

Effet du polymorphisme (AA/GC) au locus *DGAT1* sur l'activité transcriptionnelle du tissu mammaire bovin, sur la composition du lait et sur les caractéristiques des globules gras et des micelles de caséines

FAUCON F. (1,2), REBOURS E. (1), BERNARD L. (3), HURTAUD C. (4), MIRANDA G. (1), MENARD O. (5), DHORNE-POLLET S. (1), BEVILACQUA C. (1), LARROQUE H. (6), GALLARD Y. (7), LEROUX C. (3), MARTIN P. (1)

(1) INRA - UR1196 génomique et physiologie de la lactation, équipe GEL-PICT, F-78352 Jouy-en-Josas

(2) Institut de l'élevage - F-75012 Paris

(3) INRA, UR1213 herbivores - équipe TALL - F-63122 Saint-Genès-Champanelle

(4) INRA - AgroCampus ouest - UMR1080 production du lait - F-35590 Saint-Gilles

(5) INRA - AgroCampus ouest - UMR1253 science et technologie du lait et de l'œuf - F-35042 Rennes

(6) INRA - UR337 station de génétique quantitative et appliquée - F-78352 Jouy-en-Josas

(7) INRA - UE326 unité expérimentale du Pin-au-Haras - F-61310 Exmes

RESUME - La recherche de QTL laitiers bovins affectant la matière grasse laitière (MGL) a conduit à l'identification d'un polymorphisme (AA vs. GC) au niveau du gène spécifiant l'enzyme *Diacylglycérol Acyltransferase 1* (*DGAT1*) impliquée dans l'étape ultime et limitante de la synthèse des triglycérides, qui composent majoritairement (97 %) la MGL. Ce polymorphisme modifie la séquence en acides aminés de la protéine (K232A), ce qui entraîne une réduction de la vitesse maximale de la réaction catalysée par *DGAT1* et donc de son efficacité. Notre objectif était d'étudier l'effet de ce polymorphisme : d'une part sur la composition et les caractéristiques des structures supramoléculaires du lait (globules gras et micelles de caséines), et d'autre part sur le transcriptome de la région sécrétrice du tissu mammaire. Pour cela, sept couples de vaches laitières pleine-sœurs ou demi-sœurs (même père) et de génotypes opposés (homozygotes AA/AA et GC/GC) au locus *DGAT1* ont été choisis au sein du dispositif de détection de QTL laitiers (croisement Holstein x Normande) mis en place sur l'installation expérimentale du Pin-au-Haras. La taille et la composition des globules gras et des micelles de caséines des laits ont été analysées. Une étude transcriptomique a été réalisée à partir des ARN totaux extraits de biopsies de tissu mammaire et hybridés sur des lames bovines 22K produites par le CRB de Jouy-en-Josas et des lames bovines 4x44K d'Agilent Technologies. L'analyse des laits confirme une diminution du taux butyreux (TB) et montre une réduction de la taille des globules gras pour les individus de génotype GC/GC (A232), associé à un TB faible. La composition en acides gras des laits varie dans le sens d'une augmentation de l'acide myristique (C14 :0) et des acides gras longs et insaturés (C18 :1 et C20 :1) chez des individus homozygotes pour l'allèle GC (A232). L'analyse transcriptomique a mis en évidence 1496 gènes différemment exprimés entre les deux génotypes au locus *DGAT1*. Ces gènes sont principalement impliqués dans les voies du métabolisme glucidique et lipidique.

Effect of the polymorphism (AA/GC) occurring at the *DGAT1* locus on the transcriptional activity of the bovine mammary tissue, on the milk content and on the milk fat globules and casein micelle characteristics

FAUCON F. (1,2), REBOURS E. (1), BERNARD L. (3), HURTAUD C. (4), MIRANDA G. (1), MENARD O. (5), DHORNE-POLLET S. (1), BEVILACQUA C. (1), LARROQUE H. (6), GALLARD Y. (7), LEROUX C. (3), MARTIN P. (1)

(1) INRA - UR1196 Génomique et Physiologie de la Lactation - équipe GEL-PICT - F-78352 Jouy-en-Josas

(2) Institut de l'Élevage - F-75012 Paris

SUMMARY - Bovine milk QTL research has revealed a polymorphism (AA vs GC) in the gene encoding the Diacylglycerol Acyltransferase 1 (*DGAT1*) enzyme. This enzyme catalyzes the ultimate and limiting step of the triacylglyceride (TAG) synthesis, which represents the major milk fat fraction (97%). This polymorphism modifies the amino acid sequence of the protein (K232A) which affects the maximum velocity (V_{max}) and the efficiency of the enzyme. The aim of this work was to study the effect of the K232A polymorphism on (i) the milk composition and milk fat globule and casein micelle characteristics, (ii) the transcriptome of the mammary tissue. Seven paired full-sib or half sib cows (same father) with opposite and homozygous genotype at the locus *DGAT1* were chosen from the milk QTL herd reared on an experimental farm at Le Pin-au-Haras (INRA, France). Milk samples were analysed for fat globule and casein micelle size and composition. Transcriptomic study was performed on total RNA extracted from mammary biopsies and hybridised on 22K bovine slides produced at the CRB in Jouy-en-Josas (INRA, France) and 4x44K bovine slides from Agilent Technologies. Milk fat content and the fat globule size decreased whereas myristic (C14:0) as well as long and unsaturated fatty acid (C18:1 and C20:1) content increased for individuals of genotype GC/GC A232 at the *DGAT1* locus. From the transcriptomic analysis, 1 496 genes were shown to be differentially expressed between the two *DGAT1* genotypes. These genes are mainly involved in glucose and lipid metabolism pathways.

INTRODUCTION

La filière laitière connaît actuellement une phase critique en partie due à la baisse de consommation du lait liée à la teneur élevée en acides gras saturés de sa matière grasse (matière grasse laitière, MGL), essentiellement constituée de triglycérides (97 %), les acides gras saturés étant reconnus athérogènes lorsqu'ils sont consommés de façon excessive (Bingham, 2002). L'enzyme qui catalyse l'étape ultime et limitante de la synthèse des triglycérides, est la *Diacylglycérol Acyltransferase 1*. Il a été montré chez la

souris que l'inactivation du gène spécifiant cette enzyme conduit à une absence totale de production laitière (Smith *et al.*, 2000). Chez les bovins laitiers, le locus *DGAT1* est localisé dans la terminaison centromérique du chromosome 14 (BTA14) où un QTL affectant la quantité de lait, de MGL produite et la concentration de MGL a été détecté (Coppieters *et al.*, 1998, Boichard *et al.*, 2003). La différence de quantité de MGL produite, mais également de taux butyreux (TB), entre individus est pour partie expliquée par la substitution de deux nucléotides successifs (AA→GC)

localisée dans le huitième exon du gène *DGAT1* et conduisant aux deux formes alléliques du gène les plus répandues (Grisart *et al.*, 2002). Cette double mutation induit une substitution lysine /alanine en position 232 de la chaîne peptidique (K232A) de la protéine qui a pour effet de modifier la vitesse maximale de l'enzyme (Grisart *et al.*, 2004) et l'affinité pour son substrat, expliquant pour partie le changement de composition en acides gras (AG) du lait observé par Schennink *et al.* (2007).

Notre objectif était d'une part de valider l'effet de cette double mutation au locus *DGAT1* sur les performances laitières et sur la composition en acides gras du lait des animaux choisis à partir du dispositif mis en place au Pin-au-Haras (croisement Holstein x Normande, Larroque *et al.*, 2003) et d'autre part d'en étudier l'effet sur la taille des globules gras, des micelles de caséines et sur l'activité transcriptionnelle du tissu mammaire, afin de mieux cerner les voies métaboliques affectées par ce polymorphisme.

Pour plus de clarté, le génotype AA/AA (K232) au locus *DGAT1* sera appelé génotype « fort » (pour le critère TB) et le génotype GC/GC (A232), génotype « faible ».

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. ANIMAUX

Quatorze vaches laitières homozygotes au locus *DGAT1* issues de trois pères différents ont été sélectionnées au sein du dispositif de détection de QTL laitiers du Pin-au-Haras. A chaque vache de génotype homozygote fort (AA/AA) au locus *DGAT1* était associé, soit sa pleine sœur (n = 4), soit sa demi-sœur (même père, n = 3) de génotype homozygote faible (GC/GC), pour constituer *in fine* sept couples de vaches de génotypes opposés. En 2007, année au cours de laquelle fut mis en place le protocole à l'INRA de Theix (installations expérimentales de l'URH), deux couples de vaches étaient en troisième lactation (L3), deux couples en deuxième lactation (L2) et trois couples en première lactation (L1). L'originalité de ce dispositif par rapport aux études précédemment réalisées sur la mutation K232A au locus *DGAT1* réside dans le fait que les vaches d'un même couple étaient de même stade de lactation, étaient homozygotes et de génotype opposé au locus *DGAT1*, se trouvaient dans le même élevage et recevaient le même régime alimentaire au moment des prélèvements.

1.2. MESURES PHENOTYPIQUES

A deux cent trente jours (± 20 jours), les performances laitières ont été mesurées sur une semaine, alors que les animaux recevaient *ad libitum* un régime de type hivernal à base d'ensilage de maïs. Les variables mesurées étaient : la production laitière journalière (lait en kg / j), les taux butyreux (TB) et protéique (TP) et la teneur en lactose (TL en g / kg), la quantité de cellules dans le lait (en millier / ml), le poids de l'animal (en kg). A partir de ces valeurs mesurées, étaient calculées les quantités de matière grasse (MG = TB x lait), protéique (MP = TP x lait) et de lactose (ML = TL x lait en g / j) secrétées. La composition du lait en acides gras et la taille des globules gras ont été mesurées sur un échantillon de lait de la traite du matin. La composition en protéines majeures et la taille des micelles de caséine ont été évaluées sur un échantillon de lait de la traite du soir. Les performances zootechniques et les mesures sur les laits, ont été analysées statistiquement (analyse de variance) en utilisant la fonction *lme* (modèle linéaire mixte) du package « *nlme* » du logiciel R. Le modèle d'analyse de variance était :

$y = \text{gen} + \text{lact} + \text{gen} \times \text{lact} + \text{Père} + e$,
Avec

y : variable quantitative étudiée,

« gen » : effet fixe du polymorphisme au locus *DGAT1*,

« lact » : effet fixe du stade de lactation,

Père : effet aléatoire du père,

« gen x lact » : interaction entre l'effet « gen » et l'effet « lact »,

e : résiduelle du modèle.

1.3. ANALYSE TRANSCRIPTOMIQUE

Une biopsie mammaire a été réalisée après anesthésie locale de la mamelle, suivant la méthode de Farr *et al.* (1996). Les ARN totaux (ARNt), extraits des biopsies (*TRIzol Reagent*, *Invitrogen*, *Life Technologies*) ont été traités à la DNase sur colonnes *Cleanup* (Qiagen). Les ARNt (1 μ g) ont été retro-transcrits, puis marqués (Cy3 et Cy5) au moyen du kit *Low RNA Linear Amplification Kit PLUS, Two-Color* (*Agilent Technologies*). La quantité et la qualité des ARNt et des cibles marquées ont été contrôlées (*NanoDrop ND-100*, *Nixor Biotech et Bioanalyzer 2100*, *Agilent Technologies*). Les cibles marquées ont ensuite été hybridées, par couple de vaches (paragraphe 1.1.), en *dye-swap* sur lames commerciales *Agilent* bovines 4 x 44K (825 ng déposés) et sur lames bovines 22K produites par le centre de ressources biologiques (CRB)-GADIE (INRA, Jouy-en-Josas) à raison de 2,7 à 6 μ g déposés par cible. Les données extraites (scanner, logiciel *Feature Extraction*, *Agilent Technologies*) ont été normalisées (fonction normalisation, package « *anapuce* », logiciel R). Après vérification de leur cohérence, les deux jeux de données issus des deux types de lames ont été regroupés afin d'obtenir un nouveau jeu de données comparable à une « super lame » contenant 43061 cibles (soit 16091 gènes différents possédant un identifiant *Ingenuity*). Ce nouveau jeu a été vérifié puis analysé par analyse différentielle (*DiffAnalysis*, « *anapuce* », R) en regroupant les gènes de même variance (Delmar *et al.*, 2005) et en corrigeant les faux positifs par la méthode de Benjamini et Hochberg (1995). Les fonctions métaboliques associées à la liste de gènes différemment exprimés entre les deux génotypes au locus *DGAT1* ont été identifiées à l'aide du logiciel *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA).

2. RESULTATS

2.1. EFFET DU POLYMORPHISME AU LOCUS *DGAT1* SUR LES PERFORMANCES LAITIÈRES ET LES CARACTÉRISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DU LAIT

2.1.1. Réduction du TB et de la taille des globules gras

Le tableau 1 présente l'effet du polymorphisme au locus *DGAT1* sur les performances laitières et sur les caractéristiques des laits. Les animaux de génotype « faible » présentent un TB et une taille des globules gras significativement plus faible que les animaux de génotype « fort » (-8,6 g / kg et -0,7 μ m, respectivement). Le génotype au locus *DGAT1* n'a en revanche pas d'effet significatif sur la production de lait, le TP, les matières secrétées (MG et MP), le taux de cellules et sur la taille des micelles de caséines. De même, ce polymorphisme n'a pas d'effet significatif sur la teneur en lactose et la quantité de lactose secrétée (ML) malgré une tendance à une légère élévation avec le génotype « faible ».

Tableau 1 : effets du génotype au locus *DGAT1* sur les performances zootechniques, la taille des globules gras et des micelles de caséines (ML : quantité de lactose secrétée, MG : matière grasse, MP : matière protéique, NS : effet non significatif à 5 %, TB : taux butyreux, TGG : taille globules gras, TL : teneur en lactose, TMC : taille micelles de caséines, TP : taux protéique, * effet de l'interaction génotype x lactation)

	AA/AA (K232)	GC/GC (A232)	P-value
lait (kg / j)	16,3	18,9	NS
TB (g / kg)	50,9	42,3	P<0,01
TP (g / kg)	34,4	32,8	NS*
TL (g / kg)	47,3	49,8	NS
Cellules (millier/ml)	266,1	291,6	NS*
MG (g / j)	828,6	789,5	NS*
MP (g / j)	563,2	615,9	NS*
ML (g / j)	773,8	932,9	NS
TGG (µm)	5,0	4,3	P<0,01*
TMC (µm)	164,2	162,4	NS

2.1.2. Modification de la composition en acides gras

Le tableau 2 présente la teneur en acides gras des laits (% , g pour 100 g des acides gras totaux) pour lesquels l'effet du polymorphisme au locus *DGAT1* est significatif (seuil de significativité fixé à 10 %). La teneur en C7 :0, C14 :1, C15 :0 et C16 :1 cis9 des individus de génotype « faible » est significativement inférieure à celle des individus de génotype « fort ». En revanche, avec le génotype « faible » la teneur est plus élevée en C14 :0, en C18 mono et poly-insaturés et en C20 mono et poly-insaturés.

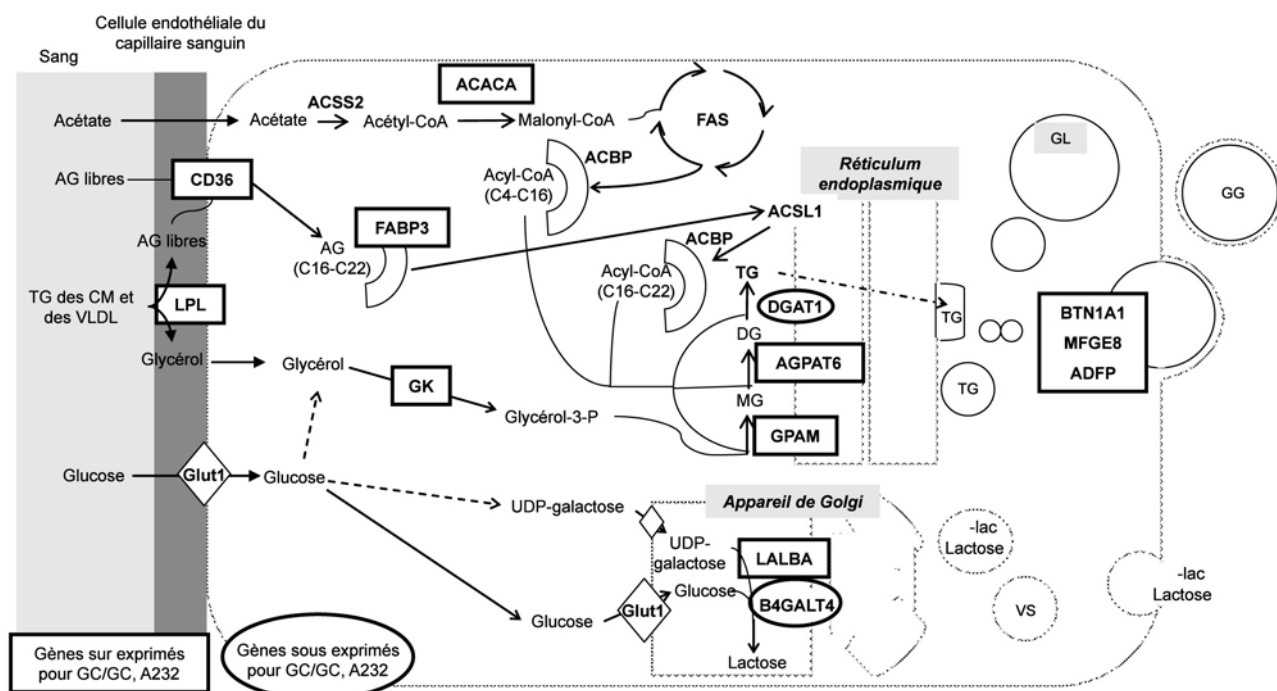
Tableau 2 : polymorphisme au locus *DGAT1* et composition en acides gras des laits

Acide gras (%)	AA/AA (K232)	GC/GC (A232)	P-value
C7:0	0,05	0,04	P<0,05
C14:0	12,91	13,87	P<0,05
C14:1	1,20	1,01	P<0,001
C15:0	1,56	1,40	P<0,1
C16:1 cis9	1,55	1,20	P<0,05
C18:1 cis11	0,47	0,56	P<0,1
C18:1 cis12	0,17	0,22	P<0,1
C18:1 cis16	0,03	0,04	P<0,1
C18:2 n-6	1,17	1,41	P<0,05
C18:3 n-3	0,28	0,34	P<0,05
C20:1 cis11	0,01	0,02	P<0,01
C20:2 n-6	0,02	0,03	P<0,1

2.1. EFFET DU POLYMORPHISME AU LOCUS *DGAT1* SUR L'ACTIVITE TRANSCRIPTIONNELLE DU TISSU MAMMAIRE

En fixant le seuil de significativité à 10 %, 1 991 cibles sur 43 061 sont déclarées différemment exprimées entre les deux génotypes au locus *DGAT1*. Ces cibles correspondent à 1 496 gènes différents ayant une annotation acceptée par IPA qui se répartissent en 698 gènes sur-exprimés et 798 gènes sous-exprimés pour le génotype « faible » en TB. Les principales voies métaboliques affectées par le polymorphisme au locus *DGAT1* sont le « métabolisme des lipides » (124 gènes) et la « biochimie des petites molécules » (168 gènes). A partir de la synthèse de Bionaz et Looor (2008), une sélection des gènes les plus pertinents de ces deux voies a été effectuée et est présentée à la figure 1.

Figure 1 : effet du polymorphisme au locus *DGAT1* sur l'expression dans le tissu mammaire des gènes des voies de synthèse du lactose et des lipides du lait. (ACACA : acétyl-CoA carboxylase, ACBP : acyl-CoA binding protein, ACSL : l'acyl-CoA synthétase chaîne longue, ACSS : l'acyl-CoA synthétase chaîne courte, ADFP : adipophiline, AG : acides gras, AGPAT6 : acylglycerol-3-phosphate acyltransférase, BTN1A1 : butyrophilline, B4GALT4 : galactosyl transférase, CM : chylomicron, DG : diacylglycérol, DGAT : diacylglycérol acyltransférase, FABP : fatty acid binding protein, FAS : fatty acid synthétase, GG : globule gras, GK : glycérol kinase, GL : gouttelette lipidique, Glut1 : transporteur de glucose, GPAM : glycerol-3-phosphate acyltransférase, LALBA : alpha-lactalbumine, MFGE8 : milk fat globule-EGF factor 8, MG : monoacylglycérol, TG : triglycérides, VLDL : Very Low Density Lipoprotein, VS : vésicule de sécrétion, α-lac : alpha-lactalbumine).



Les gènes spécifiant les protéines de captation et de transport des acides gras longs telles que la lipoprotéine lipase (LPL), CD36, et la *fatty acid binding protein* (FABP3) sont sur-exprimés chez les individus de génotype « faible ». Il en va de même pour les gènes spécifiant l'*acétyl CoA carboxylase* (ACACA) qui intervient dans la synthèse *de novo* des acides gras, la *glycerol-3-phosphate acyltransférase* (GPAM) et l'*acylglycerol-3-phosphate acyltransférase* (AGPAT6) qui interviennent dans la synthèse du diacylglycérol. Le gène spécifiant l' α -lactalbumine (LALBA), la protéine nécessaire à la synthèse du lactose est également sur-exprimé chez les individus de génotype « faible » qui en revanche sous-expriment les gènes spécifiant DGAT1 et la *glucosyltransférase* (B4GALT4).

3. DISCUSSION

L'allèle DGAT1 « faible » (A232) est associé à une diminution des acides gras à chaînes courtes et moyennes (C4 à C12) et une augmentation des acides gras à chaînes longues et insaturés (>C18), ce qui va dans le sens des résultats publiés récemment par nos collègues néerlandais (Schennink *et al.*, 2007). Les acides gras à chaîne carbonée supérieure à 16 atomes de carbone sont essentiellement d'origine alimentaire (ou viennent du tissu adipeux lors d'un bilan énergétique négatif) alors que les acides gras à chaîne courte et moyenne sont synthétisés *de novo* dans la cellule épithéliale mammaire (Chilliard *et al.*, 2001). La sur-expression pour les animaux de génotype « faible » des gènes de la LPL, le CD36 et la FABP3 qui facilitent la captation et le transport des acides gras à chaîne longue (de C16 à C22) corrobore les résultats enregistrés en matière de composition en acides gras des laits (Bernard *et al.*, 2008). La sous-expression du gène DGAT1 pour les individus de génotype « faible » est en revanche observée pour la première fois. Elle renforcerait l'effet de la mutation K232A rendue responsable d'une perte de l'efficacité de l'enzyme qui catalyse l'étape limitante de la synthèse des triglycérides favorisant ainsi l'accumulation de *diacylglycérols*, ce qui permettrait la synthèse accrue de phospholipides membranaires (Bell *et al.*, 1981). La diminution de la taille des globules gras pour le génotype « faible » et donc l'augmentation de la surface membranaire sécrétée avec le globule gras va dans le sens d'une telle hypothèse. Par ailleurs, l'absence d'effet significatif du génotype sur la matière grasse laitière s'explique par le fait que l'augmentation de la production laitière avec les individus de génotype « faible » compenserait l'effet significatif observé sur la baisse du taux butyreux. Cette augmentation est à rapprocher de la sur-expression du gène spécifiant la protéine nécessaire à la voie de synthèse du lactose (LALBA). Cette observation est en accord avec les travaux menés chez la souris sur l'inactivation du gène DGAT1 qui montrent que la perturbation de la synthèse des triglycérides s'accompagne d'une augmentation de la dépense énergétique et du métabolisme glucidique de l'adipocyte (Chen, 2006). Ces éléments suggèrent que le glucose non utilisé pour la synthèse des triglycérides du lait pourrait servir au métabolisme glucidique qui est principalement la voie de synthèse du lactose dans le tissu mammaire. La validation des différentiels d'expression de certains gènes est en cours (PCRq) au laboratoire.

CONCLUSIONS

Notre étude a permis de confirmer que le polymorphisme affectant le locus *DGAT1* analysé ici, modifie la teneur du lait en matière grasse et de mettre en évidence qu'il perturbe le fonctionnement du tissu mammaire dans un sens qui pourrait ralentir la synthèse des triglycérides tout en favorisant celle du lactose. Il semble que la matière grasse des laits des animaux homozygotes pour l'allèle « faible » (GC, A232) contient plus d'acides gras d'origine alimentaire ou adipeuse (C18-C20). Ainsi, ces animaux pourraient répondre davantage aux variations de l'alimentation, ou bien mobiliser davantage leurs réserves corporelles. Ces hypothèses vont pouvoir être vérifiées prochainement à la faveur de l'expérimentation menée dans le cadre du programme « *Genomilk Fat* » qui combinera l'analyse des effets du génotype et du régime alimentaire.

Les travaux présentés ici font partie intégrante du programme « Genomilk Fat » co-financé par l'ANR (Genanimal) et Apis-Gene. Le projet a également reçu un support financier du ministère de l'Agriculture (CAS DAR). Les auteurs souhaitent remercier le personnel des unités expérimentales INRA du Pin-au-Haras et de Theix pour le soin apporté aux animaux et l'organisation des divers prélèvements, Didier Goidin de la société Agilent Technologies pour les conseils techniques lors de l'utilisation des lames 4x44K bovines et le personnel du CRB GADIE de l'INRA de Jouy-en-Josas pour la production et la fourniture des lames oligoarrays 22K bovines. Nos remerciements s'adressent aussi à Jean-Claude Mocquot, Pierre-Louis Gastinel et Sophie Mattalia de l'Institut de l'élevage pour l'initialisation et le suivi de la collaboration INRA-Institut de l'élevage dans le domaine de la génomique fonctionnelle, à Joëlle Leonil, Jean-Louis Peyraud, Yves Chilliard et Didier Boichard de l'INRA pour leur participation active au programme « Genomilk Fat ».

- Bell R.M., Ballas L.M., Coleman R.A., 1981. *J. Lipid Res.* 22:391-403
- Benjamini Y., Hochberg Y., 1995. *J. R. Statist. Soc. B*, 57, 289-300
- Bernard L., Leroux C., Chilliard Y., 2008. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 606, 67-108
- Bingham S., 2002. *Essentials of Human Nutrition.*, 335-54
- Bionaz M., Loor J.J., 2008. *BMC Genomics*, 9 :366
- Boichard D., Grohs C., Bourgeois F., Cerqueira *et al.*, 2003. *Genet. Sel. Evol.*, 35, 77-101
- Chen H.C., 2006. *Nutr. Metabolism*, 3, 10
- Chilliard Y., Ferlay A., Doreau M., 2001. *INRA Prod. Anim.*, 14, 323-335
- Coleman R.A., Lewin T.M., Muoio D.M., 2000. *Annu. Rev. Nutr.*, 20, 77-103
- Coppieters W., Riquet J., Arranz J.J., Berzi P. *et al.*, 1998. *Mamm Genome.*, 9, 540-544
- Delmar P., Robin S., Daudin J.J., 2005. *Bioinformatics*, 21, 502-508
- Farr V.C., Stelwagen K., Cate L.R., Molenaar A.J., McFadden T.B., Davis S.R., 1996. *J.Dairy Sci.*, 79, 543-549
- Grisart B., Coppieters W., Farnir F., Karim L. *et al.*, 2002. *Genome Res.*, 12, 222-231
- Grisart B., Farnir F., Karim L., Cambisano N., Kim *et al.*, 2004. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 101, 2398-2403
- Larroque H., Gallard Y., Boichard D., Colleau J.J., 2003. *Renc. Rech. Ruminants*, 10, 61
- Schennink A., Stoop W.M., Visker M.H.P.W., Heck *et al.*, 2007. *Anim. Genet.*, 38, 467-473
- Smith S.J., Cases S., Jensen D.R., Chen H.C. *et al.*, 2000. *Nat. Genet.*, 25, 87-90