

# **EPIDEMIOLOGIE MOLECULAIRE DE LA MALADIE D'AJESZKY EN FRANCE**

A. JESTIN, P. BLANCHARD, P. VANNIER

*Ministère de l'Agriculture, Station de Pathologie Porcine, BP 9, 22440 - PLOUFRAGAN, FRANCE*

## **INTRODUCTION**

La maladie d'Aujeszky se manifeste chez le porc charcutier par des troubles respiratoires, des troubles nerveux et de la mortalité chez le jeune porcelet et des avortements (BASKERVILLE et al, 1973 ; ANDRIES et al, 1987 ; KLUNE et MARE ; 1974, HSU et al, 1981).

De nombreuses différences dans les propriétés biologiques des souches isolées ont été décrites (BASKERVILLE et al, 1973) et des études ont tenté de définir des marqueurs biologiques tels la description des effets cytopathiques, la sensibilité à la trypsine, à la chaleur (BARTHA et al, 1969) ou le profil de migration en électrophorèse des fragments de digestion du DNA par les enzymes de restriction (GIELKENS et al, 1985).

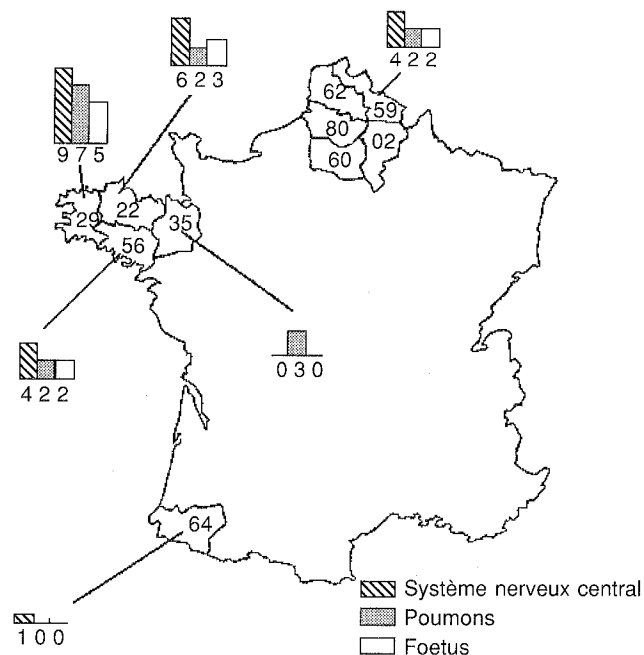
L'observation de tableaux cliniques très différents d'un élevage à l'autre nous a conduit à isoler dans différentes régions des souches dans des foyers de maladie d'Aujeszky où prédominait une des trois entités cliniques : troubles nerveux, pathologie respiratoire, avortement. La virulence de ces souches a été déterminée dans des modèles animaux décrits par d'autres auteurs : le modèle souris (PLATT et al, 1980, HARKNESS et SAND, 1985), le modèle poussin (LOMNICZI et al, 1984), le modèle porcelet (KLUGE et al, 1986 ; BERNS et al, 1985). L'article présente l'utilisation du profil génomique d'une souche comme marqueur épidémiologique ou marqueur des propriétés biologiques.

## **1. MATERIEL ET METHODES**

### **1.1. Les souches de virus**

Les 45 souches étudiées ont été isolées en France entre 1980 et 1987 dans les 4 départements bretons, les départements du Nord et des Pyrénées Atlantiques. Toutes les souches ont été isolées du porc. Les virus ont été isolés, soit des encéphales de jeunes porcelets, soit des poumons de porcs charcutiers, soit d'avortons (Figure 1).

**FIGURE 1**  
ORIGINE GEOGRAPHIQUE DES SOUCHES ET TABLEAUX CLINIQUES ASSOCIES



Les virus ont été isolés en cultures cellulaires (PK15) et un stock viral, produit après deux passages en cultures cellulaires, a été stocké à - 70° C.

### **1.2. Etude de la virulence des souches dans le modèle souris**

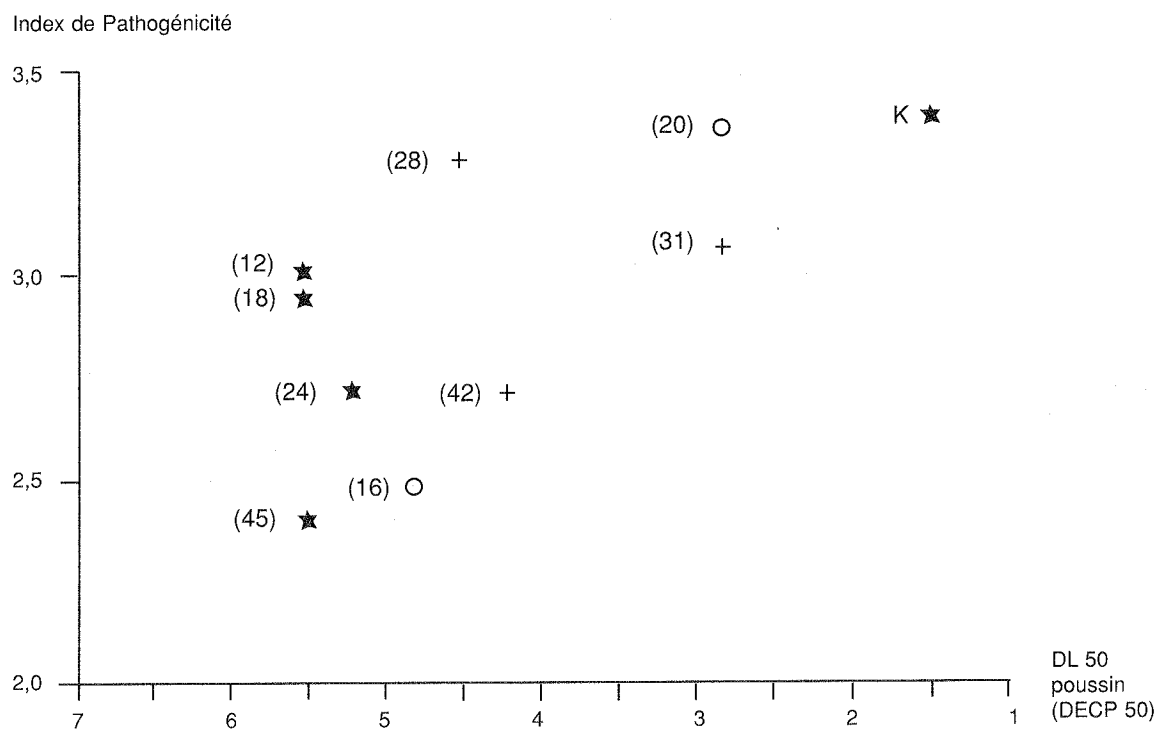
Le protocole employé est celui décrit par HARKNESS et SAND (1985). Des souris (Swiss-white) pesant entre 10 et 12 g sont allotées par groupes de 10. Chaque souris, inoculée par voie sous-cutanée dans la région du cou, reçoit 0,1 ml d'une suspension titrant 10<sup>4</sup> DECP50. Les souris sont observées toute les six heures et sont notés ; la durée de

**TABEAU 1**  
**INDEX DE PATHOGENICITE SUR SOURIS DE 45 SOUCHES DE V. M. A. ET RELATION**  
**AVEC LA DATE ET L'ORIGINE DU PRELEVEMENT**

|                                     | Année | DEPARTEMENTS D'ORIGINE                                                                      |                                                              |              |                              |              |                                           |
|-------------------------------------|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|--------------|------------------------------|--------------|-------------------------------------------|
|                                     |       | 29                                                                                          | 22                                                           | 56           | 35                           | 64           | 59                                        |
| Système nerveux central du porcelet | 1981  | n° 21 (2,81)                                                                                |                                                              |              |                              |              |                                           |
|                                     | 1984  | n° 1 (2,98)<br>n° 8 (3,30)<br>n° 29 (2,93)<br>n° 35 (2,98)                                  | n° 44 (2,68)                                                 |              |                              |              |                                           |
|                                     | 1985  | n° 37 (2,73)<br>n° 39 (2,73)<br>n° 2 (3,04)<br>n° 4 (3,01)                                  | n° 26 (2,59)<br>n° 32 (2,68)<br>n° 36 (2,78)<br>n° 18 (2,95) | n° 45 (2,41) |                              | n° 12 (3,02) | n°17 (2,78)                               |
|                                     | 1986  |                                                                                             | n° 24 (2,73)                                                 |              |                              |              | n° 3 (2,98)<br>n°10 (3,08)<br>n°25 (3,20) |
|                                     |       |                                                                                             |                                                              |              |                              |              |                                           |
| Poumons de porcs                    | 1980  | n° 6 (2,58)                                                                                 |                                                              |              |                              |              |                                           |
|                                     | 1985  | n° 9 (2,83)<br>n° 19 (2,64)<br>n° 23 (3,08)<br>n° 30 (2,98)<br>n° 38 (2,68)<br>n° 34 (2,99) | n° 28 (3,30)                                                 |              | n° 42 (2,73)<br>n° 43 (3,24) |              | n°14 (2,51)                               |
|                                     |       |                                                                                             |                                                              |              |                              |              |                                           |
|                                     | 1986  |                                                                                             | n° 22 (3,16)                                                 |              | n° 31 (3,10)                 |              | n°11 (3,08)                               |
|                                     |       |                                                                                             |                                                              |              |                              |              |                                           |
| Avortons                            | 1985  | n° 7 (2,81)                                                                                 | n° 20 (3,39)                                                 |              |                              |              |                                           |
|                                     | 1986  | n° 13 (2,64)<br>n° 27 (2,64)<br>n° 33 (2,83)<br>n° 40 (2,89)                                | n° 41 (3,12)<br>n° 16 (2,50)                                 |              |                              |              | n°15 (2,78)                               |
|                                     |       |                                                                                             |                                                              |              |                              |              |                                           |
|                                     | 1987  |                                                                                             |                                                              |              |                              |              | n° 5 (2,73)                               |

**FIGURE 2**

CORRELATION ENTRE VIRULENCE DETERMINEE DANS LE MODELE POUSSIN (DL50) ET LE MODELE SOURIS (IP) POUR 9 SOUCHES DE VMA ISOLEES DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL (\*), DU POUMON (O) OU D'AVORTON (+)



survie, le taux de mortalité et le pourcentage de prurit défini par l'existence d'un grattage entraînant une dépilation et une abrasion visible de la peau. Un index de pathogénicité ( $I_p$ ) a été calculé pour chaque souche en utilisant la formule suivante d'HARKNESS.

$$I_p = 100 \left( 1 + T_m \right) \left( 1 + \frac{T_p}{2} \right) \frac{1}{TMS}$$

$T_m$  = Taux de mortalité

$T_p$  = Taux de prurit

TMS = Temps Moyen de Survie (en heures)

Les encéphales et les poumons des animaux morts sont broyés et le titre en virus est défini en cultures cellulaires. Le rapport des concentrations virales du cerveau et du poumon est calculé pour les souches étudiées.

### 1.3. Etude de la virulence des souches dans le modèle poussin

Le protocole adopté est celui décrit par LOMNICZI (LOMNICZI et al, 1984). Des poussins de un jour reçoivent par injection intracérébrale, sous un volume de 50  $\mu$ l, une dose de virus. Chaque lot de cinq poussins reçoit une dilution virale. Le nombre de morts est retenu pour la détermination de la dose létale 50 p. cent (DL50).

### 1.4. Etude de la virulence des souches dans le modèle porcelet

Des porcelets SPF âgés de 3 semaines par groupe de 7, reçoivent par voie intranasale une dose de  $10^5$  DECP<sub>50</sub> de virus. Les signes cliniques et la température rectale sont relevés deux fois par jour pendant une période de quinze jours.

### 1.5. Etude du profil de migration des fragments du génome après digestion par des enzymes de restriction

Le DNA est obtenu par une technique dite rapide, décrite par JESTIN (JESTIN et al, 1988). Le DNA est purifié à partir de la fraction cytoplasmique cellulaire et est digéré par l'enzyme de restriction Bam HI qui coupe le génome en des sites spécifiques dits sites de clivage. Les fragments, de longueur différente, une quinzaine, sont séparés par électrophorèse en gel de polyacrylamide. Les profils de migration obtenus, selon le principe général d'une migration plus rapide dans le gel des fragments les plus courts, peuvent être comparés entre eux après coloration par le nitrate d'argent, technique récemment appliquée à l'étude du génome des virus de la maladie d'Aujeszky (JESTIN et al, 1988). Les différences obtenues correspondent, soit à une modification du nombre de sites de clivage, soit à une modification de la longueur des fragments. Ces altérations se traduisent respectivement, soit par la modification du nombre de fragments, soit par un déplacement d'une des bandes dans le profil. Sur ce principe d'analyse des profils, le génome des souches a pu être comparé.

## 2. RESULTATS

### 2.1. Les souches

Toutes les souches ont été isolées chez le porc. L'origine géographique des souches ainsi que le tissu à partir duquel le virus a été isolé sont présentés dans le Tableau 1. La

majorité des souches est isolée dans l'Ouest de la France et le plus souvent d'encéphales de jeunes porcelets morts après avoir présenté des troubles nerveux.

### 2.2. La virulence des souches dans les modèles animaux : souris, poussins et porcelets

Au total 45 souches ont été testées dans le modèle souris, 9 dans le modèle poussin et 4 dans le modèle porcelet.

La virulence des souches virales a été déterminée dans le modèle souris (Tableau 1). L'index de virulence varie entre 2,41 (souche no 45) et 3,39 (souche no 20), l'index de virulence moyen est  $I_p = 2,88 \pm 0,133$ . Toutes les souches isolées dans cette étude se révèlent être pathogènes pour la souris, cependant cette virulence est variable et des souches nettement moins pathogènes existent dans le lot de souches isolées.

La détermination de la virulence de certaines souches retenues pour une étude complémentaire dans le modèle poussin, démontre clairement que la virulence des souches n'est pas homogène. La dose létale 50 p. cent varie entre  $10^{2,8}$  pour les souches les plus pathogènes et  $10^{5,5}$  DECP<sub>50</sub> pour les souches les moins pathogènes (figure 2). Toutes les souches inoculées par voie intracérébrale se révèlent être pathogènes pour le poussin et une importante hétérogénéité de virulence est confirmée dans ce nouveau modèle animal.

Le pouvoir pathogène de quatre souches sauvages a été déterminée dans le modèle porcelet et leur virulence comparée à celle de deux souches de référence ; la souche virulente Kojnok et la souche hypovirulente NIA4 (tableau 2). Les fréquences d'apparition des symptômes de nature diverse (ataxie, éternuements, dyspnée, vomissements...) sont très variables d'une souche à l'autre. Elles augmentent considérablement pour les souches les plus virulentes (no 31). L'étude des gains moyens quotidiens, de la durée de survie sont autant de paramètres évoluant très étroitement avec le taux de mortalité. Ainsi ce paramètre unique est le seul retenu pour la détermination de la virulence des souches. La souche 31 est très pathogène pour le porcelet, la souche 18 se révèle moyennement pathogène, les deux autres souches (16, 45) se révèlent peu pathogènes pour le porcelet dans ce modèle.

La corrélation existant entre la virulence déterminée dans ces trois modèles animaux ne peut être définie mathématiquement compte tenu du nombre trop restreint de souches étudiées. Les résultats présentés dans la figure 2 bis permettent d'apprécier cette corrélation. Un premier groupe de souches (12, 18, 24, 45) présente un index de virulence différent dans le modèle souris alors que ces souches s'avèrent toutes peu pathogènes dans le modèle poussin. Ces souches ont la particularité d'avoir été isolées du tissu nerveux de porcelets (Figure 2). Les résultats présentés dans la figure 2 bis permettent d'apprécier l'intérêt des deux modèles animaux souris et poussin dans la détermination de la virulence d'une souche pour le porcelet.

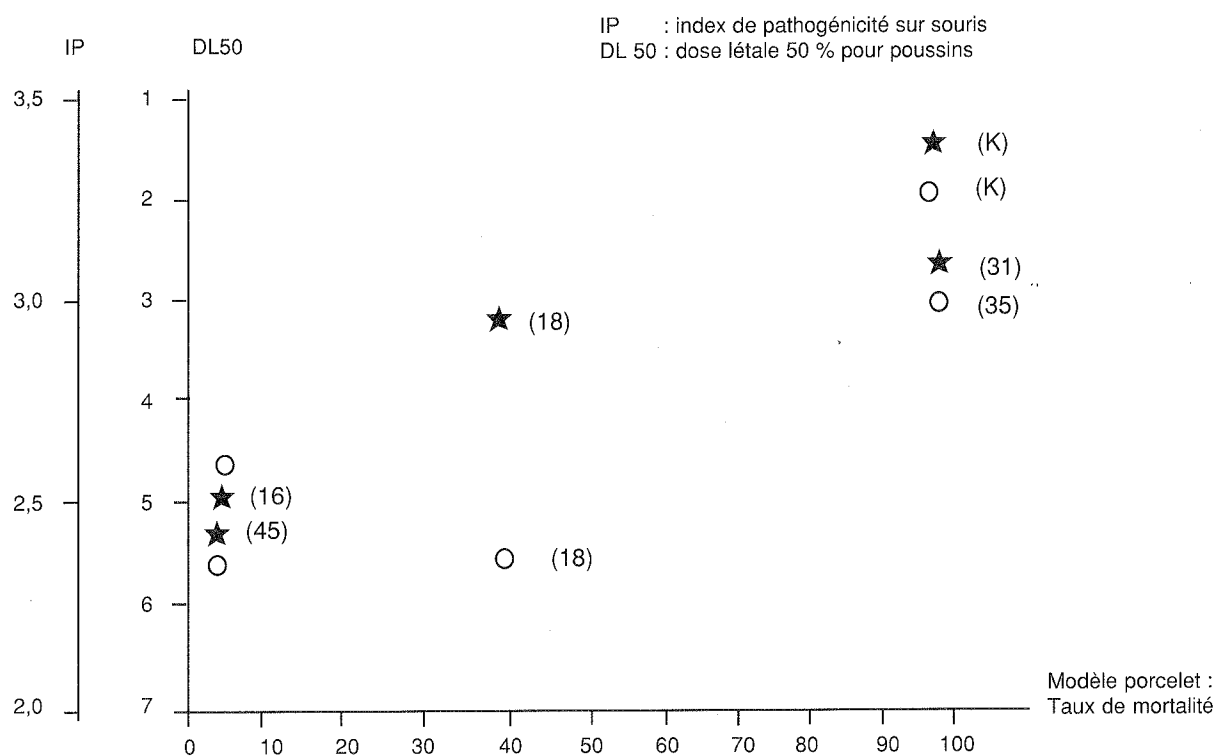
### 2.3. Le tropisme des souches pour le système nerveux et l'appareil pulmonaire

Quatre souches sauvages (tableau 3) et deux souches de référence ont été injectées aux souris. Afin de définir un éventuel tropisme pour le tissu pulmonaire ou le tissu nerveux, le virus a été recherché et titré dans le poumon et le cerveau des souris. La souche virulente (no 31) est retrouvée

**TABLEAU 2**  
VIRULENCE DES SOUCHES VIRALES POUR LE PORCELET

| PARAMETRES       |        |       |                     | SCORE CLINIQUE (Fréquence) |                   |        |         |
|------------------|--------|-------|---------------------|----------------------------|-------------------|--------|---------|
|                  | Nombre | Poids | Nombre Observations | Mortalité                  | Hyperthermie > 40 | Ataxie | Dyspnée |
| Kojnok           | 6      | 4,21  | 21                  | 1,00                       | 0,71              | 0,30   | 0,30    |
| no 31            | 7      | 5,20  | 25                  | 1,00                       | 0,76              | 0,25   | 0,32    |
| no 18            | 5      | 4,64  | 71                  | 0,40                       | 0,54              | 0,10   | 0,20    |
| no 16            | 7      | 4,77  | 100                 | 0,00                       | 0,46              | 0,07   | 0,10    |
| no 45            | 6      | 4,38  | 66                  | 0,00                       | 0,30              | 0,01   | 0,05    |
| NIA <sub>4</sub> | 6      | 5,50  | 72                  | 0,00                       | 0,08              | 0,00   | 0,00    |
| Témoins          | 5      | 4,70  | 45                  | 0,00                       | 0,00              | 0,00   | 0,00    |

**FIGURE 2 BIS**  
CORRELATION DES RESULTATS DE VIRULENCE OBTENUS DANS LE MODELE POUSSIN, SOURIS ET PORCELET



dans le cerveau et le poumon à des titres comparables. La souche moyennement pathogène (no 18) se multiplie dans les deux appareils de façon équivalente mais le virus n'est retrouvé qu'à un titre faible. Quant aux deux autres souches peu virulentes (no 16, 45) le virus se réplique préférentiellement dans le cerveau des souris.

L'étude du neurotropisme a été poursuivie dans le modèle poussin inoculé par la voie intracérébrale. Deux groupes de souches peuvent être considérés (figure 3). La souche Kojnok

et la souche no 31 sont pathogènes pour le poussin. Les virions sont retrouvés dans l'encéphale à des titres élevés. Les souches no 14, 18 et 45 se répliquent dans le cerveau mais la répllication des souches no 18 et 45 est considérablement ralentie dès le 3<sup>e</sup> jour peu avant la mort des animaux. La souche NIA<sub>4</sub> s'est répliquée dans l'encéphale mais les virions n'ont plus été retrouvés après le 3<sup>e</sup> jour.

La souche moyennement pathogène (no 18) ne présente pas de tropisme plus prononcé pour le tissu pulmonaire ou

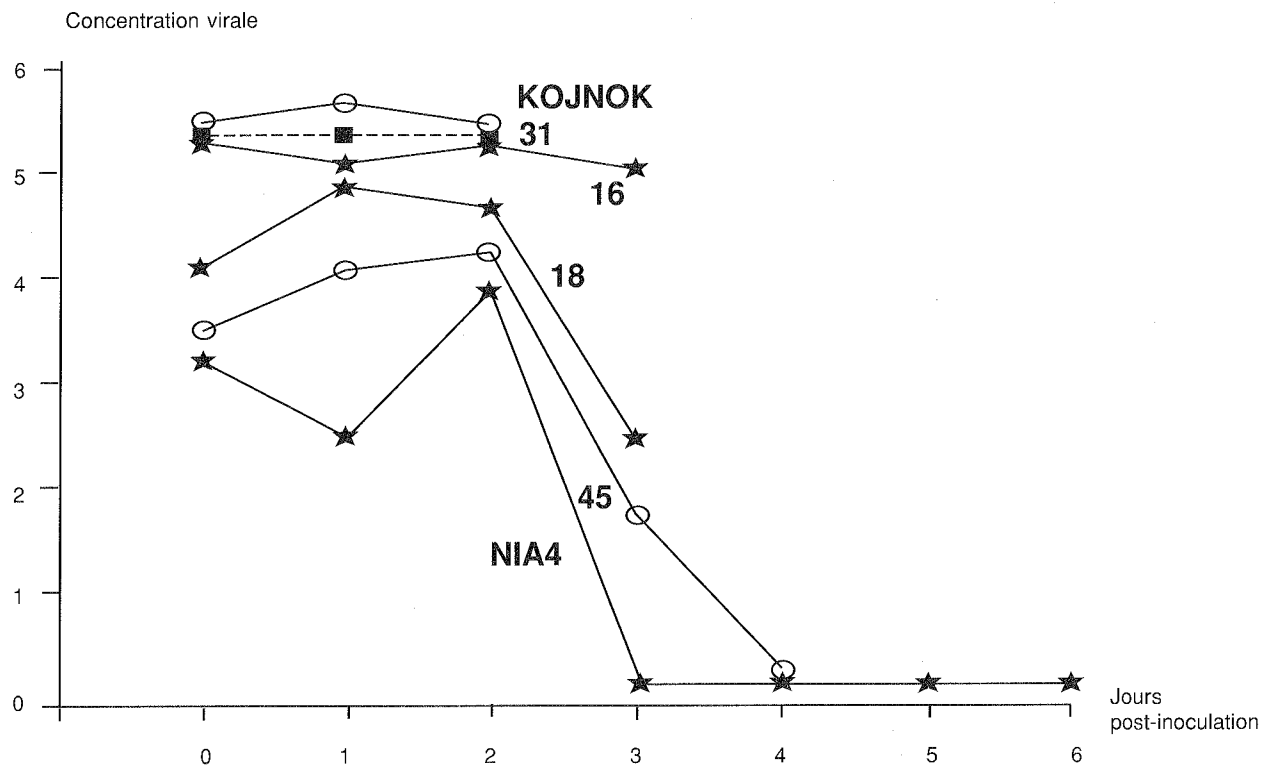
nerveux. Par contre les deux souches moins pathogènes présentent pour le système nerveux chez la souris un tropisme plus marqué relativement au tissu pulmonaire ; en revanche le neurotropisme d'une de ces deux souches n'est

pas confirmé dans le modèle poussin (souche no 45). De toute évidence ces trois souches présentent dans les modèles animaux utilisés un neurotropisme différent.

**TABEAU 3**  
TROPISME DE 6 SOUCHES DE V. M. A. POUR LE POUMON ET LE CERVEAU DETERMINE CHEZ LA SOURIS

| Souches          | Nombres | Encephales<br>DECP <sub>50</sub> | Poumon<br>DECP <sub>50</sub> | ENCEPHALE/<br>POUMON |
|------------------|---------|----------------------------------|------------------------------|----------------------|
| KOJNOK           | 10      | 4,70                             | 4,40                         | 1,07                 |
| no 31            | 10      | 4,92                             | 4,20                         | 1,17                 |
| no 18            | 10      | 2,34                             | 2,18                         | 1,07                 |
| no 16            | 10      | 4,3                              | 2,5                          | 1,6                  |
| no 45            | 7       | 3,2                              | 1,7                          | 1,88                 |
| NIA <sub>4</sub> | 6       | 4,7                              | 2,2                          | 2,13                 |
| CONTROL          | 10      | 0                                | 0                            | 0                    |

**FIGURE 3**  
REPLICATION DANS L'ENCEPHALE DU POUSSIN DE DIFFERENTES SOUCHES DE WMA PRES INOCULATION INTRA-CEREBRALE



## 2.4 . Comparaison des génomes des souches de virus de la maladie d'Aujeszky

La technique d'électrophorèse en polyacrylamide permet de séparer des fragments non ségrégués en gel d'agarose, générant ainsi des profils légèrement différents de ceux obtenus en gel d'agarose (JESTIN et al, 1988).

### 2.4.1. Les types de profils

Les 45 souches étudiées peuvent être divisées en deux groupes. Le premier groupe (4 des 45 souches) présente un profil identique au profil de référence de la souche NIA3 (Type 1, figure 4). Il comprend le sous-type 1a comprenant un fragment 6 plus court (figure 4), (no 6, 21) et le sous-type 1b

comprenant un fragment no 12 plus court (figure 4) (no 14-17).

Le second groupe (41 des 45 souches) est caractérisé par l'absence du fragment no 2 (figure 5). L'existence d'un site supplémentaire donne naissance à deux fragments 2a et 2b situés plus bas dans le gel (figure 5). Trois types sont rencontrés.

Sur la base de l'absence du groupe de bandes 8-8-8' un sous-type 2c est décrit. Il se définit par l'absence du site de clivage entre les fragments 8 et 8' et les fragments 8 et 13 (figure 5) (no 25).

Une souche présente un fragment no 1 plus court. Ce sous-type 1b a rarement été décrit.

Dans notre travail le type 2a a fait l'objet d'une étude complémentaire et cinq sous-types différents ont été décrits (figure 6).

Le sous-type 2a<sub>1</sub> présente un profil identique au profil de type II décrit par HERRMANN (1984). 27 des 45 souches possèdent ce profil.

Le second sous-type (2a<sub>2</sub> - figure 6) se caractérise par la mobilité des fragments 5-5' (no 2, 34).

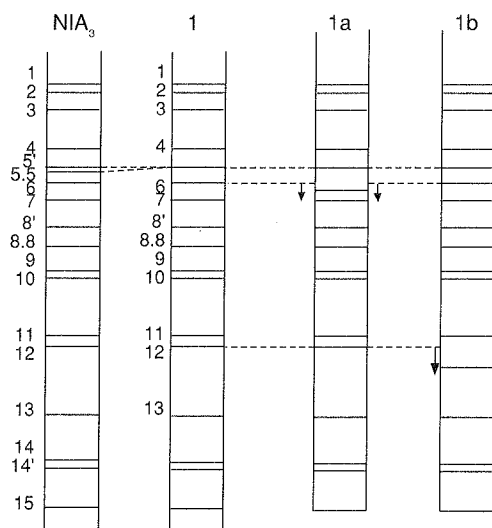
Le sous-type 2a<sub>3</sub> n'est retrouvé que dans une seule souche (no 16) et se caractérise par un regroupement des bandes 5-5-2b - 5'.14'.

Les sous-types 2a<sub>4</sub> et 2a<sub>5</sub> (figure 6) présentent des différences dans la position et la molarité des bandes 2b, 5-5. La bande bimolaire 5-5 est probablement localisée au-dessus de la bande 2b (sous-type 2a<sub>4</sub>) ou au-dessous (sous-type 2a<sub>5</sub>).

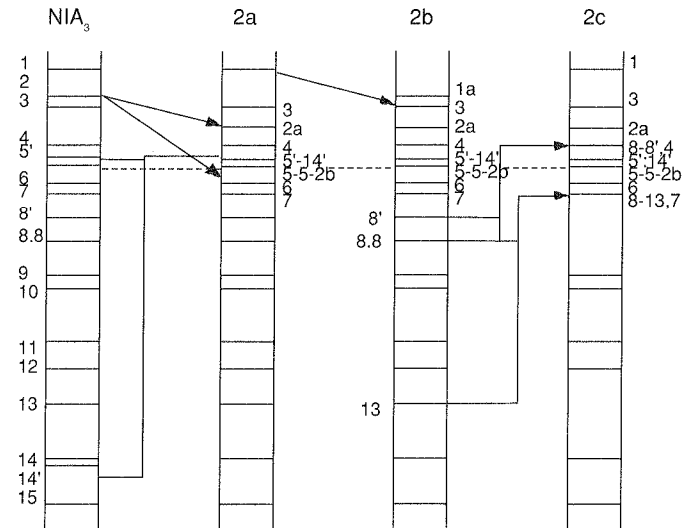
Une seule souche présente le profil génomique du sous-type 2a<sub>1</sub> (no 4).

Huit souches possèdent le profil génomique du sous-type 2a<sub>5</sub> (no 10, 11, 15, 18, 20, 35, 42, 43).

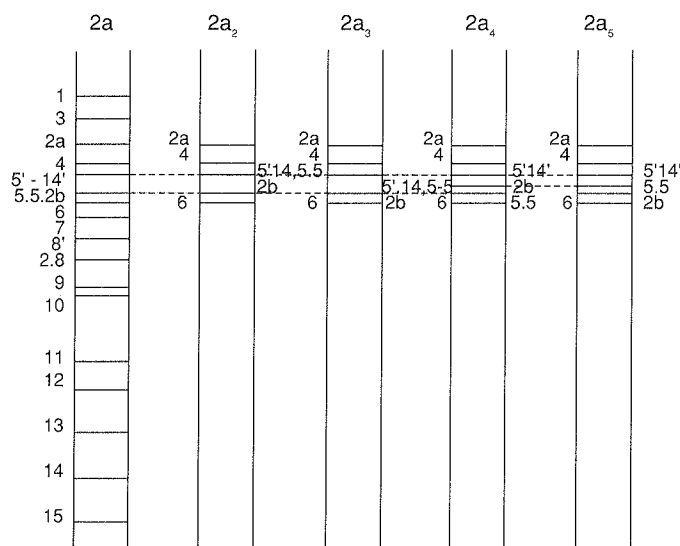
**FIGURE 4**  
GENOME TYPE 1



**FIGURE 5**  
GENOME TYPE 2



**FIGURE 6**  
GENOME TYPE 2a ET SOUS-TYPES 1-2-3-4-5



## 2.4. 2. Evolution des profils avec le temps et relation avec la région

**TABEAU 4**  
PROFIL GENOMIQUE EN RELATION AVEC LA DATE ET L'ORIGINE DU PRELEVEMENT

| Type | s/type | Année | FIN.                                                                                         | C. d. N.                                        | MORB.    | I. et V.             | PYR.ATL   | NORD                           |
|------|--------|-------|----------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|----------|----------------------|-----------|--------------------------------|
| 1    | 1a     | 1980  | n° 6 Pm                                                                                      |                                                 |          |                      |           |                                |
|      |        | 1981  | n° 21 CNS                                                                                    |                                                 |          |                      |           |                                |
|      | 1b     | 1985  |                                                                                              |                                                 |          |                      |           | n°14 Pm<br>n°17 CNS            |
| 2    | 2a1    | 1984  | n° 1 CNS<br>n° 8 CNS<br>n° 29 CNS                                                            | n° 44 CNS                                       |          |                      |           |                                |
|      |        | 1985  | n° 37 CNS<br>n° 39 CNS<br>n° 9 Pm<br>n° 19 Pm<br>n° 23 Pm<br>n° 30 Pm<br>n° 38 Pm<br>n° 7 Ab | n° 26 CNS<br>n° 32 CNS<br>n° 36 CNS<br>n° 28 Pm |          |                      | n° 12 CNS |                                |
|      |        | 1986  | n° 13 Ab<br>n° 27 Ab<br>n° 33 Ab<br>n° 40 Ab                                                 | n° 22 Pm<br>n° 41 Ab<br>n° 24 CNS               |          | n°31 Pm              |           | n° 3 CNS                       |
|      |        | 1987  |                                                                                              |                                                 |          |                      |           | n° 5 Ab                        |
|      | 2a2    | 1985  | n° 2 CNS<br>n° 34 Pm                                                                         |                                                 |          |                      |           |                                |
|      | 2a3    | 1986  |                                                                                              | n° 16 Ab                                        |          |                      |           |                                |
|      | 2a4    | 1985  | n° 4 CNS                                                                                     |                                                 |          |                      |           |                                |
|      | 2a5    | 1984  | n° 35 CNS                                                                                    |                                                 |          |                      |           |                                |
|      |        | 1985  |                                                                                              |                                                 |          | n° 42 Pm<br>n° 43 Pm |           |                                |
|      |        | 1986  |                                                                                              |                                                 |          |                      |           | n°10 CNS<br>n°11 Pm<br>n° 15Ab |
|      | b      | 1985  |                                                                                              |                                                 | no45 CNS |                      |           |                                |
|      | c      | 1986  |                                                                                              |                                                 |          |                      |           | n° 25 CNS                      |

- C. N. S. : système nerveux central
- Pm : poumons
- Ab : Avortons

Les souches virales de type génomique 1 ont été isolées dans le Finistère en 1980 et 1981. En France ce profil n'a plus été retrouvé ultérieurement. Ce n'est qu'en 1985 que deux souches présentant ce profil génomique ont été isolées dans le Nord de la France (tableau 4).

Les souches virales possédant un profil génomique de sous-type 2a1 sont retrouvées dans tous les départements et de préférence isolées de l'encéphale de jeunes porcelets en 1984, de poumons de porcs en 1985 et le plus souvent d'avortons en 1986.

Les virus de sous-types 2a 2-3-4 sont isolés de divers organes dans le Finistère et les Côtes-du-Nord. Quant aux souches de sous-type 2a5, elles ont été isolées dans différents départements.

L'exemplaire unique possédant un profil de sous-type 2b a été isolé dans le Morbihan à partir du cerveau d'un jeune porcelet en 1985 (souche no 45).

L'exemplaire unique possédant un profil de sous-type 2c a été isolé dans le Nord de la France en 1986 du cerveau d'un jeune porcelet.

### 2.4.3. Essai de corrélation avec la virulence

Les souches de type 1 sont des souches moins virulentes. Les souches virales présentant une bande no 12 plus courte (type 1b) ne se révèlent pas être moins virulentes que les souches ne connaissant pas cette altération du génome (type 1a).

La virulence des souches du sous-type 2a1, le groupe le plus important, n'est pas homogène. L'index de pathogénicité varie entre 2,59 (souches no 26) et 3,3 (souches no 28).

La souche de sous-type 2a3 (no 16) est peu virulente chez la souris (IP = 2,50), le poulet et le porcelet.

L'absence du site de clivage décrit pour le sous-type 2c (souche no 25) n'affecte par la virulence de la souche pour la souris (IP = 3,20).

Quant à la souche no 45 dont la bande 1 est plus courte, elle s'avère très peu pathogène pour la souris, le poussin et le porcelet.

## 3. DISCUSSION

### 3.1. La virulence

L'intérêt de ce travail est dans la mise au point d'un outil permettant l'identification des souches provenant des élevages. Ces dernières années, nous avons été confronté à l'existence de cas de maladie d'Aujeszky inapparente, pour lesquels la séroconversion était le seul signe de l'infection. L'existence de souches moins pathogènes a été imputée. Dans cette étude nous avons isolé 45 souches et déterminé leur virulence dans des modèles animaux ; souris et poussins. Notre étude démontre que la souris est un bon modèle pour la détermination de la virulence des souches pour le porc. Les résultats sont en accord avec d'autres auteurs (CHONG et FORSTER, 1987). La virulence des souches sauvages a été étudiée dans le modèle souris dans d'autres pays (MOCSARI, 1981 ; PLATT et al, 1980 ; HARKNESS et SAND, 1985). Selon leurs travaux toutes les souches se révélaient pathogènes. Notre étude confirme ces résultats, en effet toutes les souches se révèlent être virulentes mais une grande hétérogénéité existe et certaines souches se sont révélées être peu pathogènes.

L'inoculation par voie intracérébrale à des poussins a été effectuée pour l'étude génétique de la neurovirulence (LOMNICZI et al, 1984). Dans notre étude, la virulence de la souche est étroitement liée à la réplication de cette souche dans l'encéphale.

Le modèle porcelet a déjà été utilisé pour mettre en évidence l'existence de souches moins virulentes (Mc CULLOUGH et TODD, 1988, Van OIRSCHOT et al, 1985). En effet, récemment Mc CULLOUGH a isolé une souche très peu pathogène en Irlande du Nord dans un élevage où l'infection était subclinique.

### 3.2. Epidémiologie moléculaire

Les profils génomiques ont été étudiés par de nombreux auteurs (GIELKENS et al, 1985 ; CHRISTENSEN et al, 1987 ; PAUL et al, 1982 ; PRITCHETT et al, 1984 ; NISHIMORI et al, 1987 ; PIRTLE et al, 1984 ; LUDWIG et al, 1982 ; TODD

et Mac FERRAN, 1985). Des systèmes de classification diverses ont été proposés. GIELKENS (1985) a proposé une classification en 6 différents groupes. Plus récemment CHRISTENSEN a proposé un système de classification des souches isolées au Danemark en trois types et différents sous-types (CHRISTENSEN et SOERENSENS, 1988, CHRISTENSEN et al, 1988). Dans notre classification, le type 1 est le prototype I de HERRMANN (1984) et CHRISTENSEN (1988), le groupe 1 de GIELKENS (1985). Le type 2 (sous-type 2a) correspond au prototype II de ces auteurs. L'absence de site de restriction BamH1 dans les séquences répétées terminale et interne est une altération génomique qui a été décrite au Danemark (CHRISTENSEN et al, 1988). Cependant le profil génomique de cette souche était de type I et non pas de type II comme c'est le cas pour la souche isolée en France (sous-type 2c).

Le profil génomique de sous-type 2b a été décrit pour une seule souche. L'absence de bande 1 a déjà été décrite dans 6 des 92 souches étudiées par GIELKENS (1985) en Hollande. Ce profil génomique était le résultat de l'existence d'un site supplémentaire de clivage par BamH1 coupant le fragment 1 en 1a et 1b. Au Japon des souches de ce type ont déjà été décrites (NISHIMORI et al, 1987).

La technique d'électrophorèse en gel de polyacrylamide utilisée dans cette étude permet de mieux séparer certains fragments relativement à l'électrophorèse en gel d'agarose. Si les fragments longs (bandes 1, 2, 3) sont peu ségrégés, par contre les fragments des bandes 5-5'-6 sont bien séparés, à tel point qu'une classification élaborée en sous-types a été rendue possible pour les profils génomiques de type 2a. Cinq sous-types ont été décrits. L'identification précise de ces bandes n'a pas été effectuée par les techniques d'hybridation en southern-blot. Ce travail permettrait de consolider la validité de ce système de classification et des interprétations effectuées.

### 3.3. Evolution dans l'espace et le temps

Sur la base de notre système de classification la majorité de nos souches possède le profil génomique des souches dites d'Europe Centrale. Plusieurs souches appartenant au type 1 (type d'Irlande du Nord) furent trouvées en France il y a quelques années. Ces souches ont été étudiées par GIELKENS (1985) et les résultats suggèrent que les souches dites d'Europe Centrale ont remplacé les souches de type 1 dites d'Irlande du Nord. En effet dans notre étude, seules deux souches isolées dans le Finistère en 1980-1981 possédaient un profil génomique de type 1. Ce n'est qu'en 1985 que des souches de ce type furent retrouvées dans le Nord de la France, suggérant le rôle non négligeable des pays tiers dans l'introduction de souches virales nouvelles. L'application de ces techniques d'étude des profils génomiques comme outil de suivi épidémiologique a été faite par CHRISTENSEN pour démontrer l'origine des souches de VMA introduites au Danemark (CHRISTENSEN et al, 1988).

Deux nouveaux sous-types furent décrits : le sous-type 2b pour une souche isolée dans le Morbihan et le sous-type 2c pour une souche isolée dans le Nord. Des profils analogues ont été décrits au Japon et en Hollande. Aucune information épidémiologique n'a permis d'établir une quelconque relation avec ces pays. Ces observations suggèrent que les modifications génétiques survenant dans certaines séquences entraînant des modifications du profil génomique peuvent survenir dans certaines zones et indépendamment des modi-

fications survenues au préalable, ceci infirme le projet de CHRISTENSEN d'établir un arbre "généalogique" de l'apparition chronologique des types et des sous-types.

Il ressort de cette étude que le type 2 est dominant en France comme d'autres sous-types sont dominants en Irlande du Nord (TODD et Mc FERRAN, 1985), au Danemark (CHRISTENSEN et al, 1987) aux USA (PIRTLE et al, 1984) et au Japon (NISHIMORI et al, 1987). Cependant des variations détectables dans ce profil génomique spécifique ont été décrites (GIELKENS et al, 1985). Dans notre étude en polyacrylamide ces modifications ont été très bien détectées.

Le profil génomique de sous-type 2b a été décrit pour une seule souche. L'absence de bande 1 a déjà été décrite dans 6 des 92 souches étudiées par GIELKENS (1985) en Hollande. Ce profil génomique était le résultat de l'existence d'un site supplémentaire de clivage par BamH1 coupant le fragment 1 en 1a et 1b. Au Japon des souches de ce type ont déjà été décrites (NISHIMORI et al, 1987).

La technique d'électrophorèse en gel de polyacrylamide utilisée dans cette étude permet de mieux séparer certains fragments relativement à l'électrophorèse en gel d'agarose. Si les fragments longs (bandes 1, 2, 3) sont peu ségrégués, par contre les fragments des bandes 5-5'-6 sont bien séparés, à tel point qu'une classification élaborée en sous-types a été rendue possible pour les profils génomiques de type 2a. Cinq sous-types ont été décrits. L'identification précise de ces bandes n'a pas été effectuée par les techniques d'hybridation en southern-blot. Ce travail permettrait de consolider la validité de ce système de classification et des interprétations effectuées.

### 3.3. Evolution dans l'espace et le temps

Sur la base de notre système de classification la majorité de nos souches possède le profil génomique des souches dites d'Europe Centrale. Plusieurs souches appartenant au type 1 (type d'Irlande du Nord) furent trouvées en France il y a quelques années. Ces souches ont été étudiées par GIELKENS (1985) et les résultats suggèrent que les souches dites d'Europe Centrale ont remplacé les souches de type 1 dites d'Irlande du Nord. En effet dans notre étude, seules deux souches isolées dans le Finistère en 1980-1981 possédaient un profil génomique de type 1. Ce n'est qu'en 1985 que des souches de ce type furent retrouvées dans le Nord de la France, suggérant le rôle non négligeable des pays tiers dans l'introduction de souches virales nouvelles. L'application de ces techniques d'étude des profils génomiques comme outil de suivi épidémiologique a été faite par CHRISTENSEN pour démontrer l'origine des souches de VMA introduites au Danemark (CHRISTENSEN et al, 1988).

Deux nouveaux sous-types furent décrits : le sous-type 2b pour une souche isolée dans le Morbihan et le sous-type 2c pour une souche isolée dans le Nord. Des profils analogues ont été décrits au Japon et en Hollande. Aucune information épidémiologique n'a permis d'établir une quelconque relation avec ces pays. Ces observations suggèrent que les modifications génétiques survenant dans certaines séquences entraînant des modifications du profil génomique peuvent survenir dans certaines zones et indépendamment des modifications survenues au préalable, ceci infirme le projet de CHRISTENSEN d'établir un arbre "généalogique" de l'apparition chronologique des types et des sous-types.

Il ressort de cette étude que le type 2 est dominant en France comme d'autres sous-types sont dominants en Irlande du Nord (TODD et Mc FERRAN, 1985), au Danemark (CHRISTENSEN et al, 1987) aux USA (PIRTLE et al, 1984) et au Japon (NISHIMORI et al, 1987). Cependant des variations détectables dans ce profil génomique spécifique ont été décrites (GIELKENS et al, 1985). Dans notre étude en polyacrylamide ces modifications ont été très bien détectées.

### 3.4. Dominante clinique et profil génomique

Les entités cliniques de la maladie d'Aujeszky sont les troubles nerveux, les troubles respiratoires et les avortements. Cette grande diversité des symptômes est rencontrée également pour les autres herpès virus. L'herpes bovin (BHV1) est l'un des pathogènes les plus importants en pathologie bovine et est responsable de troubles respiratoires (IBR), génitaux (IPV) (GREGERSON et al, 1985) ou nerveux (ENGELLS et al, 1986). Le virus herpès équin (EHV1) est un agent important responsable de troubles respiratoires ou génitaux. La majorité des souches isolées du tractus respiratoire et les souches isolées des foetus ont des profils génomiques bien spécifiques (ALLEN et al, 1983). En pathologie humaine, de la même manière les virus herpès retrouvés dans les formes génitale ou oronasale présentent des profils distincts (PERRIN et al, 1984). Notre étude met en évidence l'existence d'une discrète hétérogénéité entre les souches isolées des formes nerveuses, respiratoires et génitales et démontre que les souches de sous-type 2a ne sont pas préférentiellement responsables d'une des trois entités cliniques. Ces résultats suggèrent que les tableaux cliniques rencontrés seraient dictés soit par des propriétés génétiques du virus sans relation avec le profil génomique, soit par les données épidémiologiques.

### 3.5. Virulence et profil génomique

La virulence des souches isolées dans d'autres pays a été étudiée (MOCSARI, 1981). Notre étude a permis d'identifier différents profils et d'étudier d'éventuelles relations entre certains profils et les modifications de virulence. Cependant aucune altération semblable à celle rencontrée dans certaines souches avirulentes, comme la délétion du fragment BamH1 no 7, n'a été décrite.

Les quatre souches du type 1 se révèlent être peu pathogènes pour la souris. La réduction anormale de la longueur du fragment 12 notée pour les souches 14 et 17, ne s'accompagne pas d'une diminution de virulence relativement à celle des souches 6 et 21. Ces résultats confirment l'absence de relation entre la virulence et la longueur du fragment 12. La souche présentant une disparition du site de clivage entre les fragments 8-13 et 8-8' a conservé sa virulence. Les modifications moléculaires à ce niveau ne semblent donc pas conditionner le pouvoir pathogène de la souche.

Une souche présentant une bande 1 plus courte se révèle moins pathogène pour le porc, le poussin et la souris. L'altération génomique est à l'étude dans notre laboratoire. Sur le fragment 1, se trouve localisé le gène codant pour la gII (METTENLEITTER et al, 1986).

### REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient Mrs LORANT, VIGOUROUX, SALIN-

GARDES, ROSE, BATAILLON et DUE pour leur contribution à la collecte des souches. Les poussins ont été fournis par Mlle GUITTET

et Mr JP PICAULT du Laboratoire National de Pathologie Aviaire de Ploufragan.

## BIBLIOGRAPHIE

- ALLEN G. P., YEARGAN M. R., TURTINEN L. W., BRYANS J. T., Mc COLLUM V. H., 1983. *Am. J. Vet. Res.* **44** : 263-271
- ANDRIES K., PENSAERT M. B., VANDEPUTTE J., 1978. *Am. J. Vet. Res.* **39**, 1282-1285
- BARTHA A., BELAK S., BENYEDA J., 1969. *Acta. Vet. Acad. Sci. Hung.*, **19**, 97-99
- BASKERVILLE A., Mc FERRAN J. B., DOW C., 1973. *Vet. Bull.*, **43**, 465-480
- CHONG Y. C., FORSTER U., 1987. *Vet. Microbiol.* **15**, 249-256
- CHRISTENSEN L. S., SOERENSEN K. J., 1988. *Arch. Virol.*, **100**, 109-113.
- CHRISTENSEN L. S., SOERENSEN K. J., LEI J. C., 1987. *Arch. Virol.*, **97**, 215-224
- CHRISTENSEN L. S., SOERENSEN K. J., LEI J. C., 1988. IPVS Rio de Janeiro p 176 14-17 August
- DIEUZY I., VANNIER P., JESTIN A., 1987. *Ann. Rech. Vet.*, **18**, 233-240
- ENGELS M., GIULIANI C., WILD P., BECK T. M., LEOPFE E., WYLER R., 1986. *Vir. Res.* **6**, 57-73
- GIELKENS A. L. J., VAN OIRSCHOT J. T., BERNS A. J. M., 1985. *Arch. Virol.* **66**, 69-82
- GREGERSON J. P., PAULI G., LUDWIG H., 1985. *Arch. Virol.* **84**, 97-103
- HARKNESS J. W., SANDS J. J., 1985. *Br. Vet. J.*, **141**, 151-159
- HERMANN S. C., HEPPNER B., LUDWIG H., 1984. In : Wittman G., Gaskell R. M., RZIHA H. J. (eds) latent herpes virus infections in veterinary medicine. *Curr. Top. Vet. Anim. Sci.* **27**, 387-401
- HSU F. S., CHU R. M., LEE R. C. T., CHU S. H. J., 1981. *JAVMA* **177**, 636-641
- IGLESIAS J., HARKNESS J. W., 1988. *Vet. Microbiol.*, **16**, 243-254
- JESTIN A., BLANCHARD P., VANNIER P., GARBAR-CHENON A., NICOLAS J. C., 1988. *J. Virol., Meth.* (sous presse)
- KLUGE J. P., NIYO Y., MILLER L. D., HILL HT, PIRTLE E. C., 1986. *Proceeding IPVS 9th Barcelona 15-18 July 1986*, p 338
- KLUGE J. P., MARE C. J., 1974. *Am. J. Vet. Res.*, **35**, 911-915
- LOMNICZI B., KAPLAN A., BEN-PORAT T., 1987. *Virology* **161**, 181-189
- LOMNICZI B., WATANABE S., BEN-PORAT T., KAPLAN A., 1984. *J. Virol.* **52**, 198-205
- LUDWIG H., HEPPNER B., HERRMANN S., 1982. In Wittmann G., Hall SA (eds) Aujeszky's disease. *Curr. Top. Vet. Anim. Sci.* **17**, 15-22
- Mc CULLOUGH S. J., TODD D., 1988. *Vet. Rec.* **122**, 77-81.
- MENGELING W. L., PAUL P. S., PIRTLE E. C., WATHEN M. W., 1983. *Arch. Virol.* **78**, 213-220.
- METTENLEITER T. C., LOMNICZI B., ZSAK L., MEDVECZKY I., BEN-PORAT T., KAPLAN A. S., 1988. In Wittmann G (eds) Vaccination and control of Aujeszky' disease. *Curr. Top. Vet. Anim. Sci.* (sous presse)
- METTENLEITER T. C., LUKACS N., THIEL H. J., SCHREURS C., RZIHA H. J., 1986. *Virology* **152**, 66-75.
- METTENLEITER T. ZSOK L., KAPLAN A. S., BEN-PORAT T., LOMNICZI B., 1987. *J. Virol.*, **61**, 4030-4032.
- MOSCARI E., 1981. *Acta. Vet. Acad. Sci. Hung.* **29**, 343-348.
- NISHIMORI T., IMADA T., SAKURAI M., KITABAYASHI T., KAWAMURA H., NAKAJIMA H., 1987, **49**, 365-367.
- PERRIN D., INGRAND D., FORTIER B., KEMLER R., NICOLAS J. C., HURAUX J. M., BRICOUT F., 1984. *Ann. Virol.*, **135**, 111-118.
- PIRTLE E. C., WATHEN M. W., PAUL P. S., MENGELING W. L., SACKS J. M., 1984. *Am. J. Vet. Res.* **45**, 1906-1912.
- PLATT K. E., MARE C. J., HINZ P. N., 1979. *Arch. Virol.* **60** : 13-23.
- PLATT K. B., MARE C. J., HINZ P. N., 1980. *Arch. Virol.* **63**, 107-114
- PRITCHETT R. F., BUSH C. E., CHANG T. J., WANG J. T., ZEE Y. C., 1984. *Am. J. Vet. Res.* **45**, 2486-2489.
- VANNIER P., 1985. *Am. J. Vet. Res.*, **46**, 1498-1502