

---

## Etude de la prévalence de l'Anguillid herpesvirus 1 chez l'anguille européenne (*Anguilla anguilla*) au sein de cours d'eau wallons

**Auteur :** Philippart, Adèle

**Promoteur(s) :** Vanderplasschen, Alain

**Faculté :** Faculté de Médecine Vétérinaire

**Diplôme :** Master en médecine vétérinaire

**Année académique :** 2019-2020

**URI/URL :** <http://hdl.handle.net/2268.2/9600>

---

### *Avertissement à l'attention des usagers :*

*Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.*

*Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.*

---

**Etude de la prévalence de l'Anguillid herpesvirus 1 chez  
l'anguille européenne (*Anguilla anguilla*) au sein de cours  
d'eau wallons**

**Study of Anguillid herpesvirus 1 prevalence in European  
eels (*Anguilla anguilla*) of Walloon rivers**

**Adèle PHILIPPART**

**Travail de fin d'études  
présenté en vue de l'obtention du grade  
de Médecin Vétérinaire**

**ANNEE ACADEMIQUE 2018/2019**

**Le contenu de ce travail n'engage que son auteur**

**Etude de la prévalence de l'Anguillid herpesvirus 1 chez  
l'anguille européenne (*Anguilla anguilla*) au sein de cours  
d'eau wallons**

**Study of Anguillid herpesvirus 1 prevalence in European  
eels (*Anguilla anguilla*) of Walloon rivers**

**Adèle PHILIPPART**

**Tuteur : Alain Vanderplasschen,**

**Docteur en Médecine vétérinaire**

**Professeur ordinaire d'Immunologie à l'Université de Liège**

**Travail de fin d'études**

**présenté en vue de l'obtention du grade**

**de Médecin Vétérinaire**

**ANNEE ACADEMIQUE 2018/2019**

**Le contenu de ce travail n'engage que son auteur**

## Table des matières

1. Objectifs du travail et résumé
2. Remerciements
3. Introduction
  - 3.1. L'anguille européenne
    - 3.1.1. Biologie
    - 3.1.2. Importance économique
    - 3.1.3. Statut de l'anguille européenne
    - 3.1.4. Repeuplement
    - 3.1.5. Menaces
  - 3.2. L'anguillid herpesvirus 1
    - 3.2.1. Description
    - 3.2.2. Epidémiologie
    - 3.2.3. Pathogénie
    - 3.2.4. Diagnostic
    - 3.2.5. Traitement et prévention
4. Matériels et méthodes
  - 4.1. Anguilles européennes
  - 4.2. Prélèvement des échantillons
  - 4.3. Extraction d'ADN
  - 4.4. Mesure des concentrations en ADN et normalisation
  - 4.5. PCR quantitative
    - 4.5.1. Méthode
    - 4.5.2. Protocoles
    - 4.5.3. Réactifs
    - 4.5.4. Préparation de la plaque de 96 puits
5. Résultats
  - 5.1. Anguilles sauvages et échantillons
  - 5.2. Etalonnage
  - 5.3. Courbes standards cellulaires
  - 5.4. Courbes standards virales
  - 5.5. Analyses cellulaires ARNr 18S
  - 5.6. Analyses virales ORF57

6. Discussion et perspectives
7. Conclusion
8. Annexes
9. Références bibliographiques

## Résumé et objectif du travail

L'anguille européenne (*Anguilla anguilla*) est une espèce de poisson emblématique au cycle de vie catadrome encore mal compris. Depuis plusieurs décennies, la population d'anguille européenne est en déclin drastique et en voie critique d'extinction. En 2007, l'Union européenne a fait paraître le règlement CE 1100/2007 qui stipule que chaque État membre doit mettre en place des mesures afin d'œuvrer à la conservation de cette espèce. Parmi les mesures mises en place, le « repeuplement » est la méthode la plus réalisée pour la préservation des anguilles européennes. Cette méthode consiste à capturer des anguilles au stade civelle dans des estuaires pour les libérer au sein de rivières sélectionnées.

En mars 2017, le Laboratoire de Démographie des Poissons et d'Hydroécologie (LDPH) de l'Unité de biologie du comportement de l'Université de Liège a effectué un repeuplement en civelles de quelques cours d'eau belges. Un total de 76000 civelles, capturées dans le Sud-Ouest de la France, ont été transférées et libérées dans 6 rivières wallonnes. Des analyses réalisées sur le lot de civelles avant le repeuplement ont révélé qu'elles étaient négatives pour l'Anguillid herpesvirus 1.

L'Anguillid herpesvirus 1 (AngHV-1) est un des pathogènes majeurs de l'anguille européenne (Van Beurden *et al.*, 2012). Ce virus a été suggéré comme une des causes du déclin de cette espèce. Depuis mars 2017, une collaboration a été mise en place entre le Laboratoire d'Immunologie et Vaccinologie de la Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Liège (Prof. A. Vanderplasschen) et le LDPH afin de réaliser un suivi de la prévalence de l'AngHV-1 au sein de la population d'anguilles relâchée en mars 2017. L'objectif de ce travail de fin d'étude consiste à déterminer la prévalence de l'AngHV-1 chez les sujets recapturés en octobre 2019, soit 30 mois après le déversement des civelles dans les 6 cours d'eau wallons. En pratique, 40 anguilles ont été capturées et transférées au laboratoire. Après euthanasie, une autopsie a été réalisée et des prélèvements de 4 tissus (peau, pool d'organes internes, branchie et cerveau) ont été conservés pour analyses ultérieures pour la quantification du génome de l'AngHV-1 par PCR quantitative. Les résultats obtenus démontrent que 8 des 40 anguilles européennes testées étaient positives pour l'AngHV-1. La présence d'au moins une anguille positive pour l'AngHV-1 au sein de chaque cours d'eau testé suggère une prévalence élevée de ce virus au sein des rivières wallonnes.

Mots clés : anguille européenne, Anguillid herpesvirus 1

## Summary and aim of the work

The European eel (*Anguilla anguilla*) is an emblematic fish species with a catadromous life cycle that is still poorly understood. For several decades, the European eel population has been declining and is now critically endangered. In 2007, the European Union published Regulation EC 1100/2007, which stipulates that each Member State must establish measures to actively participate to the conservation of this species. Among these measures, "restocking" is the most adopted method for the preservation of the European eel. This method consists of capturing eels at the glass eel stage in estuaries for later release further inland.

In March 2017, the Fish Demography and Hydroecology team (LDPH) from the Behavioural Biology Unit at the University of Liège carried out a restocking of glass eels of some Belgian rivers. A total of 76,000 glass eels, originating from the southwestern France, were transferred and released in 6 Walloon rivers. Analyses performed on the batch of glass eels before restocking revealed that they were negative for Anguillid herpesvirus 1.

The Anguillid herpesvirus 1 (AngHV-1) is one of the major pathogens affecting European eels (Van Beurden *et al.*, 2012). It is thought to be one of the causes of eel population decline. Since March 2017, a collaboration has been set up between the team of Professor Alain Vanderplasschen (Laboratory of Immunology and Vaccinology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège) and the LDPH to monitor the prevalence of AngHV-1 in the eel population following the restocking that took place in March 2017. The goal of this master thesis consisted to determine the prevalence of AngHV-1 in recaptured subjects in October 2019, i.e. 30 months after the release of the glass eels in the 6 Walloon rivers. In practice, 40 eels were captured and transferred to the laboratory. After euthanasia, a necropsy examination was carried out and samples of 4 types of tissue (skin, pool of internal organs, gill and brain) were stored for subsequent analyses for quantification of AngHV-1 genome by quantitative PCR. The results obtained revealed that 8 of the 40 European eels tested were positive for AngHV-1. The detection of at least one positive eel for AngHV-1 in each tested river suggests a high prevalence of this virus in Walloon rivers.

Keywords: European eels, Anguillid herpesvirus 1

## 1. Introduction

### 1.1. L'anguille européenne

#### 1.1.1. Biologie

L'anguille européenne est un poisson du genre *Anguilla*, de l'espèce *anguilla*. L'anguille européenne fait partie de la famille des *Anguillidae*, situées dans l'ordre des Anguilliformes (EFSA, 2008).

Comme montré sur la figure 1, l'anguille européenne est un poisson catadrome, ce qui signifie qu'après avoir grandi dans les cours d'eau douces et saumâtres, elle effectue une migration océanique vers la mer afin de se reproduire (EFSA, 2008 ; Bandin *et al.*, 2014). Suite à l'éclosion des œufs, les larves leptocéphales quittent la mer des Sargasses et entament la traversée de l'Océan Atlantique, qui peut prendre jusqu'à 2 ans, probablement par migration passive grâce au courant du Gulf Stream. A leur arrivée aux côtes européennes, les larves se sont métamorphosées en civelles transparentes (EFSA, 2008 ; ICES, 2018). Ce stade est suivi par les stades civelle pigmentée et anguilette. Les anguillettes nagent à contre-courant vers les estuaires, les rivières, les lacs, les étangs et les marais, où elles deviennent des anguilles jaunes qui s'établissent pour 2 à 25 ans, voire plus. Après cette période, les anguilles jaunes se métamorphosent en anguilles argentées. Les mâles et les femelles, qui mesurent respectivement 40 cm et 60 cm en moyenne, entament la migration au travers de l'océan Atlantique pour aller se reproduire dans la mer des Sargasses, à environ 6000 km de l'Europe (EFSA, 2008 ; ICES, 2018). La durée de la migration a été évaluée à 6 mois (EFSA, 2008). Après la reproduction et la ponte, les anguilles argentées meurent (Tour du Valat, 2013). Leur mode de reproduction est encore inconnu à ce jour (EFSA, 2008 ; Van Beurden *et al.*, 2012).

#### 1.1.2. Importance économique

Deux secteurs de production commerciale d'anguilles existent en Europe : la pêche et l'aquaculture (ICES, 2018). Le mode de reproduction des anguilles n'étant pas encore connu, il ne peut pas être imité dans les conditions artificielles (Van Beurden *et al.*, 2012). Les anguilles utilisées en aquaculture proviennent par conséquent intégralement du milieu naturel (Van Beurden *et al.*, 2012 ; ICES, 2018). En 2017, l'aquaculture en Union européenne comptait 4546 tonnes d'anguilles ; les Pays-Bas et l'Allemagne étant les principaux pays producteurs. La France est également le principal producteur de civelles en termes de pêche, suivie par l'Angleterre, l'Espagne et le Portugal. Une partie des anguilles élevées en aquaculture et capturées lors des pêches dans le milieu naturel sont destinées aux plans de



repeuplement (Van Beurden *et al.*, 2012 ; Kullmann *et al.*, 2017 ; ICES, 2018 ; McConville *et al.*, 2018).

### 1.1.3. Statut de l'anguille européenne

A ce jour, l'anguille européenne est protégée à l'échelle mondiale et européenne par trois entités (Van Beurden *et al.*, 2012) : L'Union internationale pour la conservation de la nature (UICN), la Convention sur le commerce international des espèces de faune et de flore sauvages menacées d'extinction (CITES) (CITES, 2007) et le Conseil de l'Union européenne, via le règlement CE 1100/2007 (Conseil de l'Union européenne, 2007). Depuis 2007, l'UICN a conféré le statut « espèce en danger critique d'extinction » à l'anguille européenne (IUCN, 2020). Le règlement CE 1100/2007 établi par le Conseil de l'Union européenne stipule que chaque État membre doit mettre en place des mesures afin d'œuvrer activement à la conservation de l'espèce *Anguilla anguilla*. L'objectif de ces mesures sur le long terme est que le nombre d'anguilles européennes quittant l'Europe pour migrer vers la mer des Sargasses et s'y reproduire corresponde à 40% du nombre initial d'anguilles qui effectuerait ce trajet (Conseil de l'Union européenne, 2007).

### 1.1.4. Repeuplement

Le règlement CE 1100/2007 inclut la mise en place de plans de repeuplement en anguilles au sein des États membres (Conseil de l'Union européenne, 2007). Le repeuplement a pour but de transférer des anguilles d'un endroit densément peuplé vers un nouvel habitat naturel afin d'en accroître l'effectif en anguilles (ICES, 2018). En réponse au règlement CE 1100/2007, l'équipe de Démographie des Poissons et d'Hydroécologie de l'Unité de biologie du comportement de l'Université de Liège a effectué un repeuplement massif en civelles en mars 2017. Un total de 76000 civelles, prélevées dans des cours d'eau du Sud-Ouest de la France, ont été libérées dans les 6 rivières wallonnes suivantes : Oxhe, Gueule, Berwinne, Wayai, Hoegne et Winamplanche. En raison de l'absence d'obligations légales, aucune investigation n'a été effectuée avant le repeuplement afin de déterminer le statut sanitaire des civelles importées.

### 1.1.5. Menaces

Depuis les années 1980, l'effectif d'anguilles européennes diminue d'année en année, et on estime qu'il ne reste plus que 1 à 10% de la population d'anguilles recensée il y a 40 ans (Dekker et Casselman, 2014 ; Van Beurden *et al.*, 2012). Il y a de nombreuses causes

potentielles à cette décroissance massive, qui sont en grande partie anthropogéniques : surpêche, aquaculture, pollution des eaux, empêchement de la migration, destruction de la niche écologique, braconnage et marché noir (Van Ginneken et Maes, 2005 ; Belpaire *et al.*, 2009, 2016 ; Van Beurden *et al.*, 2012 ; Tour du Valat, 2013 ; Dekker et Casselman, 2014 ; Fédération du Nord pour la pêche et la protection du milieu aquatique, 2015 ; ICES, 2018 ; IUCN, 2020). Les changements climatiques (Van Ginneken et Maes, 2005 ; Dekker et Casselman, 2014) et l'amaigrissement des anguilles européennes adultes (Van Ginneken et Maes, 2005 ; Belpaire *et al.*, 2009) sont deux causes partiellement dues à l'homme. La prédation naturelle apparaît également comme l'une des causes de la dépopulation des anguilles européennes. Cela est notamment dû à la recrudescence du silure glane, abondamment introduit par l'homme en France (Fédération du Nord pour la pêche et la protection du milieu aquatique, 2015 ; Paz-Vinas et Santoul, 2018).

Les maladies infectieuses et parasitaires (Van Ginneken et Maes, 2005 ; Esteve et Alcaide, 2009 ; Van Beurden *et al.*, 2012 ; Bandin *et al.*, 2014) contribuent aussi de manière très probable au déclin de la population. *Anguillicola crassus*, un vers nématode infestant la vessie natatoire, est le principal parasite pathogène pour l'anguille européenne (Haenen *et al.*, 2010 ; Kullmann *et al.*, 2017). Les trois principaux virus affectant l'anguille européenne sont l'anguillid herpesvirus 1 (AngHV1), le rhabdovirus de l'anguille européenne X (Eel virus European X, EVEX) et l'aquabirnavirus de l'anguille européenne (Eel virus European, EVE) (Haenen *et al.*, 2012 ; Van Beurden *et al.*, 2012).

## 1.2. L'anguillid herpesvirus 1

### 1.2.1. Description

La découverte du génome complet de l'AngHV1 par Van Beurden *et al.*, en 2010, a permis de préciser la classification phylogénétique du virus, et par conséquent de situer l'AngHV1 dans l'ordre des *Herpesvirales*, dans la famille des *Alloherpesviridae*. Cette famille regroupe les herpesvirus des poissons et des amphibiens et appartient à l'ordre des *Herpesvirales* (Van Beurden, 2012). L'AngHV1 appartient précisément au genre *Cyprinivirus*. En outre, les virus les plus proches de l'AngHV1 en termes d'évolution sont les cyprinid herpesvirus 1, 2 et 3 (CyHV1, CyHV2 et CyHV3) (Van Beurden *et al.*, 2010), hautement pathogènes pour les carpes communes et koï (Boutier *et al.*, 2015).

La structure virale (figure 2) de l'AngHV1 se compose d'une nucléocapside icosaédrique d'un diamètre de 100 nm, composée de 162 capsomères creux. La nucléocapside contient et

protège le génome viral double brin, et est elle-même protégée par une couche composée de protéines, le tégument. L'enveloppe recouvre le tégument. Son diamètre peut aller de 120 à 260 nm. L'enveloppe contient les glycoprotéines virales (Van Beurden *et al.*, 2012). Van Beurden *et al.* (2011) ont caractérisé l'AngHV1 sur le plan moléculaire et ont découvert que l'AngHV1 contient 40 protéines structurales. Selon leurs recherches, 7, 11 et 22 de ces 40 protéines appartiennent respectivement à la capsid, à l'enveloppe et au tégument.

L'AngHV1 est un virus à ADN bicaténaire, linéaire non-segmenté (Van Beurden, 2012) et long de 249000 paires de base (249 kpb) (Van Beurden *et al.*, 2010). Le séquençage de l'entièreté du génome de l'AngHV1 a été réalisé par Van Beurden *et al.*, en 2010.

L'AngHV1, comme tous les herpesvirus, effectue une réplication intra-nucléaire au sein de la cellule-hôte (Thiry, 2014). Les gènes précoce-immédiats et précoces engendrent des enzymes nécessaires à la réplication virale. Les gènes précoces donnent également lieu à des protéines qui permettent l'assemblage du virion. Les protéines structurales sont issues des gènes précoce-tardifs et tardifs. Les gènes tardifs codent aussi pour les protéines non-structurales (Van Beurden *et al.*, 2013 ; Thiry, 2014).

### 1.2.2. Epidémiologie

L'AngHV1 a déjà été mis en évidence dans beaucoup de pays européens (figure 3), aussi bien en aquaculture que dans le milieu naturel (Jakob *et al.*, 2009 ; Kempter *et al.*, 2014). A ce jour, l'AngHV1 a été détecté chez des anguilles européennes dans les pays européens suivants : Pays-Bas (Davidse *et al.*, 1999 ; Haenen *et al.*, 2002, 2010 ; Van Ginneken *et al.*, 2004 ; Van Beurden *et al.*, 2012), Allemagne (Scheinert et Baath, 2006 ; Jakob *et al.*, 2009 ; Kullmann *et al.*, 2017), Grèce (Varvarigos *et al.*, 2011), Angleterre (Armitage *et al.*, 2013), Espagne (Bandin *et al.*, 2014) et Pologne (Kempter *et al.*, 2014 ; Nguyen *et al.*, 2016). L'AngHV1 a également été trouvé en Corée du Sud grâce aux recherches de Kim *et al.* (2012) sur des anguilles japonaises. De plus, à Taiwan, Chang *et al.* (2002) ont isolé un virus semblable à l'AngHV1 sur le plan génétique à partir d'anguilles européennes. Aucune donnée n'a encore été publiée quant à la présence de l'AngHV1 en Belgique.

L'AngHV1 est un virus hôte-spécifique, ce qui signifie qu'il ne peut infecter que certaines espèces auxquelles il est adapté (Davidse *et al.*, 1999 ; Van Beurden *et al.*, 2012), à savoir l'anguille européenne, *Anguilla anguilla*, l'anguille japonaise, *Anguilla japonica* (Van Beurden, 2012) et l'anguille américaine, *Anguilla rostrata* (Kempter *et al.*, 2014). Il a été

démontré que la probabilité qu'une anguille soit infectée par l'AngHV1 augmente avec sa taille (Kullmann *et al.*, 2017).

Le stress est probablement un des plus importants facteurs pouvant induire la réactivation de l'état latent ou la primo-infection de l'AngHV1 (Van Nieuwstadt *et al.*, 2001). Parmi les sources de stress présentes en aquaculture, on considère les variations de la qualité et de la température de l'eau, les changements d'environnement et de congénères, la densité de population abondante, l'alimentation inadéquate et les lésions dues aux contacts sociaux (Haenen *et al.*, 2002 ; EFSA, 2008 ; Van Beurden *et al.*, 2012). Des températures de l'eau comprises entre 20 et 26°C sont favorables à la réplication du virus (Haenen *et al.*, 2009). L'abaissement de la température sous 22°C en aquaculture est donc fortement recommandé (Haenen *et al.*, 2002). L'infection par le parasite *Anguillicola crassus* (Haenen *et al.*, 2010 ; Van Beurden *et al.*, 2012 ; Kullmann *et al.*, 2017), les contaminations par les PCB (Haenen *et al.*, 2009) et la traversée de l'Océan Atlantique vers la mer des Sargasses (Haenen *et al.*, 2009 ; Van den Thillart *et al.*, 2009) peuvent également être des facteurs de propagation/réactivation de l'AngHV1 car ils induisent tous trois une immunosuppression importante.

### 1.2.3. Pathogénie

A l'heure actuelle, peu de données ont été publiées sur la pathogénie de l'AngHV1. Pour pallier ce manque, le laboratoire d'immunologie et vaccinologie du Professeur Alain Vanderplasschen (Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège) a développé un projet qui vise à étudier l'infection de l'AngHV1 chez son espèce cible, l'anguille européenne. Grâce à une technique d'imagerie *in vivo* basée sur la bioluminescence, la porte d'entrée, ainsi que les différents modes de transmission, ont été mis en évidence.

L'infection par l'AngHV1 se caractérise par deux phases distinctes : la phase aiguë, qui correspond à la primo-infection, et la phase chronique. Une période d'incubation, dont la durée n'est pas encore connue, précède la phase aiguë. La phase aiguë est marquée par des signes cliniques, un taux de morbidité élevé (Davidse *et al.*, 1999) et l'excrétion virale dans le milieu environnant (Thiry, 2014). La mortalité survient dans 0 à 10% des cas (Davidse *et al.*, 1999 ; Haenen *et al.*, 2002 ; Van Beurden *et al.*, 2012). Les conditions de vie stressantes font grimper le taux de mortalité (Haenen *et al.*, 2009), parfois même jusque 50% (Kempter *et al.*, 2014). La phase chronique est caractérisée par un portage latent asymptomatique (van Nieuwstadt *et al.*, 2001 ; Haenen *et al.*, 2002 ; Van Beurden, 2012), avec le virus qui persiste

dans les cellules de l'hôte sous forme d'épisomes (Thiry, 2014). Une réactivation virale peut survenir, notamment en cas de soumission au stress (Van Nieuwstadt *et al.*, 2001), et est associé à une nouvelle excrétion du virus (Thiry, 2014).

Durant la phase aigüe, l'apathie est fréquemment observée (Haenen *et al.*, 2002 ; Van Beurden *et al.*, 2012). Les lésions externes liées à cette phase sont l'érythème, les pétéchies, les lésions hémorragiques, les ulcères et l'hyperhémie sur la peau, les nageoires et les branchies (Sano *et al.*, 1990 ; Davidse *et al.*, 1999 ; Haenen *et al.*, 2002 ; Chang *et al.*, 2002 ; Van Ginneken *et al.*, 2004). A l'autopsie, les viscères montrent des saignements, de l'hyperhémie, de l'hypertrophie et de la distension (Davidse *et al.*, 1999 ; Haenen *et al.*, 2002 ; Van Beurden *et al.*, 2012). Le foie est le viscère abdominal le plus fréquemment atteint (Van Beurden *et al.*, 2012). L'absence de lésions est possible, notamment chez les individus en phase chronique de la maladie (Jakob *et al.*, 2009).

#### 1.2.4. Diagnostic

Il est difficile de détecter l'infection par l'AngHV1 chez l'anguille européenne à partir des signes cliniques car le tableau clinique se retrouve aussi chez EVE et EVEX (Van Beurden *et al.*, 2012), et parce que les individus infectés par l'AngHV1 peuvent être cliniquement sains (Van Nieuwstadt *et al.*, 2001 ; Haenen *et al.*, 2002 ; Jakob *et al.*, 2009). La microscopie électronique (Davidse *et al.*, 1999 ; Haenen *et al.*, 2002 ; Varvarigos *et al.*, 2011) permet l'observation des virions et de la morphologie typique des herpesvirus mais ne permet pas de confirmer l'espèce virale. Parmi les méthodes d'immunohistochimie, on retrouve le test immuno-peroxydase (Davidse *et al.*, 1999), le test d'immunofluorescence indirecte (Varvarigos *et al.*, 2011) et l'ELISA indirect (Van Nieuwstadt *et al.*, 2001). Le génie génétique regroupe entre autres la PCR quantitative (Van Beurden *et al.*, 2016), la PCR conventionnelle (Rijsewijk *et al.*, 2005), l'hybridation in situ (Shih *et al.*, 2003) et le typage grâce à l'enzyme de restriction HindIII (Haenen *et al.*, 2002).

Le test de référence pour le diagnostic de l'AngHV1 est la Polymérase Chain Reaction (PCR), soit standard (Rijsewijk *et al.*, 2005), soit quantitative (Van Beurden *et al.*, 2016). Il s'agit d'une technique qui permet de détecter une séquence particulière au sein d'un segment d'ADN grâce à l'amplification de celle-ci. Cette séquence d'intérêt amplifiée par PCR est appelée amplicon ou produit de PCR (Bio-Rad Laboratories Inc., 2006). La PCR quantitative (qPCR) permet la quantification des produits de PCR grâce à la détection de la fluorescence émise lors de chaque synthèse d'un nouvel amplicon. La qPCR est une technique très sensible

et spécifique (Bio-Rad Laboratories Inc., 2006 ; Van Beurden *et al.*, 2016) qui donne un résultat à la fois qualitatif et quantitatif (Bio-Rad Laboratories Inc., 2006).

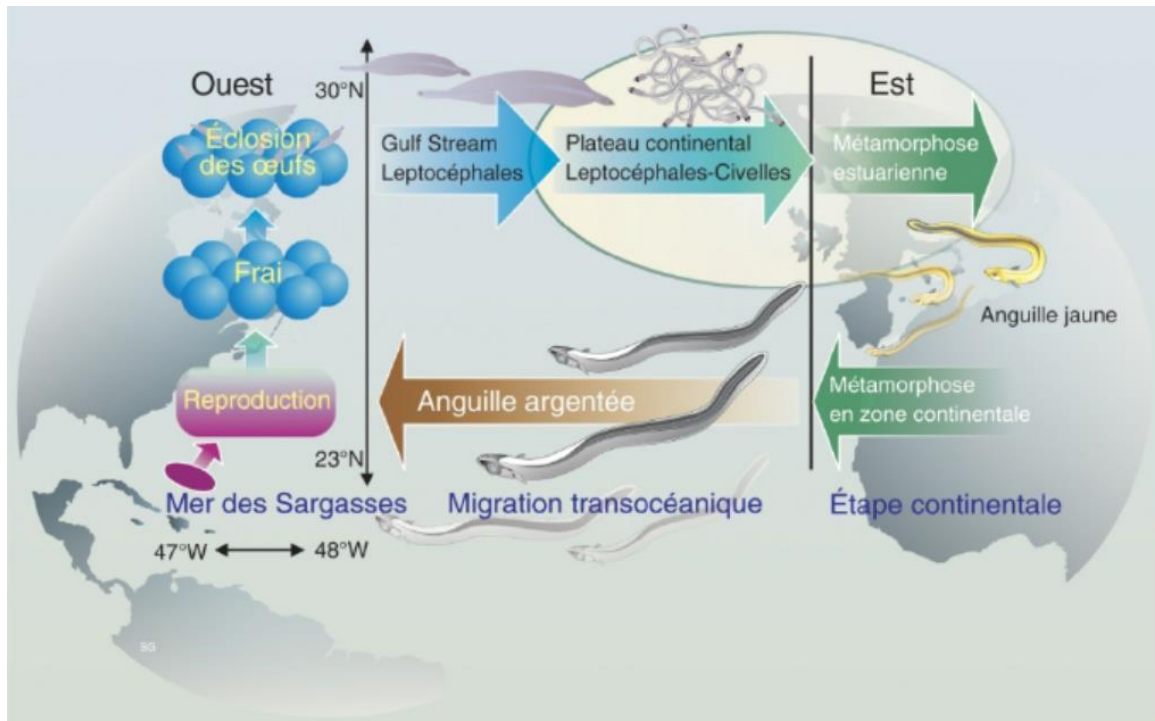
Le laboratoire du Pr. Alain Vanderplasschen a développé deux PCR quantitatives distinctes mais complémentaires afin de réaliser le diagnostic de l'AngHV1 sur des anguilles européennes. Une PCR quantitative, ci-après nommée « cellulaire » vise à mettre en évidence un gène spécifique de l'anguille européenne, qui code pour l'ARNr 18S *Anguilla anguilla* (Frankowski *et al.*, 2010). L'ARN ribosomique 18S est un des constituants d'une des 2 sous-unités ribosomiques. Le diagnostic par PCR quantitative de l'infection par l'AngHV1, nommé analyse virale, se base sur la détection d'un gène spécifique de l'AngHV1, l'ORF57, qui code pour la protéine structurale CapProt06 (Van Beurden *et al.*, 2011, 2016). La CapProt06 est une protéase de capsid et protéine d'échafaudage. La réalisation en parallèle de l'analyse cellulaire et virale sur un même échantillon permet d'établir un ratio, c'est à dire une charge virale par nombre de copie de gène cellulaire de l'anguille.

Ces deux analyses qPCR sont basées sur la méthode de détection TaqMan. Cette méthode emploie l'ADN Taq polymérase et une sonde TaqMan marquée par le fluorophore 6-carboxyfluorescéine (FAM). La fluorescence détectée provient de l'émission de la sonde lorsqu'elle est dégradée par l'activité exonucléase de l'ADN Taq polymérase, au moment où cette dernière effectue la synthèse de l'amplicon (Bio-Rad Laboratories Inc., 2006 ; Sawakinome, 2019). Plus un échantillon contient de copies d'un fragment d'intérêt par  $\mu\text{L}$ , plus le signal fluorescent (figure 4) émis par cet échantillon est important, plus ce signal est détecté rapidement dans les cycles d'amplification. Une valeur de Cq est donc d'autant plus faible que la concentration en fragments d'intérêt est élevée (Bio-Rad Laboratories Inc., 2006).

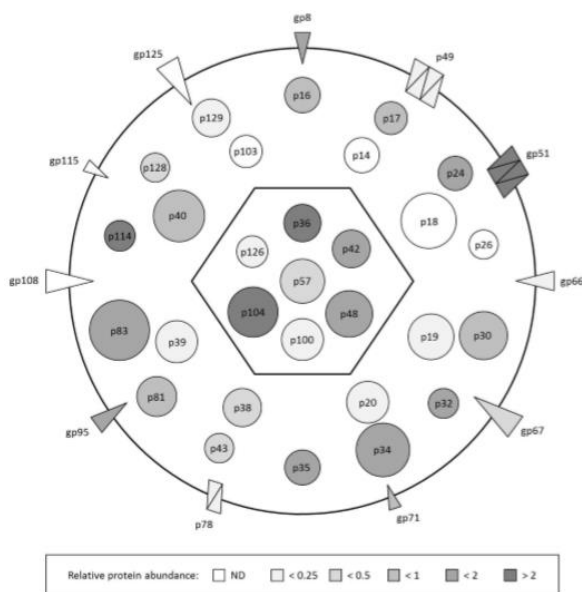
Les analyses qPCR réalisées se basent sur une amplification du fragment d'intérêt en 39 cycles. Le nombre de cycles Cq (figure 4) correspond au nombre de cycles pour lequel le signal fluorescent de l'échantillon passe au-dessus du seuil de détection de la fluorescence (Bio-Rad Laboratories Inc., 2006). Le logiciel considère qu'un échantillon est négatif (Non applicable ; N/A) si aucun amplicon n'a été produit après les 39 cycles, autrement dit si l'échantillon n'émet pas de signal fluorescent.

#### 1.2.5. Traitement et prévention

Aucun traitement fiable et efficace n'est disponible dans le commerce à ce jour (Van Beurden *et al.*, 2012). Le contrôle de la température de l'eau peut s'avérer efficace pour diminuer les signes cliniques dus à l'infection par l'AngHV1 (Haenen *et al.*, 2002).



**Fig. 1.** Cycle biologique et stades de développement de l'anguille européenne. 47°W, 48°W, 23°N et 30° sont les coordonnées géographiques de la Mer des Sargasses (Adam et al 2008, dessin par S. Gros).

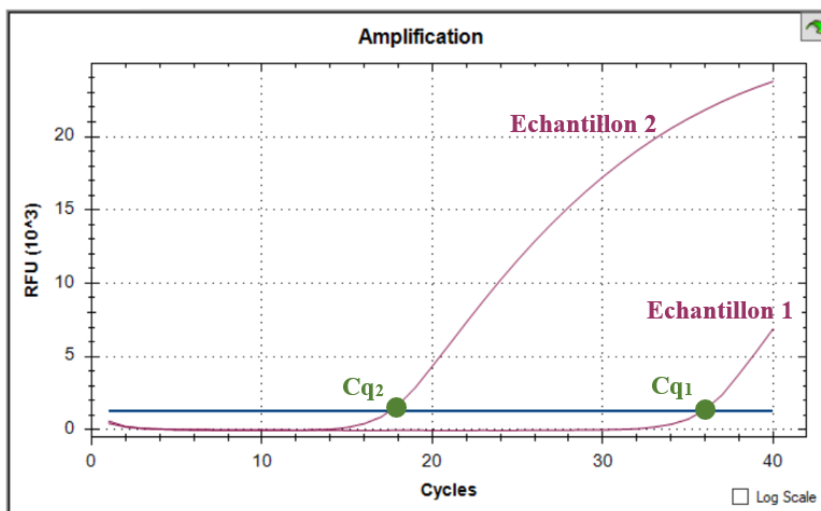


**Fig. 2.** Structure virale. Le grand cercle, l'hexagone, l'espace entre les deux, les triangles et les ronds colorés par diverses nuances de gris représentent respectivement l'enveloppe, le

tégument, la capside, les glycoprotéines de surface (gp) et les protéines (p). ND signifie « non déterminé ». (Van Beurden *et al.*, 2011).



**Fig. 3.** Carte montrant par des points rouges les pays où l'anguillid herpesvirus 1 a été détecté de 1999 à 2017 (Carte du monde vierge. Wikipédia, 2020. Annotations par Philippart A.).



**Fig. 4.** La courbe d'amplification représente la fluorescence (unité de fluorescence relative, RFU) d'un échantillon au cours des cycles de la PCR quantitative. La ligne bleue correspond au seuil de détection de la fluorescence, les courbes mauves représentent les signaux fluorescents des échantillons 1 et 2 et Cq<sub>1</sub> (Cq<sub>2</sub>) correspond au nombre de cycles pour lequel le signal fluorescent de l'échantillon 1 (2) dépasse le seuil de détection de la fluorescence.



## Matériels et méthodes

### Anguilles européennes

Les animaux utilisés pour la présente étude sont des anguilles européennes sauvages originaires de 6 cours d'eau wallons et appartenant à une population issue d'un repeuplement en civelles réalisé en mars 2017 par l'équipe de Démographie des Poissons et d'Hydroécologie (ULiège).

En septembre et octobre 2019, soit 30 mois après le repeuplement, 8 pêches électriques ont été réalisées dans 6 cours d'eau wallons, sur 8 sites initialement sélectionnés pour ce repeuplement : Oxhe, Gueule, Berwinne, Wayai, Hoegne et Winamplanche (figure 5). Les cours d'eau Wayai et Berwinne sont chacun représentés par 2 sites distincts. A chaque recapture, 5 anguilles ont été prélevées pour les analyses, ce qui représente un total de 40 anguilles.

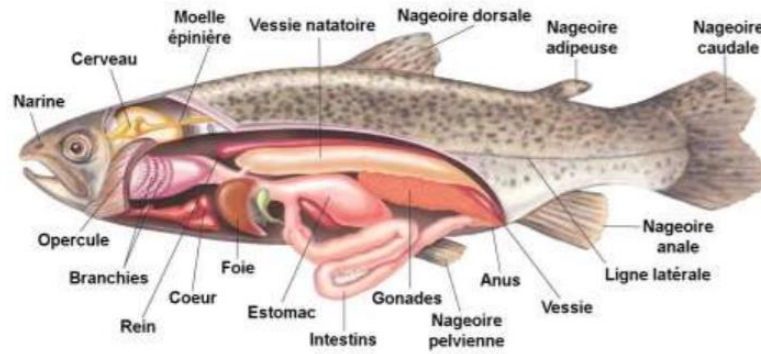


**Fig. 5.** Carte des alentours de Liège indiquant les sites de recapture des 40 anguilles : Oxhe, Gueule, Berwinne, Wayai, Hoegne et Winamplanche, indiqués respectivement par les pastilles orange, jaune, rouge, bleue, verte et mauve. Google Maps, 2019. Annotations : Philippart A.

### Prélèvement des échantillons

Après recapture dans le milieu naturel, les anguilles sont transférées au laboratoire et euthanasiées dans un bain létal de benzocaïne (1%). Chaque anguille est pesée et mesurée (voir tableau en annexe) avant de procéder à la dissection et au prélèvement des échantillons. Un examen général externe et interne est réalisé afin de notifier la présence de lésion ou parasite. Une attention particulière est portée sur la vessie natatoire (figure 6) pour détecter

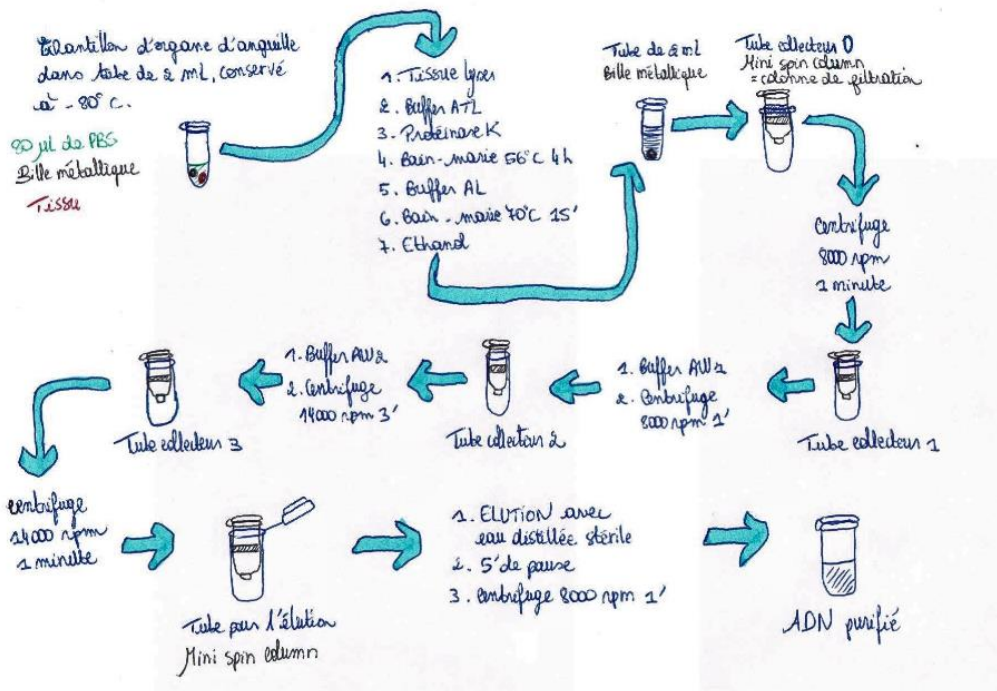
l'éventuelle présence d'*Anguillicola crassus*. Les quatre tissus suivants ont été prélevés sur chacune des 40 anguilles de repeuplement : peau, pool d'organes internes (cœur, rate et foie), arc branchial et cerveau (figure 6). La quantité maximale de tissu par échantillon est 30 mg. Chaque tissu est transféré dans un tube contenant 80  $\mu$ L de phosphate buffered saline (PBS) et une bille métallique Qiagen. L'étude porte sur un total de 160 échantillons.



**Fig. 6.** Anatomie du poisson. Campbell Biologie, 2012.

#### Extraction d'ADN

L'extraction d'ADN des tissus prélevés (figure 7) a été réalisée à l'aide du kit QIAamp DNA Mini Kit (250) de Qiagen, suivant le protocole fourni (QIAamp DNA mini and blood mini handbook, Qiagen, 2016). Ce kit contient tous les réactifs nécessaires à l'extraction d'ADN (figure 7). Un blanc d'extraction, ne contenant pas de tissu d'anguille, est préparé pour chaque lot d'échantillons.



**Fig. 7.** Schéma des étapes de l'extraction d'ADN des échantillons tissulaires prélevés sur les 40 anguilles de repeuplement. Rpm : rotations par minute. Schéma réalisé par Philippart A sur base du protocole QIAamp DNA mini and blood mini handbook (Qiagen, 2016).

#### Mesure des concentrations en ADN et normalisation

La mesure de la concentration en acides nucléiques (en ng/µL) des échantillons a été réalisée avec le Spectrophotomètre NanoDrop ND-1000 et le logiciel informatique ND-1000-V3.8.1. Deux rapports d'absorbance, 260/280 et 260/230, sont fournis, et permettent de vérifier l'absence de contamination des échantillons (Thermo Fisher Scientific Inc., 2016 ; Ozyme, 2019). Le tableau des valeurs de concentration en acides nucléiques et des ratios 260/280 et 260/230 des échantillons, ainsi que le tableau expliquant la signification des deux rapports d'absorbance, sont disponibles en annexe. Préalablement à l'analyse qPCR, les échantillons sont normalisés à 50 ng/µL, afin qu'ils soient tous analysés pour la même quantité d'acides nucléiques lors de la qPCR. Une concentration comprise entre 45 et 55 ng/µL est tolérée.

#### PCR quantitative

##### Méthode

Pour rappel, deux qPCR sont réalisées grâce à la méthode TaqMan. L'analyse cellulaire permet la détection du gène codant pour l'ARNr 18S. Le diagnostic de l'infection est obtenu par l'analyse virale, qui permet la mise en évidence de l'ORF57.

## Protocoles

La machine Bio-Rad CFX96 et le logiciel informatique Bio-Rad CFX Manager sont employés. Le protocole de la qPCR cellulaire débute par 30 minutes de préchauffage à 48°C. L'étape suivante est la dénaturation 10 minutes à 95°C. Ensuite, l'hybridation des amorces se déroule à 95°C et dure 15 secondes. Enfin, l'élongation a lieu à 60°C durant 1 minute (Sunarto et al., 2014). Le protocole de la qPCR virale démarre par 10 minutes de préchauffage à 37°C. La dénaturation se déroule ensuite en 10 minutes à 95°C. Puis, l'hybridation des amorces dure 15 secondes à 95°C. Enfin, l'élongation a lieu à 60°C durant 30 secondes (Van Beurden et al., 2016). Pour les deux protocoles, les étapes d'hybridation des amorces et d'élongation forment un cycle qui se répète 39 fois.

## Réactifs

La mise en évidence des fragments d'intérêt viral et cellulaire est permise par l'utilisation de 2 amorces forward et reverse et d'une sonde marquée par un quencher et le fluorophore 6-carboxyfluorescéine (FAM). Pour l'analyse cellulaire, les 2 amorces 18S rRNA F (20 pb) et 18S rRNA R (18 pb) ont respectivement pour séquence 5'-CGG-CTA-CCA-CAT-CCA-AGG-AA-3' et 5'-GCT-GGA-ATT-ACC-GCG-GCT-3' (Sunarto et al., 2014). La séquence de la sonde 18S rRNA P (22 pb) est 5'-6FAM-TGC-TGG-CAC-CAG-ACT-TGC-CCT-C-BHQ-1-3' (Sunarto et al., 2014). Concernant l'analyse virale, l'amorce F, nommée AngHV1.CapProt. F06 (21 pb), a pour séquence 5'-TGC-TCT-TGG-AGT-CGG-TTG-ATG-3' et l'amorce R, ou AngHV1.CapProt. R06 (23 pb), a pour séquence 5'-CCG-TGT-GGG-AAA-AGA-CTA-TTT-GA-3' (Van Beurden et al., 2016). La sonde AngHV1.CapProt. p06 contient la séquence de 22 bases 5'-6FAM-TCT-GAA-AAC-CCG-CTC-GCC-CTG-A-BHQ1-3' (Van Beurden et al., 2016). L'ADN polymérase iTaq « hot-start », les nucléotides dNTP et les tampons adaptés sont directement prélevés au départ du mélange iQ Supermix Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories Inc., 2019). L'ADN template est l'ADN des échantillons à analyser par les qPCR cellulaire et virale.

**Tableau I.** Préparation de la plaque de 96 puits. Dosages des réactifs employés pour les PCR quantitatives cellulaire et virale.

Réactifs	[Départ]	[Finale]	1 puit (µL)	96 puits (µL)
Eau distillée stérile	-	Jusque 20 µL	5,5	528

Amorce forward	10 $\mu$ M	100 nM	0,5	48
Amorce reverse	10 $\mu$ M	100 nM	0,5	48
Sonde FAM	10 $\mu$ M	200 nM	1	96
iQ Supermix Bio-Rad	-	2x	12,5	1200
Volume total du mix	-	-	20	1920
Volume ADN template	-	-	5	-
Volume final	-	-	25	-

La référence de l'eau distillée stérile est UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water, Invitrogen. La sonde FAM désigne la sonde marquée par le fluorophore 6-carboxyfluorescéine. [Départ] et [Finale] signifient les concentrations de chacun des réactifs respectivement avant et après dilution avec l'eau distillée stérile.

Les ADN template, ou ADN à tester par qPCR (tableau I), sont les 160 échantillons issus des 40 anguilles de repeuplement ainsi que les contrôles (blancs d'extraction, no template contrôle (NTC ou blank) et contrôles qPCR positif et négatif). La courbe d'étalonnage, réalisée à chaque qPCR, est élaborée sur base de 8 échantillons standards cellulaires ou viraux de concentrations connues : ces 8 échantillons correspondent chacun à une dilution allant de  $10^8$  à  $10^1$  copies d'ARNr 18S ou de CapProt06 par  $\mu$ L.

Les 160 échantillons d'anguilles de repeuplement sont analysés en triplicatas. Les courbes d'étalonnage ainsi que les contrôles sont réalisés en duplicatas.

## 1. Résultats

### 1.1. Anguilles sauvages et échantillons

Au cours de cette étude, 40 anguilles sauvages issues de la campagne de repeuplement de mars 2017 ont été sélectionnées pour déterminer la prévalence de l'AngHV-1. Le poids moyen de ces anguilles était de 26,49 g, et leur taille était en moyenne de 23,63 cm (voir tableau en annexe). La plus petite anguille mesurait 10,9 cm pour un poids de 1,7 g. La plus grande anguille faisait quant à elle 36,5 cm et pesait 76,4 g. Elles provenaient respectivement des cours d'eau Oxhe et Berwinne. Les examens généraux des anguilles n'ont mis en évidence aucune lésion interne évidente. De plus, l'examen de la vessie natatoire en vue de rechercher la présence du parasite nématode *Anguillicola crassus* s'est révélé négatif chez toutes les anguilles. Seules des lésions mineures (compatibles avec des interactions interspécifiques) ont été mises en évidence sur la peau de certains individus. Pour chaque anguille, un échantillon de branchies, un pool d'organes internes (cœur, rate, foie), de cerveau et de peau a été sélectionné pour analyse par qPCR ultérieure.

### 1.2. Etalonnage

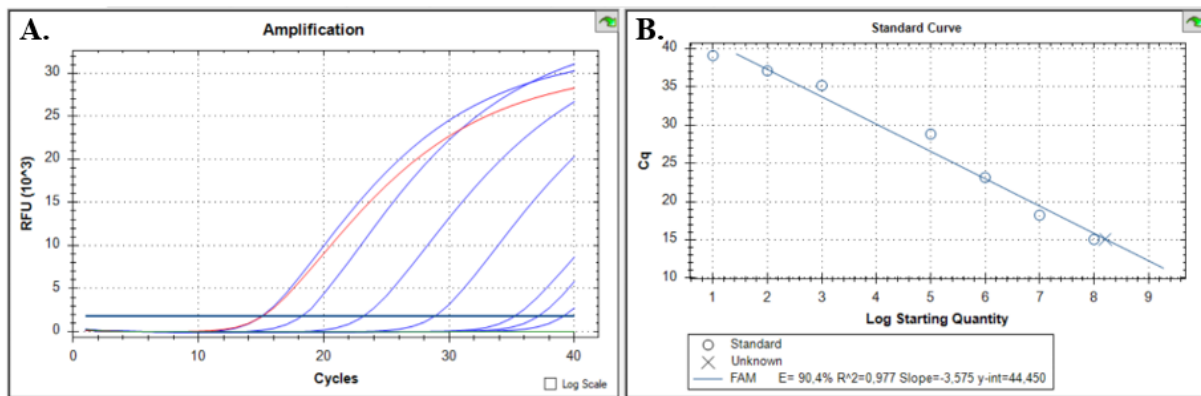
L'ensemble des résultats de qPCR ainsi que les graphiques présentés ci-dessous ont été analysés à l'aide du logiciel Bio-Rad CFX Manager. Etant donné le nombre important d'échantillons à analyser en triplicatas, les analyses cellulaires et virales ont chacune nécessité 7 plaques. Afin d'uniformiser ces analyses, un seuil moyen de détection de la fluorescence a été fixé en réalisant une moyenne des seuils de détection de la fluorescence de toutes les courbes d'amplification. Les seuils moyens cellulaire et viral sont respectivement 1800,07 et 885,24. L'ajustement des seuils cellulaires et viraux fait légèrement varier les valeurs SQ et Cq, sans différence significative.

L'analyse par la qPCR des 8 échantillons standards de concentrations connues en gène codant pour l'ARNr 18S ou en ORF57 permet d'obtenir les 8 courbes standards cellulaires ou virales. Ces courbes permettent d'étalonner les résultats des échantillons de concentrations inconnues « unknown », à savoir les 160 échantillons d'anguilles, les contrôles positif et négatif et le NTC (Bio-Rad Laboratories Inc., 2006).

Trois critères permettent de s'assurer que les échantillons standards fournissent un étalonnage correct (Bio-Rad Laboratories Inc., 2006). Le premier est l'équidistance entre les standards. Les 8 standards doivent être espacés par le même nombre de cycles Cq (également noté Ct).

Cela se vérifie sur la courbe d'amplification, sur la droite d'étalonnage et dans le tableau des SQ et des Cq. Le second critère est la linéarité de la droite d'étalonnage. Les points correspondant aux 8 standards (valeurs observées) sont sensés se superposer au maximum à la droite (valeurs attendues). Plus les points sont proches de la droite, plus le coefficient de détermination  $R^2$  s'approche de 1. Le dernier critère est l'efficacité de l'amplification E. E doit s'approcher au maximum de 100%, ce qui signifie que le nombre d'amplicons a exactement doublé lors de chacun des 39 cycles.

### 1.3. Courbes standards cellulaires



**Fig. 8.** Analyse des échantillons standards cellulaires ARNr 18S. **8.A.** Courbe d'amplification représentant la fluorescence (RFU) des échantillons standards ARNr 18S (courbes bleues) et du contrôle positif (courbe rouge) au cours des cycles de la PCR quantitative cellulaire. Le NTC (vert) est négatif pour l'ARNr 18S. **8.B.** Droite d'étalonnage des échantillons standards cellulaires (o) représentant le nombre de cycles Cq en fonction de leur valeur quantitative (SQ) attendue (en log). La croix (x) représente le contrôle positif (Cq = 15,10).

La figure 8.A. montre les courbes standards obtenues lors de l'analyse cellulaire des échantillons 89 à 112. Il s'agit des courbes standards correspondant à un des deux réplicas des 8 échantillons standards cellulaires. La figure 8.A. représente la courbe d'amplification, c'est-à-dire la quantité de fluorescence détectée RFU (unité de fluorescence relative) en fonction du nombre de cycles Cq pour chaque échantillon (Bio-Rad Laboratories Inc., 2006).

La courbe d'étalonnage pour l'analyse cellulaire est définie par 8 échantillons standards dont le plus concentré (représenté par la courbe la plus à gauche sur la figure 8.A.) correspond à  $10^8$  copies du fragment d'intérêt codant pour l'ARNr 18S/ $\mu$ L et le moins concentré (représenté par la courbe la plus à droite sur la figure 8.A.) correspond à 10 copies/ $\mu$ L. Le signal fluorescent du contrôle positif dépasse le seuil de détection de la fluorescence à un

nombre faible de cycles ( $Cq = 15,10$ ) car sa concentration en gène codant pour l'ARNr 18S est élevée ( $SQ = 1,616 \cdot 10^8$  copies/ $\mu$ L). L'échantillon « no template control » ne dépasse pas le seuil de détection, ce qui confirme le fait que le NTC ne contient pas d'ADN.

La figure 8.B. représente la droite d'étalonnage, c'est-à-dire le nombre de cycles  $Cq$  en fonction du logarithme de  $SQ$  (Log Starting Quantity). Le tableau II expose les  $Cq$  obtenus ainsi que les  $SQ$  des échantillons standards et contrôles utilisés pour l'analyse cellulaire. La valeur quantitative  $SQ$  représente le nombre de copies du fragment d'intérêt par  $\mu$ L, autrement dit la concentration en fragments d'intérêt de chacun des échantillons (Bio-Rad Laboratories Inc., 2006). Les standards cellulaires employés correspondent aux valeurs attendues. Il est cependant à noter que l'échantillon standard 4, attendu à  $10^4$  copies/ $\mu$ L, a rapporté un  $Cq$  erroné inapproprié. L'exclusion de cet échantillon permet d'obtenir un étalonnage de meilleure qualité tout en gardant un nombre correct d'échantillons standards. En effet, l'espacement entre chaque standard est caractérisé par approximativement le même nombre de cycles (tableau II). De plus, l'efficacité de l'amplification  $E$  vaut 90,4 %, et le coefficient de détermination  $R^2$  est égal à 0,977 (figure 8.B.).

**Tableau II.** Valeurs  $SQ$  et  $Cq$  de l'analyse cellulaire des standards, contrôle positif et NTC.

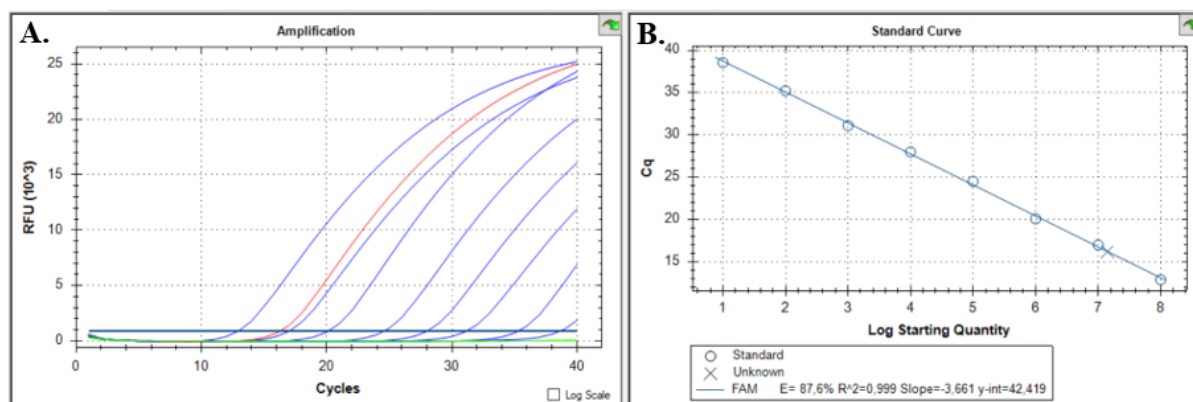
<b>Echantillons</b>	<b>SQ</b>	<b>Cq</b>
<b>Standard 1</b>	$10^1$	39,12
<b>Standard 2</b>	$10^2$	37,12
<b>Standard 3</b>	$10^3$	35,21
<b>Standard 5</b>	$10^5$	28,84
<b>Standard 6</b>	$10^6$	23,17
<b>Standard 7</b>	$10^7$	18,23
<b>Standard 8</b>	$10^8$	15,06
<b>Contrôle positif</b>	$1,616 \times 10^8$	15,10
<b>No template control</b>	Non applicable	Non applicable

La valeur quantitative  $SQ$  représente le nombre de copies du gène codant pour l'ARNr 18S par  $\mu$ L. La  $Cq$  représente le nombre de cycles pour lequel le signal de l'échantillon passe au-dessus du seuil de détection de la fluorescence. « Non applicable » (N/A) signifie qu'il n'y a pas eu d'amplification du gène de l'ARNr 18S au cours des 39 cycles.



#### 1.4. Courbes standards virales

La figure 9.A. montre la courbe d'amplification des 8 échantillons standards viraux. Les explications relatives à la figure 8.A. s'appliquent à la figure 9.A.. L'étalonnage par les échantillons standards est de bonne qualité. Les standards sont espacés équitablement les uns des autres par 3,67 cycles en moyenne (tableau III). L'efficacité de l'amplification E et le coefficient de détermination  $R^2$  valent respectivement 87,6% et 0,999 (figure 9.B.).



**Fig. 9.** Analyse des échantillons standards viraux AngHV-1 ORF57. **9.A.** Courbe d'amplification de la fluorescence (RFU) des échantillons standards viraux (courbes bleues) et du contrôle positif (courbe rouge) au cours des cycles de la qPCR virale. Le contrôle négatif (jaune) et le NTC (vert) sont négatifs pour l'ORF57. **9.B.** Droite d'étalonnage des échantillons standards viraux (o). Le nombre de cycles Cq est rapporté à la valeur quantitative (SQ) attendue de chaque échantillon standard. La croix (x) représente le contrôle positif (Cq = 16,25).

**Tableau III.** Valeurs SQ et Cq de l'analyse virale des 8 échantillons standards, des contrôles positif et négatif et du NTC.

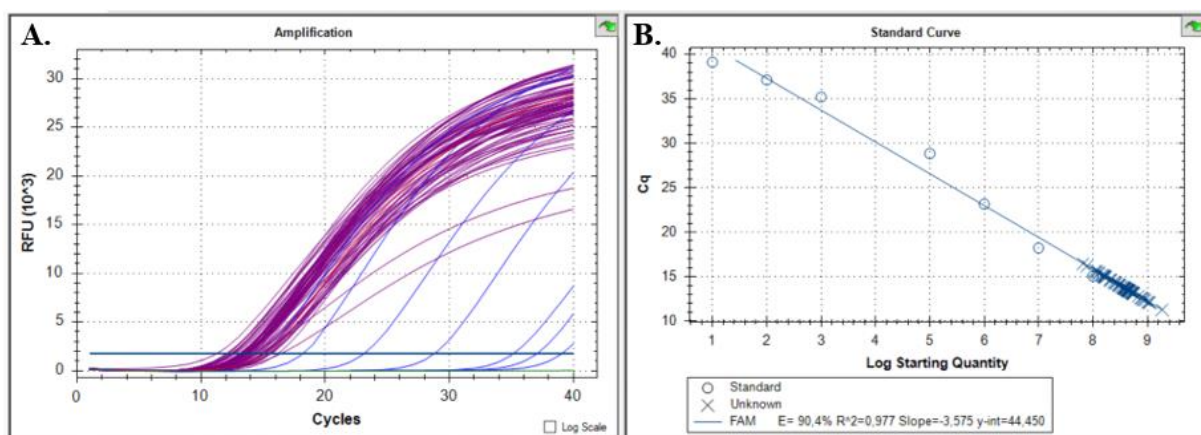
Echantillons	SQ	Cq
Standard 1	10 <sup>1</sup>	38,59
Standard 2	10 <sup>2</sup>	35,26
Standard 3	10 <sup>3</sup>	31,13
Standard 4	10 <sup>4</sup>	28,01
Standard 5	10 <sup>5</sup>	24,54
Standard 6	10 <sup>6</sup>	20,11

Standard 7	$10^7$	17,01
Standard 8	$10^8$	12,91
Contrôle positif	$1,409 \times 10^7$	16,25
Contrôle négatif	Non applicable	Non applicable
No template control	Non applicable	Non applicable

La valeur quantitative SQ représente le nombre de copies du gène ORF57 par  $\mu\text{L}$ . La  $C_q$  représente le nombre de cycles pour lequel le signal de l'échantillon passe au-dessus du seuil de détection de la fluorescence. « Non applicable » (N/A) signifie qu'il n'y a pas eu d'amplification de l'ORF57 au cours des 39 cycles.

### 1.5. Analyses cellulaires ARNr 18S

Sept analyses qPCR cellulaires sont nécessaires pour analyser les 160 échantillons en triplicatas. L'étalonnage est correct pour chacune de ces analyses, avec des valeurs de  $R^2$  comprises entre 0,977 et 0,994. L'exclusion du standard 4 est réalisée pour 5 des 7 analyses afin de ne pas influencer négativement l'efficacité de la droite d'étalonnage.



**Fig. 10.** Analyse cellulaire en triplicatas de 24 échantillons (N°89 à 112). **10.A.** Courbe d'amplification de la fluorescence (RFU) des échantillons standards cellulaires (courbes bleues), 89 à 112 en triplicatas (courbes mauves), contrôle positif (courbe rouge) et NTC (vert) au cours des cycles de la PCR quantitative cellulaire. **10.B.** Droite d'étalonnage des échantillons standards cellulaires (o). Les croix (x) représentent tous les réplicas des échantillons 89 à 112 et le contrôle positif ( $C_q = 15,10$ ).

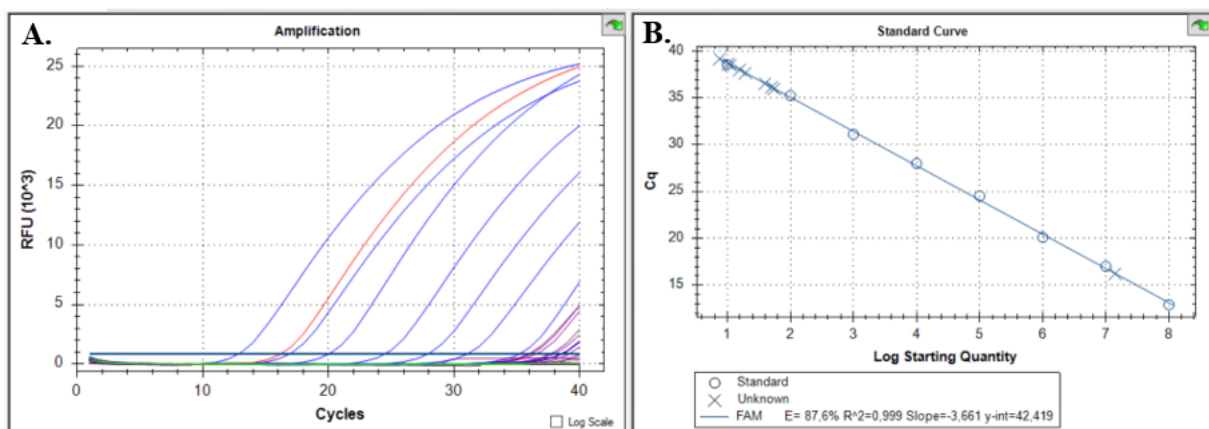
Les résultats des 3 réplicas des échantillons 89 à 112 sont tous ressortis fortement positifs pour le gène codant pour l'ARNr 18S (figure 10). Il en va de même pour les 136 autres échantillons d'anguilles. Tous les réplicas des 160 échantillons d'anguilles sont donc positifs

pour le gène codant pour l'ARNr 18S, avec des valeurs quantitatives SQ très élevées (figure 10). En effet, la majorité de ces valeurs SQ sont comprises entre  $10^7$  et  $8.10^8$  copies du gène codant pour l'ARNr 18S par  $\mu\text{L}$ . Quant aux cycles Cq, ils sont souvent compris entre 12 et 16. Plusieurs réplicas sortent cependant de ces fourchettes. La valeur de SQ la plus élevée est  $1,880.10^9$  copies/ $\mu\text{L}$ , pour un des triplicatas de l'échantillon 91 (Cq = 11,29). A l'inverse, la valeur de SQ la plus faible est  $4,149.10^6$  copies/ $\mu\text{L}$ , pour un réplica de l'échantillon 49 (Cq = 20,45).

### 1.6. Analyses virales ORF57

Sept plaques sont nécessaires pour réaliser l'analyse virale des 160 échantillons en triplicatas. L'étalonnage est correct pour chacune des 7 analyses, avec des valeurs de  $R^2$  comprises entre 0,991 et 0,999.

Au total, 130 échantillons sont négatifs pour tous leurs réplicas. 30 échantillons sont quant à eux ressortis positifs pour l'ORF57 une, deux ou trois fois sur leurs 3 triplicatas. La figure 11 concerne 24 échantillons d'anguilles (N°89 à 112) et donne un exemple de résultats. 19 échantillons (analysés en triplicatas) sont ressortis négatifs (Non applicable ; N/A). Seuls 5 échantillons 96, 102, 105, 110 et 112, sont apparus positifs pour l'ORF57 (figure 11). Les valeurs quantitatives SQ associées sont faibles, allant de 7,56 à 55,68 copies de l'ORF57 par  $\mu\text{L}$ , pour des nombres de cycles Cq valant respectivement 39,20 et 36,03. Seul l'échantillon 96 est ressorti directement positif en 3 réplicas. L'échantillon 110 est ressorti positif pour l'ORF57 pour deux de ses réplicas. Les échantillons 102, 105 et 112 ne sont ressortis positifs qu'une fois. Les résultats des échantillons 102, 105, 110 et 112 ont donc été confirmés par une analyse supplémentaire.



**Fig. 11.** Analyse virale en triplicatas des échantillons 89 à 112. **11.A.** Courbe d'amplification de la fluorescence (RFU) des échantillons standards viraux (courbes bleues), contrôles positif

(courbe rouge) et négatif (jaune), NTC (vert) et des répliques positifs pour l'ORF57 des échantillons d'anguilles 96, 102, 105, 110 et 112 (courbes mauves) au cours des cycles de la PCR quantitative. **11.B.** Droite d'étalonnage des échantillons standards viraux (o). Les croix (x) montrent les répliques positifs pour l'ORF57 des échantillons 96, 102, 105, 110 et 112 ( $C_q > 35$ ) et le contrôle positif ( $C_q = 16,25$ ).

Etant donné la sensibilité élevée des analyses par PCR quantitative, un échantillon a été considéré comme significativement positif pour l'AngHV1 si et seulement si au moins la moitié de ses répliques sont apparus positifs à l'analyse qPCR virale. Sur base de cela, 9 échantillons (tableau IV) ont été déterminés significativement positifs pour l'ORF57 suite aux analyses qPCR virales : 16, 31, 81, 84, 87, 96, 110, 136 et 148. Ces 9 échantillons sont représentés par une valeur cellulaire (détection du gène codant pour l'ARNr 18S) et une valeur virale (détection de l'ORF57). Ces deux valeurs sont les moyennes des SQ viraux et des SQ cellulaires calculées à partir des valeurs du SQ viral et du SQ cellulaire de chaque réplique positif pour l'ORF57 des 9 échantillons.

Afin de déterminer la charge virale par nombre fixe de gène cellulaire présent dans chaque échantillon, un ratio « SQ viral / SQ cellulaire » a été calculé grâce à la formule  $(SQ \text{ viral moyen} / SQ \text{ cellulaire moyen}) \times 10^8$ . Ce ratio exprime donc le nombre de copies de gène viral par  $10^8$  copies de gène cellulaire dans un échantillon. Il permet donc de comparer les échantillons entre eux en termes de charge virale sur base équivalente.

**Tableau IV.** Résultats des 9 échantillons positifs pour l'AngHV1.

Echantillon	Cours d'eau	Anguille	Tissus	SQ viral moyen (copies/ $\mu$ L)	SQ cellulaire moyen (copies/ $\mu$ L)	Ratio (SQv/SQc) $\times 10^8$ (copies de gène viral/ $10^8$ copies de gène cellulaire)
16	Oxhe	4	Cerveau	122,37	$0,909 \times 10^8$	134,65
31	Gueule	3	CRF	130,43	$1,707 \times 10^8$	76,43
81	Wayai	6	Peau	101,72	$0,992 \times 10^8$	102,50
84	Wayai	6	Cerveau	280,4	$2,406 \times 10^8$	116,56
87	Wayai	7	CRF	439,46	$1,382 \times 10^8$	318,07
96	Wayai	9	Cerveau	33,8	$3,775 \times 10^8$	8,95
110	Berwinne, BM	3	Branchies	28,84	$3,796 \times 10^8$	7,60
136	Hoegne	4	Cerveau	14,54	$2,116 \times 10^8$	6,87
148	Winamplanche	2	Cerveau	39,71	$1,628 \times 10^8$	24,39

CRF correspond au pool d'organes internes, qui comprend les échantillons de cœur, rate et foie. La valeur quantitative SQ représente le nombre de copies du fragment d'intérêt par  $\mu$ L.

Les résultats des anguilles positives pour l'AngHV1 sont rapportés dans le tableau IV. Parmi les échantillons positifs, l'échantillon 87 possède la charge virale la plus importante (318,07)

et l'échantillon 136 possède le plus faible ratio (6,87). On peut observer que les 9 échantillons infectés par l'AngHV1 correspondent à 8 poissons distincts. En effet, l'anguille n°6 du cours d'eau Wayai présente deux tissus (peau et cerveau) infectés. De plus, 5 des 9 échantillons proviennent du tissu cérébral et deux échantillons sont issus du pool d'organes internes (CRF). La peau et les branchies ne sont quant à elles représentées qu'une seule fois. Enfin, 3 des 8 poissons infectés proviennent du cours d'eau Wayai, et les 6 cours d'eau présentent au moins une anguille positive pour l'AngHV1.

### Discussion et perspectives

Cette étude présente quelques limites. La première limite se situe lors du prélèvement de l'échantillon de la population d'anguilles européennes de repeuplement, qui est de faible taille. En effet, un total de 40 anguilles n'est probablement que peu représentatif de l'intégralité de l'effectif initial, soit 76000 civelles de repeuplement. La deuxième limite est retrouvée lors de l'analyse par l'appareil PCR quantitative. La détection de moins de 10 copies d'un fragment d'intérêt par  $\mu\text{L}$  montre la sensibilité très importante de l'appareil qPCR, qui a pour désavantage de parfois générer des faux positifs.

Pour pouvoir comparer les échantillons en termes de charge virale, il faut qu'ils contiennent la même quantité d'ADN. La qPCR cellulaire permet d'obtenir le ratio  $\text{SQv/SQc}$ , qui permet de comparer la charge virale des échantillons. Malgré qu'on dispose de la qPCR cellulaire, on a tout de même effectué une mise à niveau de l'ADN dans chaque échantillon par un moyen supplémentaire, toutefois plus approximatif que la qPCR. Il s'agit du dosage de l'ADN des échantillons après l'étape de l'extraction d'ADN. En effet, tous les échantillons ayant subi l'extraction d'ADN ont été normalisés à  $50 \text{ ng}/\mu\text{L}$  d'ADN à l'aide du Spectrophotomètre Nanodrop (voir Matériels et méthodes). Afin d'avoir environ la même quantité d'ADN dans chaque échantillon, on aurait également pu prélever la même quantité de tissu lors des dissections des 40 poissons. Cela n'a pas été effectué. Toutefois, la quantité maximale de tissu prélevée par échantillon était 30 mg.

Les charges virales des 9 échantillons étaient comprises entre 14,54 (échantillon 136, provenant de la Hoegne) et 439,46 (échantillon 87, provenant de Wayai) copies de gène viral par  $\mu\text{L}$  (tableau IV). Il s'agit de faibles concentrations en comparaison avec les contrôles positifs employés lors des PCR quantitatives virales, dont les charges virales sont comprises entre  $2,3 \cdot 10^4$  et  $3,3 \cdot 10^7$  copies/ $\mu\text{L}$ . Ces faibles charges virales indiquent que les individus infectés étaient en période d'incubation ou en phase chronique de l'infection par anguillid

herpesvirus 1. En outre, il est plus probable que les 8 anguilles infectées étaient en phase chronique (latente), cette phase étant beaucoup plus longue que la période d'incubation.

Comme présenté dans le tableau IV, l'échantillon 87 montre la charge virale la plus importante (439,46 copies de gène viral par  $\mu\text{L}$ ) ; cet échantillon correspond au pool d'organes internes (cœur, rate et foie) d'une anguille provenant de Wayai. A l'inverse, l'échantillon 136 montre la charge virale la plus faible (14,54 copies de gène viral par  $\mu\text{L}$ ) ; cet échantillon correspond au cerveau d'une anguille provenant de la Hoegne. Même si 2 autres échantillons de cerveau ont une charge virale inférieure à 40 copies de gène viral par  $\mu\text{L}$  (échantillons 96 et 148), l'échantillon 84 (cerveau) a la deuxième charge virale la plus élevée des 9 échantillons positifs pour l'AngHV1, avec 280,4 copies/ $\mu\text{L}$ . Il est donc difficile, au vu des résultats, d'établir une corrélation entre l'importance de la charge virale et le type d'organe infecté.

La fréquence plus élevée du cerveau parmi les organes positifs est à souligner. En effet, 5 échantillons sur 9 proviennent de cerveaux d'anguilles infectées (tableau IV). En outre, deux échantillons sont issus du pool d'organes internes (CRF). La peau et les branchies sont toutes deux représentées par un seul échantillon. En phase aiguë, une anguille infectée par l'AngHV1 peut présenter une encéphalite dans son tableau clinique (Donnée provenant du laboratoire d'immunologie et vaccinologie de la Faculté de Médecine vétérinaire de l'Université de Liège). Selon Van Beurden (2012) et Boutier *et al.* (2015), il est très probable que tous les *alloherpesviridae* soient capables de s'établir sous forme chronique latente dans l'organisme de leurs hôtes. Un parallélisme peut donc potentiellement être établi entre l'anguillid herpesvirus 1 et le cyprinid herpesvirus 3 (CyHV3). Le CyHV3 peut persister de manière chronique latente dans le cerveau sous forme d'épisomes. En outre, le CyHV3 peut être détecté dans l'encéphale de carpes cliniquement saines (Boutier *et al.*, 2015). Si on part du postulat que la forme latente de l'AngHV1 est semblable à celle du CyHV3, la présence de l'AngHV1 au niveau cérébral serait donc possible autant en phase chronique qu'en phase aiguë de la maladie. Etant donné que les résultats obtenus dans cette étude montraient des charges virales faibles dans tous les organes étudiés, les 5 cerveaux positifs pour l'AngHV1 joueraient plutôt un rôle de maintien du virus sous sa forme latente dans l'organisme des 5 hôtes.

Il est intéressant de constater que chacun des 6 cours d'eau est représenté par les 9 échantillons, c'est-à-dire par les 8 anguilles positives pour l'AngHV1 (tableau IV). Le cours

d'eau Wayai est représenté par 4 échantillons, soit 3 poissons. Les cours d'eau Oxhe, Gueule, Berwinne, Hoegne et Winamplanche sont chacun représentés par un seul échantillon. Pour rappel, 5 poissons ont été recapturés dans chaque cours d'eau, à l'exception de Wayai et Berwinne, où 10 poissons ont été prélevés. En effet, il y avait 2 sites distincts de recapture pour ces deux cours d'eau. Comparativement, il y a donc 1,5 fois plus d'anguilles de repeuplement infectées par l'AngHV1 à Wayai et 2 fois moins à Berwinne que dans les autres cours d'eau (rapport  $\frac{1}{2}$ ). Il existe donc potentiellement des paramètres environnementaux et/ou humains qui expliqueraient qu'il y a plus d'anguillettes positives pour l'AngHV1 à Wayai que dans les 5 autres cours d'eau étudiés.

En 2017, Kullmann *et al.* ont mis en évidence que plus une anguille est longue, plus elle est susceptible d'être infectée par l'AngHV1. Pour rappel, les 40 anguilles étudiées pesaient en moyenne 26,49 g et mesuraient en moyenne 23,63 cm (voir tableau en annexe). La plus petite anguille mesurait 10,9 cm (1,7 g) et la plus grande 36,5 cm (76,4 g). Il s'agit respectivement des anguilles n°2 provenant de Oxhe et n°5 provenant de Berwinne, Val Dieu (voir tableau en annexe). Ces deux anguilles étaient négatives pour l'AngHV1. On observe dans le tableau V que parmi les anguilles positives pour l'AngHV1, la plus petite mesurait 17,1 cm pour 6,8 g (anguille n°9 de Wayai), et la plus grande faisait 31 cm pour un poids de 50,3 g (anguille n°7 de Wayai). La comparaison avec les tailles moyennes minimale (10,9 cm) et maximale (36,5 cm) des 40 anguilles montre à priori que dans cette étude, il n'y a pas de corrélation entre le résultat du diagnostic et la taille en centimètre des anguilles.

Depuis mars 2017, la prévalence de l'AngHV1 a déjà été étudiée au total 4 fois sur la population des anguilles de repeuplement dans les 6 cours d'eau wallons. Ces études de prévalence ont toutes été menées par le laboratoire d'immunologie et vaccinologie du Professeur Alain Vanderplasschen. Le procédé utilisé pour réaliser le diagnostic des anguilles recapturées a été le même que celui de ce présent travail, incluant la détection de l'AngHV1 par l'emploi de deux PCR quantitatives complémentaires (voir Introduction). Les deux premières études ont été réalisées sur 50 et 80 civelles recapturées respectivement peu de temps après la date du repeuplement de mars 2017 et 6 mois après, en octobre 2017. Aucun individu issu de ces deux recaptures, espacées de 6 mois, n'était infecté par l'AngHV1. La troisième étude de prévalence a été menée en octobre 2018 sur 40 civelles recapturées. Les résultats montraient que 7 de ces 40 civelles étaient positives pour l'AngHV1, soit une prévalence de 17,5% (Données provenant du laboratoire d'immunologie et vaccinologie de la Faculté de Médecine vétérinaire de l'Université de Liège).

Pour rappel, en octobre 2019, 8 des 40 anguilles recapturées dans les 6 cours d'eau wallons étaient infectées par l'AngHV1. Cela correspond à une prévalence de 20%. Il s'agit de 8 et 1 anguilles de plus que les prévalences évaluées en 2017 et en 2018, respectivement. A première vue, il semblerait que la prévalence de l'AngHV1 en 2019 dans les populations d'anguilles de repeuplement ait augmenté par rapport aux deux années précédentes. Cependant, les échantillons, étant de taille limitée, sont probablement peu représentatifs de l'effectif total. En outre, les recherches effectuées dans le laboratoire du Pr. Vanderplasschen (2019) ont permis d'observer que les anguilles infectées expérimentalement par l'AngHV1 ne sont sensibles qu'à partir du stade anguillette. Cette information peut être mise en lien avec les prévalences annuelles observées dans les 6 cours d'eau étudiés. En effet, lors des deux études menées en 2017, les individus étudiés étaient au stade civelle, et donc potentiellement non sensibles à l'AngHV1. En 2018 et 2019, la population d'anguilles de repeuplement a évolué vers le stade anguillette. Cela expliquerait qu'il y ait eu un passage d'une prévalence nulle en 2017 à une prévalence concernant en moyenne 18,75% des échantillons étudiés en 2018 et 2019.

L'homme joue un grand rôle dans la dissémination de l'AngHV1 et d'autres maladies affectant les anguilles, en effectuant des repeuplements avec des anguilles infectées, faute de contrôles sanitaires obligatoires en Union européenne (Van Beurden *et al.*, 2012 ; Nguyen *et al.*, 2016 ; Kullmann *et al.*, 2017), ainsi que par les imports et exports à l'échelle internationale d'individus contaminés (Van Ginneken *et al.*, 2004 ; Van Beurden *et al.*, 2012). Cela explique l'intervention de la CITES dans la régulation du commerce des anguilles européennes depuis 2007. L'importation de pathologies pourrait également survenir en aquaculture en raison de l'utilisation d'anguilles européennes potentiellement malades prélevées à l'état sauvage afin de constituer les stocks d'élevage (Van Beurden *et al.*, 2012 ; ICES, 2018).

On peut affirmer que l'AngHV1 pose un problème majeur sur le plan économique (Jakob *et al.*, 2009 ; Kullmann *et al.*, 2017). En effet, il a été isolé dans de nombreuses exploitations aquacoles ainsi que dans des zones destinées à la pêche dans plusieurs pays européens (Haenen *et al.*, 2002 ; Kullmann *et al.*, 2017 ; McConville *et al.*, 2018). L'infection par l'AngHV1 constitue un frein à la croissance des anguilles d'élevage (Van Beurden, 2012). De plus, les taux de mortalité impliqués par ce virus avoisinent les 10% en aquaculture (Haenen *et al.*, 2002 ; Kullmann *et al.*, 2017). Ce taux peut monter à 30% (Van Beurden *et al.*, 2012),



voire même plus, lorsque les anguilles sont soumises à des facteurs stressants (Kempton *et al.*, 2014).

Même si beaucoup d'études ont été réalisées sur l'AngHV1, la prévalence et le taux de mortalité exacts dus à ce virus ne sont pas encore bien connus dans la nature, à l'échelle mondiale. La présente étude n'a pas permis d'éclairer cette thématique, l'échantillon étant de faible taille et ne comportant que des anguilles de repeuplement, et non des anguilles autochtones. De plus, les taux de mortalité causés par l'AngHV1 dans la nature sont très difficiles à évaluer. En effet, à l'état sauvage, le nombre d'anguilles qui décèdent de l'infection par l'AngHV1 ne peut pas être observé, étant donné que la recapture n'est possible que pour les anguilles vivantes. Il est donc tout à fait envisageable que des anguilles du repeuplement de mars 2017 infectées par l'AngHV1 soient mortes lors de la phase aiguë, et n'aient donc pas pu être incluses dans l'étude. Cela expliquerait que les résultats obtenus ne montrent que des faibles charges virales chez les 8 anguilles positives pour l'AngHV1. Autrement dit, seule la phase chronique de la maladie a pu être rapportée.

A ce jour, les données existantes ne permettent pas de déterminer l'impact précis de l'anguillid herpesvirus 1 sur le danger d'extinction de l'anguille européenne, et donc sur la biodiversité. Il est probable que l'AngHV1 affecte la migration et les aptitudes de reproduction des anguilles européennes (Haenen *et al.*, 2009 ; Kullmann *et al.*, 2017) au point que cela perturbe leur pérennité. A l'inverse, la traversée de l'Océan Atlantique vers la mer des Sargasses est très coûteuse en énergie (Van den Thillart *et al.*, 2009). A leur arrivée, les anguilles européennes ont perdu beaucoup de poids (Van den Thillart *et al.*, 2009) et sont probablement immunodéprimées (Haenen *et al.*, 2009). Cette immunosuppression accroît la sensibilité des anguilles aux maladies infectieuses et parasitaires (Haenen *et al.*, 2009). De plus, la température de l'eau est plus élevée vers le continent américain, ce qui favorise la possibilité d'infection par l'AngHV1 ou de réactivation du virus chez les anguilles argentées qui arrivent à destination (Haenen *et al.*, 2010). L'AngHV1 participe sans doute au déclin de l'anguille européenne, mais il faudrait approfondir les recherches pour savoir dans quelle mesure.

D'autres agents pathogènes majeurs concourent au déclin de l'espèce *Anguilla anguilla* (Van Ginneken et Maes, 2005 ; Esteve et Alcaide, 2009 ; Van Beurden *et al.*, 2012 ; Bandin *et al.*, 2014). Les tableaux cliniques d'EVE et d'EVEX sont fort semblables à celui de l'AngHV1. En effet, ils reprennent des hémorragies et de l'hyperhémie, avec des taux de morbidité

élevés. EVE est responsable de branchionéphrite chez l'anguille européenne (Van Beurden *et al.*, 2012). Les taux de mortalité engendrés par EVE et EVEX peuvent aller jusque 50% (Van Ginneken *et al.*, 2004 ; Van Beurden *et al.*, 2012), voire même jusque 100% pour EVE selon Chen *et al.* (1985). Il arrive que des anguilles européennes soient infectées simultanément par AngHV1 et EVE, ou par AngHV1 et EVEX (Van Beurden *et al.*, 2012). En outre, l'AngHV1 permet une brèche pour l'infection par d'autres agents pathogènes (Davidse *et al.*, 1999). En ce qui concerne *Anguillicola crassus*, la charge de ce nématode est plus importante chez des anguilles saines que chez des anguilles infectées par l'AngHV1. Cela s'explique par le fait que les anguilles infectées par ce virus n'ont plus assez d'énergie pour se nourrir de proies, qui sont potentiellement contaminées par ce parasite. Par contre, les anguilles les plus infectées par *A. crassus* sont aussi celles qui sont le plus infectées par l'AngHV1 (Kullmann *et al.*, 2017). Lors des dissections, les 40 anguilles de repeuplement ne présentaient pas de lésion au niveau des organes internes. En outre, *Anguillicola crassus* n'a été retrouvé dans aucune des 40 vessies natatoires des poissons étudiés.

L'AngHV1 peut infecter l'anguille européenne, *Anguilla anguilla*, l'anguille japonaise, *Anguilla japonica* (Van Beurden, 2012) et l'anguille américaine, *Anguilla rostrata* (Kempter *et al.*, 2014). Le virus induit un tableau clinique de gravité variable ainsi que de la mortalité chez ces 3 espèces. En 2018, McConville *et al.* rapportaient également l'existence d'espèces potentiellement réservoirs de l'anguillid herpesvirus 1 en Pologne. Il s'agit des 5 espèces de poisson suivantes, chez qui le virus a été détecté dans plusieurs tissus : la carpe de Prusse (*Carassius gibelio*), la perche commune (*Perca fluviatilis*), le sandre doré européen (*Stizostedion lucioperca*), l'esturgeon du Danube (*Acipenser ruthenus*) et le gobie à taches noires (*Neogobius melanostomus*) (McConville *et al.*, 2018). L'infection par l'AngHV1 d'autres espèces que l'anguille européenne vient compliquer l'éventuelle mise en place de moyens de prévention et de traitement de ce virus à l'état sauvage.

La prévalence de l'AngHV1 chez les anguilles sauvages de repeuplement dans 6 cours d'eau belges a été analysée dans ce travail. Il serait intéressant d'étudier la prévalence de l'AngHV1 chez les anguilles sauvages autochtones, c'est-à-dire qui résident naturellement dans ces cours d'eau. Il s'agirait d'anguilles européennes jaunes, plus âgées, plus grandes et morphologiquement différentes des anguilles de repeuplement. Pour rappel, il n'y a encore aucune donnée à l'heure actuelle sur la prévalence de l'AngHV1 chez les anguilles européennes sauvages en Belgique.

Une amélioration de la législation belge en matière de détention et de statut sanitaire des anguilles européennes est nécessaire. A l'heure actuelle, en Belgique, il n'y a aucune réglementation quant à l'obligation de mise en quarantaine des anguilles avant d'effectuer un repeuplement. Une quarantaine aurait pour intérêt de pouvoir établir le statut sanitaire des anguilles à importer. En effet, le repeuplement avec des individus dont le statut sanitaire est inconnu constitue un risque important en termes de transfert de maladies, dont l'AngHV1, aux populations d'anguilles sauvages. Cependant, dans le cadre de l'AngHV1, l'instauration d'une quarantaine pour des civelles en pré-repeuplement n'aurait probablement aucun effet, ces dernières étant potentiellement insensibles à l'AngHV1.

La prévention et le traitement de l'AngHV1 sont difficiles à mettre en œuvre, notamment en raison de l'existence d'une phase chronique latente pouvant être caractérisée par l'absence de signes cliniques (Van Beurden, 2012). Un des objectifs du laboratoire du Professeur Vanderplasschen est la création d'un vaccin vivant atténué. Toutefois, il est probable que ce futur vaccin empêche l'excrétion virale sans protéger les individus vaccinés du développement de la maladie et des signes cliniques.

**Tableau V.** Taille et poids des 8 anguilles de repeuplement testées positives pour l'AngHV1.

Echantillon	Cours d'eau	Anguille	Taille (cm)	Poids (g)
16	Oxhe	4	18,8	10,5
31	Gueule	3	30,8	51,2
81/84	Wayai	6	18,3	9,2
87	Wayai	7	31	50,3
96	Wayai	9	17,1	6,8
110	Berwinne, BM	3	28,9	45,1
136	Hoegne	4	25,7	28,1
148	Winamplanche	2	28,8	37,7

La taille est exprimée en centimètre et le poids en gramme.

## Conclusion

Cette étude a permis la mise en évidence de la prévalence de l'anguillid herpesvirus 1 chez l'anguille européenne (*Anguilla anguilla*) dans les cours d'eau wallons Oxhe, Gueule, Berwinne, Wayai, Hoegne et Winamplanche en 2019, qui s'élève à 20%, soit 8 anguilles positives pour l'AngHV1 sur l'échantillon des 40 anguilles de repeuplement. Cette prévalence de 20% est supérieure à celles obtenues en 2017 et 2018. Le diagnostic a été rendu possible par un ensemble de manipulations en laboratoire incluant la PCR quantitative. Cette dernière s'est avérée très efficace pour détecter l'AngHV1. Chacun des 6 cours d'eau étudié comportait au moins une anguille positive pour l'AngHV1. De plus, toutes les anguilles détectées étaient infectées par la forme chronique de l'AngHV1. Il est important de souligner que l'AngHV1 a un impact sur le déclin des populations d'anguilles européennes, classées « espèces en danger critique d'extinction » par l'UICN. Des recherches supplémentaires sont nécessaires pour connaître les conséquences exactes de l'AngHV1 sur la biodiversité à l'échelle planétaire.

## Annexes

**Tableau I.** Tailles et poids des 40 anguilles de repeuplement.

<b>Cours d'eau</b>	<b>Date de capture et de prélèvement</b>	<b>Numéro de l'anguille</b>	<b>Poids (g)</b>	<b>Longueur (cm)</b>
<b>Oxhe</b>	29-08-19	1	8	18
		2	1,7	10,9
		3	5,5	14,6
		4	10,5	18,8
		5	8,3	17,3
<b>Gueule</b>	17-09-19	1	2,11	12
		2	71,54	34,4
		3	51,2	30,8
		4	55,98	31,4
		5	71,13	34
<b>Berwinne (Val Dieu)</b>	24-09-19	1	20,4	23,4
		2	49	31,6
		3	35,1	30,3
		4	55,3	33,3
		5	76,4	36,5
<b>Wayai</b>	26-09-19	1	22,2	25,5
		2	18,2	23,3
		3	14	13,3
		4	8,9	18,5
		5	25	26,2
<b>Wayai</b>	01-10-19	6	9,2	18,3
		7	50,3	31
		8	6,8	17,5
		9	6,8	17,1
		10	35,2	28,5
<b>Berwinne (Boukai Moulin)</b>	10-10-19	1	33,5	27,5
		2	5,6	15,3
		3	45,1	28,9
		4	13,1	21,6
		5	56,1	31,7
<b>Hoegne (Chaufheid)</b>	15-10-19	1	5,8	18,2
		2	37,6	27,5
		3	10,3	20,2
		4	28,1	25,7

		5	12,8	20,1
<b>Winamplanche</b>	23-10-19	1	7,7	17,5
		2	37,7	28,8
		3	6,9	17,4
		4	12,5	21
		5	28,1	27,2

**Tableau II.** Signification des deux rapports d'absorbance 260/280 et 260/230 fournis par le Spectrophotomètre NanoDrop.

Ratio 260/280	<1,8	Contamination : protéines, phénols, autres contaminants.
	1,8 – 2,0	Echantillon pur en acides nucléiques.
Ratio 260/230	< 1,8	Contamination : phénol, isothiocyanate de guanidine, carbohydrates, peptides, acide humique, urée, EDTA, polysaccharides, ...
	1,8 – 2,2	Echantillon pur en acides nucléiques.

Signification des ratios 260/280 et 260/230. Thermo Fisher Scientific Inc., 2016 ; Ozyme, 2019.

**Tableau III.** Mesure de la concentration en acides nucléiques des 160 échantillons d'anguilles et des blancs d'extraction.

Echantillon	Cours d'eau	Anguille	Organe	Concentration initiale (ng/ul)	260/280 (optimal: 1,8)	260/230 (optimal: 1,8-2,2)
1	Oxhe	1	Peau	150,92	1,94	2,18
2	Oxhe	1	Branchies	478,24	1,92	2,25
3	Oxhe	1	CRF	848,92	2,02	2,22
4	Oxhe	1	Cerveau	253,79	1,92	2,27
5	Oxhe	2	Peau	662,22	1,96	2,23

6	Oxhe	2	Branchies	201,25	1,95	2,18
7	Oxhe	2	CRF	878,04	2,03	2,22
8	Oxhe	2	Cerveau	238,07	1,92	2,23
9	Oxhe	3	Peau	355,23	1,93	2,22
10	Oxhe	3	Branchies	403,67	1,93	2,26
11	Oxhe	3	CRF	889,59	2,01	2,12
12	Oxhe	3	Cerveau	258,6	1,93	1,79
13	Oxhe	4	Peau	134,11	1,95	1,65
14	Oxhe	4	Branchies	561,26	1,95	2,16
15	Oxhe	4	CRF	820,01	2,04	2,22
16	Oxhe	4	Cerveau	321,23	1,92	2,27
17	Oxhe	5	Peau	147,85	1,97	2,1
18	Oxhe	5	Branchies	753,85	1,91	2,24
19	Oxhe	5	CRF	795,21	1,98	2,28
20	Oxhe	5	Cerveau	156,4	1,94	2,19
21	Gueule	1	Peau	103,48	2,04	2,09
22	Gueule	1	Branchies	553,72	1,91	2,22
23	Gueule	1	CRF	800,25	1,96	2,24
24	Gueule	1	Cerveau	70,41	1,97	2,09
25	Gueule	2	Peau	340,52	1,98	2,18
26	Gueule	2	Branchies	488,28	1,93	2,2
27	Gueule	2	CRF	611,67	1,95	2,16
28	Gueule	2	Cerveau	456,79	1,93	2,21
29	Gueule	3	Peau	237	1,96	2,16

30	Gueule	3	Branchies	562,58	1,93	2,21
B1	Blanc d'extraction 16/10			1,35	-3,29	0,11
31	Gueule	3	CRF	441,46	1,89	2,14
32	Gueule	3	Cerveau	1038,31	2,01	2,22
33	Gueule	4	Peau	157,1	1,96	2,36
34	Gueule	4	Branchies	540,77	1,89	2,31
35	Gueule	4	CRF	689,68	1,91	2,23
36	Gueule	4	Cerveau	155,91	1,88	2,36
37	Gueule	5	Peau	369,45	1,93	2,31
38	Gueule	5	Branchies	711,04	1,92	2,29
39	Gueule	5	CRF	668,72	1,91	2,1
40	Gueule	5	Cerveau	320,14	1,92	2,4
41	Berw, VD	1	Peau	171,78	1,95	2,32
42	Berw, VD	1	Branchies	235,91	1,91	2,38
43	Berw, VD	1	CRF	591,12	1,87	2,19
44	Berw, VD	1	Cerveau	293,88	1,92	2,4
45	Berw, VD	2	Peau	199,63	1,89	2,32
46	Berw, VD	2	Branchies	381,91	1,92	2,22
47	Berw, VD	2	CRF	523,16	1,91	2,21
48	Berw, VD	2	Cerveau	421,96	1,9	2,35
49	Berw, VD	3	Peau	185,64	1,96	2,35
50	Berw, VD	3	Branchies	645,54	1,93	2,33



51	Berw, VD	3	CRF	664,18	1,91	2,3
52	Berw, VD	3	Cerveau	319,53	1,89	2,42
53	Berw, VD	4	Peau	122,06	1,94	2,33
54	Berw, VD	4	Branchies	398,65	1,91	2,33
55	Berw, VD	4	CRF	652,35	1,92	2,3
56	Berw, VD	4	Cerveau	330,51	1,91	2,35
57	Berw, VD	5	Peau	135,94	1,96	2,23
58	Berw, VD	5	Branchies	901,72	1,9	2,2
59	Berw, VD	5	CRF	532,86	1,88	2,18
60	Berw, VD	5	Cerveau	258,71	1,9	2,33
B2	Blanc d'extraction 17/10			-4,71	1,98	0,63
61	Wayai	1	Peau	146,7	1,99	2,06
62	Wayai	1	Branchies	380,13	1,99	2,15
63	Wayai	1	CRF	520,94	1,95	2,11
64	Wayai	1	Cerveau	44,36	2,01	1,43
65	Wayai	2	Peau	180,45	2	2,05
66	Wayai	2	Branchies	513,15	1,94	2,23
67	Wayai	2	CRF	465,81	1,93	2,21
68	Wayai	2	Cerveau	450,61	1,94	2
69	Wayai	3	Peau	224,65	2,03	2,08
70	Wayai	3	Branchies	246,18	2	2,19
71	Wayai	3	CRF	594,62	1,94	2,07

72	Wayai	3	Cerveau	312,51	1,97	2,23
73	Wayai	4	Peau	62,53	2,01	1,77
74	Wayai	4	Branchies	200,38	2	2,13
75	Wayai	4	CRF	1147,51	1,92	2,03
76	Wayai	4	Cerveau	175,97	1,92	2,08
77	Wayai	5	Peau	318,09	1,98	2,25
78	Wayai	5	Branchies	534,36	1,93	2,2
79	Wayai	5	CRF	647,36	2,03	2,16
80	Wayai	5	Cerveau	586,87	1,93	2,2
B3	Blanc d'extraction 18/10			4,85	1,24	0,44
81	Wayai	6	Peau	131,84	2,02	1,99
82	Wayai	6	Branchies	536,82	1,92	2,05
83	Wayai	6	CRF	718,72	2,03	2,15
84	Wayai	6	Cerveau	381,76	1,93	2,07
85	Wayai	7	Peau	75	1,97	1,61
86	Wayai	7	Branchies	346,64	1,96	2,2
87	Wayai	7	CRF	471,56	1,93	1,98
88	Wayai	7	Cerveau	300,15	1,93	2,21
89	Wayai	8	Peau	149,93	1,97	1,87
90	Wayai	8	Branchies	566,02	1,92	2,14
91	Wayai	8	CRF	691,59	1,95	2,13
92	Wayai	8	Cerveau	246,59	1,98	2,13
93	Wayai	9	Peau	58,01	2,03	1,42

94	Wayai	9	Branchies	640,51	1,96	2,25
95	Wayai	9	CRF	814,31	1,92	1,69
96	Wayai	9	Cerveau	252,23	1,96	2,17
97	Wayai	10	Peau	99,44	1,99	1,82
98	Wayai	10	Branchies	346,94	1,99	2,18
99	Wayai	10	CRF	581,42	1,95	2,04
100	Wayai	10	Cerveau	287,69	1,96	2,12
B4	Blanc d'extraction 21/10			2,61	1,05	0,3
101	Berw, BM	1	Peau	92,2	1,96	1,65
102	Berw, BM	1	Branchies	377,58	1,86	1,69
103	Berw, BM	1	CRF	740,95	1,92	1,94
104	Berw, BM	1	Cerveau	409,72	1,89	2
105	Berw, BM	2	Peau	240,41	1,94	1,75
106	Berw, BM	2	Branchies	753,37	1,94	2,21
107	Berw, BM	2	CRF	1031,87	1,93	2,28
108	Berw, BM	2	Cerveau	313,42	1,9	2,11
109	Berw, BM	3	Peau	102	1,98	1,73
110	Berw, BM	3	Branchies	754,34	1,84	1,34
111	Berw, BM	3	CRF	756,45	1,94	2,26
112	Berw, BM	3	Cerveau	290,33	1,93	2,25
113	Berw, BM	4	Peau	102,67	1,94	1,89

114	Berw, BM	4	Branchies	578,05	1,92	2,14
115	Berw, BM	4	CRF	870,86	1,92	1,91
116	Berw, BM	4	Cerveau	436,25	1,9	2,24
117	Berw, BM	5	Peau	79,57	1,98	1,92
118	Berw, BM	5	Branchies	1107,92	1,95	2,25
119	Berw, BM	5	CRF	1104,73	1,9	1,82
120	Berw, BM	5	Cerveau	450,49	1,89	2,25
B5	Blanc d'extraction 24/10			0,07	-0,12	0,02
121	Hoegne	1	Peau	106,91	1,91	1,83
122	Hoegne	1	Branchies	530,19	1,9	2,22
123	Hoegne	1	CRF	879,81	1,94	2,1
124	Hoegne	1	Cerveau	315,27	1,91	2,16
125	Hoegne	2	Peau	50,83	1,91	1,4
126	Hoegne	2	Branchies	480,05	1,93	2,17
127	Hoegne	2	CRF	557,45	1,92	2,18
128	Hoegne	2	Cerveau	130,18	1,87	1,96
129	Hoegne	3	Peau	172,79	1,95	1,91
130	Hoegne	3	Branchies	539,29	1,89	2,15
131	Hoegne	3	CRF	698,09	1,84	1,33
132	Hoegne	3	Cerveau	336,91	1,95	2,23
133	Hoegne	4	Peau	25,03	1,9	1,16
134	Hoegne	4	Branchies	162,41	1,98	2,06

135	Hoegne	4	CRF	326,15	1,94	2,17
136	Hoegne	4	Cerveau	47,05	1,94	1,55
137	Hoegne	5	Peau	150,28	1,99	1,95
138	Hoegne	5	Branchies	716,85	1,94	2,24
139	Hoegne	5	CRF	1107,49	1,98	2,23
140	Hoegne	5	Cerveau	362,27	1,93	2,19
B6	Blanc d'extraction 25/10			0,7	0,52	0,15
141	Winamplanche	1	Peau	113,45	1,95	1,89
142	Winamplanche	1	Branchies	558,11	1,93	2,19
143	Winamplanche	1	CRF	1081,29	1,95	1,93
144	Winamplanche	1	Cerveau	170,3	1,96	2,06
145	Winamplanche	2	Peau	51,05	1,91	1,4
146	Winamplanche	2	Branchies	344,81	1,97	2,18
147	Winamplanche	2	CRF	931,35	1,99	2,12
148	Winamplanche	2	Cerveau	322,42	1,94	2,22
149	Winamplanche	3	Peau	73,09	1,94	1,74
150	Winamplanche	3	Branchies	508,85	1,92	2,19
151	Winamplanche	3	CRF	1065,19	1,95	2,18
152	Winamplanche	3	Cerveau	134,21	2	1,8
153	Winamplanche	4	Peau	71,88	2	1,5
154	Winamplanche	4	Branchies	462,93	1,96	2,2

155	Winamplanche	4	CRF	953,93	1,96	2,15
156	Winamplanche	4	Cerveau	187,39	1,99	2,08
157	Winamplanche	5	Peau	154,62	2,06	1,97
158	Winamplanche	5	Branchies	469,17	1,98	2,22
159	Winamplanche	5	CRF	920,96	2	2,23
160	Winamplanche	5	Cerveau	174,92	1,99	2,11
B7	Blanc d'extraction 28/10			4,63	1,24	0,27

CRF : échantillons des cœur, rate et foie du pool d'organes internes ; Berw, VD : Berwinne, site du Val Dieu ; Berw, BM : Berwinne, site de Boukai Moulin.

## Références bibliographiques

Békési, L., Horváth, I., Kovács-Gayer, E., Csaba, G., 1986. Demonstration of herpesvirus like particles in skin lesions of European eel (*Anguilla anguilla*). *J Appl Ichthyol* 2, 190–192.

Bio-Rad Laboratories Inc. (Ed.), 2006. Real-Time PCR Applications Guide. Bio-Rad Laboratories Inc., Californie, 105 pp.

Bio-Rad Laboratories Inc., 2019. iQ Supermix. <https://www.bio-rad.com/en-be/product/iq-supermix?ID=M8BH1V15> Consulté le 26 décembre 2019

Chang, P.H., Pan, Y.H., Wu, C.M., Kuo, S.T., Chung, H.Y., 2002. Isolation and molecular characterization of herpesvirus from cultured European eels *Anguilla anguilla* in Taiwan. *Dis Aquat Org* 50, 111–118.

Davidse, A., Haenen, O.L.M., Dijkstra, S.G., Van Nieuwstadt, A.P., Van Der Vorst, T.J.K., Wagenaar, F., Wellenberg G.J., 1999. First isolation of herpesvirus of eel (*Herpesvirus anguillae*) in diseased european eel (*Anguilla anguilla* L.) in Europe. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 19, 137-141.

Dekker, W., Casselman, J.M., Cairns, D.K., Tsukamoto, K., Jellyman, D., Lickers, H., 2003. Worldwide decline of eel resources necessitates immediate action. *Québec Declaration of Concern. Fisheries* 28, 28–30.

Elie, P., Lecomte-Finiger, R., Cantrelle, I., Charlon, N., 1982. Définition des limites des différents stades pigmentaires durant la phase civelle d'*Anguilla anguilla* L. (Poisson téléostéen anguilliforme). *Vie Milieu* 32, 149-157.

Frankowski, J., Bastrop, R., 2010. Identification of *Anguilla anguilla* (L.) and *Anguilla rostrata* (LeSueur) and their hybrids based on a diagnostic single nucleotide polymorphism in nuclear 18S rDNA. *Mol. Ecol. Resour.* 10, 173–176.

Fukuda, N., Miller, M.J., Aoyama, J., Shinoda, A., Tsukamoto, K., 2013. Evaluation of the pigmentation stages and body proportions from the glass eel to yellow eel in *Anguilla japonica*. *Fish. Sci.* 79, 425-438.

Haenen, O.L.M., Dijkstra, S.G., Van Tulden, P.W., Davidse, A., Van Nieuwstadt, A.P., Wagenaar, F., Wellenberg G.J., 2002. Herpesvirus anguillae (HVA) isolations from disease

outbreaks in cultured European eel, *Anguilla anguilla* in The Netherlands since 1996. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 22, 247-257.

Haenen, O.L.M., Lehmann, J., Engelsma, M.Y., Stürenberg, F.J., Roozenburg, I., Kerkhoff, S., Klein Breteler, J., 2010. The health status of European silver eels, *Anguilla anguilla*, in the Dutch River Rhine Watershed and Lake IJsselmeer. Aquaculture 309, 15–24.

Haenen, O.L.M., Mladineo, I., Konecny, R., Yoshimizu, M., Groman, D., Muñoz, P., Saraiva, A., Bergmann, S.M., Van Beurden, S.J., 2012. Diseases of eels in an international perspective : Workshop on Eel Diseases at the 15th International Conference on Diseases of Fish and Shellfish, Split, Croatia, 2011. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 32, 109–115.

Jakob, E., Neuhaus, H., Steinhagen, D., Luckhardt, B., Hanel, R., 2009. Monitoring of Herpesvirus anguillae (HVA) infections in European eel, *Anguilla anguilla* (L.), in northern Germany. J. Fish Dis. 32, 557–561.

Kim, H.J., Yu, J.H., Kim, D.W., Kwon, S.R., Park, S.W., 2012. Molecular evidence of anguillid herpesvirus-1 (AngHV-1) in the farmed Japanese eel, *Anguilla japonica* Temminck & Schlegel, in Korea. J. Fish Dis. 35, 315–319.

Kullmann, B., Adamek, M., Steinhagen, D., Thiel, R., 2017. Anthropogenic spreading of anguillid herpesvirus 1 by stocking of infected farmed European eels, *Anguilla anguilla* (L.), in the Schlei fjord in northern Germany. J. Fish Dis. 40, 1695-1706.

Le coin du pro, 2019. Spectrophotomètre NanoDrop ND-1000 Thermo Scientific.  
<https://www.lecoindupro.com/ShowAd.aspx?id=414099> Consulté le 20 décembre 2019

Le prof du Web, 2018. Spectrophotométrie.  
[http://www.leprofduweb.com/terminale/s/physique\\_-\\_chimie/les-dosages/spectrophotometrie](http://www.leprofduweb.com/terminale/s/physique_-_chimie/les-dosages/spectrophotometrie)  
Consulté le 20 décembre 2019.

Maxicours, 2019. Ondes lumineuses : mono/polychromatiques.  
<https://www.maxicours.com/se/cours/ondes-lumineuses-mono-polychromatiques/> Consulté le 20 décembre 2019.

McConville, J., Fringuelli, E., Evans, D., Savage, P., 2018. First examination of the Lough Neagh European eel (*Anguilla anguilla*) population for eel virus European, eel virus European



X and Anguillid Herpesvirus-1 infection by employing novel molecular techniques. *J. Fish Dis.* 41, 1783–1791.

Nguyen, T.T., Kempster, J., Panicz, R., 2016. Monitoring of herpesvirus anguillae (AngHV-1) infections in the European eel in north-west Poland. *Med. Weter.* 72, 564-566.

Ozyme, 2019. Quantification et analyse de la pureté des acides nucléiques par spectrophotométrie. dsDNA, ssDNA, RNA, oligonucléotides.

<https://www.ozyme.fr/ressources/cyberlettres/techozyme/techozyme31-quantification-acides-nucleiques.asp> Consulté le 20 décembre 2019.

Qiagen, 2016. Protocol : DNA Purification from tissues (QIAamp DNA Mini Kit). In : Qiagen (Ed.), *QIAamp DNA mini and blood mini handbook*. Qiagen, Etats-Unis, pp. 32-35.

Qiagen, 2019. TissueLyser II. <https://www.qiagen.com/us/products/human-id-and-forensics/automation/tissuelyser-ii/#orderinginformation> Consulté le 27 décembre 2019

Reece, J., Urry, L.A., Cain, M.L., Wasserman, S.A., Minorsky, P.V., Jackson, R.B., Campbell, N. (Eds), 2012. *Campbell Biologie*. 9th edition. Pearson Education, San Francisco, 1458 pp.

Rijsewijk, F., Pritz-Verschuren, S., Kerkhoff, S., Botter, A., Willemsen, M., Van Nieuwstadt, T., Haenen, O., 2005. Development of a polymerase chain reaction for the detection of Anguillid herpesvirus DNA in eels based on the herpesvirus DNA polymerase gene. *J Virol Methods* 124, 87–94.

Sano M, Fukuda H, Sano T (1990) Isolation and characterization of a new herpesvirus from eel. In: Perkins FO, Cheng TC (eds) *Pathology in marine sciences*. Academic Press, San Diego, CA, p 15–31

Sawakinome, 2019. Différence entre SYBR Green et Taqman.

<https://fr.sawakinome.com/articles/biology-science-nature/difference-between-sybr-green-and-taqman.html> Consulté le 30/11/2019

Sawakinome, 2019. Différence entre PCR et qPCR.

<https://fr.sawakinome.com/articles/science/difference-between-pcr-and-qpcr.html> Consulté le 23 décembre 2019

Shih, H.H., Hu, C.W., Wang, C.S., 2003. Detection of Herpesvirus anguillae infection in eel using in situ hybridization. *J. Appl. Ichthyol.* 19, 99 –103.

Shih, H.H., 2004. A polymerase chain reaction for detecting Herpesvirus anguillae in asymptomatic eels. *Taiwania* 49, 1–6.

Sunarto, A., McColl, K.A., Crane, M.S.J., Schat, K.A., Slobedman, B., Barnes, A.C., Walker, P.J., 2014. Characteristics of cyprinid herpesvirus 3 in different phases of infection : Implications for disease transmission and control. *Virus Res.* 188, 45-53.

Thermo Fisher Scientific Inc. (Ed.), 2016. Manuel de l'utilisateur du NanoDrop One. Thermo Fisher Scientific Inc., Etats-Unis, 330 pp.

Thermo Fisher Scientific Inc., 2019. PCR basics.

<https://www.thermofisher.com/be/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/pcr-education/pcr-reagents-enzymes/pcr-basics.html> Consulté le 23 décembre 2019

Thermo Fisher Scientific Inc., 2019. Thermo Scientific™ Plaques PCR 96 puits ABgene™ SuperPlate. <https://www.fishersci.fr/shop/products/thermo-scientific-abgene-superplate-96-well-pcr-plates-18/p-3538790> Consulté le 24 décembre 2019

Thiry, E., 2014. Interactions virus-hôte : virus à ADN bicaténaire. *Virologie vétérinaire*, Université de Liège.

Van Beurden, S.J., Bossers, A., Voorbergen-Laarman, M.H.A., Haenen, O.L.M., Peters, S., Abma-Henkens, M.H.C., Peeters, B.P.H., Rottier, P.J.M., Engelsma, M.Y., 2010. Complete genome sequence and taxonomic position of anguillid herpesvirus 1. *J. Gen. Virol.* 91, 880-887.

Van Beurden, S.J., Leroy, B., Wattiez, R., Haenen, O.L.M., Boeren, S., Vervoort, J.J.M., Peeters, B.P.H., Rottier, P.J.M., Engelsma, M., Vanderplasschen A.F., 2011. Identification and localization of the structural proteins of anguillid herpesvirus 1. *Vet. Res.* 42, 15 pp.

Van Beurden, S.J., 2012. Molecular characterization of the alloherpesvirus anguillid herpesvirus 1. (Thèse de doctorat) Université d'Utrecht : Utrecht, 208 pp.

Van Beurden, S.J., Engelsma, M.Y., Roozenburg, I., Voorbergen-Laarman, M.A., Van Tulden, P.W., Kerkhoff, S., Van Nieuwstadt, A.P., Davidse, A., Haenen, O.L.M., 2012. Viral

diseases of wild and farmed European eel *Anguilla anguilla* with particular reference to the Netherlands. *Dis. Aquat. Org.* 101, 69–86.

Van Beurden, S.J., Voorbergen-Laarman, M.A., Roozenburg, I., van Tellingen, J., Haenen, O.L.M., Engelsma, M.Y., 2016. Development and validation of a real-time PCR assay for the detection of anguillid herpesvirus 1. *J. Fish Dis.* 39, 95–104.

Van Ginneken, V.J.T., Haenen, O.L.M., Coldenhoff, K., Willemze, R., 2004. Presence of eel viruses in eel species from various geographic regions. *Bull Eur Assoc Fish Pathol* 24, 268–272.

Van Ginneken, V.J.T., Maes, G.E., 2005. The European eel (*Anguilla anguilla*, Linnaeus), its lifecycle, evolution and reproduction : a literature review. *Rev Fish Biol Fish* 15, 367–398.

Van Nieuwstadt, A.P., Dijkstra, S.G., Haenen, O.L.M., 2001. Persistence of herpesvirus of eel *Herpesvirus anguillae* in farmed European eel *Anguilla anguilla*. *Dis. Aquat. Org.* 45, 103–107.

Varvarigos, P., Vendramin, N., Cappellozza, E., Bovo, G., 2011. First confirmation of herpes virus *anguillae* (HVA) and infectious pancreatic necrosis (IPN) virus infecting European eel *Anguilla anguilla* farmed in Greece. *Bull. Eur. Assoc. Fish. Pathol.* 31, 101–111.

Waltzek, T.B., Kelley, G.O., Alfaro, M.E., Kurobe, T., Davison, A.J., Hedrick, R.P., 2009. Phylogenetic relationships in the family Alloherpesviridae. *Dis Aquat Organ* 84, 179–194.