

## Mise en évidence par technique de réaction de polymérisation en chaîne en temps réel de polymorphismes au niveau du gène PrP dans deux exploitations ovines belges déclarées positives aux encéphalopathies spongiformes transmissibles.

RENARD C.<sup>1</sup>, FONTAINE S.<sup>2</sup>, CUVELIER P.<sup>2</sup>, MULLENDER C.<sup>2</sup>, ROELS S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire national de Référence pour les encéphalopathies spongiformes transmissibles vétérinaires, section de Pathologie, département de Biocontrôle, Centre d'Etude et de Recherche vétérinaire et agrochimique (CERVA/CODA), Groeselenberg, 99 à 1180 Bruxelles, Belgique.

<sup>2</sup> Cellule de Biologie moléculaire, association régionale de Santé et d'Identification animale (ARSIA), Drève du prophète, 2 à 7000 Mons, Belgique.

Correspondance : Lic. C. Renard - Tél. : 32 (0)2/379.05.54 – Fax : 32 (0)2/379.04.79 - coren@var.fgov.be

### RESUME

Suite à l'émergence des encéphalopathies spongiformes transmissibles (EST), plusieurs mesures ont été prises : d'une part, une détection active basée sur la réglementation européenne 999/2001, d'autre part, un plan de sélection de moutons « résistants » à la tremblante. Ces mesures ont augmenté la demande de génotypage de la sensibilité à la tremblante chez les ovins. Pour y faire face, il a fallu développer des techniques plus rapides et plus faciles à mettre en œuvre que celles utilisées classiquement pour le génotypage de routine. Bien que plus coûteuse, la technique de PCR en temps réel est une alternative intéressante aux techniques classiques (*Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism, Denaturing Gradient Gel Electrophoresis...*) aussi bien au niveau de sa répétabilité, de sa reproductibilité et de sa robustesse. L'analyse des profils génétiques des individus composant deux exploitations déclarées positives aux EST dans le cadre du programme de surveillance active met en évidence la présence importante (75 %) du profil correspondant à une résistance moyenne à la tremblante. La sélection d'animaux résistants semble se justifier puisque les animaux positifs présentent un génotype d'assez faible résistance.

### Introduction

Les encéphalopathies spongiformes transmissibles (EST) sont des maladies dégénératives mortelles du système nerveux central qui affectent aussi bien l'homme, avec la nouvelle variante de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (vCJD), que beaucoup d'autres espèces (ruminants, félidés...). Cette maladie se caractérise par une conversion de la protéine prion normale (PrP<sup>c</sup>) en une protéine prion modifiée, résistante aux protéinases K (PrP<sup>res</sup>), suite à une modification de sa structure spatiale (Prusiner, 1993 ; Palmer et Collinge, 1997). En effet, des étu-

des sur la structure de PrP<sup>res</sup> et PrP<sup>c</sup> ont été incapables de définir une modification chimique post-traductionnelle qui distingue une isoforme d'une autre. Ceci appuie ainsi l'hypothèse que la différence entre ces 2 protéines se situerait bien au niveau de leur conformation tridimensionnelle (Prusiner, 1993). La PrP<sup>res</sup> a également la propriété d'être extrêmement résistante à la chaleur et aux conditions normales de stérilisation (United States Department of Agriculture, 2002).

Chez le mouton, une infection à prions spécifiques aux petits ruminants peut causer la tremblante. La sensibilité

d'un individu à développer cette maladie trouve en partie son explication dans le patrimoine génétique de celui-ci. En effet, cinq allèles du gène de la PrP sont décrits, par Belt et collaborateurs (1995) et Hunter et collaborateurs (1997), comme étant associés à l'incidence de la tremblante. Ces allèles se trouvent au niveau des codons 136, 154 et 171 de l'exon 3 codant pour la protéine PrP (PRNP). Les individus dont l'allèle PrP code pour une valine (V) au niveau du codon 136 au lieu d'une alanine (A) ont un risque significativement plus élevé de développer la tremblante. Par contre

le risque de développer la maladie semble moindre si une arginine (R) au lieu d'une histidine (H) ou d'une glutamine (Q) est présente au niveau du codon 171 (Thorgeirsdottir *et al.*, 1999 ; Tongue *et al.*, 2004). L'impact du codon 154 dans la résistance à la tremblante n'est pas encore clair, mais il est possible que la présence d'une histidine au lieu d'une arginine au niveau du codon 154 puisse offrir une protection contre la pathologie pour certaines races de moutons (Elsen *et al.*, 1999 ; Thorgeirsdottir *et al.*, 1999 ; Tranulis *et al.*, 1999). Ces 5 allèles sont identifiés sous une forme simplifiée soit ARR, ARQ, ARH, AHQ et VRQ. Les génotypes résultant de la combinaison de ces allèles sont regroupés en cinq catégories selon le niveau de résistance à la tremblante (Dawson *et al.*, 1998) (tableau I).

Un nouvel allèle au niveau du codon 171 a récemment été identifié mais l'impact de cette mutation sur la résistance à développer la tremblante reste à évaluer (DeSilva *et al.*, 2003 ; Gombojav *et al.*, 2003). En 2002, Kutzer et collaborateurs ont mis en évidence deux nouvelles combinaisons alléliques (AHR et VRR) dans des races de moutons allemands. Le niveau de sensibilité à développer la tremblante reste également à établir.

Les petits ruminants peuvent cependant aussi être infectés par le prion spécifique aux bovins, et souffrir d'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) expérimentale. Ces deux infections (tremblante et ESB) ne peuvent pas être différenciées sur

base des signes cliniques (Foster *et al.*, 2001). De récentes recherches ont montré notamment que des moutons, possédant un profil génétique résistant à la tremblante, pouvaient être infectés par l'agent de l'ESB par inoculation intra cérébrale (Houston *et al.*, 2003). A ce jour, l'ESB n'a pu être identifiée comme apparaissant naturellement chez le mouton, cela a été induit expérimentalement (Foster *et al.*, 1993) mais le premier cas naturel d'ESB chez la chèvre a été découvert en France (Eloit *et al.*, 2005). Cela rejoint la déclaration de la Commission Européenne selon laquelle le risque de contamination des petits ruminants par l'agent de l'ESB malgré l'interdiction d'utiliser des farines de viande et d'os dans l'alimentation animale ne serait pas négligeable (European Commission, 2001). Il n'est donc plus exclu qu'il y ait, comme décrit dans la tremblante chez ces espèces, également une transmission verticale et une transmission horizontale. Ces moyens de transmission peuvent être suffisants pour propager l'ESB au sein de la population de petits ruminants. Depuis 2001, malgré le manque d'information relatives à la stabilité de l'agent de l'ESB au travers des espèces d'élevage, la Commission Européenne a déjà mis en place un programme de contrôle destiné à déterminer la présence de cet agent chez les petits ruminants (mode de transmission), les facteurs impliqués dans cette transmission et les risques d'exposition humaine via les moutons et les chèvres (European Commission, 2001). Suite à cette

directive européenne, la plupart des états membres ont développé et perfectionné leurs programmes de surveillance, d'analyse et de sélection. En Belgique, comme pour l'ESB, la tremblante est une maladie à déclaration obligatoire depuis 1990 (Roels *et al.*, 2001). Depuis 2001, une surveillance active au niveau des abattoirs et du clos d'équarrissage a été mise en place pour les bovins. En 2002, un contrôle semblable a été mis sur pied pour les petits ruminants et est basé sur la réglementation européenne 999/2001. Cette réglementation a permis la détection de 57 cas jusque fin 2003 répartis dans 13 foyers primaires d'EST chez le mouton (Roels *et al.*, 2004a).

Cet article a pour but d'évaluer le polymorphisme du gène PRNP dans 2 exploitations belges détectées positives pour l'EST en 2003 et de comparer la technique de *polymerase chain reaction* (PCR) en temps réel par rapport à une technique standardisée et utilisée depuis les années '90, la *polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism* (PCR - RFLP) associée à la *denaturing gradient gel electrophoresis* (DGGE) (Bossers *et al.*, 1996). En effet, ces techniques bien que fiables, sont relativement lourdes à mettre en place et la durée d'analyse est longue. Une méthode de détection plus rapide et nécessitant moins de manipulation offre un intérêt certain dans le génotypage de masse.

## Matériels et Méthodes

### Echantillonnage

La population étudiée correspond à deux exploitations ovines, respectivement composées de 187 et 87 animaux (tableau II) dans lesquelles un animal a été détecté positif au niveau de l'abattoir dans le cadre du programme de surveillance active des EST via le test ELISA Bio-Rad (PLATELIA BSE kit, Bio-Rad, Nazareth, Belgium) (Pastoret *et al.*, 2001 ; Roels *et al.*, 2002). Tous les animaux ont été prélevés.

### Extraction de l'acide désoxyribonucléique

L'ADN est extrait à partir de sang à l'aide d'un kit commercial UltraClean BloodSpin Kit (MO BIO Labs, Solana Beach, CA, USA) et à partir de tissus (tissu cérébral ou biopsie d'oreille)

**Tableau I** - classification des niveaux de résistance à la tremblante en fonction des génotypes obtenus aux codons 136, 154 et 171.

Niveaux de résistance	Génotypes PrP
R1 : résistance très élevée	ARR/ARR
R2 : résistance élevée	ARR/AHQ ; ARR/ARH ; ARR/ARQ
R3 : résistance moyenne	ARQ/ARH ; ARQ/AHQ ; AHQ/AHQ ; ARH/ARH ; AHQ/ARH ; ARQ/ARQ
R4 : haute sensibilité	ARR/VRQ
R5 : très haute sensibilité	AHQ/VRQ ; ARH/VRQ ; ARQ/VRQ ; VRQ/VRQ

Les génotypes sont donnés sous forme de deux séries de trois lettres XXX/XXX. La première lettre de chaque série correspond aux deux allèles du codon 136, la deuxième aux deux allèles du codon 154 et la troisième aux deux allèles du codon 171.

A = alanine ; H = histidine ; Q = glutamine ; R = arginine ; V = valine.

**Tableau II** - répartition des races au sein des deux exploitations étudiées.

Race	Exploitation 1	Exploitation 2
inconnus	/	6
Bizet	/	1
Black-face	/	4
Bleu du maine	/	2
Border Leicester	/	2
Croisé	112	/
Cameroun	/	1
Causse du lot	/	5 (1*)
Entre sambre et meuse	/	4
Hamshire	/	2
Jacob	/	4
Karakul	/	1
Laitier Belge	/	2
Laitier Brun	/	6
Manech	/	2
Merinos	/	4
Mohair	/	7
Nez noir du valais	/	5
Quessant	/	2
Racka	/	8
Rouge de l'ouest	/	1
Roux ardennais	73	2
Skudell	/	3
Sohay	/	5
Somalien	/	2
Texel	1	/
Texel île de France	1*	/
Thone et marthod	/	3
Vendéen	/	1
Zwartbles	/	2
<b>Total de moutons analysés</b>	<b>187</b>	<b>87</b>

\* animal positif au test ELISA Bio-Rad.

avec le kit Tissue DNA Isolation Kit (MO BIO Labs, Solana Beach, CA, USA).

### Génotypage

L'étude des polymorphismes associés avec la tremblante a été réalisée dans un premier temps à l'aide de la réaction de polymérisation en chaîne associée à la méthode de révélation DGGE pour le codon 171 (Belt *et al.*, 1995) ainsi que par PCR-RFLP pour les codons 136 et 154 (Belt *et al.*, 1995).

Dans un deuxième temps, ces polymorphismes ont été étudiés par la technique de réaction de polymérisation en chaîne en temps réel qui se base sur une amplification spécifique d'une partie de l'exon 3 du gène PRNP. Pour ce faire, quatre réactions

PCR par échantillon sont réalisées car contrairement aux codons 136 et 154, deux réactions PCR sont nécessaires pour le génotypage du codon 171. La réaction d'amplification est réalisée dans un volume réactionnel de 25 µl composé de 50-100 ng d'ADN, TaqMan Universal PCR master mix 2x (Branchburg, New Jersey, USA), 900 nM du jeu d'amorces (tableau III) et de 200 nM de sonde. L'amplification est réalisée en utilisant le protocole standard de l'appareil ABI Prism 7000 Sequence Detection Systems : paramètre de quantification absolue (Applied Biosystems, Netherlands). Celui-ci consiste en une étape d'activation de l'UNG (Uracile N-glycosylase) à 50°C pendant 2 min suivie par une première dénaturation à 95°C pendant 10 min ; de 40 cycles de dénaturation à 95°C

pendant 15 sec, et d'hybridation à 60°C pendant 1 min. Les résultats sont ensuite analysés avec ABI Prism 7000 Sequence Detection Systems Software : paramètre de discrimination allélique (Applied Biosystems, Netherlands).

La comparaison entre la méthode DGGE-RFLP, que nous appellerons méthode de référence et la méthode alternative (PCR en temps réel) est établie selon deux facteurs principaux pour la validation de méthode qualitative, la praticabilité (définie par le temps et la facilité de mise en œuvre d'une méthode, ainsi que par son coût) et la justesse ou l'exactitude (correspond au pourcentage de concordance entre la méthode dites de référence et la méthode alternative). La répétabilité (correspond au pourcentage de concordance entre deux analyses réalisées avec la même méthode par des techniciens différents avec du matériel différent et dans des locaux différents) et la robustesse (définie comme la capacité de la méthode alternative à obtenir un résultat avec des matrices d'origine et de qualité diverses) seront également présentées pour la méthode PCR en temps réel.

### Résultats

#### Analyses des résultats

L'exploitation 1 était principalement composée de moutons Roux Ardennais et de croisements inconnus (tableau II). L'animal positif (par le test ELISA Bio Rad) pour les EST était un croisé Texel-Ile de France dont le profil génétique pour la tremblante est VRQ/VRQ. Les autres individus de l'exploitation étaient négatifs. L'exploitation

**Tableau III** - amorces et sondes utilisées pour la technique de réaction de polymérisation en chaîne en temps réel.

Codons	Séquences des amorces <sup>1</sup>	Sondes <sup>1</sup>	Taille de l'amplicon (bp)
136	F : CTGCAGCTGGAGCAGTGGTA R : GATAGTAACGGTCCTCATAGTCATTGC	Fam: TCATGgCACTTCC Vic: CTCATG <sub>a</sub> CACTTCC	105
154	F : CATGAGCAGGCTCTTATACATTTT R : GATCCACTGGTCTGTAGTACACTTGG	Fam: CCGTTACTATCgTGAAAA Vic:CGTTACTATCaTGAAAAAC	105
171	F : GTTACCCCAACCAAGTGTACTACAGA R : TGTTGACACAGTCATGCACAAAG	Fam: CCAGTGGATCgGTATA Vic: ACCAGTGGATCagTATA Vic: ACCAGTGGATCaTTAT	78

F = forward ; R = reverse.

<sup>1</sup> les séquences des amorces et des sondes sont écrites de 5' en 3'.

**Tableau IV** - Distribution des fréquences des génotypes, des fréquences alléliques et distribution de fréquence en fonction du niveau de résistance à la tremblante pour les 2 exploitations.

Exploitation		1	2	Total	Fréquences (%) / niveau de résistance
Génotypes					
<b>R1</b>	ARR/ARR	10	17	27	<b>9,85</b>
<b>R2</b>	ARR/AHQ	9	2	11	
	ARR/ARH	1	4	5	<b>29,20</b>
	ARR/ARQ	43	21	64	
<b>R3</b>	ARQ/ARH	5	0	5	
	ARQ/AHQ	16	9 (dont 1 positif EST)	25	
	AHQ/AHQ	0	1	1	
	ARH/ARH	0	0	0	
	AHQ/ARH	3	0	3	
	ARQ/ARQ	56	31	87	<b>44,16</b>
<b>R4</b>	ARR/VRQ	13	2	15	
<b>R5</b>	AHQ/VRQ	1	0	1	
	ARH/VRQ	2	0	2	
	ARQ/VRQ	26	0	26	
	VRQ/VRQ	2 (dont 1 positif EST)	0	2	
<b>Fréquences alléliques (%)</b>					
	<b>ARR</b>	22,99	36,21	<b>27,19</b>	
	<b>AHQ</b>	7,75	7,47	<b>7,66</b>	
	<b>ARH</b>	2,94	2,30	<b>2,74</b>	
	<b>ARQ</b>	54,01	52,87	<b>53,65</b>	
	<b>VRQ</b>	12,30	11,76	<b>8,76</b>	
<b>Effectif total</b>		<b>187</b>	<b>87</b>	<b>274</b>	

EST = encéphalopathie spongiforme transmissible.

était subdivisée en groupes génétiques à risque, selon la table de Dawson et collaborateurs (1998) pour la tremblante dans l'ordre d'importance en R3-R2-R5-R4 et R1 (figure 1). Tous les profils génétiques connus étaient représentés dans cette exploitation à l'exception de AHQ/AHQ et ARH/ARH.

L'exploitation 2 était fortement hétérogène du point de vue des races qui la composent (tableau II). En effet, 28 races sont représentées pour un nombre total de 87 individus. Comme pour l'exploitation 1, un seul animal était positif au test ELISA BioRad. Il s'agissait d'un Causse du Lot possédant le profil génétique ARQ/AHQ (R3) pour la tremblante. La répartition en groupes génétiques à risque pour cette exploitation correspondant dans l'ordre croissant à R3-R2-R1-

R4. Le niveau R5 n'est pas représenté dans cette exploitation. Bien qu'hétérogène pour les races la composant, cette exploitation est relativement homogène en terme de génotypes représentés ARQ/ARQ, ARR/ARQ et ARR/ARR.

La distribution des fréquences alléliques (%) au sein des deux exploitations est relativement semblable (tableau IV). La présence de l'allèle ARQ (53,65 %) est fortement marquée dans les deux exploitations, celui-ci est suivi par l'allèle ARR (27,19 %), puis VRQ (8,76 %), AHQ (7,66 %) et pour finir par l'allèle ARH (2,74 %) (tableau IV). Pour l'ensemble des échantillons testés nous observons une prédominance du groupe « R3 » avec une fréquence de 44,16 % suivi des groupes R2 puis R5, R1 et R4 (tableau

IV). Les animaux positifs présentent un génotype d'assez faible résistance.

#### **Comparaison de la RT-PCR et de la RFLP-DGGE**

##### Praticabilité

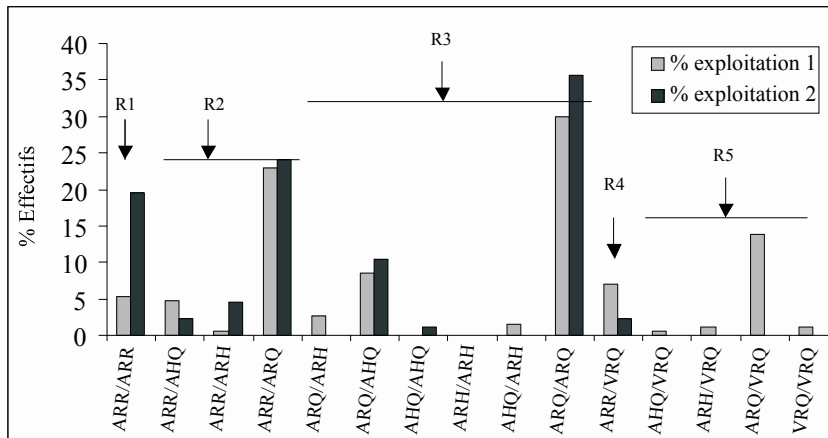
Le temps nécessaire à l'extraction et la préparation des réactifs ainsi que le temps de lecture et d'expression des résultats lors de la réalisation de la méthode PCR en temps réel peuvent être estimés, pour dix échantillons, à 4 h. Par contre, l'analyse par la méthode RFLP-DGGE demande trois jours pour obtenir un résultat complet.

##### Justesse

La justesse ou l'exactitude est de 100 %.



Figure 1 - Répartition des génotypes dans les deux exploitations.



### Répétabilité

La répétabilité est également de 100 %.

### Reproductibilité

La reproductibilité de cette méthode alternative a été évaluée à 100 % entre le Centre d'Etude et de Recherche vétérinaire et agrochimique (CERVA/CODA) et l'Association régionale de Santé et d'Identification animale (ARSIA).

### Robustesse

Actuellement le sang, le cerveau et des morceaux d'oreille ont été testés. Moins de 1 % (0,33 %) des analyses ont dû être recommencées suite à l'absence de résultat. Il existe naturellement pour un même animal une concordance entre les résultats obtenus avec du sang ou des morceaux d'oreille.

### Discussion

Des marqueurs ADN sont utilisés pour détecter les gènes déficients ou non désirables et écarter de la ligne de reproduction les animaux qui en sont porteurs. La demande accrue de détermination des profils génétiques de la tremblante dans le contexte européen nécessite, de la part des laboratoires de routine, la mise en place de techniques rapides et fiables. La présente étude a permis de démontrer que la technique de PCR en temps réel est aussi sensible, répétable et reproductible que la technique PCR-RFLP-DGGE de référence (Belt *et al.*, 1995). Le faible taux d'échec suite à l'utilisation de matrices d'origine et de qualités diverses en démontre

la robustesse (le taux d'échec de la méthode de référence étant de 0,9 %). De plus, contrairement aux méthodes de migration sur gel, la technique PCR en temps réel est facile à mettre en oeuvre et la lecture des résultats est aisée. En effet, les sondes utilisées en PCR en temps réel sont marquées par des fluorophores qui émettent un signal tout au long du processus. Ce signal est analysé en fin d'analyse sans aucune manipulation technique. Ensuite, l'interprétation des résultats n'est jamais biaisée par la qualité du gel réalisé. En effet, il n'est pas rare en RFLP ou DGGE de devoir recommencer complètement une analyse car des problèmes de migration rendent les résultats inexploitable. De plus, cette technique évite l'utilisation de produits toxiques et/ou mutagènes utilisés dans la révélation de l'ADN. En effet, les méthodes DGGE et RFLP demandent l'utilisation d'acrylamide (Institut national de Recherche et de Sécurité, 1992) ainsi que de bromure d'éthidium (Brondeau *et al.*, 2000), substances connues pour avoir des effets néfastes sur la santé humaine. Finalement, bien que la méthode de PCR en temps réel nécessite du matériel et des réactifs relativement coûteux, le gain de temps qu'elle engendre en terme de prestation technique, qui représente généralement 50 % du coût de l'analyse, en fait une technique économiquement intéressante pour des analyses de routine.

Depuis 2002, et à la suite des mesures prises par l'Union européenne, il existe de la part des détenteurs de moutons une prise de conscience et un intérêt de plus en plus marqué pour le génotypage de la tremblante.

Comme l'indiquent les résultats pour

ces deux exploitations, la majorité des génotypes appartient au groupe R3 correspondant au niveau de résistance moyen. Ce groupe est caractérisé par une présence majoritaire de l'allèle ARQ. De plus, les animaux dépistés positifs par le test TSE ELISA BioRad appartenaient aux groupes génétiques R3 et R5 correspondant à une sensibilité respectivement modérée et forte à la tremblante. Ces résultats confirment ceux obtenus lors d'une précédente étude réalisée en Belgique dans le cadre de la surveillance active de la tremblante (Roels *et al.*, 2004b). La sélection d'animaux résistants semble se justifier puisque les animaux positifs présentent un génotype d'assez faible résistance. Bien qu'il soit communément établi dans la littérature que les polymorphismes observés au niveau des codons 136, 154 et 171 soient fortement corrélés au risque qu'a un individu de développer les signes cliniques de la tremblante, ces points de mutation ne sont probablement pas les seuls paramètres intervenant dans le développement de cette pathologie. En effet, Des formes atypiques de tremblante ont été rapportées chez des moutons « résistants » en Allemagne, au Portugal, en France et en Belgique (European Food Safety Authority, 2003 ; Baylis et McIntyre, 2004 ; De Bosschere *et al.*, in press). De ce fait, d'autres mutations au niveau du gène PRNP comme le codon 141 (Moum *et al.*, 2005) ou le codon 171 (DeSilva *et al.*, 2003 ; Gombojav *et al.*, 2003) et les facteurs environnementaux, le type d'élevage ont probablement un rôle à jouer dans la sensibilité à la tremblante.

Les données actuelles semblent montrer qu'un plan de lutte contre les EST chez les ovins ne pourrait certainement pas être basé sur les seules techniques de génotypage des codons 136, 154 et 171 en excluant la surveillance passive et la surveillance active. D'autre part, indépendamment de l'efficacité potentielle de ce type de lutte, l'abandon des critères de sélection classiques tels que la conformation, le niveau de production, les aplombs, la qualité de la laine... au profit du génotype de résistance vis-à-vis de la tremblante mènerait inévitablement à une perte de diversité génétique, préjudiciable à terme, à l'ensemble du secteur. Pour finir, il ne faut pas perdre de vue l'impact d'un tel programme sur la santé humaine. En effet, les animaux sélectionnés « résistants », sensés ne jamais

présenter de signes cliniques, ne se seraient-ils pas des porteurs potentiels de l'infection ?

## Conclusion

La PCR en temps réel semble être une bonne alternative à la technique de référence au vue de sa fiabilité et de sa robustesse. De plus, cette technique plus moderne et plus facile à mettre en œuvre permet d'obtenir les résultats rapidement.

La distribution des génotypes de cette étude semble confirmer des résultats antérieurs à savoir que les animaux positifs se retrouvent plutôt dans les catégories des non résistants à la tremblante. Néanmoins, il peut être dangereux de miser sur ce seul facteur de sélection.

## Remerciements

J. De Sloovere, S. Durand et R. Foubert (CERVA/CODA) pour l'assistance technique.

## Identification by real time polymerization chain reaction of polymorphisms of PrP gene in two Belgian herds declared positive for transmissible spongiform encephalopathies.

### SUMMARY

Following the emergence of the transmissible spongiform encephalopathies (TSEs), several measures were taken : on the one hand, an active detection based on the European regulation 999/2001 and on the other hand, a selection plan of sheep "resistant" to scrapie. These measures increased the request for genotyping of PrP gene for sensitivity to scrapie in sheep. Therefore, it was necessary to develop techniques that are faster and easier to implement than those classically used for routine genotyping. Although more expensive, the

technique of real time polymerization chain reaction offers an interesting alternative to the traditional techniques (Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism, Denaturing Gradient Gel Electrophoresis...) as well on the level of repeatability, reproducibility and robustness. The analysis of the genetic profiles of individuals composing two herds declared positive for TSE within the framework of the program of active monitoring, highlights an important presence (75 %) of the profile which corresponds to an average resistance to scrapie. The selection of resistant animals seems to be justified since the animals found positive have a genotype of rather low resistance.

---

## BIBLIOGRAPHIE

- BAYLIS M., MCINTYRE K.M. Epidemiology : new variants of scrapie. *Nature*, 2004, **432**, 810.
- BELT P.B., MUILEMAN I.H., SCHREUDER B.E., BOS-DE RUIJTER J., GIELKENS A.L., SMITS M.A. Identification of five allelic variants of the sheep PrP gene and their association with natural scrapie. *J. Gen. Virol.*, 1995, **76**, 509-17.
- BOSSERS A., SCHREUDER B.E., MUILEMAN I.H., BELT P.B., SMITS M.A. PrP genotype contributes to determining survival times of sheep with natural scrapie. *J. Gen. Virol.*, 1996, **77**, 2669-2673.
- BRONDEAU M.T., FALCY M., JARGOT D., PROTOIS J.C., REYNIER M., SCHNEIDER O., SERRE P. Bromure d'éthidium : fiche toxicologique n°236. (2000) [en ligne] Adresse URL : [http://www.inrs.fr/INRS-PUB/inrs01.nsf/inrs01\\_catalog\\_view\\_view/85C0D0F1A0059ACDC1256CE8005A3CEE/\\$FILE/ft236.pdf](http://www.inrs.fr/INRS-PUB/inrs01.nsf/inrs01_catalog_view_view/85C0D0F1A0059ACDC1256CE8005A3CEE/$FILE/ft236.pdf) Consulté le 18 avril 2005.
- DAWSON M., HOINVILLE L.J., HOSIE B.D., HUNTER N. Guidance on the use of PrP genotyping as an aid to the control of clinical scrapie. *Vet. Rec.*, 1998, **142**, 623-625.
- DE BOSSCHERE H., ROELS S., DECHAMPS P., VANOPDENBOSCH E. TSE detected in a Belgian ARR-homozygous sheep via active surveillance. *Vet. J.*, in press.
- DESILVA U., GUO X., KUPFER D.M., FERNANDO S.C., PILLAI A.T., NAJAR F.Z., SO S., FITCH G.Q., ROE B.A. Allelic variants of ovine prion protein gene (PRNP) in Oklahoma sheep. *Cytogenet. Genome Res.*, 2003, **102**, 89-94.
- ELOIT M., ADJOU K., COULPIER M., FONTAINE J.J., HAMEL R., LILINT., MESSIAEN S., ANDREOLETTI O., BARON T., BENCSIK A., BIACABE A.G., BERINGUE V., LAUDE H., LE DUR A., VILOTTE J.L., COMOY E., DESLYS J.P., GRASSI J., SIMON S., LANTIER F., SARRADIN P. BSE agent signatures in a goat. *Vet. Rec.*, 2005, **156**, 523-524.
- ELSEN J.M., AMIGUES Y., SCHELCHER F., DUCROCQ V., ANDREOLETTI O., EYCHENNE F., TIEN KHANG J.V., POIVEY J.P., LANTIER F., LAPLANCHE J.L. Genetic susceptibility and transmission factors in scrapie : detailed analysis of an epidemic in a closed flock of Romanov. *Arch. Virol.*, 1999, **144**, 431-445.
- EUROPEAN COMMISSION, HEALTH AND CONSUMER PROTECTION DIRECTORATE-GENERAL TSEs in small ruminants : opinion on the safety of small ruminants products should BSE in small ruminants become probable/confirmed. (2001) [en ligne] Adresse URL : [http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/ssc/out234\\_en.pdf](http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/ssc/out234_en.pdf) Consulté le 2 mai 2005.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY Opinion of the scientific Panel on Biological Hazards on a request from the Commission related on the interpretation of results of EU surveillance of transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) in ovine and caprine animals, culling strategies for TSEs in small ruminants and the TSE-related safety of certain small ruminant products. *EFSA J.*, 2003, **12**, 1-6.
- FOSTER J.D., HOPE J., FRASER H. Transmission of bovine spongiform encephalopathy to sheep and goats. *Vet. Rec.*, 1993, **133**, 339 - 341.

- FOSTER J.D., PARNHAM D.W., HUNTER N., BRUCE M. Distribution of the prion protein in sheep terminally affected with BSE following experimental oral transmission. *J. Gen. Virol.*, 2001, **82**, 2319-2326.
- GOMBOJAV A., ISHIGURO N., HORIUCHI M., SERJMYADAG D., BYAMBAA B., SHINAGAWA M. Amino acid polymorphisms of PrP gene in Mongolian sheep. *J. Vet. Med. Sci.*, 2003, **65**, 75-81.
- HOUSTON F., GOLDMANN W., CHONG A., JEFFREY M., GONZALEZ L., FOSTER J., PARNHAM D., HUNTER N. Prion diseases : BSE in sheep bred for resistance to infection. *Nature*, 2003, **423**, 498.
- HUNTER N., MOORE L., HOSIE B.D., DINGWALL W.S., GREIG A. Association between natural scrapie and PrP genotype in a flock of suffolk sheep in Scotland. *Vet. Rec.*, 1997, **140**, 59-63.
- INSTITUT NATIONAL DE RECHERCHE ET DE SECURITE (FRANCE) Acrylamide : fiche toxicologique n°119. (1992) [en ligne] Adresse URL : [http://www.inrs.fr/INRS-PUB/inrs01.nsf/inrs01\\_catalog\\_view\\_view/6FF38EFEA1841E95C1256CE8005A91B1/\\$FILE/ft119.pdf](http://www.inrs.fr/INRS-PUB/inrs01.nsf/inrs01_catalog_view_view/6FF38EFEA1841E95C1256CE8005A91B1/$FILE/ft119.pdf) Consulté le 18 avril 2005.
- KUTZER T., PFEIFFER I., BRENIG B. Identification of new allelic variants in the ovine prion protein (PrP) gene. *J. Anim. Breed. Genet.*, 2002, **119**, 201-8.
- MOUMT., OLSAKER I., HOPP P., MOLDAL T., VALHEIM M., MOUM T., BENESTAD S.L. Polymorphisms at codons 141 and 154 in the ovine prion protein gene are associated with scrapie Nor98 cases. *J. Gen. Virol.*, 2005, **86**, 231-235.
- PALMER M.S., COLLINGE J. Prion diseases : an introduction. In : Collinge J., Palmer M.S. (Eds), Prion Diseases. Oxford University Press : New York, 1997, 1-17.
- PASTORET P.P., GOUFFAUX M., SAEGERMAN C., ROELS S., DESCHAMPS P., THIRY E., VANOPDENBOSCH E. Le diagnostic immunologique rapide des encéphalopathies spongiformes transmissibles. *Ann. Med. Vét.*, 2001, **145**, 164-173.
- PRUSINER S.B. Prion encephalopathies of animals and humans. *Dev. Biol. Stand.*, 1993, **80**, 31-44.
- ROELS S., DE MEYER G., VANOPDENBOSCH E. Encéphalopathie spongiforme bovine et variante de la maladie de Creutzfeldt-Jakob : quelques informations concernant l'origine, le diagnostic, l'épidémiologie, l'analyse du risque et l'avenir. *Ann. Med. Vét.*, 2001, **145**, 333-341.
- ROELS S., DE MEYER G., TEDIK K., FOUBERT R., VANOPDENBOSCH E. Variation of mass (volume) taken with the calibrated syringe and of the results provided by the Bio-Rad Platelia™ BSE test upon storage of brainstem samples at -20°C. *Anim. Res.*, 2002, **51**, 493-499.
- ROELS S., DE BOSSCHERE H., SAEGERMAN C., DESCHAMP P., VANOPDENBOSCH E. BSE Surveillance and testing in Belgium. *New Food*, 2004a, **1**, 36-40.
- ROELS S., RENARD C., DE BOSSCHERE H., GEEROMS R., VAN POUCKE M., PEELMAN L., VANOPDENBOSCH E. Detection of polymorphisms in the prion protein gene in the Belgian sheep population : some preliminary data. *Vet. Q.*, 2004b, **26**, 3-11.
- THORGEIRSDOTTIR S., SIGURDARSON S., THORISSON H.M., GEORGSSON G., PLASDOTTIR A. PrP gene polymorphism and natural scrapie in Icelandic sheep. *J. Gen. Virol.*, 1999, **80**, 2527-2534.
- TONGUE S.C., WILESMITH J.W., COOK C.J. Frequencies of prion protein (PrP) genotypes and distribution of ages in 15 scrapie-affected flocks in Great Britain. *Vet. Rec.*, 2004, **154**, 9-16.
- TRANULIS M.A., OSLANDA., BRATBERG B., ULVUND M.J. Prion protein gene polymorphisms in sheep with natural scrapie and healthy controls in Norway. *J. Gen. Virol.*, 1999, **80**, 1073-1077.
- UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Bovine spongiform encephalopathy. (2002) en ligne Adresse URL : [http://www.aphis.usda.gov/lpa/pubs/fsheet\\_faq\\_notice/fs\\_ahbse.pdf](http://www.aphis.usda.gov/lpa/pubs/fsheet_faq_notice/fs_ahbse.pdf) Consulté le 10 mai 2005.