

Université de Montréal

**L'ADIPONECTINE STIMULE UN PATRON GÉNÉTIQUE
OVULATOIRE *IN VITRO* CHEZ LA TRUIE**

par

SANDRA LEDOUX

Département de biomédecine vétérinaire
Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade
Maître ès sciences (M.Sc.)
en sciences vétérinaires
option reproduction

Décembre, 2004

©Sandra Ledoux, 2004



SF
607
U54
2005
V.010

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé

**L'ADIPONECTINE STIMULE UN PATRON GÉNÉTIQUE
OVULATOIRE *IN VITRO* CHEZ LA TRUIE**

présenté par

SANDRA LEDOUX

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes

.....
Jean Sirois, PhD, président-rapporteur

.....
Bruce D. Murphy, PhD, directeur de recherche

.....
Marie-France Palin, PhD, membre du jury

RÉSUMÉ

L'adiponectine est l'adipokine la plus abondamment sécrétée par le tissu adipeux. Plusieurs études ont montré les rôles de facteurs adipeux en reproduction. Nous avons vérifié l'hypothèse que l'adiponectine exerce des effets au niveau reproducteur. Nous avons cloné le gène de l'adiponectine porcine pour en produire une protéine recombinante, afin d'étudier ses effets sur les cellules de la granulosa en culture. L'adiponectine obtenue correspondait à un monomère et un trimère, confirmés par immunobuvardage. Deux gènes clés de la stéroïdogénèse, la P450 aromatasase et la protéine de régulation aigüe de la stéroïdogénèse (StAR), répondaient à 25 µg/mL d'adiponectine. L'expression de l'ARNm de l'aromatase, mesurée par RT-PCR, était réduite à 40% celle des contrôles. Celle de StAR était stimulée à plus de 3 fois celle des contrôles. Un effet marqué de l'adiponectine s'observait aussi sur la cyclooxygénase 2 (COX-2), où l'on pouvait mesurer 14 fois plus d'ARNm que dans les contrôles. De plus, l'adiponectine stimulait l'expression des ARNm de la synthétase de PGE (mPGES-1) à plus de 8 fois et du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) à près de 4 fois celles des contrôles. Enfin, des accumulations accrues de prostaglandines (4 fois plus de PGF2α et 14 fois plus de PGE2) et de VEGF (près de 3 fois plus) se mesuraient dans les milieux de culture de cellules traitées à l'adiponectine, comparativement aux contrôles. Le maximum des effets s'observait à 12 heures de culture dans tous les cas, mais l'effet stimuloire sur COX-2 se manifestait dès 2 heures d'incubation avec l'adiponectine. Ces résultats montrent pour la première fois un effet de l'adiponectine en reproduction. Les effets observés correspondent à une série d'événements ovulatoires des cellules porcines de la granulosa *in vitro* en ce qui concerne les gènes de régulation de la stéroïdogénèse, de la synthèse de prostaglandines et de la néovascularisation.

mots clés: adiponectine, tissu adipeux, adipokine, porc, fertilité, ovulation, granulosa, stéroïdogénèse, prostaglandine, vascularisation

SUMMARY

Adiponectin is adipose tissue's most abundantly secreted adipokine. Many studies have shown the roles of adipose factors on reproduction. We hypothesised that adiponectin exerts some effects at the reproductive level.

We cloned the porcine adiponectin gene to produce a recombinant protein, in order to study its effects on granulosa cell cultures. The resulting adiponectin corresponded to a monomer and a trimer, confirmed by Western blotting. Two key steroidogenic genes, P450 aromatase and steroidogenic acute regulatory protein (StAR), responded to 25 µg/mL of adiponectin. The mRNA expression of aromatase, measured by RT-PCR, was reduced to 40% that of controls. For StAR, expression was stimulated to more than 3 times that of controls. A marked effect of adiponectin was also observed on cyclooxygenase-2 (COX-2), where 14 times more mRNA was measured compared to controls. Adiponectin also stimulated expression of mRNA for PGE synthase (mPGES-1) to more than 8 times and of vascular endothelial growth factor (VEGF) to almost 4 times that of controls. Finally, increased accumulations of prostaglandins (4 times more PGF₂α and 14 times more PGE₂) and VEGF (almost 3 times more) were measured in culture media of cells treated with adiponectin, compared to controls. Each effect was maximal after 12 hours of culture in all cases, but the COX-2 stimulation by adiponectin was manifested as early as 2 hours.

These results show for the first time an effect of adiponectin in reproduction. Effects observed here correspond to a series of ovulatory events seen *in vitro* in granulosa cells for genes of steroidogenic regulation, prostaglandin synthesis and neovascularisation.

key words: adiponectin, adipose tissue, adipokine, pig, fertility, ovulation, granulosa, steroidogenesis, prostaglandin, vascularization

TABLE DES MATIÈRES

PAGE DE TITRE	i
PAGE D'IDENTIFICATION DU JURY	ii
RÉSUMÉ	iii
SUMMARY	iv
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES TABLEAUX	vii
LISTE DES FIGURES	viii
SIGLES ET ABRÉVIATIONS	ix
DÉDICACE	xii
REMERCIEMENTS	xiii
INTRODUCTION	1
RECENSION DE LA LITTÉRATURE	3
Le tissu adipeux	3
Adipokines	4
Tumor necrosis factor alpha (TNF α)	4
Transforming growth factor-beta (TGF- β)	5
Leptine	5
Adiponectine	6
Axe adipo-reproducteur	8
Anorexia nervosa (AN)	9
Polycystic ovary syndrome (PCOS)	9
Ovulation chez la truie	10
GnRH et gonadotropines	11
Aromatase	12
Steroidogenic acute regulatory protein (StAR)	13
Cyclooxygenase 2 (COX-2)	14
Prostaglandines	15
Vascular endothelial growth factor (VEGF)	16

PROBLÉMATIQUE	18
MÉTHODOLOGIE	19
Extraction d'ARN total à partir de tissu adipeux	19
Synthèse d'ADN complémentaires (ADNc) par polymérisation en transcription réverse (RT-PCR)	19
Clonage d'adiponectine porcine	20
Clonage partiel des récepteurs porcins de l'adiponectine	21
Production d'adiponectine porcine recombinante	21
Production d'un extrait bactérien (6xHIS sans adiponectine).....	22
Culture de cellules porcines de la granulosa	23
Traitements à l'adiponectine des cellules de granulosa en culture	23
Extraction d'ARN total à partir de cellules en culture	24
Extraction de protéines totales à partir de cellules en culture	24
Immunobuvardage (Western blot)	25
PCR semi-quantitatif	26
Essai Radio-Immunologique (RIA) pour PGF2 α	27
Quantifications EIA de PGE2 et VEGF	28
Analyses statistiques	28
RÉSULTATS	29
Clonage d'adiponectine porcine et des récepteurs AdipoR1 et AdipoR2 porcins	29
Production d'adiponectine porcine recombinante	30
Effets de l'adiponectine sur l'expression de gènes de la stéroïdogénèse	30
Effets de l'adiponectine sur l'expression de COX-2	31
Effets de l'adiponectine sur la sécrétion de prostaglandines	32
Effets de l'adiponectine sur l'ARNm de la mPGES-1	33
Effets de l'adiponectine sur l'expression de VEGF	33
DISCUSSION	59
CONCLUSION	66
PERSPECTIVES	67
BIBLIOGRAPHIE	69

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I.	Amorces PCR utilisées pour le clonage des homologues porcins de l'adiponectine (Acrp30) et de ses récepteurs (AdipoR1 et AdipoR2), et pour la production d'adiponectine porcine recombinante (pACRPr).....	35
Tableau II.	Amorces PCR utilisées pour les amplifications des gènes aromatasase (arom), StAR, COX-2, mPGES-1, VEGF et cyclophilline (cyclo).....	39
Tableau III.	Pourcentages d'homologies entre les séquences porcine, humaines et murines d'adiponectine, adipoR1 et adipoR2.....	41

LISTE DES FIGURES

Figure 1.	Schéma du positionnement des amorces PCR, illustrant la stratégie de clonage de l'adiponectine porcine (Acrp30).....	37
Figure 2.	Immunobuvardage d'adiponectine recombinante porcine.....	43
Figure 3.	L'adiponectine n'affecte pas l'expression de ses récepteurs, AdipoR1 et AdipoR2, dans les cellules porcines de la granulosa <i>in vitro</i>	45
Figure 4.	L'adiponectine réprime l'expression de l'ARNm de l'aromatase dans les cellules porcines de la granulosa <i>in vitro</i>	47
Figure 5.	L'adiponectine stimule l'expression de l'ARNm de StAR dans les cellules porcines de la granulosa <i>in vitro</i>	49
Figure 6.	L'adiponectine stimule l'expression de l'ARNm et de la protéine de COX-2 dans les cellules porcines de la granulosa <i>in vitro</i>	51
Figure 7.	L'adiponectine stimule la sécrétion de PGF2 α et PGE2 par les cellules porcines de la granulosa <i>in vitro</i>	53
Figure 8.	L'adiponectine stimule l'expression de l'ARNm de mPGES-1 dans les cellules porcines de la granulosa <i>in vitro</i>	55
Figure 9.	L'adiponectine stimule l'expression de l'ARNm et la sécrétion de VEGF par les cellules porcines de la granulosa <i>in vitro</i>	57

SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ACRP30	Protéine d'adipocyte de 30 kDa reliée au complément
AdipoQ	Adiponectine
AdipoR1	Récepteur 1 de l'adiponectine
AdipoR2	Récepteur 2 de l'adiponectine
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AHR	Récepteur aryl hydrocarbure
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
AN	<i>Anorexia nervosa</i> (anorexie)
APM1	Transcrit adipeux le plus abondant 1
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ASP	Protéine stimulatrice de l'acylation
<i>BamHI</i>	Enzyme de restriction
β -Me	β mercaptoéthanol
BMP	Protéine de morphogénèse osseuse
COX	Cyclooxygénase
cPGES	Synthétase cytosolique de prostaglandine E2
DTT	Dithiothreitol
DNase	Désoxyribonucléase
EIA	Essai immunologique enzymatique
E2	Estradiol
EP2	Récepteur de prostaglandine E2
FSH	Hormone de stimulation folliculaire
GBP28	Protéine de 28 kDa liant la gélatine
GDF	Facteur de croissance/ différenciation
GITC	Guanidine isothiocyanate
GnRH	Hormone de sécrétion des gonadotropines ou gonadolibérine

HCl	Acide chlorhydrique
<i>HindIII</i>	Enzyme de restriction
HRP	Peroxydase de raifort
Ig	Immunoglobuline
IPTG	Isopropylthio- β -D-galactoside
kDa	Kilodalton
LH	Hormone de lutéinisation
MEM	Milieu essentiel minimal
mPGES	Synthétase microsomale de prostaglandine E2
NaCl	Chlorure de sodium
NF- κ B	Facteur de transcription
NSAID	Médicament anti-inflammatoire non stéroïdien
PAI-1	Inhibiteur 1 de l'activateur du plasminogène
PCOS	Syndrome de l'ovaire poly-kystique
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
PGAR	Protéine reliée à l'angiopoïétine ciblée par le PPAR-gamma
PGES	Synthétase de prostaglandine E2
pGEM [®] -T	Vecteur de clonage
pQE-30	Vecteur d'expression
PGE2	Prostaglandine E2
PGF2 α	Prostaglandine F2 α
PGHS	Synthétase de prostaglandine H2
PGH2	Prostaglandine H2
PVN	Noyau paraventriculaire
P4	Progestérone
RACE	Amplification rapide des extrémités d'ADNc
RIA	Essai radio-immunologique
RNase	Ribonucléase
RT	Transcription réverse
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	Électrophorèse en gel de polyacrylamide au SDS

StAR	Protéine de régulation rapide de la stéroïdogénèse
TGF- β	Facteur β de transformation de croissance
TNF	Facteur de nécrose tumorale
TNFR	Récepteur du facteur de nécrose tumorale
Tris	Tris(hydroxyméthyl)aminométhane
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
6xHIS	Oligopeptide de 6 histidines

DÉDICACE

À Simon

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier en tout premier lieu mon directeur de recherche, le docteur Bruce D. Murphy, sans qui cet ouvrage ne serait pas. Mon passage dans son laboratoire m'a permis de combler des attentes au-delà de mes anticipations et j'ai su y développer une autonomie hors-pair. Je suis très reconnaissante pour sa patience à mon égard.

Beaucoup de mercis sont mérités par mes collègues étudiants du laboratoire Murphy, parce qu'ils m'ont aidée, ou du moins endurée toutes ces années. Je me rappellerai chaleureusement de Nicolas Gévry (maintenant docteur Gévry), de Joëlle Desmarais, de Leonor Miranda et Adrian Quero. Des mercis tout particuliers vont à Tatiana Ruiz-Cortés (Tati, Statiana) et à Flávia Lombardi Lopes (Fra), deux merveilleuses personnes que j'ai la chance d'appeler mes amies et que je n'oublierai jamais.

Un remerciement spécial est réservé pour Mira Dobias, pour sa complicité et sa grande générosité. Nos longues conversations ont permis de rendre les journées de cultures cellulaires très agréables.

Un grand merci au personnel du CRRA, plus particulièrement à Micheline Sicotte, l'indispensable technicienne en coordination de travail de bureau. Elle est la personne la plus efficace et calme que j'ai eu la chance de rencontrer. Je ne sais plus compter toutes les fois où elle m'aura tirée d'une apparente catastrophe (pas seulement moi d'ailleurs).

Je ne peux certainement pas oublier un million de mercis sincères à mes amis de St-Hyacinthe et au-delà. Sans Tania Fayad, Véronique Paradis, Isabelle Daneau, cette épreuve n'aurait pas pu se réaliser si agréablement.

Merci à la Faculté de médecine vétérinaire et à Micheline St-Germain, responsable des étudiants aux cycles supérieurs.

Je remercie infiniment les membres de ma famille, qui sont à la source de tous mes accomplissements et qui ont toujours su encourager mes choix avec un support infallible.

Finalement, merci au CRSNG pour le financement de mon projet de recherche et, surtout, de mon salaire.

INTRODUCTION

Au cours des dernières années, des recherches intensives sur les métabolismes du glucose et des lipides et la dynamique du tissu adipeux ont permis d'élargir nos connaissances au sujet des interactions complexes entre la prise alimentaire et le stockage énergétique. Le tissu adipeux est maintenant reconnu comme un organe endocrine qui produit une variété de facteurs impliqués dans la fonction reproductrice, l'homéostasie énergétique et la régulation du poids corporel. Il s'est avéré un élément clé de la régulation nutritionnelle, au-delà de son rôle principal de stockage des triglycérides en périodes d'affluence métabolique et de leur mobilisation en moments de rareté de nutriments. La dynamique des sécrétions adipeuses est amenée en partie par l'état nutritionnel et le niveau d'adiposité, et plusieurs voies métaboliques sont directement et indirectement affectées par l'action de plusieurs facteurs adipeux.

Les protéines sécrétées par le tissu adipeux incluent, entre autres, la leptine (Zhang, Proenca et al. 1994), le facteur de nécrose tumorale (TNF- α) (Carswell, Old et al. 1975), la résistine (Holcomb, Kabakoff et al. 2000), la protéine reliée à l'angiopoïétine ciblée par le PPAR-gamma (PGAR) (Yoon, Chickering et al. 2000), et l'adiponectine (Scherer, Williams et al. 1995; Hu, Liang et al. 1996; Nakano, Tobe et al. 1996). Cette dernière est une hormone spécifiquement synthétisée par les adipocytes différenciés où son expression est rapidement augmentée pendant leur différenciation à partir de préadipocytes (Scherer, Williams et al. 1995). Les concentrations sériques de cette adipokine représentent 0,01% des protéines totales (Arita, Kihara et al. 1999) et sont significativement réduites chez les individus obèses comparativement aux individus non-obèses (Hu, Liang et al. 1996; Arita, Kihara et al. 1999). L'adiponectine est impliquée dans la sensibilisation à l'insuline au niveau du foie (Berg, Combs et al. 2001) et du muscle (Yamauchi, Kamon et al. 2001; Yamauchi, Kamon et al. 2002) et les niveaux d'ARNm de l'adiponectine sont inhibés par l'insuline en fonction du temps et de la dose (Fasshauer, Klein et al. 2002). Les concentrations plasmatiques d'adiponectine sont réduites chez les patients atteints de

maladies de l'artère coronaire (Ouchi, Kihara et al. 1999) et on la reconnaît pour ses effets anti-athérogéniques (Ouchi, Kihara et al. 2000). L'adiponectine et le TNF α , qui est impliqué dans la résistance à l'insuline en état d'obésité (Hotamisligil, Shargill et al. 1993), inhibent réciproquement leur expression et leurs actions dans le muscle et le foie (Kappes and Loffler 2000; Fasshauer, Klein et al. 2002) ainsi que leur effet au niveau des cellules endothéliales (Ouchi, Kihara et al. 1999; Ouchi, Kihara et al. 2000). Deux récepteurs de l'adiponectine ont été identifiés et sont exprimés dans le cerveau, le coeur, le rein, le foie, le muscle squelettique, le colon, le thymus, le poumon, le placenta et les leucocytes sanguins chez l'humain ainsi que dans le cerveau, le coeur, le rein, le foie, le poumon, le muscle squelettique et la rate chez la souris (Yamauchi, Kamon et al. 2003) ainsi que dans l'utérus et l'ovaire chez le porc (Lord, Ledoux et al. 2005). Cependant l'étendue complète des actions de l'adiponectine est encore inconnue.

Jusqu'à maintenant, la plupart des études sur l'adiponectine ont été faites à partir de modèles humain et murin. Toutefois, nous trouvons intéressant d'investiguer les rôles potentiels de l'adiponectine chez le porc. Cet intérêt était suscité par l'approche industrielle des croisements porcins qui favorise la sélection d'individus de plus en plus maigres. Or, une corrélation a été établie entre une réduction trop importante de la masse adipeuse, par la sélection génétique ou par la nutrition, et une prolificité amoindrie chez la truie (Aherne and Kirkwood 1985; Einarsson and Rojkittikhun 1993; Clowes, Aherne et al. 2003; Eissen, Apeldoorn et al. 2003; Willis, Zak et al. 2003). Nous voulions donc étudier les rôles probables de l'adiponectine sur les fonctions reproductrices chez le porc.

À notre connaissance, aucun rôle de l'adiponectine en reproduction n'a encore été décrit mais les indices apportés par les modèles murins suggèrent un rôle permissif de cette adipokine sur la fertilité. Ainsi, les souris dont le gène de l'adiponectine est inactivé ne rencontrent pas de problème de fertilité (Maeda, Shimomura et al. 2002) mais les femelles surexprimant l'adiponectine sont infertiles (Combs, Pajvani et al. 2004). Nous avons donc étudié l'hypothèse que l'adiponectine joue un rôle important sur la fonction ovarienne chez la truie.

RECENSION DE LA LITTÉRATURE

LE TISSU ADIPEUX BLANC

Mis à part le stockage de gras (excès énergétique) et sa mobilisation (carence énergétique), le tissu adipeux possède plusieurs fonctions complexes et dynamiques. Il agit en tant qu'organe endocrine sécrétant une multitude de facteurs vers la circulation, nommés adipokines. La plupart de ces facteurs jouent d'importants rôles dans l'homéostasie énergétique, la sensibilité à l'insuline, la fonction immunitaire, l'inflammation et même la progression tumorale (Rajala and Scherer 2003).

L'obésité est un désordre résultant d'un excédent de tissu adipeux. Elle est fortement associée à plusieurs maladies chroniques: l'hyperlipidémie, la haute pression, l'intolérance aux sucres et le diabète, les maladies cardiaques athérosclérotiques, la goutte, le cancer, l'arthrite dégénératif, et l'infertilité (Hausman, DiGirolamo et al. 2001). La croissance du tissu adipeux implique l'hyperplasie et l'hypertrophie cellulaires. L'hypertrophie est causée par l'accumulation excessive de triglycérides dans l'adipocyte et l'hyperplasie résulte du recrutement de nouveaux adipocytes à partir de précurseurs cellulaires (préadipocytes) dans le tissu adipeux. Étant donné la capacité phénoménale du tissu adipeux à accroître sa masse, l'apport sanguin et la vascularisation de ce tissu sont essentiels (Rupnick, Panigrahy et al. 2002). Pour toutes ces raisons, il a été proposé que l'obésité serait comparable à une tumeur endocrine (Dizdar and Alyamac 2004).

À l'opposé, une réduction exagérée de la masse tissulaire adipeuse (cachexie) est également associée à une multitude de désordres. Des progrès récents en recherche ont montré de fortes interrelations entre les désordres nutritionnels et les systèmes endocrine, nerveux et immunitaire. Une dérégulation du réseau des cytokines pourrait être responsable de plusieurs complications médicales (Corcos, Guilbaud et al. 2003).

Chez le porc, la tendance est à la sélection de porcs plus maigres pour répondre à la demande d'une viande de consommation réduite en gras. Mais la réduction exagérée de la masse adipeuse a des conséquences sur d'autres facteurs économiques importants pour la production porcine, comme le retard dans l'âge de l'atteinte de la puberté et la prolificité amoindrie des truies (portées réduites, délai de retour en chaleurs plus longs, gestations moins nombreuses) (Klindt, Yen et al. 2001; Gaughan, Cameron et al. 1997).

ADIPOKINES

Le "sécrétome" des adipocytes est constitué d'acides gras, de prostaglandines et de facteurs protéiques nommés adipokines. La diversité des adipokines et de leurs rôles est considérable (Canello, Tounian et al. 2004; Trayhurn and Wood 2004), participant vraisemblablement à un dialogue complexe entre organes. On y retrouve des cytokines classiques (TNF α , interleukines), des facteurs de croissance (TGF- β) et des protéines du système complément (adipsine, ASP). Ce groupe comprend également des protéines impliquées dans l'homéostasie vasculaire (PAI-1), la régulation de la pression sanguine (angiotensinogène), le métabolisme des lipides (retinol-binding protein, cholesteryl ester transfer protein), l'homéostasie énergétique (adiponectine, leptine, peut-être résistine), et l'angiogénèse (VEGF). Plusieurs adipokines ont des effets bien connus en reproduction chez les mammifères, par exemples le TNF α , le TGF- β et la leptine.

Tumor necrosis factor alpha (TNF α). Le TNF α est membre de la superfamille de gènes TNF/TNFR. C'est une protéine aux multiples fonctions biologiques, dont la réponse inflammatoire, la différenciation cellulaire, le renouvellement et le réarrangement tissulaires (Locksley, Killeen et al. 2001). Le TNF α est produit principalement par les macrophages (y compris ceux du tissu adipeux), mais aussi par les lymphocytes et les cellules de la granulosa, et les niveaux de TNF α sont élevés en obésité chez l'humain (Hotamisligil, Arner et al. 1995). Entre autres, le TNF α possède plusieurs rôles au niveau de l'ovaire, comme l'inhibition de la production

d'estradiol par les cellules granulosa et d'androstènedione par les cellules de la thèque (Spicer 1998) et la stimulation de production de prostaglandines dans les cellules du jeune *corpus luteum* (Schams 1995) chez la vache, et la lutéolyse chez la truie (Pitzel, Jarry et al. 1993). Également chez la truie, on rapporte que le TNF α exerce une influence inhibitoire sur la lutéinisation et joue sur la balance entre la prolifération et l'atrésie folliculaire (Prange-Kiel, Kreutzkamm et al. 2001). Entre autres, une cible d'action du TNF α dans les cellules porcines de granulosa est le blocage de la stimulation hormonale de l'expression de l'ARNm de l'aromatase (Veldhuis, Garmey et al. 1991).

Transforming growth factor-beta (TGF- β). Le TGF- β est aussi membre d'une superfamille de gènes, celle des TGF- β , qui comprend aussi les activines, les inhibines, les growth/differentiation factors (GDF) et les bone morphogenetic proteins (BMP). Plusieurs types cellulaires produisent les TGF- β , et les concentrations de TGF- β sont élevées en obésité. Les TGF- β sont des facteurs de croissance et de différenciation, jouant d'importants rôles de régulation de fonctions ovariennes comme le développement et la maturation folliculaires, et du développement et des fonctions du placenta chez la femme (Peng 2003). Dans les follicules porcins, les cellules de la thèque sont la source de production du TGF- β 1 (May, Stephenson et al. 1996). Entre autres, les effets du TGF- β 1 dans les cellules porcines de granulosa *in vitro* est d'inhiber la relâche de progestérone et d'accroître la synthèse d'ADN (Kubota, Kamada et al. 1994).

Leptine. Une des adipokines les plus étudiées pour ses rôles en reproduction est la leptine. Elle est principalement synthétisée dans le tissu adipeux, mais l'estomac, le placenta, les glandes mammaires et les follicules ovariens en synthétisent également (Siervogel, Demerath et al. 2003). On l'a d'abord identifié comme étant le facteur aberrant chez les souris obèses ob/ob (Zhang, Proenca et al. 1994). L'injection de leptine à ces souris a amené une amélioration de la fertilité tout en diminuant l'apport alimentaire et une perte de poids a été observée (Barash, Cheung et al. 1996). L'axe hypothalamo-hypophysaire semble être le site d'action de plusieurs effets de la leptine, puisque l'on y retrouve la présence de ses récepteurs chez le porc (Lin, Barb

et al. 2000). Elle y exerce des rôles centraux pour la coordination du métabolisme, les comportements de prise alimentaire, la balance énergétique et la reproduction (Ur, Wilkinson et al. 2002). De plus, la leptine stimule la sécrétion de LH et de GnRH dans des cultures de cellules hypophysaires et de tissu hypothalamique porcins, respectivement (Barb 1999). La leptine semble être impliquée dans l'activation de l'axe reproducteur et l'âge de la puberté (Shalitin and Phillip 2003). La leptine exerce plusieurs rôles périphériques, ses récepteurs ayant été identifiés dans la plupart des tissus (Tartaglia, Dembski et al. 1995). Entre autres, la leptine agit au niveau de l'ovaire chez le rat, où elle réduit directement le taux d'ovulation *in vivo* (Duggal, Van Der Hoek et al. 2000). Plusieurs études ont également montré que la leptine a un effet négatif sur la relâche de stéroïdes ovariens chez les mammifères (Caprio, Fabbrini et al. 2001). Chez la truie, la leptine aurait cependant un effet biphasique puisqu'à de faibles doses, elle présente un effet stimulateur sur l'expression de la protéine StAR et l'accumulation de progestérone *in vitro* (Ruiz-Cortes, Martel-Kennes et al. 2003).

ADIPONECTINE

L'adiponectine (adipocyte complement-related protein of 30 kDa, ACRP30; adipoQ) a été identifiée pour la première fois en étudiant les patrons d'expression génétiques d'adipocytes murins en différenciation (Scherer, Williams et al. 1995; Hu, Liang et al. 1996). L'homologue humain a été identifié en parallèle (adipose most abundant gene transcript 1, APM1) comme étant le transcrit le plus souvent rencontré dans une banque d'ADNc de tissu adipeux de femme (Maeda, Okubo et al. 1996). Finalement, Nakano et collaborateurs ont purifié l'adiponectine directement à partir de plasma humain (gelatin-binding protein of 28 kDa, GBP28), dans leur quête de protéines sériques ayant une affinité pour les résines de gélatine-cellulose, comme les protéines liant le collagène (Nakano, Tobe et al. 1996).

L'adiponectine est produite exclusivement par les adipocytes et, différemment des autres facteurs adipeux, elle est sécrétée de façon inversement proportionnelle à la

masse adipeuse (Arita, Kihara et al. 1999). C'est une adipokine de 30 kDa, circulant sous formes de complexes multimériques à des concentrations relativement élevées en conditions physiologiques normales d'adiposité (5-30 $\mu\text{g/mL}$ chez l'humain) (Arita, Kihara et al. 1999). On observe un dimorphisme sexuel des concentrations d'adiponectine, où les femelles produisent plus d'adiponectine que les mâles chez la souris (Combs, Berg et al. 2003). Il a été proposé que les androgènes seraient des inhibiteurs de la sécrétion d'adiponectine chez la souris (Nishizawa, Shimomura et al. 2002).

Deux récepteurs pour l'adiponectine ont été identifiés chez l'humain et chez la souris (Yamauchi, Kamon et al. 2003). Chez le porc, la présence des deux récepteurs a été observée dans tous les tissus étudiés, y compris l'utérus et l'ovaire (Lord, Ledoux et al. 2005). L'expression relative d'une forme de récepteur par rapport à l'autre dans différents tissus pourrait être à l'origine d'un mécanisme de régulation physiologique de l'action de l'adiponectine sur chacune de ses cibles.

Plusieurs études ont montré différentes réponses tissulaires aux formes longues et/ou globulaires de l'adiponectine (Fruebis, Tsao et al. 2001; Wu, Motoshima et al. 2003). De plus, la présence relative de trimères, d'hexamères et de complexes de haut poids moléculaires d'adiponectine en circulation et l'affinité des récepteurs pour chaque forme de l'adiponectine sont à l'étude (Tsao, Murrey et al. 2002; Pajvani, Du et al. 2003; Tsao, Tomas et al. 2003; Hug, Wang et al. 2004).

Depuis la découverte de l'adiponectine, plusieurs rôles lui ont déjà été attribués. Elle est surtout connue pour son rôle de sensibilisation des tissus à l'insuline (Heilbronn, Smith et al. 2003), mais on la connaît maintenant comme facteur important dans la fonction vasculaire (Goldstein and Scalia 2004), et elle pourrait avoir des propriétés anti-athérogéniques et anti-inflammatoires (Chandran, Phillips et al. 2003). L'hypoadiponectinémie est associée à l'obésité, au syndrome métabolique, au diabète de type 2 et aux maladies cardiovasculaires chez l'humain.

Dans une étude sur des souris dont le gène codant pour l'adiponectine a été inactivé, les animaux ne présentaient pas d'évidence d'infertilité (Maeda, Shimomura et al. 2002). Cependant, des souris amenées à surexprimer l'adiponectine présentaient des niveaux élevés de prolactine sérique et les femelles étaient infertiles (Combs, Pajvani et al. 2004). Ainsi, l'adiponectine ne semble pas être essentielle à la fertilité. Toutefois elle pourrait y exercer une influence permissive à l'intérieur de concentrations sériques physiologiques (Panidis, Kourtis et al. 2004). Jusqu'à présent, aucune publication n'est disponible concernant l'étude de rôles que l'adiponectine pourrait jouer sur les ovaires ou l'utérus.

AXE ADIPO-REPRODUCTEUR

L'alimentation et la fonction reproductrice sont étroitement reliées. On observe depuis longtemps l'influence majeure du régime alimentaire, du poids et de la condition corporelle sur la fécondité et la fertilité (Kaku, Mori et al. 1969; Baker 1981; Bringer, Hedon et al. 1990). Il n'y a pas de seuil défini entre l'infertilité et la reproduction normale. Certains individus réussiront toujours à se reproduire malgré une condition corporelle loin de l'idéal.

Il est aujourd'hui reconnu qu'une régulation appropriée de la reproduction, de l'apport et de la dépense énergétiques, donc le maintien de la condition corporelle et de la fertilité, sont dépendant de réseaux hypothalamiques complexes. La restriction alimentaire et le poids sous-optimal, mais également l'obésité ont des effets négatifs sur la régulation des patrons de sécrétions de l'hormone de sécrétion des gonadotropines (GnRH) et sur la fonction des gonades. Des études chez la rate, le mouton, la truie, la vache, le singe et la femme ont montré que chez des individus privés ou restreints de nourriture, la sécrétion pulsatile de LH, le développement folliculaire et l'ovulation peuvent être récupérés à l'aide de traitements pulsatiles à la GnRH (Schneider 2004).

L'exemple le plus frappant de répression des fonctions reproductrices en état de cachexie est l'anorexie (*anorexia nervosa*), menant à l'aménorrhée et l'anovulation chez la femme. Depuis longtemps, des études chez les femmes athlétiques et non athlétiques ainsi que chez les mammifères supportent l'hypothèse qu'un ratio minimal de masse maigre à masse grasse est nécessaire pour l'apparition de la puberté et le maintien de la capacité reproductrice (Frisch 1987).

Plusieurs problèmes reproducteurs sont également associés à l'obésité (Bray 1997; Bongain, Isnard et al. 1998). Parmi ces désordres, le syndrome de l'ovaire polykystique (PCOS) représente le problème d'infertilité le plus fréquemment rencontré (Hoyt and Schmidt 2004). Entre autres, la capacité du tissu adipeux d'aromatiser les androgènes a été proposée comme étant une des causes des problèmes observés (Karaer, Oruc et al. 2004).

Anorexia nervosa (AN): L'anorexie est un désordre apporté par une restriction nutritionnelle anormale, initialement caractérisée dans les années 1870 par une perte de poids sévère, une aménorrhée, des dérèglements psychologiques et une activité accrue (American Psychiatric Association 1994). Plusieurs complications accompagnent la perte de poids et elles affectent tous les organes et systèmes. Les symptômes sont graves et incluent le déséquilibre des fluides et électrolytes, des problèmes cardiovasculaires, gastro-intestinaux, dermatologiques, endocrines et neurologiques. Entre autres, une aménorrhée reflète une dysfonction hypothalamique et est caractérisée par de faibles niveaux circulants de FSH et LH, ainsi que des concentrations réduites d'estrogène et de progestérone (van Binsbergen, Coelingh Bennink et al. 1990).

Polycystic ovary syndrome (PCOS): Le syndrome de l'ovaire polykystique (Balen 2004) est un désordre endocrine dont l'expression est influencée par la nutrition. Il est caractérisé par une dérégulation des cycles menstruels, un hyperandrogénisme et fréquemment par l'obésité. Une dysfonction ovarienne prévaut et est affectée par des dérégulations de l'axe hypothalamo-hypophyso-ovarien et une hyperinsulinémie. Le volume des ovaires est augmenté et l'on y retrouve de nombreux follicules 2 à 9 mm

(Balen, Laven et al. 2003). Le PCOS constitue la cause d'infertilité la plus fréquente, affectant jusqu'à 10% de toutes les femmes d'âge reproducteur (Hart, Hickey et al. 2004).

Chez la truie, les carences nutritionnelles peuvent avoir une influence sur la croissance du follicule antral, diminuer le taux ovulatoire, retarder la puberté et le retour en chaleurs après le sevrage (Prunier et Quesnel 2000). En effet, les truies plus grasses atteignent la puberté de façon plus précoce et produisent plus de portées que les plus maigres (Gaughan, Cameron et al. 1997). L'inhibition de la relâche des gonadotropines par une carence alimentaire est probablement impliquée dans ces phénomènes (Parvizi 2000). Ceci est illustré par le fait que la leptine peut stimuler la relâche de GnRH de tissu hypothalamique porcin *in vitro* (Barb, Kraeling et al. 2002). Les limitations nutritionnelles, même modestes, pourraient compromettre le développement reproducteur de la truie (Klindt, Yen et al. 2001).

OVULATION CHEZ LA TRUIE

Le porc est une espèce poly-ovulatoire. La durée du cycle oestral de la truie varie peu (19-23 jours), quoique la phase folliculaire est longue (5 à 7 jours) comparativement à d'autres espèces comme chez la vache et la brebis (2 à 3 jours). Il y a une hétérogénéité des follicules dans la population ovulatoire, avec au moins 2-3 mm de différence entre les diamètres des follicules (Hunter, Robinson et al. 2004).

Chez la truie, la croissance et la maturation folliculaires, c'est-à-dire la multiplication de la *membrana granulosa* et les changements de propriétés biochimiques des cellules, sont sous contrôles endocrine et paracrine (Hunter, Hudson et al. 2004). Il y a chez cette espèce un plus grand nombre de follicules recrutés et la phase de croissance folliculaire est plus longue que chez d'autres espèces domestiques, ce qui pourrait expliquer les taux ovulatoires plus importants (Knox, Vatzias et al. 2003). Les taux ovulatoires peuvent être manipulés par des modifications de la diète pendant des moments critiques de la croissance folliculaire (Yang, Foxcroft et al. 2000). Il ne

semble pas que l'épaisseur de gras dorsal influence le taux d'ovulation entre races de truies de composition corporelle différentes, mais les truies de race Meishan, très grasses, tendent à présenter des taux ovulatoires plus élevés (Gaughan, Cameron et al. 1997).

La croissance folliculaire dans les phases avancées est sous le contrôle des gonadotropines hypophysaires, la FSH et la LH. Un accroissement du taux ovulatoire en réponse à une sécrétion pulsatile de la sécrétion de LH induite par les nutriments alimentaires (flushing) est observé chez la truie (Flowers, Martin et al. 1989). Malgré l'efficacité qu'ont les gonadotropines à promouvoir le développement folliculaire, d'autres facteurs d'origines extra- ou intra-ovariennes peuvent limiter la réceptivité des follicules aux effets des gonadotropines (Foxcroft and Hunter 1985). Les facteurs locaux impliqués comprennent des stéroïdes, des cytokines, des prostaglandines, le VEGF, et les enzymes de dégradation de la matrice péri-folliculaire (Tsafriri and Reich 1999). Ces facteurs ont la capacité d'agir directement sur les ovaires ou de moduler la réponse cellulaire aux gonadotropines circulantes.

GnRH ET GONADOTROPINES

Plusieurs approches expérimentales, telles que l'hypophysectomie et l'hypogonadisme hypogonadotrope induit par des agonistes de la GnRH, ont démontré que chez le porc, les follicules de 4-5 mm acquièrent une dépendance aux gonadotropines (Miller, Picton et al. 1999). La GnRH est connue en tant que l'hormone clé dans le contrôle des fonctions reproductrices, via la stimulation de la synthèse et de la relâche des deux gonadotropines hypophysaires, la LH et la FSH (Conn and Crowley 1994). Le générateur des pulsions de GnRH hypothalamique est essentiel au fonctionnement normal de l'ovaire. Les problèmes de régulation de ce système sont associés à des dérèglements hormonaux, entre autres à l'hyperprolactinémie (Wuttke, Pitzel et al. 2001). La FSH est l'hormone principale du contrôle de la croissance folliculaire, entre autres chez la truie, la brebis et la vache. Sa sécrétion est à son tour contrôlée par les produits de sécrétion majeurs du (des) follicule(s) dominant(s),

l'estradiol et l'inhibine A. La FSH agit aussi pour stimuler la transcription de gènes de facteurs de croissance, l'activité aromatasase dans les cellules granulosas, l'induction des récepteurs de la LH sur les membranes de la granulosa et la sécrétion d'estradiol chez la femme (Sullivan, Stewart-Akers et al. 1999). Chez la truie cependant, des indices suggèrent que la hausse de sécrétion de la FSH n'est pas un pré-requis essentiel au recrutement folliculaire (Foxcroft and Hunter 1985). La LH est importante à l'induction de la production d'androgènes par la couche de cellules de la thèque. Lorsque les follicules atteignent un diamètre ovulatoire, les cellules de granulosa acquièrent les récepteurs de la LH. Il y a une transition de la dépendance à la FSH vers la LH avec la maturation folliculaire, coïncidant avec le déclin des niveaux de FSH chez la truie (Lucy, Liu et al. 2001). Chez le rat, le pic de LH estompe rapidement le patron d'expression génétique des granulosa pour reprogrammer ces cellules vers l'expression de gènes associés à l'ovulation et la lutéinisation (Fitzpatrick, Carlone et al. 1997). Chez l'humain, le pic de LH est responsable de la reprise de la méiose dans l'ovocyte et de l'activation d'enzymes nécessaires à la rupture folliculaire et l'ovulation (Shoham, Schacter et al. 1995). La LH est importante pour la formation du *corpus luteum* en rehaussant la sécrétion de progestérone.

AROMATASE

L'aromatase est une enzyme du complexe cytochrome P450 qui catalyse l'étape limitante dans la conversion des androgènes en estrogènes. Une forte activité aromatasase est détectable dans le trophoblaste d'embryons au temps de la pré-implantation chez le porc, l'estradiol étant le signal de reconnaissance de la gestation pour cette espèce (Gadsby, Heap et al. 1980). Elle est également exprimée dans la *membrana granulosa* de follicules chez les mammifères. L'expression de l'aromatase dans les cellules de la granulosa, faible dans le petit follicule antral, augmente drastiquement lorsque le follicule atteint une taille pré-ovulatoire chez le rat (Hickey, Chen et al. 1988). Les cellules de la thèque sont la source principale d'androgènes et contrôlent la synthèse d'estrogènes en procurant le substrat (Ainsworth, Tsang et al.

1990). Chez le porc, les cellules de la thèque comme les cellules de la granulosa expriment l'aromatase et il a été suggéré que la disponibilité des androgènes soit le facteur de régulation de la synthèse des estrogènes chez cette espèce (Foxcroft and Hunter 1985). Dans une étude comparant la dynamique du développement folliculaire en phase folliculaire des truies très grasses à taux ovulatoire élevé de race Meishan aux truies hybrides Large-White contemporaines, on a noté des variations des niveaux de production d'estradiol folliculaire entre ces races. Les follicules des truies Meishan produisaient plus d'estradiol que ceux des truies Large-White et il est suggéré que cette différence serait une explication possible aux différences de fertilité observées entre elles (Miller, Picton et al. 1998). On a aussi montré une activité aromatasase plus importante mais de plus courte durée dans les follicules de truies de race Meishan que dans les follicules de truies hybrides Large-White (Miller, Picton et al. 1998).

On a montré un déclin de l'expression de l'aromatase dans le follicule suite au pic de gonadotropines chez la truie (Conley, Howard et al. 1994). Une excellente étude utilisant la micro-dialyse a permis d'évaluer les changements dynamiques des niveaux de différents stéroïdes dans les follicules au stade pré-ovulatoire chez la truie (Einspanier, Jarry et al. 1991). Les concentrations folliculaires d'estradiol (E2) augmentent avant l'ovulation, mais chutent en période péri-ovulatoire alors que les niveaux de progestérone (P4) augmentent. La progestérone pourrait être un facteur de régulation local servant à inhiber l'activité aromatasase (Gregoraszczyk 1994).

Steroidogenic acute regulatory protein (StAR)

La biosynthèse des stéroïdes dans les tissus stéroïdiens (comme la surrénale et les gonades) débute par la conversion du cholestérol en pregnénolone, étape limitée par la translocation du cholestérol dans les mitochondries à partir des réserves cellulaires. La protéine StAR sert à faciliter le transfert du cholestérol à travers l'espace inter-membranaire vers la membrane interne des mitochondries (Stocco and Clark 1996) où s'initie la stéroïdogénèse. L'expression adéquate de StAR représente une

composante indispensable de la stéroïdogénèse dans le follicule pré-ovulatoire et le *corpus luteum* des ovaires de mammifères (Stocco 2001).

La couche de cellules de granulosa est la source principale de la hausse pré-ovulatoire de progestérone induite par la LH, et l'augmentation de l'expression de StAR dans les follicules pré-ovulatoires est nécessaire pour cette augmentation rapide de la production de progestérone (Johnson, Solovieva et al. 2002). Dans une étude effectuée chez la truie, l'expression de StAR était à son maximum dans les follicules en période pré-ovulatoire (LaVoie, Benoit et al. 1997). StAR était fortement exprimée dans les cellules de la thèque précédant l'ovulation chez la truie, puis au niveau des deux composantes du *corpus luteum* en développement, soit la granulosa et la thèque (Pescador, Stocco et al. 1999).

Cyclooxygénase 2 (COX-2)

Les premiers indices du rôle des prostaglandines dans l'ovulation proviennent d'études montrant que l'ovulation ne pouvait se produire chez des lapins pour qui la synthèse de prostaglandines avait été bloquée (Grinwich, Kennedy et al. 1972). On a éventuellement montré que la cyclooxygénase était l'enzyme nécessaire à la synthèse des prostaglandines.

La cyclooxygénase (COX) ou la synthétase de prostaglandine H₂ (PGHS) est l'enzyme limitant le taux de synthèse des prostaglandines à partir de l'acide arachidonique (Vane, Bakhle et al. 1998). Elle existe sous deux formes, COX-1 et COX-2, encodées par deux gènes différents. La COX-1 est responsable de la synthèse de prostaglandines à activité protectrice (estomac, rein). La COX-2 est inductible et produit les prostaglandines impliquées dans les processus de l'inflammation, de la douleur et de la fièvre, ainsi qu'à plusieurs niveaux de la reproduction (Vane, Bakhle et al. 1998).

Les souris dont le gène COX-2 a été inactivé sont infertiles dû à de multiples insuffisances reproductrices, dont l'ovulation, la fertilisation et l'implantation embryonnaire (Lim, Paria et al. 1997). Il a été démontré que l'activité de COX-2 est essentielle à la synthèse de prostaglandines ovariennes et que l'injection de PGE2 rétablit l'insuffisance ovulatoire chez les souris dont le gène COX-2 est inactivé (Davis, Lennard et al. 1999). Les anti-inflammatoires non-stéroïdiens (NSAID) bloquent l'activité de COX-2 et leur utilisation peut causer des problèmes de fertilité (Norman 2001).

PROSTAGLANDINES

Les prostaglandines sont des facteurs lipidiques exerçant un large spectre de processus biologiques, y compris au niveau de la reproduction. Le rôle essentiel de la PGE2 en reproduction est bien illustré par l'infertilité des souris dont le gène EP2 a été inactivé, EP2 étant un récepteur de PGE2 (Tilley, Audoly et al. 1999).

Entre autres, les prostaglandines ovariennes sont essentielles à l'ovulation. La production folliculaire de prostaglandines semble être régulée par la disponibilité de l'acide arachidonique, les activités de COX-2 et des synthétases de prostaglandines respectives (Ainsworth, Tsang et al. 1990). Les concentrations folliculaires de prostaglandines augmentent en période pré-ovulatoire chez la truie cyclique, la PGE2 étant la prostaglandine produite de façon prédominante (Gimeno, Franchi et al. 1985; Hunter and Poyser 1985). La PGE2 participe au processus de lutéinisation des cellules de la granulosa chez le porc (Evans, Dobias et al. 1983). Elle protège également le *corpus luteum* contre l'action lutéolytique de la PGF2 α (Ford and Christenson 1991), potentiellement en stimulant la production d'estradiol qui aurait un effet lutéotrope en début de gestation chez le porc (Gregoraszcuk and Michas 1999). En culture, les ratios PGE2:PGF2 α influencent le taux de production de progestérone par les cellules lutéales porcines de façon directement proportionnelle (Gregoraszcuk and Michas 1999).

La PGE2 est produite à partir de l'acide arachidonique par une séquence de trois réactions enzymatiques se terminant par l'isomérisation de la PGH2 en PGE2 par la synthétase de PGE (PGES). Récemment on a identifié 3 isoformes de PGES: une forme cytosolique, cPGES et deux formes microsomales, mPGES-1 et mPGES-2. La forme mPGES-1 est inductible et associée à COX-2 (Murakami, Naraba et al. 2000).

Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

Le VEGF est membre d'une famille de peptides angiogéniques qui affectent la vasodilatation et la perméabilité des capillaires, et stimulent la croissance de cellules endothéliales *in vivo* (Nicosia and Villaschi 1999). Par épissage alternatif, l'ARNm de VEGF donne lieu à trois isoformes principaux (de 121, 165, 189 acides aminés), ayant des activités biologiques similaires mais dont la biodisponibilité et les cibles varient considérablement. Les récepteurs de VEGF sont exprimés spécifiquement à la surface des cellules endothéliales vasculaires, quoiqu'un des récepteurs a été détecté à la surface de cellules tumorales ovariennes (Boocock, Charnock-Jones et al. 1995). L'expression de l'ARNm de VEGF est augmentée dans les cellules de la majorité des cancers chez l'humain, dont les cancers ovariens (Boocock, Charnock-Jones et al. 1995; Doldi, Bassan et al. 1996; Mattern, Stammler et al. 1997). Entre autres, la PGE2 est un puissant stimulateur de l'expression de VEGF dans les cellules cancéreuses ovariennes humaines en culture (Zhu, Saed et al. 2004).

L'ovaire est un modèle intéressant pour l'étude de l'angiogénèse physiologique et de la régression vasculaire, puisqu'on y retrouve des changements radicaux de la vascularisation à chaque stade du cycle oestral. L'angiogénèse y est donc constamment modulée par l'action de facteurs de croissance, de cytokines et d'inhibiteurs (Stouffer, Martinez-Chequer et al. 2001).

Il est aujourd'hui établi que le développement folliculaire dépend de l'angiogénèse de la couche de la thèque (Barboni, Turriani et al. 2000). En effet, l'injection de fragments de VEGF dans les ovaires de truies miniatures a permis d'augmenter le

nombre de follicules pré-ovulatoires (Shimizu, Jiang et al. 2003). Le VEGF et ses récepteurs ont été identifiés dans les ovaires de nombreuses espèces y compris chez le porc (Reynolds and Redmer 1998).

Les cellules de la granulosa sont les principales sécrétrices de VEGF (Mattioli, Barboni et al. 2001). L'expression de VEGF dans ces cellules augmente avec le développement folliculaire pour amener une accumulation de VEGF dans le liquide folliculaire. La perméabilité vasculaire et la néo-vascularisation à la périphérie folliculaire sont ainsi augmentées, permettant l'apport de facteurs circulants nécessaires aux besoins fonctionnels grandissants des cellules. Des études menées sur des truies au jeûne ont montré que la perméabilité vasculaire dans les follicules ovariens était accrue, résultant probablement de la hausse observée de production de VEGF (Galeati, Spinaci et al. 2003). L'accroissement de la concentration de VEGF pourrait jouer un rôle dans l'ovulation ainsi que la vascularisation subséquente du *corpus luteum* (Koos 1995).

PROBLÉMATIQUE

En reproduction, le rôle du tissu adipeux est bien établi. Des désordres reliés tant aux excédents qu'aux manques de masse adipeuse sont fréquemment la source de problèmes de fertilité. Le PCOS et l'anorexie sont des exemples représentant deux extrêmes de la condition adipeuse où la fonction reproductrice est affectée. L'influence des adipokines devient de mieux en mieux connue. Différents facteurs d'origine adipeuse ont d'ailleurs été grandement étudiés dans les divers axes hypothalamo-hypophyso-reproducteurs. L'adiponectine étant le facteur le plus abondamment sécrété par le tissu adipeux, un rôle pour cette adipokine en reproduction est vraisemblable. En effet, les récepteurs à l'adiponectine sont présents dans la plupart des types cellulaires des tissus reproducteurs vérifiés. De plus, deux modèles d'étude murins suggèrent un rôle permissif de l'adiponectine dans la fonction reproductrice.

Nous avons donc lancé l'hypothèse que l'adipokine adiponectine joue un rôle dans la régulation de fonctions ovariennes chez la truie et ceci permet d'expliquer, au moins en partie, les variations de fertilité entre individus d'adiposité différente. Plus spécifiquement, nous avons d'abord vérifié la production d'une adiponectine porcine pour identifier ses séquences nucléotidique et protéique spécifiques. Nous avons ensuite vérifié la présence des récepteurs de l'adiponectine, adipoR1 et adipoR2, sur les cellules porcines de la granulosa, notre sujet d'études. Après quoi nous avons produit une adiponectine porcine recombinante pour étudier ses effets sur la stéroïdogénèse et la synthèse de prostaglandines *in vitro* dans les cellules porcines de la granulosa.

MÉTHODOLOGIE

Extraction d'ARN total à partir de tissu adipeux

Toutes les étapes ont été effectuées avec du matériel exempt de RNase. À l'abattoir, du tissu adipeux viscéral a été récolté sur glace et conservé à -70°C jusqu'au temps d'extraction. Au laboratoire, cent mg de tissu adipeux gelé a été pesé et broyé dans l'azote liquide. La poudre gelée a été transvidée dans un tube sur glace contenant un mL de TRIzol® Reagent (Gibco BRL, Burlington, ON). Une fois dégelé, le tout a été homogénéisé à l'aide d'un Polytron® PT 1200 (Kinematica AG, Brinkmann, Mississauga, ON). Les lipides ont été séparés par centrifugation (12000 X g, 15 minutes, 4°C) et retirés. Les étapes subséquentes ont été effectuées selon les instructions décrites par le manufacturier. L'ARN total a été resuspendu dans 30 µL d'eau exempte de RNase et la concentration a été mesurée par spectrophotométrie à 260 nm. Les échantillons ont été conservés à -70°C.

Synthèse d'ADN complémentaires (ADNc) par polymérisation en transcription réverse (RT)

Un volume correspondant à un µg d'ARN total (extrait de gras viscéral ou de cellules de granulosa) a été traité avec 0,4 U de DNase I (RNase free) (Ambion Inc., Austin, TX) pendant 15 minutes à 37°C. L'ARN ainsi exempt d'ADN génomique a ensuite été utilisé pour synthétiser des ADNc à l'aide d'amorces déoxy-thymidines (oligo-(d)T) et de la transcriptase réverse SuperScript™ (Invitrogen, Burlington, ON), selon les instructions du manufacturier.

Clonage d'adiponectine porcine

Les séquences de l'adiponectine humaine, bovine, canine et murine ont été alignées (numéros d'accèsion NM_004797, NM_174742, AF417206 et NM_009605, respectivement) et les régions d'homologies ont servi à la conception d'amorces.

Un schéma illustrant la stratégie de clonage est montré à la Figure 1 (pages 37-8) et les différentes amorces sont incluses dans le Tableau I (pages 35-6).

Deux fragments d'adiponectine porcine ont été obtenus par PCR à partir d'un μL d'ADNc de tissu adipeux. Un premier fragment de 253 paires de bases (pb), correspondant aux nucléotides 423 à 676 de la séquence porcine de l'adiponectine (AY135647), a été obtenu d'une PCR emboîtée avec les amorces B et 2, à partir d'un μL d'une PCR effectuée à l'aide des amorces A et 1. Un second fragment de 444 pb (nucléotides 100 à 544 de l'adiponectine porcine) a été obtenu à l'aide des amorces C et 3. Les fragments ont été insérés dans pGEM®-T Easy Vector System I (Promega Corp., Madison, WI) et soumis au séquençage automatisé d'ADN sur séquenceur ABI PRISM 310 (Applied Biosystems, Foster City, CA) par le service de séquençage de l'université de Montréal (Faculté de médecine vétérinaire, St-Hyacinthe, Québec).

Pour compléter la séquence codante, des amorces destinées à l'amplification des extrémités 5' et 3' (5'- et 3'-RACE, Rapid Amplification of cDNA Ends, Invitrogen) ont été conçues à partir des fragments de séquence porcine déjà obtenus (5'R-1, -2 et -3 pour 5'-RACE; 3'R-1, -2 et -3 pour 3'-RACE). L'amplification des extrémités 5' et 3' est effectuée selon les instructions du fabricant, chacune avec un μg d'ARN total. Des fragments de 152 pb et 454 pb ont été obtenus des 5'- et 3'- RACE, respectivement, et les produits ont été séquencés. Les différents fragments ont été combinés par chevauchement de séquences communes pour obtenir la séquence codante complète de l'adiponectine porcine (numéro d'accèsion AY135647).

Clonage partiel des récepteurs porcins de l'adiponectine

Les séquences humaine et murine du récepteur 1 (adipoR1, NM_015999 et BC014875, respectivement) et du récepteur 2 (adipoR2, NM_024551 et BC024094, respectivement) de l'adiponectine ont été alignées et des amorces ont été conçues à partir des régions d'homologies (AdipoR1 -A et -1, AdipoR2 -A, -1, -B et -2; Tableau I, pages 35-6). Des fragments des séquences porcines partielles ont été obtenus par PCR. Pour l'adipoR1, la PCR a été répétée (2^e ronde) avec les mêmes amorces, à partir d'un µL de la première PCR (1^e ronde) qui ne permettait pas d'obtenir de produit détectable. Les fragments obtenus de 1044 pb pour adipoR1 et de 652 pb pour adipoR2 ont été séquencés (numéros d'accèsion AY452710 pour adipoR1 et AY452711 pour adipoR2). La présence des messagers pour les deux récepteurs a été vérifiée par PCR dans les ADNc de cellules porcines de granulosa, à l'aide d'amorces conçues spécifiquement (Lord, Ledoux et al. 2005) à partir des séquences porcines (AdipoR1 -pA et -p1, AdipoR2 -pA et -p1; Tableau I, pages 35-6).

Production d'adiponectine porcine recombinante

Toutes les étapes de clonage, d'expression et de purification ont été effectuées à l'aide du kit QIAexpressionist (QIAGEN, Mississauga, ON) avec le vecteur pQE-30 (6xHIS en N-terminal) selon les instructions du manufacturier, avec les précisions suivantes:

Clonage. Des sites de restriction *Bam*HI (en 5' de l'amorce) et *Hind*III (en 3' de l'amorce) ont été ajoutés par PCR (amorces Bam et Hind) à la séquence de l'adiponectine porcine dont la séquence du signal de sécrétion (nucléotides 1-45) a été exclue (Tableau I, pages 35-6). La souche d'expression *Escherichia coli* M15[pREP4] (QIAGEN) a été utilisée pour la transformation.

Expression. L'expression protéique a été induite par 1 mM isopropylthio- β -D-galactoside (IPTG) après 90 minutes de culture à 37°C, avec agitation. L'incubation s'est poursuivie à 37°C avec agitation, puis le surnageant a été éliminé par centrifugation (4000 X g, 30 minutes, 4°C) 4 heures après l'induction de l'expression protéique. Les culots ont été pesés et conservés à -20°C jusqu'au temps de purification.

Purification. Toutes les étapes subséquentes ont été effectuées à 4°C, avec des tampons froids. Les culots de bactéries ont été dégelés puis resuspendus dans 4 mL tampon de lyse (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole (QIAGEN), pH 8,0) par gramme de bactéries et incubés avec 1 mg/mL de lysozyme (Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, QC) pendant 30 minutes, puis 4 mg/mL DNase I (Amersham), 10 mg/mL RNase A (Amersham) et 1% Triton-X 100 (Sigma, Oakville, ON) ont été ajoutés pour 15 minutes. La purification s'est poursuivie selon les instructions du fabricant (QIAGEN). Le contenu de chaque fraction a été confirmé par séparation d'un aliquot par SDS-PAGE (gel 12% d'acrylamide), suivi d'une coloration au bleu de Coomassie (4 heures de coloration (50% méthanol, 10% acide acétique glacial, 0,25% Coomassie brilliant blue 250, Invitrogen), suivies de 24 heures de décoloration (50% méthanol, 10% acide acétique glacial)).

La protéine purifiée a été resuspendue dans le milieu utilisé pour les cultures de cellules de granulosa (MEM, Gibco), par centrifugations des fractions d'élution sur colonnes Amicon® Ultra-15 (5 X 30 minutes, 3500 X g, 4°C, Millipore, Nepean, ON). La concentration de protéine a été déterminée par absorbance à 595 nm (méthode de Bradford, BIO-RAD, Mississauga, ON) et des aliquots ont été congelés à -86°C.

Production d'un extrait bactérien (6xHIS sans adiponectine)

En parallèle à la production d'adiponectine recombinante, le vecteur pQE30 auquel aucun insert n'a été ajouté (produisant seulement le 6xHIS) a été utilisé pour une

transformation dans la même souche bactérienne et le tout a été soumis de façon identique aux étapes d'expression et de purification décrites ci-haut pour l'adiponectine porcine. L'extrait bactérien ainsi obtenu (6xHIS sans adiponectine) a été utilisé comme contrôle de purification, afin d'éliminer la possibilité que les effets observés soient dus à de potentielles endotoxines bactériennes présentes dans la suspension finale.

Culture de cellules porcines de la granulosa

Toutes les étapes ont été effectuées avec du matériel et des solutions stériles, sur glace. Des ovaires de truies prépubères ont été récoltés à l'abattoir (Olymel, St-Valérien de Milton), dans une solution saline contenant 5 mL/L Penicillin-Streptomycin (pen-strep, Gibco) et 2.5 mL/L fungizone amphotéricin B (fungizone, Gibco). Les follicules moyens-gros (4-7mm) de chaque ovaire ont été ponctionnés pour en aspirer le liquide folliculaire et les cellules de la granulosa. Le tout a été récupéré dans un tube sur glace.

Les cellules de la granulosa ont été lavées par une série de 3 centrifugations (1000 X g, 20 minutes, 4°C) dans le milieu de culture froid (Opti-MEM). Les cellules ont été resuspendues à 6-8 million de cellules par mL de milieu (Opti-MEM, 4% FBS (Gibco)+ pen-strep et fungizone) et 4 mL par puit ont étéensemencés (plaques de 6 puits, Sarstedt, Montréal, QC). Les plaques ont été incubées à 37°C avec 95% d'humidité relative et 5% de CO₂ pour 24 heures, pour permettre l'attachement des cellules. Le milieu a alors été remplacé par du milieu sans sérum. L'incubation s'est poursuivie dans les mêmes conditions pour 12-18 heures supplémentaires avant d'effectuer les traitements.

Traitements à l'adiponectine des cellules de granulosa en culture

Trois doses d'adiponectine recombinante porcine (2,5, 10 et 25 $\mu\text{g/mL}$) ont été choisies selon les concentrations physiologiques décrites chez l'humain et présentées aux cellules de granulosa en culture. Comme contrôle supplémentaire, le même volume de l'extrait bactérien (6xHIS sans adiponectine) a été ajouté à des puits réservés à cet effet. Les cultures cellulaires ont été laissées pour 2, 6, 12 et 24 heures d'incubation, après quoi les milieux, protéines totales et ARN ont été récoltés.

Extraction d'ARN total à partir de cellules en culture

Toutes les étapes ont été effectuées avec du matériel exempt de RNase. Les milieux de culture ont été aspirés et conservés à -20°C . À chaque puit, 300 μL d'une solution de guanidine isothiocyanate (GITC, Gibco) contenant 0,835 % β -mercaptoéthanol (β -Me, Sigma) ont été ajoutés. Les plaques ont été congelées à -20°C jusqu'au temps d'extraction.

Les plaques ont alors été dégelées à la température de la pièce. Le contenu de chaque puit a été homogénéisé par aspirations répétées (aiguille 21G). Un volume (300 μL) d'éthanol 70% a été ajouté, puis le tout a été chargé sur une colonne du RNeasy® Protect Mini Kit (QIAGEN). L'extraction s'est poursuivie selon les instructions du fabricant. L'ARN total a été resuspendu dans 30 μL d'eau exempte de RNase et la concentration a été mesurée par spectrophotométrie à 260 nm. Les échantillons ont été conservés à -70°C .

Extraction de protéines totales à partir de cellules en culture

Le milieu de culture a été retiré par aspiration (conservé à -20°C) et 200 μL de tampon de chargement au SDS (62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 10% glycérol, 50 mM DTT, 0,01% bleu de bromophénol) a été ajouté dans chaque puit. Le tout a

été homogénéisé par aspirations répétées et conservé à -20°C jusqu'au temps d'analyse.

Immunobuvardage (Western blot)

Pour la détection de COX-2, 20-40 μ L de protéines totales ont été bouillis (5 minutes, 100°C) et séparés par SDS-PAGE (gel séparateur à 12% de polyacrylamide avec gel concentrateur à 5% de polyacrylamide) à 70V pour 30 minutes puis 120V pour 4 heures, dans le tampon d'électrophorèse (5 mM Tris, 50 mM glycine, 0,02% SDS, pH 8.3). Pour l'adiponectine recombinante, 100 ou 500 ng de protéine purifiée ont été bouillis et séparés par SDS-PAGE (gel à 12% de polyacrylamide) à 90V pour 3 heures.

Les protéines séparées dans le gel ont par la suite été transférées sur une membrane de nitrocellulose (Trans-Blot® Transfer Medium, BIO-RAD) par transfert semi-sec (toute la nuit, 20V, 4°C), dans le tampon de transfert (39mM glycine, 48mM Tris, 0,37% SDS, 20% méthanol, pH 8.3). La membrane a été rincée à l'eau distillée, exposée au Ponceau-S (Sigma) pour 15 minutes pour visualisation des bandes, rincée à l'eau à nouveau puis soumise à une série de lavages en tampon de blocage (0,1M Tris, 0,9% NaCl, pH 7.5 avec 0,1% Tween-20).

La membrane a été exposée à l'antisérum anti-COX2 243 (Lajoie, Sirois et al. 2002) ou à l'antisérum anti-adiponectine (Tsao, Murrey et al. 2002). L'anti-COX2 243 (génereux don de Stacia Kargman, Merck, Kirkland, QC), provenant de lapins immunisés contre la COX-2 placentaire de mouton, a été dilué 1 :10000 dans le tampon de blocage. L'anti-adiponectine (génereux don de T.S. Tsao, Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, Massachusetts), provenant de lapins immunisés contre un peptide d'adiponectine murin (Tsao, Murrey et al. 2002), a été dilué 1 :5000 dans le tampon de blocage. La membrane a été incubée avec l'anticorps à 4°C pour la nuit, avec agitation.

La membrane a été lavée plusieurs fois dans le tampon de blocage puis incubée avec un second anticorps (Ig d'âne anti-lapin, avec peroxydase de raifort (HRP) conjuguée, Amersham) dilué dans le tampon de blocage (1 : 10000 pour COX-2, 1 : 5000 pour adiponectine) pendant 2 heures à température pièce, avec agitation. Après plusieurs lavages subséquents dans le tampon de blocage, 5 mL de substrat de la HRP (SuperSignal® West Pico Chemiluminescent substrate, Pierce, Rockford, IL) par membrane ont été ajoutés et laissés pendant 5 minutes maximum. La membrane a été exposée à un film radiographique (Biomax MR-1, Kodak, Mandel Scientific, Guelph, ON). La pellicule radiographique a été développée et l'image a été numérisée et quantifiée (Image J, National Institutes of Health, USA).

PCR semi-quantitatif

Les ADNc de cellules de la granulosa traitées ou non avec l'adiponectine ont été utilisés. L'abondance relative des messages de l'aromatase, de StAR, de COX-2, de mPGES-1 (forme inductible) et de VEGF (tous les isoformes) a été déterminée par PCR semi-quantitatif en utilisant la cyclophiline comme contrôle de la quantité d'ARN ajoutée et de l'efficacité de la RT-PCR (amorces Tableau II, pages 39-40). Les amorces pour l'aromatase (arom B et 2) ont été conçues à partir de la séquence porcine (numéro d'accèsion U92245) et ont permis d'obtenir un fragment de 521 pb. Les amorces pour StAR (StAR B et 2) ont été conçues à partir de la séquence porcine (numéro d'accèsion NM_213755) et ont permis d'obtenir un fragment de 325 pb. Les amorces pour COX-2 (COX-2 A et 1) ont été conçues à partir de la séquence porcine (numéro d'accèsion AY028583) et ont permis d'obtenir un fragment de 412 pb. Les amorces pour mPGES-1 (PGES F et 1) ont été conçues à partir des séquences de rat et de bovin (numéros d'accèsion AF280967 et NM_174443, respectivement) et ont permis d'obtenir un fragment de 220 pb. Les amorces pour VEGF (VEGF A et 1) ont été conçues à partir de la séquence porcine (numéro d'accèsion AF318502) et ont permis d'obtenir un fragment de 420 pb. Les amorces pour cyclophiline (cyclo A et 1; décrites dans Lord, Ledoux et al. 2005) ont permis d'obtenir un fragment de 450 pb.

Pour chaque gène étudié, une courbe d'amplification par PCR a été produite afin de déterminer le nombre de cycles permettant d'obtenir un produit en phase exponentielle d'amplification. Tous les échantillons ont été soumis à une PCR pour le nombre de cycles déterminé pour chaque gène (Tableau II, pages 39-40). Les produits de PCR ont été séparés sur gels d'agarose 1% et révélés au bromure d'éthidium, puis les images ont été numérisées et quantifiées (Image J, NIH). Une première valeur d'expression d'ARNm pour chaque gène dans chaque échantillon est obtenue selon la valeur numérisée du gène étudié relative à la valeur numérisée du gène domestique, la cyclophiline (gène/ cyclophiline). Enfin, les résultats sont présentés sous forme du niveau d'expression du gène dans l'échantillon cellulaire traité (adiponectine 25 µg/mL, A) relativement à l'expression de ce même gène dans l'échantillon cellulaire non traité (contrôle, C) à chaque période d'incubation (A/C).

Essai Radio-Immunologique (RIA) pour PGF2α

La concentration de PGF2α a été mesurée pour chaque échantillon dans 100 µL de milieu de culture, avec un anticorps polyclonal de lapin d'Assay Designs, Inc (Ann Arbor, MI); la réactivité croisée avec 13,14-dihydro-15-keto-PGF2α (PGFM), 6-keto-PGF1α, PGD2, PGE2 et l'acide arachidonique était de 0,07, 6,1, 0,6, 0,2 et 0,002%, respectivement, à 50% de déplacement. Chaque valeur correspond à la moyenne des résultats de trois échantillons (chacun en duplicata) obtenus d'expériences indépendantes. La sensibilité de l'essai était de 62,5 pg/ mL, et les coefficients de variation intra- et inter-essai étaient de 9,2 et 12,3%, respectivement. Les concentrations de valeur inférieure à la limite de détection de l'essai ont été considérées de concentration 57,5 pg/mL.

Quantifications immunologiques (EIA) de PGE2 et VEGF

Les concentrations de PGE2 et VEGF ont été mesurées par EIA à l'aide des trousse Enzyme Immunoassay for Prostaglandin E2 (Oxford Biomedical Research, Oxford, MI) et Quantikine® Human VEGF Immunoassay (R&D Systems, Minneapolis, MN), respectivement, selon les instructions des manufacturiers. Chaque valeur correspond à la moyenne des résultats de trois échantillons (chacun en duplicata) obtenus d'expériences indépendantes. Toutes les mesures ont été effectuées dans un seul essai pour chaque quantification, pour lesquels le coefficients de variation internes se situaient entre 1,1 et 4,3 % pour PGE2 et entre 3,5 et 6,5 % pour VEGF (calculés entre duplicatas). Les concentrations de PGE2 de valeur inférieure à la limite de détection de la trousse (100 pg/mL) ont été considérées de concentration 95 pg/mL.

Analyses statistiques

Chaque expérience a été effectuée sur des cellules folliculaires de la granulosa provenant de la combinaison d'ovaires de plusieurs truies. Chaque traitement a été effectué en triplicatas et répété en duplicatas sur des cellules de pools obtenus de journées différentes. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm écart-type de 3 expériences indépendantes. Une analyse de variance ANOVA a été effectuée pour déterminer l'effet des traitements et du temps. En présence d'un effet significatif, les moyennes individuelles ont été soumises à un test de comparaison d'attributs multiples de Duncan.

RÉSULTATS

Clonage d'adiponectine porcine et des récepteurs AdipoR1 et AdipoR2 porcins

Tel que suspecté, l'espèce porcine produit de l'adiponectine. De l'ARN extrait de tissu adipeux viscéral de porc a effectivement permis d'obtenir la séquence codante complète de l'adiponectine porcine. Le Tableau III (pages 41-2) montre les pourcentages d'homologies entre les séquences nucléotidiques porcines obtenues dans notre laboratoire comparativement aux séquences humaine et murine disponibles (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). La séquence de l'adiponectine porcine contenait 84% et 89% d'homologie avec les séquences humaine et murine, respectivement. La séquence nucléotidique obtenue correspondait également à 99% aux séquences d'adiponectine porcine obtenues plus tard par deux autres groupes de recherche (Ding, Liu et al. 2004; Jacobi, Ajuwon et al. 2004).

L'existence des deux récepteurs de l'adiponectine, AdipoR1 et AdipoR2 a également été confirmée chez le porc et les séquences nucléotidiques partielles obtenues dans notre laboratoire correspondent à 98% et 100% aux séquences porcines respectives obtenues par un autre groupe de recherche (Ding, Liu et al. 2004). L'homologie observée entre les séquences nucléotidiques porcines des récepteurs 1 et 2 de l'adiponectine et les séquences nucléotidiques correspondantes humaines et murines est particulièrement élevée (Tableau III, pages 41-2). Ainsi, l'adipoR1 porcin était homologue à 92% comparativement à chacune des séquences humaine et murine, et l'adipoR2 porcin était à 92% et 90% homologue avec les séquences humaine et murine, respectivement. La présence du messenger de chacun des deux récepteurs de l'adiponectine a été détectée dans chaque tissu porcin étudié (Lord, Ledoux et al. 2005), y compris dans les cellules de la granulosa (Figure 3, pages 45-6). L'expression de chacun des deux récepteurs de l'adiponectine a été confirmée à tous les stades de développement du follicule et du *corpus luteum*, vérifié à partir de l'ARN total extrait d'échantillons frais de cellules de granulosa, obtenu pour chaque stade (résultats non montrés). Cependant, nous n'avons pas observé de différence

dans l'expression de l'un ou l'autre des récepteurs au niveau des cellules de granulosa en culture, ni dans le temps, ni dans les échantillons ayant été traités avec l'adiponectine recombinante comparativement aux contrôles (Figure 3, pages 45-6). Toutefois, nous n'avons pas approfondi d'avantage sur cette question. Un plus grand échantillonnage serait donc nécessaire afin de pouvoir appuyer statistiquement cette affirmation.

Production d'adiponectine porcine recombinante

La Figure 2 (pages 43-4) montre le résultat d'un immunobuvardage obtenu à partir de 100 et 500 ng d'adiponectine porcine recombinante. On peut y observer une bande principale correspondant au monomère d'adiponectine de la taille attendue, soit à 25 kDa. Le retrait de la séquence codant pour le signal de sécrétion explique l'obtention d'un monomère de taille plus petite que 30 kDa, poids moléculaire de l'adiponectine de pleine longueur. La Figure 2 (page 43-4) permet également d'observer une seconde bande correspondant à ce qui est vraisemblablement un trimère d'adiponectine, soit à 75 kDa. La détection par l'antisérum confirme l'identité de l'adiponectine pour les deux fragments. L'assemblage des unités d'adiponectine en trimères se fait de façon covalente entre résidus cystéine. Les agents dénaturants utilisés dans le tampon de chargement et dans la SDS-PAGE (DTT ou β -Me) ne peuvent détruire ce lien, tel qu'observé par un autre groupe de recherche (Tsao, Tomas et al. 2003).

Effets de l'adiponectine sur l'expression de gènes de la stéroïdogénèse

Dans les puits où les cellules avaient été traitées avec 25 μ g/mL d'adiponectine recombinante, l'expression de l'ARNm de l'aromatase était réprimée (Figure 4A, pages 47-8) tandis que celle de StAR était stimulée (Figure 5A, pages 49-50). L'ampleur de ces effets est maximal à 12 heures d'incubation dans les deux cas, où l'expression de l'ARNm de l'aromatase était réduite à 40% de celle du contrôle et où

l'expression de l'ARNm de StAR était 3 fois plus importante que dans les puits de cellules non traitées. Pour ces deux gènes, l'effet s'était estompé quelque peu à 24 heures, sans toutefois être complètement effacé. En effet, l'expression de l'aromatase n'était qu'à 75% de celle observée pour les cellules contrôles, et l'expression de StAR est demeurée 2,5 fois plus importante. Aucun effet de l'extrait bactérien n'a été observé sur les niveaux d'ARNm de l'aromatase ou de StAR (Figures 4B et 5B, pages 47-8 et 49-50 respectivement), où le niveau d'expression obtenu pour l'une et l'autre cible après 12 heures d'incubation équivalait à celui du contrôle respectif. Ceci suggérait que seule l'adiponectine était responsable des variations observées sur l'expression des deux gènes de régulation de la stéroïdogénèse, aromatase et StAR.

Effets de l'adiponectine sur l'expression de COX-2

La répression de l'expression de l'aromatase, accompagnée d'une stimulation de l'expression de StAR déclenchées *in vitro* par l'adiponectine, rappelle un patron *in vivo* observé dans les cellules de granulosa de follicules pendant la période qui précède tout juste l'ovulation. Afin de vérifier le potentiel de l'adiponectine à produire des effets correspondant à l'induction de l'ovulation dans les cellules de granulosa, nous nous sommes penchés sur l'expression de COX-2. Des recherches suggéraient déjà la capacité de l'adiponectine à stimuler l'expression de COX-2 (Yokota, Meka et al. 2002; Yokota, Meka et al. 2003). L'incubation de cellules porcines de la granulosa avec 25 µg/mL d'adiponectine a amené une forte stimulation de l'expression du messenger de COX-2 avec le temps (Figure 6A, pages 51-2). Cet effet ne semblait pas être dû à une possible contamination de l'adiponectine recombinante par des endotoxines bactériennes puisque l'extrait bactérien (6xHIS sans adiponectine) n'avait aucun effet sur l'expression de COX-2, même après 12 heures d'incubation (Figure 6B, pages 51-2). L'induction de COX-2 dans les cellules traitées à l'adiponectine était déjà observable après 2 heures (induite 4 fois plus que dans les contrôles), continuait de grimper à 6 heures (9 fois les contrôles) et devenait maximale après 12 heures (induite 14 fois). L'induction demeurait soutenue après 24

heures (5 fois les contrôles) mais l'effet était moindre qu'à 12 heures. Un immunobuvardage a permis de confirmer la présence de la protéine COX-2 dans les échantillons traités à l'adiponectine à 12 heures d'incubation. La protéine COX-2 n'était détectable qu'en faible quantité dans les cellules non traitées avec l'adiponectine recombinante ou dans les contrôles incubés avec l'extrait bactérien (6xHIS sans adiponectine) (Figure 6C, pages 51-2).

Effets de l'adiponectine sur la sécrétion de prostaglandines

Afin de confirmer l'activité de COX-2 dans les cellules traitées à l'adiponectine, l'abondance des prostaglandines PGF2 α et PGE2 dans les milieux de cultures a été vérifiée. L'accumulation de chacune des deux prostaglandines a été mesurée par essais immunologiques. La détection de PGF2 α par RIA montrait une accumulation de près de 4 fois plus importante dans les milieux des cellules de la granulosa traitées à l'adiponectine à 12 heures (Figure 7A, pages 53-4), comparativement aux milieux des cellules contrôles dont l'accumulation de PGF2 α était souvent de concentration sous les limites de détection de l'essai (62,5 pg/mL). L'accumulation était encore plus importante à 24 heures, atteignant des niveaux de près de 5 fois ceux des contrôles (de concentrations souvent sous les limites de détection). Cependant la majorité de sécrétion de PGF2 α semblait se produire jusqu'à 12 heures, ce qui pourrait suggérer un ralentissement de la production de cette prostaglandine. Les concentrations de PGF2 α des contrôles se situaient entre la valeur minimale et 154,9 pg/mL. L'accumulation de PGE2 mesurée par EIA était de 2 à 3 fois plus importante à 12 heures dans les milieux de cellules traitées à l'adiponectine comparativement aux contrôles, mais la détection s'est amplifiée entre 12 et 24 heures dans les milieux des cellules traitées à l'adiponectine pour atteindre des niveaux en moyenne 14 fois plus concentrés que ceux mesurés pour les cellules contrôles (Figure 7B, pages 53-4). Ici encore, les concentrations de PGE2 dans les milieux des cellules contrôles étaient fréquemment sous les limites de détection de la trousse (100 pg/mL) et se situaient entre la valeur minimale et 300 pg/mL. Ainsi l'accumulation de prostaglandines PGF2 α et PGE2 dans les milieux de culture des cellules traitées à l'adiponectine a

permis de confirmer l'activité de COX-2 dans ces cellules, laquelle semblait d'avantage dirigée vers la production de PGE2 que de PGF2 α . Aucune accumulation n'a pu être mesurée dans les contrôles ayant reçu de l'extrait bactérien (résultats non montrés).

Effets de l'adiponectine sur l'ARNm de la mPGES-1

L'accumulation principalement observée de prostaglandine PGE2 dans les milieux de cellules traitées à l'adiponectine a mené notre investigation vers la mesure du messenger de l'enzyme de conversion de PGH2 spécifiquement en PGE2, la synthétase de PGE, plus spécifiquement la mPGES-1 (forme inductible). Les traitements à 25 μ g/mL d'adiponectine ont amené une stimulation marquée de l'expression de la mPGES-1 avec le temps dans les cellules de la granulosa en culture, comparativement aux contrôles non traités ou ceux ayant reçu l'extrait bactérien (6xHIS sans adiponectine) (Figure 8A et 8B, pages 55-6). Nous avons réussi à mesurer une stimulation de l'expression du messenger de mPGES-1 par l'adiponectine jusqu'à près de 9 fois celle des contrôles. Comme pour les autres gènes étudiés, c'est à 12 heures d'incubation avec l'adiponectine que l'on a pu observer le maximum de l'induction du messenger, induction qui persistait, mais de façon beaucoup moindre (3 fois), à 24 heures. Dès 2 heures cependant, on pouvait commencer à voir une stimulation significative de PGES dans les cellules de la granulosa en présence d'adiponectine recombinante (Figure 8A, pages 55-6). La présence d'une stimulation de l'expression du messenger de la PGES permet de confirmer l'observation d'une accumulation marquée de PGE2 dans les milieux de culture des cellules traitées avec l'adiponectine.

Effets de l'adiponectine sur l'expression de VEGF

L'expression relative du messenger de VEGF par l'adiponectine a aussi été vérifiée dans notre système de culture de cellules de granulosa car l'effet de la PGE2 sur

VEGF est couramment suggéré dans la littérature (Abdel-Majid and Marshall 2004). En effet, dans les échantillons exposés à l'adiponectine recombinante, le message de VEGF est détecté 2 fois plus fortement que dans les échantillons non traités, dès 6 heures du début des traitements (Figure 9A, pages 57-8), atteignait un maximum à 12 heures (4 fois) et persistait à 24 heures mais de façon réduite (2 fois). L'incubation avec l'extrait bactérien (6xHIS sans adiponectine) n'a produit aucun effet significatif sur l'expression de VEGF dans les cultures de cellules de granulosa, même après 12 heures d'incubation (Figure 9B, page 57-8). Afin de vérifier que l'ARN est traduit en protéine, laquelle est ensuite sécrétée par les cellules, l'accumulation de VEGF a été mesurée dans les milieux de culture par essai immunologique (EIA). Les niveaux de VEGF mesurés dans les milieux provenant de cellules traitées à l'adiponectine pendant 12 heures étaient près de 3 fois plus importants que dans les contrôles (Figure 9C, page 57-8). Cette différence d'accumulation était mesurable après 6 heures (environ 2 fois) et maintenue à 24 heures de culture, sans qu'il n'y ait d'accumulation additionnelle importante, suggérant un arrêt de la sécrétion de VEGF ou une probable dégradation de la protéine. Les données du message suggèrent plutôt la première possibilité. Il n'y avait aucune accumulation mesurable de VEGF dans les échantillons ayant été exposés à l'extrait bactérien après 12 heures d'incubation (résultats non montrés).

Tableau I. Amorces PCR utilisées pour le clonage des homologues porcins de l'adiponectine (Acrp30) et de ses récepteurs (AdipoR1 et AdipoR2), et pour la production d'adiponectine porcine recombinante (pACRPr).

Les détails de conception d'amorces PCR et des étapes de clonage sont décrits dans la méthodologie. Un schéma de la stratégie de clonage de l'adiponectine porcine est illustré à la Figure 1. Les sites de restrictions ajoutés aux amorces utilisées pour la production d'adiponectine porcine recombinante (*BamHI* et *HindIII*) ont été soulignés. Les températures d'hybridation des amorces (temp.), le nombre de cycles et la longueur des fragments obtenus sont indiqués.

Gène	Amorce ^a	Séquence de l'amorce	Longueur (pb) ^b	Temp. (°C) ^c	Cycles
<i>Acrp30</i>	A (s)	5'- YCCVGGAAACCCWGGCAGGAAA-3'	-	55	35
	1 (as)	5'- CCRTACACC TGGAGCCAGACTT- 3'			
	B (s)	5'-TCAGCRTTCAGTGTGGGGYTGGAGA- 3'	253	50	35
	2 (as)	5'- GCCTGGTCCACATTATTTTCT- 3'			
	C (s)	5'- TGCTGGGAGCTGTTCTACTG -3'	444	55	35
	3 (as)	5'- AGTGGAAATTTGCCAGTGGTGACA- 3'			
	5'R-1	5'- ATA CCC GCC ATC CAG CCT- 3'	-	55	35
	5'R-2	5'- GTA GTG CTC CAG GCT TCT- 3'	-	55	35
	5'R-3	5'- GGT TTC CTG GCC GAG ACT- 3'	152	55	35
	3'R-1	5'- GAA GGT CAG CCT CTA CAA- 3'	-	54	35
	3'R-2	5'- GAA GGA CAA GGC TGT ACT- 3'	-	54	35
	3'R-3	5'- CAC CTA CGA CCA GTA CCA- 3'	454	54	35
	<i>AdipoR1</i>	A (s)	5'- CTG GCT GAR CTG GGR CCC CTG CTR GAR GAG AAG- 3'	(1 ^e ronde):	63
			-	59	15
				54	10
1 (as)		5'- AAG GGW GTC RTC RGT ACA GCC RCC TTC TAG GCC- 3'	(2 ^e ronde):	59	15
			1044	54	20
pA (s)		5'- AACCCACCCAAAGCTGAAGA -3'	344	58	35
p1 (as)	5'- CTGAGCATGGTCAAGATTCC -3'				
<i>AdipoR2</i>	A (s)	5'- CAG GAA GAT GAR GGS TTT ATG GGC ATG TCC- 3'	-	60	30
	1 (as)	5'- CTG GWK MCT GGW RRG TAT CAC AGT GCA TCC- 3'			
	B (s)	5'- GCCTGGGGATCTTTTAT- 3'	652	50	15
				47	15
	2 (as)	5'- CCC GCC RAT CAT GA- 3'			
	pA (s)	5'- GCC TGG GGA TCT TTT ATA TGT TTC- 3'	650	52	32
	p1 (as)	5'- GCC GAT CAT GAA GCG AA- 3'			
<i>pACRPr</i>	Bam (s)	5'- <u>GGATCC</u> GGCCAGGAAACCACCGAGAAGCCTGG -3'	762	55	35
	Hind (as)	5'- <u>AAGCTT</u> CTCTGAGTTGGCAGTGCTCATCAT -3'			

^as= amorce sens; as = amorce anti-sens; p = spécifique à la séquence porcine.

^bpb: paires de bases.

^c°C: degrés Celcius.

Figure I. Schéma du positionnement des amorces PCR, illustrant la stratégie de clonage de l'adiponectine porcine (Acrp30).

Le long trait foncé représente la séquence nucléotidique de l'adiponectine porcine (AY135647). Les codons START (ATG) et STOP (TGA) sont indiqués par de petits traits verticaux sur la séquence. Les amorces énumérées dans le Tableau I sont positionnées approximativement selon leur position d'hybridation sur la séquence d'adiponectine porcine. Les traits unis pâles chevauchant la séquence l'adiponectine représentent les produits obtenus par la combinaison des amorces indiquées, flanquant les traits (produits PCR, au-dessus de la séquence) ou à leur extrémité (produits RACE, en-dessous de la séquence). Le trait pointillé correspond à l'équivalent d'un produit de PCR attendu avec les amorces A et 1 (non visualisé sur gel), ayant servi de matrice pour la PCR emboîtée effectuée avec les amorces B et 2. Pour les amorces de PCR, les lettres majuscules correspondent à des amorces sens et les nombres correspondent à des amorces anti-sens.

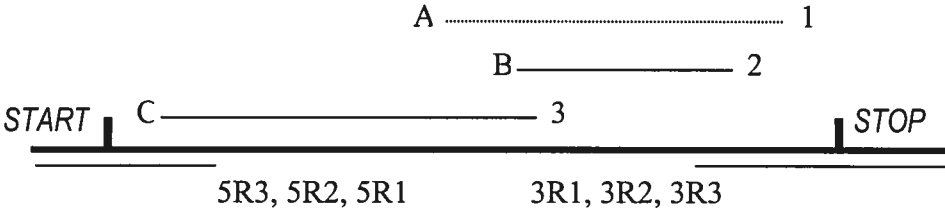


Tableau II. Amorces PCR utilisées pour les amplifications des gènes de l'aromatase (arom), de StAR, de COX-2, de mPGES-1 (PGES), de VEGF et de cyclophiline (cyclo).

Les amorces ont été conçues à partir de séquences porcines, sauf pour PGES (détails dans la méthodologie). Les températures d'hybridation des amorces (temp.), le nombre de cycles et la longueur des fragments obtenus sont indiqués.

Gène	Amorce	Séquence de l'amorce	Longueur (pb) ^a	Temp. (°C) ^b	Cycles
<i>Arom</i>	B	5'- TGCTGCTCACTGGCTTTCTTCTCT -3'	B2: 521	61,5	35
	2	5'- AGAGGTTGTTAGAGGTGCCAGCA -3'			
<i>StAR</i>	B	5'- AACATGAAGGGGCTGAGGCAC -3'	B2: 325	62,0	30
	2	5'- TCCACCACCACCTCCAGC -3'			
<i>COX-2</i>	A	5'- ATGGGTGTGAAAGGGAGGAAAGAG -3'	A1: 412	61,5	35
	1	5'- ATCATCAGACCAGGCACCAGACCA -3'			
<i>PGES</i>	F	5'- GCTGCGGAAGAAGGCTTTTG -3'	F1: 220	60,0	32
	1	5'- AAGTAGGCCACGGTGTGTAC -3'			
<i>VEGF</i>	A	5'- CTCCGAAACCATGAAC TTTCTG -3'	A1: 420	58,0	28
	1	5'- CTCGCTCTATCTTTCTTTGGTCT -3'			
<i>Cyclo</i>	A	5'- ACCGTCTTCTTCGACATCGC -3'	A1: 450	62,0	24
	1	5'- CTTGCTGGTCTTGCCATTCC -3'			

^a pb: paires de bases.

^b °C: degrés Celcius.

Tableau III. Pourcentages d'homologies entre les séquences nucléotidiques porcines, humaines et murines d'adiponectine, adipoR1 et adipoR2.
Les numéros d'accèsion dans GenBank sont indiqués entre parenthèses.

Séquence porcine	Homologies à séq. humaines	Homologies à séq. murines
<i>Adiponectine</i> (AY135647)	84% (NM_004797)	89% (NM_009605)
<i>AdipoR1</i> (AY452710)	92% (NM_015999)	92% (BC014875)
<i>AdipoR2</i> (AY452711)	92% (NM_024551)	90% (BC024094)

Figure 2. Immunobuvardage d'adiponectine recombinante porcine.

Des aliquots de 100 ou 500 ng d'adiponectine recombinante porcine ont été séparés par SDS-PAGE (gel 12% de polyacrylamide) puis transférés sur membrane de nitrocellulose. Deux fragments (monomère, 25 kDa et trimère, 75 kDa) ont pu être détectés suite à une incubation avec de l'antisérum dirigé contre un fragment d'adiponectine murin (1:5000).

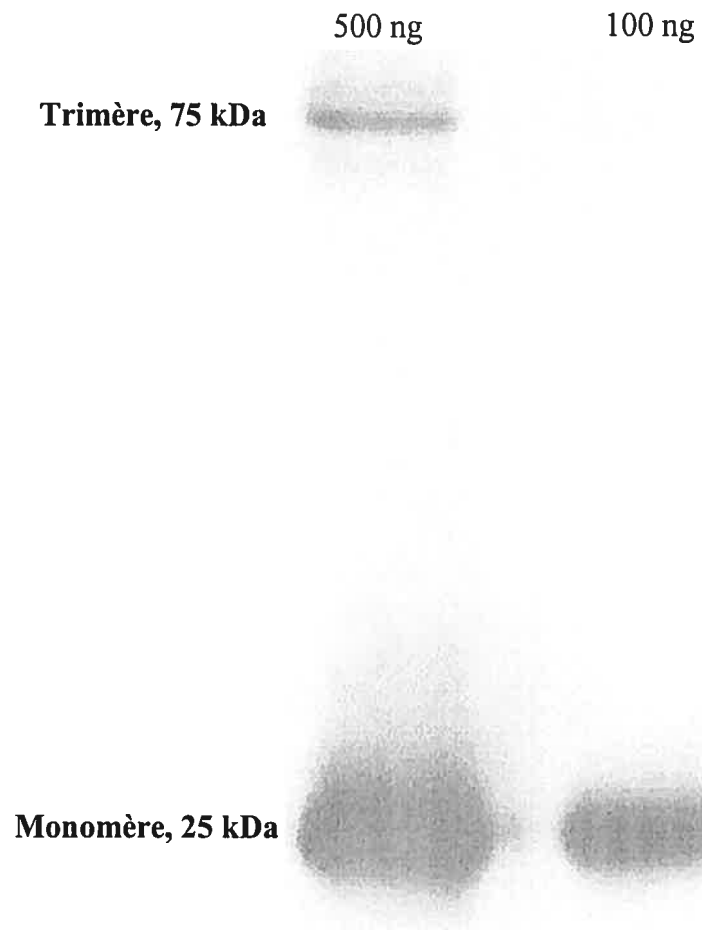
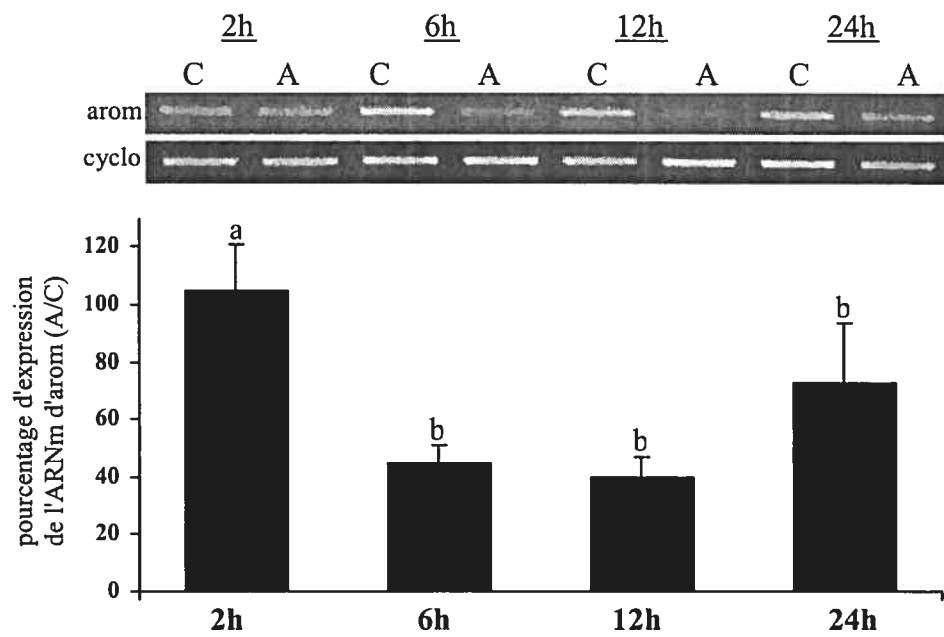


Figure 3. L'adiponectine n'affecte pas l'expression de ses récepteurs, AdipoR1 et AdipoR2, dans les cellules porcines de la granulosa *in vitro*. Gel montrant le résultat obtenu par RT-PCR semi-quantitatif pour AdipoR1 (R1) et AdipoR2 (R2).
cyclo: cyclophiline; C: contrôle (sans adiponectine); A: adiponectine 25 µg/mL.

Figure 4. L'adiponectine réprime l'expression de l'ARNm de l'aromatase dans les cellules porcines de la granulosa *in vitro*. A) Gel d'agarose montrant un résultat typique de PCR semi-quantitatif pour l'aromatase et représentation graphique des moyennes \pm écarts moyens des résultats de trois cultures. Pour chaque échantillon, des PCR pour arom et pour cyclo ont été effectuées, puis le produit de arom/cyclo a été obtenu (soit C, soit A). À chaque temps indiqué dans le graphique, la barre indique le résultat de A/C. Le traitement à l'adiponectine est significatif à $P < 0,001$. Les lettres minuscules différentes = $P < 0,05$. B) Gel montrant un résultat obtenu par PCR semi-quantitatif pour l'aromatase après 12 heures d'incubation, avec l'extrait bactérien comme contrôle de purification.

arom: aromatase; cyclo: cyclophilline; C: contrôle (sans adiponectine recombinante); A: adiponectine 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$; bact: extrait bactérien (6xHIS sans adiponectine).

A)



B)

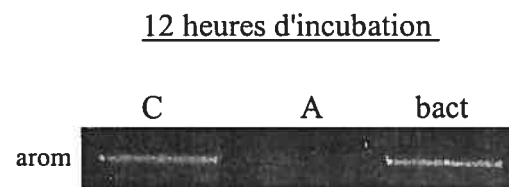
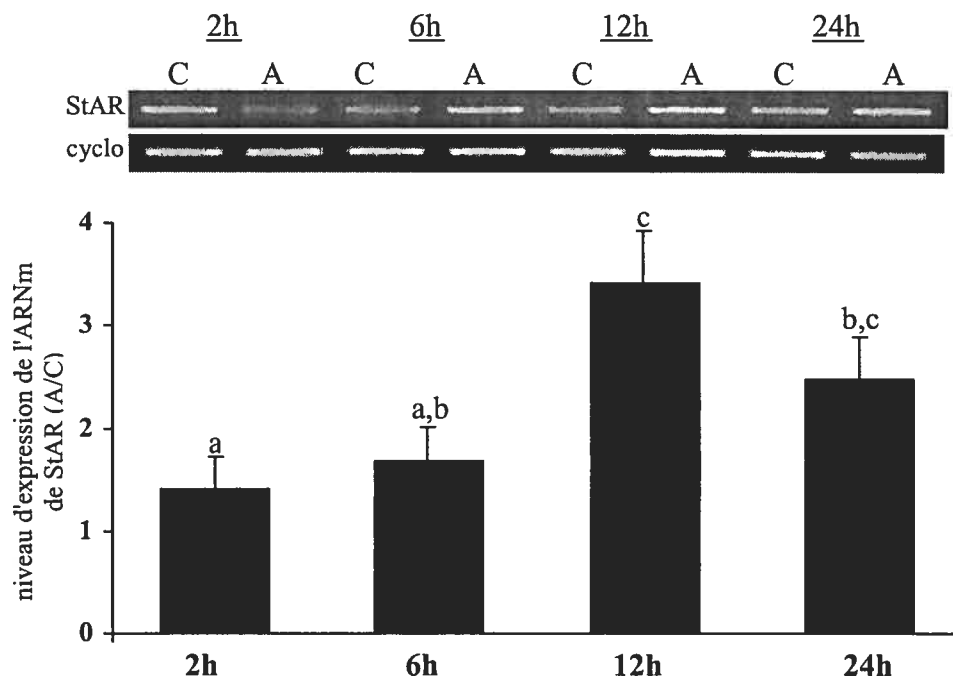


Figure 5. L'adiponectine stimule l'expression de l'ARNm de StAR dans les cellules porcines de la granulosa *in vitro*. A) Gel d'agarose montrant un résultat typique de PCR semi-quantitatif pour StAR et représentation graphique des moyennes \pm écarts moyens des résultats de trois cultures. Pour chaque échantillon, des PCR pour StAR et pour cyclo ont été effectuées puis le produit de StAR/cyclo a été obtenu (soit C, soit A). À chaque temps indiqué dans le graphique, la barre indique le résultat de A/C. Le traitement à l'adiponectine est significatif à $P < 0,001$. Les lettres minuscules différentes = $P < 0,05$. B) Gel montrant un résultat obtenu par PCR semi-quantitatif pour StAR après 12 heures d'incubation, avec l'extrait bactérien comme contrôle de purification.

cyclo: cyclophiline; C: contrôle (sans adiponectine recombinante); A: adiponectine 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$; bact: extrait bactérien (6xHIS sans adiponectine).

A)



B)

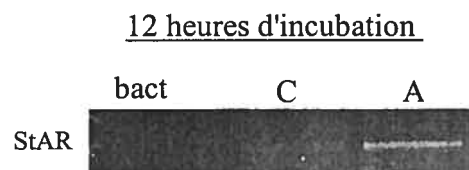
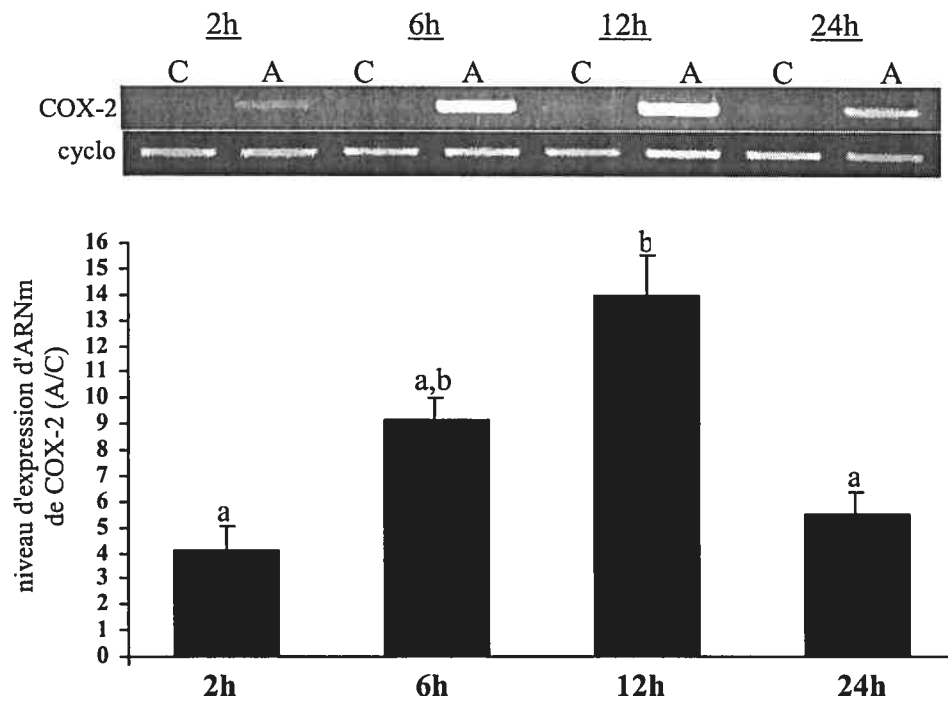


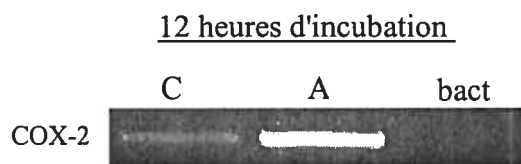
Figure 6. L'adiponectine stimule l'expression de l'ARNm de COX-2 dans les cellules porcines de la granulosa *in vitro*. A) Gel montrant un résultat typique de PCR semi-quantitatif pour COX-2 et représentation graphique des moyennes \pm écarts moyens des résultats de trois cultures. Pour chaque échantillon, des PCR pour COX-2 et pour cyclo ont été effectuées puis le produit de COX-2/cyclo a été (soit C, soit A). À chaque temps indiqué dans le graphique, la barre indique le résultat de A/C. Le traitement à l'adiponectine est significatif à $P < 0,001$. Les lettres minuscules différentes = $P < 0,05$. B) Gel montrant un résultat obtenu par PCR semi-quantitatif pour COX-2 après 12 heures d'incubation avec l'extrait bactérien comme contrôle de purification. C) Immunobuvardage pour COX-2 à partir de protéines totales extraites de cellules de la granulosa suite à 12 heures de culture avec les traitements indiqués. La bande correspondant à COX-2 (74 kDa) est détectée fortement dans les échantillons traités avec l'adiponectine et faiblement dans les échantillons du contrôle et de l'extrait bactérien.

cyclo: cyclophiline; C: contrôle (sans adiponectine recombinante); A: adiponectine 25 $\mu\text{g/mL}$; bact: extrait bactérien (6xHIS sans adiponectine); éch: échelle de poids moléculaires.

A)



B)



C)

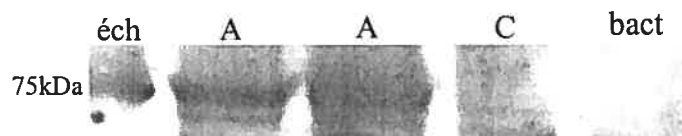
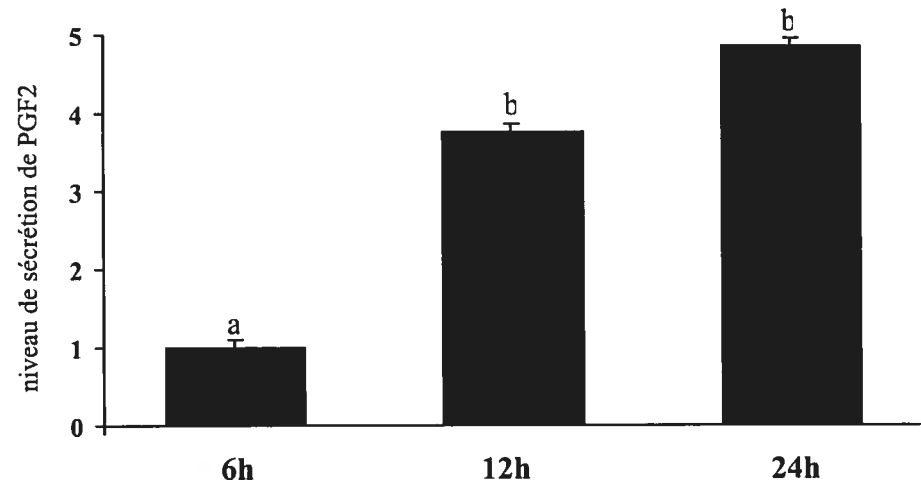


Figure 7. L'adiponectine stimule la sécrétion de $\text{PGF2}\alpha$ et PGE2 par les cellules porcines de la granulosa *in vitro*. A) Représentation graphique des résultats de RIA pour $\text{PGF2}\alpha$. B) Représentation graphique des résultats de EIA pour PGE2 .

À chaque temps indiqué, la barre indique le résultat de A/C (C: contrôle (sans adiponectine recombinante); A: adiponectine 25 $\mu\text{g/mL}$). Le traitement à l'adiponectine est significatif à $P < 0,001$. Les lettres minuscules différentes = $P < 0,05$.

A)



B)

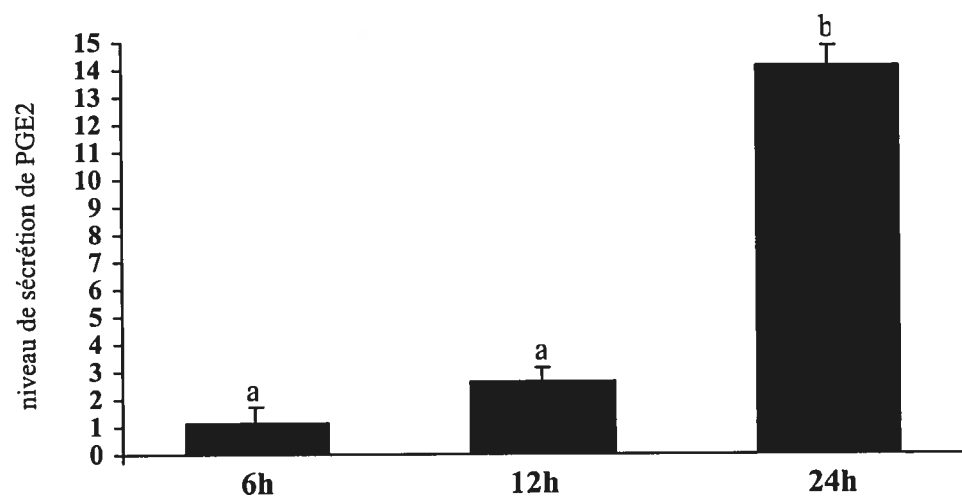
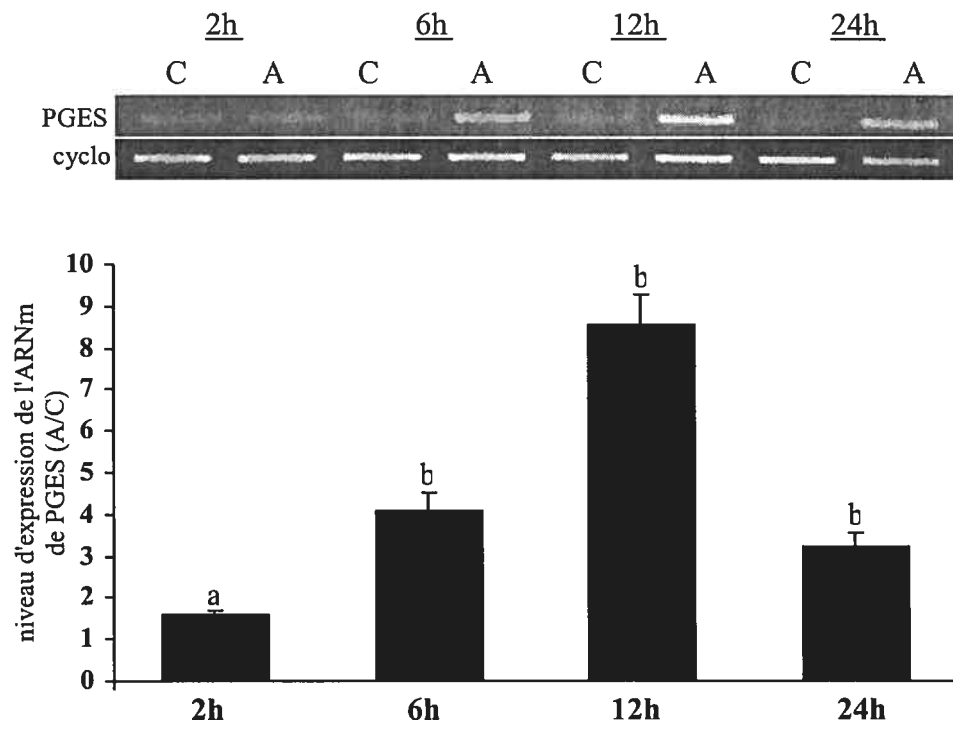


Figure 8. L'adiponectine stimule l'expression de l'ARNm de mPGES-1 dans les cellules porcines de la granulosa *in vitro*. A) Gel d'agarose montrant un résultat typique de PCR semi-quantitatif pour la mPGES-1 et représentation graphique des moyennes \pm écarts moyens des résultats de trois cultures. Pour chaque échantillon, des PCR pour mPGES-1 et pour cyclo ont été effectuées puis le produit de mPGES-1/cyclo a été obtenu (soit A, soit C). À chaque temps indiqué dans le graphique, la barre indique le résultat de A/C. Le traitement à l'adiponectine est significatif à $P < 0,001$. Les lettres minuscules différentes = $P < 0,05$. B) Gel montrant un résultat obtenu par PCR semi-quantitatif pour mPGES-1 après 12 heures d'incubation avec l'extrait bactérien comme contrôle de purification.

cyclo: cyclophiline; C: contrôle (sans adiponectine recombinante); A: adiponectine 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$; bact: extrait bactérien (6xHIS sans adiponectine).

A)



B)

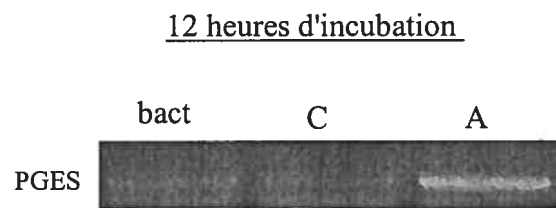
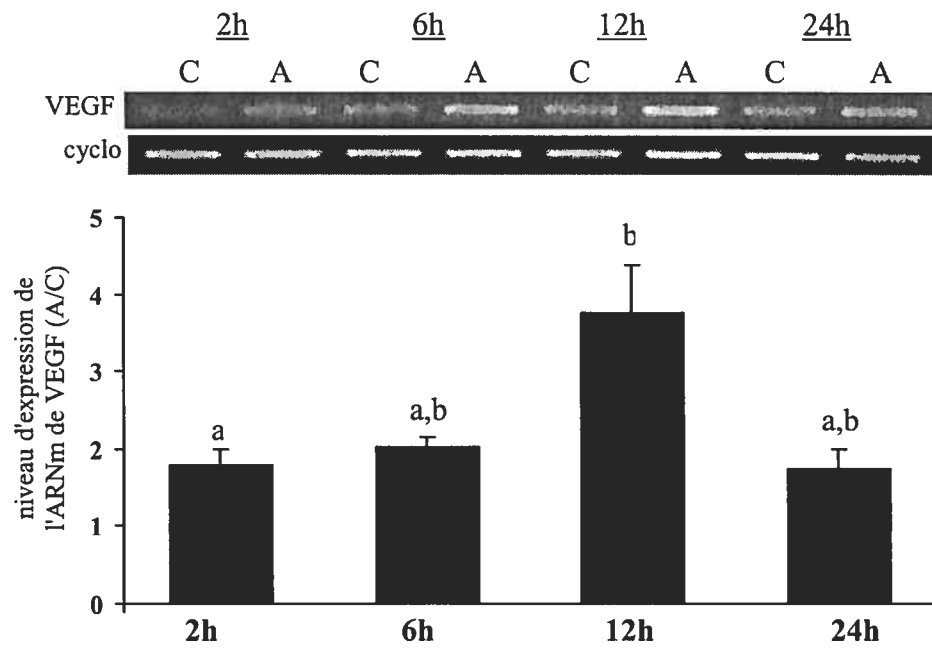


Figure 9. L'adiponectine stimule l'expression de l'ARNm et la sécrétion de VEGF par les cellules porcines de la granulosa *in vitro*. A) Gel d'agarose montrant un résultat typique de PCR semi-quantitatif pour VEGF et représentation graphique des moyennes \pm écarts moyens des résultats de trois cultures. Pour chaque échantillon, des PCR pour VEGF et pour cyclo ont été effectuées puis le produit de VEGF/cyclo a été obtenu (soit C, soit A). Puis, à chaque temps indiqué dans le graphique, la barre indique le résultat de A/C. B) Gel montrant un résultat obtenu par PCR semi-quantitatif pour VEGF après 12 heures d'incubation avec l'extrait bactérien comme contrôle de purification. C) Représentation graphique des résultats de EIA pour VEGF. À chaque temps indiqué, la barre indique le résultat de A/C.

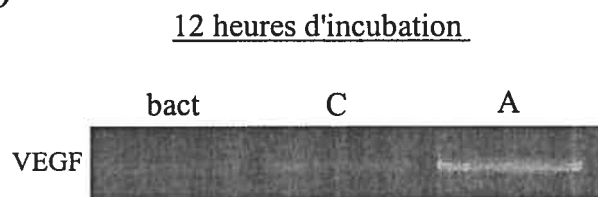
Le traitement à l'adiponectine est significatif à $P < 0,001$. Les lettres minuscules différentes = $P < 0,05$.

cyclo: cyclophilline; C: contrôle (sans adiponectine recombinante); A: adiponectine 25 $\mu\text{g/mL}$; bact: extrait bactérien (6xHIS sans adiponectine).

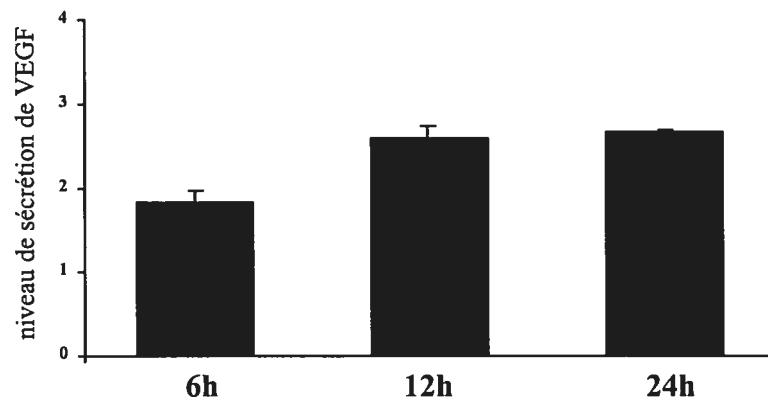
A)



B)



C)



DISCUSSION

Nos résultats montrent pour la première fois un rôle potentiel de l'adiponectine en reproduction. Plus spécifiquement, nous avons clairement observé un effet de l'adiponectine sur les cellules de la granulosa porcines *in vitro*, où elle induit un patron d'expression génétique rappelant celui observé *in vivo* en période pré-ovulatoire lorsque la granulosa se prépare à l'ovulation et à la lutéinisation subséquente, du moins en ce qui concerne les gènes étudiés. Ainsi, l'ensemble des réponses obtenues par la présence de l'adiponectine dans les milieux de cultures, c'est-à-dire la répression de l'expression de l'aromatase, accompagnée de la stimulation de l'expression de StAR, de COX-2, de la mPGES-1, de VEGF, ainsi que la sécrétion de prostaglandines et de VEGF, représente une cascade d'événements se produisant chez plusieurs espèces, culminant en l'expulsion de l'ovocyte (Espéy and Richards 2002; Duffy and Stouffer 2003). Tous ces indices portent à croire que des concentrations physiologiques élevées d'adiponectine favorisent le succès ovulatoire.

L'utilisation dans nos cultures de trois différentes doses dites physiologiques d'adiponectine s'appuyait sur des concentrations sériques rapportées pour l'humain (Arita, Kihara et al. 1999). Il n'est pas impossible que ces valeurs soient différentes chez le porc et de plus amples détails seront nécessaires pour mieux évaluer la pertinence des résultats que nous avons obtenus. De plus il sera intéressant de déterminer la demi-vie de l'adiponectine recombinante que nous produisons. Peut-être pourrions-nous alors expliquer l'effet de l'adiponectine apparemment transitoire sur chacune des cibles étudiées.

La littérature rapporte la présence d'adiponectine sérique circulant sous forme de structures organisées en trimères, en hexamères et en complexes de haut poids moléculaire (Goldstein and Scalia 2004; Wang, Lu et al. 2004). À la Figure 2 (pages 43-4), l'immunobuvardage ne permet de visualiser qu'un monomère et un trimère d'adiponectine. La visualisation de l'adiponectine recombinante ayant été réalisée par migration en conditions dénaturantes, il nous a été impossible de vérifier la présence

d'hexamères ou de complexes de haut poids moléculaire dans notre préparation. Cependant, un groupe de recherche ayant produit une adiponectine recombinante murine dans les mêmes conditions que celles utilisées dans notre laboratoire, rapportent la présence de formes d'organisation complexe des unités de l'adiponectine lorsque la visualisation est effectuée à l'aide d'une séparation en conditions natives (Waki, Yamauchi et al. 2003) c'est-à-dire qui correspond aux formes détectées en circulation. Les trimères, mais non les hexamères ou les complexes de haut poids moléculaire, peuvent activer la voie de l'AMPc, tandis que les hexamères et les complexes de haut poids moléculaire, mais non les trimères, peuvent activer la voie NF- κ B (Tsao, Tomas et al. 2003). Les études sur les différentes formes circulantes permettront probablement de mieux comprendre les moyens de régulation de l'action de l'adiponectine au niveau de différentes cibles, où il se pourrait qu'il y ait une réorganisation des complexes multimériques s'effectuant à la surface cellulaire lors de l'arrimage au récepteur. Récemment, un groupe de recherche a montré que la T-cadhérine était un récepteur des formes hexamériques et de haut poids moléculaires de l'adiponectine (Hug, Wang et al. 2004). Cependant cette liaison n'était possible qu'avec une adiponectine recombinante exprimée à partir d'une source eucaryote, donc les modifications post-traductionnelles semblent importantes pour cette liaison. Ainsi, plusieurs questions devront être étudiées afin de déterminer si les effets de notre adiponectine porcine recombinante sur les cellules de la granulosa sont représentatifs des effets potentiels *in vivo* chez le porc.

Les récepteurs de l'adiponectine ne semblent pas être associés à l'une ou l'autre des protéines G, malgré le fait qu'ils soient constitués des sept domaines transmembranaires (Yamauchi, Kamon et al. 2003). Ils pourraient constituer une nouvelle famille de récepteurs. La liaison de l'adiponectine à ses récepteurs permettait d'activer des molécules de signalisation cellulaire telles que PPAR α , AMPK et p38 MAPK (Yamauchi, Kamon et al. 2003), mais on rapporte aussi l'activation par l'adiponectine des voies PKA (Ouchi, Kihara et al. 2000) et PI3 kinase (Maeda, Shimomura et al. 2002). On n'écarte pas la possibilité que d'autres voies de signalisation pourraient être activées par l'adiponectine. L'élucidation du mode de fonctionnement d'adipoR1 et adipoR2 permettra certainement de répondre à

plusieurs questions quant à la (aux) voie(s) d'action intracellulaire(s) empruntée(s) par l'adiponectine.

Contrairement à la plupart des hormones (Collins, Bolanowski et al. 1989), nous n'avons pas observé d'effet de l'adiponectine sur l'expression de ses récepteurs dans les cultures de cellules de granulosa (Figure 3, pages 45-6). Puisqu' aucune étude ne fait mention d'une variation des niveaux d'adiponectine au cours du cycle oestral et puisque les niveaux sériques d'adiponectine varient peu à court terme, il serait logique de croire que l'apport tissulaire d'adiponectine par la modulation de la vascularisation locale soit à l'origine d'un contrôle de l'action de l'adiponectine sur différentes cibles cellulaires, comme les ovaires. D'ailleurs, on peut s'imaginer que les effets obtenus de l'adiponectine sur l'expression et la sécrétion de VEGF (Figure 9, pages 57-8) soient à l'origine d'une régulation de l'apport d'adiponectine vers la couche granulosa, par la perméabilisation du réseau vasculaire local.

Dans cet ordre d'idée, l'effet de l'adiponectine sur l'expression de VEGF est des plus intéressants. Cet effet se répercutera sûrement à plusieurs autres niveaux du système reproducteur. Déjà, on connaît les effets bénéfiques de l'adiponectine dans les problèmes vasculaires associés à l'obésité (Ouchi, Kihara et al. 1999; Okamoto, Arita et al. 2000; Kubota, Terauchi et al. 2002; Matsuda, Shimomura et al. 2002). Cela pourrait être dû à un effet de l'adiponectine sur VEGF directement ou indirectement, tel que suggéré par nos résultats. Il a été démontré que VEGF est exprimé dans tous les tissus reproducteurs où se fait l'acquisition de nouveaux réseaux de vaisseaux capillaires, comme les tissus stéroïdiens (Shweiki, Itin et al. 1993) et que cette expression est régulée de façon hormonale (Laitinen, Ristimaki et al. 1997). L'expression des récepteurs de l'adiponectine dans l'utérus et le placenta, deux tissus connus pour leur expression de VEGF (Sharkey, Charnock-Jones et al. 1993; Li, Gregory et al. 1994), attirera d'avantage d'attention sur nos résultats. Plusieurs groupes de recherche se penchent d'ailleurs sur le rôle de VEGF dans la vascularisation liée à l'implantation chez les mammifères (Charnock-Jones, Sharkey et al. 1993; Chakraborty, Das et al. 1995; Yi, Jiang et al. 1999; Halder, Zhao et al. 2000; Lopes, Desmarais et al. 2003).

Il a été suggéré que la PGE₂, produit des activités de COX-2 et de la synthétase de PGE, est un stimulateur de l'expression de VEGF (Ben-Av, Crofford et al. 1995). Ici encore, nos résultats montrent l'expression simultanée de COX-2, de la mPGES-1, accompagnée d'une importante production de PGE₂ par les granulosa en présence de l'adiponectine. L'ensemble des résultats démontrent plus évidemment le rôle de l'adiponectine dans plusieurs fonctions essentielles à l'ovulation.

L'impact de l'action de l'adiponectine sur l'expression de COX-2 sera alors vraisemblablement des plus importants. En effet, les multiples rôles de COX-2 dans la plupart des aspects de la reproduction est mis en évidence chez les souris dont COX-2 est inactivé (Lim, Paria et al. 1997). Seulement au niveau ovarien, l'ovulation ne peut s'effectuer sans l'action de COX-2. Ainsi, la stimulation de l'expression de COX-2 par l'adiponectine dans les cellules granulosa et la sécrétion d'une importante quantité de PGE₂, mais aussi de PFG₂ α pourraient avoir plusieurs implications physiologiques importantes. Par exemple, ce phénomène pourrait servir à expliquer en partie les problèmes ovulatoires rencontrés lors d'un excès de masse adipeuse abdominale, où les niveaux d'adiponectine sont réduits. L'expression de COX-2 est essentielle à l'implantation pour la stimulation de l'angiogénèse (Chakraborty, Das et al. 1996). La présence de récepteurs de l'adiponectine au niveau utérin chez le porc (Lord, Ledoux et al. 2005) mènera sans doute les recherches vers l'étude du rôle de l'adiponectine sur l'expression de COX-2 et la production de prostaglandines à ce niveau.

Il sera toutefois important de déterminer si l'adiponectine agit directement sur chacune des cibles étudiées ou indirectement en déclenchant une cascade d'événements menant à leur activation/répression. La voie de signalisation activée pourrait être spécifique à chaque type cellulaire, ou même varier pour un même type cellulaire selon les conditions biochimiques existantes au moment de l'activation. Ceci pourrait être le phénomène se produisant dans le cas de l'activation de COX-2 par l'adiponectine. Dans notre système de culture, l'adiponectine stimulait l'expression de COX-2 dans les cellules folliculaires, mais également dans les

cellules lutéinisées *in vitro* (résultats préliminaires, non montrés). Le promoteur de COX-2 contient plusieurs éléments *cis* caractéristiques des gènes à réponse précoce (Tanabe and Tohnai 2002). L'induction rapide de l'expression de COX-2 observée *in vitro* dans les granulosa traitées à l'adiponectine est donc plausible. Dans les cellules de granulosa pré-ovulatoires, plusieurs activateurs de la voie PKA (gonadotropines, GnRH) pouvaient stimuler l'expression de COX-2 (Wong, DeWitt et al. 1989; Wong and Richards 1992). Cependant, l'activation de COX-2 par la voie PKA dans les granulosa pré-ovulatoires semble faire une transition pour la voie PKC dans les cellules lutéales (Wu and Wiltbank 2001; Wu and Wiltbank 2002). L'une ou l'autre de ces voies pourrait mener à l'activation de COX-2 par l'adiponectine, dans différentes conditions de culture.

De la même façon, l'expression de l'ARNm de l'aromatase est induite par la FSH dans les granulosa de follicules pré-ovulatoires, mais est rapidement réprimée par le pic ovulatoire de LH (Fitzpatrick, Carlone et al. 1997). Ces auteurs ont démontré que les voies PKC et PKA sont responsables de la répression de l'expression de l'aromatase par la LH. Par contre, la voie PKC est associée à l'inhibition de l'expression de StAR dans les granulosa de follicules en développement (Pescador, Houde et al. 1997) et il est accepté que la voie PKA est responsable de l'expression de StAR (Miller and Strauss 1999).

L'expression de la synthétase de PGE est généralement associée à l'expression de COX-2 (Forsberg, Leeb et al. 2000). Cependant peu d'information est disponible quant à la régulation spécifique de la PGES. Une portion du promoteur de la forme inductible de PGES a été brièvement décrite et semble contenir des éléments *cis* qui pourraient réguler son expression, telles que des boîtes barbie (éléments de réponse aux barbituriques) et un élément AHR, souvent rencontré dans les gènes de la phase I de détoxification, comme ceux de la famille du cytochrome P450 (Forsberg, Leeb et al. 2000). Cependant, on ne décrit pas d'élément potentiel qui pourrait établir une relation avec l'expression jumelée de PGES et de COX-2.

On retrouve plusieurs éléments de transcription dans le promoteur de VEGF, soit des sites de liaison pour Sp1, AP-1 et AP-2 (Tischer, Mitchell et al. 1991) et NF-kappaB (Chilov, Kukk et al. 1997). Une étude a montré l'activation du promoteur de VEGF par la forskoline (activateur de l'adénylate cyclase), c'est-à-dire par la voie PKA (Garrido, Saule et al. 1993) et l'induction de VEGF par la LH a également été montrée (Stouffer, Martinez-Chequer et al. 2001; Duffy and Stouffer 2003).

Chacune de ces voies est potentiellement activée par l'adiponectine, et les études à venir permettront sans doute de déterminer comment l'adiponectine exerce ses actions sur ses différentes cibles. La possibilité d'activation d'une seule voie de signalisation par l'adiponectine dans les granulosa semble invraisemblable pour expliquer les multiples effets observés ici, sans compter les nombreux effets potentiels encore inconnus. Il faudra aussi prendre en considération que des changements de l'environnement biochimique, créés par l'adiponectine dans ces cellules, peuvent affecter l'expression de certains des gènes.

Les effets de l'adiponectine sur les cellules de granulosa observés jusqu'à présent ressemblent fortement à ceux induits par le pic ovulatoire de la LH (Fitzpatrick, Carlone et al. 1997). La voie de PKA sera donc une voie intéressante pour débiter ces investigations.

Le rôle de l'adiponectine sur la fertilité pourrait toutefois être indirect, par exemple en jouant sur l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadal. Il est probable que l'adiponectine puisse agir directement et/ou indirectement sur le générateur de pulsions de la GnRH pour moduler la fertilité. En effet, il a déjà été démontré que l'adiponectine agit au niveau du cerveau (Qi, Takahashi et al. 2004) et les récepteurs de l'adiponectine y ont été détectés chez l'humain, la souris et le porc (Yamauchi, Kamon et al. 2003; Lord, Ledoux et al. 2005). Chez les souris surexprimant l'adiponectine, les niveaux de prolactine étaient anormalement élevés, et les femelles étaient infertiles (Combs, Pajvani et al. 2004). Or, les hyperprolactinémies sont couramment à l'origine de problèmes d'infertilité chez la femme, entre autres en causant des perturbations du générateur de pulsions de la GnRH (Wuttke, Pitzel et al. 2001). Il a également été

observé que la prolactine inhibe la sécrétion de l'adiponectine (Combs, Berg et al. 2003). Ainsi, comme chez les souris, des perturbations de la sécrétion de GnRH pourraient être amenées par des niveaux anormaux d'adiponectine, entre autres en provoquant un dérèglement de la sécrétion de prolactine destinée à contrôler à son tour la sécrétion d'adiponectine par le tissu adipeux. Ceci permettrait d'expliquer les problèmes liés tant à des concentrations élevées d'adiponectine (anorexie, athlètes, truies maigres) qu'à des concentrations réduites (obésité, PCOS).

La localisation exacte des récepteurs de l'adiponectine dans les différentes régions du cerveau permettra de mieux examiner cette question. On peut déjà prédire une expression d'au moins un des récepteurs de l'adiponectine au niveau du noyau paraventriculaire (PVN) dans l'hypothalamus, puisque des injections d'adiponectine provoquaient une stimulation de l'immuno-coloration de Fos dans le PVN (Qi, Takahashi et al. 2004). L'expression de Fos est associée à une activité neuronale et est utilisée pour caractériser des populations de neurones activés par une variété de facteurs. Aussi, on a déjà montré que la disponibilité des nutriments énergétiques métaboliques par les modifications alimentaires affectaient l'expression de Fos sur les neurones exprimant la GnRH dans le PVN (Berriman, Wade et al. 1992).

CONCLUSION

L'information présentée par nos résultats causera certainement un impact majeur dans le domaine de la recherche en reproduction, entre autres sur l'étude des problèmes de fertilité associés à la condition corporelle. Par exemple, l'adiposité abdominale est associée au syndrome d'infertilité le plus courant chez la femme, le syndrome de l'ovaire polykystique (polycystic ovary syndrome, PCOS). Les femmes atteintes de ce syndrome souffrent d'hyperandrogénisme hyperinsulinémique accompagné d'anovulation. Aucune corrélation directe n'a été établie entre ce syndrome et l'adiponectine, mais il a été suggéré que l'implication de l'adiponectine serait dans l'interaction avec l'action et la production des stéroïdes (Panidis, Kourtis et al. 2004). Nous pouvons en partie valider cette observation, puisque nous avons montré que l'adiponectine peut affecter l'expression de deux facteurs clés de la stéroïdogénèse, l'aromatase et StAR. Plusieurs groupes ont déjà abordé la question de l'effet des stéroïdes sur la production d'adiponectine. Entre autres, on a montré que les estrogènes (Combs, Berg et al. 2003), les androgènes (Nishizawa, Shimomura et al. 2002) et la testostérone (Lanfranco, Zitzmann et al. 2004) pouvaient inhiber la sécrétion de l'adiponectine des adipocytes. L'étude d'une boucle de rétrocontrôle entre la production et l'action de stéroïdes par l'adiponectine, et l'inhibition subséquente de la sécrétion d'adiponectine par ces stéroïdes est donc à envisager.

En production porcine, l'objectif est la rentabilité, où il est souhaitable que les truies atteignent la puberté, deviennent gestantes et rejoignent le groupe des autres truies le plus tôt possible, qu'elles soient en mesure de produire des portées de nombreux porcelets viables et que leur prolificité soit de longue durée et efficace. Les résultats présentés dans cet ouvrage montrent un lien étroit entre un facteur adipeux et les fonctions ovariennes chez la truie. Ils ouvrent la porte sur des études grandissantes traitant de l'importance de facteurs adipeux sur les performances de production et de reproduction. En effet, ils clarifient un peu plus la corrélation observée entre fertilité et adiposité.

PERSPECTIVES

Notre étude ouvre une avenue nouvelle dans le domaine de la recherche reliant les facteurs adipeux aux fonctions reproductrices. L'adiponectine s'ajoute à une liste grandissante d'adipokines exerçant leurs fonctions sur l'axe adipo-reproducteur, et l'observation d'effets de l'adiponectine en reproduction accroît la liste déjà exhaustive de ses rôles dans tout l'organisme.

Notre étude est très descriptive et nécessitera l'élucidation des mécanismes rattachés à chacun des effets de l'adiponectine observés jusqu'à maintenant sur les fonctions ovariennes. Ceci pourra être accompli par l'étude des voies de signalisation activées/inhibées par l'adiponectine, dans diverses conditions et ce pour ses différentes cibles. Dans un futur proche, ces études seront faites par le biais de cultures de cellules *in vitro* où des inhibiteurs de voies métaboliques (PKA, PKC, etc.) seront ajoutés aux traitements d'adiponectine dans les milieux. Ainsi, nous pourrions comparer ces effets à ceux déjà observés sur les cibles identifiées jusqu'à présent et nous fournir des indices quant au(x) mécanisme(s) d'action de l'adiponectine. De plus, l'étude des interactions entre l'adiponectine et de multiples facteurs importants à l'ovulation comme l'insuline, les gonadotropines et le TNF α est envisagée.

Il sera certainement intéressant d'élaborer sur les rôles que l'adiponectine exerce à travers le cycle oestral, ainsi que sur les modes de régulation de ces actions. À cet effet, la néovascularisation et la perméabilité vasculaire sont des phénomènes sur lesquels il faudra se pencher. En parallèle, une étude approfondie de l'expression des récepteurs de l'adiponectine sera à considérer puisque les données que nous avons présentées ne sont que très préliminaires. L'immunohistochimie et l'hybridation *in situ* sur des coupes histologiques d'ovaires ou sur des préparations de cellules en culture seraient des techniques de choix pour ce faire. De nouvelles cibles de l'adiponectine pourraient être identifiées par l'utilisation de technologies comme les micropuces à ADN. Une multitude de gènes potentiellement affectés restent encore à

être caractérisée et une approche comme celle utilisée dans notre étude ne permet pas d'explorer toutes les possibilités.

Il sera impératif de déterminer l'étendue des concentrations physiologiques circulantes de l'adiponectine chez le porc. Les trousseaux commerciaux de dosage d'adiponectine sont incapables de reconnaître l'adiponectine porcine. À l'aide de l'adiponectine porcine recombinante et de l'anticorps anti-adiponectine décrits dans cet ouvrage, un essai immunologique maison pourrait être mis au point. En établissant une courbe de concentrations d'adiponectine connues à l'aide de l'adiponectine recombinante (courbe standard), il serait alors possible d'obtenir des valeurs de concentrations d'adiponectine plasmatiques à partir d'échantillons sanguins prélevés sur des porcs.

À plus grande échelle, le rôle de l'adiponectine devra être exploré au niveau de la maturation de l'ovocyte, la fertilisation, l'implantation, la gestation, les développements embryonnaire et placentaire, et l'axe hypothalamo-hypophysaire. Les études *in vivo* seront importantes et devront tenir compte des différentes espèces animales et des différences entre les races, comme chez le porc.

Il est vraisemblable que l'on déterminera de nombreux rôles de l'adiponectine dans la plupart des organes et systèmes reproducteurs. Un indice nous provient des souris surexprimant l'adiponectine. Des niveaux anormalement élevés d'adiponectine amenaient les femelles à être infertiles. Ceci pourrait être un lien potentiel qui relie les truies plus maigres à une fertilité réduite par rapport aux truies plus grasses. De plus amples détails seront nécessaires pour élaborer sur cette question.

En somme, notre compréhension de l'importance de l'adiposité sur la fertilité mérite d'être élargie. Notre étude du rôle de l'adiponectine sur la fonction ovarienne servira sans doute à mieux expliquer comment le gras est lié à la fertilité, notamment pour la prolificité chez la truie.

BIBLIOGRAPHIE

- Abdel-Majid, R.M. and J.S. Marshall (2004) "Prostaglandin E2 induces degranulation-independent production of vascular endothelial growth factor by human mast cells." J Immunol **172** (2):1227-36.
- Aherne, F. X. and R. N. Kirkwood (1985). "Nutrition and sow prolificacy." J Reprod Fertil Suppl **33**: 169-83.
- Ainsworth, L., B. K. Tsang, et al. (1990). "The synthesis and actions of steroids and prostaglandins during follicular maturation in the pig." J Reprod Fertil Suppl **40**: 137-50.
- American Psychiatric Association (1994). Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. Washington, DC, American Psychiatric Association.
- Arita, Y., S. Kihara, et al. (1999). "Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity." Biochem Biophys Res Commun **257**(1): 79-83.
- Baker, E. R. (1981). "Menstrual dysfunction and hormonal status in athletic women: a review." Fertil Steril **36**(6): 691-6.
- Balen, A. (2004). "The pathophysiology of polycystic ovary syndrome: trying to understand PCOS and its endocrinology." Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol **18**(5): 685-706.
- Balen, A. H., J. S. Laven, et al. (2003). "Ultrasound assessment of the polycystic ovary: international consensus definitions." Hum Reprod Update **9**(6): 505-14.
- Barash, I. A., C. C. Cheung, et al. (1996). "Leptin is a metabolic signal to the reproductive system." Endocrinology **137**(7): 3144-7.
- Barb, C.R. (1999) "The brain-pituitary-adipocyte axis: role of leptin in modulating neuroendocrine function." J Anim Sci **77** (5):1249-57.
- Barb, C. R., Barrett J.B., R.R. Kraeling and G.B. Rampacek (1999). "Role of leptin in modulating neuroendocrine function: a metabolic link between the brain - pituitary and adipose tissue." Reprod Dom Anim **34**: 111–125.

- Barb, C.R., R.R. Kraeling, et al. (2002) "Metabolic regulation of the neuroendocrine axis in pigs." Reprod Suppl **59**: 203-17.
- Barboni, B., M. Turriani, et al. (2000). "Vascular endothelial growth factor production in growing pig antral follicles." Biol Reprod **63**(3): 858-64.
- Ben-Av, P., L. J. Crofford, et al. (1995). "Induction of vascular endothelial growth factor expression in synovial fibroblasts by prostaglandin E and interleukin-1: a potential mechanism for inflammatory angiogenesis." FEBS Lett **372**(1): 83-7.
- Berg, A. H., T. P. Combs, et al. (2001). "The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action." Nat Med **7**(8): 947-53.
- Berriman, S. J., G. N. Wade, et al. (1992). "Expression of Fos-like proteins in gonadotropin-releasing hormone neurons of Syrian hamsters: effects of estrous cycles and metabolic fuels." Endocrinology **131**(5): 2222-8.
- Bongain, A., V. Isnard, et al. (1998). "Obesity in obstetrics and gynaecology." Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol **77**(2): 217-28.
- Boocock, C. A., D. S. Charnock-Jones, et al. (1995). "Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors flt and KDR in ovarian carcinoma." J Natl Cancer Inst **87**(7): 506-16.
- Bray, G. A. (1997). "Obesity and reproduction." Hum Reprod **12 Suppl 1**: 26-32.
- Bringer, J., B. Hedon, et al. (1990). "[Influence of abnormal weight and imbalanced diet on female fertility]." Presse Med **19**(31): 1456-9.
- Canello, R., A. Tounian, et al. (2004). "Adiposity signals, genetic and body weight regulation in humans." Diabetes Metab **30**(3): 215-27.
- Caprio, M., E. Fabbrini, et al. (2001). "Leptin in reproduction." Trends Endocrinol Metab **12**(2): 65-72.
- Carswell, E. A., L. J. Old, et al. (1975). "An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors." Proc Natl Acad Sci U S A **72**(9): 3666-70.
- Chakraborty, I., S. K. Das, et al. (1995). "Differential expression of vascular endothelial growth factor and its receptor mRNAs in the mouse uterus around the time of implantation." J Endocrinol **147**(2): 339-52.
- Chakraborty, I., S. K. Das, et al. (1996). "Developmental expression of the cyclo-oxygenase-1 and cyclo-oxygenase-2 genes in the peri-implantation mouse

- uterus and their differential regulation by the blastocyst and ovarian steroids." J Mol Endocrinol **16**(2): 107-22.
- Chandran, M., S. A. Phillips, et al. (2003). "Adiponectin: more than just another fat cell hormone?" Diabetes Care **26**(8): 2442-50.
- Charnock-Jones, D. S., A. M. Sharkey, et al. (1993). "Identification and localization of alternately spliced mRNAs for vascular endothelial growth factor in human uterus and estrogen regulation in endometrial carcinoma cell lines." Biol Reprod **48**(5): 1120-8.
- Chilov, D., E. Kukk, et al. (1997). "Genomic organization of human and mouse genes for vascular endothelial growth factor C." J Biol Chem **272**(40): 25176-83.
- Clowes, E. J., F. X. Aherne, et al. (2003). "Parturition body size and body protein loss during lactation influence performance during lactation and ovarian function at weaning in first-parity sows." J Anim Sci **81**(6): 1517-28.
- Collins, S., M. A. Bolanowski, et al. (1989). "Genetic regulation of beta-adrenergic receptors." Annu Rev Physiol **51**: 203-15.
- Combs, T. P., A. H. Berg, et al. (2003). "Sexual differentiation, pregnancy, calorie restriction, and aging affect the adipocyte-specific secretory protein adiponectin." Diabetes **52**(2): 268-76.
- Combs, T. P., U. B. Pajvani, et al. (2004). "A transgenic mouse with a deletion in the collagenous domain of adiponectin displays elevated circulating adiponectin and improved insulin sensitivity." Endocrinology **145**(1): 367-83.
- Conley, A. J., H. J. Howard, et al. (1994). "Steroidogenesis in the preovulatory porcine follicle." Biol Reprod **51**(4): 655-61.
- Conn, P. M. and W. F. Crowley, Jr. (1994). "Gonadotropin-releasing hormone and its analogs." Annu Rev Med **45**: 391-405.
- Corcos, M., O. Guilbaud, et al. (2003). "Involvement of cytokines in eating disorders: a critical review of the human literature." Psychoneuroendocrinology **28**(3): 229-49.
- Davis, B. J., D. E. Lennard, et al. (1999). "Anovulation in cyclooxygenase-2-deficient mice is restored by prostaglandin E2 and interleukin-1beta." Endocrinology **140**(6): 2685-95.

- Ding, S. T., B. H. Liu, et al. (2004). "Cloning and expression of porcine adiponectin and adiponectin receptor 1 and 2 genes in pigs." J Anim Sci **82**(11): 3162-74.
- Dizdar, O. and E. Alyamac (2004). "Obesity: an endocrine tumor?" Med Hypotheses **63**(5): 790-2.
- Doldi, N., M. Bassan, et al. (1996). "Vascular endothelial growth factor messenger ribonucleic acid expression in human ovarian and endometrial cancer." Gynecol Endocrinol **10**(6): 375-82.
- Duffy, D. M. and R. L. Stouffer (2003). "Luteinizing hormone acts directly at granulosa cells to stimulate periovulatory processes: modulation of luteinizing hormone effects by prostaglandins." Endocrine **22**(3): 249-56.
- Duggal, P. S., K. H. Van Der Hoek, et al. (2000). "The in vivo and in vitro effects of exogenous leptin on ovulation in the rat." Endocrinology **141**(6): 1971-6.
- Einarsson, S. and T. Rojkittikhun (1993). "Effects of nutrition on pregnant and lactating sows." J Reprod Fertil Suppl **48**: 229-39.
- Einspanier, A., H. Jarry, et al. (1991). "Determination of secretion rates of estradiol, progesterone, oxytocin, and angiotensin II from tertiary follicles and freshly formed corpora lutea in freely moving sows." Endocrinology **129**(6): 3403-9.
- Eissen, J. J., E. J. Apeldoorn, et al. (2003). "The importance of a high feed intake during lactation of primiparous sows nursing large litters." J Anim Sci **81**(3): 594-603.
- Espey, L. L. and J. S. Richards (2002). "Temporal and spatial patterns of ovarian gene transcription following an ovulatory dose of gonadotropin in the rat." Biol Reprod **67**(6): 1662-70.
- Evans, G., M. Dobias, et al. (1983). "Production of prostaglandins by porcine preovulatory follicular tissues and their roles in intrafollicular function." Biol Reprod **28**(2): 322-8.
- Fasshauer, M., J. Klein, et al. (2002). "Hormonal regulation of adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes." Biochem Biophys Res Commun **290**(3): 1084-9.
- Fitzpatrick, S. L., D. L. Carlone, et al. (1997). "Expression of aromatase in the ovary: down-regulation of mRNA by the ovulatory luteinizing hormone surge." Steroids **62**(1): 197-206.

- Flowers, B., M.J. Martin, et al. (1989) "Endocrine changes associated with dietary induced increase in ovulation rate (flushing) in gilts." J Anim Sci **67**: 771-778.
- Ford, S. P. and L. K. Christenson (1991). "Direct effects of oestradiol-17 beta and prostaglandin E-2 in protecting pig corpora lutea from a luteolytic dose of prostaglandin F-2 alpha." J Reprod Fertil **93**(1): 203-9.
- Forsberg, L., L. Leeb, et al. (2000). "Human glutathione dependent prostaglandin E synthase: gene structure and regulation." FEBS Lett **471**(1): 78-82.
- Foxcroft, G. R. and M. G. Hunter (1985). "Basic physiology of follicular maturation in the pig." J Reprod Fertil Suppl **33**: 1-19.
- Frisch, R. E. (1987). "Body fat, menarche, fitness and fertility." Hum Reprod **2**(6): 521-33.
- Fruebis, J., T. S. Tsao, et al. (2001). "Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(4): 2005-10.
- Gadsby, J. E., R. B. Heap, et al. (1980). "Oestrogen production by blastocyst and early embryonic tissue of various species." J Reprod Fertil **60**(2): 409-17.
- Galeati, G., M. Spinaci, et al. (2003). "Stimulatory effects of fasting on vascular endothelial growth factor (VEGF) production by growing pig ovarian follicles." Reproduction **126**(5): 647-52.
- Garrido, C., S. Saule, et al. (1993). "Transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor gene expression in ovarian bovine granulosa cells." Growth Factors **8**(2): 109-17.
- Gaughan, J.B., R.D. Cameron, et al. (1997) "Effect of body composition at selection on reproductive development in large white gilts." J Anim Sci **75** (7):1764-72.
- Gimeno, M. F., A. M. Franchi, et al. (1985). "Sow (*Sus scrofa*) follicular fluid: prostaglandin content and effect on the motility of isolated oviducts." Prostaglandins **29**(5): 831-46.
- Goldstein, B. J. and R. Scalia (2004). "Adiponectin: A novel adipokine linking adipocytes and vascular function." J Clin Endocrinol Metab **89**(6): 2563-8.
- Gregoraszczyk, E. L. (1994). "Is progesterone a modulator of luteal steroidogenesis in pig? A tissue culture approach." Folia Histochem Cytobiol **32**(1): 31-3.

- Gregoraszcuk, E. L. and N. Michas (1999). "Progesterone and estradiol secretion by porcine luteal cells is influenced by individual and combined treatment with prostaglandins E2 and F2alpha throughout the estrus cycle." Prostaglandins Other Lipid Mediat **57**(4): 231-41.
- Grinwich, D. L., T. G. Kennedy, et al. (1972). "Dissociation of ovulatory and steroidogenic actions of luteinizing hormone in rabbits with indomethacin, an inhibitor of prostaglandin biosynthesis." Prostaglandins **1**(2): 89-96.
- Halder, J. B., X. Zhao, et al. (2000). "Differential expression of VEGF isoforms and VEGF(164)-specific receptor neuropilin-1 in the mouse uterus suggests a role for VEGF(164) in vascular permeability and angiogenesis during implantation." Genesis **26**(3): 213-24.
- Hart, R., M. Hickey, et al. (2004). "Definitions, prevalence and symptoms of polycystic ovaries and polycystic ovary syndrome." Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol **18**(5): 671-83.
- Hausman, D. B., M. DiGirolamo, et al. (2001). "The biology of white adipocyte proliferation." Obes Rev **2**(4): 239-54.
- Heilbronn, L. K., S. R. Smith, et al. (2003). "The insulin-sensitizing role of the fat derived hormone adiponectin." Curr Pharm Des **9**(17): 1411-8.
- Hickey, G. J., S. A. Chen, et al. (1988). "Hormonal regulation, tissue distribution, and content of aromatase cytochrome P450 messenger ribonucleic acid and enzyme in rat ovarian follicles and corpora lutea: relationship to estradiol biosynthesis." Endocrinology **122**(4): 1426-36.
- Holcomb, I. N., R. C. Kabakoff, et al. (2000). "FIZZ1, a novel cysteine-rich secreted protein associated with pulmonary inflammation, defines a new gene family." Embo J **19**(15): 4046-55.
- Hotamisligil, G. S., P. Arner, et al. (1995). "Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance." J Clin Invest **95**(5): 2409-15.
- Hotamisligil, G. S., N. S. Shargill, et al. (1993). "Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance." Science **259**(5091): 87-91.

- Hoyt, K. L. and M. C. Schmidt (2004). "Polycystic ovary (Stein-Leventhal) syndrome: etiology, complications, and treatment." Clin Lab Sci **17**(3): 155-63.
- Hu, E., P. Liang, et al. (1996). "AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity." J Biol Chem **271**(18): 10697-703.
- Hug, C., J. Wang, et al. (2004). "T-cadherin is a receptor for hexameric and high-molecular-weight forms of Acrp30/adiponectin." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(28): 10308-13.
- Hunter, M. G., N. Hudson, et al. (2004). "Resumption of follicle growth in gilts after ovarian autografting." Anim Reprod Sci **80**(3-4): 317-28.
- Hunter, M.G., R.S. Robinson, et al. (2004) "Endocrine and paracrine control of follicular development and ovulation rate in farm species." Anim Reprod Sci **82-83**: 461-77.
- Hunter, R. H. and N. L. Poyser (1985). "Ovarian follicular fluid concentrations of prostaglandins E2, F2 alpha and I2 during the pre-ovulatory period in pigs." Reprod Nutr Dev **25**(5): 909-17.
- Jacobi, S. K., K. M. Ajuwon, et al. (2004). "Cloning and expression of porcine adiponectin, and its relationship to adiposity, lipogenesis and the acute phase response." J Endocrinol **182**(1): 133-44.
- Johnson, A. L., E. V. Solovieva, et al. (2002). "Relationship between steroidogenic acute regulatory protein expression and progesterone production in hen granulosa cells during follicle development." Biol Reprod **67**(4): 1313-20.
- Kaku, M., N. Mori, et al. (1969). "[Disturbance of sexual function and the adipose tissue in obese women]." Sanfujinka No Jissai **18**(3): 212-8.
- Kappes, A. and G. Loffler (2000). "Influences of ionomycin, dibutyryl-cycloAMP and tumour necrosis factor-alpha on intracellular amount and secretion of apM1 in differentiating primary human preadipocytes." Horm Metab Res **32**(11-12): 548-54.
- Karaer, O., S. Oruc, et al. (2004). "Aromatase inhibitors: possible future applications." Acta Obstet Gynecol Scand **83**(8): 699-706.
- Klindt, J., J.T. Yen, et al. (2001) "Level of dietary energy during prepubertal growth and reproductive development of gilts." J Anim Sci **79** (10):2513-23.

- Knox, R. V., G. Vatzias, et al. (2003). "Plasma gonadotropins and ovarian hormones during the estrous cycle in high compared to low ovulation rate gilts." J Anim Sci **81**(1): 249-60.
- Koos, R. D. (1995). "Increased expression of vascular endothelial growth/permeability factor in the rat ovary following an ovulatory gonadotropin stimulus: potential roles in follicle rupture." Biol Reprod **52**(6): 1426-35.
- Kubota, N., Y. Terauchi, et al. (2002). "Disruption of adiponectin causes insulin resistance and neointimal formation." J Biol Chem **277**(29): 25863-6.
- Kubota, T., S. Kamada, et al. (1994) "Autocrine/paracrine function of transforming growth factor-beta 1 in porcine granulosa cells." Hum Reprod **9** (11):2118-22.
- Laitinen, M., A. Ristimäki, et al. (1997). "Differential hormonal regulation of vascular endothelial growth factors VEGF, VEGF-B, and VEGF-C messenger ribonucleic acid levels in cultured human granulosa-luteal cells." Endocrinology **138**(11): 4748-56.
- Lajoie, S., J. Sirois, et al. (2002). "Induction of Cyclo-oxygenase-2 Expression in Naturally Occurring Gastric Ulcers." J Histochem Cytochem **50**: 923-934.
- Lanfranco, F., M. Zitzmann, et al. (2004). "Serum adiponectin levels in hypogonadal males: influence of testosterone replacement therapy." Clin Endocrinol (Oxf) **60**(4): 500-7.
- LaVoie, H. A., A. M. Benoit, et al. (1997). "Coordinate developmental expression of genes regulating sterol economy and cholesterol side-chain cleavage in the porcine ovary." Biol Reprod **57**(2): 402-7.
- Li, X. F., J. Gregory, et al. (1994). "Immunolocalisation of vascular endothelial growth factor in human endometrium." Growth Factors **11**(4): 277-82.
- Lim, H., B. C. Paria, et al. (1997). "Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice." Cell **91**(2): 197-208.
- Lin, J., C. R. Barb, et al. (2000). "Long form leptin receptor mRNA expression in the brain, pituitary, and other tissues in the pig." Domest Anim Endocrinol **19**(1): 53-61.
- Locksley, R. M., N. Killeen, et al. (2001). "The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology." Cell **104**(4): 487-501.

- Lopes, F. L., J. Desmarais, et al. (2003). "Expression of vascular endothelial growth factor isoforms and receptors Flt-1 and KDR during the peri-implantation period in the mink, *Mustela vison*." Biol Reprod **68**(5): 1926-33.
- Lord, E., S. Ledoux, et al. (2005). "Expression of adiponectin and its receptors in swine." Journal of Animal Science **accepted pour publication**.
- Lucy, M. C., J. Liu, et al. (2001). "Ovarian follicular growth in sows." Reprod Suppl **58**: 31-45.
- Maeda, K., K. Okubo, et al. (1996). "cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1)." Biochem Biophys Res Commun **221**(2): 286-9.
- Maeda, N., I. Shimomura, et al. (2002). "Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30." Nat Med **8**(7): 731-7.
- Matsuda, M., I. Shimomura, et al. (2002). "Role of adiponectin in preventing vascular stenosis. The missing link of adipo-vascular axis." J Biol Chem **277**(40): 37487-91.
- Mattem, J., G. Stammer, et al. (1997). "Association of vascular endothelial growth factor expression with tumor cell proliferation in ovarian carcinoma." Anticancer Res **17**(1B): 621-4.
- Mattioli, M., B. Barboni, et al. (2001). "Follicle activation involves vascular endothelial growth factor production and increased blood vessel extension." Biol Reprod **65**(4): 1014-9.
- May, J.V., L.A. Stephenson, et al. (1996) "Transforming growth factor beta expression in the porcine ovary: evidence that theca cells are the major secretory source during antral follicle development." Biol Reprod **54** (2):485-96.
- Miller, A. T., H. M. Picton, et al. (1998). "Follicle dynamics and aromatase activity in high-ovulating Meishan sows and in Large-White hybrid contemporaries." Biol Reprod **58**(6): 1372-8.
- Miller, A. T., H. M. Picton, et al. (1999). "Suppression of ovarian activity in the gilt and reversal by exogenous gonadotrophin administration." Anim Reprod Sci **54**(3): 179-93.

- Miller, W. L. and J. F. Strauss, 3rd (1999). "Molecular pathology and mechanism of action of the steroidogenic acute regulatory protein, StAR." J Steroid Biochem Mol Biol **69**(1-6): 131-41.
- Murakami, M., H. Naraba, et al. (2000). "Regulation of prostaglandin E2 biosynthesis by inducible membrane-associated prostaglandin E2 synthase that acts in concert with cyclooxygenase-2." J Biol Chem **275**(42): 32783-92.
- Nakano, Y., T. Tobe, et al. (1996). "Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma." J Biochem (Tokyo) **120**(4): 803-12.
- Nicosia, R. F. and S. Villaschi (1999). "Autoregulation of angiogenesis by cells of the vessel wall." Int Rev Cytol **185**: 1-43.
- Nishizawa, H., I. Shimomura, et al. (2002). "Androgens decrease plasma adiponectin, an insulin-sensitizing adipocyte-derived protein." Diabetes **51**(9): 2734-41.
- Norman, R. J. (2001). "Reproductive consequences of COX-2 inhibition." Lancet **358**(9290): 1287-8.
- Okamoto, Y., Y. Arita, et al. (2000). "An adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, adheres to injured vascular walls." Horm Metab Res **32**(2): 47-50.
- Ouchi, N., S. Kihara, et al. (1999). "Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin." Circulation **100**(25): 2473-6.
- Ouchi, N., S. Kihara, et al. (2000). "Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF-kappaB signaling through a cAMP-dependent pathway." Circulation **102**(11): 1296-301.
- Pajvani, U. B., X. Du, et al. (2003). "Structure-function studies of the adipocyte-secreted hormone Acrp30/adiponectin. Implications for metabolic regulation and bioactivity." J Biol Chem **278**(11): 9073-85.
- Panidis, D., A. Kourtis, et al. (2004). "Association of the T45G polymorphism in exon 2 of the adiponectin gene with polycystic ovary syndrome: role of Delta4-androstenedione." Hum Reprod **19**(8): 1728-33.
- Parvizi, N. (2000) "Neuroendocrine regulation of gonadotropins in the male and the female." Anim Reprod Sci **60-61**: 31-47.

- Peng, C. (2003). "The TGF-beta superfamily and its roles in the human ovary and placenta." J Obstet Gynaecol Can **25**(10): 834-44.
- Pescador, N., A. Houde, et al. (1997). "Follicle-stimulating hormone and intracellular second messengers regulate steroidogenic acute regulatory protein messenger ribonucleic acid in luteinized porcine granulosa cells." Biol Reprod **57**(3): 660-8.
- Pescador, N., D. M. Stocco, et al. (1999). "Growth factor modulation of steroidogenic acute regulatory protein and luteinization in the pig ovary." Biol Reprod **60**(6): 1453-61.
- Pitzel, L., H. Jarry, et al. (1993). "Effects and interactions of prostaglandin F2 alpha, oxytocin, and cytokines on steroidogenesis of porcine luteal cells." Endocrinology **132**(2): 751-6.
- Prange-Kiel, J., C. Kreutzkamm, et al. (2001) "Role of tumor necrosis factor in preovulatory follicles of swine." Biol Reprod **65** (3):928-35.
- Prunier, A., and H. Quesnel (2000) "Influence of the nutritional status on ovarian development in female pigs." Anim Reprod Sci **60-61**: 185-97.
- Qi, Y., N. Takahashi, et al. (2004). "Adiponectin acts in the brain to decrease body weight." Nat Med **10**(5): 524-9.
- Rajala, M. W. and P. E. Scherer (2003). "Minireview: The adipocyte--at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis." Endocrinology **144**(9): 3765-73.
- Reynolds, L. P. and D. A. Redmer (1998). "Expression of the angiogenic factors, basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor, in the ovary." J Anim Sci **76**(6): 1671-81.
- Ruiz-Cortes, Z. T., Y. Martel-Kennes, et al. (2003). "Biphasic effects of leptin in porcine granulosa cells." Biol Reprod **68**(3): 789-96.
- Rupnick, M. A., D. Panigrahy, et al. (2002). "Adipose tissue mass can be regulated through the vasculature." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(16): 10730-5.
- Schams, D., Schmidt, K., Schlegel, W. (1995). "Effects of growth factors on prostaglandin secretion of bovine luteal cells in vitro at different stages of the luteal phase." Biol reprod **52**(Suppl 1): 569.

- Scherer, P. E., S. Williams, et al. (1995). "A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes." J Biol Chem **270**(45): 26746-9.
- Schneider, J. E. (2004). "Energy balance and reproduction." Physiol Behav **81**(2): 289-317.
- Shalitin, S., and M. Phillip (2003) "Role of obesity and leptin in the pubertal process and pubertal growth--a review." Int J Obes Relat Metab Disord **27** (8):869-74.
- Sharkey, A. M., D. S. Charnock-Jones, et al. (1993). "Expression of mRNA for vascular endothelial growth factor in human placenta." J Reprod Fertil **99**(2): 609-15.
- Shimizu, T., J. Y. Jiang, et al. (2003). "Induction of follicular development by direct single injection of vascular endothelial growth factor gene fragments into the ovary of miniature gilts." Biol Reprod **69**(4): 1388-93.
- Shoham, Z., M. Schacter, et al. (1995). "The luteinizing hormone surge--the final stage in ovulation induction: modern aspects of ovulation triggering." Fertil Steril **64**(2): 237-51.
- Shweiki, D., A. Itin, et al. (1993). "Patterns of expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in mice suggest a role in hormonally regulated angiogenesis." J Clin Invest **91**(5): 2235-43.
- Siervogel, R. M., E. W. Demerath, et al. (2003). "Puberty and body composition." Horm Res **60**(Suppl 1): 36-45.
- Spicer, L. J. (1998). "Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) inhibits steroidogenesis of bovine ovarian granulosa and thecal cells in vitro. Involvement of TNF-alpha receptors." Endocrine **8**(2): 109-15.
- Stocco, D. M. (2001). "StAR protein and the regulation of steroid hormone biosynthesis." Annu Rev Physiol **63**: 193-213.
- Stocco, D. M. and B. J. Clark (1996). "Role of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in steroidogenesis." Biochem Pharmacol **51**(3): 197-205.
- Stouffer, R. L., J. C. Martinez-Chequer, et al. (2001). "Regulation and action of angiogenic factors in the primate ovary." Arch Med Res **32**(6): 567-75.
- Sullivan, M. W., A. Stewart-Akers, et al. (1999). "Ovarian responses in women to recombinant follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone (LH): a

- role for LH in the final stages of follicular maturation." J Clin Endocrinol Metab **84**(1): 228-32.
- Tanabe, T. and N. Tohnai (2002). "Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression." Prostaglandins Other Lipid Mediat **68-69**: 95-114.
- Tartaglia, L. A., M. Dembski, et al. (1995). "Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R." Cell **83**(7): 1263-71.
- Tilley, S. L., L. P. Audoly, et al. (1999). "Reproductive failure and reduced blood pressure in mice lacking the EP2 prostaglandin E2 receptor." J Clin Invest **103**(11): 1539-45.
- Tischer, E., R. Mitchell, et al. (1991). "The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing." J Biol Chem **266**(18): 11947-54.
- Trayhurn, P. and I. S. Wood (2004). "Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue." Br J Nutr **92**(3): 347-55.
- Tsafiriri, A. and R. Reich (1999). "Molecular aspects of mammalian ovulation." Exp Clin Endocrinol Diabetes **107**(1): 1-11.
- Tsao, T. S., H. E. Murrey, et al. (2002). "Oligomerization state-dependent activation of NF-kappa B signaling pathway by adipocyte complement-related protein of 30 kDa (Acrp30)." J Biol Chem **277**(33): 29359-62.
- Tsao, T. S., E. Tomas, et al. (2003). "Role of disulfide bonds in Acrp30/adiponectin structure and signaling specificity. Different oligomers activate different signal transduction pathways." J Biol Chem **278**(50): 50810-7.
- Ur, E., D. A. Wilkinson, et al. (2002). "Leptin immunoreactivity is localized to neurons in rat brain." Neuroendocrinology **75**(4): 264-72.
- van Binsbergen, C. J., H. J. Coelingh Bennink, et al. (1990). "A comparative and longitudinal study on endocrine changes related to ovarian function in patients with anorexia nervosa." J Clin Endocrinol Metab **71**(3): 705-11.
- Vane, J. R., Y. S. Bakhle, et al. (1998). "Cyclooxygenases 1 and 2." Annu Rev Pharmacol Toxicol **38**: 97-120.
- Veldhuis, J.D., J.C. Garmey, et al. (1991) "Ovarian actions of tumor necrosis factor-alpha (TNF alpha): pleiotropic effects of TNF alpha on differentiated

- functions of untransformed swine granulosa cells." Endocrinology **129**(2):641-8.
- Waki, H., T. Yamauchi, et al. (2003). "Impaired multimerization of human adiponectin mutants associated with diabetes. Molecular structure and multimer formation of adiponectin." J Biol Chem **278**(41): 40352-63.
- Wang, Y., G. Lu, et al. (2004). "Proteomic and functional characterization of endogenous adiponectin purified from fetal bovine serum." Proteomics **4**(12): 3933-42.
- Willis, H. J., L. J. Zak, et al. (2003). "Duration of lactation, endocrine and metabolic state, and fertility of primiparous sows." J Anim Sci **81**(8): 2088-102.
- Wong, W. Y., D. L. DeWitt, et al. (1989). "Rapid induction of prostaglandin endoperoxide synthase in rat preovulatory follicles by luteinizing hormone and cAMP is blocked by inhibitors of transcription and translation." Mol Endocrinol **3**(11): 1714-23.
- Wong, W. Y. and J. S. Richards (1992). "Induction of prostaglandin H synthase in rat preovulatory follicles by gonadotropin-releasing hormone." Endocrinology **130**(6): 3512-21.
- Wu, X., H. Motoshima, et al. (2003). "Involvement of AMP-activated protein kinase in glucose uptake stimulated by the globular domain of adiponectin in primary rat adipocytes." Diabetes **52**(6): 1355-63.
- Wu, Y. L. and M. C. Wiltbank (2001). "Differential regulation of prostaglandin endoperoxide synthase-2 transcription in ovine granulosa and large luteal cells." Prostaglandins Other Lipid Mediat **65**(2-3): 103-16.
- Wu, Y. L. and M. C. Wiltbank (2002). "Transcriptional regulation of the cyclooxygenase-2 gene changes from protein kinase (PK) A- to PKC-dependence after luteinization of granulosa cells." Biol Reprod **66**(5): 1505-14.
- Wuttke, W., L. Pitzel, et al. (2001). "LH pulses and the corpus luteum: the luteal phase deficiency LPD)." Vitam Horm **63**: 131-58.
- Yamauchi, T., J. Kamon, et al. (2003). "Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects." Nature **423**(6941): 762-9.

- Yamauchi, T., J. Kamon, et al. (2002). "Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase." Nat Med 8(11): 1288-95.
- Yamauchi, T., J. Kamon, et al. (2001). "The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity." Nat Med 7(8): 941-6.
- Yang, H., G. R. Foxcroft, J. E. Pettigrew, L. J. Johnston, G. C. Shurson, A. N. Costa, and L. J. Zak (2000). "Impact of dietary lysine intake during lactation on follicular development and oocyte maturation after weaning in primiparous sows." J. Anim Sci. 78(4): 993-1000.
- Yi, X. J., H. Y. Jiang, et al. (1999). "Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors during embryonic implantation in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*)." Cell Tissue Res 296(2): 339-49.
- Yokota, T., C. S. Meka, et al. (2003). "Adiponectin, a fat cell product, influences the earliest lymphocyte precursors in bone marrow cultures by activation of the cyclooxygenase-prostaglandin pathway in stromal cells." J Immunol 171(10): 5091-9.
- Yokota, T., C. S. Meka, et al. (2002). "Paracrine regulation of fat cell formation in bone marrow cultures via adiponectin and prostaglandins." J Clin Invest 109(10): 1303-10.
- Yoon, J. C., T. W. Chickering, et al. (2000). "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma target gene encoding a novel angiopoietin-related protein associated with adipose differentiation." Mol Cell Biol 20(14): 5343-9.
- Zhang, Y., R. Proenca, et al. (1994). "Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue." Nature 372(6505): 425-32.
- Zhu, G., G. M. Saed, et al. (2004). "Hypoxia up-regulates the effects of prostaglandin E2 on tumor angiogenesis in ovarian cancer cells." Gynecol Oncol 94(2): 422-6.

