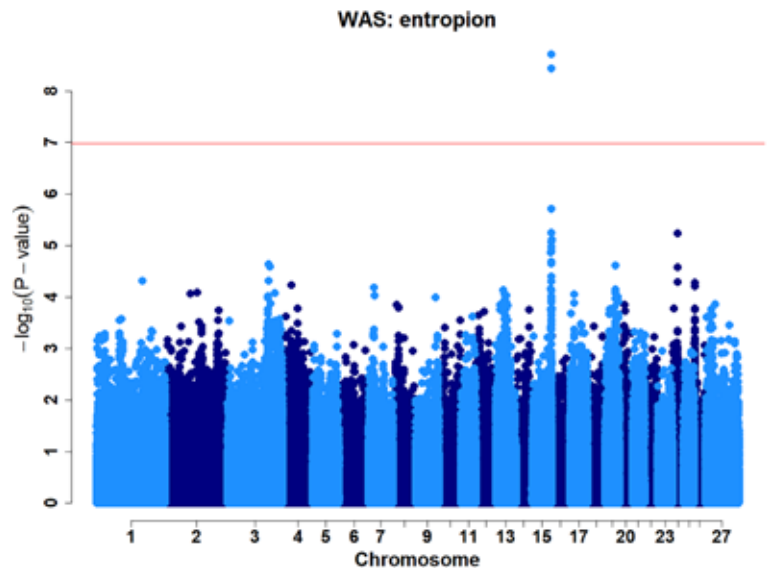


# Entropium beim Schaf: Die Genetik entscheidet

Nathalie Hirter / Cord Drögemüller

Eine 2012 durchgeführte Umfrage bei den vier Schweizer Hauptrassen hat deutliche Rassenunterschiede zum Vorkommen von Missbildungen festgestellt, was auf eine vererbte Entstehung hinweist. Das angeborene Entropium (eingerolltes Augenlid) wurde dabei mit Abstand am häufigsten genannt. Die hier vorgestellte Pilotstudie der Universität Bern zur Ergründung des vermehrten Auftretens dieses Erbfehlers beim WAS konnte erstmals einen Zusammenhang zu einer Region im Schafgenom ermitteln. Damit wurde eine Basis für die zukünftige Entwicklung von Gentests zur Selektion gegen diese unerwünschte Anomalie geschaffen.



Resultate der genomweiten Assoziationsstudie, dargestellt im Manhattan plot. Alles über der roten Linie gilt als signifikant. Résultats de l'étude d'association génomique, représentée dans le Manhattan plot. Tout ce qui est au-dessus de la ligne rouge est considéré comme significatif. (Photo: N. Hirter, Uni Bern)

## Was ist das Entropium?

Das Entropium (eingerolltes Augenlid) ist eine bekannte angeborene Anomalie bei Schafen, von der schon lange angenommen wird, dass sie vererbbar ist. Bis jetzt wurde jedoch keine Ursache für diese angeborene Augenlidveränderung gefunden. Betroffene Lämmer zeigen von Geburt an ein variables Einrollen der unteren Augenlider, was zu einer ständigen Reizung, Schmerzen, Augenausfluss und Veränderungen der Hornhaut führen kann (Abbildung, Seite 13). In schweren Fällen erblinden die Lämmer. Angeborene Missbildungen sind zum Glück selten und müssen nicht zwingend genetisch bedingt sein, sie können z.B. auch durch virale Infektionen oder Mängel bzw. Fremdstoffe in der Fütterung verursacht werden.

## Resultate der Studie aus dem Jahr 2012

Die von der Vetsuisse-Fakultät der Universität Bern durchgeführte Umfrage bei Betrieben mit den vier Schweizer Hauptrassen (Weisses Alpenschaf WAS, Braunköpfiges Fleischschaf BFS, Schwarzbraunes Bergschaf SBS, Walliser Schwarznasenschaf SN) hat deutliche Rassenunterschiede zum Vorkommen von kongenitalen (angeborenen) Anomalien festgestellt, was genetisch bedingte Ursachen vermuten lässt (Forum 09 | 2013, Seite 6). Das Entropium wurde mit Abstand am häufigsten genannt und tritt der Umfrage zufolge vermehrt beim WAS und BFS auf. Der verkürzte Unterkiefer kommt oft beim SBS vor und die hinteren Hernien (Brüche) häufiger beim SN. Im Durchschnitt hatte jeder zweite WAS-Betrieb bereits von Entropium betroffene Lämmer innerhalb der vergan-

genen 10 Jahren und ca. 6% aller Lämmer innerhalb der Ablammsaison 2012 waren daran erkrankt. In der Studie, bei der schweizweit über 1 000 Schafhalter einen Fragebogen ausfüllten, kristallisierte sich die Erkrankung Entropium als die häufigste angeborene Missbildung heraus. Im Fazit wurde festgehalten, dass angeborenen Missbildungen vermehrt Aufmerksamkeit geschenkt werden sollte, um geeignete zuchthygienische Massnahmen ergreifen zu können.

## Weiterführende Pilotstudie

Das Institut für Genetik der Vetsuisse-Fakultät an der Universität Bern untersuchte in einer Pilotstudie diese offensichtliche rassespezifische Problematik am Beispiel der am stärksten betroffenen Rasse WAS näher. Dabei war das Ziel, die genetische Ursache dieser Missbildung herauszufinden. Während mehreren Jahren wurden kontinuierlich Proben betroffener Lämmer, die uns motivierte Züchtende und Veterinäre gemeldet haben, gesammelt. Jedes auffällige Lamm mit Verdacht auf Entropium konnte dabei vor Ort untersucht und der genaue Krankheitsstatus dokumentiert werden. Zusätzlich wurden, soweit verfügbar, Blutproben der Eltern und Wurfgeschwister entnommen. Auffällig war, dass oft das Einsetzen eines neuen Widders für das gehäufte Auftreten von Entropium verantwortlich gemacht wurde, wofür es jedoch bis heute keinen gesicherten Hinweis gibt.

## Vorgehen

Für die Analysen im molekulargenetischen Labor wurden die dafür in Frage kommenden Tiere genau bestimmt, das heisst nur eindeutig Entropium aufweisende Fälle sowie eindeutig normal entwickelte Kontrolltiere nahmen an der Auswertung teil. Um für die Rasse WAS repräsentative und nichtverzerrte Resultate zu bekommen, wurde darauf geachtet, dass keine Geschlechter- oder Familiendominanz vorlag. Wann immer möglich wurde zu einem mit Entropium betroffenen Lamm ein normales Kontrollgeschwister hinzugezogen. So konnten 90 Lämmer mit Entropium sowie 60 unauffällige Kontrolltiere der Rasse WAS untersucht werden. Aufgrund der verbreitet praktizierten Einkreuzungen mit anderen Rassen nahmen aber auch einzelne WAS-Schafe mit einem gewissen Fremdblutanteil an der Studie teil. Mit Hilfe eines SNP-Chips für Schafe konnten die Genotypen dieser insgesamt 150 Schafe an über 400 Tausend Stellen im Genom bestimmt werden. Der SNP-Chip ist ein modernes Laborwerkzeug, das in der Rinderzucht seit über 10 Jahre für die genomische Selektion zum Einsatz kommt und mittlerweile auch für Schafe entwickelt worden ist. Diese unzähligen SNPs sind definierte genetische Marker, die sich gleichmässig über das ganze Erbgut (26 paarigen Chromosomen sowie die beiden Geschlechtschromosomen X und Y) verteilen. Chromosomen sind Träger des Erbguts und kommen in jeder Zelle (ausser in Keimzellen) paarig vor. Das Schafgenom besteht aus insgesamt 54 Chromosomen. Das Genom der Ziege besteht dagegen aus 60 Chromosomen.

## Auswertung

Mit diesen Daten wurde am Institut für Genetik eine sogenannte genomweite Assoziationsstudie (GWAS) durchgeführt, wobei die Genotypen der 90 Fälle denen der 60 Kontrollen gegenübergestellt wurden. Das Ziel dieser GWAS war, einen Unterschied zwischen den Genotypen bei den Schafen mit einem bestimmten Phänotyp (Entropium) im Gegensatz zu den normalen Schafen zu identifizieren. Aufgrund der Gegenüberstellung von kranken und normal entwickelten Tieren ermöglichte diese Analyse, Unterschiede im Erbgut zwischen diesen Gruppen darzustellen. Die erzielten Resultate wurden in einem sogenannten «Manhattan plot» grafisch dargestellt (Abbildung, Seite 11). Für das Merkmal Entropium konnte dabei ein eindeutiger, statistisch abgesicherter (signifikanter) Unterschied auf dem Chromosom 15 festgestellt werden. Daraus lässt sich ableiten, dass sich WAS-Tiere mit Entropium auf einem Abschnitt auf diesem Chromosom deutlich von normalen WAS-Schafen unterscheiden. Der entscheidende Abschnitt ist sehr umfangreich und umfasst 14 verschiedene bekannte Gene. Um die Zahl weiter einzugrenzen, wurde von drei Geschwisterpaaren (jeweils ein Tier mit Entropium und ein normales Lamm) die gesamte Genomsequenz entschlüsselt und mithilfe eines speziellen Computerprogramms auf Unterschiede untersucht. Für die Analyse verglich man das Erbgut eines betroffenen Tiers mit der des normalen Geschwistertiers und stellte sie den normalen Tieren aus 15 anderen Schafrassen

gegenüber. So konnten insgesamt rund 100 Unterschiede, sogenannte DNA-Varianten, festgestellt werden, die nur bei Lämmern mit Entropium vorkamen. Nur zwei dieser Varianten befinden sich innerhalb von Genen und können somit die kodierten Proteine dieser Gene verändern und daher bestenfalls die angeborene Missbildung direkt verursachen.

In der Humanmedizin verursachen krankmachende Varianten in einem bestimmten dieser beiden Gene eine sehr seltene Missbildung mit Augenlidanomalien (das sogenannte Blepharocheilodontische Syndrom 2). Das zweite betroffene Gen reguliert die Skelett- und glatte Muskulatur und wurde deshalb auch beim Schaf weiter untersucht. Bei insgesamt 231 Tieren (72 WAS mit Entropium und 159 normale WAS) konnten die individuellen Genotypen für diese beiden Genvarianten bestimmt werden. Die gewonnenen Daten zeigten jedoch, dass die Mutationen nicht nur bei den betroffenen Tieren, sondern auch bei normalen WAS-Schafen gefunden wurden. Es kann daher ein ursächlicher Zusammenhang mit Entropium hochwahrscheinlich ausgeschlossen werden (Tabelle, Seite 14).

## Vielversprechende Resultate

Die hier vorgestellte Pilotstudie zur Ergründung des vermehrten Auftretens des Entropiums beim WAS konnte erstmals einen eindeutigen Zusammenhang zu einer Region im Schafgenom ermitteln und hat somit die angenommene vererbte Entstehung bestätigt. Zudem wurde eine Basis für die mögliche Entwicklung von einem Gentest für die spätere Anwendung zur Selektion gegen diese unerwünschte Missbildung geschaffen. An dieser Stelle noch einmal einen herzlichen Dank an alle beteiligten Schafbesitzer, die betroffene Tiere gemeldet und einer anschliessenden Untersuchung und Probenentnahme zugestimmt haben.

## Weiterführendes Forschungsprojekt

Die übrigen Varianten in diesem Genomabschnitt müssten entsprechend untersucht werden, um damit eine Mutation zu identifizieren, die für die Missbildung verantwortlich ist. Es ist jedoch nach wie vor unklar, ob eine einzige genetische Ursache oder mehrere Varianten in verschiedenen Genen zu identischen Missbildungen der Augenlider führen. Daher wäre ein anschliessendes Forschungsprojekt notwendig, indem eine grössere Anzahl betroffener Lämmer mit Entropium beim WAS sowie aus anderen Rassen erfasst werden, um diese ersten vielversprechenden Resultate zu verifizieren und dem anvisierten Fernziel, der Entwicklung von Gentests für die praktische Anwendung zur gezielten Vermeidung dieses Erbleidens, näher zu kommen.

# L'entropion chez le mouton: la génétique décide

Nathalie Hirter / Cord Drögemüller

Selon une enquête menée en 2021 auprès des quatre races de moutons principales en Suisse, laquelle a montré des différences importantes sur la fréquence d'apparition de malformations, on semble confronté à une certaine hérédité. L'entropion congénital était de loin la première malformation citée. L'étude-pilote de l'Université de Berne sur l'origine de l'apparition de cette malformation génétique chez le BA présentée ci-après a pour la première fois permis de faire le lien avec une région du génome ovin. Elle a dès lors permis de jeter les bases du développement d'un test génétique de sélection contre cette malformation.

## Qu'est-ce que l'entropion?

L'entropion (paupière enroulée) est une anomalie de naissance connue chez les moutons, pour laquelle on suspecte depuis longtemps une composante génétique. A ce jour, on n'y avait toutefois encore jamais trouvé de cause. Les agneaux touchés présentent depuis la naissance un enroulement variable de la paupière inférieure, ce qui peut conduire à une irritation constante, des douleurs, un écoulement lacrymal et des altérations de la cornée (illustration). Dans les cas prononcés, les agneaux peuvent perdre la vue. Les malformations congénitales sont heureusement rares et ne sont pas obligatoirement héréditaires, puisqu'elles peuvent aussi être occasionnée par des infections virales ou des carences, ou encore la présence de substances étrangères dans l'alimentation.

## Résultats de l'étude de 2012

L'enquête menée par la faculté Vetsuisse de l'Université de Berne auprès d'exploitations détenant l'une des quatre races principales de Suisse (Blanc des Alpes BA, Oxford OX, Brun-Noir du Pays BNP, Nez-Noir du Valais NN) a relevé des différences importantes entre les races quant à l'apparition d'anomalies congénitales. Cela laisse supposer des causes génétiques (Forum 09 | 2013, page 10). L'entropion était l'anomalie de loin la plus souvent citée et apparaît, si l'on en croit l'enquête, plus souvent chez le BA et l'OX. Le mandibulaire raccourci est quant à lui plus souvent présent chez le BNP et les hernies postérieures plus fréquentes chez le NN. En moyenne, une exploitation BA sur deux avait déjà eu des agneaux souffrant d'entropion au cours des 10 dernières années et environ 6% des agneaux durant la saison d'agnelage 2012 étaient concernés. Dans l'étude, pour laquelle plus de 1 000 moutonniers dans toute la Suisse ont rempli le questionnaire, l'entropion s'est cristallisé comme étant la malformation congénitale la plus fréquente. En conclusion, on estimait qu'il faudrait porter une attention accrue aux malformations congénitales, afin de pouvoir mettre en place des mesures d'hygiène zootechnique appropriées.

## Etude pilote consécutive

Dans le cadre d'une étude pilote, l'institut de génétique de la faculté Vetsuisse de l'Université de Berne a examiné cette problématique, visiblement spécifique à la race, à l'exemple de la race la plus touchée qu'est le BA. L'objectif était de déterminer la cause génétique de cette malformation. Des échantillons prélevés sur des agneaux touchés, signalés par des éleveurs ou des vétérinaires, ont été prélevés durant plusieurs années. Chaque agneau suspect d'entropion était examiné sur place pour en documenter



**Verschieden starke Ausprägungen von Entropium bei Lämmern.** Expressions plus ou moins fortes de l'entropion chez des agneaux.

(Photo: N. Hirter, Uni Bern)

**Tabelle: Auflistung der zwei überprüften Genvarianten**

Tableau: Présentation des deux variantes génétiques étudiées

	Lämmer mit Entropium Agneaux atteints d'entropion	Normale WAS BA normaux
Normaler SMTNL1 Genotyp (Wildtyp) Génotype SMTNL1 normal (type sauvage)	97	119
Träger der SMTNL1 Genvariante Porteur de la variante génétique SMTNL1	5	3
Normaler CTNND1 Genotyp (Wildtyp) Génotype CTNND1 normal (type sauvage)	84	65
Träger der CTNND1 Genvariante Porteur de la variante génétique CTNND1	23	95

son statut sanitaire. Des échantillons sanguins des parents et des animaux de la même portée ont également été prélevés, dans la mesure des disponibilités. A noter que l'utilisation d'un nouveau bélier était souvent tenue pour responsable de la recrudescence d'entropion, alors qu'il n'existe aucune preuve avérée à ce jour.

**Procédure**

Pour les analyses réalisées au laboratoire de génétique moléculaire, on ne s'est servi que des animaux présentant clairement un entropion, de même que d'animaux de contrôle au développement apparemment normal. Afin d'obtenir des résultats représentatifs pour la race BA et non biaisés, on a veillé à ne pas avoir de fratries ou de familles

dominantes. Dans toute la mesure du possible, on a pris en contrôle un frère ou une sœur normal de l'agneau souffrant d'entropion. On a ainsi examiné 90 agneaux atteints d'entropion et 60 animaux de contrôle sans particularité de la race BA. Compte tenu des croisements fréquemment pratiqués avec d'autres races, l'étude a également intégré quelques moutons BA ayant une proportion de sang étranger. A l'aide d'une puce à ADN pour les moutons, il a été possible de définir les génotypes de ces 150 moutons à plus de 400 emplacements du génome. La puce à ADN est un outil de laboratoire moderne que l'on utilise depuis plus de 10 ans pour la sélection génomique en élevage bovin et qui a aussi été développé pour les moutons depuis lors. Les innombrables SNP utilisés sont des marqueurs génétiques définis, répartis régulièrement sur tout le matériel génétique (26 paires de chromosomes ainsi que les deux chromosomes sexuels X et Y). Les chromosomes sont les porteurs du matériel génétique et sont présents par paires dans chaque cellule (à l'exception des cellules germinales). Le génome ovin est constitué de 54 chromosomes au total. Celui de la chèvre en a par contre 60.

**Evaluation**

A l'Institut de génétique, ces données ont permis de réaliser une étude d'association pangénomique (GWAS), comparant les génomes des 90 cas avec les 60 contrôles. L'objectif de cette GWAS était de trouver une différence entre les génotypes des moutons présentant un phénotype défini (entropion) et les moutons normaux. Compte tenu de la comparaison des animaux malades avec les animaux au développement normal, cette analyse a permis de relever des différences entre le matériel génétique de ces deux groupes. Les résultats obtenus ont été représentés graphiquement dans un «Manhattan plot» (illustration, page 11). Pour le caractère «entropion», on y a relevé une différence claire, statistiquement assurée (significative) sur le chromosome 15. On en déduit donc que les animaux BA souffrant d'entropion se distinguent clairement des moutons BA normaux sur une portion de ce chromosome. La séquence décisive est très volumineuse et comprend 14 gènes différents connus. Afin d'en réduire le nombre, on a décodé

**Die Autoren des Artikels / Les auteurs de cet article**



**Natalie Hirter, Dr. med. vet., ist seit 2019 als praktische Tierärztin in der Nutztierpraxis tätig und hat zuvor im Rahmen ihres Master- und Doktoratsstudiums an der Vetsuisse-Fakultät der Universität Bern diese Studie durchgeführt.**

Natalie Hirter, Dr med. vet., travaille comme vétérinaire en pratique rurale depuis 2019. Auparavant, elle a mené cette étude dans le cadre de son travail de master et de dissertation à la faculté Vetsuisse de l'Université de Berne.



**Cord Drögemüller, Dr. med. vet. und Professor für Nutztiergenetik am Institut für Genetik der Vetsuisse-Fakultät der Universität Bern erforscht seit über 20 Jahren genetische Besonderheiten bei Haustieren und hat mit seinem Team zahlreiche Gentests für die Zuchtpraxis entwickelt.**

Cord Drögemüller, Dr med. vet. est professeur de génétique des animaux de rente à l'Institut de génétique de la faculté Vetsuisse de l'Université de Berne. Il étudie depuis plus de 20 ans les particularités génétiques des animaux domestiques et a, avec son équipe, développé un grand nombre de tests génétiques pour la pratique de sélection.

l'intégralité de la séquence génomique de trois couples de frères et sœurs (à chaque fois un animal atteint d'entropion et un agneau normal) pour en examiner les différences à l'aide d'un programme d'ordinateur. Pour l'analyse, on a comparé le matériel génétique d'un animal touché avec celui de son frère ou de sa sœur, pour le confronter aux animaux normaux des 15 autres races de moutons. On a ainsi relevé au total une centaine de différences, des variantes ADN, qui n'apparaissent que chez les agneaux atteints d'entropion. Seules deux de ces variantes se situent au sein de gènes et peuvent donc altérer les protéines codées par ces gènes et ainsi provoquer directement les malformations congénitales.

En médecine humaine, les variantes pathologiques dans un de ces deux gènes déterminent une malformation très rare avec des anomalies oculaires (le syndrome blépharocheilo-odontique 2). Le second gène concerné agit au niveau de la musculature squelettique et lisse, raison pour laquelle il a aussi été examiné chez le mouton. On a déterminé les génotypes individuels de ces deux variantes de gènes pour un total de 231 animaux (72 BA avec entropion et 159 BA normaux). Les données ont cependant montré que les mutations n'étaient pas présentes que chez les animaux affectés, mais aussi chez des moutons BA normaux. On peut donc très vraisemblablement exclure un rapport de cause à effet avec l'entropion (tableau, page 14).

## Résultats prometteurs

L'étude pilote de détermination de la présence accrue de l'entropion chez le BA présentée ici a pour la première fois pu mettre en évidence un rapport évident avec une région du génome ovin et a donc confirmé l'hérédité suspectée. Elle a en outre permis de jeter les bases pour le développement potentiel d'un test génétique pouvant servir ultérieurement en sélection contre cette malformation. Nous saisissons l'occasion pour formuler nos cordiaux remerciements à tous les détenteurs de moutons impliqués, qui ont annoncé des animaux touchés et finalement accepté que nous venions réaliser un examen et un prélèvement d'échantillon.

## Projet de recherche consécutif

Les autres variantes dans cette séquence de génome devraient encore être examinées, pour éventuellement identifier une mutation qui pourrait être responsable de la malformation. Il n'est cependant toujours pas clair si une cause génétique unique ou plusieurs variantes dans différents gènes entraînent des malformations identiques des paupières. Un projet de recherche consécutif, qui s'intéresserait à un nombre plus élevé d'agneaux touchés par l'entropion chez le BA comme chez d'autres races, pourrait ainsi être utile afin de vérifier ces résultats prometteurs et de se rapprocher quelque peu du but lointain de développement d'un test génétique pour l'utilisation en pratique.

## Entropion palpebrale negli ovini: Fattore decisivo è la genetica

Un'indagine condotta nel 2012 sulle quattro principali razze ovine svizzere ha rilevato notevoli differenze tra le varie razze quanto all'incidenza di malformazioni, il che fa pensare a una malattia di origine genetica. L'entropion congenito (palpebra rivolta verso l'interno) è di gran lunga la malattia maggiormente indicata e, secondo l'indagine, si verifica più frequentemente nella Pecora da carne dalla testa bruna (BFS) e nella Pecora bianca delle Alpi (WAS). Nello studio pilota qui presentato, l'Istituto di genetica della Facoltà Vetsuisse dell'Università di Berna ha analizzato più in dettaglio questa problematica apparentemente legata alla razza, utilizzando l'esempio della razza maggiormente colpita, ossia la Pecora bianca delle Alpi (WAS). Un aspetto singolare è che l'introduzione di un nuovo ariete nel gregge è spesso ritenuta la causa della frequente comparsa di entropion, ma a tutt'oggi non vi sono prove certe. Gli animali idonei all'analisi nel laboratorio di genetica molecolare sono stati selezionati con grande attenzione, vale a dire che sono stati presi in considerazione complessivamente 90 casi con evidente presenza di entropion e 60 animali di controllo con uno sviluppo del tutto normale. Per mezzo di un chip a SNP per ovini, è stato possibile determinare i genotipi di questi 150 ovini in esame in oltre 400 mila siti nel genoma. Il cosiddetto studio di associazione genoma-wide (cioè uno studio sulla variazione genetica tra individui) ha rilevato una differenza nel cromosoma 15 tra ovini sani e quelli malati, sostenuta da prove statistiche. Finora, sebbene siano state fatte le prime analisi, non fu rilevata nessuna mutazione nella sezione del genoma corrispondente a tale malformazione dell'occhio. Pertanto, sarebbe opportuno realizzare un successivo progetto di ricerca, che coinvolga un maggior numero di agnelli affetti da entropion, sia della razza bianca delle Alpi che di altre razze, nell'intento di verificare questi primi risultati promettenti e raggiungere l'obiettivo a lungo termine, ossia lo sviluppo di test genetici di applicazione pratica per giungere alla prevenzione mirata di questa fastidiosa malattia genetica.