse des lignées précédentes de poissons GloFish^{MD}.

4.2.2. Dangers possibles liés à la transmission horizontale de gènes

Ce phénomène 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 les plus probables) comprennent l'exposition au sein de 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 connus 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 régulateurs. Une forte proximité des promoteurs aux transgènes pigmentaires 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 la construction transgénique d'une lignée actuelle (GB2011) et de certaines lignées déclarées antérieurement pourrait 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 dans

Escherichia coli (Wu *et al.* 2015). Une étude récente a analysé le potentiel de transfert hémato-gène 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'a 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 une grande diversité 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 antigène) 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 actuels 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 leur emplacement dans le génome du *P. tetrazona* 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 tétras, des poissons zèbres et des bettas GloFish^{MD}, bien que dans ce dernier groupe l'incertitude ait été jugée faible (MPO 2018, 2019, 2020a, 2020 b, 2021). Ici, à l'instar des poissons zèbres et des bettas, l'indice d'incertitude a été augmenté pour mieux refléter le nombre limité d'études pertinentes sur la THG et les conséquences qui en découlent.

4.2.3. Dangers possibles liés aux interactions avec d'autres organismes

Si des barbus GloFish^{MD} étaient libérés dans l'environnement, ils pourraient interagir avec d'autres organismes présents dans les écosystèmes d'eau douce canadiens, dont de possibles proies, compétiteurs et prédateurs. Le barbus tigre est connu pour se nourrir de plantes, de crustacés, de détritus et de larves de moustiques (Mills et Vevers 1989; Barik *et al.* 2018), et présente souvent des comportements agonistiques envers ses congénères et des poissons plus gros (Innes 1979; Kortmulder 1972; Sakurai *et al.* 1993). Par conséquent, il peut affecter les populations localisées de petites proies ou de compétiteurs occupant des niches semblables au lieu de sa libération. Toutefois, dans les réseaux d'eau douce typiques du Canada, les niveaux d'activité et d'alimentation de *P. tetrazona* devraient être faibles en raison des températures de l'eau inférieures à la température idéale pour l'espèce (voir les sections 3.4.2 et 5.1.1), et des données anecdotiques de l'entreprise indiquent qu'aucune différence de comportement n'a été détectée entre les barbus GloFish[®] et les barbus tigres domestiqués non transgéniques au cours de plusieurs années de développement et d'utilisation commerciale. Compte tenu des faibles températures presque toute l'année dans les réseaux 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 barbus GloFish^{MD} sur les espèces aquatiques indigènes par prédation, compétition et agression devraient être négligeables presque toute l'année, et ne pas être plus importantes que celles des *P. tetrazona* non transgéniques.

Les barbus GloFish^{MD} libérés pourraient également avoir une incidence sur les populations indigènes de prédateurs comme nouvelle source de proie. 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 barbus GloFish^{MD} cause des effets nocifs. Il s’agit d’une situation improbable, puisque les barbus GloFish^{MD} ne sont pas censés être toxiques pour l’environnement (voir la section 5.2.1 ci-dessus). Par conséquent, les lignées déclarées introduites aux échelles prévues ne devraient pas représenter un danger pour les prédateurs indigènes.

Compte tenu de la faible activité de *P. tetrazona* dans les eaux froides et de l’absence de modifications constatées dans le comportement trophique des lignées déclarées, les barbus GloFish^{MD} ne devraient pas affecter les interactions trophiques des organismes indigènes au-delà des fluctuations naturelles. Le danger qui lui est associé est donc **négligeable** par rapport à ses homologues non transgéniques. L’absence d’études portant directement sur les dangers des barbus GloFish®, et la mauvaise compréhension des GxE concernant l’agressivité et la susceptibilité à la prédation, se traduisent par un niveau d’incertitude **modéré**. Cela concorde avec le classement des évaluations des tétras, des poissons zèbres et des bettas GloFish^{MD} déclarés précédemment (MPO 2018, 2019, 2020a, 2020 b, 2021).

4.2.4. Dangers possibles liés à l’hybridation avec des espèces indigènes

Le potentiel d’hybridation des barbus tigres avec les espèces indigènes au Canada est faible. *P. tetrazona* est un membre de la famille taxonomique des *Cyprinidae*, dont 53 espèces sont présentes au Canada et plus de 1 500 espèces dans le monde entier (Coad 2015). Il existe plusieurs types de cyprinidés au Canada, et des hybridations intergénériques ont été constatées pour deux types de cyprinidés en Europe (Hayden *et al.* 2010), ce qui donne à penser que des hybrides entre *P. tetrazona* et des cyprinidés canadiens pourraient être possibles. De plus, dans la famille des mormyridés, la survie des hybrides intergénériques était liée à la distance phylogénétique de l’espèce mère (c.-à-d. qu’une plus grande distance phylogénétique a entraîné une diminution de la viabilité et une augmentation de la présence de malformations, Kirschbaum *et al.* 2016). Étant donné que l’on s’attend à ce que les cyprinidés canadiens présentent d’autres différences phylogénétiques par rapport au genre susmentionné qui n’a pas produit d’hybrides viables, il est peu probable que les cyprinidés canadiens forment des hybrides viables avec *P. tetrazona*.

Les barbus tigres ne dispersent pas leurs gamètes au hasard; ils fertilisent directement les œufs pondus sur un substrat (voir la section 3.5), ce qui réduit au minimum le potentiel de fertilisation entre les espèces. De plus, les barbus tigres préfèrent l’eau chaude (23 à 28 °C) pendant la reproduction (Tamaru *et al.* 1998), des conditions difficiles à trouver au Canada (voir la section 4.1.1) où les cyprinidés indigènes sont plus susceptibles de se reproduire à des températures fraîches. Par conséquent, le risque que les barbus GloFish^{MD} présentent des dangers en raison d’une hybridation viable avec un poisson indigène au Canada est **négligeable**. De l’information de haute qualité sur la répartition des cyprinidés et les exigences de reproduction de *P. tetrazona*, ainsi que certaines données sur l’hybridation intergénérique conduisent à une incertitude **faible** associée à ce classement. La conclusion selon laquelle le risque est négligeable est conforme à la conclusion des évaluations des tétras, des poissons zèbres et des bettas GloFish^{MD} déjà évalués, bien que ce classement diffère de l’incertitude négligeable concernant les tétras et les bettas qui n’appartiennent pas à des familles d’espèces de poissons canadiennes, et de l’incertitude modérée pour les poissons zèbres (famille des cyprinidés), pour lesquels il n’existe pas de données sur l’hybridation intergénérique (MPO 2018, 2019, 2020a, 2020 b, 2021; voir le tableau 6).

4.2.5. Dangers possibles en tant que vecteurs de maladies

Les poissons d'ornement d'aquarium commerciaux sont des vecteurs courants d'agents pathogènes, virus, bactéries, champignons ou parasites (Evans et Lester 2001; Hongslo et Jansson 2009; Řehulka *et al.* 2006; Rose *et al.* 2013; Whittington et Chong 2007).

De plus, tout agent pathogène dont les barbus GloFish^{MD} seraient porteurs devrait être d'origine tropicale ou persister dans les eaux chaudes normalement présentes dans un aquarium de maison (p. ex., 25 à 28°C) et, par conséquent, pourrait avoir une capacité limitée de persister à l'intérieur ou à l'extérieur des barbus GloFish^{MD} une fois dans les milieux d'eau douce canadiens qui sont plus froids. *P. tetrazona* 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, par l'Agence canadienne d'inspection des aliments ([Espèces d'animaux aquatiques vulnérables](#)).

La possibilité que la capacité des barbus GloFish^{MD}, ou de tout autre organisme fluorescent transgénique, à agir comme vecteurs d'agents pathogènes soit modifiée 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 l'eGFP 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 al.* (2015) ont signalé que des souris transgéniques pour 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 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, des poissons zèbres fluorescents sont utilisés 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** pour que les barbus GloFish^{MD} présentent une capacité altérée comme vecteurs de maladies par rapport aux *P. tetrazona* non transgéniques. Comme ce paramètre n'a pas été directement observé chez les barbus 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 est **modéré**. Cela concorde avec le degré d'incertitude déterminé lors des évaluations des tétras, des poissons zèbres et des bettas GloFish^{MD} déclarés précédemment (MPO 2018, 2019, 2020a, 2020 b, 2021).

4.2.6. Dangers potentiels pour le cycle biogéochimique

Les barbus 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 possibles des protéines fluorescentes sur le métabolisme chez les barbus 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 barbus GloFish^{MD} subissaient les mêmes effets liés à l'expression génique du transgène fluorescent, mais la petite taille du *P. tetrazona* 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 les conclusions des évaluations des lignées de tétras, de poissons zèbres et de bettas GloFish^{MD} déclarées précédemment (MPO 2018, 2019, 2020a, 2020 b, 2021).

4.2.7. Dangers potentiels pour l'habitat

P. tetrazona est un petit poisson qui ne construit pas de structures susceptibles d'affecter l'habitat des autres poissons. Aucun signalement, anecdotique ou autre, ne fait état d'une modification du comportement des barbus GloFish^{MD}, par rapport aux *P. tetrazona* domestiqués, qui pourrait affecter la structure de l'habitat. Par conséquent, les barbus GloFish^{MD} devraient avoir des effets **négligeables** sur l'habitat, et le niveau d'incertitude concernant ce classement est **faible**. Cela concorde avec les conclusions des évaluations des tétras, des poissons zèbres et des bettas GloFish^{MD} déclarés précédemment (MPO 2018, 2019, 2020a, 2020 b, 2021).

4.2.8. Dangers potentiels pour la diversité biologique

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 marché des aquariums d'ornement et les nombreuses introductions (voir la section 3.7), aucun rapport n'indique que *P. tetrazona* est devenu envahissant dans les régions tempérées de l'Amérique du Nord. De plus, rien ne prouve que les lignées de barbus GloFish^{MD} aient une aptitude accrue qui pourrait augmenter le caractère invasif par rapport aux barbus tigres non transgéniques.

Comme indiqué précédemment, les barbus GloFish^{MD} ne devraient pas affecter les espèces indigènes en raison d'interactions trophiques ou d'hybridation ni être des vecteurs 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 barbus GloFish^{MD} ne devrait pas causer de toxicité environnementale ou de dangers par l'intermédiaire de la THG du transgène. Dans l'ensemble, le risque que les barbus 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 les conclusions des évaluations des tétras, des poissons zèbres et des bettas GloFish^{MD} déclarés précédemment (MPO 2018, 2019, 2020a, 2020 b, 2021).

4.2.9. Conclusions

Les barbus GloFish^{MD} ne devraient pas être dangereux pour les environnements canadiens. Les barbus tigres non transgéniques n'ont jamais été envahissants dans les régions tempérées, y compris en Amérique du Nord, malgré leur utilisation généralisée. 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 dangereux 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 barbus GloFish^{MD} et d'autres modèles de poissons fluorescents sur

le plan de la vulnérabilité aux maladies, de comportement ou des conditions d'élevage, ni de modifications avantageuses dans la tolérance aux températures ou la reproduction; et on ne s'attend pas non plus à ce qu'ils puissent davantage agir comme vecteurs de maladies ou affecter le cycle biogéochimique.

Les dangers examinés sont classés de négligeable à faible (tableau 6), tandis que le degré d'incertitude varie de faible à modéré, en raison du caractère limité des données propres aux barbus GloFish^{MD}, des données directes limitées sur les espèces comparables, de la variabilité des données provenant de modèles substituts (p. ex., poissons zèbres RFP) et du recours à l'opinion d'experts pour l'évaluation de certains dangers. L'utilisation d'ARNg et de Cas9 pour la création des lignées OB2019 ou PB2019 ajoute une incertitude supplémentaire à l'évaluation globale des dangers découlant de mutations potentielles hors cible dans les populations de barbus. Les mutations non ciblées pourraient théoriquement entraîner une modification de la structure ou de l'expression des protéines qui altère le phénotype des barbus et peut avoir des conséquences en aval sur l'environnement. Le potentiel de mutations non ciblées résultant de l'utilisation d'ARNg et de Cas9 a été discuté pour d'autres modèles dans le contexte d'un dommage ou d'une toxicité potentiels pour l'organisme lui-même, et les phénotypes de mutations non ciblées, lorsqu'ils sont examinés, sont généralement neutres ou négatifs. Les éventuels effets nocifs des mutations non ciblées sur l'environnement n'ont pas été examinés expérimentalement ou rapportés dans d'autres modèles, et il n'existe aucun signalement anecdotique d'individus dans les populations de barbus GloFish^{MD} ayant des phénotypes altérés pouvant entraîner des dommages environnementaux. Bien que cette considération supplémentaire ne modifie pas les cotes de danger pour les barbus GloFish^{MD}, elle augmente l'incertitude dans l'évaluation globale du danger.

Les barbus GloFish^{MD} ne devraient présenter aucun danger particulier outre ceux associés à leur utilisation prévue comme poissons d'ornement destinés aux aquariums fixes. Le classement des dangers concorde avec ceux évalués précédemment pour les tétras, les poissons zèbres et les bettas GloFish^{MD}, bien que l'incertitude relative aux dangers par hybridation diffère des autres modèles en raison de la disponibilité des données et de la présence de confamiliers canadiens, et des tétras GloFish^{MD} dans l'incertitude relative aux dangers par THG en raison de la reconnaissance accrue des limites des données.

Tableau 6. Résumé de tous les classements et niveaux d'incertitude pour l'évaluation du risque pour l'environnement posé par les lignées de barbus GloFish^{MD} actuellement déclarées, ainsi que par les lignées de poissons zèbres, tétras et bettas GloFish^{MD} précédemment déclarées (MPO 2018, 2019, 2020a, 2020 b, 2021). Les soulignements représentent les différences entre les évaluations précédentes et actuelles.

Évaluation	Danger/Incertitude			
	Barbus	Bettas	Poissons zèbres	Tétras
Exposition	Faible/Faible	Faible/Faible	Faible/Faible	Faible/Faible
Dangers				
1. Toxicité environnementale	Nég./mod.	Nég./mod.	Nég./mod.	Nég./mod.

Évaluation	Danger/Incertitude			
	Barbus	Bettas	Poissons zèbres	Tétras
2. THG	Faible/moyen	Faible/moyen	Faible/moyen	Faible/ <u>Faible</u>
3. Interactions trophiques	Nég./mod.	Nég./mod.	Nég./mod.	Nég./mod.
4. Hybridation	Nég./ <u>Faible</u>	Nég./Nég.	Nég./ <u>Mod.</u>	Nég./Nég.
5. Vecteur de maladies	Nég./mod.	Nég./mod.	Nég./mod.	Nég./mod.
6. Biogéochimie	Nég./mod.	Nég./mod.	Nég./mod.	Nég./mod.
7. Habitat	Nég./Faible	Nég./Faible	Nég./Faible	Nég./Faible
8. Biodiversité	Nég./Faible	Nég./Faible	Nég./Faible	Nég./Faible
Risque pour l'environnement	Faible	Faible	Faible	Faible

4.3. 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. Les conclusions de l'avis scientifique du MPO remis à ECCC et à Santé Canada pour la prise de décisions réglementaires sont fondées 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 potentielle. La conclusion globale concernant le risque s'appuie sur le paradigme habituel selon lequel le risque est proportionnel au danger et à l'exposition : $\text{Risque} \propto \text{Exposition} \times \text{Danger}$

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 en fonction de l'exposition, au moyen d'une matrice ou d'une carte des risques, comme le montre la figure 2. 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.

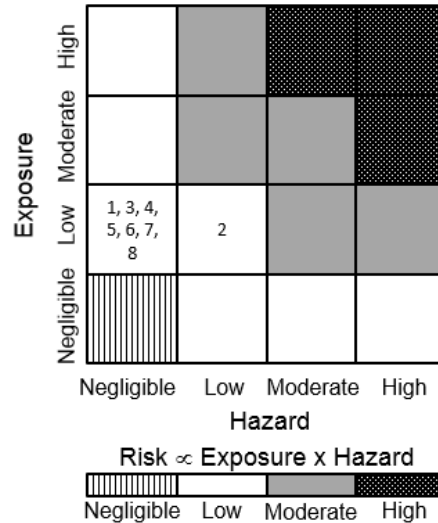


Figure 2. Matrice de risques et échelle de spectres pour illustrer comment l'exposition et le danger sont intégrés afin d'établir un niveau de risque dans l'évaluation du risque pour l'environnement. Les évaluations du risque associées aux composantes du danger évaluées selon l'évaluation de l'exposition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

4.3.1. Évaluation du risque posé par les barbus GloFish^{MD}

Selon l'évaluation de l'exposition, les barbus GloFish^{MD}, utilisés dans le commerce des poissons d'ornement destinés aux aquariums ou à d'autres fins, 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 personnels, ainsi qu'à une probabilité négligeable des barbus GloFish^{MD} de persister ou de passer l'hiver dans les écosystèmes aquatiques canadiens. Ainsi, toute exposition des écosystèmes canadiens d'eau douce aux barbus GloFish^{MD} devrait être isolée, rare et éphémère. La qualité des données démontrant l'intolérance au froid des barbus GloFish^{MD} et des *P. tetrazona* 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.

Selon l'évaluation des dangers, les barbus GloFish^{MD} représentent un danger de négligeable à faible pour l'environnement canadien, au vu de l'absence de dangers liés au *P. tetrazona* domestiqué, et de l'absence de preuve directe que le danger serait accru par la protéine fluorescente exprimée, par rapport au *P. tetrazona* domestiqué. Le niveau d'incertitude lié à chaque paramètre de danger va de faible à modéré, en raison du caractère limité des données propres aux barbus GloFish^{MD} et des données directes sur les espèces comparables, de la variabilité des données concernant les modèles substituts et de la dépendance à l'égard de l'opinion des experts pour l'évaluation de certains dangers.

D'après la matrice des risques (figure 2), les barbus GloFish^{MD} s'ils sont utilisés dans le commerce de poissons d'ornement 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 pour l'environnement comprennent l'absence de données directes sur les dangers des organismes déclarés et des espèces comparables, la

variabilité des données tirées des substituts qu'une certaine dépendance à l'égard de l'opinion d'experts dans certains cas.

En dépit de l'incertitude modérée associée à certains paramètres individuels évalués, il n'y a rien qui indique que les niveaux globaux de risque posé par des barbus GloFish^{MD} utilisés peuvent être plus élevés que le niveau faible de risque mesuré pour l'environnement canadien. Cela concorde avec le classement de danger faible des tétras, des poissons zèbres et des bettas GloFish^{MD} déclarés précédemment (MPO 2018, 2019, 2020a, 2020 b, 2021, voir le tableau 6).

4.3.2. Résumé et conclusions

La présence des barbus GloFish^{MD} dans des aquariums personnels au Canada, ou leur utilisation non prévue, devrait entraîner des libérations fréquentes à très petite échelle dans l'environnement, quoiqu'il ne soit pas possible d'exclure la possibilité qu'ils y soient introduits de façon importante occasionnellement. Cependant, les données de haute qualité disponibles indiquent que les barbus GloFish^{MD} n'ont pas la capacité d'hiverner dans les 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 barbus GloFish^{MD} par rapport au *P. tetrazona* domestiqué non transgénique, 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 modèles de base ou de barbus GloFish^{MD}, le degré d'incertitude associé aux évaluations des dangers varie de faible à modéré. Le risque global des barbus GloFish^{MD} pour l'environnement canadien est faible, et les organismes déclarés ne devraient 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 des organismes déclarés ou d'une espèce comparable, rien ne semblait indiquer que les barbus GloFish^{MD}, dans le cadre de l'utilisation proposée ou d'autres utilisations potentielles, pouvaient nuire à l'environnement canadien en cas d'exposition.

RÉFÉRENCES CITÉES

- Abdallah, S.J., Thomas, B.S., and Jonz, M.G. 2015. Aquatic surface respiration and swimming behaviour in adult and developing zebrafish exposed to hypoxia. *J Exp Biol* 218: 1777-1786. doi:10.1242/jeb.116343.
- Abolhasani, M.H., Hosseini, S.A., Ghorbani, R., M., S., and Hoseini, S.M. 2014. Growth, survival and stress resistance of tiger barb (*Puntius tetrazona*) larvae fed on linseed oil-enriched *Artemia franciscana* nauplii. *Iran. J. Fish. Sci.* 13(3): 576-584.
- 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. doi:10.1089=dna.2007.0604.
- 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. doi:10.1371/journal.pone.0000054.

-
- Barik, M., Bhattacharjee, I., Ghosh, A., and Chandra, G. 2018. Larvivorous potentiality of *Puntius tetrazona* and *Hyphessobrycon rosaceus* against *Culex vishnui* subgroup in laboratory and field based bioassay. *BMC Res Notes* 11(1): 804. doi:10.1186/s13104-018-3902-8.
- Blake, A., Crockett, R., and Nasevicius, A. 2016a. Green transgenic fluorescent ornamental fish. Yorktown Technologies, L.P., United States.
- Blake, A., Crockett, R., and Nasevicius, A. 2019. Red transgenic fluorescent ornamental fish. United States.
- Chapman, F.A. 1997. Evaluation of Commercially-Formulated Diets for Feeding Tiger Barb, *Puntius tetrazona*. *J. Appl. Aquacult.* 7(1): 69-74. doi:10.1300/J028v07n01_06.
- 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 Journal of Physiology* 58(1): 27-37. doi:10.4077/cjp.2015.Bac264.
- Coad, B.W. 2015. [Minnow](#). In *The Canadian Encyclopedia*. Accessed March 17, 2022.
- Concordet, J.P., and Haeussler, M. 2018. [CRISPOR: intuitive guide selection for CRISPR/Cas9 genome editing experiments and screens](#), *Nucleic Acids Research* 46: W242–W245.
- Copp, G.H., Garthwaite, R., and Gozlan, R.E. 2005. Risk identification and assessment of non-native freshwater fishes: concepts and perspectives on protocols for the UK. *C. Lowestoft*.
- 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. doi:10.1577/t04-197.1.
- Cortemeglia, C., and Beitinger, T.L. 2006a. Projected US distributions of transgenic and wildtype zebra danios, *Danio rerio*, based on temperature tolerance data. *J. Therm. Biol.* 31(5): 422-428. doi:10.1016/j.jtherbio.2006.01.011.
- Cortemeglia, C., and Beitinger, T.L. 2006b. Susceptibility of transgenic and wildtype zebra danios, *Danio rerio*, to predation. *Environ. Biol. Fish.* 76(1): 93-100. doi:10.1007/s10641-006-9011-x.
- 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. doi:10.1016/j.bbrc.2003.11.184.
- Devlin, R.H., and Nagahama, T. 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological and environmental influences. *Aquaculture*. 208: 191-364.
- 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. doi:10.1093/biosci/biv068.
- 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.
- Dill, W.A., and Cordone, A.J. 1997. [History and status of introduced fishes in California, 1871-1996](#).
-

-
- 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.
- Frankel, J.S. 1998. Monogenic inheritance of trunk banding patterns in *Barbus tetrazona*. *J. Fish Biol.* 53: 1357-1359.
- Froese, R., and Pauly, D. 2019. Species Details: *Puntigrus tetrazona* (Bleeker, 1855). *Edited by Y. Roskov and G. Ower and T. Orrell and D. Nicolson and N. Bailly and P.M. Kirk and T. Bourgoïn and R.E. DeWalt and W. Decock and E.v. Nieuwerkerken and J. Zarucchi and L. Penev. Species 2000 & ITIS Catalogue of Life, 2019 Annual Checklist, Leiden, the Netherlands.*
- Gong, Z., Wan, H., Tay, T.L., Wang, H., Chen, M., and Yan, T. 2003. Development of transgenic fish for ornamental and bioreactor by strong expression of fluorescent proteins in the skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 308: 58-63. doi:10.1016/S0006-291X(03)01282-8.
- Graham, L.A., and Davies, P.L. (2021) Horizontal Gene Transfer in Vertebrates: A Fishy Tale. *TIGS* 37(6):501-503.
- 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. doi:10.1007/s11248-007-9107-x.
- Hayden, B., Pulcini, D., Kelly-Quinn, M., O'grady, M., Caffrey, J., McGrath, A., and Mariani, S. 2010. [Hybridisation between two cyprinid fishes in a novel habitat: genetics, morphology and life-history traits](#). *BMC Evol Biol* 10: 169.
- Hill, J.E., Kapuscinski, A.R., and Pavlowich, T. 2011. Fluorescent transgenic zebra danio more vulnerable to predators than wild-type fish. *Trans. Am. Fish. Soc.* 140(4): 1001-1005. doi:10.1080/00028487.2011.603980.
- Hill, J.E., Lawson Jr., L.L., and Hardin, S. 2014. Assessment of the risks of transgenic fluorescent ornamental fishes to the United States using the Fish Invasiveness Screening Kit (FISK). *Trans. Am. Fish. Soc.* 143(3): 817-829. doi:10.1080/00028487.2014.880741.
- 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. doi:10.1080/00028487.2017.1312523.
- 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. doi:10.1111/evo.12662.
- Howells, R.G. 2001. Introduced non-native fishes and shellfishes in texas waters: an updated list and discussion. *Manage. Data Series.* 188: 1-25.
- Huang, W.Y., Aramburu, J., Douglas, P.S., and Izumo, S. 2000. Transgenic expression of green fluorescence protein can cause dilated cardiomyopathy. *Nature medicine* 6(5): 482-483. Available from <Go to ISI>://WOS:000086796200002 [accessed].
- Innes, W.T. 1979. Exotic aquarium fishes. a work of general reference. 20th ed. Metaframe Corporation, Philadelphia, USA.

-
- Ishiyama, S., Yamazaki, K., Kurihara, F., Yamashita, D., Sao, K., Hattori, A., and Koga, A. 2017. DNA-based transposable elements with nucleotide sequence similar to Tol2 from medaka fish are prevalent in cyprinid fishes. *Gene Reports* 9: 37-45. doi:10.1016/j.genrep.2017.08.004.
- 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. doi:10.1080/11250000802629463.
- Jiang, P., Bai, J.J., Ye, X., Jian, Q., Chen, M. and Chen, X.Q. 2011, [Shoaling and mate choice of wild-type *Tanichthys albonubes* in the presence of the red fluorescent transgenic conspecifics](#). *Journal of Fish Biology*, 78: 127-137.
- 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. doi:10.1577/1548-8446(2005)30[21:iasio]2.0.co;2.
- Kirschbaum, F., Nguyen, L., Baumgartner, S., Chi, H.W.L., Wolfart, R., Elarbani, K., Eppenstein, H., Kornienko, Y., Guido-Böhm, L., Mamonekene, V., Vater, M., and Tiedemann, R. 2016. Intra-genus (*Campylomormyrus*) and intergenus hybrids in mormyrid fish: Physiological and histological investigations of the electric organ ontogeny. *J. Physiol. (Paris)* 110: 281-301.
- Koelsch, K.A., Wang, Y., Maier-Moore, J.S., Sawalha, A.H., and Wren, J.D. 2013. GFP affects human T cell activation and cytokine production following *in vitro* stimulation. *PLoS ONE* 8(4): e50068. doi:10.1371/journal.pone.0050068.
- Kortmulder, K. 1972. A comparative study in colour patterns and behaviour in seven asiatic barbus species (Cyprinidaw, Ostariophysi, Osteichthyes): a progress report. *Behaviour*. E. J. Brill, Leiden, Netherlands.
- Kortmulder, K. 1982. Etho-ecology of seventeen *Barbus* species (Pisces; Cyprinidae). *Neth. J. Zool.* 32(2): 144-168. doi:10.1163/002829682X00111.
- Kortmulder, K., and Robbers, Y. 2017. *Barbelenverhalen II; Ethologie in Evolutie*. Lugdunum Press, Leiden, Netherlands.
- Kottelat, M. 1992. The identity of *Barbus johorensis* Duncker, 1904 (Teleostei: Cyprinidae). *Raffles Bulletin of Zoology* 40(2): 187-192.
- Kottelat, M. 2013. The fishes of the inland waters of Southeast Asia: a catalogue and core bibliography of the fishes known to occur in freshwaters, mangroves and estuaries. *Raff. Bull. Zool.* 27: 1-663.
- Lawson, L.L. 2014. Evaluation of the Fish Invasiveness Screening Kit (FISK v2) for identifying the invasiveness risk of non-native freshwater fishes in peninsular Florida. Graduate School of the University of Florida, University of Florida.
- 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., 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 p.

-
- 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(3): 253-260. doi:10.1139/cjz-2017-0043.
- 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. doi:10.1021/pr400567g.
- Ling, K.H., Sin, Y.M., and J., L.T. 1991. A new approach to controlling ichthyophthiriasis in a closed culture system of freshwater ornamental fish. *J. Fish Dis.* 14: 595-598.
- Liu, Z.J., Moav, B., Faras, A.J., Guise, K.S., Kapuscinski, A.R., and Hackett, P.B. 1990. Development of expression vectors for transgenic fish. *Biotechnology* 8(12): 1268-1272.
- Liu, L., Zhang, R., Wang, X. Zhu, H., Tian, Z. 2020. [Transcriptome analysis reveals molecular mechanisms responsive to acute cold stress in the tropical stenothermal fish tiger barb \(*Puntius tetrazona*\)](#). *BMC Genomics* 21: 737.
- 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.
- Marcot, B.G., Hoff, M.H., Martin, C.D., Jewell, S.D., and Givens, C.E. 2019. A decision support system for identifying potentially invasive and injurious freshwater fishes. *Management of Biological Invasions* 10(2): 200-226. doi:10.3391/mbi.2019.10.2.01.
- 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.
- Mills, D., and Vevers, G. 1989. The Tetra encyclopedia of freshwater tropical aquarium fishes. *In The Tetra Encyclopediea of Tropical Aquarium Fishes. Edited by G. Rogers.* Tetra Press, London. p. 208.
- 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.DFO. 2018. Environmental and indirect human health risk assessment of the Glofish® Electric Green® Tetra and the Glofish® Long-Fin Electric Green® Tetra (*Gymnocorymbus ternetzi*): a transgenic ornamental fish. *DFO Can. Sci. Advis. Sec. Sci. Advis. Rep.* 2018/027: 1-23.
- 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. 2020. 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.
-

-
- MPO. 2021. Évaluation des risques pour l'environnement et des risques indirects pour la santé humaine des bettas GloFishMD : trois lignées de poissons ornementaux transgéniques. Secr. can. de consult. sci. du MPO. Avis sci. 2021/046.
- Naiman, R.J., and Pister, E.P. 1974. Occurrence of the Tiger Barb, *Barbus tetrazona*, in the Owens Valley, California. Calif. Fish and Game. 60(2): 100-101.
- Nico, L., Fuller, P., Neilson, M., and Loftus, B. 2019. [Puntigrus tetrazona \(Bleeker, 1855\): U.S. Geological Survey, Nonindigenous Aquatic Species Database](#). [accessed 7/16/2019 2019].
- 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. doi:10.1016/j.anbehav.2011.12.029.
- Perdikaris, C., Koutsikos, N., Vardakas, L., Kommatas, D., Simonović, P., Paschos, I., Detsis, V., Vilizzi, L., and Copp, G.H. 2016. Risk screening of non-native, translocated and traded aquarium freshwater fishes in Greece using Fish Invasiveness Screening Kit. Fish. Manage. Ecol. 23(1): 32-43. doi:10.1111/fme.12149.
- Peterson, M.S., Slack, W.T., and Woodley, C.M. 2005. The occurrence of non-indigenous Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus) in coastal Mississippi, USA: ties to aquaculture and thermal effluent. Wetlands 25(1):112-121.
- Pethiyagoda, R., Meegaskumbura, M., and Maduwage, K. 2012. A synopsis of the South Asian fishes referred to *Puntius* (Pisces: Cyprinidae). Ichthyol. Explor. Fresh. 23: 69-95.
- Rainboth, W.J. 1996. Fishes fo the Cambodian Mekong. FAO species identification field guide for fishery purposes. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- 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). doi:10.1371/journal.pone.0207999.
- Range, I.L. 2013. Applicability of Fish Risk Assessment (FISK) to ornamental species. Departamento de Biologia Animal, Universidade de Lisboa, Lisbon, Portugal.
- 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.
- Ren, Q. 2015. Phylogenetics and evolution in select groups of cyprinid fishes from Asia and Africa (Teleostei: Cypriniformes). Graduate Faculty, Saint Louis University.
- 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. doi:10.1007/s10531-004-9663-9.
- 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. doi:10.1111/jfd.12044.
- Saillant, E., Wang, X., Ma, L., Gatlin III, D.M., Vega, R.R., and Gold, J.R. 2008. Genetic effects on tolerance to acute cold stress in red drum, *Sciaenops ocellatus* L. Aquacult. Res. 39(13): 1393-1398. doi:10.1111/j.1365-2109.2008.02008.x.

-
- Sakurai, A., Sakamoto, Y., and Mori, F. 1993. Aquarium fish of the world: the comprehensive guide to 650 species. Chronicle Books, San Francisco.
- Schaefer, J., and Ryan, A. 2006. Developmental plasticity in the thermal tolerance of zebrafish *Danio rerio*. J. Fish Biol. 69(3): 722-734. doi:10.1111/j.1095-8649.2006.01145.x.
- Shaffland, P.L., Gestring, K.B., and Stanford, M.S. 2008. Categorizing Introduced Fishes Collected from Public Waters. Southeastern Naturalist 7(4): 627-636. doi:10.1656/1528-7092-7.4.627.
- Sheriff, S.B.M.D. 1999. Colour inheritance in tiger barb (*Puntius tetrazona*). Faculty of Medicine and Health Sciences, Universiti Putra Malaysia.
- 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. doi:10.1577/03632415.2011.10389070.
- Takahashi, H., and Shimizu, M. 1983. Juvenile intersexuality in a cyprinid fish, the Sumatra Barb, *Barbus tetrazona tetrazona*. Bulletin of the Faculty of Fisheries Hokkaido University 34(2): 69-78.
- Taki, Y., Katsuyama, A., and Urushido, T. 1978. Comparative morphology and interspecific relationships of the cyprinid genus *Puntius*. Jap. J. Ichthyol. 25(1): 1-8.
- Tamaru, C.S., Cole, B., Bailey, R., and Brown, C. 1998. A manual for commercial production of the tiger barb, *Capoeta tetrazona*, a temporary paired tank spawner. Center for Tropical and Subtropical Aquaculture.
- Tan, H.H. 2012. *Systemus navjotsodhii*, a new cyprinid fish from Central Kalimantan, Borneo. Raff. Bull. Zool. 25: 285-289.
- 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., Ritch, J.L., Lawson, K.M., Lawson, L.L., and Hill, J.E. 2016. Variation in cold tolerance in escaped and farmed non-native green swordtails (*Xiphophorus hellerii*) revealed by laboratory trials and field introductions. Biol. Invasions. 18: 45-56. doi:10.1007/s10530-015-0988-y.
- Tuckett, Q.M., Ritch, J.L., Lawson, K.M., and Hill, J.E. 2017. Landscape-scale survey of non-native fishes near ornamental aquaculture facilities in Florida, USA. Biol. Invasions. 19(1): 223-237. doi:10.1007/s10530-016-1275-2.
- Vajargah, M.F., and Rezaei, H. 2015. Acute toxicity of trichlorophon on two ornamental fish: tiger barb (*Systemus tetrazona*) and glowlight tetra (*Hemigrammus erythrozonus*). J. Coast. Life Med. 3(2): 109-112. doi:10.12980/jclm.3.2015jclm-2014-0062.
- Welcomme, R.L. 1988. International introductions of inland aquatic species. FAO Fisheries Technical Paper 294. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

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. doi:10.1016/j.prevetmed.2007.04.007.

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. *Frontiers in Microbiology* 6: 607. doi:10.3389/fmicb.2015.00607.

Yanar, M., Erdoğan, E., and Kumlu, M. 2019. Thermal tolerance of thirteen popular ornamental fish Species. *Aquaculture*. 501: 382-386. doi:10.1016/j.aquaculture.2018.11.041.

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.