

Différenciation de souches du virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine (*Bovine herpesvirus 1*) par l'analyse du DNA viral après digestion par l'endonucléase de restriction Eco RI

E. THIRY *, P.-P. PASTORET *, B. BROCHIER *, R. KETTMANN **, A. BURNY **

* Service de Virologie et Pathologie des Maladies virales,
Faculté de Médecine vétérinaire, Université de Liège,
Rue des Vétérinaires, 45,
B-1070 Bruxelles, Belgique.

** Département de Biologie moléculaire,
Faculté des Sciences, Université Libre de Bruxelles,
Rue des Chevaux, 67
B-1640 Rhode-Saint-Genèse, Belgique.

RESUME

Diverses souches de *Bovine herpesvirus 1* (BHV 1 ; virus IBR/IPV) ont été comparées par électrophorèse en gel d'agarose du DNA viral clivé par l'endonucléase Eco RI.

Les souches isolées de formes respiratoires en Belgique sont très semblables entre elles et à la souche internationale de référence IBR/Los Angeles. La souche vaccinale thermosensible ts RLB 106 présente un profil électrophorétique identique à IBR/Los Angeles. La souche vaccinale IBR-IPV (Bayer) s'en distingue.

Les souches de BHV 1 isolées après réactivation chez des bovins porteurs latents ne montrent aucune différence avec la souche parentale. Une souche iso-

Travail subventionné par l'Institut pour l'encouragement de la Recherche Scientifique dans l'Industrie et l'Agriculture (I.R.S.I.A.) et le Fonds National de la Recherche Scientifique (F.N.R.S.).

Manuscrit déposé le 05-11-1982.

lée lors d'une troisième réactivation chez un bovin ne diffère pas de la souche parentale ni d'une souche isolée chez le même bovin lors d'un accès de réactivation antérieur.

Ces résultats doivent être confirmés par l'emploi d'autres endonucléases de restriction.

Les auteurs discutent de la portée des résultats, spécialement ceux obtenus pour la souche ts RLB 106, dont la souche initiale fut isolée en Belgique d'un cas génital (IPV), avant l'apparition des formes respiratoires dans ce pays, et qui possède des caractéristiques identiques aux souches respiratoires (IBR).

INTRODUCTION

L'infection d'un bovin par le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine (virus IBR ; *Bovine herpesvirus 1* ; BHV 1) peut revêtir diverses formes cliniques, dont les principales sont la rhinotrachéite infectieuse bovine (forme IBR) et la vulvovaginite pustuleuse (forme IPV).

Les souches isolées des diverses formes cliniques ne peuvent être facilement différenciées. Certaines d'entre elles ont néanmoins été caractérisées par des marqueurs biologiques ou biochimiques (Jetté et al., 1979 ; Pastoret et al., 1980b).

Parmi les marqueurs biochimiques, l'analyse des fragments de DNA (acide désoxyribonucléique) viral obtenus après digestion par des endonucléases de restriction a récemment été développée. Les endonucléases ou enzymes de restriction présentent la propriété de couper le DNA bicaténaire en des points très précis. Chaque endonucléase de restriction possède une spécificité propre qui la rend capable de cliver le DNA au niveau de séquences déterminées de nucléotides. Le mode d'action de ces enzymes a été récemment détaillé dans cette revue (Godeau, 1981).

Après son utilisation dans la différenciation des types 1 et 2 de l'*herpes simplex virus* (Hayward et al., 1975 ; Skare et al., 1975), cette technique a été employée dans les études d'épidémiologie moléculaire d'autres herpesvirus, dont le virus de la Maladie d'Aujeszky (*Suid herpesvirus 1*) (Gielkens, 1982 ; Herrmann et Ludwig, 1982 ; Paul et al., 1982) et le BHV 1 (Hayward et al., 1975 ; Skare et al., 1975 ; Summers et al., 1975 ; Skare, 1979) : caractérisation de souches sauvages et vaccinales (Pastoret et al., 1980a ; Pauli et al., 1981 ; Rziha et al., 1981) ; différenciation entre souches respiratoires (IBR) et souches génitales (IPV) (Engels et al., 1981).

Le BHV 1, comme un grand nombre d'herpesvirus, persiste à l'état latent chez le bovin infecté (Sheffy et Davies, 1972). La stabilité des souches latentes reste un des problèmes soulevés par le phénomène de latence : y a-t-il identité entre la souche qui, lors de l'infection primaire, s'est installée à l'état latent chez l'animal et la souche réactivée et réexcrétée chez le même animal (Pastoret et al., 1982) ? La taille moyenne des plages produites en culture de cellules par une souche réactivée est parfois inférieure à celle de la

souche parentale (Pastoret et al., 1979b). Par contre, l'analyse des protéines virales de structure ne révèle pas de différence (Pastoret et al., 1980b).

Dans cette étude préliminaire, le DNA de plusieurs souches de BHV 1 isolées en Belgique et de deux souches vaccinales est comparé après digestion par l'endonucléase de restriction Eco RI. Le site de restriction du DNA reconnu spécifiquement par l'enzyme Eco RI est composé de six paires de bases dont la structure est : G A A T T C (A : Adénine ; C : Cytosine ; G : Guanine ; T : Thymine). Chaque chaîne du DNA est clivée entre G et A.

Les souches isolées après réactivation chez deux bovins infectés de manière latente par le BHV 1 sont de la même manière comparées à la souche parentale.

MATERIEL ET METHODES

Culture cellulaire

Les cellules GBK (Georgia Bovine Kidney), aimablement fournies par le Prof. L.A. Babiuk, Saskatoon, Canada, sont cultivées en bouteilles de Roux de 175 cm² ou en roller bottles de 850 cm², selon les conditions précédemment décrites (Thiry et al., 1981).

Souches de BHV 1

Les souches sauvages belges de BHV 1 sont : IBR/Cu3, isolée d'un cas de mètrite ; IBR/Cu5, isolée d'un cas respiratoire typiques ; IBR/Cu7, isolée d'une forme respiratoire associée à des mortinatalités de veaux. Ces trois souches ont été clonées sur cellules, par trois passages successifs sous agarose à 1 %, et ont subi trois passages sur cellules GBK.

Les souches vaccinales sont : la souche thermosensible ts RLB 106 (Zygraich et al., 1974), aimablement fournie par Smith-Kline R.I.T., Genval, Belgique, et la souche vaccinale IBR-IPV, aimablement fournie par Bayer Belgium, Bruxelles, Belgique. Les souches vaccinales ont été passées trois fois sur cellules GBK, à partir de vaccins lyophilisés.

Trois souches de BHV 1 ont été isolées au jour 6 après réactivation par la dexaméthasone chez deux bovins infectés par IBR/Cu5, dépourvus d'anticorps neutralisant le BHV 1 avant l'infection : IBR/Cu5TIJ06, isolée d'un taurillon ; IBR/Cu5GIJ06, isolée d'une génisse au cours d'une première réactivation ; IBR/Cu5G3J06, isolée de la même génisse, au cours de la troisième réactivation (Pastoret et al. 1979a).

La souche de référence est la souche IBR/Los Angeles (LA), aimablement fournie par le Prof. D.G. McKercher, Davis, U.S.A.

Purification virale

Le BHV 1 est purifié selon la technique de centrifugation zonale en gradient de Tartrate de potassium décrite par Talens et Zee (1976).

Analyse du DNA viral

L'extraction du DNA viral, la digestion du DNA par l'endonucléase Eco RI et l'électrophorèse des brins de DNA en gel d'agarose sont réalisés selon les techniques précédemment décrites (Thiry et al., 1982). Le DNA du bactériophage lambda, clivé par l'endonucléase Eco RI, est utilisé comme marqueur de poids moléculaire.

RESULTATS

Les DNA des trois souches de BHV 1 isolées en Belgique montrent un profil électrophorétique assez semblable (Fig. 1 ; tableau 1). Après digestion par Eco RI, le DNA de la souche IBR/Cu7

est identique à celui de la souche respiratoire internationale de référence IBR/LA ; les génomes des souches IBR/Cu5 et IBR/Cu3 ne présentent pas de différence entre eux après clivage par Eco RI, mais diffèrent légèrement de celui des souches IBR/Cu7 et IBR/LA :

les bandes C et D semblent être confondues (Fig. 1 ; tableau 1).

Le DNA de la souche vaccinale ts RLB 106 présente un profil identique à celui de IBR/LA, souche respiratoire. La souche vaccinale IBR-IPV de Bayer se

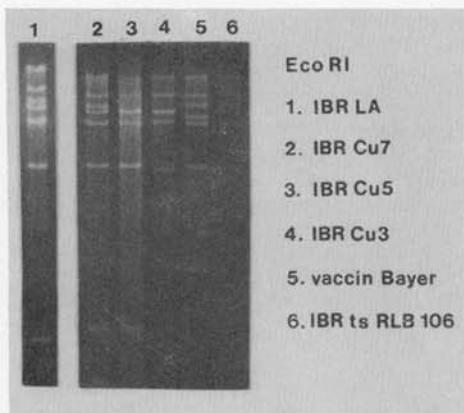


Fig. 1a.

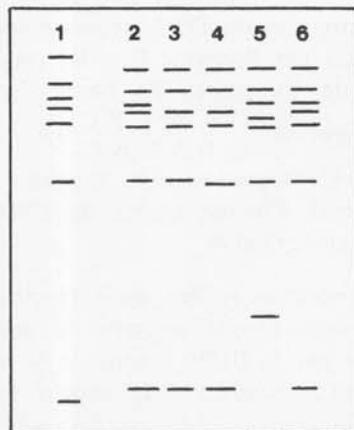


Fig. 1b.

Fig. 1. — Analyse du DNA viral de diverses souches sauvages et vaccinales de BHV 1 après digestion par Eco RI.

TABLEAU I. — Poids moléculaires estimés ($\times 10^6$ daltons) des fragments de DNA viral obtenus pour diverses souches de BHV 1 après digestion par Eco RI.

+ : présence d'une bande dont le poids moléculaire ne peut être estimé avec le marqueur utilisé.

	IBR/LA	IBR/Cu7	IBR/Cu5	IBR/Cu3	IBR/IPV Bayer	IBR/ts RLB 106
A	+	+	+	+	+	+
B	13,7	13,7	13,7	13,7	13,7	13,7
C	11,5	11,5			11,7	11,5
C + D			10,5	11		
D	11	10,9			10,2	10,8
E	9,2	9,3	9,5	9,3	9,3	9,2
F	5,6	5,7	5,5	5,7	5,6	5,6
G	1,6	1,6	1,6	1,6	2,5	1,6

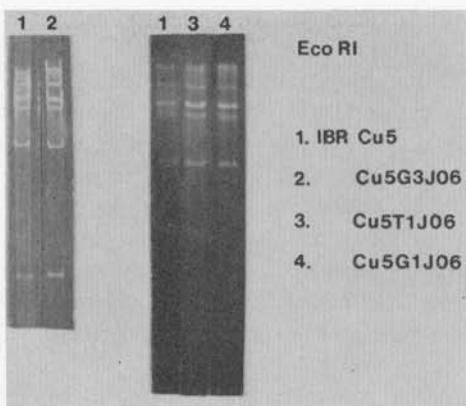


Fig. 2a.

Fig. 2. — Analyse du DNA viral de trois souches réactivées et de la souche parentale après digestion par Eco RI.

distingue aisément de toutes les souches précitées (tableau 1).

Le DNA des souches virales isolées après réactivation chez des bovins infectés par IBR/Cu5 ne diffère pas de celui de la souche parentale, après clivage par Eco RI (Fig. 2).

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Les trois souches de BHV 1 isolées en Belgique ont un profil électrophorétique très semblable à celui observé pour les souches respiratoires (formes IBR) (Engels et al., 1981). Néanmoins, de légères différences existent entre les génomes des souches IBR/Cu3 et IBR/Cu5, et ceux des souches IBR/Cu7 et IBR/LA (Fig. 1 ; tableau 1).

La souche vaccinale ts RLB 106 est un mutant obtenu à partir d'une souche initiale, isolée en 1969, en Belgique, d'un cas de maladie génitale (Zygraich, communication personnelle). En effet, les premières formes respiratoires décrites

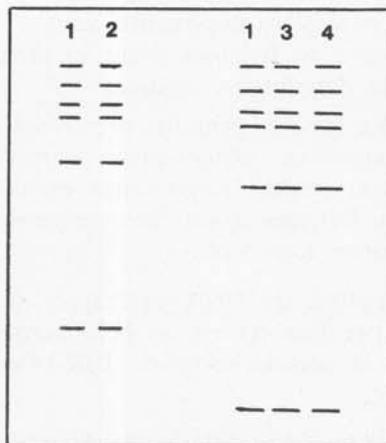


Fig. 2b.

sont apparues dans notre pays en 1972 (Pastoret, 1979). Or, le mutant ts produit à partir de cette souche génitale (IPV) présente les mêmes caractéristiques que IBR/LA et les autres souches respiratoires (Nettleton et al., 1981). Il est pourtant possible de distinguer entre souches IBR et IPV, par clivage du DNA viral par Eco RI, bien que les différences observées soient faibles (Engels et al., 1981).

Ce résultat doit être confirmé par l'emploi d'autres endonucléases de restriction de sites de clivage différents, de manière à augmenter la spécificité de la méthode.

Il permet toutefois de postuler trois hypothèses :

- a. La souche initiale possédait les caractères génomiques propres aux souches génitales ; la mutation thermosensible s'est accompagnée d'une modification du génome, dont la forme, après clivage par Eco RI, s'est rapprochée de celle des souches respiratoires.

- b. Les souches respiratoires étaient présentes en Belgique avant les premières descriptions cliniques.
- c. Des souches génitales présentant des caractères génomiques semblables aux souches respiratoires existaient en Belgique avant l'émergence de la forme respiratoire.

L'analyse du DNA viral après digestion par Eco RI est un bon marqueur pour la souche vaccinale IBR-IPV de Bayer.

Elle peut être différenciée des souches respiratoires et de la souche vaccinale RLB 106. Ce marqueur n'est pas utile pour caractériser la souche vaccinale thermosensible : dans ce cas, le caractère thermosensible reste l'outil de différenciation le plus aisé.

Dans les trois cas étudiés, les souches réactivées ne diffèrent pas de la souche parentale. Ces résultats concordent avec

ceux obtenus précédemment (Pastoret et al., 1980a), mais doivent être confirmés par l'emploi d'autres endonucléases de restriction. Dans l'étude de l'épidémiologie du BHV 1, la stabilité des souches latentes est une propriété importante. Elle n'élimine pas cependant la possibilité d'apparition de virus recombinants, obtenus dans des cellules coinfectées par deux souches différentes maintenues à l'état latent chez un même animal.

REMERCIEMENTS

Nous remercions vivement le Prof. H. Ludwig et le Dr. S. Herrmann, Freie Universität, Berlin, de l'aide qu'ils nous ont apportée ; nous remercions également le Dr. W. Desmedt, Smith Kline-RIT, Genval, et M. Henrard, Bayer-Belgium, Bruxelles, de nous avoir fourni les souches vaccinales, ainsi que G. Derboven, pour sa précieuse collaboration.

BIBLIOGRAPHIE

- ENGELS M., STECK F., WYLER R. Comparison of the genomes of infectious bovine rhinotracheitis and infectious pustular vulvovaginitis virus strains by restriction endonuclease analysis. *Arch. Virol.*, 1981, **67**, 169.
- GIELKENS A.L.J. Comparison of restriction fragment patterns of reactivated Aujeszky's disease virus and parent virus. CEE seminar on latent persistent herpesvirus infections in veterinary medicine, 1982, Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science, sous presse.
- GODEAU J.M. Des plasmides à l'ingénierie génétique. *Ann. Méd. Vét.*, 1981, **125**, 495.
- HAYWARD G.S., FRENKEL N., ROIZMAN B. Anatomy of herpes simplex virus DNA : strain differences and heterogeneity in locations of restriction endonuclease cleavage sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1975, **72**, 1768.
- JETTEUR P., PASTORET P.-P., AGUILAR-SETIEN A., LEROY P., GODART M., SCHOENAERS F. Différenciation de souches du virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine (*Bovid herpesvirus 1*) fondée sur la dimension moyenne des plages. *Ann. Méd. Vét.*, 1979, **123**, 115.
- NETTLETON P.F., HERRING A.J., SHARP J.M. Current research into infectious bovine rhinotracheitis in Scotland. ECC workshop on bovine infectious rhinotracheitis : epidemiology and diagnosis, 26-27 nov. 1981, INRA, Thiverval-Grignon, France.
- PASTORET P.-P. Le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine (*Bovid herpesvirus 1*). Aspects biologiques et moléculaires. *Thèse*, 1979, Université de Liège.
- PASTORET P.-P., AGUILAR-SETIEN A., BURTONBOY G., MAGER J., JETTEUR P., SCHOENAERS F. Effect of repeated treatment with dexamethasone on the reex-

cretion pattern of infectious bovine rhinotracheitis virus and humoral immune response. *Vet. Microbiol.*, 1979a, **4**, 149.

PASTORET P.-P., JETTEUR P., AGUILAR-SETIEN A., LEROY P., GODART M., SCHOENAERS F. Etude par une méthode de comparaison de la moyenne des plages, de souches du virus IBR (*Bovid herpesvirus 1*) isolées chez les bovins après injection de dexaméthasone. *Ann. Méd. Vét.*, 1979b, **123**, 203.

PASTORET P.-P., BABIUK L.A., MISRA V., GRIEBEL P. Reactivation of temperature-sensitive and non temperature-sensitive infectious bovine rhinotracheitis vaccine virus with dexamethasone. *Infect. Immun.*, 1980a, **29**, 483.

PASTORET P.-P., BURTONBOY G., AGUILAR-SETIEN A., GODART M., LAMY M.E., SCHOENAERS F. Comparison between strains of infectious bovine rhinotracheitis virus (*Bovid herpesvirus 1*) from respiratory and genital origins, using polyacrylamid gel electrophoresis of structural proteins. *Vet. Microbiol.*, 1980b, **5**, 197.

PASTORET P.-P., THIRY E., BROCHIER B., DERBOVEN G., VINDEVOGEL H. The role of latency in the epizootiology of infectious bovine rhinotracheitis. CEE Seminar on latent persistent herpesvirus infections in veterinary medicine, 1982, Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science, sous presse.

PAULI G., DARAI G., STORZ J., LUDWIG H. IBR-IPV viruses: genome structure and disease. *Med. Microbiol. Immunol.*, 1981, **169**, 129.

RZIHA H.J., DÖLLER P., BACHMANN D.P.A. Comparison of the DNA of various Bovid herpesvirus type 1 (BHV-1) isolates (IBR/IPV) by restriction enzyme analysis. *Med. Microbiol. Immunol.*, 1981, **169**, 127.

SHEFFY B.E., DAVIES D.H. Reactivation of a bovine herpesvirus after corticosteroid treatment. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1972, **140**, 974.

SKARE J., SUMMERS W.P., SUMMERS W. C. Structure and function of herpesvirus genomes. I. Comparison of five HSV-1 and two HSV-2 strains by cleavage of their DNA with Eco RI restriction endonuclease. *J. Virol.*, 1975, **15**, 726.

SKARE J. Restriction mapping of infectious bovine rhinotracheitis virus DNA. Abstract. Fourth Cold Spring Harbor meeting on Herpesviruses, 28 août - 2 sept. 1979, New York, USA.

SUMMERS W.C., FICKEL T., SKARE J., SUMMERS W.P., WAGNER M. Use of restriction endonucleases to analyse the DNA of herpesviruses. In: *Oncogenesis and herpesviruses II*, éditeurs G. de Thé, M.A. Epstein, H. Zur Hausen, IARC scientific publications, 1975.

TALENS L.T., ZEE Y.C. Purification and buoyant density of infectious bovine rhinotracheitis virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1976, **151**, 132.

THIRY E., PASTORET P.-P., DESSY-DOIZE C., HANZEN C., CALBERG-BACQ C.M., DAGENAIS L., VINDEVOGEL H., ECTORS F. Réactivation d'un *herpesvirus* en culture de cellules testiculaires prélevées chez un taureau atteint d'orchite et d'azoospermie. *Ann. Méd. Vét.*, 1981, **125**, 107.

THIRY E., PASTORET P.-P., KETTMANN R., BURNY A. Use of restriction analysis for the study of *Bovid herpesvirus 1* latency. CEE Seminar on latent persistent herpesvirus infections in veterinary medicine, 1982, Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science, sous presse.

ZYGRAICH N., LOBMANN M., VASCO-BOINIC E., BERGE E., HUYGELEN C. In vivo and in vitro properties of a temperature sensitive mutant of infectious bovine rhinotracheitis virus. *Res. Vet. Sci.*, 1974, **16**, 328.

SUMMARY

Differentiation between infectious bovine rhinotracheitis virus (*Bovine herpesvirus 1*) strains by Eco RI restriction endonuclease analysis.

Several *Bovine herpesvirus 1* (BHV 1 ; IBR/IPV virus) strains were compared by the electrophoretic pattern

in agarose gel of viral DNA cleaved by the restriction endonuclease Eco RI.

The strains isolated from respiratory cases in Belgium and Los Angeles strain were almost the same. Thermosensitive vaccine strain (ts RLB 106) showed the same electrophoretic pattern as respiratory (IBR) strains. An attenuated vaccine strain (IBR-IPV vaccine strain from Bayer), on the opposite, was different.

BHV 1 strains isolated after reactivation from two latent carriers were quite the same as the initial strain.

In the discussion, the authors emphasize the likeness of ts vaccine strain to respiratory strains, whereas the parental strain used to make the ts mutant was isolated from a genital (IPV) case in Belgium, before the onset of the respiratory (IBR) disease.

These results have to be confirmed by the use of other restriction endonucleases.