

Université de Montréal

IDENTIFICATION DE GÈNES IMPLIQUÉS À LA FOIS DANS
LE DÉPÔT DE GRAS DORSAL ET LE CONTRÔLE DE CERTAINS
CARACTÈRES DE REPRODUCTION CHEZ LE PORC

par

ÉTIENNE LORD

Département de biomédecine vétérinaire

Faculté de médecine vétérinaire

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

Décembre, 2005



©Étienne Lord, 2005

SF

607

U54

2006

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

IDENTIFICATION DE GÈNES CLÉS IMPLIQUÉS À LA FOIS DANS
LE DÉPÔT DE GRAS DORSAL ET LE CONTRÔLE DE CERTAINS
CARACTÈRES DE REPRODUCTION CHEZ LE PORC

présenté par

ETIENNE LORD

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Christine Théorêt, présidente-rapporteuse

Bruce D. Murphy, directeur de recherche

Marie-France Palin, codirectrice

Lawrence C. Smith, membre du jury

Résumé

La cellule adipeuse, ou adipocyte, est maintenant reconnue comme ayant deux fonctions. Outre son rôle de stockage d'énergie, elle peut aussi agir comme une cellule endocrine sécrétant des hormones, appelées adipokines, capables d'influencer la balance énergétique globale de l'organisme ainsi que l'axe hypothalamo-gonadal. Chez le porc, certaines adipokines, tel la leptine, ont montrées qu'elles pouvaient avoir un effet important sur l'appétit et l'axe reproducteur. Ce projet de recherche a été entrepris dans l'objectif d'identifier d'autres gènes ayant un rôle dans le dépôt de gras dorsal et le développement de certains caractères de reproduction chez le porc.

Des gènes spécifiques, impliqués dans la lipogenèse chez l'humain et la souris, tel que les facteurs de transcription de la famille des « peroxisome proliferator-activated receptors » (**PPAR γ 1, γ 2 et PPAR δ**) et l'isoforme 1c des « sterol regulatory element-binding proteins » (**SREBP1c**), ont été choisis. L'expression de certaines adipokines tel que l'angiopoietin-like 4 (**ANGPTL4**) ainsi que l'adiponectine et ses deux récepteurs (**AdipoR1 et AdipoR2**) a aussi été étudiée.

L'abondance des ARN messagers (**ARNm**) de ces gènes dans différents tissus porcins a, tout d'abord, été vérifiée. Leurs niveaux d'ARNm ont ensuite été mesurés dans deux dépôts adipeux (tissu adipeux dorsal et viscéral) de truies prolifiques de race Upton Meishan (**UM**) présentant une forte adiposité, de truies Large White (**LW**) présentant une adiposité médiane et de truies Ham Line (**HL**), présentant une faible adiposité. Comme chez l'humain, une corrélation négative entre le taux de gras dorsal, viscéral et gras total, et l'expression de l'ARNm de l'adiponectine dans le gras viscéral, mais pas dans le gras dorsal, a été observée. D'autre part, nous avons observé que le niveau d'expression de AdipoR2, contrairement à AdipoR1, était modulé dans le tissu viscéral porcine. L'adiposité viscérale étant identifiée comme un facteur important dans l'apparition du diabète de type II et de l'obésité chez l'humain, cette différence pourrait s'avérer importante dans l'étude de l'adiposité chez le porc.

L'étude des résultats nous a permis de faire une sélection plus restreinte de gènes présentant le potentiel d'agir à la fois comme régulateur de l'adiposité et de la reproduction porcine. Ainsi, un modèle *in vitro* de différenciation de préadipocytes porcins en adipocytes a été adapté et a servi à étudier l'effet du « Tumor Necrosis Factor α » (TNF α), une cytokine impliquée dans l'obésité et le diabète de type II chez l'humain, ainsi que de leptine recombinante porcine, sur cette différenciation. L'étude de l'expression des gènes dans ce modèle *in vitro* a permis de conclure que la leptine recombinante porcine diminue l'expression des transcrits de l'adiponectine sans avoir d'effet sur ses récepteurs. L'ajout de TNF α diminue également les transcrits de l'adiponectine et de son récepteur AdipoR2, mais non AdipoR1.

Enfin, l'étude des niveaux d'expression de PPAR γ 1, PPAR γ 2, PPAR δ , SREBP1c et ANGPTL4 a été réalisée sur des échantillons de tissu utérin porcine (endomètre aux sites d'attachement et entre les sites d'attachement embryonnaire). Cette mesure a été réalisée chez des truies présentant des parités variées (nullipares vs multipares) et à différents stades de gestation (cycliques, gestantes 15 jours, gestantes 25 jours). Il ressort de cette partie de l'étude que les niveaux d'expression de PPAR γ 1, PPAR δ et ANGPTL4 sont modulés selon la parité, le stade de gestation et le site d'échantillonnage utérin. Aussi, l'abondance des transcrits de SREBP1c variait également selon la parité des truies. Finalement, dans cette étude, le niveau d'expression de PPAR γ 2, identifié pour la première fois dans le tissu reproducteur porcine, ne variait pas dans le tissu utérin porcine. Nous concluons que SREBP1c et PPAR γ 2 jouent probablement un rôle secondaire chez la truie en début de gestation.

En conclusion, ce travail a permis de constater que différents gènes impliqués dans la différenciation des préadipocytes en adipocytes (PPAR δ , PPAR γ 1, PPAR γ 2, SREBP1c) ou produits par ceux-ci (ANGPTL4, adiponectine et ses récepteurs), sont présents dans le tissu utérin porcine. Nous avons aussi mis en évidence la présence d'adiponectine et de ses récepteurs dans le tissu adipeux porcine et montré leur modulation selon la race porcine, le type de tissu adipeux, et le niveau d'obésité. Nous

avons aussi démontré la variation des niveaux des récepteurs de l'adiponectine par différentes adipokines tel que la leptine et le TNF α , laissant entrevoir une cible potentielle de contrôle de l'obésité chez l'humain et le porc. D'autre part, nous avons montré que les facteurs de transcription (PPAR γ 1 et PPAR δ) et l'adipokine ANGPTL4, importants dans la différenciation des adipocytes chez d'autres espèces, étaient possiblement impliqués dans l'attachement embryonnaire de l'embryon chez le porc. De plus, certains facteurs tel que PPAR γ 2 et SREBP1c ne le sont probablement pas. En définitive, ces résultats suggèrent qu'il existe un lien entre le tissu adipeux et la reproduction chez le porc et que l'adiponectine, PPAR γ 1, PPAR δ et ANGPTL4 en sont des composantes importantes.

Mots-clés : Adipocytes - Culture de cellules - Différenciation - Porcs - Préadipocytes - Real-time PCR - Reproduction.

Summary

The fat cell, also known as the adipocyte, is now recognized as having two principal functions. Other than its direct involvement in energy metabolism, because of its ability to store energy in the form of triglycerides in times of nutritional affluence, the adipocyte can also act as an endocrine organ, secreting hormones, called adipokines. The adipokines are capable of influencing the total energy balance of the organism as well as the pituitary-gonadal axis. In pigs, the adipokine leptin has been shown to have an effect on the feeding behavior and on the reproductive axis. This research project was undertaken to identify other genes involved in fat deposition and in expression of pig reproductive traits.

Candidate genes, known to be involved in human and mouse lipogenesis were chosen. These included transcription factors in the peroxisome-proliferator-activated receptor family (**PPAR γ 1**, **PPAR γ 2** and **PPAR δ**) and the sterol regulatory element-binding protein isoform 1c (**SREBP1c**). Expression levels of novel adipokine angiopoietin-like 4 (**ANGPTL4**) and adiponectin and its two receptors (**AdipoR1** and **AdipoR2**), were also studied.

Distribution of candidate genes messenger RNA (**mRNA**) was first verified in pig tissues. Abundance of mRNA was also measured in specific body fat deposits (backfat and visceral fat tissues) in highly prolific Upton Meishan (**UM**) sows, that have the greatest total body fat, in Large White (**LW**), with a normal body fat content and in Ham Line (**HL**) sows, having lowest total body fat. A negative correlation was found between level of backfat, visceral and total body fat and abundance of adiponectin mRNA in visceral fat, but not in backfat. We also observed that the expression of adiponectin receptor AdipoR2 was modulated in visceral fat, but not AdipoR1. Visceral adiposity has been identified, in human, as having a role in the development of obesity and type II diabetes. Thus, this difference in expression could be important in the study of pig adiposity.

Preliminary observations allowed us to reduce the number of candidate genes involved in adipocyte regulation and porcine reproduction. An *in vitro* model of porcine preadipocyte differentiation was established and used to study the impact of tumor necrosis factor α (TNF α), a cytokine involved in type II diabetes and obesity in human, and of recombinant leptin protein on this differentiation. We concluded that leptin decreased adiponectin transcripts without effect on adiponectin receptor mRNA abundance. TNF α treatment also decreased the adiponectin mRNA levels with concomitant decline in AdipoR2 mRNA levels.

Futhermore, abundance of PPAR γ 1, PPAR γ 2, PPAR δ , SREBP1c and ANGPTL4 mRNA was studied in porcine uterine samples, between and at implantation sites. This measure compare sows parity (nulliparous vs multiparous) and gestational states (cyclic, gestation day 15, gestation day 25). We found that mRNA levels of PPAR γ 1, PPAR δ and ANGPTL4 are modulated by the sow parity, gestational state and the site of endometrial tissue sampling. Also, transcript abundance of SREBP1c was found to be modulated by sow parity. Finally, mRNA expression levels of PPAR γ 2, identified for the first time in pig reproductive tissues, were found to be constant. We concluded that SREBP1c and PPAR γ 2 play a role in establishment of gestation in sow.

In conclusion, we demonstrated the expression of genes implicated in preadipocyte differentiation into adipocytes (PPAR δ , PPAR γ 1, PPAR γ 2, SREBP1c) or produced by mature adipocytes (ANGPTL4, adiponectin and its receptors) in the porcine uterine tissue. We also demonstrated the presence of adiponectin and adiponectin receptor transcripts in pig adipose tissues and showed that they were modulated by adipose deposit and adiposity level. We also studied the change in mRNA expression levels of adiponectin and its receptors after addition of leptin and TNF α in cell culture, demonstrating that those factors could be potential elements in the control of human and pig obesity. Furthermore, we showed that transcription factors (PPAR γ 1, PPAR δ) and adipokine (ANGPTL4), important in adipocyte differentiation in other species, appear to be involved in pig embryo implantation. Other factors (PPAR γ 2, SREBP1c), appear not to be. These results suggest that a link exists between pig adipose

tissue and reproduction, and that adiponectin, PPAR γ 1, PPAR δ and ANGPTL4 are important elements of it.

Keywords: Adipocytes - Cell culture - Differentiation - Pig - Preadipocytes - Real Time PCR - Reproduction.

Table des matières

Résumé	iii
Summary	vi
Table des matières	ix
Liste des tableaux	xi
Liste des figures	xii
Abbreviations	xiv
Remerciements	xvii
Chapitre 1. Recension de la littérature	1
1. Le tissu adipeux.....	1
1.1 Physiologie du tissu adipeux	1
1.2 Rôles et fonctions classiques du tissu adipeux.....	1
1.3 Role d'organe endocrinien	2
1.4 Spécialisation du tissu adipeux	2
1.4.1. <i>Tissu adipeux blanc</i>	3
1.5 Développement du tissu adipeux.....	3
1.5.1 <i>Origine du tissu adipeux</i>	4
1.5.2 <i>Initiation du développement du tissu adipeux</i>	5
1.5.3 <i>Phase d'arrêt de la prolifération cellulaire</i>	6
1.5.4 <i>Initiation de la différenciation terminale</i>	6
1.5.5 <i>Facteurs de transcription essentiels à la différenciation</i>	8
1.5.6 <i>Différenciation terminale des adipocytes</i>	23
1.6 Lipogenèse	23
1.6.1 <i>Lipogenèse par incorporation d'acides gras libres</i>	26
1.6.2 <i>Lipogenèse par la voie du glucose</i>	28
1.7 Lipolyse.....	31
1.8 Expression des adipokines	32
1.8.1 <i>L'adiponectine</i>	33
1.8.2 <i>Récepteurs de l'adiponectine</i>	36
1.8.3 <i>Facteur nécrosant α (TNF-α)</i>	38

1.8.4 <i>Angiopoietin-like 4 (ANGPTL4)</i>	40
2. La reproduction chez la truie.....	41
2.1 Importance du tissu adipeux dans les caractères de reproduction.....	42
2.1.1 <i>Les adipokines dans la reproduction</i>	42
2.1.2 <i>Les facteurs de transcription dans la reproduction</i>	43
2.2 Gestation et puberté chez la truie	44
2.2.1 <i>Initiation de l'ovulation</i>	45
2.2.2 <i>Développement embryonnaire précoce</i>	45
2.2.3 <i>Reconnaissance de la gestation chez la truie</i>	46
2.2.4 <i>Période de péri-implantation</i>	47
2.2.5 <i>Endomètre et attachement embryonnaire</i>	49
2.3 Caractères de reproduction, la race Meishan	51
2.4 Cause de la prolificité des truies Meishan.....	52
2.5 Mortalité embryonnaire.....	53
2.5.1 <i>Effet de la parité sur la survie embryonnaire</i>	54
2.5.2 <i>Effet du génotype sur la survie embryonnaire</i>	54
2.5.3 Effet de l'environnement utérin sur la survie embryonnaire.....	55
2.5.4 <i>Effet de la sécrétion d'œstrogène sur la survie embryonnaire</i>	55
2.6 Différences entre les embryons Meishan et ceux des races occidentales	56
2.7 Effet de la capacité utérine sur la prolificité	57
2.8 Effet du taux d'ovulation sur la prolificité.....	57
Objectifs et hypothèse	59
Chapitre 2. Articles rédigés.....	61
Article 1.....	61
2.1 Préambule.....	61
2.2 Contributions à l'article.....	62
Article 2.....	77
2.3 Préambule.....	77
2.4 Contributions à l'article.....	78
Chapitre 3. Conclusions et perspectives.....	121
Bibliographie.....	125

Liste des tableaux

Recension de la littérature

Tableau 1. Exemple de gènes cibles des PPAR présentant une séquence PPRE dans leur promoteur.	13
Tableau 2. Exemple de gènes activés ou réprimés par l'activation des PPAR γ	17
Tableau 3. Exemple de gènes activés par les SREBP	22
Tableau 4. Résumé des différences entre les truies et les conceptus de race Meishan versus les races occidentales.....	50

Article 1

Tableau 1. Effect of pig genotype on circulating glucose, insulin, body weight, and carcass fat distribution.....	64
Tableau 2. Primer sequences and optimal conditions for PCR of porcine adiponectin, adiponectin receptor 1 and 2 (adipoR1, adipoR2), cyclophilin, and adipocytes specific fatty acid-binding protein (aP2) genes.....	65
Tableau 3. Overall and within-breed correlation coefficients between adiponectin mRNA levels and carcass traits.....	70
Tableau 4. Overall and within-breed correlation coefficients between adipoR1 and adipoR2 mRNA levels and carcass traits.....	72

Article 2

Tableau 1. Description of the population of sows used by breed and distribution in experimental groups.....	112
Tableau 2. Oligonucleotide primers used for cloning, tissue distribution and real-time PCR of selected porcine genes.....	113

Liste des figures

Recension de la littérature

Figure 1. Développement des adipocytes composants le tissu adipeux à partir de cellules mésenchymateuses multipotentes	5
Figure 2. Résumé des différentes étapes menant à la différenciation terminale des adipocytes.....	7
Figure 3. Cascade générale d'activation des C/EBP et des PPARs menant à la différenciation terminale des adipocytes.....	9
Figure 4. Représentation schématique des différentes parties composant les PPAR ainsi que la formation d'un hétérodimère	11
Figure 5. Représentation schématique des ARNm des différentes isoformes de PPAR γ retrouvées chez le porc	15
Figure 6. Schéma des étapes menant à l'activation des SREBP.....	21
Figure 7. Schéma de la synthèse et de la dégradation du triacylglycérol	25
Figure 8. Schéma de la dégradation des triacylglycérols.....	30
Figure 9. Représentation schématique des différentes formes et structures de l'adiponectine plasmatique	33
Figure 10. Évènements majeurs de la deuxième semaine de gestation chez le porc.....	47
Figure 11. Relation entre les différents facteurs expliquant la taille de portée finale chez le porc	52

Article 1

Figure 1. Deduced AA sequence of pig adiponectin receptors 1 and 2.....	68
Figure 2. Tissue distribution of adiponectin and adiponectin receptors 1 and 2 mRNA in various tissues collected from an adult sow.....	69
Figure 3. Relative abundance of adiponectin mRNA in subcutaneous and visceral adipose tissues.....	70

Figure 4. Relative abundance of adipoR1 and adipoR2 mRNA in subcutaneous and visceral adipose tissues..... 71

Figure 5. Measurement of adiponectin and adiponectin receptors 1 and 2 (adipoR1 and adipoR2) mRNA levels in porcine stromal-vascular cell culture..... 73

Article 2

Figure 1. Deduced amino acid sequence of pig PPAR δ 114

Figure 2. RT-PCR analysis of PPAR δ , ANGPTL4 and ADD1 mRNA in various tissues collected from an adult Duroc x Yorkshire-Landrace sow 115

Figure 3. Immunohistochemical localization of PPAR δ in pig uterus 116

Figure 4. Immunohistochemical localization of PPAR γ in pig uterus 117

Figure 5. Parity effects on relative expression of PPAR δ (a), PPAR γ 1 (b), PPAR γ 2 (c), ANGPTL4 (d) and ADD1 (e) mRNA in endometrial tissue from day 25 pregnant Yorkshire-Landrace sows 118

Figure 6. Effects of the day of pregnancy and site of endometrial tissue sampling on relative expression of PPAR δ (a), PPAR γ 1 (b), PPAR γ 2 (c), ANGPTL4 (d) and ADD1 (e) mRNA in endometrial tissue 119

Figure 7. Effects of the day of pregnancy and pregnancy status on relative expression of PPAR δ (a), PPAR γ 1 (b), PPAR γ 2 (c), ANGPTL4(d) and ADD1 (e) mRNA in endometrial tissue of Meishan-Landrace sows at day 15 of the oestrous cycle (cycling) and at days 15 or 25 of pregnancy..... 120

Abbréviations

- 5'-AMPK : 5'-AMP-activated protein kinase
- Aa: Acides aminés
- ADN: Acide déoxyribonucléique
- ADSF : Cysteine-rich adipocyte tissue-specific secretory factor ou résistine
- ARN: Acide ribonucléique
- ARNm: ARN messenger
- ACS: Acyl-coA synthase
- ADD1: Adipocyte determination- and differentiation-dependent factor 1
(SREBP1c)
- AdipoQ: Adiponectine
- AF-1, AF-2: Activation function 1, activation function 2 ou domaine d'activation
de fonction 1 et 2
- A-FABP: Adipocyte-specific fatty acid-binding protein
- AMPc: Adénosine-5'-monophosphate cyclique
- aP2: Adipocyte-specific fatty acid-binding protein (A-FABP)
- ATP: Adénosine triphosphate
- bHLHLZ: Basic helix-loop-helix-leucine zipper
- BAT : Brown adipose tissu ou tissu adipeux brun
- CD36: Fatty acid transport protein
- CDH13: Cadhérine-13, cadhérine-T (truncated) ou cadhérine-H (heart)
- C/EBP: CCAAT/enhancer binding protein
- CL: Corpus luteum
- CLA: Conjugated linoleic acid ou Acide linoléique conjugué
- CoA: Coenzyme A
- COX: Cyclo-oxygénases
- cPGI: Carbaprostacycline
- C-terminal: Partie carboxy-terminale (en référence à une protéine)
- DAG: Diacylglycérol
- DGAT: Diacylglycérol acyl transférase

DR-1 : Répétition directe de la séquence consensus AGGTCA séparée par un nucléotide

ERK1/2: Extracellular-signal-regulated kinase 1 and 2

ESR: Récepteur d'œstrogènes

FAS: Fatty acid synthase.ou synthase d'acides gras

FAT: Fatty acid transporter

FAAR: Fatty acid activated receptor

FIZZ3: cysteine-rich secreted protein found in inflammatory zone 3 ou résistine

FSH: Hormone folliculo-stimulante

GH: Growth hormone.

GLUT: Glucose transporters

GnRH: Gonadolibérine ou « gonadotropin releasing hormone »

GPAT: Glycérol-3-phosphate acyle transférase

Gs: Stimulatory-G-protein

HDL: High density lipopoteins ou lipoprotéines de haute densité

HL: Ham Line (porc de race)

HSL: Homone sensitive lipase ou lipase hormono-sensible.

IGF-I: Insulin-like growth factor I

kDa: kilodalton

LH : hormone lutéinisante

LPL: Lipoprotéine lipase

LW: Large White (porc de race)

MAPK: protéine kinase activée par des agents mitogènes

MEC : Matrice extracellulaire

MSC: Mesenchymal stem cells ou cellules souches mésenchymateuses

NEFA: Non esterified fatty acid ou acides gras non-estérifiées

NF-κB: Nuclear factor kappa-B

NUC1: Nuclear hormone receptor 1

N-terminal: partie amino-terminale (en référence à une protéine)

P450ssc: P450 side-chain cleavage

PCR: Réaction en chaîne de polymérisation (technique)

PDE3B: phosphodiesterase de type 3B
PG: Prostaglandines
PGE2: Prostaglandine E2
PGF2 α : Prostaglandine F2 α
PPAR: Peroxisomes-proliferator activated receptors
PPRE: Peroxisomes-proliferator responsive elements
PREF-1: Preadipocyte factor-1
PUFA: Polyunsaturated fatty acid ou acide gras polyinsaturé
RBP: Retinol-binding protein
RE: Réticulum endoplasmique
RTEN : Résistine
RXR: Retinoid X receptor ou récepteur rétinoid X
SCAP: SREBP cleavage-activating protein
SCD: Stéaroyl-coA desaturase
S1P, S2P: Alternativement: site-1-protease et site-2-protease
SRE: sterol-regulatory elements
SREBP: Sterol regulatory element binding protein
StAR: Steroidogenic acute regulatory protein
STAT1: Signal transducer and activator of transcription 1
T3: Triiodothyronine
TNF: Tumor necrosis factor ou facteur de nécrose tumorale
UCP: Uncoupling protein
UM: Upton Meishan (porc de race)
VEGF: Vascular endothelial growth factor
VLDL: Very low density lipoproteins ou lipoprotéines de très faible densité

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier sincèrement la Dre. Marie-France Palin pour son accessibilité, son écoute, sa compréhension et ses encouragements durant mes recherches.

Merci au Dr. Bruce Murphy pour avoir tenté de me faire comprendre toute l'étendue de l'univers de la reproduction tout en m'apprenant à garder un esprit critique.

Je suis aussi très reconnaissant envers Mme Danièle Beaudry qui m'a montré ce qu'était vraiment la biologie moléculaire.

Je tiens encore à remercier ma famille ainsi que mes deux amies Myriam Moujahidine et Marie-Belle Poirier pour leurs encouragements et leur soutien moral pendant ces années qui furent très agréables.

Finalement, je voudrais remercier le groupe Hypor (Génétiporc), qui m'a fourni les animaux nécessaires à mes recherches, la fédération des producteurs de porcs (FPPQ) ainsi que le Conseil de Recherche en Sciences Naturelles et en Génie du Canada (CRSNG) pour leur soutien financier.

Chapitre 1. Recension de la littérature

1. Le tissu adipeux

Avec l'augmentation dramatique des cas d'obésité chez l'humain et des pathologies associées à cette condition, le tissu adipeux est présentement l'un des tissus les plus étudiés (Grégoire *et al.* 1998). La sélection des porcs dans les dernières décennies s'est faite principalement sur une réduction du taux de gras dorsal ainsi qu'une augmentation du taux de croissance (Gaughan *et al.* 1995; Roehle *et al.* 2003).

1.1 Physiologie du tissu adipeux

Le tissu adipeux est formé d'une combinaison organisée, dans un tissu alvéolaire, de cellules fibroblastiques, de macrophages, de leucocytes, de cellules conjonctives, de cellules endothéliales et de 30-60% d'adipocytes (Ailhaud *et al.* 1992; Ding *et al.* 2000). Dans ce tissu, les adipocytes sont regroupés ensemble par le stroma qui consiste en un filet de fibres de collagènes entrecoupé de capillaires sanguins. On appelle cet ensemble la partie « stromal-vascular » et celle-ci a pour fonction de supporter le tissu adipeux. À l'intérieur de cette matrice, les adipocytes et les autres cellules sont en contact avec le système sanguin (Hausman et Richardson, 2004). De plus, une innervation sympathique, provenant de l'hypothalamus, se trouve également dans le tissu adipeux (Bartness et Bamshad, 1998). Ainsi, le métabolisme du tissu adipeux est contrôlé non seulement de manière locale mais aussi de manière neuroendocrine via le système nerveux central (Barb *et al.* 2005; Hausman, 1985).

1.2. Rôles et fonctions classiques du tissu adipeux

Jusqu'à tout récemment, on considérait le tissu adipeux comme un organe passif impliqué dans la balance énergétique des vertébrés. La fonction primaire des adipocytes était l'accumulation d'énergie, sous forme de triglycérides, lorsque le nombre de calories consommées excédait le nombre de calories dépensées. Cette énergie était libérée sous différentes formes lorsque l'organisme tombait en déficit énergétique (Boone *et al.* 1999b).

On attribuait aussi au tissu adipeux un rôle de soutien, de protection mécanique, et d'isolation thermique de l'organisme (Pond, 1999). Plus récemment, l'hypothèse de l'implication possible du tissu adipeux dans les processus d'inflammation et de défense immunitaire a également été émise (Cousin et al. 1999). Enfin, un rôle endocrinien du tissu adipeux a été récemment proposé (Ahima et Flier, 2000; Ailhaud, 2000).

1.3 Role d'organe endocrinien

Nous savons aujourd'hui que l'adipocyte est le siège d'une activité métabolique intense. Ainsi, le tissu adipeux peut être considéré comme un organe endocrinien puisque les adipocytes sont capables de sécréter différents facteurs et hormones dans la circulation sanguine (Ahima et Flier, 2000; Fain *et al.* 2004; Trayhurn et Beattie, 2001). Cette relâche va permettre au tissu adipeux d'influencer le système nerveux central et les tissus périphériques dans la régulation de différents processus métaboliques ainsi que l'homéostasie générale de l'organisme (Fruhbeck *et al.* 2001; Kim et Moustaid-Moussa, 2000).

1.4 Spécialisation du tissu adipeux

Une certaine spécialisation du tissu adipeux au niveau cellulaire est possible. Ainsi, les mammifères développent, pendant leur croissance, différents types de tissus adipeux dont la nature et la masse varient en fonction de l'âge, du sexe, de l'espèce et du statut nutritionnel (Rothwell et Stock, 1985). Deux types d'adipocytes, présentant des caractéristiques distinctes au niveau morphologique et fonctionnel, sont présents chez la plupart des espèces (Rothwell et Stock, 1986). Le type le plus commun, le tissu adipeux blanc, est composé d'adipocytes blancs. Ceux-ci sont uniloculaires c'est-à-dire qu'ils se distinguent par la présence d'une importante gouttelette lipidique centrale (Oberkofler *et al.* 1997). Leur principale fonction est l'accumulation et la relâche d'énergie sous forme de triglycérides (Ding *et al.* 1999). Les adipocytes bruns, composant le tissu adipeux brun, présentent, quant à eux, plusieurs gouttelettes lipidiques et une quantité importante de mitochondries qui confèrent au tissu une couleur particulière (Rothwell et Stock, 1985). Le tissu adipeux brun, aussi capable de stocker et de synthétiser des triglycérides, est spécialisé dans l'oxydation des acides gras servant à produire de la chaleur (Marko *et*

al. 1995). Cette production de chaleur explique la présence de tissu adipeux brun, chez plusieurs espèces, dès la naissance, où une génération de chaleur importante est requise (Trayhurn, 1989a; Werner *et al.* 1999).

Cependant, chez le porc, il n'y aurait pas de tissu adipeux brun (Mostyn *et al.* 2004; Trayhurn *et al.* 1989b) même à la naissance. Pour pallier à cette situation, la génération de chaleur, chez les porcelets naissants, serait principalement effectuée dans les muscles (Damon *et al.* 1998; Mostyn *et al.* 2004).

1.4.1. Tissu adipeux blanc

Les adipocytes blancs sont présents chez les mammifères à divers endroits tels que les tissus périrénaux, péristomacaux ou omentales et mésentériques, les tissus sous-cutanés, les tissus inter- et intra- musculaires et le tissu adipeux de la moelle osseuse (Guesnet et Demarne, 1987). Le tissu adipeux blanc compose la majeure partie du tissu adipeux chez les mammifères adultes (Grégoire *et al.* 1998; Himms-Hagen, 2001).

Au niveau fonctionnel, le tissu adipeux blanc sert principalement de réserve d'énergie (Rosen et Spiegelman, 2000). Les adipocytes blancs sont métaboliquement plus actifs et participent de manière plus importante que les adipocytes bruns à l'homéostasie énergétique de l'organisme (Trayhurn et Beattie, 2001) tout en étant le principal siège de la sécrétion des adipokines: leptine, adiponectine, TNF- α , insulin-like growth factor 1 et bien d'autres (Grégoire *et al.* 1998). Cependant, le tissu adipeux brun peut lui aussi produire des adipokines tel que la leptine (Trayhurn et Beattie, 2001).

1.5 Développement du tissu adipeux

Chez la plupart des espèces, y compris le porc, le développement du tissu adipeux commence durant la vie fœtale (Desnoyers et Vodovar, 1977). Le développement du tissu adipeux se divise en deux étapes importantes : 1) l'augmentation du nombre d'adipocytes à partir de cellules précurseurs ou, hyperplasie; 2) l'augmentation du volume des adipocytes par la production et l'incorporation de lipides à l'intérieur de ceux-ci ou, hypertrophie.

Chez le porc, l'hyperplasie du tissu adipeux est le phénomène le plus important durant les deux premiers mois suivant la naissance alors que le phénomène d'hypertrophie devient le plus important vers l'âge de 5 mois (Lawrence et Fowler, 2002).

1.5.1. Origine du tissu adipeux

L'adipogenèse ou formation *de novo* du tissu adipeux est un phénomène encore mal connu au niveau cellulaire et moléculaire (Grégoire *et al.* 1998). Les cellules souches mésenchymateuses (MSC) multipotentes, dérivées des cellules embryonnaires pluripotentes, sont les premières cellules capables de se différencier en adipocytes (Pittenger *et al.* 1999; Rosen et Spiegelman, 2000). Puisque l'on retrouve les MSC dans le tissu adipeux adulte chez les mammifères, la formation de ce tissu n'est pas restreinte au stade périnatal (Hausman et Kauffman, 1986; Pittenger *et al.* 1999; Sen *et al.* 2001).

Le processus exact de détermination des cellules mésenchymateuses vers les différents types cellulaires n'est pas encore connu (Grégoire *et al.* 1998). Cependant, le processus de détermination des cellules fibroblastiques, maintenant appelées préadipocytes, serait la première étape menant au phénotype d'adipocyte (figure 1) (Fruhbeck *et al.* 2001; Grégoire, 2001).

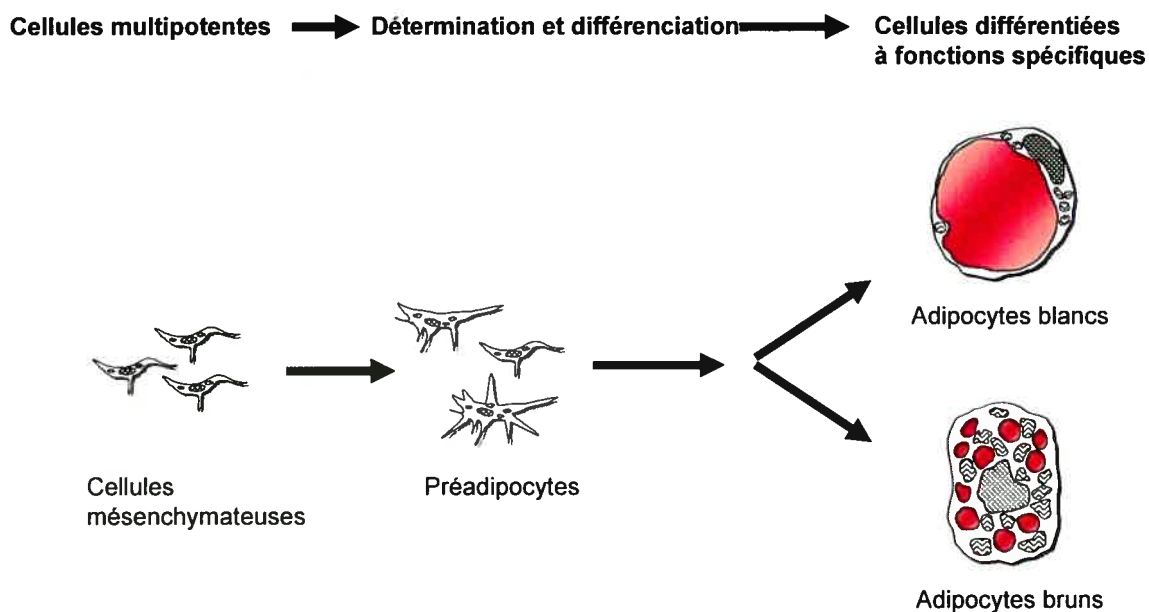


Figure 1. Développement des adipocytes composants le tissu adipeux à partir de cellules mésenchymateuses multipotentes. Adapté de Pittenger *et al.* (1999).

1.5.2. Initiation du développement du tissu adipeux

Après cette première étape de détermination des cellules mésenchymateuses, les préadipocytes maintiennent leur capacité à se diviser. Chez le porc comme chez la plupart des espèces, la formation du tissu adipeux commencerait par une importante phase de croissance mitotique exponentielle qui se déroulerait tardivement dans le développement embryonnaire (Fruhbeck *et al.* 2001; Grégoire *et al.* 1998). Elle serait caractérisée par l'apparition d'amas ou groupes de préadipocytes, à des sites anatomiques précis, qui augmenteraient en nombre et en volume durant le développement de l'embryon (Hausman et Richardson, 2004). Chez l'embryon porcin, cette première étape de prolifération serait étroitement associée au processus de vascularisation, puisque l'apparition de ces amas est temporellement et spatialement corrélée avec le développement des capillaires sanguins (Grégoire *et al.* 1998; Hausman et Richardson, 2004; Poissonnet *et al.* 1983). De plus, le développement artériolaire

précéderait la différenciation des préadipocytes en adipocytes dans les différents dépôts adipeux au stade fœtal (Hausman et Richardson, 2004).

1.5.3. Phase d'arrêt de la prolifération cellulaire

Suivant cette croissance mitotique exponentielle, une phase d'arrêt du cycle cellulaire est requise pour l'initiation de la différenciation terminale des préadipocytes en adipocytes (MacDougald et Lane, 1995). Cette phase d'arrêt du cycle cellulaire ne serait pas due aux contacts inter-cellulaires puisque des préadipocytes porcins à confluence, *in vitro*, peuvent proliférer sans se différencier (Nakajima *et al.* 2003).

L'altération du cytosquelette des préadipocytes, qui passent d'une forme fibroblastique à une forme plus sphérique, pourrait être l'initiateur de cette phase (Boone *et al.* 1999a) puisqu'une diminution de l'expression de l'ARNm des gènes tels que l'actine, la tubuline et la tropomyosine, précède cette phase d'arrêt chez les préadipocytes murins 3T3-F442A (Spiegelman et Farmer, 1982).

1.5.4. Initiation de la différenciation terminale

La fin de cette phase d'arrêt marque le début de la dernière étape de la différenciation des préadipocytes en adipocytes, ne pouvant plus se multiplier mais pouvant accumuler des acides gras (Ding *et al.* 1999, Grégoire *et al.* 1998). Les changements associés à cette étape sont surtout d'ordre transcriptionnel. Ainsi, l'expression temporelle des gènes impliqués dans cette différenciation terminale se divise en trois catégories : l'expression des gènes précoces, intermédiaires et tardifs (Ntambi et Kim, 2000; Rosen *et al.* 2000).

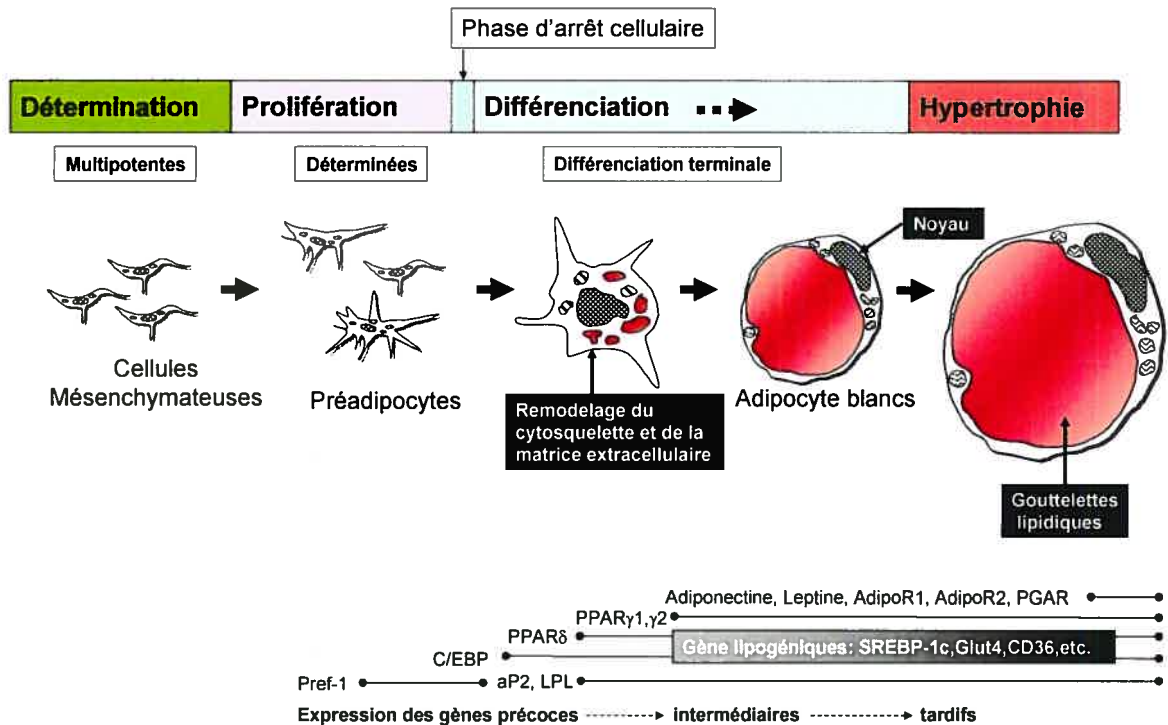


Figure 2. Résumé des différentes étapes menant à la différenciation terminale des adipocytes.

Un des gènes précocement modulé est le « preadipocyte factor 1 » (**Pref-1**) qui joue un rôle clé dans le maintien de l'état non-différencié des préadipocytes (Smas et Sul, 1993). Pref-1, inhibe l'expression de facteurs de transcription membres de la famille des « CCAAT/enhancer binding protein » (**C/EBP**) ainsi que des récepteurs nucléaires **PPAR γ** et **PPAR δ** , tous nécessaires à la différenciation terminale des adipocytes et qui seront décrits plus loin (Mei *et al.* 2002). Au cours de cette différenciation, les niveaux d'ARNm de Pref-1 diminuent (Grégoire *et al.* 1998; Mei *et al.* 2002; Smas et Sul, 1993). Chez le porc, l'expression de Pref-1 est totalement absente des tissus adipeux adultes et la différenciation des préadipocytes, *in vitro*, amène une diminution de l'expression de Pref-1 (Lord et Palin; non publié).

1.5.5. Facteurs de transcription essentiels à la différenciation

Certains facteurs de transcription sont essentiels à la différenciation des préadipocytes en adipocytes (Pittenger *et al.* 1999). Il s'agit des membres de la famille des C/EBP, des PPAR, et des SREBP. Les membres de la famille des C/EBP seront les premiers à être exprimés par les adipocytes en formation (figure 2). L'inhibition de leur expression protéique empêche la différenciation terminale des préadipocytes murins 3T3-L1 (Lin et Lane, 1992). Suite à cette première étape, l'expression de l'ARNm des membres de la famille des PPAR suivra. L'expression de PPAR γ 2 est d'ailleurs considérée comme l'un des principaux marqueurs de la différenciation des adipocytes (Akune *et al.* 2004; Chawla *et al.* 1994). Finalement, une troisième famille de facteurs de transcription sera activée dans les adipocytes en formation : les membres de la famille des SREBP qui régulent le niveau de cholestérol intracellulaire et le métabolisme des lipides (Brown et Goldstein, 1997).

Famille des C/EBP

Les C/EBP sont des protéines faisant partie de la famille des facteurs de transcription « leucine zipper » qui peuvent former des homo- ou hétérodimères (Morrison et Farmer, 1999). On retrouve cinq membres de cette famille : C/EBP α , C/EBP β , C/EBP δ , C/EBP ϵ et C/EBP ζ , et leur distribution n'est pas limitée aux tissus adipeux (Lekstrom-Himes et Xanthopoulos, 1998). Des souris, où l'expression de certains de ces gènes a été éliminée (knock-out), ont montré différents rôles pour cette famille de facteurs de transcription incluant : la régulation du métabolisme des lipides, la régulation du métabolisme des carbohydrates, l'implication dans les processus inflammatoires et dans la reproduction (Lekstrom-Himes et Xanthopoulos, 1998). Cependant, c'est l'étude de modèles de différenciation *in vitro* (ex. 3T3-L1 murins) qui a permis de mieux comprendre le rôle des C/EBP dans le processus de différenciation des adipocytes (Cao *et al.* 1991). La cascade d'activation des gènes, menant à l'accumulation de lipides dans les adipocytes, débiterait par une expression transitoire de C/EBP β suivie de C/EBP δ (figure 3; Brun *et al.* 1996; Wu *et al.* 1996). Ces derniers amèneraient l'expression C/EBP α , exprimé juste avant la transcription de la plupart de

gènes spécifiques aux adipocytes (Mandrup et Lane, 1997), qui aurait pour rôle probable l'activation des gènes permettant aux adipocytes de répondre au signal de l'insuline (Rosen *et al.* 2001). L'expression de C/EBP β et C/EBP δ amènerait aussi l'expression de PPAR γ qui, via l'activation de gènes produisant différents ligands, pourrait augmenter mutuellement l'expression de C/EBP α (Rosen et Spiegelman, 2000). Ce modèle d'activation, résultant d'observations *in vitro*, est supporté chez la souris par le fait que des souris présentant des niveaux réduits de C/EBP β et C/EBP δ ont une masse réduite de tissus adipeux (Morisson et Farmer, 1999). De plus, une diminution de l'expression de l'ARNm de PPAR γ diminue aussi l'expression de l'ARNm C/EBP α , alors qu'une diminution des niveaux de transcrits de C/EBP α diminue la différenciation des préadipocytes et l'expression de PPAR γ (Barak *et al.* 1999; Wu *et al.* 1998).

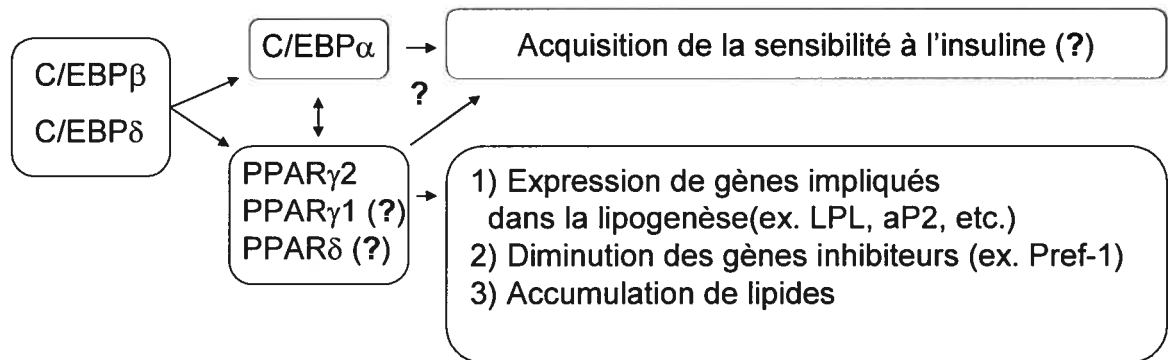


Figure 3. Cascade générale d'activation des C/EBP et des PPARs menant à la différenciation terminale des adipocytes. Adapté de Rosen *et al.* (2001).

Chez le porc, ce modèle d'activation (figure 3) menant à la différenciation des adipocytes est contesté. Ainsi, l'expression de C/EBP β et C/EBP δ dans des cultures primaires de préadipocytes porcins se fait de manière continue et non de manière transitoire (Hausman, 2003). De plus, aucune augmentation de l'expression de C/EBP β et C/EBP δ ne se produit dans le tissu adipeux de fœtus de 50, 75 et 95 jours alors qu'une augmentation graduelle de l'expression de C/EBP α est observée de concert avec l'augmentation de l'adipogenèse (Hausman, 2003; Lee *et al.* 1998).

Famille des PPAR

Les « peroxisome proliferator-activated receptors » sont des membres de la superfamille des récepteurs nucléaires qui comprennent, entre autre, les récepteurs pour les hormones thyroïdiennes, les récepteurs de la vitamine D et les récepteurs de l'acide rétinoïque (Michalik *et al.* 2002; Rosen *et al.* 2000). Leur activité transcriptionnelle est modulée par des interactions ligands-récepteurs (Brun et Spiegelman, 1997). Jusqu'à maintenant, trois membres de la famille des PPAR ont été identifiés chez les vertébrés (Morrison et Farmer, 1999). Ils sont nommés PPAR α , PPAR δ/β et PPAR γ (PPAR γ 1 à 7) et sont encodés par différents gènes (Desvergne et Wahli, 1999; Zhou *et al.* 2002). La forme des domaines de liaison aux ligands des différents PPAR ainsi que leur distribution dans les tissus pourraient expliquer, en partie, leurs fonctions qui seront discutées un peu plus loin (Desvergne et Wahli, 1999; Morrison et Farmer, 1999).

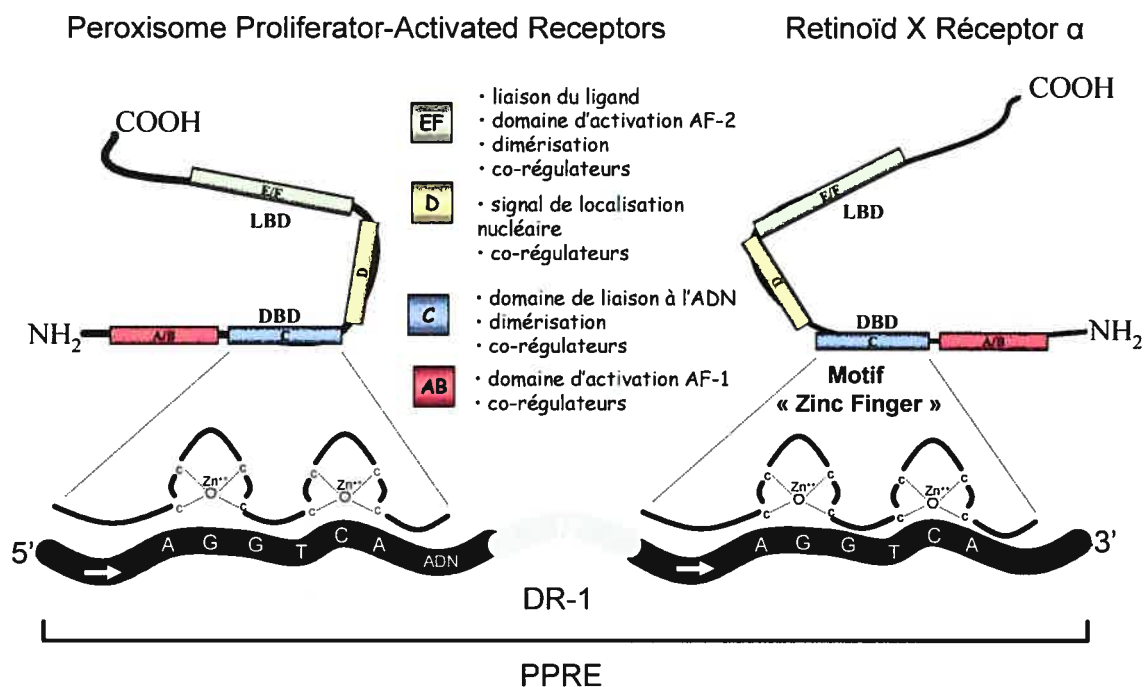


Figure 4. Représentation schématique des différentes parties composant les PPAR ainsi que la formation d'un hétérodimère. Légende : AF-1 et AF-2, domaine d'activation de fonction 1 et 2; DBD, domaine de liaison à l'ADN; DR-1, Répétition directe de la séquence consensus AGGTCA séparée par un nucléotide; LBD, domaine de liaison au ligand; PPRE, peroxisome proliferator responsive elements. Schématisé d'après Aranda et Pascual (2001).

Aspects fonctionnels des PPAR

Comme tous les récepteurs nucléaires, les PPAR possèdent trois domaines distincts (figure 4) : le domaine N-terminal (partie A/B), le domaine de liaison à l'ADN (DBD) (partie C) et un domaine de liaison aux ligands (LBD) (partie E/F). De plus, la partie D, qui sert de liaison entre les domaines DBD et LBD, comprend aussi un signal de localisation nucléaire tout en permettant l'attachement de co-régulateurs (Aranda et Pascual, 2001; Robyr *et al.* 2000). Le domaine de liaison à l'ADN est très conservé chez les récepteurs nucléaires de cette famille et comprend deux motifs « zinc finger » qui permettent la liaison du récepteur à la séquence promotrice des gènes qu'il régule (Aranda et Pascual, 2001; Robyr *et al.* 2000). La variabilité dans le LBD des différents

récepteurs et isoformes permet d'expliquer leur spécificité envers les différents ligands ainsi que leurs fonctions biologiques (Aranda et Pascual, 2001). De plus, les PPAR comprennent les domaines « activation function 1 » et « activation function 2 » (**AF-1** et **AF-2**) permettant la liaison de co-activateurs ou co-répresseurs modulant l'activation des PPAR (Baniahmad, 2005). Dans le cas du domaine AF-1, la liaison de co-activateurs à ce domaine permet l'activation des PPAR en absence de ligands (Werman *et al.* 1997).

Effets des PPAR sur la transcription génique

L'activité des PPAR peut être régulée via leur phosphorylation par différentes kinases (Lazennec *et al.* 2000; Gelman *et al.* 2005). Outre cette régulation, l'activation des PPAR s'effectue normalement par liaison à un ligand ou agoniste (Tan *et al.* 2005a). Cette liaison permet un changement de conformation des PPAR permettant la liaison avec le « retinoïd X receptor » (**RXR**). Il est d'ailleurs à noter que les PPAR forment exclusivement des hétérodimères (Berger et Moller, 2002). Le RXR existe sous la forme de trois isoformes ($RXR\alpha$, $RXR\beta/\delta$ et $RXR\gamma$) qui sont activées par l'acide 9-cis rétinolique (Bastien et Rochette-Egly, 2004; Mangelsdorf *et al.* 1992). Cependant, c'est la forme $RXR\alpha$ qui est la plus susceptible de former des hétérodimères avec les PPAR (Desvergne et Wahli, 1999).

Suite à la formation d'hétérodimères, des co-activateurs ou co-répresseurs sont recrutés (Robyr *et al.* 2000; Tan *et al.* 2005a) et la liaison du complexe PPAR-RXR dans les régions promotrices des gènes cibles se produit. Des sites de liaison spécifiques, appelés « peroxisome proliferator responsive elements » (**PPRE**), sont requis pour cette liaison. Ces derniers se composent d'une répétition, dans la même orientation (directe), de deux séquences ou motifs de 6 acides nucléiques dont la plus connue est « AGGTCA » (Desvergne et Wahli, 1999) séparées par une paire de base (1 pb) appelée « **DR-1** » (Kliwer *et al.* 1992).

Tableau 1. Exemple de gènes cibles des PPAR présentant une séquence PPRE dans leur promoteur. Adapté de Desvergne et Wahli (1999)

Gènes	Fonctions
Acyl-coA synthase	Activation des acides gras
Adipocyte-specific fatty-acid binding protein (A-FABP)	Liaison des acides gras intracellulaires
Lipoprotéine lipase	Libération des acides gras des lipoprotéines
Fatty acid transport protein (CD36)	Récepteur membranaire/transporteur des acides gras

Cette liaison de PPAR-RXR aux PPRE amène une augmentation de la transcription des gènes cibles (Berger et Moller, 2002; Desvergne et Wahli, 1999; Grégoire *et al.* 1998). Ces gènes sont principalement impliqués dans la différenciation cellulaire, la prolifération cellulaire et le contrôle du métabolisme des lipides et ce, à plusieurs niveaux, tels que l'incorporation d'acides gras par les cellules, la liaison intracellulaire des acides gras et leur activation, l'oxydation des acides gras, et finalement le stockage des acides gras (tableau 1). Cependant, la régulation de la transcription de gènes par les PPAR ne nécessite pas nécessairement la présence de PPRE dans le gène cible. Ainsi, PPAR γ peut interférer avec la fonction des facteurs des transcriptions « signal transducer and activator of transcription 1 » (STAT1) et « nuclear factor kappa-B » (NF- κ B) (Ricote *et al.* 1998).

Ligands des PPAR

De manière générale, les ligands naturels ou activateurs des PPAR sont des acides gras à longues chaînes tels que l'acide linoléique ou l'acide palmitique (Krey *et*

al. 1997). D'autre part, on retrouve parmi leurs ligands naturels des eicosanoïdes (ex. acide 9-hydroxyoctadénoïde) et des dérivés des prostaglandines tel que la 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ₂ (Margeli *et al.* 2003).

Des analogues synthétiques des prostaglandines tels que le carbaprostacycline (cPGI), l'IloprostTM et le CicaprostTM peuvent aussi servir d'agonistes aux PPAR (Desvergne et Wahli, 1999). Certains agents diminuant les taux de lipides plasmatiques chez l'humain, tels les fibrates, peuvent aussi activer les PPAR (Desvergne et Wahli, 1999; Weatherman *et al.* 1999). Finalement, les membres de la famille des thiazolidinediones (TZD), des dérivés synthétiques qui augmentent la sensibilité des tissus à l'action de l'insuline, auparavant utilisés dans le traitement du diabète de type II, activent aussi les PPAR (Berger et Moller, 2002).

Membres de la famille des PPAR : PPAR α

PPAR α fut le premier membre de la famille des PPAR à être identifié (Issemann et Green, 1990). Cette équipe cherchait à identifier, chez les rongeurs, un facteur expliquant la prolifération des peroxisomes. Chez l'humain, l'expression de l'ARNm de PPAR α se retrouve principalement dans le foie, les reins, le cœur, les muscles squelettiques et les adipocytes bruns (Auboeuf *et al.* 1997). Chez le porc adulte, le foie et les reins présentent aussi la plus forte expression de l'ARNm de PPAR α . Cependant, contrairement à l'humain, les niveaux d'expression de PPAR α sont très faibles dans les muscles cardiaques et squelettiques (Sundvold *et al.* 2001).

Le rôle de PPAR α serait relié à la régulation de l'incorporation cellulaire des acides gras et de leur β -oxydation (Michalik *et al.* 2002). Aussi, PPAR α participerait à la modulation des processus inflammatoires et au processus de réparation des tissus (Berger et Moller, 2002; Michalik *et al.* 2001).

Membres de la famille des PPAR : PPAR γ

Tel que mentionné précédemment, le récepteur nucléaire PPAR γ est le membre le plus étudié de la famille des PPAR. Ceci s'explique en partie par le fait qu'il est une composante clé de la régulation de la différenciation des préadipocytes en adipocytes (Rosen *et al.* 2000). Différents transcrits de PPAR γ , dû à l'usage de promoteurs alternatifs et à l'épissage d'exons alternatifs, se retrouvent chez les mammifères. On retrouve sept transcrits chez le singe (Zhou *et al.* 2002), trois chez l'humain (Fajas *et al.* 1998) alors que seulement deux formes ont été identifiées chez le porc : PPAR γ 1 et PPAR γ 2 (figure 5; Grindflek *et al.* 1998; Houseknecht *et al.* 1998).



Figure 5. Représentation schématique des ARNm des différentes isoformes de PPAR γ retrouvées chez le porc. Les différents exons A1, A2, B et 1 à 6 sont identifiés de même que les sites d'initiation de la traduction (AUG). Schématisé d'après Grindflek *et al.* (1998).

Chez le porc, le gène de PPAR γ comprend six exons. Les exons 2 et 3 encodent le DBD et les exons 5 et 6 le LBD. La région N-terminale est la moins conservée entre les espèces et comprend trois exons nommés A1, A2 et B (Zhou *et al.* 2002). L'ARNm de l'isoforme PPAR γ 1 comprend les exons A1 et A2 suivis des exons 1 à 6, tandis que le transcrit de PPAR γ 2 comprend les exons B et 1 à 6 (Grindflek *et al.* 1998; Houseknecht

et al. 1998). Cependant, la position du codon d'initiation de la traduction fait en sorte que le récepteur PPAR γ 1 porcin ne contient pas les exons A1 et A2 alors que le récepteur PPAR γ 2 comprend l'exon B à son extrémité N-terminale, qui comporte ainsi 29 acides aminés (**aa**) de plus que PPAR γ 1 (Grindflek *et al.* 1998; Houseknecht *et al.* 1998).

Même s'ils proviennent d'un seul gène, les récepteurs PPAR γ 1 et PPAR γ 2 n'ont pas la même spécificité pour les ligands et exhibent un patron d'expression différent (Desvergne et Wahli, 1999). Chez le porc, PPAR γ 1 se retrouve à de faibles niveaux dans plusieurs tissus alors que PPAR γ 2 est fortement exprimé dans le tissu adipeux (Grindflek *et al.* 1998; Houseknecht *et al.* 1998). Outre l'abondance des transcrits de PPAR γ dans les tissus adipeux, on retrouve chez l'humain (Marvin *et al.* 2000; Mukherjee *et al.* 1997) et la souris (Barak *et al.* 1999) l'expression de ceux-ci dans les tissus reproducteurs et en particulier dans l'endomètre utérin. Ainsi, les souris n'exprimant pas PPAR γ présentent de graves défauts dans la différenciation des trophoblastes, dans la placentation, ainsi que dans les processus de vascularisation. Cela entraîne une mortalité embryonnaire accrue chez ces souris (Barak *et al.* 1999). Ces défauts observés pourraient être, en partie, expliqués par l'action proangiogénique de PPAR γ , alors absente (Yamakawa *et al.* 2000).

Le ligand naturel présumé de PPAR γ est la 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandine J₂. PPAR γ peut aussi être activé par les TZD (Berger et Moller, 2002; Lehmann *et al.* 1995), par l'acide arachidonique et l'acide linoléïque (Thoennes *et al.* 2000). Par contre, la transcription de l'ARNm de PPAR γ est aussi activée par la production de ligands endogènes (Fajas *et al.* 1999; Kim *et al.* 1998; Nakamura *et al.* 2004) et par l'action directe de SREBP1c capable de se lier à une partie du promoteur du gène de PPAR γ (Kim *et al.* 1998). Cette activation de PPAR γ amène la transcription de gènes impliqués dans l'adipogenèse et la régulation du métabolisme des lipides dont certains des plus importants sont énumérés au tableau 2. Aussi, bien qu'ils n'ont pas la même affinité pour les différents ligands, l'activation de PPAR γ 1 ou de PPAR γ 2 résulte en une

différenciation des préadipocytes en adipocytes, comme le démontre une étude chez la souris (Barak *et al.* 1999).

Tableau 2. Exemple de gènes activés ou réprimés par l'activation des PPAR γ .
Adapté de Berger et Moller (2002)

Gènes et fonctions	Action de PPAR γ sur le niveau d'expression de l'ARNm
Transport et synthèse des lipides	
Adipocyte-specific fatty acid binding protein	↑
Lipoprotéine lipase	↑
FAT/CD36	↑
Acyl-coA synthase	↑
Adipokines	
Adiponectine	↑
TNF- α	↓
Leptine	↓
Angiopoietin-like 4 (ANGPTL4)	↑

Membres de la famille des PPAR : PPAR δ

Le dernier membre de la famille des PPAR est PPAR β aussi appelé PPAR δ . Exprimé dans la plupart des tissus (Amri *et al.* 1995; Braissant *et al.* 1996; Schmidt *et al.* 1992), on le retrouve principalement dans le cerveau, le tissu adipeux, la peau, le foie, et le site d'implantation embryonnaire chez la souris et le rat (Amri *et al.* 1995, Braissant *et al.* 1996; Braissant et Wahli, 1998; Ding *et al.* 2003; Larsen *et al.* 2002; Lim *et al.* 1997). Son expression augmente pendant le développement embryonnaire chez le rat et durant la différenciation des préadipocytes en adipocytes (Bastie *et al.* 2000; Braissant et Wahli, 1998).

Le rôle exact de ce récepteur nucléaire n'est pas encore bien défini. Il serait possiblement impliqué dans le transport du cholestérol, la prolifération et différenciation cellulaire, ainsi que dans la réparation de l'épiderme (Barak *et al.* 2002; Michalik *et al.* 2001; Rosen *et al.* 2000; Teboul *et al.* 2001). L'implication de PPAR δ dans le contrôle du métabolisme des lipides semble confirmé par son activation par des acides gras. Cette activation amène, d'une part, une plus grande oxydation des réserves lipidiques dans le tissu adipeux et musculaire et, d'autre part, entraîne l'activation de PPAR γ probablement par la relâche de ligands capables d'activer ce dernier (Helliwell *et al.* 2004; Wang *et al.* 2003). L'activation de PPAR δ par des acides gras à longues chaînes dans des préadipocytes *in vitro*, augmente leur sensibilité à l'insuline tout en favorisant le processus de différenciation (Bastie *et al.* 2000).

Famille des SREBP

Outre la famille des PPAR, l'expression des gènes adipogéniques, impliqués dans la synthèse des acides gras et dans le contrôle de leur entrée dans les adipocytes, est aussi contrôlée par les SREBP (Brown et Goldstein, 1997). Membre de la famille de facteurs de transcription liant l'ADN «basic helix-loop-helix-leucine zipper» (**bHLHLZ**), les SREBP comprennent 3 membres : SREBP1a, SREBP1c aussi appelé « adipocyte determination and differentiation-dependent factor 1 » (**ADD1**), ainsi que SREBP2 (Gondret *et al.* 2001; Tontonoz *et al.* 1993). Bien que produites à partir de gènes différents, l'homologie entre la protéine SREBP1 et SREBP2 est de 50%. Les isoformes SREBP1a et SREBP1c, quant à eux, sont produits à partir du même gène, par épissage alternatif, et diffèrent au niveau de leur domaine de trans-activation N-terminal. Cette différence confère à SREBP1a un meilleur pouvoir transcriptionnel que SREBP1c (Edwards *et al.* 2000).

SREBP2 s'occupe principalement du contrôle de l'homéostasie du cholestérol tandis que la régulation du métabolisme des lipides est principalement effectuée par SREBP1a et SREBP1c (Morrison et Farmer, 1999). L'expression de l'ARNm de SREBP1a se retrouve principalement dans les lignées de préadipocytes (ex. 3T3-L1).

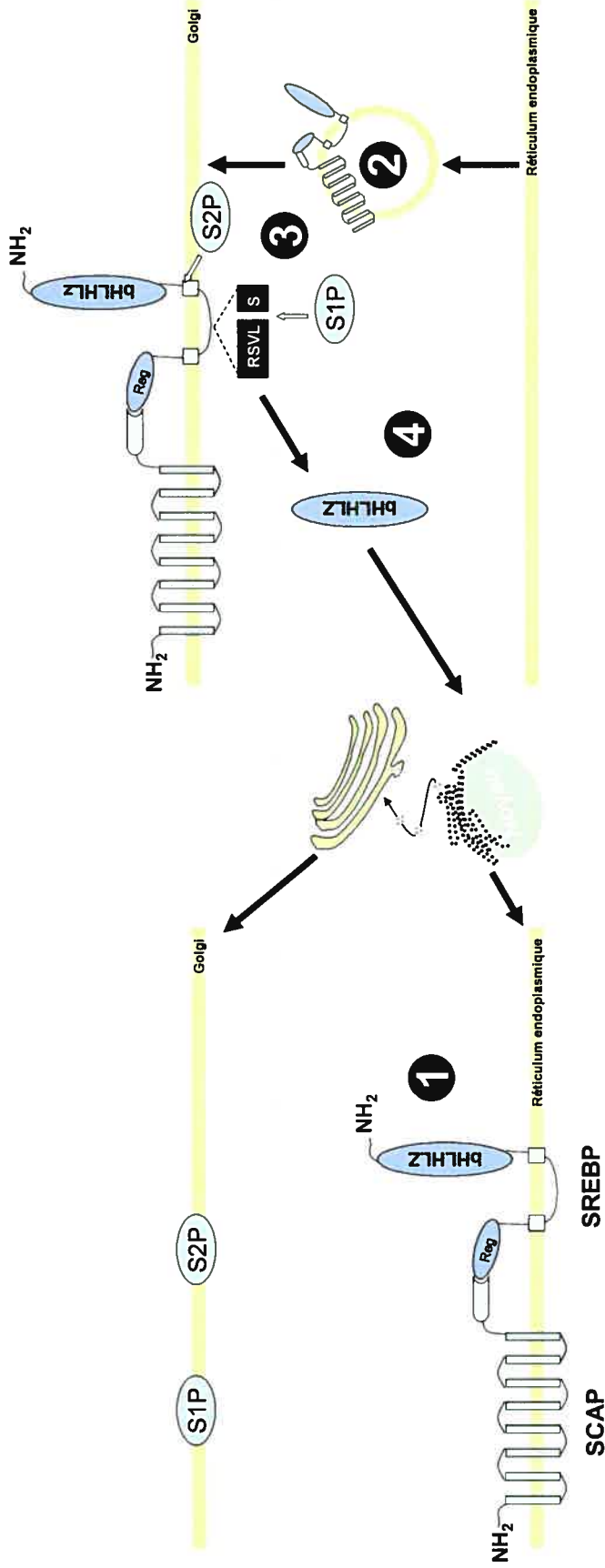
Autrement, SREBP1c est exprimé dans les tissus lipogéniques (Shimomura *et al.* 1997). Chez le porc, l'expression de l'ARNm de SREBP1c se retrouve principalement dans le tissu adipeux (Ding *et al.* 1999), alors que chez d'autres espèces, on retrouve aussi son expression dans le tissu adipeux brun et blanc, le foie, et les reins (Rosen *et al.* 2000).

Activation de SREBP1c

SREBP1c est synthétisée sous la forme d'une protéine de 125kDa, attachée au réticulum endoplasmique (**RE**). À cet endroit, elle adopte une conformation en « épingle à cheveux » et comprend trois domaines (Brown et Goldstein, 1997). Du côté N-terminal, on retrouve le domaine « basic helix-loop-helix-leucine-zipper » (**bHLHLZ**) qui fonctionne comme un facteur de transcription et fait face au cytosol (figure 6). Le deuxième domaine, servant d'ancrage à la membrane plasmique, consiste en deux répétitions d'environ 90 aa séparées par une boucle d'environ 30 aa hydrophiliques, se retrouvant dans le lumen du RE. Finalement, le dernier domaine, se trouvant dans le cytosol, contient un élément de régulation qui lie la protéine « SREBP cleavage-activating protein » (**SCAP**) (Goldstein *et al.* 2002). Cette protéine, comportant huit domaines transmembranaires, est nécessaire au mouvement des SREBP du RE à l'appareil de Golgi (Brown et Goldstein, 1997; Goldstein *et al.* 2002).

L'activation du facteur de transcription SREBP se produit lorsqu'il y a un manque de stérols intra-cellulaires, incluant le cholestérol (figure 6, étape 1 et figure 6, étape 2). Dans ce cas, le manque de cholestérol membranaire va permettre le transport de SREBP/SCAP du RE vers l'appareil de Golgi (figure 6, étape 2). Cependant, le mécanisme exact de cette régulation n'est pas encore connu (McPherson et Gauthier, 2004). Une fois dans le Golgi, SREBP va être clivé par la sérine protéase « Site-1-Protéase » (**S1P**), suivie de la zinc métalloprotéase « Site-2-Protéase » (**S2P**), libérant le fragment N-terminal bHLHLZ de 68kDa (figure 6, étape 3) (Goldstein *et al.* 2002). Ce fragment bHLHLZ va être transloqué jusqu'au noyau (figure 6, étape 4) et va former des homo- ou hétérodimères (ex. SREBP1c/SREBP2). Il est à noter que les hétérodimères de SREBP1c sont de moins bons activateurs de la transcription des gènes que les homodimères de SREBP1a et SREBP2 (Datta et Osborne, 2005). Une fois dimérisée,

SREBP va activer la transcription de gènes cibles contenant dans leur région promotrice des motifs « E-box », ou encore des répétitions directes de « sterol-regulatory elements » (**SRE**) (Goldstein *et al.* 2002).



HAUT taux de cholestérol BAS taux de cholestérol

Figure 6. Schéma des étapes menant à l'activation des SREBP. Étape 1. Si le taux de cholestérol intracellulaire est élevé, SREBP, liée à SCAP, se retrouve à la surface du réticulum endoplasmique; Étape 2. Si le taux de cholestérol intracellulaire diminue, il y a translocation de SREBP/SCAP jusqu'au Golgi; Étape 3. Il se produit alors le clivage de SREBP par les protéases S1P et S2P, libérant le fragment bHLHLZ; Étape 4. Ce fragment de SREBP va alors être transloqué jusqu'au noyau de la cellule, où il activera la transcription de gènes contenant des motifs « E-box » ou SRE. Schématisé d'après McPherson et Gauthier (2004).

Dans le cas de SREBP1c, son activation amène la transcription de plus de 20 gènes impliqués dans le transport et la synthèse des acides gras polyinsaturés (PUFA), la synthèse du cholestérol et l'adipogenèse dont certains sont énumérés au tableau 3.

Tableau 3. Exemple de gènes activés par la famille des SREBP. Adapté de Goldstein *et al.* (2002), Kim *et al.* (1998), Kita *et al.* (2005), McPherson et Gauthier (2004), Shiromura *et al.* (1997).

Gènes et fonctions	Action de SREBP1c sur le niveau d'expression de l'ARNm
Transport et synthèse des lipides	
Fatty Acid synthase	↑
Acétyl-coA synthétase	↑
Acétyl-coA carboxylase	↑
Stéaroyl-coA désaturase	↑
Récepteurs LDL (avec SREBP2)	↑
Adipogenèse	
PPAR γ	↑
SREBP1c	↑
Adiponectine	↑

De plus, SREBP1 est impliquée dans la synthèse des stéroïdes, via son action sur la synthèse du cholestérol et l'activation de la protéine « steroidogenic acute regulatory protein » (**StAR**). Cette dernière module la synthèse de la pregnenolone via le transport du cholestérol intracellulaire jusqu'à la membrane interne des mitochondries, où se produit la conversion du cholestérol en pregnenolone par la « P450 side-chain cleavage » (**P450ssc**) (Shea-Eaton *et al.* 2001; Stocco et Clark, 1996; Sugawara *et al.* 1995).

Régulation de l'expression des SREBP

Alors que SREBP1a est exprimée à de très bas niveaux et de manière constitutive dans plusieurs tissus (Shimomura *et al.* 1997), SREBP1c et SREBP2 contiennent tous les deux des éléments SRE dans leur promoteur, et peuvent ainsi s'autoréguler (Sato *et al.* 1994).

De plus, l'expression de l'ARNm de SREBP1c ainsi que son clivage protéique, dans la membrane, sont inhibés par les PUFA (Hannah *et al.* 2001; Xu *et al.* 2002). L'insuline augmente aussi l'expression de l'ARNm de SREBP1c (Shimomura *et al.* 1999). Inversement, l'abondance des ARNm de SREBP1c et la lipogenèse sont diminués par le glucagon et l'AMPc (Shimomura *et al.* 2000).

1.5.6. Différenciation terminale des adipocytes

Après l'expression des C/EBP, menant à l'activation de la transcription des PPAR, le processus de lipogenèse (i.e. la synthèse *de novo* de triacylglycérols et leur incorporation dans les adipocytes) peut commencer (figure 2). Pendant cette phase terminale de différenciation, les adipocytes acquièrent une sensibilité à l'action de l'insuline par l'augmentation du nombre de récepteurs à l'insuline et de transporteurs du glucose (Garcia de Herreros et Birnbaum, 1989). De plus, l'activité protéique et l'expression des ARNm des gènes, impliqués dans la synthèse des lipides, augmentent de 10 à 100 fois (Grégoire *et al.* 1998; Spiegelman *et al.* 1983; Spiegelman *et al.* 1993). Finalement, une augmentation dans l'expression des gènes responsables du transport des acides gras se produit également (Spiegelman *et al.* 1983) et la production et la relâche d'adipokines, par les adipocytes, débutent (Grégoire *et al.* 1998; Grégoire, 2001).

1.6 Lipogenèse

La lipogenèse est le processus par lequel se produit la synthèse des triacylglycérols qui composent la majeure partie de la réserve énergétique humaine et porcine (Coleman *et al.* 2000; Mersmann *et al.* 1997). Cette synthèse est suivie d'un stockage des acides

gras à l'intérieur d'une structure entourée d'une simple membrane lipidique, le liposome. Les liposomes en formation se fusionnent pour devenir des gouttelettes lipidiques (Lawrence et Fowler, 2002). Chez l'humain, la lipogenèse se produit principalement dans le foie tandis que chez le porc, celle-ci s'effectue principalement dans les adipocytes (Guesnet et Demarne, 1987). Il existe deux voies permettant la production de triglycérides par les adipocytes: 1) la synthèse à partir d'acides gras se retrouvant dans la circulation sanguine ou, 2) la synthèse *de novo* d'acides gras via la voie du glucose (figure 7).

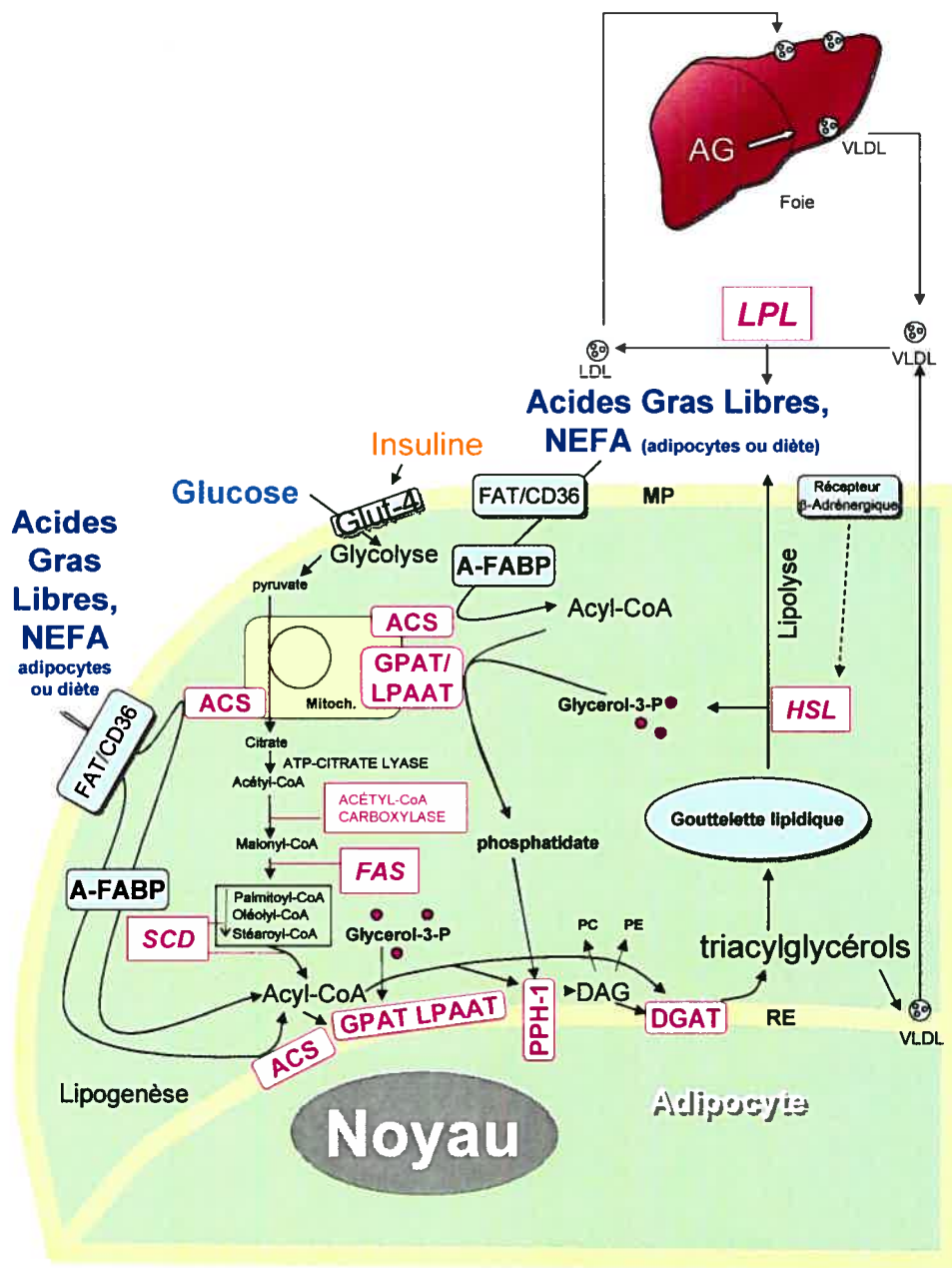


Figure 7. Schéma de la synthèse et de la dégradation du triacylglycérol. Adapté de Coleman *et al.* (2000). Abréviations: ACS: Acyl-coA synthétase, A-FABP: Adipocyte-Fatty Acid Binding Protein, AG: Acides Gras, DAG: Diacylglycérol, DGAT: Diacylglycérol acyl transférase, FAS: Fatty Acid synthase, FAT/CD36: Fatty acid translocase, LPL: Lipoprotéine Lipase, HSL: Hormone-Sensitive Lipase, GLUT4: glucose transporter-4, GPAT: Glycérol-3-Phosphate Acyl Transférase, HDL: lipoprotéines de haute densité, LPAAT: lysophosphatidique acide acyltransférase, LDL: lipoprotéines de faible densité, MP: Membrane plasmique, NEFA: Acides gras non-estérifiés, PE: Phosphatidyléthanolamine, PC: Phosphatidylcholine, PPH-1: Phosphopyruvate hydrolase 1, SCD: Stéaroyl-coA Désaturase, RE: Réticulum endoplasmique. VLDL: lipoprotéines de très faible densité.

1.6.1 Lipogenèse par incorporation d'acides gras libres

La synthèse du triacylglycérol dans les adipocytes se fait rarement via la synthèse *de novo* d'acides gras mais plutôt par incorporation, dans les adipocytes, d'acides gras libres provenant de complexes lipoprotéiques plasmatiques appelés lipoprotéines (Frayn *et al.* 2003). Les lipoprotéines les plus riches en triglycérides sont les chylomicrons. Ces derniers sont synthétisés par l'intestin via le transfert d'acides gras alimentaires. Également, les lipoprotéines de très faible densité (VLDL), synthétisées par le foie, participent au transport des acides gras jusqu'aux adipocytes (figure 7). L'étape initiale du stockage des acides gras dans les adipocytes est l'hydrolyse des lipoprotéines plasmatiques et des VLDL par la lipoprotéine lipase extracellulaire (LPL) produite par les adipocytes. Ainsi, les acides gras sanguins sont estérifiés en acides gras non estérifiés (NEFA), capables de traverser la membrane plasmique des adipocytes (Shrago *et al.* 1969; van der Vusse *et al.* 2002). L'expression de l'ARNm de la lipoprotéine lipase est d'ailleurs considérée comme un signe précoce de différenciation (figure 2). Cependant, l'expression de la LPL n'est pas exclusive aux adipocytes (Grégoire *et al.* 1998).

Contrôle de l'entrée des acides gras dans les adipocytes

En solution aqueuse, tel que le sang, les NEFA sont virtuellement insolubles (Fisher *et al.* 2002). La solubilisation et le transport efficace des NEFA dans la circulation sanguine vont se faire via la liaison des NEFA à l'albumine plasmique (Abumrad *et al.* 1999). Une fois dans le cytoplasme, les NEFA seront ré-estérifiés. Cependant, dans le sang, une certaine proportion des acides gras ne sont pas liés à l'albumine plasmique et peuvent ainsi pénétrer dans les cellules par simple diffusion. On parle alors d'acides gras libres (Abumrad *et al.* 1999).

Deux modèles tentent d'expliquer l'absorption des acides gras dans les adipocytes (figure 7). Le premier implique la simple diffusion des acides gras à travers la membrane suivant un gradient transmembranaire de concentrations, de pH ou de charges (non illustré; Febbraio *et al.* 2002). Le deuxième modèle implique l'action de protéines

membranaires qui permettent la dissociation des acides gras de l'albumine et facilitent leur transport à l'intérieur des adipocytes. Une de ces protéines est le récepteur CD36 ou « Fatty Acid Transporter » (**FAT/CD36**) (Abumrad *et al.* 1999). CD36 est une glycoprotéine de 88 kDa. Elle est exprimée à la surface de cellules ayant une haute activité métabolique pour les acides gras tels que les adipocytes, les myocytes cardiaques et les cellules des muscles squelettiques (Abumrad *et al.* 1993; Greenwalt *et al.* 1992).

L'expression de CD36 est sous le contrôle du récepteur nucléaire PPAR γ (Teboul *et al.* 2001), et est augmentée par les acides gras à longues chaînes (Abumrad *et al.* 1999). On considère ainsi FAT/CD36 comme un marqueur tardif de la différenciation des adipocytes (Abumrad *et al.* 1991; Teboul *et al.* 2001). Du côté métabolique, l'inhibition de la traduction des ARNm de CD36 dans des cultures de préadipocytes murins 3T3-F442A, conduit à une diminution de l'expression de l'ARNm LPL, allant de paire avec une diminution de l'incorporation de lipides par les adipocytes (Sfeir *et al.* 1999).

Contrôle intracellulaire des acides gras dans les adipocytes

À l'intérieur des adipocytes, les acides gras libres sont liés à des protéines cytoplasmiques ayant le même rôle que l'albumine extracellulaire i.e. rendre les acides gras solubles dans la cellule tout en les séquestrant à l'intérieur de celle-ci. Une des protéines effectuant cette fonction est la protéine « Adipocyte-specific fatty acid-binding protein » (**A-FABP**) aussi appelé **aP2** (Armstrong *et al.* 1990). Cette protéine est exclusivement exprimée dans les adipocytes et est l'une des huit membres identifiés de la famille des « fatty acid-binding protein » (**FABP**) (Veerkamp *et al.* 1993). A-FABP est un marqueur précoce de la différenciation des adipocytes, et se retrouve sous le contrôle transcriptionnel de PPAR γ et des C/EBP (Gerbens *et al.* 1998; Hunt *et al.* 1986). À l'intérieur des adipocytes, où elle constitue 1-3% des protéines solubles, A-FABP a pour rôle spécifique le transport des acides gras au site de synthèse des phospholipides (triglycérides), ainsi qu'au site d'oxydation des acides gras (Veerkamp *et al.* 1993).

Stockage des acides gras dans les adipocytes

Finalement, la transformation en triacylglycérols, forme de stockage des acides gras dans les adipocytes, peut se résumer par la liaison des acides gras à longues chaînes à leur coenzyme A (coA) thioester via l'acyl-coA synthase (ACS) (figure 7). Ce produit est alors estérifié en phosphatidate par l'action séquentielle du glycérol-3-phosphate acyle transférase (GPAT) et de la lysophosphatidique acide acyltransférase (LPAAT) (Coleman *et al.* 2000). Ce composé est alors hydrolysé en diacylglycérol (DAG) et finalement acylé en triacylglycérol par la diacylglycérol acyl transférase (DGAT) (Coleman *et al.* 2000).

1.6.2 Lipogenèse par la voie du glucose

Contrôle de l'entrée du glucose dans les adipocytes

La première étape de l'utilisation du glucose par les adipocytes est, comme pour les acides gras, son passage à travers la membrane plasmique. L'utilisation du glucose par les muscles et les adipocytes est stimulée par l'insuline, qui maintient l'homéostasie plasmique du glucose (Saltiel et Kahn, 2001). Le transport du glucose vers l'intérieur des cellules est accompli par une famille de transporteurs de glucose, les « glucose transporters » (GLUT) (Minokoshi *et al.* 2003). Le transporteur GLUT4, sensible à l'action de l'insuline, est la forme la plus répandue dans les muscles squelettiques et le muscle cardiaque, ainsi que dans le tissu adipeux chez l'humain, le rat et le porc (Chiu *et al.* 1994; Minokoshi *et al.* 2003; Zorzano *et al.* 1989). Cependant, on retrouve aussi le transporteur de glucose GLUT1 chez le rat (Zorzano *et al.* 1989) ainsi que le transporteur GLUT5, qui a une haute affinité pour le fructose, dans le tissu musculaire et adipeux humain (Shepherd *et al.* 1992).

En condition normale, le transporteur GLUT4 serait séquestré dans le cytoplasme, à l'intérieur de vésicules de transport, alors que le transporteur GLUT1 est présent dans la membrane plasmique des cellules. L'activation des récepteurs de l'insuline résulterait dans la translocation des vésicules contenant GLUT4 jusqu'à la membrane plasmique, où il se produirait une fusion, résultant en une augmentation de la capacité des cellules à incorporer le glucose extracellulaire (Saltiel et Kahn, 2001). Fait intéressant, certaines

formes de résistance à l'insuline, menant au développement du diabète de type II et à l'obésité chez l'humain, seraient liées à une déficience dans la fonction du transporteur GLUT4 ou dans sa localisation cellulaire (Saltiel et Kahn, 2001).

Utilisation du glucose intracellulaire dans les adipocytes

Une fois le glucose à l'intérieur de l'adipocyte, il sera utilisé comme substrat dans les voies métaboliques de la glycolyse et du cycle du citrate (figure 7). Le citrate ainsi libéré des mitochondries, qui ne peuvent relâcher l'acétyl-coA directement faute de transporteurs, va alors servir de substrat à la formation d'acétyl-coA via l'action de l'ATP citrate lyase. L'acétyl-coA sera par la suite converti en malonyl-coA par l'acétyl-CoA carboxylase. Ce produit servira à la synthèse du palmitoyl-coA et autres acides gras à longues chaînes par l'enzyme « fatty acid synthase » (**FAS**) (Wakil, 1989). Par la suite, il sera oxydé en oléic-coA ou en acyl-coA par la stéaroyl-coA désaturase (**SCD**) (Zhang *et al.* 1999) et converti en triacylglycérols par la voie de synthèse normale (section 1.6.1).

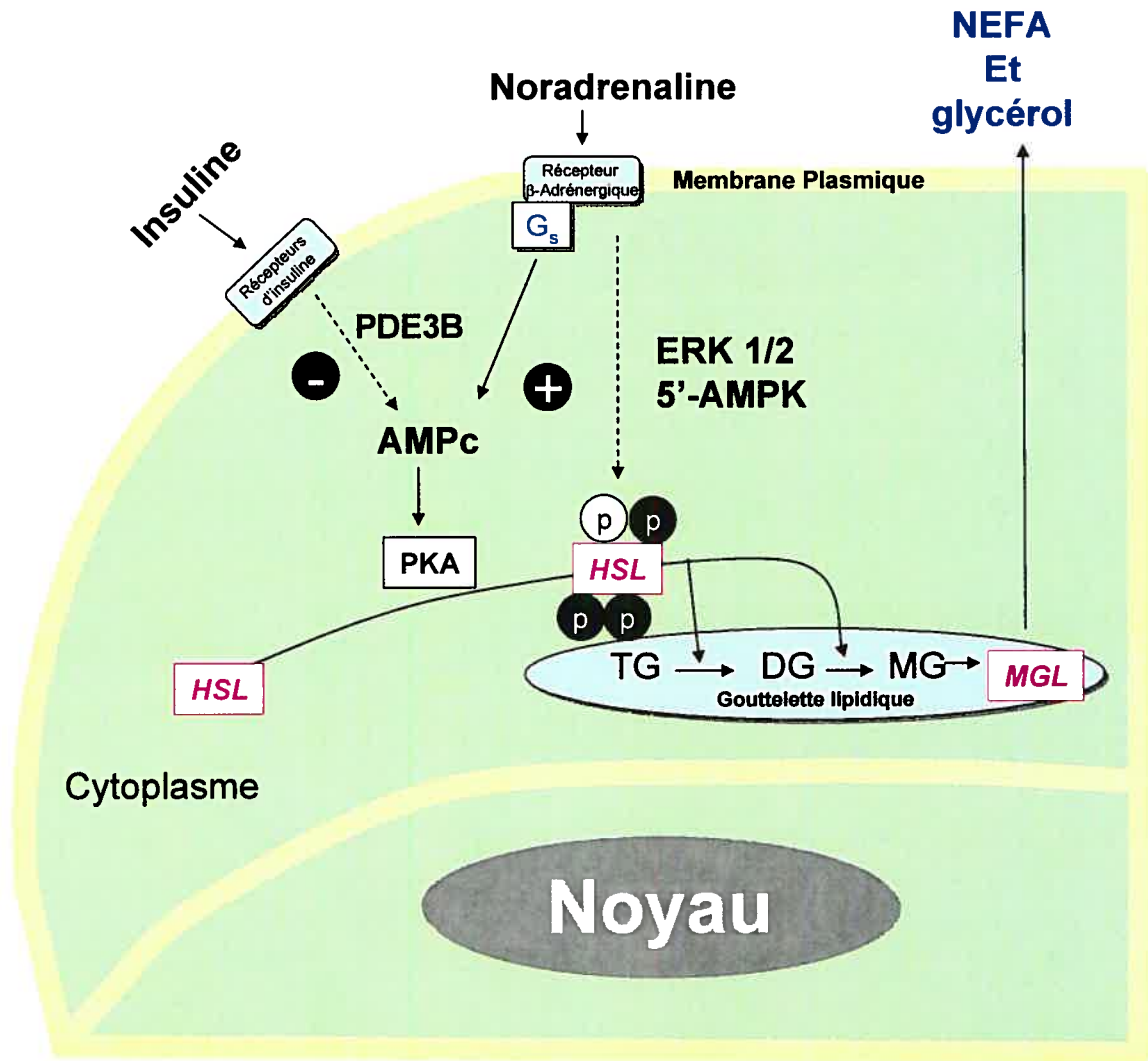


Figure 8. Schéma de la dégradation des triacylglycérols. Adapté de Holm (2003). L'activation par phosphorylation de « l'hormone sensitive lipase » via les récepteurs β -adrénergiques. Cette phosphorylation impliquerait l'action de la protéine kinase A (PKA) sur trois résidus sérine. De plus, une quatrième phosphorylation pourrait impliquer la 5'-AMPK (en blanc). Abréviations : 5'-AMPK, « 5'-AMP-activated protein kinase », AMPc, adénosine-5'-monophosphate cyclique; DG, diacylglycérol; ERK1/2, « Extracellular signal-regulated kinase » 1 et 2; Gs, « stimulatory-G-protein »; HSL, « Hormone sensitive lipase »; MG, monoacylglycérol; MGL, « monoglyceride lipase »; p, phosphate; PDE3B, phosphodiesterase 3B; PKA, protéine kinase A; TG, triacylglycérol.

1.7 Lipolyse

La lipolyse est le processus par lequel les acides gras contenus dans les adipocytes sont relâchés des triglycérides pour être oxydés et produire de l'énergie ou être exportés dans la circulation sanguine (Mersmann, 1998). Dans les adipocytes, ce processus implique l'hydrolyse des triglycérides qui est catalysée par deux enzymes: la lipase hormono-sensible (**HSL**) et la « monoglyceride lipase » (**MGL**) (figure 8; Holm *et al.* 2000; Mersmann, 1998). La HSL est cependant l'enzyme limitante puisqu'elle peut hydrolyser tous les triacylglycérols et diacylglycérols, les esters de cholestérols, ainsi que les esters de stéroïdes. La MGL, quant à elle, hydrolyse les monoglycérides en NEFA et glycérol (Holm *et al.* 2003).

L'activation de la HSL, et ainsi de la lipolyse, est principalement contrôlée par la phosphorylation de la HSL, dans un système de régulation de type « cascade » (voir figure 8), par la protéine kinase A (**PKA**), sur trois résidus sérine (Egan *et al.* 1992). Suite à la liaison d'un agoniste tel que les cathécholamines (ex. noradrénaline), à un récepteur β -adrénergique, il y aurait activation des protéines « stimulatory-G-protein » (**Gs**) et une agmentation de la concentration intracellulaire d'AMPc (Hausman *et al.* 1993; Holm *et al.* 1989). Cette augmentation entrainerait l'activation de la PKA et phosphorylation de la HSL. Une fois phosphorylée, il y aurait translocation de la HSL du cytosol vers les goutellettes lipidiques, lieu de dégradation des triacylglycérols (Holm, 2003). De plus, la HSL pourrait être phosphorylée sur un quatrième résidu sérine, via la voie des protéines kinases activées par les « extracellular-signal-regulated kinase 1 and 2 » (**ERK1/2**) et la 5'-AMP-activated protein kinase (**5'-AMPK**), qui aurait plutôt un rôle inhibiteur (Greenberg *et al.* 2001; Watt *et al.* 2004).

Ce modèle d'activation permet d'expliquer, en partie, les effets de l'insuline sur la lipolyse. Ainsi, l'insuline, en induisant la phosphorylation et l'activation de la phosphodiesterase de type 3 (**PDE3B**), inhibe ce mécanisme d'activation de la HSL en diminuant la concentration d'AMPc intracellulaire. (Degerman *et al.* 1997). De plus, un rétrocontrôle de la HSL s'effectue via les différents acides gras libérés par l'hydrolyse des triglycérides (ex. acide oléique et les monoacylglycérols) (Holm *et al.* 2000). Ce

rétrocontrôle peut cependant être inhibé par l'action de A-FABP qui, séquestrant certains acides gras, empêche leur action sur HSL (Shen *et al.* 1999).

Bien qu'exprimé dans différents tissus, il n'y a pas de différences d'expression des transcripts de la HSL entre les différents dépôts de tissu adipeux chez l'humain (Lefebvre *et al.* 1998; Montagne *et al.* 1998). Cependant, chez le rat, l'expression des transcripts de la HSL dans les tissus adipeux est plus faible chez les individus obèses comparativement aux rats de poids normal (Pagano *et al.* 2004).

1.8 Expression des adipokines

Tel que mentionné précédemment, la différenciation terminale des adipocytes amène l'expression et la relâche de certaines adipokines par les adipocytes matures suite à des stimuli ou à des changements métaboliques de l'organisme (Grégoire *et al.* 1998; Kim et Moustaid-Moussa, 2000). Celles-ci auront d'ailleurs pour rôle la régulation de l'homéostasie de l'organisme (Kadowaki et Yamauchi, 2005), ce qui confère du même coup un rôle d'organe endocrinien au tissu adipeux. La plus connue et étudiée des adipokines est la leptine, identifiée en 1994 (Zhang *et al.* 1994; Trayhurn et Beattie, 2001). Cette protéine de 16kDa, issue du gène *obese*, a un rôle de signal à long terme des réserves d'énergies de l'organisme, stockées dans le tissu adipeux (Fliers, 2004). Elle contribue au maintien du poids corporel en modulant les dépenses énergétiques globales de l'organisme et la prise alimentaire. Aussi, chez le porc comme chez l'humain, une augmentation de la masse corporelle est corrélée avec une augmentation du taux de leptine plasmatique (Kennes *et al.* 2001; Ostlund *et al.* 1996).

Depuis, d'autres adipokines ont été identifiées chez le porc comme chez l'humain incluant la résitin, l'interleukin-6, le tumor-necrosis factor- α , l'adiponectine et «l' angiopoietin-like 4 » (ANGPTL4) (Flier, 2004; Kobayashi, 2005; Yoon *et al.* 2000).

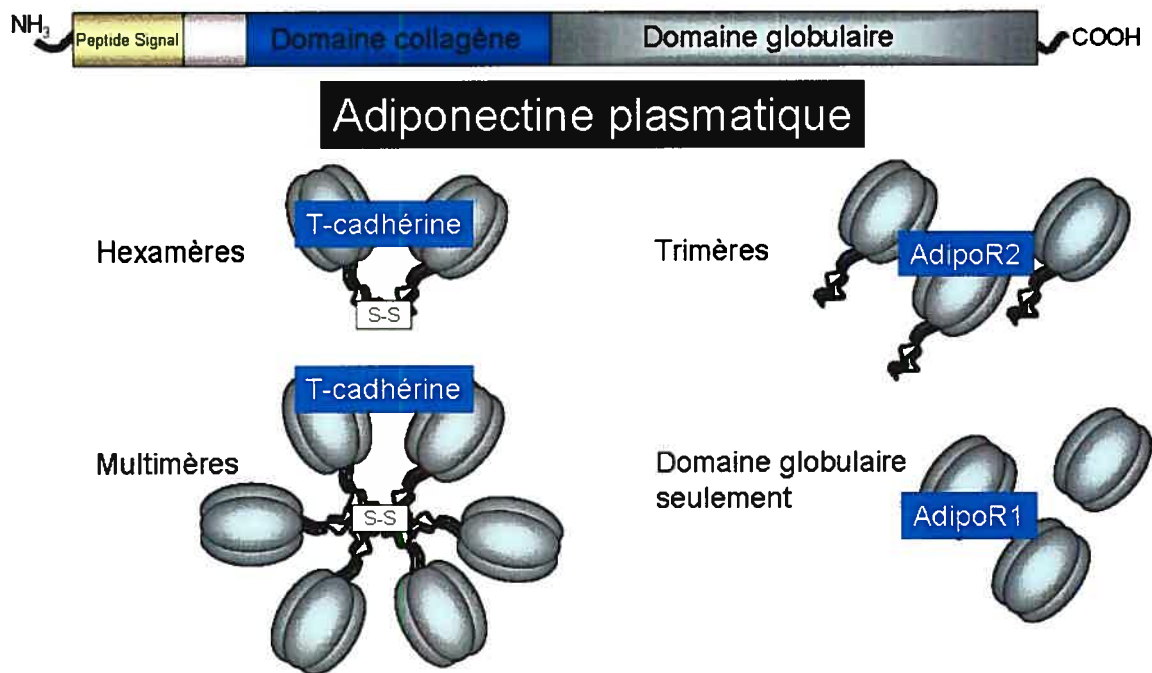


Figure 9. Représentation schématique des différentes formes et structures de l'adiponectine plasmatique. D'après Hug *et al.* (2004) et Tsao *et al.* (2003).

1.8.1 L'adiponectine

L'adiponectine est une protéine sécrétée uniquement par les adipocytes différenciés (Maeda *et al.* 1996; Scherer *et al.* 1996). Elle est une adipokine anti-diabétique qui contrôle le métabolisme des lipides et des phosphates chez les mammifères en agissant sur l'oxydation des acides gras et le transport du glucose via des récepteurs spécifiques (Diez et Iglesias, 2003). Cette protéine, codée par le gène *aPM1* (adipose most abundant gene transcript 1) (Maeda *et al.* 1996), est connue sous plusieurs noms en raison de son identification simultanée, chez la souris et chez l'humain, par différentes équipes. Ainsi, chez la souris, on la nomme : AdipoQ ou Acrp30 (adipocyte complement-related protein of 30kDa) (Hu *et al.* 1996; Scherer *et al.* 1995), tandis que chez l'homme, elle est nommée : GBP28 (gelatin-binding protein of

28 kDa) (Nakano *et al.* 1996). Deux récepteurs de cette adipokine ont été identifiés jusqu'à présent (Yamauchi *et al.* 2001) et seront discutés dans la prochaine section (section 1.8.2).

L'adiponectine humaine comporte 244 aa (Maeda *et al.* 1996, Nakano *et al.* 1996) tandis que l'adiponectine porcine en compte 243 aa (Jacobi *et al.* 2004) et est 83% et 81.5% identique à la séquence humaine (Scherer *et al.* 1995) et de souris (Maeda *et al.* 1996), respectivement. Sa structure cristalline montre une certaine homologie avec les membres de la famille des TNF (Shapiro et Scherer, 1998). Elle comprend une séquence peptide signal, responsable de sa translocation aux organelles, une région hypervariable, ainsi qu'un domaine globulaire dans sa partie carboxy-terminale (**C-terminal**) qui serait responsable de sa liaison aux récepteurs. Elle possède aussi un domaine collagène dans sa partie amino-terminale (**N-terminal**) (figure 9; Maeda *et al.* 1996). Ce domaine collagène est formé de séquences peptidiques répétées Gly-X-Y ou Gly-X-Pro, formant une triple hélice. Celui-ci montre une homologie avec la famille du complément C1q et permet la liaison de l'adiponectine au collagène de type I, III et V *in vitro* (Okamoto *et al.* 2000).

Les transcrits de l'adiponectine se retrouvent dans le tissu adipeux chez l'humain, la souris, le singe et le rat (Arita *et al.* 1999). Chez le porc, des transcrits l'adiponectine ont été observés, comme chez l'humain, dans le tissu adipeux, mais aussi dans le tissu musculaire squelettique (Jacobi *et al.* 2004; Lord *et al.* 2005). Toutefois, on peut aussi retrouver l'expression de l'ARNm de l'adiponectine dans les hépatocytes soumis à un traitement par l'interleukine-6 ou par le chloroforme. Cependant, dans ce cas, la production de la protéine n'a pas été démontrée (Yoda-Murakami *et al.* 2001).

L'adiponectine plasmatique, régulation et contrôle

On retrouve l'adiponectine circulante dans le sang, mais aussi dans le cerveau (Qi *et al.* 2004). Elle peut être sous la forme d'homotrimères liés par des ponts disulfures (figure 9; Tsao *et al.* 2003). On peut également retrouver des hexamères et des multimères d'adiponectine. Ces structures tertiaires et quaternaires permettent la régulation de voies métaboliques différentes dans l'organisme (Waki *et al.* 2003, Tsao

et al. 2003). Aussi, un clivage protéique du domaine globulaire de l'adiponectine peut se produire dans la circulation sanguine. On nomme alors cette portion globulaire de 17kDa se retrouvant dans le plasma : adiponectine globulaire (Fruebis *et al.* 2001).

Contrairement aux autres adipokines connues, tel que la leptine, la résistine et le TNF- α , dont les niveaux plasmatiques sont augmentés dans les maladies reliées aux problèmes d'obésité, les niveaux d'expression de l'ARNm de l'adiponectine dans le tissu adipeux, ainsi que sa concentration dans le plasma sanguin, sont diminués chez les personnes souffrant d'obésité, de diabète de type II, et de maladies coronariennes (Arita *et al.* 1999; Halleux *et al.* 2001; Hotta *et al.* 2000; Stefan *et al.* 2002). L'action de l'adiponectine est de plus mise en évidence dans les souris déficientes en adiponectine qui développent une résistance à l'insuline et du diabète de type II (Kubota *et al.* 2002; Maeda *et al.* 2002). De plus, dans un autre modèle murin, l'injection d'adiponectine dans la circulation sanguine diminue les niveaux de glucose sanguin et améliore la résistance à l'insuline de ces souris (Yamauchi *et al.* 2001). Chez le porc, les animaux présentant une adiposité élevée ont aussi une concentration plasmatique plus faible en adiponectine comparativement aux animaux plus maigres (Jacobi *et al.* 2004).

Au niveau transcriptionnel, le gène de l'adiponectine est sous le contrôle de plusieurs facteurs de transcription puisque sa région promotrice comprend des sites de liaisons pour : les PPAR, C/EBP α , ainsi que SREBP (Rosen *et al.* 2001; Saito *et al.* 1999). De plus, on retrouve parmi les régulateurs de l'expression de l'adiponectine, l'insuline, le TNF- α et certains glucocorticoïdes tel le dexaméthasone (Fasshauer *et al.* 2002). Sa sécrétion par les adipocytes est diminuée en présence d'androgènes tel que la testostérone (Page *et al.* 2005; Xu *et al.* 2005a). Chez l'humain, cette régulation par les androgènes explique le plus haut taux plasmatique d'adiponectine retrouvé chez la femme (Bottner *et al.* 2004). Cependant, il est à noter que la ménopause n'influence pas l'expression de cette adipokine (Arita *et al.* 1999; Combs *et al.* 2003).

Au niveau fonctionnel, l'action de l'adiponectine est d'abord anti-inflammatoire puisqu'elle réprime l'activation de NF- κ B, un régulateur transcriptionnel important des cytokines pro-inflammatoires (Ajuwon et Spurlock, 2004; Jhun *et al.* 2004; Wulster-

Radcliffe *et al.* 2004). Elle agit directement dans la régulation du tissu adipeux en agissant sur la sensibilité des tissus à l'action de l'insuline via une augmentation de « l' adenosine 5'monophosphate kinase » (**5'-AMPK**), de l'activité de PPAR α (Berg *et al.* 2001; Combs *et al.* 2003; Yamauchi *et al.* 2003), mais aussi en augmentant l'expression de l'ARNm de PPAR γ 2 dans les adipocytes (Ajuwon et Spurlock, 2004). Elle a aussi une action sur les muscles squelettiques, où elle accroît l'oxydation des acides gras libres (Yamauchi *et al.* 2001), ainsi que sur le foie (Berg *et al.* 2001; Yamauchi *et al.* 2003). Finalement, l'adiponectine aurait un effet antiangiogénique puisque l'injection d'adiponectine dans un modèle tumoral murin réduit significativement la croissance de la tumeur et la néovascularisation de celle-ci en plus d'activer les caspases -3, -8 et -9 (Brakenhielm *et al.* 2004).

1.8.2 Récepteurs de l'adiponectine

Clonés récemment (Yamauchi *et al.* 2003), deux récepteurs de l'adiponectine ont été identifiés chez la souris, l'humain (Yamauchi *et al.* 2003) et le porc (Ding *et al.* 2004; Lord *et al.* 2005). Les récepteurs nommés : AdipoR1 et AdipoR2, n'ont pas la même affinité pour les différentes formes et structures de l'adiponectine retrouvées dans la circulation sanguine (figure 9). Ces deux récepteurs sont des membres distants de la famille des récepteurs couplés à la protéine G contenant 7 domaines transmembranaires puisque la partie extracellulaire de ces récepteurs est plutôt petite comparativement aux autres membres et qu'ils présentent une topologie différente au niveau N-terminal (Yamauchi *et al.* 2003). AdipoR1 lie principalement l'adiponectine globulaire et, avec une plus faible affinité, la forme entière. D'autre part, AdipoR2 lie ces deux formes avec une affinité intermédiaire (Yamauchi *et al.* 2003). Cette liaison entraînerait l'activation par phosphorylation de la voie des des «mitogen-activated protein kinase» (**MAPK**), qui serait responsable d'une partie des effets de l'adiponectine dans la cellule (Yamauchi *et al.* 2002; Kadowaki et Yamauchi, 2005).

Récemment, un troisième récepteur a été identifié, lequel se lie aux formes hexamériques et multimériques de l'adiponectine. Ce récepteur, la cadhérine-T (truncated), est aussi appelée cadherine-13 (**CDH13**) ou cadhérine-H (heart) (Hug *et al.*

2004; Ranscht et Dours-Zimmermann, 1991). Cette protéine extracellulaire, liée à la membrane plasmique via une liaison glycosyl phosphatidylinositol, n'a pas de domaine cytoplasmique et donc, doit interagir avec un autre récepteur cellulaire pour transmettre son signal (revue par Ivanov *et al.* 2001). Cependant, celui-ci n'a pas encore été identifié (Adachi *et al.* 2005; Hug *et al.* 2004).

Chez la souris et l'homme, les récepteurs de l'adiponectine AdipoR1 et AdipoR2 sont exprimés dans la plupart des tissus à des niveaux variables (Yamauchi *et al.* 2003). La forme AdipoR1 se retrouve principalement dans les muscles squelettiques, où elle est associée au contrôle de l'oxydation des acides gras. D'autre part, le récepteur AdipoR2 se retrouve principalement au niveau hépatique et contrôlerait l'entrée du glucose dans ce tissu (Yamauchi *et al.* 2003). Chez le porc, l'expression de l'ARNm des récepteurs de l'adiponectine est détectée dans le cœur, le foie, les muscles squelettiques, le pancréas et le tissu adipeux (Ding *et al.* 2004) mais aussi dans les poumons, l'estomac et l'utérus (Lord *et al.* 2005). De plus, l'expression de l'ARNm de AdipoR1, mais non de AdipoR2, se retrouve dans les ovaires et le cerveau porcine alors que l'ARNm de AdipoR2 se retrouve aussi dans les cellules de la granulosa (Ledoux *et al.* à paraître; Lord *et al.* 2005). Pour ce qui est du récepteur cadhérine-T, aucune étude n'a encore vérifié l'expression de ce récepteur dans les tissus porcins. Par contre, une étude rapporte son expression dans les artères des glandes mammaires porcines (Qin *et al.* 2003). Chez l'homme, on retrouve l'expression de la cadhérine-T dans les cellules endothéliales des capillaires sanguins de cellules tumorales (Adachi *et al.* 2005) ainsi que dans le cœur, l'aorte, la carotide, l'artère illiaque et l'artère rénale (Ivanov *et al.* 2001).

Contrôle de l'expression des récepteurs de l'adiponectine

Dû à leur récente identification, très peu d'information est disponible sur le contrôle de l'expression des récepteurs de l'adiponectine dans les différents tissus. Cependant, les niveaux d'expression des récepteurs AdipoR1 et AdipoR2 sont réduits chez les personnes souffrant d'obésité, ce qui réduit la sensibilité des tissus de ces personnes à l'action de l'adiponectine, amenant l'apparition progressive de diabète de type II et autres problèmes connexes (Kadowaki et Yamauchi, 2005). Dans ce contexte, il est surprenant de constater que certains acides gras non-saturés, tel l'oléate,

augmentent l'expression des récepteurs de l'adiponectine dans les cellules β du pancréas (Kharroubi *et al.* 2003). De plus, l'expression de l'ARNm des récepteurs AdipoR1 et AdipoR2 est aussi augmentée pendant la différenciation des préadipocytes murins 3T3-L1 (Asshauer *et al.* 2004). Autrement, l'expression des deux récepteurs de l'adiponectine dans ces cultures de 3T3-L1 n'est pas influencée par l'insuline, la triiodothyronine (T3), les glucocorticoïdes (dexaméthasone) et le TNF- α (Asshauer *et al.* 2004). Cependant, le rosiglitazone, un agoniste de PPAR γ , augmente l'expression de l'ARNm de AdipoR1 dans le tissu adipeux mais la diminue dans le tissu musculaire (Tan *et al.* 2005a). Finalement, un agoniste des récepteurs de l'adiponectine, l'osmotin, a été identifié récemment. Cette protéine, via sa liaison aux récepteurs AdipoR1 et AdipoR2, active la voie des MAPK, importante dans la transduction du signal de l'adiponectine dans les cellules (Narasimhan *et al.* 2005). Finalement, l'hormone de croissance (GH) aurait un effet positif sur l'expression de l'ARNm de AdipoR2 chez les 3T3-L1 (Asshauer *et al.* 2004).

Pour ce qui est de la cadhérine-T, son implication dans la transduction du signal de l'adiponectin étant trop récente, aucune étude ne porte sur sa régulation. Par contre, elle pourrait être responsable des effets de l'adiponectine sur l'angiogenèse puisque ceux-ci impliquent principalement les structures multimériques et hexamériques de l'adiponectine (Hug *et al.* 2004).

1.8.3 Facteur nécrosant α (TNF- α)

Le facteur nécrosant α est une cytokine pro-inflammatoire produite principalement, mais non exclusivement, par les macrophages (Pennica *et al.* 1984). Le tissu adipeux est également une importante source de TNF- α (Hotamisligil *et al.* 1993).

Outre son rôle dans la défense immunitaire (Beutler et Cerami, 1989), cette protéine non glycosylée de 17kDa influence aussi le métabolisme du glucose et l'homéostasie des lipides dans l'organisme (Grunfeld et Feinfol, 1991). Les niveaux circulants de TNF- α sont élevés chez les rongeurs servant de modèles d'obésité ainsi que chez les patients insulino-résistants présentant une certaine obésité (Hotamisligil *et*

al. 1995, Katsuki *et al.* 1998). Cependant, ces résultats sont controversés car certaines études n'ont pas détecté de TNF- α dans la circulation sanguine humaine (Hotamisligil *et al.* 1995) ou encore, n'ont détecté aucune augmentation des niveaux circulant de TNF- α chez les personnes souffrant d'obésité (Bruun *et al.* 2003). D'autres études ont cependant rapporté une augmentation des transcrits de TNF- α ainsi qu'une plus grande sécrétion par le tissu adipeux chez les humains souffrant d'obésité (Kern *et al.* 2001).

De manière similaire, l'expression de TNF- α (ARNm et protéines) est plus importante chez les porcs présentant un poids corporel plus élevé par rapport à ceux présentant un poids corporel faible (Chen *et al.* 2004). Cette expression est aussi augmentée avec l'âge chez le porc (Chen *et al.* 2004). De plus, l'injection d'œstrogène en début de gestation (jours 9 et 10) augmente l'expression de l'ARNm de TNF- α dans le tissu utérin des embryons au jour 15 de la gestation (Yu *et al.* 1998). Ainsi, le TNF- α pourrait jouer un rôle important dans la mortalité embryonnaire résultant de la production d'œstrogènes par le conceptus en début de gestation (voir section 2.5.4).

Au niveau fonctionnel, TNF- α inhibe l'expression de l'ARNm de l'adiponectine chez les 3T3-L1 (Fasshauer *et al.* 2002). TNF- α bloque aussi les voies de transmission du signal de l'insuline en inhibant l'activité tyrosine kinase des récepteurs de l'insuline (Hotamisligil *et al.* 1994). De plus, il a été démontré que le TNF- α inhibait aussi l'expression de l'ARNm de la LPL et du transporteur GLUT4 dans des cultures primaires de préadipocytes humains, menant à une diminution de la différenciation des préadipocytes en adipocytes (Hauner *et al.* 1995). De plus, cette inhibition stimule la lipolyse des adipocytes, contribuant ainsi à une augmentation des taux plasmatiques en acides gras menant à une augmentation de la résistance à l'insuline dans les tissus périphériques (Boden, 1997; Ryden *et al.* 2004). TNF- α pourrait aussi réguler certaines voies d'apoptose chez les adipocytes (Prins *et al.* 1997). Finalement, chez le porc, on retrouve l'expression des récepteurs de TNF- α dans le corpus luteum (CL) (Hehnke-Vagnoni *et al.* 1995; Miyamoto *et al.* 2000) et les cellules de la granulosa (Nakayama *et al.* 2003). D'ailleurs, l'expression intense des ARNm de TNF- α , ainsi que ses récepteurs, dans les cellules de la granulosa pourrait être un signal de prolifération et de

survie cellulaire important durant l'atrésie folliculaire chez le porc (Nakayama *et al.* 2003).

1.8.4 Angiopoietin-like 4 (ANGPTL4)

L'angiopoietin-like 4 (ANGPTL4) est une glycoprotéine qui a été identifiée simultanément par plusieurs groupes de recherche (revue par Kersten, 2005). Aussi appelée PGAR (PPAR γ angiopoietin related), FIAF (Fasting-induced adipose factor) ou HFARP (hepatic fibrinogen/angiopoietin-related protein), cette adipokine est sécrétée principalement par le tissu adipeux et le placenta, mais se retrouve aussi dans le coeur, les muscles squelettiques, le foie et les reins chez la souris (Kersten *et al.* 2000; Kim *et al.* 2000; Wiesner *et al.* 2004; Yoon *et al.* 2000). Jusqu'à maintenant, chez le porc, aucune étude n'a été réalisé sur l'expression de cette adipokine.

Structurellement, ANGPTL4, comprend une séquence signale en N-terminal suivie d'un domaine hélicoïdal et d'un domaine « fibrinogen-like » dans sa partie C-terminal. Comme l'adiponectine, on la retrouve dans la circulation sanguine sous forme de multimères liés par des ponts disulfures (Ge *et al.* 2003). Suite à un clivage protéolytique de son domaine « fibrinogen-like », on peut aussi retrouver l'ANGPTL4 sous la forme d'un monomère dans le plasma (Ge *et al.* 2004). Chez l'humain, ce clivage protéique semble être dépendant du tissu exprimant la protéine, le tissu adipeux sécrétant la forme entière alors que le foie sécrète la forme clivée (Mandard *et al.* 2004).

L'augmentation des ARNm de ANGPTL4, en conditions hypoxiques, dans des cultures de cellules endothéliales, de cardiomyocytes et mésenchymateuses humaines, pourrait indiquer un rôle de cette protéine dans le processus d'angiogenèse, qui est le principale rôle des angiopoïétines (Belanger *et al.* 2002; Fink *et al.* 2004; Le Jan *et al.* 2003). ANGPTL4, contrairement aux angiopoïétines, est incapable de lier le récepteur à tyrosines kinases Ti2, lequel est impliqué dans la maturation des vaisseaux sanguins, la maintenance de l'intégrité de l'endothélium vasculaire et l'angiogenèse (Ward et Dumont, 2002). Ainsi, le récepteur de cette adipokine reste à identifier. Cependant, les différentes structures et formes de ANGPTL4 (clivée ou normale) exercent des contrôles

différents sur le métabolisme des lipides *in vitro*, chez des 3T3-L1 (Mandard *et al.* 2004), ce qui porte à croire que plusieurs récepteurs pourraient transmettre le signal de cette adipokine.

L'expression de ANGPTL4 est sous le contrôle de PPAR γ , lequel augmente son expression (Kersten *et al.* 2000). L'expression de ANGPTL4 est aussi contrôlée par l'état nutritionnel de l'organisme. Ainsi, chez la souris, l'expression de ANGPTL4 dans le tissu adipeux, le foie et l'hypothalamus est induite en période de jeûne (Wiesner *et al.* 2004; Yoon *et al.* 2000). De plus, ANGPTL4 inhibe l'activité de la LPL chez la souris et favoriserait ainsi la lipogenèse et le contenu sanguin en triglycérides (Ge *et al.* 2004; Mandard *et al.* 2006; Yoshida *et al.* 2002).

2. La reproduction chez la truie

La fertilité chez le porc est influencée par plusieurs facteurs comprenant : l'âge de la puberté, le nombre de porcelets sevrés par la truie, ainsi que l'intervalle entre les différentes gestations. Dans les 20 dernières années, la pression sélective sur les populations porcines a amené l'amélioration de la déposition en protéines au détriment du tissu adipeux porcin. Ainsi, une diminution de l'ordre de 40% a été observée dans l'épaisseur de gras dorsal chez les porcs de race pure, par rapport à leur poids à l'abattage. Il est maintenant reconnu qu'un excès ou un manque de tissu adipeux a des impacts négatifs sur la reproduction porcine (Schneider, 2004). Ainsi, une faible adiposité résulte en une augmentation du temps requis pour le premier oestrus, une diminution des tailles de portées et une augmentation de l'intervalle sevrage-saillie fécondante (Chen *et al.* 2003; Gaughan *et al.* 1997; Holm *et al.* 2004). Les effets de l'augmentation du gras corporel sur la taille des portées sont multiples, mais des effets ont été confirmés sur le taux d'ovulation ainsi que la survie embryonnaire (Gaughan *et al.* 1997; Willis *et al.* 2003). De plus, l'analyse de données sur plusieurs générations de truies démontre que les truies maigres produisent moins de portées, et des portées de plus petite taille, pendant leur période reproductive comparativement aux truies plus grasses (Gaughan *et al.* 1995).

2.1 Importance du tissu adipeux dans les caractères de reproduction

2.1.1 Les adipokines dans la reproduction

Chez l'homme, une portion significative de la population infertile est obèse (Norman et Clark, 1998). L'adipokine leptine qui est un signal de satiété pour l'organisme, est reconnue pour ses multiples effets positifs sur la reproduction via son action sur le tissu ovarien, le placenta et l'axe neuroendocrinien (revue par Barb *et al.* 2005). Ces effets sont modulés via les récepteurs de la leptine qui se retrouvent chez le porc principalement dans le foie, le pancréas, les poumons, le cerveau mais aussi dans les reins, les testicules, les ovaires, le CL, la thèque et la granulosa (Ruiz-Cortés *et al.* 2000). Beaucoup d'autres adipokines sont maintenant connues comme étant produites par le tissu adipeux porcin. De plus, certains récepteurs des adipokines ont été identifiés dans les tissus reproducteurs porcins.

La première confirmation d'un lien entre l'expression de ces adipokines et la reproduction vient de l'observation de certains modèles animaux. Par exemple, les souris qui ne produisent pas de leptine sont infertiles, mais peuvent le devenir après administration de leptine recombinante (Chehab *et al.* 1996). Cependant, les souris n'exprimant pas l'adiponectine demeurent fertiles (Ma *et al.* 2002) et c'est plutôt la surexpression d'adiponectine qui entraîne l'infertilité (Combs *et al.* 2004).

Les niveaux circulants de plusieurs adipokines sont augmentés lors de la puberté. C'est le cas de la leptine chez le porc (Qian *et al.* 1999), ainsi que l'adiponectine et la résistine chez l'humain (Brown *et al.* 2005; Combs *et al.* 2003). Des études *in vitro* et *in vivo*, chez le rat, rapportent que la leptine a un rôle central sur la relâche de gonadolibérine (**GnRH**), par l'hypothalamus, ainsi que sur la relâche de l'hormone lutéinisante (**LH**) et l'hormone folliculo-stimulante (**FSH**) par l'hypophyse (De Biasi

et al. 2001; Nagatani *et al.* 1998; Ogura *et al.* 2001). Le jeûne, ainsi que la perte de gras corporel par l'organisme, peuvent normalement influencer la magnitude des sécrétions de GnRH. Des études *in vitro* ont montré que la leptine pouvait influencer la relâche de GnRH ainsi que stimuler la relâche de LH et de FSH chez le porc (Barb, 1999). Aucune étude n'a encore démontré un effet de l'adiponectine ou de ANGPTL4 sur la relâche des gonadotropines. Cependant, on retrouve des récepteurs de l'adiponectine dans le cerveau porcine (Lord *et al.* 2005), suggérant ainsi un effet possible sur la relâche de LH et de FSH.

Une autre action possible des adipokines pourrait être sur la stéroïdogénèse (revue par Mitchell *et al.* 2005). Une étude rapporte que la leptine peut augmenter, *in vitro*, la relâche de progestérone et d'œstrogène par les follicules porcins. De plus, cet effet varie selon le stade de développement des follicules et selon les niveaux de LH et de FSH présents (Gregoraszcuk *et al.* 2003). La leptine, à des doses physiologiques, stimule la relâche de progestérone par les cellules de la granulosa porcine *in vitro* alors que de fortes doses l'inhibe (Ruiz-Cortes *et al.* 2003).

Une étude chez le rat rapporte que la leptine diminue le taux d'ovulation de ceux-ci (Duggal *et al.* 2000). Chez le porc, il a aussi été démontré que la leptine augmente la maturation nucléaire des oocytes, *in vitro* (Craig *et al.* 2004).

2.1.2 Les facteurs de transcription dans la reproduction

Certains récepteurs nucléaires, normalement associés au développement du tissu adipeux, ont aussi un rôle important sur la reproduction. Ainsi, bien que les souris n'exprimant pas SREBP1c soient fertiles (Liang *et al.* 2002), les souris n'exprimant pas PPAR γ présentent des défauts au niveau du placenta, de la différenciation du trophoblaste ainsi que dans le processus de vascularisation en début de gestation (Barak *et al.* 1999). PPAR γ régule l'incorporation d'acides gras par les trophoblastes (Schaiff *et al.* 2005). Une étude récente a démontré que PPAR γ inhibait l'expression de VEGF dans des cellules utérines humaines, via la présence d'un PPRE dans le promoteur de ce gène (Peeters *et al.* 2006). Or, une étude de Vonnahme et Ford (2003), chez des porcs de race

Yorkshire, a démontré que les truies sélectionnées pour une haute efficacité placentaire (i.e. le poids des porcelets divisé par le poids du placenta) présentaient une augmentation dans l'expression de l'ARNm du récepteur de VEGF-R1 et de VEGF dans le placenta, au jour 90 de la gestation. Les phénomènes d'angiogenèse sont essentiels lors de l'attachement du trophoblaste à l'endomètre utérin (section 2.2.4 et 2.2.5), la présence confirmée de PPAR γ dans l'endomètre porcine (Lord *et al.* sous presse) pourrait donc avoir une importance sur la reproduction porcine.

Il a été rapporté que plus de 90% des embryons de souris n'exprimant pas PPAR δ présentent de sérieux problèmes développementaux, principalement dues à une malformation du placenta (Barak *et al.* 2002). Aussi, la forte expression de PPAR δ , au site d'implantation dans l'utérus murin en présence d'un blastocyste actif, laisse présager un rôle possible dans l'implantation (Lim *et al.* 1999; Ding *et al.* 2003). Les problèmes retrouvés chez les souris n'exprimant pas PPAR δ sont comparables à ceux trouvés chez les souris n'exprimant pas la cyclooxygénase-2 (COX-2), où l'implantation des blastocystes est déficiente (Lim *et al.* 1997; Lim *et al.* 1999). L'administration d'un ligand synthétique spécifique à PPAR δ , le L-165,041, en combinaison à de l'acide 9-cis rétinolique rétablit l'implantation chez ces souris COX-2^{-/-} (Lim *et al.* 1999). L'expression de PPAR δ (mRNA et protéine) est retrouvée dans l'endomètre porcine (Lord *et al.* sous presse), ce qui suggère pas un rôle important de celui-ci sur la reproduction porcine.

2.2 Gestation et puberté chez la truie

La gestation chez la truie dure en moyenne 114 jours. L'ovulation se produit à tous les 21 jours (Rothschild et Bidanel, 1998). On considère généralement le taux de fécondité chez la truie comme étant de 100% (Kemp et Soede, 1997).

La puberté correspond au premier œstrus et à la première ovulation. C'est aussi l'œstrus qui correspondant à la phase où la truie est réceptive au verrot (Beach, 1976). Le temps requis entre la naissance et la puberté varie selon la race porcine, la génétique et certains facteurs environnementaux (ex. la nutrition). Ainsi, différentes hormones influencent l'âge du premier oestrus y compris la LH, l'insuline, les oestrogènes et les

adipokines (Martinat-Botté *et al.* 1996; Gaughan *et al.* 1997). Chez le porc, la durée de la phase lutéale du cycle oestral est de 14 jours et débute par la formation des corps jaunes. La phase folliculaire, qui correspond à la croissance des follicules pré-ovulatoires et qui se termine par l'ovulation, s'étale de 5 à 6 jours (Martinat-Botté *et al.* 1996). L'oestrus chez la truie s'étale généralement de 24 à 96 heures (Soede *et al.* 1995) et est initié par les oestrogènes provenant des follicules pré-ovulatoires (Huff et Esbenshade, 1989).

2.2.1 Initiation de l'ovulation

Au début de la phase folliculaire, la sécrétion pulsative de LH augmente, stimulant la production d'oestrogènes par les follicules antraux. Au delà d'une certaine concentration, les oestrogènes induisent une décharge de LH qui déclenche alors l'ovulation, 30 à 35 heures après ce pic initial (Grant *et al.* 1989; Soede *et al.* 1994). Débute alors la phase lutéale, la formation du CL, à partir des cellules de la granulosa et de la thèque interne des follicules (Niswender *et al.* 1994). Sous la pulsation de la sécrétion de LH, il y a lutéinisation des cellules folliculaires qui produisent alors de la progestérone. Après l'ovulation, cette production de progestérone augmente pour atteindre son maximum au jour 13, et chute, suite à la lutéolyse du CL. Chez le porc, la prostaglandine F2 α (PGF2 α), sécrétée par l'endomètre utérin, est la substance lutéolytique limitant le maintien du CL (Bazer *et al.* 1984; Bazer *et al.* 1986).

2.2.2 Développement embryonnaire précoce

Les processus se déroulant entre la fertilisation et l'initiation de l'implantation sont généralement bien conservés chez les différentes espèces de mammifères (McLaren, 1982). Chez le porc, après la fertilisation dans l'oviducte, l'ovocyte passe de six à huit heures au stade de 2 cellules et entre 20 h à 24 h au stade de 4 cellules (Flint, 1981). Cette première partie du développement embryonnaire est contrôlée par des ARNm d'origine maternelle présents dans l'ovocyte (Prather, 1993). Par contre, à partir de ce stade de 4 cellules, environ 48h après l'ovulation, la synthèse d'ARNm par l'ovocyte porcin débute (Prather, 1993) alors que l'entrée dans l'utérus se produit 48 h à 72 h après l'ovulation (revue par Stroband et van der Lende, 1990). Le stade de

blastocyste, composé de 16 à 32 cellules, est atteint aux jours cinq et six de la gestation (Papaioannou et Ebert, 1988). Chez le porc, la rupture de la zone pellucide se déroule aux jours 6 à 7 de la gestation. Le blastocyste acquiert alors la capacité de s'implanter (Papaioannou et Ebert, 1988).

2.2.3 Reconnaissance de la gestation chez la truie

La concentration protéique du blastocyste augmente d'environ 15 fois durant les jours 8 et 9 de la gestation, où le blastocyste s'accroît de 0.2 mm à 10 mm de diamètre (Geisert *et al.* 1982a). Bien qu'il possède, dès ce stade, les protéines nécessaires à la réalisation de la synthèse protéique, cette accumulation de protéines dans le blastocyste serait principalement due à une accumulation de protéines utérines (Beier *et al.* 1983). À ce stade, un signal du conceptus est nécessaire pour la poursuite de la gestation, qui serait sinon terminée par l'initiation de la lutéolyse du CL. Ce signal doit ainsi se produire au plus tard au jour 12 de la gestation chez cette espèce et les conceptus doivent occuper les deux cornes utérines pour qu'il y ait maintien de la gestation (Dhindsa et Dzuil, 1968).

Chez le porc, ce signal de maintien de la gestation serait la relâche d'œstrogènes par les blastocystes sphériques au jour 11 ou 12 de la gestation (Geisert et Yelich, 1997). Cette sécrétion est mesurable dans les blastocystes à partir d'un diamètre de 5-7 mm et augmente rapidement durant la phase d'expansion du blastocyste. Ce plus, cette fenêtre de relâche des œstrogènes est très importante chez le porc puisque la relâche d'œstrogènes au jour 10.5 va favoriser la mort embryonnaire plutôt que le maintien de la gestation (Morgan *et al.* 1987; Roberts *et al.* 1993).

Au niveau fonctionnel, cette relâche d'œstrogènes par le conceptus va réorienter la sécrétion de la PGF2 α (responsable de la lutéolyse) de la circulation sanguine vers l'intérieur du lumen utérin, où il y aura séquestration (Bazer *et al.* 1984; Bazer *et al.* 1986). De plus, chez le porc, une deuxième phase de sécrétion d'œstrogènes se produira entre les jours 15 et 30 de la gestation (Bazer *et al.* 1988).

Cette reconnaissance de la gestation va entraîner de profonds changements morphologiques au niveau du conceptus. Ceux-ci permettront l'établissement de voies de communication complexes à l'interface conceptus-maternel impliquant, entre autres, des cytokines, des hormones stéroïdiennes et des prostaglandines (Chabot *et al.* 2004).

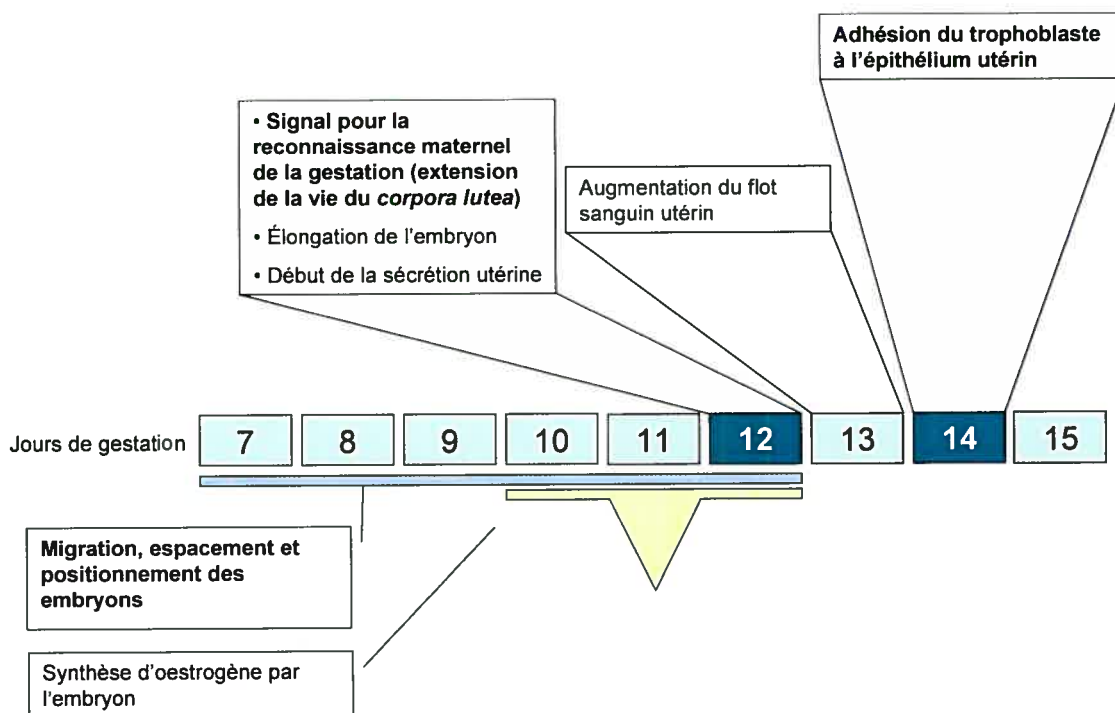


Figure 10. Évènements majeurs de la deuxième semaine de gestation chez le porc. Adapté de Roberts *et al.* (1993).

2.2.4 Période de péri-implantation

Au jour 10 de la gestation, l'embryon porcin est au stade de blastocyste. Il présente une forme sphérique et se déplace librement dans les cornes utérines (Geisert *et al.* 1982a). Le développement des conceptus porcins est souvent mesuré selon le diamètre des blastocystes. Aussi, au jour 11, les blastocystes porcins, présents dans la lumière utérine, diffèrent grandement, leur diamètre pouvant atteindre de un à plusieurs millimètres (Anderson, 1978; Barends *et al.* 1989).

Entre les jours 11 et 12 de la gestation, certains conceptus entreprennent une rapide phase de différenciation et d'expansion de leur membrane trophoblastique, menant à leur élongation (figure 10) (Geisert *et al.* 1982b). Cependant, cette phase n'est pas coordonnée puisque tous les conceptus ne sont pas au même stade de développement (Geisert *et al.* 1982b).

Durant cette phase, l'embryon s'allonge et change morphologiquement, passant d'une forme sphérique de 10 mm de diamètre à une forme tubulaire pouvant atteindre 20 à 40 mm de longueur. À la fin de cette phase, le trophoblaste aura une structure filamenteuse pouvant atteindre jusqu'à 100 mm de longueur (Geisert *et al.* 1982b). Au niveau cellulaire, cette élongation n'est pas seulement due à une augmentation de l'activité mitotique, ou hyperplasie, des cellules (Pusateri *et al.* 1990), mais implique également une réorganisation du cytosquelette du trophoblaste et de l'endoderme (Mattson *et al.* 1990). Cependant, les mécanismes déclenchant ce processus d'élongation ne sont pas encore connus mais seraient influencés par le contenu luminal de l'utérus ainsi que par la présence d'autres embryons dans les cornes utérines (Stroband et van der Lende, 1990). Finalement, cette expansion va définir les limites physiques de l'attachement de l'embryon à la paroi utérine (section 2.2.5) et serait déterminante de la longueur du placenta, pour le reste de la gestation (Wilson et Ford, 2000). De même, cette élongation permettra de définir l'emplacement de chacun des conceptus dans l'utérus, ce qui amènera une certaine compétition pour les nutriments (Geisert et Yelich, 1997) et affecter ainsi la survie embryonnaire (Stroband et van der Lende, 1990).

Effet de la relâche des oestrogènes sur l'endomètre

Le processus d'élongation correspond aussi à la relâche d'oestrogènes par le conceptus. (Roberts *et al.* 1993). Cette sécrétion déclinera, de façon significative, aux jours 14-15 de la gestation, lorsque l'élongation sera complétée (Geisert *et al.* 1982a). Entre autre, l'oestrogène amène une augmentation du calcium (Geisert *et al.* 1982a; Wright *et al.* 1988) ainsi qu'une augmentation de la concentration en « retinol binding protein » (RBP) dans la lumière utérine (Trout *et al.* 1992). De plus, l'oestrogène

augmente la perméabilité vasculaire utérine, le flot sanguin utérin (Ford *et al.* 2002) et maintient un haut taux de récepteurs de l'hormone lutéinisante (LH) dans l'endomètre et le CL porcin. Ces récepteurs de LH seraient impliqués dans la relâche du « vascular endothelial growth factor » (VEGF), un fort promoteur de l'angiogenèse et de la perméabilité vasculaire, dans l'endomètre porcin (Vonnahme *et al.* 2001). Plus tard dans la gestation, chez le porc, le VEGF va jouer un rôle très actif dans la vascularisation ordonnée et progressive du placenta et de la paroi utérine adjacente (Ziecik, 2002).

2.2.5 Endomètre et attachement embryonnaire

Chez le porc, il ne se produit pas de véritable implantation. Par contre, un développement placentaire de type épitheliochoriale, se produit, impliquant que les couches cellulaires maternelles et embryonnaires restent séparées, tout comme leur circulation sanguine respective (Wooding, 1992). L'attachement du trophoblaste porcin à la paroi utérine se produit aux jours 13 et 14 de la gestation pour se terminer au jour 18 (Dantzer, 1985).

Aux jours 8 à 14 de la gestation, il y a une augmentation des jonctions communicantes (tight-junction) entre les cellules épithéliales formant l'endomètre porcin (Johnson *et al.* 1988). Cette augmentation pourrait avoir des conséquences importantes pour le transport des nutriments entre la mère et l'embryon. De plus, chez le porc, la présence du conceptus induit une prolifération locale de l'épithélium utérin luminal (Dantzer, 1985).

Tableau 4. Résumé des différences entre les truies et les conceptus de race Meishan versus les races occidentales

	Caractéristiques	Meishans	Races occidentales	Références
Truie	Adiposité totale	+	-	Camara <i>et al.</i> 1994; Mourot <i>et al.</i> 1996
	Croissance musculaire	-	+	Mourot <i>et al.</i> 1996
	Puberté	3ième ou 4ième mois	6ième ou 7ième mois	Rothchild et Bidanel, 1998
	Capacité utérine	14 à 15 petits par portée	12 petits par portée	Lee <i>et al.</i> 1995
	Petits par portée	3 à 4 de plus que les races occidentales	-	Cheng, 1983; Haley et Lee, 1993
	Croissance des conceptus au jour 30 de la gestation	Plus petits	Plus gros	Ashworth <i>et al.</i> 1992
	Taux d'ovulation au premier oestrus	=	=	Haley et Lee, 1993
	Taux d'ovulation aux oestrus subséquents	+	-	Christenson, 1993
	Distance entre les conceptus (jours 30 à 50)	Plus petite	Plus grande	Galvin <i>et al.</i> 1993; Lee <i>et al.</i> 1995
	Surface placentaire (jours 30 à 50)	Plus petite	Plus grande	Biensen <i>et al.</i> 1998, 1999
Conceptus	Division trophoblastique	Plus lente	Plus rapide	Wilson et Ford, 1997
	Sécrétion d'oestrogènes	Prressive	Normale	Ford, 1997

2.3 Caractères de reproduction, la race Meishan

Le nombre de porcelets par portée est généralement accepté comme étant l'un des facteurs importants de la production porcine. Une augmentation de ce nombre serait bénéfique à la production porcine ainsi qu'à toute l'industrie porcine (Christenson *et al.* 1993). Le nombre de petits par portée (i.e. la taille de portée) est déterminé par plusieurs facteurs incluant: le taux d'ovulation, le taux de fécondation, le taux de survie embryonnaire ainsi que la capacité utérine (Bennett et Leymaster, 1989; Christenson *et al.* 1987; Christenson *et al.* 1993). La capacité utérine est définie comme le nombre de conceptus que l'utérus porcine peut, avec succès, mener à terme durant la gestation (Fenton *et al.* 1972).

Pendant plusieurs années, les tailles de portée sont restées généralement les mêmes en Amérique, oscillant autour de 8.3 porcelets par portée. Différentes stratégies de sélection ont été pratiquées, en particulier sur les caractères de reproduction tels que le taux d'ovulation (Johnson *et al.* 1985) et la capacité utérine (Christenson *et al.* 1987), sans succès. Pour améliorer la prolificité des truies, l'importation en occident de truies hyperprolifiques de race Meishan (truies chinoises) a été réalisée en 1989 (Ford, 1997). Celles-ci produisent de 3 à 4 porcelets de plus par portée, comparativement aux truies Européennes (Cheng, 1983; Haley et Lee, 1993). Cependant, elles présentent des caractères de croissance et de qualité de la viande défavorables, elles ne peuvent donc pas être intégrées à la production porcine occidentale (Bidanel *et al.* 1990; Haley *et al.* 1992).

Les truies de race Meishan sont un modèle particulièrement intéressant pour l'étude du tissu adipeux car elles ont une propension à accumuler beaucoup plus de tissu adipeux que les autres races pour un même poids corporel, tout en ayant une prolificité supérieure (tableau 4; Camara *et al.* 1994; Mourot *et al.* 1996). Les porcs de race Meishan présentent une croissance musculaire beaucoup plus lente que les autres races (Mourot *et al.* 1996). Cependant, cette race porcine présente aussi une maturité sexuelle précoce (Cheng, 1983). Ainsi, les truies de race Meishan atteignent leur puberté au 3 ou

4^{ème} mois, plutôt qu'au 6 ou 7^{ème} mois chez les truies occidentales (Rothchild et Bidanel, 1998). Or, au jour 30 de la gestation, le développement utérin (poids des cornes utérines et surface endométriale totale) est plus important chez les truies Large White que chez les truies de race Meishan (Bazer et al. 1988).

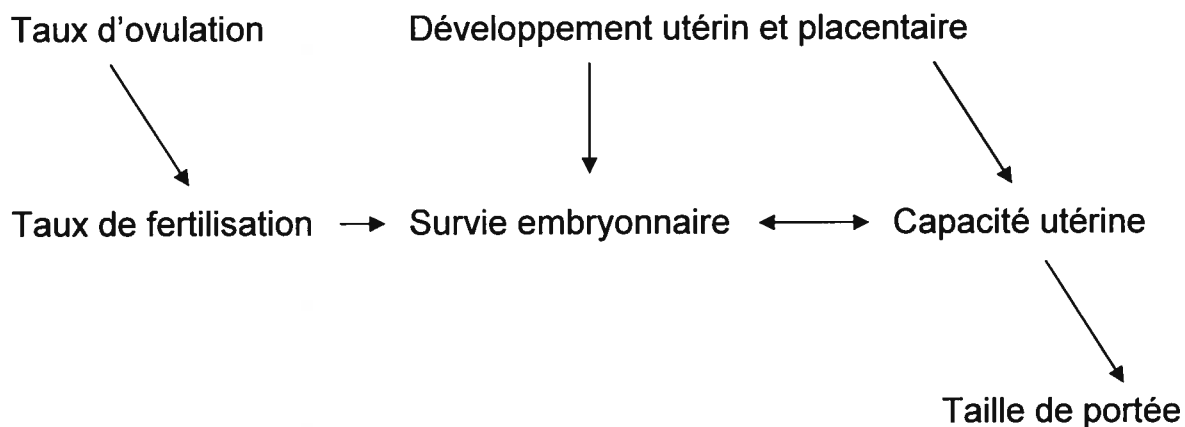


Figure 11. Relation entre les différents facteurs expliquant la taille de portée finale chez le porc. Adapté de Christenson *et al.* (1993).

2.4 Cause de la prolificité des truies Meishan

La prolificité des truies est le résultat de plusieurs facteurs tels que la survie embryonnaire, l'efficacité placentaire et la capacité utérine (Johnson *et al.* 1990). Les truies de race Meishan présentent plusieurs caractéristiques distinctes par rapport aux races occidentales : différence dans le développement embryonnaire, la capacité utérine, le développement et vascularisation placentaire, le taux d'ovulation, le statut hormonal et la survie embryonnaire (figure 11; Christenson *et al.* 1993). Par contre, les facteurs précis expliquant cette supériorité n'ont pas encore été identifiés avec certitude (Town *et al.* 2005; Vallee *et al.* 2003).

2.5 Mortalité embryonnaire

Chez le porc, il y a trois grandes vagues de mortalité embryonnaire (revue par Ford *et al.* 2002). Lors d'une gestation normale, environ 20-30% des embryons sont perdus entre les jours 12 et 18, une période critique pour l'attachement embryonnaire (Stroband et van der Lende, 1990). Cette perte est plus importante chez les truies ayant un plus haut taux d'ovulation (Perry, 1960). Cette mortalité péri-implantation est l'un des facteurs principaux expliquant la réduction de la taille de portée chez la truie (Rothschild et Bidanel, 1998).

La première vague de mortalité embryonnaire serait due à deux phénomènes importants soit : une asynchronie entre le développement des embryons et la réceptivité utérine de la truie (Pope, 1988; Ashworth, 1992). Aux jours 11 et 12 de la gestation, il est commun de retrouver des blastocystes à différents stades de croissance : sphériques, tubulaires et filamenteux (Pope, 1988). La relâche d'œstrogène par les conceptus dont le développement est plus avancé serait le déclencheur de cette vague de mortalité. Ainsi, une étude a démontré que l'injection d'œstrogène intra-utérin aux jours 9 et 10 de la gestation conduit à une forte mortalité embryonnaire, due à l'altération de la réceptivité utérine. De plus, cette injection d'œstrogène entraîne une augmentation des concentrations sanguines en PGF2 α dans l'utérus, favorisant ainsi la lutéolyse (Geisert *et al.* 1982a; Gries *et al.* 1989).

Une augmentation de la concentration en œstrogène stimule aussi l'expression intra-utérine de l'ARNm de la RBP et la libération utérine de rétinol (vitamine A) dont le taux augmente de dix à cinquante fois en moins de quelques heures (Trout *et al.* 1992). Les dérivés du rétinol sont toxiques (Lammer *et al.* 1985), mais toutefois nécessaires, puisqu'une carence entraîne la fin de la gestation chez plusieurs espèces (Thompson *et al.* 1964). Ces derniers seraient requis lors de la phase d'élongation des trophoblastes, étant des facteurs régulateurs de la synthèse de la matrice extracellulaire (MEC) et des molécules d'adhésion cellulaires (Schule *et al.* 1990; Agura *et al.* 1992). De plus, les conceptus, dont le développement est plus avancé, sécrètent plus de RBP que les conceptus au développement plus précoce. Les conceptus plus développés

seraient ainsi mieux protégés des effets cytotoxiques du rétinol comparativement aux autres conceptus (Roberts *et al.* 1993). Toutefois, la nature exacte des mécanismes menant à la dégénérescence de certains conceptus n'a pas encore été identifiée (Roberts *et al.* 1993).

Deux autres périodes semblent critiques à la survie prénatale, soit entre les jours 30 à 40 et 90 à 114, où 10-15% et 5-10% des embryons restants sont perdus, respectivement (revue par Ford *et al.* 2002). L'hypothèse généralement avancée pour expliquer ces deux dernières vagues de mortalité embryonnaire serait un manque d'espace utérin (capacité utérine). Une corrélation négative entre la taille de portée et la survie prénatale des conceptus est d'ailleurs retrouvée chez le porc (Rothchild et Bidanel, 1998).

2.5.1 Effet de la parité sur la survie embryonnaire

La parité de la truie affecte la survie embryonnaire, le taux d'ovulation et la taille de portée. Généralement, les truies multipares ont des tailles de portée et un taux d'ovulation supérieur aux truies nullipares mais, elles présentent aussi une survie prénatale et embryonnaire plus faible (Perry, 1960; Harper *et al.* 1996).

2.5.2 Effet du génotype sur la survie embryonnaire

Des études menées en Angleterre et en France ont montré que la haute prolificité des porcs de race Meishan est principalement due à la génétique de la mère (i.e. la truie) et non au génotype des embryons (Bidanel *et al.* 1989; Haley et Lee, 1990). De plus, le génotype du père ne serait pas un facteur important de la prolificité des truies de race Meishan (Bidanel *et al.* 1989; Haley *et al.* 1995). Finalement, les truies croisées Meishan ont une plus grande prolificité que la moyenne des races pures (Bidanel *et al.* 1989; Haley *et al.* 1995).

2.5.3 Effet de l'environnement utérin sur la survie embryonnaire

L'environnement utérin est un facteur reconnu comme influençant le développement embryonnaire (Roberts et Bazer, 1988). Des différences temporelles dans la composition de l'hystotrophe (le milieu utérin), qui fournit aux embryons les éléments nécessaires à leur développement, ont d'ailleurs été observées entre les truies de race Meishan et Large White (Bazer *et al.* 1991). Durant la gestation, les sécrétions utérines maternelles sont principalement sous le contrôle de la progestérone. Cependant, la production d'œstrogènes par les conceptus amène un changement drastique de la composition chimique de l'hystotrophe, modulant la sécrétion de plusieurs protéines, dont l'utéroferrine (qui transporte le fer vers l'embryon porcin), la RBP ainsi que « l'insulin-like growth factor I » (IGF-I) (Roberts et Bazer, 1988; Roberts *et al.* 1993). Ainsi, chez les truies de race Meishan, la sécrétion de protéines utérines serait plus faible (Vallet *et al.* 1998 ; Wilson et Ford, 1997). Cette différence en apport de nutriments dans le milieu utérin des truies Meishan, pourrait expliquer la plus faible division mitotique des cellules des trophoblastes de celles-ci par rapport à des truies occidentales (Wilson et Ford, 1997).

Finalement, l'embryon peut également modifier l'environnement utérin en sécrétant, entre autre, la prostaglandine E2 (PGE2) (Geisert *et al.* 1982a). Ceci amène la relaxation des artères utérines chez le porc, résultant en une augmentation de la circulation sanguine vers l'utérus et une augmentation des nutriments disponibles pour l'embryon (revue par Krzymowski et Stefanczyk-Krzybowska, 2002).

2.5.4 Effet de la sécrétion d'œstrogène sur la survie embryonnaire

La sécrétion d'œstrogène est plus progressive chez les conceptus de race Meishan, comparativement aux truies de race Yorkshire, ce qui provoquerait des changements moins drastiques de l'environnement utérin. Cela favoriserait une survie plus élevée des embryons étant à un stade de développement moins avancé, et pourrait être un facteur influençant la taille de portée (Ford, 1997; Wilson et Ford, 1997).

Vu cette différence de sécrétion, le gène du récepteur d'œstrogènes (**ESR**) fut identifié comme un candidat potentiel expliquant la prolificité des truies de race Meishan. Ce récepteur d'hormones stéroïdiennes est impliqué, entre autres, dans la régulation de gènes liés au développement (Knowler et Beaumont, 1985). Chez le porc, un polymorphisme d'ADN dans la région codante du gène ESR a été identifié (Rothchild et al. 1996). L'allèle B, identifié chez les porcs de race Meishan, serait associé à des tailles de portée plus élevées. Cependant, certaines études contredisent cet effet (Linville *et al.* 2001).

2.6 Différences entre les embryons Meishan et ceux des races occidentales

Au jour 2 de la gestation, les embryons de truies de race Meishan présentent un taux de division des cellules trophoblastiques plus faible que les embryons Yorkshire (Youngs *et al.* 1993). Cependant, les embryons des deux races atteignent le stade de blastocyste au même moment, soit aux jours 5 et 6 (Wilson et Ford, 1997), bien que le nombre de cellules trophodermiques reste plus faible chez les embryons de race Meishan (Ashworth *et al.* 1990; Rivera *et al.* 1996). Par contre, l'élongation se produit au même moment chez les deux races (Wilson et Ford, 1997).

Au jour 30 de la gestation, les conceptus des porcs de race Meishan sont plus petits que ceux de porcs Landrace x Large White (Ashworth *et al.* 1992). D'autres études ont conclu que les embryons des porcs Meishan se développent, au contraire, plus rapidement et uniformément que les embryons de truies Large White (Bazer *et al.* 1988). D'autres études, utilisant le transfert d'embryons comme moyen d'investigation, ont rapporté que les embryons prélevés chez des truies Meishan sont plus petits et contiennent moins d'ADN que les embryons prélevés au même jour de gestation chez des truies Yorkshire. Par contre, une fois implantés chez des truies de race Yorkshire et Meishan, les conceptus implantés chez les truies de race Yorkshire présentaient un taux de croissance plus important que les conceptus implantés chez des truies Meishan. Cette

dernière étude confirme un rôle important de l'environnement utérin dans le développement embryonnaire (Ford et Youngs, 1993).

2.7 Effet de la capacité utérine sur la prolificité

Une autre explication de la taille de portée supérieure des truies de race Meishan s'explique par une plus grande capacité utérine. Ainsi, la capacité utérine des truies Meishan et des truies Meishan x Landrace a été évaluée à 14 et à 15 porcelets, comparativement à 12 pour les cochettes occidentales (Lee *et al.* 1995). Cette plus grande capacité utérine s'expliquerait par une meilleure utilisation de l'espace utérin, par une plus petite distance entre les différents sites d'attachement embryonnaire, et par une plus faible surface placentaire aux jours 30-50 de la gestation chez les truies de race Meishan (Galvin *et al.* 1993; Lee *et al.* 1995). Une étude de Leenhouders (2001) a d'ailleurs démontré que les animaux présentant un génotype favorable à la survie embryonnaire avaient habituellement des placentas plus petits ainsi qu'une variation dans la taille de portée plus faible.

Chez les truies de race Meishan, cette diminution du développement de la surface placentaire est associée à une croissance réduite des conceptus, qui est cependant compensée, au jour 70 de la gestation jusqu'à la mise-bas, par une augmentation de la vascularisation placentaire (Biensen *et al.* 1998, Biensen *et al.* 1999).

2.8 Effet du taux d'ovulation sur la prolificité

Contrairement à une hypothèse relativement commune, la haute prolificité des truies Meishan ne serait pas due à un plus haut taux d'ovulation (Bolet *et al.* 1986). Ainsi, au premier oestrus, le taux d'ovulation des truies de race Meishan est comparable à celui des truies d'origine occidentale (Haley et Lee, 1993). Par contre, avec l'augmentation du nombre de cycles, le taux d'ovulation augmente plus rapidement chez les truies Meishan (Christenson, 1993). Pour les truies multipares, les truies Meishan présentent aussi un plus grand taux d'ovulation que les truies occidentales (Galvin *et al.* 1993; Wilmut *et al.* 1992). Cependant, la lutéinisation des cellules folliculaires, après le

pic de LH, serait aussi plus rapide chez les truies Meishan, entraînant une augmentation plus rapide de la concentration plasmatique en progestérone (Hunter *et al.* 1996).

Objectifs et hypothèse

Problématique

Le principal rôle du tissu adipeux est d'emmagasiner les acides gras pendant les jours fastes et de les mobiliser pendant les jours de disettes. Il apparaît également que le tissu adipeux peut avoir un rôle d'organe endocrinien important. Celui-ci produit certains facteurs ayant une action sur l'hypothalamus ou autres tissus périphériques afin de réguler divers processus métaboliques qui incluent la reproduction. L'importance du tissu adipeux dans le maintien du cycle oestral et dans les performances reproductrices a été démontré chez les mammifères.

Hypothèse

Certains gènes, qui s'expriment dans le tissu adipeux, sont impliqués non seulement dans la régulation de la masse adipeuse, mais également, directement et indirectement, dans certains caractères de reproduction chez le porc.

Objectifs

Dans un premier temps, les objectifs portaient sur l'expression de l'adipokine adiponectine et de ses récepteurs chez le porc:

1. Déterminer la présence et la distribution de l'expression de l'ARNm de l'adiponectine et de ses récepteurs dans divers tissus porcins, incluant les tissus reproducteurs (ovaires et utérus)
2. Caractériser les niveaux d'ARNm de l'adiponectine et de ses récepteurs dans différents dépôts adipeux (i.e. sous-cutané et viscéral)

3. Étudier sur des cultures de cellules «stromal-vascular» les effets des adipokines leptine et TNF- α sur l'expression de l'adiponectine et de ses récepteurs.

Dans un deuxième temps, les objectifs portaient sur la détermination de l'expression de certains gènes impliqués dans le contrôle de l'adipogénèse dans les tissus reproducteurs porcins :

4. Déterminer l'expression des récepteurs nucléaires PPAR δ , PPAR γ 1, PPAR γ 2, du facteur de transcription SREBP1c et de l'adipokine ANGPTL4 dans l'endomètre porcine.
5. Étudier les corrélations possibles entre le jour de gestation (truie cyclique, au jour 15 et au jour 25) et l'expression de l'ARNm de ces gènes dans l'endomètre porcine.
6. Étudier les corrélations possibles entre la parité des truies et les niveaux d'ARNm de ces gènes dans le tissu utérin.

Chapitre 2. Articles rédigés

Article 1

Expression of adiponectin and its receptors in swine

2.1 Préambule

Cet article montre, pour la première fois, la présence d'ARNm des récepteurs de l'adiponectine dans les tissus reproducteurs porcins. Nous rapportons aussi qu'il n'y a pas de corrélation entre les niveaux circulants d'insuline et de glucose et les niveaux d'ARNm de l'adiponectine dans le gras dorsal (sous-cutané) et viscéral porcine. Chez le porc, nous avons également observé une corrélation négative entre le niveau des ARNm de l'adiponectine dans le gras viscéral et le poids total du gras dorsal, du gras viscéral et de la masse adipeuse totale. Nous avons aussi observé que le niveau d'expression de l'ARNm de l'adiponectine variait selon les races étudiées, ce niveau étant plus élevé chez les porcs de race Ham Line que chez les porcs de race Upton Meishan, mais uniquement dans le gras dorsal. Cette différence n'est cependant pas encore élucidée.

Le niveau d'expression des ARNm des récepteurs de l'adiponectine varie selon les races, mais uniquement dans le gras viscéral. Ainsi, le niveau d'expression de l'ARNm de ceux-ci était réduit chez les porcs obèses de race Upton Meishan, comparativement aux porcs maigres Ham Line. De plus, une corrélation négative entre le niveau de l'ARNm du récepteur AdipoR2 et le poids total du gras dorsal, du gras viscéral et de la masse adipeuse totale a aussi été démontrée. Cependant, aucune corrélation n'a été trouvée pour le récepteur AdipoR1.

Un modèle *in vitro* de différenciation de préadipocytes porcins en adipocytes matures a été utilisé dans cette étude afin de mieux comprendre les mécanismes de régulation de la transcription pour ces gènes. Nous avons ainsi observé que la leptine peut diminuer le niveau d'expression de l'adiponectine, sans avoir d'effet sur ses

récepteurs. Enfin, nous rapportons un effet de $\text{TNF}\alpha$ qui diminue le niveau des transcrits de l'adiponectine et de son récepteur AdipoR2, sans toutefois affecter les transcrits de AdipoR1. Ces derniers résultats suggèrent que $\text{TNF}\alpha$ pourrait interférer sur les fonctions de l'adiponectine, via une diminution de l'expression de l'ARNm de AdipoR2, mais non de AdipoR1, dans le tissu adipeux porcin.

2.2 Contributions à l'article

Cet article présente une version définitive et acceptée d'un article qui a été publié en 2005 dans la revue *Journal of Animal Science*. Pour cet article, j'ai effectué l'optimisation des différentes conditions de Real-Time PCR en collaboration avec Mme. Danièle Beaudry (technicienne du laboratoire). J'ai réalisé la majorité des analyses Real-Time PCR dans les différents tissus adipeux. Les résultats de Real-Time PCR pour les récepteurs AdipoR1 et AdipoR2 ont été réalisés en partie par Mme. Danièle Beaudry. Le clonage de l'adiponectine et de ses récepteurs a été réalisé par Mlle. Sandra Ledoux et Mme. Danièle Beaudry. Enfin, j'ai effectué la totalité des expériences impliquant les cultures de cellules « stromal-vascular » ainsi que les PCR confirmant l'expression des différents transcrits dans différents tissus (i.e. distribution tissulaire des transcrits).

Expression of adiponectin and its receptors in swine^{1,2}

E. Lord^{*}, S. Ledoux^{*}, B. D. Murphy^{*}, D. Beaudry[†], and M. F. Palin^{†3}

^{*}Centre de Recherche en Reproduction Animale, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Quebec, Canada J2S 7C6; and [†]Dairy and Swine Research and Development Center, Agriculture and Agri-Food Canada, Lennoxville, Quebec, Canada J1M 1Z3

ABSTRACT: Adiponectin is an adipocyte-derived hormone that plays an important role in lipid metabolism and glucose homeostasis. Objectives of this study were 1) to determine the presence and distribution of adiponectin and its receptors 1 and 2 (adipoR1 and adipoR2) in porcine tissues; 2) to characterize pig adiponectin, adipoR1, and adipoR2 mRNA levels in various fat depots from three different breeds of pigs; and 3) to study, in stromal-vascular cell culture, the effects of leptin and tumor necrosis factor- α (TNF α) on pig adiponectin, adipoR1, and adipoR2 gene expression. To this end, fat Chinese Upton Meishan (UM, $n = 10$), lean Ham Line (HL, $n = 10$), and Large White (LW, $n = 10$) gilts were used. We report the isolation of partial cDNA sequences of pig adipoR1 and adipoR2. Porcine-deduced AA sequences share 97 to 100% homology with human and murine sequences. Pig adipoR1 mRNA is abundant in skeletal muscle, visceral fat, and s.c. fat tissues, whereas adipoR2 mRNA is predominantly expressed in liver, heart, skeletal muscle, and visceral and s.c. fat tissues. Pig adiponectin mRNA levels in s.c. and visceral fat tissues were not associated with plasma insulin and glucose in fasting animals. Subcutaneous ($r =$

-0.44 , $P < 0.05$), visceral ($r = -0.43$, $P < 0.05$), and total body fat ($r = -0.42$, $P < 0.05$) weights were negatively correlated with adiponectin mRNA levels measured in visceral, but not s.c., fat. Pig adipoR1 and adipoR2 mRNA levels, in visceral fat, were less expressed in fat UM gilts than in the lean HL gilts ($P < 0.05$). Inverse associations were found between s.c. ($r = -0.57$, $P < 0.01$), visceral ($r = -0.46$, $P < 0.05$), and total body fat ($r = -0.56$, $P < 0.01$) weights and adipoR2 mRNA levels in visceral fat only. We were unable to find such associations for adipoR1 mRNA levels in the overall gilt population. The current study demonstrated that TNF α downregulates adiponectin and adipoR2, but not adipoR1, mRNA levels in stromal-vascular cell culture. Moreover, leptin significantly decreased adiponectin mRNA levels, whereas there was no effect on adiponectin receptors. We conclude that adiponectin and adipoR2 mRNA levels, but not adipoR1, are modulated in pig visceral fat tissues. Furthermore, our results indicate that TNF α interferes with adiponectin function by downregulation of adipoR2 but not of adipoR1 mRNA levels in pigs.

Key Words: Adiponectin, Adiponectin Receptors, Fat, mRNA Levels, Pig

©2005 American Society of Animal Science. All rights reserved.

J. Anim. Sci. 2005. 83:565–578

Introduction

Adipose tissue, well known for its function as an energy reservoir, is now recognized as an endocrine organ

¹This work was supported by the National Sciences and Engineering Research Council of Canada Strategic Grant No. 246154 to B. D. Murphy and M. F. Palin, Genetipore Inc. (St-Bernard, QC, Canada), Agriculture and Agri-Food Canada, and Hypor (formerly Genex Swine Group, Regina, SK, Canada). E. Lord is supported by a FPPQ fellowship.

²The authors are grateful to R. Charest for technical assistance, the staff of the Swine Complex for animal care, and S. Methot for statistical analysis. Lennoxville Dairy and Swine R&D Centre Contribution No. 845.

³Correspondence: P.O. Box 90, 2000 Rte. 108 E. (phone: 819-565-9174, ext. 207; fax: 819-564-5507; [redacted]).

Received August 19, 2004.

Accepted December 7, 2004.

that produces numerous proteins with broad biological activities. These include IL-6, tumor necrosis factor- α (TNF α), leptin (Coppack, 2001), resistin (Steppan et al., 2001), and adiponectin (Maeda et al., 1996). Circulating adiponectin levels are decreased in obese human subjects (Arita et al., 1999) and in individuals with type 2 diabetes and coronary artery disease (Hotta et al., 2000). Administration of adiponectin lowers circulating glucose and ameliorates insulin resistance in mice (Yamauchi et al., 2001), and adiponectin-deficient mice develop insulin resistance and diabetes (Kubota et al., 2002; Maeda et al., 2002). In response to the binding of adiponectin, adiponectin receptors 1 (adipoR1) and 2 (adipoR2) mediate intracellular signalling events, including increased adenosine 5'-monophosphate kinase and peroxisome proliferator-activator receptor- α ligand activity, with the consequence of increased fatty

Table 1. Effect of pig genotype on circulating glucose, insulin, body weight, and carcass fat distribution

Variable	Breed ^a			SEM	P-value
	HL ^b	LW ^b	UM ^b		
BW, kg	109.7	111.3	108.4	1.00	0.13
Subcutaneous fat, kg	13.8 ^c	14.9 ^c	19.6 ^d	0.69	<0.001
Visceral fat, kg	2.1 ^c	2.0 ^c	3.4 ^d	0.21	<0.001
Total body fat, kg	27.3 ^c	28.6 ^c	38.1 ^d	1.32	<0.001
Fasting serum insulin, pmol/L	132.2	137.9	139.3	9.70	0.86
Fasting serum glucose, nmol/L	5.5	5.6	5.0	0.20	0.07

^aData are presented as least-square means \pm SEM.

^bHL = Ham Line, LW = Large White, UM = Upton-Meishan.

^{c,d}Means with different letters differ at the P-value shown.

acid oxidation and glucose uptake (Yamauchi et al. 2003). Adiponectin expression can be modulated by TNF α , a pro-inflammatory cytokine (Fasshauer et al., 2002). Higher levels of TNF α mRNA and protein are associated with obesity in humans and pigs (Hotamisligil et al., 1999; Chen et al., 2004). Moreover, TNF α was the first adipocytokine proposed to represent a molecular link between obesity and insulin resistance (Moller, 2000). The purposes of this study were to establish the existence of adiponectin receptors in the pigs, to determine tissue distribution of adiponectin and its receptors, and to establish whether the relative expression of adiponectin and its receptors, in s.c. and abdominal fat depots, varies among divergent porcine genotypes. Finally, the effects of TNF α and leptin on the expression levels of adiponectin, adipor1, and adipor2 mRNA were further studied during the differentiation process of porcine stromal-vascular (SV) cells to adipocytes.

Materials and Methods

Animals and Tissue Collection

A total of 30 gilts, kindly provided by Hypor (Regina, Saskatchewan, Canada), were used in this study. These included Chinese Upton Meishan (UM, n = 10), Large White (LW, n = 10) and Ham Line (HL, n = 10) gilts. These breeds differ considerably in body composition and body fat distribution (shown in Table 1). Piglets were transported to the research center on reaching 15 \pm 2 kg of BW. They were fed a commercial diet (50% corn, 20% barley, 20% wheat bran, and 5% soybean; as-fed basis) ad libitum until slaughter at 109.9 \pm 2.96 kg of live weight. Animals had free access to fresh water during the entire trial. A crossbred adult sow (Duroc \times Yorkshire \times Landrace) was sampled to establish adiponectin and adiponectin receptor tissue distribution.

At slaughter, live weight was taken, and backfat and abdominal visceral fat tissue samples were collected and immediately frozen in liquid nitrogen. Jugular blood samples were collected from gilts to measure fasting insulin and glucose. Various tissue samples, including s.c. fat, visceral fat, lung, kidney, stomach, skeletal

muscle, liver, ovary, uterus, brain and heart, were collected for tissue distribution studies. All tissue samples were frozen immediately in liquid N and stored at -80°C until needed. After evisceration, abdominal visceral fat was completely removed from the carcasses and weighed. Total s.c. fat weight (kg) was measured by carcass dissection according to Marcoux et al. (2003), with the exception that the s.c. fat weight included the skin. One side of each carcass was separated into four cuts (shoulder, ham, belly, and loin), and each part was completely dissected to measure the complete carcass s.c. fat. Total body fat was obtained by adding the abdominal visceral fat to the s.c. fat and intermuscular fat (kg). Animals were cared for according to the recommended code of practice and killed using an acceptable method approved by the local Animal Care Committee following the guideline of the CCAC (1993).

Biochemical Analyses

Plasma glucose was measured by colorimetry using a commercial kit (No. 1448668; Roche Diagnostic Corp., Indianapolis, IN) and according to the manufacturer's instructions. Glucose intra- and interassay CV were 0.7 and 1.0%, respectively. Plasma insulin was measured by RIA (catalog No. 11002, Immunocorp, Montreal, Quebec, Canada). The intra- and interassay CV for the insulin RIA were 4.1 and 4.7%, respectively. Assay sensitivity was 26.9 pmol/L.

Stromal-Vascular Cell Culture

Dorsal s.c. adipose tissue was aseptically removed from five crossbred piglets at 5 d of age, and SV cells were isolated according to a method used by Ramsay (2001). Briefly, adipose tissue was minced with scissors and incubated for 90 min in a digestion buffer made of Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM/F12 (Sigma, Oakville, Ontario, Canada), 100 mM HEPES, and 1.5% BSA at pH 7.4, which contained 2 mg/mL of Type I collagenase/g of tissue (Gibco BRL, Burlington, Ontario, Canada). Incubation was performed at 37°C in a shaking agitator. A fivefold excess of digestion buffer, without collagenase, was then added to the digested

adipose tissue solution and the resulting solution was then filtered through 250- and 20- μ m nylon mesh (Sefar America, Depew, NY). Cells were then centrifuged at $1,000 \times g$ for 10 min at 4°C . Supernatant fluid was discarded and cells were resuspended in plating medium made of DMEM/F12, 10% fetal bovine serum (Gibco-Invitrogen, Grand Island, NY), 80 nM dexamethasone (Sigma), and antibiotics: 40 mg/L of gentamicin sulfate (Sigma), 50 mg/L of cephalothin (Sigma), and 2 mg/L of fungizone (BioWhittaker, Walkersville, MD). Aliquots of SV cells were stained with 0.4% trypan blue and counted on a hemocytometer to evaluate the number of viable/dead cells. Cells were plated at a density of 5×10^4 cells/cm² in 24-well culture plates. They were maintained at 37°C in a humidified, 5% CO₂ atmosphere until they reached confluence. At that time, medium was changed to serum-free medium for 24 h. After this starvation period, cultures were then changed to a serum-free media that contained DMEM/F12 and antibiotics. These cell cultures were then treated with 1) a combination of 850 nM insulin, 2.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of transferrin, and 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of selenium (ITS; Sigma); 2) ITS + 10 ng/mL of recombinant human TNF α (Sigma); or 3) ITS + 100 ng/mL of recombinant porcine leptin (Ruiz-Cortes et al., 2003). We used ITS to induce differentiation of preadipocytes to adipocytes because it was previously demonstrated that insulin is sufficient to promote differentiation of porcine SV cells to adipocytes (Hausman, 1989; Boone et al., 2000). Culture medium was changed every 2 d. Cells from each treatment group were collected at 0, 24, 48, 72, and 96 h (two wells collected at each time) and immediately frozen at -80°C for RNA isolation. Stromal-vascular cell cultures were stained for lipids using Oil Red O as described by Magun et al. (1996) and were counterstained with Giemsa to evaluate cellular proliferation and differentiation. The extent of differentiation was estimated by measuring adipocyte-specific fatty acid-binding protein (aP2) mRNA levels by reverse-transcriptase PCR (RT-PCR) analysis as previously reported (Ding et al. 1999). Oligonucleotides and PCR conditions used to amplify porcine aP2 are described in Table 2.

RNA Extraction and cDNA Preparation

Total RNA was extracted from collected tissue samples using TRIzol reagent (Gibco BRL) according to the manufacturer's instructions. The RNA isolation for SV cell culture was done using RNeasy mini kit (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada) according to the manufacturer instructions. The extracted RNA was dissolved in water and quantified spectrophotometrically at 260 nm. For each sample, an RNA aliquot was subjected to electrophoresis in a 1% agarose gel to verify its integrity. Total RNA was reverse transcribed to cDNA in a PTC-200 Peltier programmable thermal cycler (MJ Research, Foster City, CA). Five micrograms of total RNA was treated with 3 U of DNase I (Gibco BRL) to remove contaminating genomic DNA. For the abdomi-

Table 2. Primer sequences and optimal conditions for PCR of porcine adiponectin, adiponectin receptor 1 and 2 (adipoR1, adipoR2), cyclophilin, and adipocyte-specific fatty acid-binding protein (aP2) genes

Gene	Primer name*	Primer sequences	GenBank Accession No.	Hybridization position, nt	MgCl ₂ , mM	Primer, nM	Annealing T, $^{\circ}\text{C}$	Cycles, No.
AdipoR1	R1-A (F)	5'-CTGGCTGACCTGGGCCCTCCTRCARGAGAAG-3'	NM_018999	272-304 1283-1315	1.0	200	63	10
	R1-1 (R)	5'-AAGGGWGTCTGRTACAGCCRCCTTAGGCC-3'						
AdipoR2	R2-A (F)	5'-GCCTGGGGATCTTTTAT-3'	BC015858	679-695 1318-1331	1.5	200	50	15
	R2-1 (R)	5'-CCCCCRATCATGA-3'						
Adiponectin	Adipo1 (F)	5'-TGCTGTGTGGGAGCTGTTC-3'	AY135647	2-22 690-710	1.5	150	60	35
	Adipo2 (R)	5'-AGGAAGCCTTGAAGATGGAG-3'						
AdipoR1	AdipoR1-1 (F)	5'-AACCCACCCAAAGCTGAAGA-3'	NM_015999	323-342 647-666	1.5	150	58	35
	AdipoR1-2 (R)	5'-CTGACATGGTAAAGATCC-3'						
AdipoR2	AdipoR2-1 (F)	5'-GCCTGGGGATCTTTTATATGTTTC-3'	NM_024551	207-233 840-856	1.0	150	53	34
	AdipoR2-2 (R)	5'-GCCGATCATGAAACGAA-3'						
Cyclophilin	Cyclo1 (F)	5'-ACCGTCTTTCGACATCC-3'	AY266299	17-36 447-466	1.0	150	60	35
	Cyclo2 (R)	5'-CTTGCTGCTTGCAATCC-3'						
aP2	aP2 (F)	5'-TACCAGGAAAGTGGCTGGCAT-3'	AF102872	9-29 174-194	1.0	150	61	35
	vascular cell culture	5'-GCCCTCCATCTAAGTTATG-3'						

*F = forward primer; R = reverse primer

nal visceral fat samples, 2 μ g of total RNA was treated with 2 U of DNase I. For the SV cells, 1 μ g of total RNA was treated with 1 U of DNase I. The first strand cDNA was synthesized using the SuperScript™ II preamplification system (Gibco BRL) and 500 ng of oligo(dT)₁₂₋₁₈ as a primer (Amersham Pharmacia Biotech, Baie D'Urfé, Quebec, Canada) in 50 μ L of total reaction volume.

Cloning and Sequencing of Porcine Adiponectin Receptors

To determine porcine specific sequences of adipoR1 and adipoR2, primers were designed for PCR amplifications based on homology between human (Accession No. NM_015999 for R1; NM_024551/BC051858 for R2) and murine (Accession No. BC014875 for R1) sequences. For both receptors, 2.5 μ g of total RNA from porcine s.c. adipose tissue was reverse-transcribed using Superscript RNase H reverse transcriptase (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. For adipoR1, the PCR reaction was performed using primers R1-A and R1-1 (Table 2) and the appropriate PCR conditions. A 1,044-bp product was gel-extracted using the QIAquick gel extraction kit (Qiagen) and according to the manufacturer's instructions. Porcine adipoR1 was sequenced (three independent PCR amplifications) using the Big Dye terminator cycle sequencing ready reactions (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) according to manufacturer's instructions, and run on an ABI 377 (PE Applied Biosystems). A partial porcine adipoR1 coding a 1,044-bp sequence was submitted to GenBank (Accession No. AY452710). For adipoR2, the PCR reaction was performed using primers R2-A and R2-1 and the PCR conditions indicated in Table 2. A 652-bp fragment was gel-extracted using the QIAquick gel extraction kit (Qiagen) and according to the manufacturer's instructions. Porcine adipoR2 was sequenced as described above for porcine adipoR1 (three independent PCR amplifications). The partial porcine adipoR2 coding sequence of 652 bp was submitted to GenBank (Accession No. AY452711).

Tissue Distribution of Porcine Adiponectin and Adiponectin Receptors 1 and 2

The PCR amplifications of adiponectin and adipoR1 and adipoR2 cDNA were performed in various pig tissues. The PCR reactions were performed using primers Adipo1 and Adipo2 for adiponectin, primers Adipor1-1 and Adipor1-2 for adipoR1 and primers Adipor2-1 and Adipor2-2 for adipoR2 (Table 2). These PCR reactions were performed in a 100- μ L total volume, which contained 2 μ L of the reverse transcriptase product, 200 μ M deoxyribonucleotide triphosphate, 0.5 U of Taq polymerase in 1 \times Taq polymerase buffer (Amersham Pharmacia Biotech), and their corresponding concentrations of MgCl₂ and forward and reverse primers (Table 2). The PCR profiles consisted of an initial denatur-

ation step at 94°C for 2 min, followed by a fixed cycle number (Table 2) of denaturing at 94°C for 1 min, followed by the corresponding annealing temperature for 1 min (Table 2), extension at 72°C for 1 min and a final extension at 72°C for 5 min.

Pig cyclophilin amplification was also performed, using primers Cyclo1 and Cyclo2 (Table 2), to have an internal control for variations in cDNA synthesis. The 100- μ L PCR reaction mixture contained 2 μ L of the reverse transcriptase product, 200 μ M deoxyribonucleotide triphosphate, 0.5 U of Taq polymerase in 1 \times Taq polymerase buffer (Amersham Pharmacia Biotech), and optimal concentrations of MgCl₂ and forward and reverse primers (Table 2). The PCR profile used for cyclophilin was the same as described above for adiponectin. Adiponectin, adipoR1, adipoR2, and cyclophilin-amplified PCR fragments were separated on a 1% agarose gel and stained with ethidium bromide. Pictures of resulting gels were taken with Polaroid (Mississauga, Ontario, Canada) positive-negative film. Negatives were then scanned using an imaging densitometer (model GS-670, Bio-Rad Laboratories Ltd., Mississauga, Ontario, Canada). The PCR amplifications were repeated in duplicates using two different tissue samples from the same animal.

Quantitative Measurements of Adiponectin and Adiponectin Receptor mRNA Expression in Fat Tissues

Subcutaneous fat and abdominal visceral fat cDNA were analyzed for adiponectin, adipoR1, and adipoR2 mRNA levels using real-time PCR amplification. For adiponectin, the forward 5'-ATGATGTCACCACTGGCAAATTC-3' and reverse 5'-GACCGTGACGTGGAAGCAGA-3' primers were designed based on the sequence of porcine adiponectin mRNA (GenBank Accession No. AY135647) and were selected with Primer Express Software (PE Applied BioSystem). Real-time PCR amplifications were performed in a 25- μ L reaction volume consisting of 900 nM forward primer, 300 nM reverse primer, 1 μ L of cDNA, 0.25 μ L of AmpErase (PE Applied Biosystems), and 1 \times SYBR Green Master Mix (PE Applied Biosystems). Cycling conditions were 2 min at 50°C, followed by 10 min at 95°C. Then, 40 repetitive cycles of 15 s at 95°C and 1 min at 60°C, were performed. All procedures were performed on an ABI Prism 7700 sequence detector (PE Applied Biosystems). The adipoR1 was amplified in real time using forward 5'-GCCATGGAGAAGATGGAGGA-3' and reverse 5'-AGCACGTCGTACGGGATGA-3' primers, designed from the sequence of porcine adipoR1 mRNA (GenBank Accession No. AY452710). Real-time PCR amplifications of adipoR1 were performed using the same conditions as previously described for adiponectin except that 300 nM and 50 nM of forward and reverse primers were used, respectively. AdipoR2 real-time amplifications were performed using forward 5'-TGTTCCACCCCTCAGTAT-3' and reverse 5'-AATGATTCCACTCAGG-

CCCA-3' primers, based on adipoR2 porcine mRNA sequence (GenBank Accession No. AY452711). The adipoR2 real-time PCR amplification conditions were identical to those described above for adiponectin, with the exception of forward and reverse primers quantities, which was 50 nM for both primers. Samples were normalized using the housekeeping gene cyclophilin (primer sequences; 5'-GCA CTG GTG GCA AGT CCA T-3' and 5'-AGG ACC CGT ATG CTT CAG GA-3', GenBank Accession No. AY266299). Cyclophilin real-time PCR amplifications were performed using the same conditions except that 300 nM of each forward and reverse primer were used. The PCR amplifications were performed in triplicate. Standard curves were prepared in duplicate, for adiponectin, adipoR1, adipoR2, and cyclophilin. A pool of visceral and s.c. fat tissues cDNA was used to create a standard curve for quantification of the transcripts using the relative standard curve method as described by Applied Biosystems (1997). Standard curve arbitrary units were set at 1 for the undiluted cDNA pool, and n-fold dilutions of 0.75, 0.50, 0.25, 0.10, 0.05, 0.025, and 0.005 were then performed. The relative mRNA levels of each studied genes and endogenous cyclophilin reference were determined by interpolating the threshold cycle values to their respective standard curves. Specificity of the amplified fragments was verified on 3% agarose gel and with the melting curve analysis.

Quantitative Measurements of Adiponectin and Adiponectin Receptors mRNA Expression in Stromal-Vascular Cell Culture

Stromal-vascular cell culture cDNA were analyzed for adiponectin, adipoR1, and adipoR2 mRNA levels. Primers were those described above. Real-time PCR amplifications were performed in a 25- μ L reaction volume consisting of 50 nM forward primer, 50 nM reverse primer, 1 μ L of cDNA, 0.25 μ L of AmpErase (PE Applied Biosystems), and 1 \times SYBR Green Master Mix (PE Applied Biosystems) for each of these genes. Samples were normalized using cyclophilin housekeeping gene. Cyclophilin RT-PCR amplifications were performed using the same conditions, except that 50 and 300 nM forward and reverse primers were used, respectively. A pool of SV cDNA was used to create a standard curve for quantification of the transcripts using the relative standard curve method as described above. The PCR amplifications were performed in triplicate.

Statistical Analyses

Relative quantification of mRNA levels was performed according to the standard curve method described by Applied Biosystems (1997). Differences among breeds were analyzed using one-way ANOVA followed by Dunnett adjustment for comparison to the UM reference group. Data were presented as mRNA quantities relative to the UM reference group with their

SEM. Differences between treatments in SV cell culture were analyzed by one-way ANOVA with repeated measures in time. Correlation analysis between adiponectin, adipoR1, and adipoR2 mRNA levels and carcasses traits was calculated using the PROC CORR procedure of SAS (Version 8.1, SAS Inst., Inc., Cary, NC). Statistical significance was set at $P < 0.05$.

Results

Sequencing of Adiponectin Receptors 1 and 2 Reverse-Transcriptase PCR Products

Using RT-PCR on total RNA isolated from porcine adipose tissue, partial cDNA coding sequences were obtained for adipoR1 and adipoR2 (GenBank Accession No. AY452710 and AY452711, respectively). Analysis of the porcine adipoR1 nucleotide sequence showed that it is 92% identical to both the human and murine sequences (Yamauchi et al., 2003). Similarity analysis of adipoR1-deduced AA sequence showed 98 and 97% identity when compared with the human and mouse sequences, respectively (Figure 1A). The porcine adipoR2 displayed a nucleotide sequence that was 92 and 90% identical to the human and murine sequences, respectively (Yamauchi et al., 2003). Analysis of the deduced adipoR2 AA sequence showed a 100 and 99.5% identity compared with these same species (Figure 1B). Hydropathy plots of the porcine adipoR1 and adipoR2 sequences indicate that both have seven transmembrane domains along with a cytoplasmic amino-terminal domain and extracellular carboxyl-terminal (Figure 1). The adipoR1 and adipoR2 are highly related proteins in the mouse, and porcine adipoR1 and adipoR2 available sequences also are highly related and share 77% identity.

Effect of Breed on Plasma Glucose and Insulin, Body Weight, and Carcass Fat Distribution

At slaughter, total body fat, visceral fat, and s.c. fat were higher in UM gilts than in HL and LW gilts ($P < 0.001$; Table 1). There were no breed effects associated with fasting plasma insulin and glucose concentrations (Table 1).

Tissue Distribution of Pig Adiponectin and Adiponectin Receptors 1 and 2 mRNA

Expression of adiponectin, adipoR1, and adipoR2 mRNA was assessed by RT-PCR analyses in various tissues from an adult sow. The expected 709-bp fragment was amplified for pig adiponectin in adipose tissues (Figure 2), but it was not found in liver, kidney, heart, lung, ovary, stomach, brain, or uterus. A faint band corresponding to the expected length was also detected in skeletal muscle, presumably owing to the presence of i.m. fat in that tissue. A single 344-bp band for adipoR1 was amplified in all pig tissues tested, with

A

Cytoplasmic domain

HUMAN	ADIPOR1	MSSHKOSVVAQNGAPASNREADTVLAEELGFLLEEKOKHVIANPPKAEBBQTCFVPVQEEEEVVRVLTLPQAAHH	75
MOUSE	ADIPOR1	MSSHKGSAGAQONGAPSGREADTVLAEELGFLLEEKOKHAASSPAKAEEDQACFVPVQEEEEVVRVLTLPQAAHH	75
PIG	ADIPOR1	-----LAELGFLLEEKOTRGTNPPKAESE QACFVPVQEEEEVVRVLTLPQAAHH	49
HUMAN	ADIPOR1	AMEKMEEFVYKVVWEGRWHVI PYDVLDPWLKNDNDYLLHGHRPPMPSPRACPKSI FRIHTETGN IwthllGfVlFLfL	150
MOUSE	ADIPOR1	AMEKMEEFVYKVVWEGRWHVI PYDVLDPWLKNDNDYLLHGHRPPMPSPRACPKSI FRIHTETGN IwthllGfVlFLfL	150
PIG	ADIPOR1	AMEKMEEFVYKVVWEGRWHVI PYDVLDPWLKNDNDYLLHGHRPPMPSPRACPKSI FRIHTETGN IwthllGfVlFLfL	124
HUMAN	ADIPOR1	LQILTMLRPNMYPMAFLQEKVVPQMFPLQAVLCLSFBSWLPHTVYCHSEKVSRTFSKLDYSOIALLIMGSFVPWLY	225
MOUSE	ADIPOR1	LQILTMLRPNMYPMAFLQEKVVPQMFPLQAVLCLSFBSWLPHTVYCHSEKVSRTFSKLDYSOIALLIMGSFVPWLY	225
PIG	ADIPOR1	LQILTMLRPNMYPMAFLQEKVVPQMFPLQAVLCLSFBSWLPHTVYCHSEKVSRTFSKLDYSOIALLIMGSFVPWLY	199
HUMAN	ADIPOR1	YSPYCRPQPHLIYLSIVCVLQISAI IVAQWDRFATPKHRQTHAGVFLQGLGSOVPTMHPTIAEGFVKATTVOQM	300
MOUSE	ADIPOR1	YSPYCRPQPHLIYLSIVCVLQISAI IVAQWDRFATPKHRQTHAGVFLQGLGSOVPTMHPTIAEGFVKATTVOQM	300
PIG	ADIPOR1	YSPYCRPQPHLIYLSIVCVLQISAI IVAQWDRFATPKHRQTHAGVFLQGLGSOVPTMHPTIAEGFVKATTVOQM	274
HUMAN	ADIPOR1	GWFFLMAVMIITGAGLYAARI PERFFPGKFDIWFQSHQIFHVLVAAAAPVHYGVSNLQEPHYGLEGGCTDDTLL	375
MOUSE	ADIPOR1	GWFFLMAVMIITGAGLYAARI PERFFPGKFDIWFQSHQIFHVLVAAAAPVHYGVSNLQEPHYGLEGGCTDDTLL	375
PIG	ADIPOR1	GWFFLMAVMIITGAGLYAARI PERFFPGKFDIWFQSHQIFHVLVAAAAPVHYGVSNLQEPHYGLEGGCTDDT---	347

B

Cytoplasmic domain

HUMAN	ADIPOR2	MNEPTENRLGCSRTPEPDIRLRKHQHLQDTRRGDNDSHQDDLEPIL EASVLSHHKKSSEEHYSD EAPQED EOP	75
MOUSE	ADIPOR2	-----	0
PIG	ADIPOR2	-----	0
HUMAN	ADIPOR2	MOMSPLLQAHHAMFKMEFFVCKVWEGRWHVIPHVDLPWLKNDNDYLLHGHRPPMPSPRACPKSI FRIHTETGNIW	150
MOUSE	ADIPOR2	MOMSPLLQAHHAMFKMEFFVCKVWEGRWHVIPHVDLPWLKNDNDYLLHGHRPPMPSPRACPKSI FRIHTETGNIW	75
PIG	ADIPOR2	-----	0
HUMAN	ADIPOR2	THLLGCVFFLCLGIFPYMFRPNI SPVAPLQEKVVPQMFPLQAVLCLSFBSWLPHTVYCHSEKVSRLFSKLDYSOIAL	225
MOUSE	ADIPOR2	THLLGCVFFLCLGIFPYMFRPNI SPVAPLQEKVVPQMFPLQAVLCLSFBSWLPHTVYCHSEKVSRLFSKLDYSOIAL	180
PIG	ADIPOR2	-----LGI PYMFRPNI SPVAPLQEKVVPQMFPLQAVLCLSFBSWLPHTVYCHSEKVSRLFSKLDYSOIAL	64
HUMAN	ADIPOR2	LIMGSFVPWLYYSFYCHPQPCFIYLIIVICVLGIAAI IVSQWDMFATPQYRGRVAGVFLGGLGSGI IPTLHYVISE	300
MOUSE	ADIPOR2	LIMGSFVPWLYYSFYCHPQPCFIYLIIVICVLGIAAI IVSQWDMFATPQYRGRVAGVFLGGLGSGI IPTLHYVISE	225
PIG	ADIPOR2	LIMGSFVPWLYYSFYCHPQPCFIYLIIVICVLGIAAI IVSQWDMFATPQYRGRVAGVFLGGLGSGI IPTLHYVISE	130
HUMAN	ADIPOR2	GFLKAATIGQIGWMLMASLYITGAALYAARI PERFFPGKCDIWPHEQLPHI FVVAGAFVHPHGVSNLQEPFRM	375
MOUSE	ADIPOR2	GFLKAATIGQIGWMLMASLYITGAALYAARI PERFFPGKCDIWPHEQLPHI FVVAGAFVHPHGVSNLQEPFRM	300
PIG	ADIPOR2	GFLKAATIGQIGWMLMASLYITGAALYAARI PERFFPGKCDIWPHEQLPHI FVVAGAFVHPHGVSNLQEPFRM	214
HUMAN	ADIPOR2	IGGGCSEEDAL	286
MOUSE	ADIPOR2	IGGGCTEEDAL	311
PIG	ADIPOR2	IG-----	210

Figure 1. Deduced AA sequence of pig adiponectin receptors 1 and 2. A) Alignment of the predicted A.A sequences of pig (AY452710), human (NM_015999), and mouse (BC014875) adiponectin receptor 1 (adipoR1). B) Alignment of the predicted AA sequences of pig (AY452711), human (BC051858), and mouse (AY424291) adiponectin receptor 2 (adipoR2). The hypervariable region of adiponectin receptor 1 is underlined and the phosphorylatable threonine is in bold character. Numbers indicate AA residue position. Hyphens are gaps introduced to optimize alignment. The seven transmembrane domains are shaded.

the most abundant mRNA expression occurring in skeletal and adipose tissues (Figure 2). The 650-bp adipoR2 fragment was also expressed ubiquitously in the pig, with the greatest abundance found in the liver, heart, skeletal muscle, and adipose (Figure 2).

Expression of Pig Adiponectin mRNA in Subcutaneous and Visceral Fat Tissues

Using real-time PCR, pig adiponectin mRNA levels were quantified in s.c. and visceral fat tissues from different breeds of pigs. In the s.c. tissue, levels of adipo-

nectin mRNA were higher in HL than in UM gilts ($P < 0.05$; Figure 3A). In visceral fat tissue, no significant differences were observed in adiponectin mRNA levels for these breeds (Figure 3B). Real-time PCR analysis also revealed that the expression of adiponectin mRNA was 52, 69, and 88% higher in visceral than s.c. fat tissue in the HL, LW, and UM breeds, respectively (data not shown).

Correlation analyses between adiponectin mRNA levels and carcass traits showed negative correlations between adiponectin mRNA levels in visceral fat tissue and s.c. fat ($r = -0.44$, $P < 0.05$), visceral fat ($r = -0.43$,

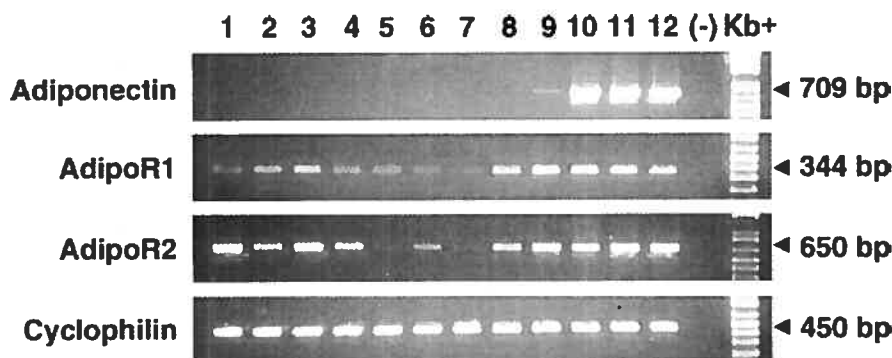


Figure 2. Tissue distribution of adiponectin and adiponectin receptors 1 and 2 mRNA in various tissues collected from an adult sow. The tissues were as follows: Lane 1 = liver; Lane 2 = kidney; Lane 3 = heart; Lane 4 = lung; Lane 5 = ovary; Lane 6 = stomach; Lane 7 = brain; Lane 8 = uterus; Lane 9 = skeletal muscle; Lane 10 = ham s.c. fat; Lane 11 = back s.c. fat; Lane 12 = visceral fat; (-) = PCR amplification negative control without cDNA; Kb+ = Kb plus DNA Ladder (Invitrogen, Grand Island, NY). Expected fragment length (bp) is indicated on the right. Equal amounts of PCR products were loaded per lane as adjusted by cyclophilin housekeeping gene.

$P < 0.05$), and total body fat ($r = -0.42$, $P < 0.05$) in the overall gilt population (Table 3). Within-breed analyses showed a negative correlation between adiponectin mRNA levels measured in s.c. fat and s.c. ($r = -0.78$, $P < 0.01$), visceral ($r = -0.73$, $P < 0.05$), and total body ($r = -0.73$, $P < 0.05$) fat weights for the HL gilts only (Table 3). In visceral fat tissue, there was also a significant negative correlation between adiponectin mRNA abundance and s.c. ($r = -0.63$, $P < 0.05$) and total body ($r = -0.67$, $P < 0.05$) fat weights, whereas there was a nonsignificant correlation with visceral fat ($r = -0.57$, $P = 0.067$) in the UM gilts. In the same tissue, the HL gilts showed a nonsignificant correlation between adiponectin mRNA levels and visceral fat ($r = -0.54$, $P = 0.074$). Finally, no correlation could be found between adiponectin mRNA levels in both tissues and plasma concentrations of insulin or glucose (data not shown).

Expression of Pig Adiponectin Receptors 1 and 2 mRNA in Subcutaneous and Visceral Fat

Pig adipoR1 and adipoR2 mRNA levels were also quantified by real-time PCR in s.c. and visceral fat tissues from the three breeds. In the s.c. fat tissue, there were no significant breed differences for either adipoR1 or adipoR2 mRNA levels (Figure 4A). In the visceral fat tissue (Figure 4B), the LW gilts had higher adipoR1 and adipoR2 mRNA levels compared with the UM gilts ($P < 0.05$). Correlation analyses performed in the overall gilts population showed visceral fat adipoR2 mRNA levels to be negatively correlated with s.c. ($r = -0.57$, $P < 0.01$), visceral ($r = -0.46$, $P < 0.05$), and total body ($r = -0.56$, $P < 0.01$) fat (Table 4). There were no other correlations between carcass traits and adipoR1 and adipoR2 mRNA levels in the overall gilt population. Within-breed analyses of adipoR1 mRNA levels in visceral fat showed significant negative correlation with visceral

fat ($r = -0.72$, $P < 0.05$), whereas a tendency was observed with s.c. fat weight ($r = -0.58$, $P = 0.10$), and a nonsignificant correlation was noted with total body ($r = -0.60$, $P = 0.060$) fat weight for the LW gilts only (Table 4). Within-breed analyses of adipoR2 mRNA levels in visceral fat showed a significant negative correlation with s.c. ($r = -0.68$, $P < 0.05$) and total body ($r = -0.71$, $P < 0.05$) fat weights, whereas there was a nonsignificant correlation with visceral fat ($r = -0.63$, $P = 0.070$) for the LW gilts (Table 4). For the UM gilts, negative correlations also were observed between adipoR2 mRNA levels in visceral fat and s.c. fat ($r = -0.66$, $P < 0.05$) and total body fat weights ($r = -0.70$, $P < 0.05$; Table 4).

Quantification of Adiponectin and Adiponectin Receptors 1 and 2 in Porcine Stromal-Vascular Cell Culture

Expression of adiponectin, adipoR1, and adipoR2 mRNA levels were determined during differentiation of porcine SV cells in the presence of ITS and were compared with ITS + leptin or ITS + TNF α treatments. A significant time-independent decrease in adiponectin mRNA levels was observed when SV cells were incubated with 100 ng/mL of recombinant porcine leptin (Figure 5A; $P < 0.05$). Porcine leptin did not significantly influence adipoR1 and adipoR2 mRNA levels (Figure 5B and C). A significant time-dependent decrease of adiponectin mRNA levels could be observed when SV cells were treated with 10 ng/mL of recombinant human TNF α (Figure 5A; $P < 0.001$). A significant time-independent decrease was also observed for adipoR2 mRNA levels in SV cells treated with human TNF α (Figure 5C; $P < 0.001$). In contrast, mRNA levels of adipoR1 were not influenced by TNF α treatment (Figure 5B). We next examined the effects of TNF α and recombinant

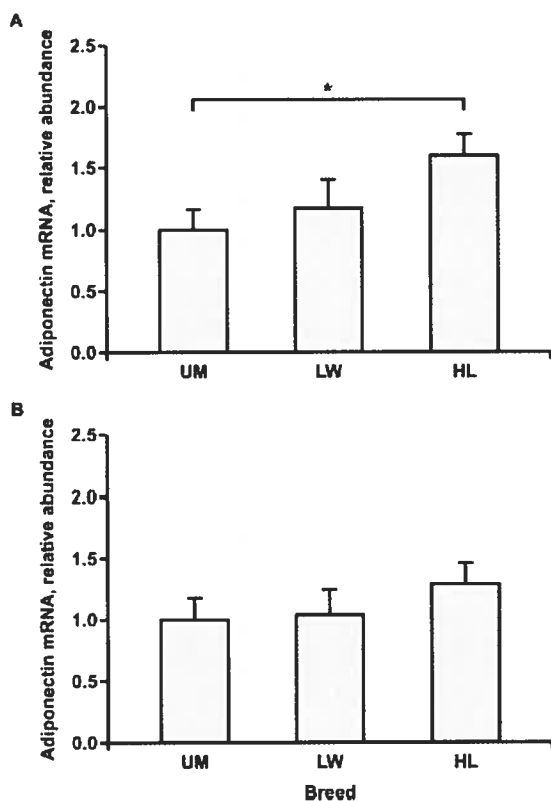


Figure 3. Relative abundance of adiponectin mRNA in s.c. (A) and visceral (B) adipose tissues. Values (\pm SEM) are expressed as mRNA quantities relative to the UM reference group, which was given a value of one. Ham Line = HL ($n = 10$), Large White = LW, ($n = 10$), and Upton-Meishan = UM ($n = 10$). The asterisk indicates that means differed, $P < 0.05$.

porcine leptin on the expression of aP2, which is a well-known marker of adipocyte differentiation. Lower mRNA levels of aP2 were observed in SV cells treated with ITS + leptin over a 96-h period, and this effect was more pronounced with ITS + $\text{TNF}\alpha$ (Figure 5D). Compared with the ITS-treated cells, decreases in lipid accumulation were observed in SV cells treated with ITS + $\text{TNF}\alpha$, as revealed by Oil Red O staining after 24, 48, and 96 h exposure to $\text{TNF}\alpha$ (data not shown).

Discussion

To our knowledge, this is the first report of the cloning and characterization of pig adipoR1 and adipoR2. The deduced porcine adipoR1 protein sequence shares a high level of similarity with human and mouse orthologues (Yamauchi et al., 2003), and the deduced porcine adipoR2 protein sequence is identical with the human adipoR2 and nearly identical with the mouse sequence (Yamauchi et al., 2003). The main feature distinguishing the pig adipoR1 protein from human and mouse proteins is a hypervariable region between AA 39 and 51 relative to the human protein sequence. In this hypervariable region, three threonine residues are found in the porcine sequence that are not present in the human and mouse counterparts. Prediction of putative Thr phosphorylation sites, using the PhosphoBase database (Kreegipuu et al., 1999) and the ELM motif search (<http://ca.expasy.org/tools/>), revealed that Thr16 (relative to the porcine sequence) may be phosphorylated by adenosine cyclic 3',5'-phosphate protein kinase. Because AA phosphorylation is central to signal transduction pathways, this species discrepancy may have functional relevance to adiponectin signal transduction.

Adiponectin mRNA was abundantly expressed in s.c. and visceral fat tissues, consistent with human (Maeda et al., 1996) and mouse (Hu et al., 1996) tissue distributions. In the current study, we also detected, for the first time, adiponectin mRNA in pig skeletal muscle tissue, derived from i.m. fat cells or from muscle cells, as it was previously reported that adiponectin mRNA expression is inducible in human myotubes (Staiger et

Table 3. Overall and within-breed correlation coefficients between adiponectin mRNA levels and carcass traits^a

mRNA levels	Breed ^b	Subcutaneous fat	Visceral fat	Total body fat
Overall adiponectin				
Subcutaneous fat		-0.25 (29)	-0.21 (29)	-0.24 (28)
Visceral fat		-0.44 (29)*	-0.43 (29)*	-0.42 (28)*
Within-breeds adiponectin				
Subcutaneous fat	HL	-0.78 (10)**	-0.73 (10)*	-0.73 (10)*
	LW	0.08 (10)	0.08 (10)	0.10 (10)
	UM	0.15 (9)	0.00 (9)	0.04 (8)
Visceral fat	HL	-0.32 (10)	-0.54 (10)†	-0.29 (10)
	LW	-0.18 (9)	-0.19 (9)	-0.15 (9)
	UM	-0.63 (8)*	-0.57 (10)†	-0.67 (9)*

† $P < 0.10$; * $P < 0.05$; and ** $P < 0.01$. All other values are not significant.

^aCorrelation coefficients are shown, with number of pigs given in parentheses.

^bHL = Ham Line; LW = Large White; UM = Upton-Meishan.

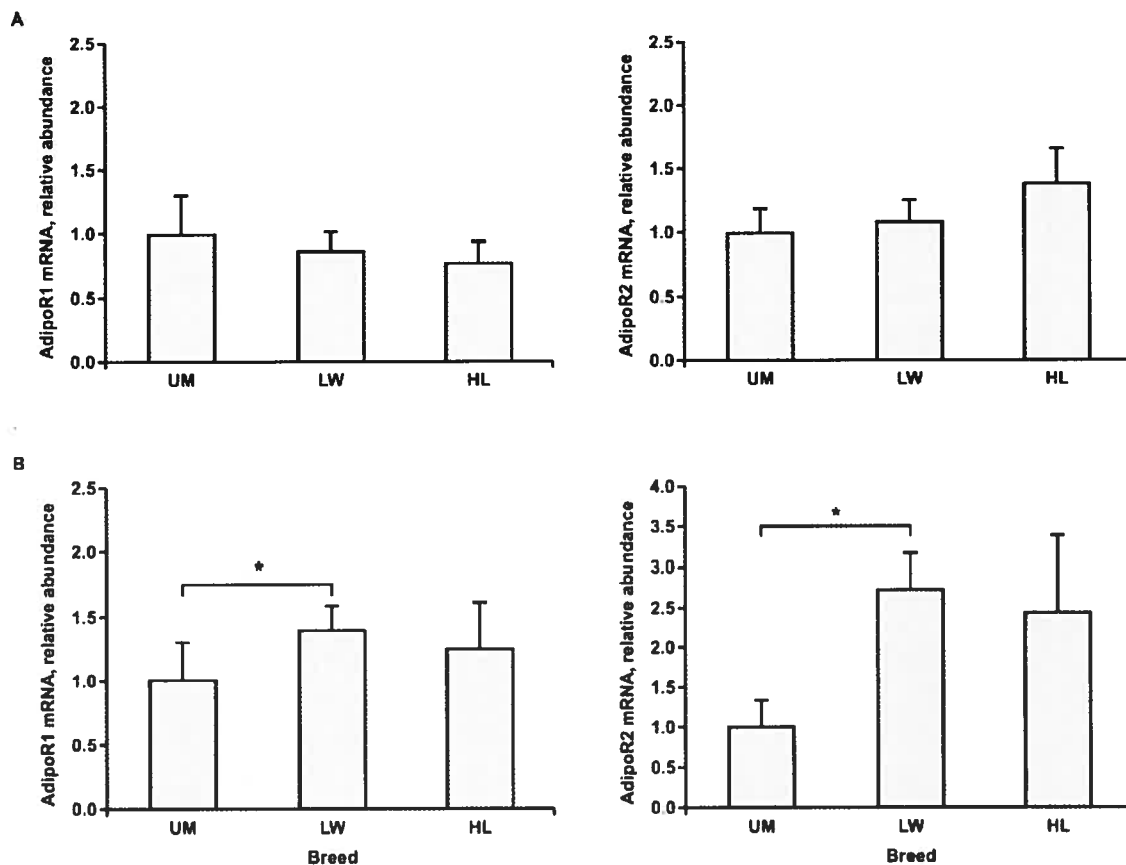


Figure 4. Relative abundance of adipoR1 and adipoR2 mRNA in s.c. (A) and visceral (B) adipose tissues. Values (\pm SEM) are expressed as mRNA quantities relative to the UM reference group, which was given a value of one. Ham Line = HL (n = 10), Large White = LW, (n = 10), and Upton-Meishan = UM (n = 10). The asterisks indicate that means differed, $P < 0.05$.

al., 2003). Adiponectin receptors mRNA is ubiquitously expressed in pig tissues, as are the receptors' orthologues in human and mouse species (Yamauchi et al., 2003). The pig R1 subtype is abundantly expressed in skeletal muscle, visceral fat, and s.c. fat tissues, whereas the R2 isoform is predominantly expressed in liver, heart, skeletal muscle, visceral fat, and s.c. fat tissues. It was recently reported that adiponectin receptors also are expressed in 3T3-L1 adipocytes (Fasshauer et al., 2004), but this is the first time that adipoR1 and adipoR2 mRNA expression has been demonstrated in visceral and s.c. fat tissues. The presence of adipoR1 and adipoR2 in porcine fat tissues suggests that adiponectin may have a paracrine role in fat cells. Alternatively, circulating adiponectin may act directly on these cells to suppress lipogenesis. Such a role was recently reported by Jacobi et al. (2004), who found that adiponectin directly affects isolated pig adipocytes to attenuate lipogenesis. In the current study, we show for the

first time that the mRNA of both adiponectin receptors is expressed in the ovary and uterus, thereby suggesting that adiponectin may have effects on pig reproductive function as well.

In the present study, we also found that the porcine adiponectin mRNA levels are higher in visceral than in s.c. fat. These results are in accordance with those of Altomonte et al. (2003), where lean rats showed higher levels of adiponectin mRNA in visceral fat than in s.c. adipose tissue. These authors suggested that visceral fat might be a predominant contributor to plasma adiponectin. Few human studies have examined adiponectin mRNA levels in various fat depots, and yet these results are inconsistent, showing either no difference (Yang et al., 2003) or lower levels of adiponectin mRNA in omental (Fisher et al., 2002) or visceral fat (Lihn et al., 2004) compared to s.c. adipose. Interestingly, we observed that the highest visceral/s.c. fat tissue ratios of adiponectin mRNA levels were found in UM, followed

Table 4. Overall and within-breed correlation coefficients between adipoR1 and adipoR2 mRNA levels and carcass traits^a

mRNA levels ^b	Subcutaneous fat	Visceral fat	Total body fat
Overall			
AdipoR1			
Subcutaneous fat	0.25 (29)	0.21 (29)	0.27 (28)
Visceral fat	-0.32 (27)	-0.25 (27)	-0.25 (26)
AdipoR2			
Subcutaneous fat	-0.21 (28)	-0.07 (28)	-0.15 (27)
Visceral fat	-0.57 (28)**	0.46 (28)*	-0.56 (27)**
Within breeds			
AdipoR1			
Subcutaneous fat			
HL	-0.29 (10)	-0.04 (10)	-0.16 (10)
LW	0.34 (9)	0.31 (9)	0.29 (9)
UM	0.42 (10)	0.23 (10)	0.40 (9)
Visceral fat			
HL	0.09 (10)	-0.01 (10)	0.17 (10)
LW	-0.58 (9)†	-0.72 (9)†	-0.60 (9)†
UM	0.06 (8)	0.53 (8)	0.16 (7)
AdipoR2			
Subcutaneous fat			
HL	-0.35 (9)	0.06 (9)	-0.23 (9)
LW	0.42 (9)	0.46 (9)	0.37 (9)
UM	-0.21 (10)	-0.10 (10)	-0.29 (9)
Visceral fat			
HL	-0.02 (9)	0.18 (9)	0.01 (9)
LW	-0.68 (9)†	-0.63 (9)†	-0.71 (9)†
UM	-0.66 (10)*	-0.39 (10)	-0.70 (9)**

† $P < 0.10$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, respectively. All other values are nonsignificant.

^aCorrelation coefficients are shown with number of pigs given in parentheses.

^bHL, Ham Line; LW, Large White; UM, Upton-Meishan; AdipoR1 = adiponectin receptor 1; AdipoR2 = adiponectin receptor 2.

by LW and HL. These results show that visceral adipocytes from fatter pigs express higher levels of adiponectin mRNA in visceral fat compared with adipocytes from s.c. fat tissues. In the current study, we only had access to females of the three genotypes used. Because other studies have reported gender differences in circulating adiponectin (Arita et al., 1999; Combs et al., 2003), care should be taken in extrapolating these results to both genders. Despite the fact that we observed higher levels of adiponectin mRNA in porcine visceral fat, the s.c. fat depot may also contribute substantially more adiponectin to the circulation than visceral fat because s.c. fat depots (which includes intermuscular fat depots) comprise approximately 92% of the total fat mass in our pig sample.

The Meishan pigs are recognized for their slower growth and higher backfat thickness than Occidental breeds (Bonneau et al., 1990). In the present study, UM gilts, although a crossbreed between Meishan and an Occidental breed, had greater visceral, s.c., and total body fat than HL and LW gilts. These UM gilts also had lower adiponectin mRNA levels in their s.c. fat tissue compared with the leaner HL gilts. Similarly, Jacobi et al. (2004) showed that there was no difference

in pig adiponectin protein concentrations between fat and lean genotype at 28 and 56 d of age, whereas significant differences were reported at 90 and 165 d of age. Adiponectin mRNA levels and its plasma concentration are also decreased with developing obesity in rats and human subjects, but the mechanism underlying the decrease in adiponectin production is not fully understood (Hu et al., 1996; Arita et al., 1999; Milan et al., 2002). Our data clearly show that adiponectin mRNA levels in s.c. and visceral fat tissues are not associated with circulating insulin and glucose concentrations in pigs. Although most studies in humans and rodents report significant associations between adiponectin levels and insulin resistance (Weyer et al., 2001; Altomonte et al., 2003), a more limited role for adiponectin on insulin action has been suggested by other reports. For example, Silha et al. (2003) demonstrated that insulin resistance was more closely related to circulating resistin and leptin than to adiponectin levels. Other studies have also reported that adiponectin deficiency can result in no insulin resistance or glucose intolerance (Ma et al., 2002; Silha et al., 2004).

In this study, the s.c., visceral, and total body fat depots weights were negatively correlated with adiponectin mRNA levels from visceral adipose tissue, but not from s.c. fat tissue. Milan et al. (2002) previously reported that adiponectin expression was significantly lower in visceral fat tissue from genetically obese vs. lean rats. Consistent with our results, these authors could not find such differences when s.c. fat tissues were compared from the same animals. Interestingly, previously reported studies (Cnop et al., 2003; Park et al., 2004) have suggested that adiponectin expression is determined predominantly by the visceral fat compartment. Within-breed correlation analyses revealed that the association between adiponectin mRNA levels in visceral fat and the various fat depots weights was due mostly to the high negative associations found in the UM breed. No such associations could be made in the leaner breeds of pigs (HL and LW), although this lack of statistical significance might be due to the low number of animals used for each breed. These results suggest that associations between pig adiponectin mRNA levels in visceral fat and pig body fat mass can only be made when pigs have reached higher levels of body fat. Similarly, a study performed on normal-weight and obese women showed that the association found between circulating adiponectin and body fat mass became stronger after an adjustment was made for body fat mass (i.e., adiponectin/body fat mass; Matsubara et al., 2002). Because most associations reported herein were found between adiponectin mRNA levels in visceral fat tissue and the s.c., visceral, and total body fat depots, the significance of the high negative correlations between adiponectin mRNA levels in s.c. fat tissue and the various fat depots weights in the HL gilts only remains unclear to us.

In the current study, we provide the first evidence that pig adipoR1 and adipoR2 mRNA is less expressed

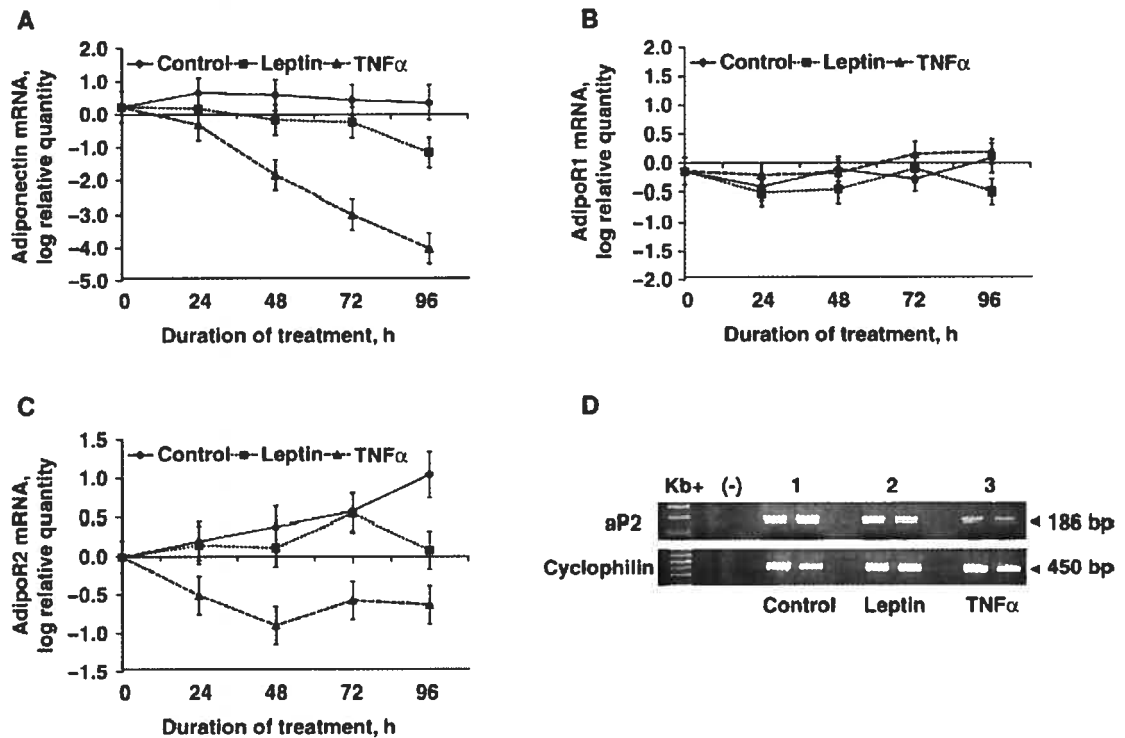


Figure 5. Measurement of adiponectin and adiponectin receptors 1 and 2 (adipoR1 and adipoR2) mRNA levels in porcine stromal-vascular cell culture. Total RNA was subjected to quantitative real-time PCR with primers specific for adiponectin (A), adipoR1 (B), and adipoR2 (C) as described in the Materials and Methods section. D) Representative reverse-transcriptase PCR results showing the effects of tumor necrosis factor- α (TNF α) and leptin on adipocyte-specific fatty acid-binding protein (aP2) mRNA levels in stromal-vascular cells after 96 h of differentiation with insulin-transferin-selenium (ITS) alone (Lane 1), ITS + 100ng/mL recombinant porcine leptin (Lane 2), and ITS + 10ng/mL TNF α (Lane 3). In panels A to C, data are log values of relative gene mRNA levels normalized with the cyclophilin housekeeping gene. Data are expressed as least squares means \pm SEM of three independent experiments ($n = 3$), with two wells in each replicate. Real-time reverse-transcriptase PCR amplifications were performed in triplicate.

in fat pigs when compared with lean breeds, and that this effect can only be detected in visceral fat tissue. Similar results were reported by Tsuchida et al. (2004), who found lower mRNA levels of adipoR1 and adipoR2 in white adipose tissue of ob/ob mice, a model of insulin resistance and obesity. Moreover, these authors reported that adipoR1 and adipoR2 mRNA levels in ob/ob mice were 31.9 and 7.9% of those from the wild-type mice, respectively. The same observation can be made in pigs, where adipoR1 and adipoR2 mRNA levels in UM fat gilts are 66 and 37% of those found in lean LW pigs. Tsuchida et al. (2004) reported that the expression of adipoR1 and adipoR2 is inversely correlated with plasma insulin levels. In contrast, human adiponectin receptors are not altered in muscle of type 2 diabetic patients (Debard et al., 2004), and insulin does not affect adipoR1 and adipoR2 gene expression in 3T3-L1 adipocytes (Fasshauer et al. 2004). In the current study,

it seems that pig adipoR1 and adipoR2 mRNA levels are controlled by factors other than insulin and glucose because fasting plasma concentrations of glucose and insulin were similar in all three breeds. Interestingly, Mersmann et al. (1982) previously reported that genetically obese pigs do not manifest their propensity to obesity through modifications in circulating glucose and insulin. Moreover, Wangness et al. (1977) showed that obese pigs are not hyperinsulinemic and have fasting glucose concentrations that are similar to those found in lean pigs.

Correlation analyses performed on the whole population revealed that pig obesity is associated with decreased expression of adipoR2 mRNA but not of adipoR1. Our results also suggest that adipoR2 expression is mainly modulated in the visceral fat tissue, which is also the predominant fat compartment for the control of adiponectin expression (Halleux et al., 2001). A lower

expression of *adipoR2* mRNA may lead to a decrease in adiponectin binding and thus results in decreased adiponectin effects in visceral adipose tissues. Pig *adipoR1* mRNA, which seems to be less affected by the development of obesity, might be able to compensate for decreased expression of *adipoR2* in visceral fat, and thus be able to mediate adiponectin effects in fat tissues. There were no correlations between *adipoR2* mRNA levels measured in visceral fat tissue and the various fat compartments weights in the HL breed. These discrepancies further suggest that adiponectin receptor gene expression can be modulated differently in adipocytes according to the breed of pigs. It may also suggest that adiponectin effects might be oriented towards various target tissues, such as the liver, muscles, and adipocytes according to the breed of pigs. Thus, it will be of interest to further study breed effects on adiponectin receptors mRNA levels in muscle and liver tissues.

Recent evidence suggests that $\text{TNF}\alpha$ may be involved in the modulation of lipid metabolism. Indeed, elevated levels of $\text{TNF}\alpha$ mRNA and protein have been found in adipose tissues of obese rodents, humans, and pigs (Hotamisligil 1999; Chen et al., 2004). Moreover, $\text{TNF}\alpha$ was the first adipocytokine proposed to represent a molecular link between obesity and insulin resistance (Moller 2000). In the current study, decreases in lipid accumulation and in *aP2* mRNA levels were observed in SV cells treated with ITS + $\text{TNF}\alpha$. These results agree with those of Rosenbaum and Greenberg (1998), who reported a 200% decrease of *aP2* mRNA levels after 48 and 72 h of treatment with $\text{TNF}\alpha$ on 3T3-L1 adipocytes. Ruan et al. (2002) recently reported that $\text{TNF}\alpha$ can downregulate many adipocyte-abundant genes that are critical for insulin responsiveness. Because of the known association between adiponectin expression and insulin resistance, we hypothesize that $\text{TNF}\alpha$ might also modulate adiponectin and adiponectin receptors mRNA levels in SV cells.

In our *in vitro* system, $\text{TNF}\alpha$ significantly decreased adiponectin mRNA levels in porcine SV cells in a time-dependent manner. This result agrees with those of Fasshauer et al. (2002), who showed that the expression and secretion of adiponectin from 3T3-L1 adipocytes was significantly decreased by $\text{TNF}\alpha$ (Fasshauer et al., 2002), and suggested that $\text{TNF}\alpha$ might have an active role for the decreased adiponectin production in obesity. In the current study, we demonstrate, for the first time, that *adipoR2*, but not *adipoR1*, is downregulated by $\text{TNF}\alpha$. These results suggest that $\text{TNF}\alpha$ might mediate its adiponectin-reducing effect via a downregulation of *adipoR2* mRNA levels. Previous data suggested that $\text{TNF}\alpha$ has no significant effect on *adipoR2* mRNA levels in 3T3-L1 cell culture (Fasshauer et al., 2004). In this later study, a steady decrease in *adipoR2* mRNA levels could be seen through the 4-h incubation period with $\text{TNF}\alpha$. We believe that longer incubation periods with $\text{TNF}\alpha$, such as those used in the current study, are required to document significant decreases of *adipoR2*

mRNA levels in fat cells. In the current study, we also demonstrated that adiponectin mRNA levels are significantly decreased when SV cells are incubated with recombinant porcine leptin. Similarly, adiponectin mRNA levels were suppressed by expression of leptin transgene in the hypothalamus of wild type and *ob/ob* mice (Ueno et al., 2004). In contrast, it was recently reported that leptin directly stimulates adiponectin mRNA and protein levels from 3T3-F442A adipocytes (Delporte et al., 2004). Finally, acute leptin treatment did not modify plasma adiponectin levels in humans (Gravila et al., 2003). Because of the conflicting results reported thus far, further studies will be needed to elucidate the effects of leptin on adiponectin expression.

Implications

The present study demonstrates the presence of adiponectin receptors mRNA in pig tissues. We also report that adiponectin and levels of adiponectin receptor 2, but not adiponectin receptor 1, mRNA are modulated in the visceral fat tissues, thereby suggesting an important role of central obesity in pig adiponectin expression. Furthermore, we showed that tumor necrosis factor- α may mediate this adiponectin-reducing effect through a downregulation of adiponectin receptor R2, but not adiponectin receptor R1, mRNA levels. Associations between adiponectin, tumor necrosis factor- α , and obesity in the pig indicate the utility of the pig as a research model for human studies. Increased understanding of the mechanisms regulating adiponectin expression in the pig will contribute to the development of approaches to treat obesity in humans and to control fat deposition in pigs.

Literature Cited

- Altomonte, J., S. Harbaran, A. Richter, and H. Dong. 2003. Fat depot-specific expression of adiponectin is impaired in Zucker fatty rats. *Metabolism* 52:958-963.
- Applied Biosystems. 1997. User Bulletin #2: ABI PRISM 7700 Sequence Detection System. Applied Biosystems, Foster City, CA.
- Arita, Y., S. Kihara, N. Ouchi, M. Takahashi, K. Maeda, J. Miyagawa, K. Hotta, I. Shimomura, T. Nakamura, K. Miyaoaka, H. Kuriyama, M. Nishida, S. Yamashita, K. Okubo, K. Matsubara, M. Muraguchi, Y. Ohmoto, T. Funahashi, and Y. Matsuzawa. 1999. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 257:79-83.
- Bonneau, M., J. Mourrot, J. Noblet, L. Lefaucheur, and J. P. Bidanel. 1990. Tissue development in meishan pigs: Muscle and fat development and metabolism and growth hormone regulation by somatotrophic hormone. Pages 201-213 in *Proc. Chinese Pig Symp.* M. Molenat and C. Legault, ed. Toulouse, France.
- Boone, C., F. Gregoire, and C. Remacle. 2000. Culture of porcine stromal-vascular cells in serum-free medium: Differential action of various hormonal agents on adipose conversion. *J. Anim. Sci.* 78: 885-895.
- CCAC. 1993. Guide to the Care and Use of Experimental Animals. Vol. 1. 2nd ed. Can. Coun. Anim. Care, Ontario, Canada.
- Chen, X. D., T. Lei, T. Xia, L. Gan, and Z. Q. Yang. 2004. Increased expression of resistin and tumour necrosis factor-alpha in pig adipose tissue as well as effect of feeding treatment on resistin and cAMP pathway. *Diabetes Obes. Metab.* 6:271-279.

- Cnop, M., P. J. Havel, K. M. Utzschneider, D. B. Carr, M. K. Sinha, E. J. Boyko, B. M. Retzlaff, R. H. Knopp, J. D. Brunzell, and S. E. Kahn. 2003. Relationship of adiponectin to body fat distribution, insulin sensitivity and plasma lipoproteins: Evidence for independent roles of age and sex. *Diabetologia* 46:459-469.
- Combs, T. P., A. H. Berg, M. W. Rajala, S. Klebanov, P. Iyengar, J. C. Jimenez-Chillaron, M. E. Patti, S. L. Klein, R. S. Weinstein, and P. E. Scherer. 2003. Sexual differentiation, pregnancy, calorie restriction, and aging affect the adipocyte-specific secretory protein adiponectin. *Diabetes* 52:268-276.
- Coppack, S. W. 2001. Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue. *Proc. Nutr. Soc.* 60:349-356.
- Debard, C., M. Laville, V. Berbe, E. Loizon, C. Guillet, B. Morio-Liondore, Y. Boirie, and H. Vidal. 2004. Expression of key genes of fatty acid oxidation, including adiponectin receptors, in skeletal muscle of type 2 diabetic patients. *Diabetologia* 47:917-925.
- Delporte, M.-L., S. Ait El Mkedem, M. Quisquater, and S. M. Brichard. 2004. Leptin treatment markedly increased plasma adiponectin, but barely decreased plasma resistin of ob/ob mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 287:E446-E453.
- Ding, S. T., R. L. McNeel, and H. J. Mersmann. 1999. Expression of porcine adipocyte transcripts: Tissue distribution and differentiation in vitro and in vivo. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 123:307-318.
- Fnashauer, M., J. Klein, S. Kralisch, M. Klier, U. Loasner, M. Blüher, and R. Paschke. 2004. Growth hormone is a positive regulator of adiponectin receptor 2 in 3T3-L1 adipocytes. *FEBS Lett.* 558:27-32.
- Fnashauer, M., J. Klein, S. Neumann, M. Eszlinger, and R. Paschke. 2002. Hormonal regulation of adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290:1084-1089.
- Fisher, F. M., P. G. McTernan, G. Valsamakis, R. Chetty, A. L. Harte, A. J. Anwar, J. Starcynski, J. Crocker, A. H. Barnett, C. L. McTernan, and S. Kumar. 2002. Differences in adiponectin protein expression: Effect of fat depots and type 2 diabetic status. *Horm. Metab. Res.* 34:650-654.
- Gavrila, A., J. L. Chan, N. Yiannakouris, M. Kontogianni, L. C. Miller, C. Orlova, and C. S. Mantzoros. 2003. Serum adiponectin levels are inversely associated with overall and central fat distribution but are not directly regulated by acute fasting or leptin administration in humans: Cross-sectional and interventional studies. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88:4823-4831.
- Halleux, C. M., M. Takahashi, M. L. Delporte, R. Detry, T. Funahashi, Y. Matsuzawa, and S. M. Brichard. 2001. Secretion of adiponectin and regulation of apM1 gene expression in human visceral adipose tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 288:1102-1107.
- Hausman, G. J. 1989. The influence of insulin, triiodothyronine (T₃) and insulin-like growth factor-I (IGF-I) on the differentiation of preadipocytes in serum-free cultures of pig stromal-vascular cells. *J. Anim. Sci.* 67:3136-3143.
- Hotamisligil, G. S. 1999. The role of TNF α and TNF receptors in obesity and insulin resistance. *J. Intern. Med.* 245:621-625.
- Hotta, K., T. Funahashi, Y. Arita, M. Takahashi, M. Matsuda, Y. Okamoto, H. Iwahashi, H. Kuriyama, N. Ouchi, K. Maeda, M. Nishida, S. Kihara, N. Sakai, T. Nakajima, K. Hasegawa, M. Muraguchi, Y. Ohmoto, T. Nakamura, S. Yamashita, T. Hanafusa, and Y. Matsuzawa. 2000. Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20:1595-1599.
- Hu, E., P. Liang, and B. M. Spiegelman. 1996. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J. Biol. Chem.* 271:10697-10703.
- Jacobi, S. K., K. M. Ajuwon, T. E. Weber, J. L. Kuske, C. J. Dyer, and M. E. Spurlock. 2004. Cloning and expression of porcine adiponectin, and its relationship to adiposity, lipogenesis and the acute phase response. *J. Endocrinol.* 182:133-144.
- Kreegipuu, A., N. Blom, and S. Brunak. 1999. PhosphoBase, a database of phosphorylation sites: Release 2.0. *Nucleic Acids Res.* 27:237-239.
- Kubota, N., Y. Terauchi, T. Yamauchi, T. Kubota, M. Moroi, J. Matsui, K. Eto, T. Yamashita, J. Kamon, H. Satoh, W. Yano, P. Froguel, R. Nagai, S. Kimura, T. Kadowaki, and T. Noda. 2002. Disruption of adiponectin causes insulin resistance and neointimal formation. *J. Biol. Chem.* 277:25863-25866.
- Lihn, A. S., J. M. Bruun, G. He, S. B. Pedersen, P. F. Jensen, and B. Richelsen. 2004. Lower expression of adiponectin mRNA in visceral adipose tissue in lean and obese subjects. *Mol. Cell. Endocrinol.* 219:9-15.
- Ma, K., A. Cabrero, P. K. Saha, H. Kojima, L. Li, B. H. Chang, A. Paul, and L. Chan. 2002. Increased beta-oxidation but no insulin resistance or glucose intolerance in mice lacking adiponectin. *J. Biol. Chem.* 277:34658-34661.
- Maeda, K., K. Okubo, I. Shimomura, T. Funahashi, Y. Matsuzawa, and K. Matsubara. 1996. cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 221:286-289.
- Maeda, N., I. Shimomura, K. Kishida, H. Nishizawa, M. Matsuda, H. Nagaretani, N. Furuyama, H. Kondo, M. Takahashi, Y. Arita, R. Komuro, N. Ouchi, S. Kihara, Y. Tochino, K. Okutomi, M. Hørie, S. Takeda, T. Aoyama, T. Funahashi, and Y. Matsuzawa. 2002. Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat. Med.* 8:731-737.
- Magun, R., B. M. Burgering, P. J. Coffey, D. Pardasani, Y. Lin, J. Chabot, and A. Sorisky. 1996. Expression of a constitutively activated form of protein kinase B (ϵ -Akt) in 3T3-L1 preadipose cells causes spontaneous differentiation. *Endocrinology.* 137:3590-3593.
- Marcoux, M., J. F. Bernier, and C. Pomar. 2003. Estimation of Canadian and European lean yields and composition of pig carcasses by dual-energy x-ray absorptiometry. *Meat Sci.* 63:359-365.
- Matsubara, M., S. Maruoka, and S. Katayose. 2002. Inverse relationship between plasma adiponectin and leptin concentrations in normal-weight and obese women. *Eur. J. Endocrinol.* 147:173-180.
- Mersmann, H. J., W. G. Pond, and J. T. Yen. 1982. Plasma glucose, insulin and lipids during growth of genetically lean and obese swine. *Growth* 46:189-198.
- Milan, G., M. Granzotto, A. Scarda, A. Calcagno, C. Pagano, G. Federspil, and R. Vettor. 2002. Resistin and adiponectin expression in visceral fat of obese rats: Effect of weight loss. *Obes. Res.* 10:1095-1103.
- Møller, D. E. 2000. Potential role of TNF- α in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Trends Endocrinol. Metab.* 11:212-217.
- Park, K. G., K. S. Park, M. J. Kim, H. S. Kim, Y. S. Suh, J. D. Ahn, K. K. Park, Y. C. Chang, and I. K. Lee. 2004. Relationship between serum adiponectin and leptin concentrations and body fat distribution. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 63:135-142.
- Ramsay, T. G. 2001. Porcine leptin alters insulin inhibition of lipolysis in porcine adipocytes in vitro. *J. Anim. Sci.* 79:653-657.
- Rosenbaum, S. E., and A. S. Greenberg. 1998. The short- and long-term effects of tumor necrosis factor- α and BRL 49653 on peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ 2 gene expression and other adipocyte genes. *Mol. Endocrinol.* 12:1150-1160.
- Ruan, H., N. Hacohen, T. R. Golub, L. Van Parijs, and H. F. Lodish. 2002. Tumor necrosis factor- α suppresses adipocyte-specific genes and activates expression of preadipocyte genes in 3T3-L1 adipocytes: Nuclear factor- κ B activation by TNF- α is obligatory. *Diabetes* 51:1319-1336.
- Ruiz-Cortés, Z. T., Y. Martel-Kennes, N. Y. Gevry, B. R. Downey, M. F. Palin, and B. D. Murphy. 2003. Biphasic effects of leptin in porcine granulosa cells. *Biol. Reprod.* 68:789-96.
- Silha, J. V., M. Krsek, J. U. Skřha, P. Sucharda, B. L. Nyomba, and L. J. Murphy. 2003. Plasma resistin, adiponectin and leptin levels in lean and obese subjects: correlations with insulin resistance. *Eur. J. Endocrinol.* 149:331-335.
- Silha, J. V., M. Krsek, J. Skřha, P. Sucharda, B. L. Nyomba, and L. J. Murphy. 2004. Plasma resistin, leptin and adiponectin levels

- in non-diabetic and diabetic obese subjects. *Diabet. Med.* 21:497-499.
- Staiger, H., C. Kausch, A. Guirguis, M. Weisser, E. Maerker, M. Stumvoll, R. Lammers, F. Machicao, and H. U. Haring. 2003. Induction of adiponectin gene expression in human myotubes by an adiponectin-containing HEK293 cell culture supernatant. *Diabetologia* 46:956-960.
- Steppan, C. M., S. T. Bailey, S. Bhat, E. J. Brown, R. R. Banerjee, C. M. Wright, H. R. Patel, R. S. Ahima, and M. A. Lazar. 2001. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature (Lond.)* 409:307-312.
- Tsuchida, A., T. Yamauchi, Y. Ito, Y. Hada, T. Maki, S. Takekawa, J. Kamon, M. Kobayashi, R. Suzuki, K. Hara, N. Kubota, Y. Terauchi, P. Froguel, J. Nakae, M. Kasuga, D. Accili, K. Tobe, K. Ueki, R. Nagai, and T. Kadowaki. 2004. Insulin/Foxo1 pathway regulates expression levels of adiponectin receptors and adiponectin sensitivity. *J. Biol. Chem.* 279:30817-30822.
- Ueno, N., M. G. Dube, A. Inui, P. S. Kalra, and S. P. Kalra. 2004. Leptin modulates orexigenic effects of ghrelin, attenuates adiponectin and insulin levels, and selectively the dark-phase feeding as revealed by central leptin gene therapy. *Endocrinology* 145:4176-4184.
- Applied Biosystems. 1997. User Bulletin #2: ABI PRISM 7700 Sequence Detection System. Applied Biosystems, Foster City, CA.
- Wangness, P. J., R. J. Martin, and J. H. Gahagan. 1977. Insulin and growth hormone in lean and obese pigs. *Am. J. Physiol.* 233:E104-E108.
- Weyer, C., T. Funahashi, S. Tanaka, K. Hotta, Y. Matsuzawa, R. E. Pratley, and P. A. Tataranni. 2001. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: Close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86:1930-1935.
- Yamauchi, T., J. Kamon, H. Waki, Y. Terauchi, N. Kubota, K. Hara, Y. Mori, T. Ide, K. Murakami, N. Tsuboyama-Kasaoka, O. Ezaki, Y. Akanuma, O. Gavrilova, C. Vinson, M. L. Reitman, H. Kagechika, K. Shudo, M. Yoda, Y. Nakano, K. Tobe, R. Nagai, S. Kimura, M. Tomita, P. Froguel, and T. Kadowaki. 2001. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nat. Med.* 7:941-946.
- Yamauchi, T., J. Kamon, Y. Ito, A. Tsuchida, T. Yokomizo, S. Kita, T. Sugiyama, M. Miyagishi, K. Hara, M. Tsunoda, K. Murakami, T. Ohteki, S. Uchida, S. Takekawa, H. Waki, N. H. Tsuno, Y. Shibata, Y. Terauchi, P. Froguel, K. Tobe, S. Koyasu, K. Taira, T. Kitamura, T. Shimizu, R. Nagai, and T. Kadowaki. 2003. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature (Lond.)* 423:762-769.
- Yang, W. S., M. H. Chen, W. J. Lee, K. C. Lee, C. L. Chao, K. C. Huang, C. L. Chen, T. Y. Tai, and L. M. Chuang. 2003. Adiponectin mRNA levels in the abdominal adipose depots of nondiabetic women. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 27:896-900.

Article 2

Modulation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Delta and Gamma Transcripts in swine endometrial tissue during early gestation

2.3 Préambule

Cet article rapporte, pour la première fois, la séquence codante entière du gène PPAR δ porcine et la distribution des ARNm de PPAR δ , SREBP1c/ADD1 et ANGPTL4 dans différents tissus porcins. Nous avons aussi démontré l'expression au niveau protéique de PPAR γ et de PPAR δ dans l'endomètre porcine et étudié les corrélations entre la parité, le site d'échantillonnage dans l'endomètre porcine (entre et aux sites d'attachement embryonnaire), et le stade de gestation (i.e. cyclique, jours 15 et 25 de la gestation), sur l'expression des transcrits des différents gènes candidats étudiés. Ces différents gènes sont connus, chez l'humain, pour leurs rôles dans le métabolisme des lipides. Cependant, nous démontrons ici qu'ils pourraient également avoir des rôles importants pendant la période de péri-implantation chez le porc. En particulier, nous rapportons une corrélation entre la parité et l'expression des gènes de PPAR δ , ANGPTL4 et SREBP1c. Ainsi, les truies multipares, généralement reconnues comme ayant des tailles de portée plus grandes, présentent une expression d'ARNm supérieure aux truies nullipares pour ces gènes.

De plus, nos résultats démontrent que l'abondance des transcrits de PPAR δ , PPAR γ 1 et ANGPTL4 est diminuée aux sites d'attachement embryonnaire comparativement aux échantillons inter-site. De plus, la présence du trophoblaste a été associée avec une détection de PPAR δ et PPAR γ mais seulement aux sites d'attachement embryonnaire au jour 15 de la gestation. Cependant, les niveaux d'ARNm de PPAR δ , aux sites d'attachement embryonnaire, sont diminués aux jours 15 et 25 de la gestation, comparativement aux échantillons provenant de truies cycliques.

Une augmentation significative des transcrits de PPAR γ , impliqué dans le processus d'implantation et d'angiogenèse chez d'autres espèces, a aussi été observée au jour 25 de la gestation, comparativement aux truies au jour 15 de la gestation et aux truies ML cycliques.

Enfin, l'abondance des transcrits de PPAR γ 2 n'est pas corrélée avec la parité, le site d'échantillonnage ou le stade de gestation, dans l'endomètre porcin. Ceci suggère, en conclusion, que, contrairement à PPAR γ 1, PPAR δ , ANGPTL4 et SREBP1c, le récepteur nucléaire PPAR γ 2 aurait un rôle de moindre importance en début de gestation chez la truie.

2.4 Contributions à l'article

Cet article présente une version non définitive d'un article soumis au journal *Reproduction*, fin décembre 2005. J'ai réalisé la majorité des analyses PCR concernant l'expression des différents transcrits (multi-tissus). Le clonage et séquençage du gène porcin PPAR δ ont été effectués par Mme. Danièle Beaudry. Les analyses Real-Time PCR des différents gènes dans l'endomètre ont été réalisés en collaboration avec Mme. Danièle Beaudry.

Running head: Pig PPAR delta and gamma mRNA levels in gestation

Modulation of peroxisome proliferator-activated receptor delta and gamma transcripts in swine endometrial tissue during early gestation.*

Etienne Lord¹, Bruce D. Murphy¹, Joëlle A. Desmarais¹, Sandra Ledoux¹, Danièle Beaudry² and Marie-France Palin^{2,3}

¹Centre de Recherche en Reproduction Animale, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, Canada, J2S 7C6

²Dairy and Swine Research and Development Center, Agriculture and Agri-Food Canada, Lennoxville, Québec, Canada J1M 1Z3

³Correspondence: Agriculture and Agri-Food Canada, P.O. Box 90, 2000
Route 108 East, Lennoxville, Quebec, Canada J1M 1Z3
(Phone: 819-565-9174 ext. 207; Fax: 819-564-5507 ■)

* This work was supported by the National Sciences and Engineering Research Council of Canada Strategic Grant no. 246154 to B.M.D. and M.F.P., Genetiporc Inc. (St-Bernard, QC, Canada) and Agriculture and Agri-Food Canada. E.L. is supported by FPPQ fellowship.

²The authors are grateful to staff of the Swine Complex for animal care and S. Méthot for statistical analysis. Lennoxville Dairy and Swine R&D Centre contribution no XXX.

Abstract

Recent evidence points to a role for peroxisome proliferator-activated receptors δ and γ (PPAR) in embryo implantation and survival. In this study, we report the porcine PPAR δ complete coding sequence and mRNA abundance of PPAR δ , PPAR γ 1 and γ 2, angiopoietin-like protein 4 (ANGPTL4) and adipocyte determination and differentiation-dependent factor 1 (ADD1) genes in the pregnant sow endometrium. Real-time PCR analysis was used to study the effect of parity (Yorkshire-Landrace multiparous (YL) and nulliparous (YLn)), site of endometrial tissue sampling (between and at embryo attachment sites) in crossbred Duroc x Yorkshire-Landrace (DYL) sows) and stages of pregnancy (non-pregnant, day 15 and day 25 after mating) in Meishan-Landrace (ML)) on mRNA levels. Parity effects were observed for PPAR δ , ANGPTL4 and ADD1, with higher mRNA levels in YL than YLn sows. In DYL sows, lower mRNA levels were present at attachment sites compared to between attachment sites for PPAR δ , PPAR γ 1 and ANGPTL4. Finally, day 15 pregnant ML sows had lower PPAR δ mRNA levels compared to day 15 cycling ML sows. A significant increase of PPAR γ 1 mRNA levels was found on day 25 pregnant ML and DYL sows relative to day 15 ML or DYL pregnant sows. PPAR δ and γ immunostaining was detected in endometrial tissue of day 15 cycling sow, day 15 and 25 pregnant sow and epithelial cells of day 25 embryos. Collectively, our results suggest a role for PPAR δ , PPAR γ 1 and ANGPTL4, but not PPAR γ 2, during the periimplantation period in pregnant sows.

Introduction

Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) are members of the nuclear hormone receptor superfamily of ligand-dependent transcription factors that regulate the expression of target genes involved in cell differentiation and proliferation (Michalik *et al.* 2002; Rosen *et al.* 2000). Three subtypes of PPARs, named PPAR α , PPAR δ/β and PPAR γ (PPAR γ 1 and γ 2), have been identified in vertebrates, each encoded by a separate gene and fulfilling distinct functions. Whereas the importance of PPARs in the control of lipid and glucose homeostasis and cellular growth and differentiation has been well established, much less is known about their function in reproductive tissues. PPAR δ is highly expressed in the mouse uterus at implantation sites and its expression requires the presence of an active blastocyst (Lim *et al.* 1999; Ding *et al.* 2003b). PPAR δ was also found in the rat uterus at implantation sites and in decidual cells (Ding *et al.* 2003a). PPAR γ is expressed in human (Marvin *et al.* 2000), rat (Asami-Miyagishi *et al.* 2004) and mouse (Barak *et al.* 1999) placental tissues at various stages of gestation. Studies from knockout mouse models showed that both PPAR δ and PPAR γ have essential, but different roles in murine pregnancy. Indeed, while PPAR γ appears to be required for differentiation of the placenta, PPAR δ seems to be more important for normal development of the placental-decidual interface (Barak *et al.* 1999; Barak *et al.* 2002). Normal fertility was reported in PPAR α deficient mice, thus suggesting that this nuclear receptor is not essential for normal reproductive function (Lee *et al.* 1995).

The observation that uterine cyclo-oxygenase-2 (COX-2), a rate limiting enzyme in prostaglandin synthesis, is expressed in an implantation-specific manner and that implantation is defective in COX-2-deficient mice established that uterine

prostaglandins produced by COX-2 may play an essential role in this uterine event (Lim *et al.* 1997). Moreover, PPAR δ selective agonist, L-165041, is able to restore implantation in COX-2 deficient mice, suggesting that COX-2-derived prostaglandins mediate embryo implantation via PPAR δ (Lim *et al.* 1999). Numerous arachidonic acid metabolites have been shown to be naturally occurring ligands for nuclear PPARs (reviewed in Helliwell *et al.* 2004). Prostaglandins are essential to early porcine pregnancy for vascular permeability, placenta development, and immune responses (Geisert *et al.* 1990), suggesting a key role for PPAR γ and δ in early gestation in pigs. Various genes contain peroxisome proliferator response elements (PPRE) in their upstream regulatory sequences (Martin *et al.* 1997), however, biologically relevant target genes are largely unknown in reproductive tissues. Angiopoietin-like protein 4 (ANGPTL4) is a PPAR γ target gene (Mandard *et al.* 2004), and, due to its previously reported role as an apoptosis survival factor (Kim *et al.* 2000) and in angiogenesis (Belanger *et al.* 2002; Le Jan *et al.* 2003), it is a relevant PPAR target gene to study in early pregnancy. Therefore, the objectives of this study were 1) to evaluate whether PPAR δ , PPAR γ 1, PPAR γ 2 and ANGPTL4 are expressed in pig endometrium; 2) to examine the effects of the day of pregnancy (non-pregnant, d15 and d25), parity of the sows and site of endometrial tissue sampling on PPAR δ , PPAR γ 1, PPAR γ 2 and ANGPTL4 mRNA levels in endometrial tissues. In addition, mRNA levels of ADD1/SREBP1c, a member of the basic helix-loop-helix transcription factor family, were also estimated in this experimental design. This last candidate was chosen because of its previously reported role in the production of endogenous ligands for PPAR γ (Kim *et al.* 1998b).

Materials and Methods

Animals

Three groups of sows (Table 1) were kindly provided by Genetiporc (St-Bernard, QC, Canada). The first group comprised 22 multiparous Yorkshire-Landrace sows (YL, 4-5 parities) and 22 nulliparous Yorkshire-Landrace sows (YLn) and was used to study parity effects on transcript abundance of selected genes. The second group consisted of 24 crossbred Duroc x Yorkshire-Landrace sows (2 parities) that were killed on day 15 (DYL15, n = 14) or on day 25 (DYL25, n = 10) of gestation. These sows were used to study the effects of day of pregnancy and site of endometrial tissue sampling (at implantation or between implantation sites). These sows were also used for immunohistochemical analysis. A third group of 24 Meishan-Landrace sows were killed on day 15 (ML15, 2-3 parities) or on day 25 (ML25, 2-3 parities) of gestation, and 6 Meishan-Landrace sows were killed on day 15 of the oestrous cycle (MLc, 2-3 parities). This last group was used to study the effects of pregnancy status (day 15 pregnant vs day 15 of the oestrous cycle) and of the day of pregnancy (day 15 vs day 25 pregnant sows). A crossbred sow was also used for tissue distribution analysis. Heat detection was performed twice a day, between 0800 and 0900 h and between 1600 and 1700 h, by introducing a boar into the pen. At the second oestrous, sows were inseminated twice with pooled semen from Landrace boars of proven fertility (CIPQ, Inc., St-Lambert, QC, Canada), 12 and 24 h after oestrus detection. The day of oestrous was considered day 0. All procedures involving animals were approved by the local Animal Care Committee following the guidelines of the Canadian Council on Animal Care (1993).

Tissue Collection

Prior to collection of endometrial tissue, the uteri of day 15 pregnant sows were flushed with phosphate buffered saline (PBS) and pregnancy confirmed by the presence of embryos in the flushing. The reproductive tract was collected and the uterine horns were opened along the antimesometrial border. Endometrial tissue samples were taken from the mesometrial side, at the sites or between sites of conceptus attachment for the pregnant sows, or in the middle of the horn for the cyclic sows. A minimum of five attachment sites or five endometrial sites was collected for each sow. Attachment sites from day 15 sows were determined by the presence of local hyperemia in endometrial tissue, manifest as a darker reddish color compared to surrounding tissue. All tissue samples were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until processed. The procedure was completed within 20 min after slaughter. Several tissues were sampled, including liver, kidney, heart, lung, ovary, stomach, brain cortex, endometrium, skeletal muscle, ham subcutaneous fat, back subcutaneous fat, and visceral fat.

RNA Extraction and complementary DNA preparation

Total RNA was extracted from endometrial tissue (minimum of five samples per sow) using TRIzol Reagent (Gibco BRL, Burlington, ON, Canada) according to the manufacturer's instructions. Endometrial RNA samples from individual animals were pooled prior to cDNA synthesis. Total RNA was dissolved in water and quantified spectrophotometrically at 260 nm and an RNA aliquot was run on 1% agarose gel to verify its integrity. Total RNA was reverse transcribed to cDNA in a PTC-200 Peltier Programmable Thermal Cycler (MJ Research, Foster City, CA). Five (5) µg of total

RNA were treated with three units of Dnase I (amplification grade; Gibco BRL) to remove contaminating genomic DNA. First-strand cDNA was synthesized using a SuperScript™ II preamplification system (Gibco BRL) and 500 ng of oligo(dT)₁₂₋₁₈ as primer (Amersham Pharmacia Biotech, Baie D'Urfé, QC, Canada) in a 50 µl reaction volume.

Cloning and sequencing of porcine PPAR δ

To determine the porcine specific sequence of PPAR δ , degenerate primers (PPARD-F and PPARD-R; Table 2) were designed based on homology between human (GenBank accession no. HUMPPARA), rat (GenBank accession no. U75918) and mouse (GenBank accession no. NM_011145) sequences. PCR amplification was performed under the following conditions: The 50-µl PCR reaction contained 200 µM dNTPs, 300 nM of each primer, 1.5 mM MgCl₂, 1 unit of Taq polymerase (Clontech, Palo Alto, CA) in 1X Taq polymerase buffer. The PCR profile consisted of an initial denaturation step at 94°C for 1 minute followed by 33 cycles of 94°C for 30 sec, 55°C for 30 sec., 68°C for 2 minutes, and a final extension at 68°C for 3 minutes. This amplification generated one fragment of 576 bp. The nucleotide sequence of the amplified fragment was determined by cycle sequencing in both directions a total of three independent amplifications. Sequence determination was performed using the Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reactions (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) according to manufacturer's instructions and run on an ABI 377 DNA sequencer (PE Applied Biosystems).

To obtain the complete coding sequence of porcine PPAR δ , 5' and 3' rapid amplification of the cDNA ends (RACE) was performed using the Marathon™ cDNA

Amplification kit (Clontech). Poly A⁺ RNA was isolated using the Nucleotrap mRNA purification kit (Clontech). One (1) µg of Poly A⁺ RNA from sow endometrial tissue was reverse-transcribed using the Marathon cDNA synthesis primer. Second strand cDNA was synthesized and a Marathon cDNA adaptor was ligated as recommended by the manufacturer. The 3' end amplification of porcine PPAR δ was performed using an upstream primer 5'-ACTACGGAGTCCACGCTTGCGA-3', which corresponds to pig PPAR δ cDNA between nucleotides 535 and 556 (GenBank accession number NM_214152). The 3' RACE generated a single fragment of 1.5 kb. The 5' end of pig PPAR δ was amplified using a pig specific downstream primer 5'-CTGCCACAACGTCTCGATGTCG-3', which hybridizes with nucleotides 923 to 944 of the pig PPAR δ cDNA sequence (GenBank accession number NM_214152). The amplified 5' end generated a single fragment of 1 kb. Both 5' and 3' end fragments were sequenced as described above and were assembled using the AutoAssembler 2.0 software (PE Applied Biosystems) to determine the complete porcine specific PPAR δ coding sequence. PPAR δ sequence features were found using NCBI Conserved Domain Search (Marchler-Bauer *et al.* 2003).

Tissue distribution of porcine PPAR δ , ANGPTL4 and ADD1 mRNA

Amplifications of PPAR δ , ADD1 and ANGPTL4 cDNAs were performed in various pig tissues using primers described in Table 2. Total RNA extraction and cDNA synthesis were performed as described above. PCR amplifications were performed in a 100-µl total volume which contained a 2 µl aliquot of the reverse transcriptase product, 150 nM of forward and reverse primers, 200 µM dNTPs, 1 mM MgCl₂ (0.8 mM for ADD1) and 0.5 unit of Taq polymerase in 1X Taq polymerase buffer (Amersham Pharmacia

Biotech). The PCR profile consisted of an initial denaturation step at 94°C for 2 min, followed by 35 cycles (36 for ADD1) of denaturing at 94°C for 1 min, annealing at 69°C (61°C for ADD1 and ANGPTL4) for 1 min, extension at 72°C for 1 min, and a final extension at 72°C for 5 min. Pig cyclophilin amplification using forward 5'-ACCGTCTTCTTCGACATCGC-3' and reverse 5'-CTTGCTGGTCTTGCCATTCC-3' primers, which correspond to nucleotides 17-36 and 447-466 of the pig cyclophilin sequence (GenBank accession number AY266299), was also performed on the same cDNAs as an internal control for variations in cDNA synthesis. The 100- μ l PCR reaction mixture contained a 2 μ l aliquot of the reverse transcriptase product, 150 nM of forward and reverse primers, 200 μ M dNTPs, 1.0 mM MgCl₂, and 0.5 unit of Taq polymerase in 1 X Taq polymerase buffer (Amersham Pharmacia Biotech). The PCR profile which was used was the same as that described above for PPAR δ , with the exception of the annealing temperature, which was 60°C. Amplified PCR fragments were electrophoresed on a 1.5% agarose gel (3% for ADD1) and stained with ethidium bromide. These fragments were single pass sequenced, as described above to confirm their identity. Pictures of the resulting gels were taken with Polaroid positive-negative film (#55). Negatives from Polaroid positive-negative photos were then scanned using an Imaging Densitometer (Model GS-670; Bio-Rad Laboratories Ltd., Mississauga, ON, Canada). PCR amplifications were repeated in duplicate using two different tissue samples from the same animal.

Quantitative measurements of mRNA levels in endometrial tissues.

Endometrial tissues at embryo attachment (groups 1,2 and 3) and between attachment sites (group 2) were analysed for PPAR δ , PPAR γ 1, PPAR γ 2, ADD1 and ANGPTL4

mRNA levels using Real-Time PCR amplifications. Gene-specific primers (Table 2) were designed and selected using the Primer Express Software (PE Applied BioSystem). Primers used for ADD1 are the same as those used for tissue distribution. Real-time PCR amplifications were performed in 25- μ l reaction volume consisting of 50 nM of forward and reverse primer, 1 μ l of cDNA, 0.25 μ l AmpErase (PE Applied BioSystems) and 1 X SYBR®Green Master Mix (PE Applied BioSystems). Cycling conditions were 2 min at 50°C, followed by 10 min at 95°C. Then, 40 cycles of 15 sec at 95°C and 1 min at 60°C, were performed. Amplification, detection and analysis were performed with an ABI Prism 7700 Sequence Detector (PE Applied BioSystems). Samples were normalized using the housekeeping gene cyclophilin (Table 2). Reaction mixtures contained 50 nM of forward and 900 nM of reverse primers. Real-time PCR cycling conditions were the same as described above. All real-time PCR reactions were performed in triplicate and standard curves were established in duplicate for each gene. Target genes and cyclophilin amplifications were run in separate assays. A pool of endometrial cDNA was used to create a standard curve for quantification of the transcripts using the relative standard curve method as described by Applied Biosystems (User Bulletin #2, 1997). Standard curve arbitrary units were set at 1 for the undiluted cDNA pool and dilutions of 0.75, 0.50, 0.25, 0.10, 0.05, 0.025 and 0.005 were then performed. For each experimental sample, the amount of target gene mRNA relative to endogenous cyclophilin was determined from their respective standard curves. Relative quantity ratios were obtained by dividing the relative quantity units of target genes by those of cyclophilin. Mean values from triplicates were then used to perform statistical analyses. Specificity of the amplified fragments was verified on a 3.5% agarose gel and

with melting curve analysis using the Dissociation Curves v1.0 software (PE Applied BioSystems).

Immunohistochemical analysis

Uterine tissues were fixed in 4% paraformaldehyde, 0.1M sodium cacodylate, and kept in a 0.4% paraformaldehyde solution at 4° C until embedded in paraffin. Endogenous peroxidase activity was quenched by incubating slides for 30 minutes in methanol containing 0.3% hydrogen peroxide, and sections were boiled for 15 min in 0.01M citrate buffer, pH 6.0 for antigen retrieval. Non-specific protein binding was blocked by incubating sections in Tris-buffered saline (TBS) containing 10 % normal goat serum (Jackson Immuno Research laboratories, West Grove, PA) for 45 min at room temperature. Tissues were then incubated overnight at 4°C in a 1:50 dilution in TBS of either rabbit anti-human PPAR γ or PPAR δ polyclonal antiserum (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Slides were washed twice (5 min) at room temperature. Primary antibody was detected using the Vectastain ABC kit (Vector laboratories, Burlingame, CA), which includes a biotinylated goat anti-rabbit secondary antibody at a concentration of 10 μ g/ml. The Nova Red substrate kit (Vector laboratories, Burlingame, CA) detected peroxidase activity in the form of a red precipitate. Sections were counterstained with hematoxylin. Control sections were subjected to the same procedure, except that rabbit anti-human PPAR δ and PPAR γ antibodies were omitted.

Statistical analyses

Relative quantification of mRNA levels was performed according to the standard curve method described by Applied Biosystems (User Bulletin no 2, PE Applied Biosystem,

1997). Group 1 means were analyzed using a one-way analysis of variance (ANOVA) on two treatment groups (multiparous vs nulliparous). Groups 2 and 3 means were analyzed by all pair-wise multiple comparison procedures (Tukey test) or by a two-way analysis of variance (full factorial on sampling site and day of pregnancy) where pertinent. Data were analysed using SAS (SAS Inst., Inc., Cary, NC, version 8.1) and results are presented as least square means of mRNA relative abundance \pm SEM. Statistical significance was set at $P < 0.05$.

Results

Cloning and sequence analysis of porcine PPAR δ cDNA

Using RT-PCR and RACE on total RNA isolated from porcine endometrial tissue, the complete cDNA coding sequence for porcine PPAR δ was obtained (GenBank accession no. NM_214152). Analysis of the porcine PPAR δ nucleotide sequence indicated it to be 91.7%, 88.1% and 88.8% identical to the human, rat and mouse sequences, respectively with a predicted protein sequence length of 441 amino acids. Analysis of the deduced PPAR δ amino acid sequence (Fig. 1) showed a 95%, 89% and 90% identity with human, rat and mouse sequences, respectively. Multiple alignments revealed that the DNA-binding and ligand-binding domains, characteristic of the nuclear receptors, are also well conserved in the pig PPAR δ protein relative to other species (Desvergne & Wahli 1999).

Expression of PPAR δ , ANGPTL4 and ADD1 transcripts in porcine tissues

Relative abundance of PPAR δ , ANGPTL4 and ADD1 mRNA were assessed in various tissues from an adult sow. A single amplified fragment of 358 bp was detected for PPAR δ in all tissues tested (fig. 2). ANGPTL4 amplification generated a single

fragment of 340 bp which was expressed in all tissues, with the exception of the cerebral cortex where it was undetectable. Finally, a single ADD1 fragment of 79 bp was amplified in all tissues but very faint amplifications were obtained in the heart and brain cortex tissues.

PPAR δ and PPAR γ localization during the peri-implantation period

Immunostaining detected PPAR δ and PPAR γ in nuclei of pig endometrial cells, while both were absent in the myometrium. On day 15 of pregnancy, PPAR δ staining was observed at attachment sites in the luminal and glandular epithelium and minor expression of PPAR δ was present in the subepithelial stroma (Fig. 3A and B). Between attachment sites, there was PPAR δ immunoreactivity in the luminal and glandular epithelium, but none in stromal cells (Fig. 3C and D). On day 25 of pregnancy, PPAR δ protein was found in trophoblast cells (Fig. 3E) but, at the implantation sites, only weak expression was detected in the luminal epithelium and it was absent from the glandular epithelium and stroma (Fig. 3E and F). Between attachment sites, a stronger signal was detected for PPAR δ in the luminal epithelium and staining was detected in the glands located in close proximity to the luminal epithelium (Fig. 3G). No signal could be detected in glands adjacent to the myometrium (Fig. 3 H). Day 15 cycling sows displayed PPAR δ immunostaining in luminal and glandular epithelium but we were unable to detect signal in stromal cells (Fig. 3I and J).

The antibody employed interacted with both isoforms of PPAR γ , thus it was not possible to distinguish between these subtypes. Readily identifiable immunostaining was present in endometrial luminal and glandular epithelium at day 15 in cycling sows (Fig. 4I and J) and pregnant sows both between (Fig. 4C and D) and in attachment sites

(Fig. 4A and B). Faint PPAR γ staining was detected in subepithelial stroma at the implantation sites only (Fig. 4A). On day 25 of pregnancy, PPAR γ protein was detected in trophoblast cells (Fig. 4E) and in cells of the luminal epithelium at (Fig. 4E) and between (Fig. 4G) attachment sites. The glandular epithelium of day 25 pregnant sows showed no PPAR γ immunostaining at attachment sites (Fig. 4F) and only weak signal between attachment sites (Fig. 4H). No staining was evident in stromal cells at this time (Fig. 4E-H).

Effect of parity on mRNA abundance of selected genes in endometrial tissues

Using Real-Time PCR, porcine PPAR δ , PPAR γ 1, PPAR γ 2, ANGPTL4 and ADD1 mRNA levels were quantified in endometrial tissue collected at attachment sites from sow group 1. Levels of PPAR δ mRNA were higher in multiparous than in nulliparous Yorkshire-Landrace sows (Fig. 5a; $P < 0.01$). Significant parity effects were also observed for ANGPTL4 (Fig. 5d; $P < 0.01$) and ADD1 (Fig. 5e; $P < 0.05$) mRNA levels, where they were found to be higher in Yorkshire-Landrace multiparous compared with the nulliparous sows. There were no significant parity effects for porcine PPAR γ 1 and PPAR γ 2 mRNA levels (Fig. 5b and 5c; $P > 0.05$).

Effect of the site of endometrial tissue sampling

To determine whether porcine PPAR δ , PPAR γ 1, PPAR γ 2, ANGPTL4 and ADD1 mRNA levels could be modulated according to the site of endometrial tissue sampling, tissues were collected at and between embryo attachment sites. Expression levels of PPAR δ , PPAR γ 1 and ANGPTL4 mRNAs were higher between sites relative to attachment sites and this effect was significant at both day 15 and day 25 of pregnancy (Fig. 6a, 6b and 6d; $P < 0.05$). In contrast, there was no effect of endometrial tissue site

sampling on PPAR γ 2 and ADD1 mRNA levels at either day 15 or day 25 of pregnancy (Fig. 6c and e; $P > 0.05$).

Effect of the day of pregnancy and pregnancy status on selected genes mRNA levels

The effect of the day of pregnancy and pregnancy status on expression levels of PPAR δ , PPAR γ 1, PPAR γ 2, ANGPTL4 and ADD1 mRNAs was studied in Duroc x Yorkshire-Landrace (group 2) and in Meishan-Landrace (group 3) sows. In the Meishan-Landrace group, the expression level of PPAR δ mRNA was higher in day 15 cycling sows compared with day 15 ($P < 0.05$) pregnant sows (Fig. 7a). In both groups 2 and 3, there were no significant differences in PPAR δ mRNA levels between day 15 and day 25 pregnant sows (Fig. 6a and 7a; $P > 0.05$). PPAR γ 1 mRNA levels were higher at day 25 than at day 15 of pregnancy for both group 2 (Fig 6b, $P < 0.05$) and group 3 (Fig. 7b, $P < 0.01$) sows, but there was no significant difference of PPAR γ 1 mRNA levels between day 15 cycling sows and day 15 pregnant sows (Fig. 7b; $P > 0.05$). There were no effects of the day of pregnancy or pregnancy status on PPAR γ 2, ANGPTL4 and ADD1 mRNA levels in endometrial tissue for both groups 2 and 3 (Fig. 6c, d and e; Fig. 7c, d and e; $P > 0.05$).

Discussion

To our knowledge, this is the first report of the cloning and characterization of pig PPAR δ and the first to study mRNA and protein expression of PPARs in pig endometrial tissues. The complete coding sequence of the porcine PPAR δ was generated by RT-PCR and RACE using RNA from endometrial tissue as template. A multiple sequence alignment of porcine PPAR δ protein with its human, rat and mouse orthologues shows that the 1-71 amino acids N-terminal extension is the least conserved

region with 10 non-conserved amino acids relative to the human PPAR δ protein sequence. In contrast, the DNA-binding domain is the most conserved region with only one non-conserved amino acid relative to the human PPAR δ protein sequence. This domain is also known to be the most conserved domain among the nuclear receptor superfamily (Desvergne & Wahli 1999). The porcine PPAR δ ligand-binding domain shows a 7 amino-acid differences from its human counterpart. This species discrepancy may have functional relevance to the ability of porcine PPAR δ to bind ligands differentially, as it was previously demonstrated that PPAR α isotypes from *Xenopus*, mouse, and human respond differentially to the PPAR α ligands, Wy14,643 and ETYA (Keller *et al.* 1997).

The wide tissue distribution of porcine PPAR δ transcript contrasts with the more restricted expression of porcine PPAR α (Sundvold *et al.* 2001) and PPAR γ mRNA (Grindflek *et al.* 1998). The ubiquitous expression of PPAR δ mRNA in porcine tissues is in accordance with previous studies in human (Skogsberg *et al.* 2000), rat (Kliewer *et al.* 1994; Xing *et al.* 1995) and mice (Amri *et al.* 1995). ADD1 and ANGPTL4 transcripts were detected in pig endometrium and ovaries for the first time, suggesting a putative role for these genes in reproductive tissues. Previous studies have reported that the ANGPTL4 transcript was highly enriched in mouse white and brown adipose tissues and in placenta, whereas a lesser mRNA expression was observed for liver, kidney, heart and lung (Yoon *et al.* 2000; Kersten *et al.* 2000). Interestingly, ANGPTL4 mRNA tends to be more ubiquitously and evenly expressed in pig tissues, with the exception of the brain cortex for which no transcript could be detected. As previously reported for human, mouse, and rat tissue distribution studies (Tontonoz *et al.* 1993; Shimomura *et*

al. 1997; Kim *et al.* 1998a), we were able to detect ADD1 transcript in pig liver, kidney, lung, ovary, skeletal muscle, adipose tissues, heart and brain. Our results are in contrast with those of Ding *et al.* (1999; 2000) who reported ADD1 transcripts to be undetectable in pig kidney and skeletal muscle. In the current study, we used an adult sow to perform tissue distribution analysis, whereas Ding *et al.* (1999; 2000) used much younger pigs (20-30 kg). Thus, it would be of interest to further study pig ADD1 transcripts in these tissues through musculoskeletal maturation.

Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) were first recognized as key regulators of adipose differentiation and glucose homeostasis (Desvergne & Wahli 1999), but accumulating evidence points towards a functional role of the PPARs in female reproductive tract. For instance, PPAR γ -null mice exhibit placental defects in trophoblast differentiation and vascular processes (Barak *et al.* 1999). Further, 90% of the PPAR δ (-/-) mouse embryos have severe developmental defects, principally due to placental malformation (Barak *et al.* 2002). Although the role of PPARs in fatty acid metabolism has been demonstrated in pigs (Grindflek *et al.* 1998; Sundvold *et al.* 2001), no studies have yet reported a possible involvement of these receptors in pig pregnancy. In the current study, the presence of PPAR δ and γ transcripts and proteins in pig endometrium, along with modulation of their mRNA abundance according to the parity, pregnancy stage and site of endometrial tissue sampling, suggest a possible role of these PPARs in early pig gestation. We have shown by immunohistochemistry that PPAR δ and γ proteins are mainly localized in epithelial and glandular cells of the pig endometrium. The principal difference between the PPAR δ and γ signals was the decrease or loss of protein expression in endometrial glands at day 25, compared with

day 15 of pregnancy. Moreover, the presence of trophoblast was associated with the detection of PPAR δ and γ signal in the subepithelial stroma at attachment but not between sites, and this was only seen in day 15 pregnant sows. Expression of PPAR δ was also reported in the subluminal stroma at implantation sites in mouse (Lim et al., 1999) and rats (Ding et al., 2003a) uterus, where immunostaining signal were much stronger. Our data suggest that PPAR δ and γ protein specific expression in subepithelial stroma is stimulated by the presence of trophoblast during the periimplantation period (day 15) since no corresponding signals were detected in cycling or in day 25 pregnant sows. We have also shown that day 25 trophoblast expresses both PPAR δ and γ proteins. Previous reports demonstrated that PPAR γ is required for epithelial differentiation of mouse trophoblast (Barak et al., 1999), and strong PPAR γ immunostaining was also observed in bovine trophectoderm and inner cell mass cells of preattachment embryos (Mohan et al., 2002). PPAR δ is also a critical mediator of embryo implantation since its deficiency is lethal to over 90% of mice embryos (Barak et al., 2002). Thus, the presence of PPAR δ and γ immunostaining in endometrial and trophoblast cells suggest that these nuclear receptors play an important role during early pregnancy in sows.

Our results have shown that pig PPAR γ 2 mRNA levels were not affected by parity, pregnancy stage or site of endometrial tissue sampling. PPAR γ 2 is strongly up-regulated during adipogenesis (Tontonoz *et al.* 1994) and is able to completely restore adipogenesis in 3T3-L1 cells, in which both PPAR γ 1 and γ 2 expression had been abolished, whereas PPAR γ 1 had no effect (Ren *et al.* 2002). In contrast, Barak *et al.* (1999) reported elevated expression of PPAR γ 1, but not PPAR γ 2 mRNA, in mouse

placenta from embryonic day 8.5 and onwards, thus suggesting a possible role of PPAR γ 1, but not PPAR γ 2, during early pregnancy. In accordance with this later study, we see a marked increase of PPAR γ 1 mRNA, but not of PPAR γ 2, in endometrial tissues of day 25 compared to day 15 pregnant sows. We could not confirm this difference at the protein level due to lack of isoform-specific antibodies.

Our results also show that PPAR γ 1 and PPAR δ mRNA abundance was lower at attachment sites relative to regions between sites, for both Day 15 and 25 pregnant sows. Although the role of PPAR γ in early pregnancy is not known in its entirety, recent studies have shown that PPAR γ ligands can have antiangiogenic actions as demonstrated by the inhibition of endothelial proliferation and differentiation *in vitro* and suppression of VEGF-induced angiogenesis *in vivo* (Xin *et al.* 1999; Panigraphy *et al.* 2002). It is worth noting that ANGPTL4 mRNA levels were similarly reduced at pig embryo attachment sites in both day 15 and day 25 pregnant sows. ANGPTL4, which is a known downstream target of PPAR γ , was also reported to inhibit angiogenesis and vascular permeability both *in vitro* and *in vivo* (Ito *et al.* 2003). Thus, a down-regulation of antiangiogenic factors such as PPAR γ 1 and ANGPTL4 at the sites of attachment may result in increased uterine vascular permeability and angiogenesis, both required for successful trophoblast-endometrial epithelium interaction in pigs. However, an antiangiogenic role for PPAR γ 1 and ANGPTL4 in pig early pregnancy remains to be demonstrated, as PPAR γ and ANGPTL4 have also been described as potent proangiogenic factors (Yamakawa *et al.* 2000; Le Jan *et al.* 2003). The decreased mRNA levels of PPAR δ at the site of implantation remains to be explained, as this

receptor has been described as a mediator of cell proliferation and/or angiogenesis at implantation sites in mice (Lim *et al.* 1999).

The role of PPAR δ in embryo implantation was demonstrated in COX-2-deficient mice (Lim *et al.* 1999) where the COX-2-derived prostaglandin I₂ (PGI₂) participates in implantation via the nuclear receptor PPAR δ in the mouse uterus. In the current study, the lower mRNA abundance of PPAR δ found in Day 15 pregnant sows when compared with Day 15 cyclic sows suggests a limited role of PPAR δ during the peri-attachment period. Previous studies have reported higher PGE₂ in uterine fluid of day 15 pregnant gilts when compared to the day 15 cyclic gilts (Chabot *et al.* 2004) and higher PGF_{2 α} and PGE₂ levels in uterine flushings of pregnant relative to nonpregnant gilts (Geisert *et al.* 1982). Thus, the elevated levels of prostaglandins (Chabot *et al.* 2004) and the lower mRNA abundance of PPAR δ (current study) in day 15 pregnant sows, suggest that PPAR δ may be of modest significance in the mediation of action of endometrial and conceptus-derived prostaglandins during the attachment period. Alternatively, the higher level of PPAR δ mRNA found in cyclic sows suggests a putative role for PPAR δ during the oestrous cycle. Thus, it will be of interest to study further the expression of PPAR δ relative to the expression of COX-2 and of PGF_{2 α} and PGE₂ through the oestrous cycle and pregnancy.

In this study, we report lower levels of PPAR δ , ANGPTL4 and ADD1 mRNA in nulliparous relative to multiparous YL sows. There are numerous examples of parity-based differences in livestock reproductive performance but evidence of physiological mechanisms to explain them are still lacking. We previously reported larger litter size and a greater number of corpora lutea (CL) in multiparous than in nulliparous

Yorkshire-Landrace sows (Guay *et al.* 2001). Moreover, higher uterine content of oestradiol-17 (E₂) along with higher endometrial mRNA levels of COX-2 were found in multiparous sows compared to nulliparous ones (Guay *et al.* 2004). Interestingly, estrogen treatment can induce PPAR δ expression in rat glandular epithelium (Ding *et al.* 2003a) and expression of PPAR γ was also induced by E₂ in zebrafish hepatocytes (Ibabe *et al.* 2005). Moreover, Nunez *et al.* (1997) reported that PPARs are capable of activating estrogen responsive genes in the CV-1 tumor cell line. Thus, the higher levels of PPAR δ mRNA found in multiparous sows may be explained by a higher E₂ uterine content, as previously reported for multiparous sows (Guay *et al.* 2004).

This is the first report of ANGPTL4 and ADD1 mRNA in endometrial tissue, and the relative elevation of these transcripts in multiparous sows remains to be explained. Adipocyte determination differentiation-dependent factor 1 (ADD1) is an intracellular membrane-bound transcription factor (Golgi and endoplasmic reticulum) that controls the metabolism of cholesterol and fatty acids in animal cells (Wang *et al.* 1994; Kim & Spiegelman 1996). Interestingly, it was also reported that ADD1 controls the production of endogenous ligands for PPAR γ in NIH 3T3 cells (Kim *et al.* 1998b). The detection of ADD1 transcript in endometrial tissue may illustrate that PPAR ligands are also produced endogenously from endometrial cells expressing ADD1. Because ADD1 would provide PPAR ligands, it is not surprising that these transcripts follow the same expression profile in pig endometrial tissue. However, since ADD1 mRNA abundance was neither affected by pregnancy stage or by the site of endometrial tissue sampling, we believe that this transcription factor has a limited role in early porcine gestation.

In summary, we have demonstrated that PPAR δ , PPAR γ 1, and ANGPTL4 mRNA abundance decreases at the embryonic attachment sites in the pig endometrium at both day 15 and 25 of pregnancy. Modulation of PPAR γ 1 expression was also observed according to stage of pregnancy. The parity of sows also had effects on PPAR δ , ANGPTL4 and ADD1 transcripts. The mRNA abundance of PPAR γ 2 was not affected by the site of endometrial tissue sampling, pregnancy stage or parity of the sows, thus suggesting that the PPAR γ 2 subtype does not have a major role in porcine pregnancy. Because this study was performed on a limited number of pigs, further work will be needed on a much larger population and at various stages of pregnancy to confirm the current findings. The precise role of PPAR δ , PPAR γ 1 and ANGPTL4 genes in early pig pregnancy remains to be established, but our findings suggest that they may have key roles in prostaglandins mediated action on the endometrial tissue.

References

- Amri E-Z, Bonino F, Ailhaud G, Abumrad NA & Grimaldi PA** 1995 Cloning of a protein that mediates transcriptional effects of fatty acids in preadipocytes. *Journal of Biological Chemistry* **270** 2367-2371.
- Asami-Miyagishi R, Iseki S, Usui M, Uchida K, Kubo H & Morita I** 2004 Expression and function of PPAR γ in rat placental development. *Biochemical and Biophysical Research Communication* **315** 497-501.
- Barak Y, Nelson MC, Ong ES, Jones YZ, Ruiz-Lozano P, Chien KR, Koder A & Evans RM** 1999 PPAR γ is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Molecular Cell* **4** 585-595.

Barak Y, Liao D, He W, Ong ES, Nelson MC, Olefsky JM, Boland R & Evans RM

2002 Effects of peroxisome proliferator-activated receptor delta on placentation, adiposity, and colorectal cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **99** 303-308.

Belanger AJ, Lu H, Date T, Liu LX, Vincent KA, Akita GY, Cheng SH, Gregory

RJ & Jiang C. 2002 Hypoxia up-regulates expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma angiopoietin-related gene (PGAR) in cardiomyocytes: role of hypoxia inducible factor 1alpha. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. **34** 765-74.

Canadian Council on Animal Care (CCAC). 1993. Guide to the Care and Use of Experimental Animals. Vol. 1 (2nd edition). Canadian Council on Animal Care, Ontario, Canada.

Chabot V, Lambert RD, Laforest JP, St-Jacques S, Matte JJ, Guay F, Palin MF &

Lessard M 2004 Effect of oestrous cycle and early pregnancy on uterine production and expression of immune regulatory factors in gilts. *Animal Reproduction Science* **81** 137-149.

Desvergne B & Wahli W 1999 Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocrine Reviews* **20** 649-688.

Ding NZ, Ma XH, Diao HL, Xu LB & Yang ZM 2003a Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptor delta at implantation sites and in decidual cells of rat uterus. *Reproduction* **125** 817-825.

Ding NZ, Teng CB, Ma H, Ni H, Ma XH, Xu LB & Yang ZM 2003b Peroxisome proliferator-activated receptor delta expression and regulation in mouse uterus

during embryo implantation and decidualization. *Molecular Reproduction and Development* **66** 218-224.

Ding ST, McNeel RL & Mersmann HJ 1999 Expression of porcine adipocyte transcripts: tissue distribution and differentiation in vitro and in vivo. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* **123** 307-318.

Ding ST, Schinckel AP, Weber TE & Mersmann HJ 2000 Expression of porcine transcription factors and genes related to fatty acid metabolism in different tissues and genetic populations. *Journal of Animal Science* **78** 2127-2134.

Geisert RD, Renegar RH, Thatcher WW, Roberts RM & Bazer FW 1982 Establishment of pregnancy in the pig: I. Interrelationships between preimplantation development of the pig blastocyst and uterine endometrial secretions. *Biology of Reproduction* **27** 925-939.

Geisert RD, Zavy MT, Moffatt RJ, Blair RM & Yellin T 1990 Embryonic steroids and the establishment of pregnancy in pigs. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement* **40** 293-305.

Grindflek E, Sundvold H, Klungland H & Lien S 1998 Characterisation of porcine peroxisome proliferator-activated receptors 1 and 2: detection of breed and age differences in gene expression. *Biochemical and Biophysical Research Communication* **249** 713-718.

Guay F, Matte JJ, Girard CL, Palin MF, Giguère A & Laforest JP 2004 Effect of folic acid plus glycine supplement on uterine prostaglandin and endometrial granulocyte-macrophage colony-stimulating factor expression during early pregnancy in pigs. *Theriogenology* **61** 485-498.

- Guay F, Palin MF, Matte JJ & Laforest JP** 2001 Effects of breed, parity, and folic acid supplement on the expression of leptin and its receptors' genes in embryonic and endometrial tissues from pigs at day 25 of gestation. *Biology of Reproduction* **65** 921-927.
- Helliwell RJA, Berry EBE, O'Carroll SJ & Mitchell MD** 2004 Nuclear prostaglandin receptors: role in pregnancy and parturition? *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* **70** 149-165.
- Ibabe A, Herrero A & Cajaraville MP** 2005 Modulation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) by PPARalpha- and PPARgamma-specific ligands and by 17beta-estradiol in isolated zebrafish hepatocytes. *Toxicology In Vitro* **19** 725-735.
- Ito Y, Oike Y, Yasunaga K, Hamada K, Miyata K, Matsumoto S, Sugano S, Tanihara H, Masuho Y & Suda T** 2003 Inhibition of angiogenesis and vascular leakiness by angiopoietin-related protein 4. *Cancer Research* **63** 6651-6657.
- Keller HJ, Devchand PR, Perroud M & Wahli W** 1997 PPAR α structure-function relationships derived from species-specific differences in responsiveness to hypolipidemic agents. *Biological Chemistry* **378** 651-655.
- Kersten S, Mandard S, Tan NS, Escher P, Metzger D, Chambon P, Gonzalez FJ, Desvergne B & Wahli W** 2000 Characterization of the fasting-induced adipose factor FIAF, a novel peroxisome proliferator-activated receptor target gene. *Journal of Biological Chemistry* **275** 28488-29493.

Kim I, Kim HG, Kim H, Kim HH, Park SK, Uhm CS, Lee ZH & Koh GY 2000

Hepatic expression, synthesis and secretion of a novel fibrinogen/angiopoietin-related protein that prevents endothelial-cell apoptosis. *Biochemical Journal* **346** 603-10.

Kim JB, Sarraf P, Wright M, Yao KM, Mueller E, Solanes G, Lowell BB &

Spiegelman BM 1998a Nutritional and insulin regulation of fatty acid synthase and leptin gene expression through ADD1/SREBP1. *Journal of Clinical Investigation* **101** 1-9.

Kim JB & Spiegelman BM 1996 ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation

and gene expression linked to fatty acid metabolism. *Genes & Development* **10** 1096-1107.

Kim JB, Wright HM, Wright M & Spiegelman BM 1998b ADD1/SREBP1 activates

PPAR γ through the production of endogenous ligand. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **95** 4333-4337.

Kliewer SA, Forman BM, Blumberg B, Ong ES, Borgmeyer U, Mangelsdorf DJ,

Umesono K & Evans RM 1994 Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* **91** 7355-7359.

Lee SS, Pineau T, Drago J, Lee EJ, Owens JW, Kroetz DL, Fernandez-Salguero

PM, Westphal H & Gonzalez FJ 1995 Targeted disruption of the alpha isoform of the peroxisome proliferator-activated receptor gene in mice results in abolishment of the pleiotropic effects of peroxisome proliferators. *Molecular and Cellular Biology* **15** 3012-3022.

- Le Jan S, Amy C, Cazes A, Monnot C, Lamande N, Favier J, Philippe J, Sibony M, Gasc JM, Corvol P & Germain S** 2003 Angiotensin-like 4 is a proangiogenic factor produced during ischemia and in conventional renal cell carcinoma. *American Journal of Pathology* **162** 1521-1528.
- Lim H, Paria BC, Das SK, Dinchuk JE, Langenbach R, Trzaskos JM & Dey SK** 1997 Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. *Cell* **91** 197-208.
- Lim H, Gupta RA, Ma WG, Paria BC, Moller DE, Morrow JD, DuBois RN, Trzaskos JM & Dey SK** 1999 Cyclo-oxygenase-2-derived prostacyclin mediates embryo implantation in the mouse via PPARdelta. *Genes & Development* **13** 1561-1574.
- Mandard S, Zandbergen F, Tan NS, Escher P, Patsouris D, Koenig W, Kleemann R, Bakker A, Veenman F, Wahli W, Muller M & Kersten S.** 2004 The direct peroxisome proliferator-activated receptor target fasting-induced adipose factor (FIAF/PGAR/ANGPTL4) is present in blood plasma as a truncated protein that is increased by fenofibrate treatment. *Journal of Biological Chemistry* **279** 34411-34420.
- Marchler-Bauer A, Anderson JB, DeWeese-Scott C, Fedorova ND, Geer LY, He S, Hurwitz DI, Jackson JD, Jacobs AR, Lanczycki CJ, Liebert CA, Liu C, Madej T, Marchler GH, Mazumder R, Nikolskaya AN, Panchenko AR, Rao BS, Shoemaker BA, Simonyan V, Song JS, Thiessen PA, Vasudevan S, Wang Y, Yamashita RA, Yin JJ & Bryant SH** 2003 CDD: a curated Entrez database of conserved domain alignments. *Nucleic Acids Res* **31** 383-387.

- Martin G, Schoonjans K, Lefebvre AM, Staels B & Auwerx J.** 1997 Coordinate regulation of the expression of the fatty acid transport protein and acyl-CoA synthetase genes by PPARalpha and PPARgamma activators. *Journal of Biological Chemistry* **272** 28210-28217.
- Marvin KW, Eykholt RL, Keelan JA, Sato TA & Mitchell MD** 2000 The 15-deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J(2)receptor, peroxisome proliferator activated receptor-gamma (PPARgamma) is expressed in human gestational tissues and is functionally active in JEG3 choriocarcinoma cells. *Placenta* **21** 436-440.
- Michalik L, Desvergne B, Dreyer C, Gavillet M, Laurini RN & Wahli W** 2002 PPAR expression and function during vertebrate development. *International Journal of Developmental Biology* **46** 105-114.
- Mohan M, Malayer JR, Geiser RD and Morgan GL** 2002 Expression patterns of retinoid X receptors, retinaldehyde dehydrogenase, and peroxisome proliferators activated receptor gamma in bovine preattachment embryos. *Biology of Reproduction* **66** 692-700.
- Nunez SB, Medin JA, Braissant O, Kemp L, Wahli W, Ozato K & Segars JH** 1997 Retinoid X receptor and peroxisome proliferator-activated receptor activate an estrogen responsive gene independent of the estrogen receptor. *Molecular and Cellular Endocrinology* **127** 27-40.
- Panigrahy D, Singer S, Shen LQ, Butterfield CE, Freedman DA, Chen EJ, Moses MA, Kilroy S, Duensing S, Fletcher C, Fletcher JA, Hlatky L, Hahnfeldt P, Folkman J & Kaipainen A** 2002 PPARgamma ligands inhibit primary tumor

growth and metastasis by inhibiting angiogenesis. *Journal of Clinical Investigation* **110** 923-932.

Ren D, Collingwood TN, Rebar EJ, Wolffe AP & Camp HS 2002 PPARgamma knockdown by engineered transcription factors: exogenous PPARgamma2 but not PPARgamma1 reactivates adipogenesis. *Genes & Development* **16** 27-32.

Rosen ED, Walkey CJ, Puigserver P & Spiegelman BM 2000 Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes & Development* **14** 1293-1307.

Shimomura L, Shimano H, Horton JD, Goldstein JL & Brown MS 1997 Differential expression of exons 1a and 1c in mRNAs for the sterol regulatory element binding protein-1 in human and mouse organs and cultured cells. *Journal of Clinical Investigation* **99** 838-845.

Skogsberg J, Kannisto K, Roshani L, Gagne E, Hamsten A, Larsson C & Ehrenborg E 2000 Characterization of the human peroxisome proliferator activated receptor delta gene and its expression. *International Journal of Molecular Medicine* **6** 73-81.

Sundvold H, Grindflek E & Lien S 2001 Tissue distribution of porcine peroxisome proliferators-activated receptor α : detection of an alternatively spliced mRNA. *Gene* **273** 105-113.

Tontonoz P, Kim JB, Graves RA & Spiegelman BM 1993 ADD1: a novel helix-loop-helix transcription factor associated with adipocyte determination and differentiation. *Molecular and Cellular Biology* **13** 4753-4759.

Tontonoz P, Hu E & Spiegelman BM 1994 Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* **79** 1147-56.

User Bulletin #2: ABI PRISM 7700 Sequence Detection System. 1997. Applied Biosystems, Foster City, CA, USA. 36 pp.

Wang X, Sato R, Brown MS, Hua X & Goldstein JL 1994 SREBP-1, a membrane-bound transcription factor released by sterol-regulated proteolysis. *Cell* **77** 53-62.

Xin X, Yang S, Kowalski J & Gerritsen ME 1999 Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands are potent inhibitors of angiogenesis in vitro and in vivo. *Journal of Biological Chemistry* **274** 9116-9121.

Xing G, Zhang L, Zhang L, Heynen T, Yoshikawa T, Smith M, Weiss S & Detera-Wadleigh S 1995 Rat PPAR δ contains a CGG triplet repeat and is prominently expressed in the thalamic nuclei. *Biochemical and Biophysical research Communication* **217** 1015-1025.

Yamakawa K, Hosoi M, Koyama H, Tanaka S, Fukumoto S, Morii H & Nishizawa Y 2000 Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists increase vascular endothelial growth factor expression in human vascular smooth muscle cells. *Biochemical and Biophysical research Communication* **271** 571-574.

Yoon JC, Chickering TW, Rosen ED, Dussault B, Qin Y, Soukas A, Friedman JM, Holmes WE & Spiegelman BM 2000 Peroxisome proliferator-activated receptor gamma target gene encoding a novel angiopoietin-related protein associated with adipose differentiation. *Molecular and Cellular Biology* **20** 5343-5349.

Figure Legends

Figure 1 Deduced amino acid sequence of pig PPAR δ . Alignment of the predicted amino acid sequences of pig (NM_214152), human (AY442342), rat (U75918) and mouse (NM_011145) PPAR δ . Residues identical to the pig sequence are indicated by an hyphen. The DNA binding (C4 zinc-finger) and ligand-binding domains of nuclear hormone receptors are shaded.

Figure 2 RT-PCR analysis of PPAR δ , ANGPTL4 and ADD1 mRNA in various tissues collected from an adult Duroc x Yorkshire-Landrace sow. Amplification of Li, Liver; Ki, kidney; He, heart; Lu, lung; Ov, ovary; St, stomach; Br, brain cortex; En, endometrium; Sk, skeletal muscle; Hf, ham subcutaneous fat; Bf, back subcutaneous fat; Vf, visceral fat; Ne, negative control without cDNA; Ma, molecular marker. Expected fragment length (bp) is indicated on the right. Equal amounts of PCR products were loaded per lane as adjusted by cyclophilin housekeeping gene.

Figure 3 Immunohistochemical localization of PPAR δ in pig uterus. **A** and **B**, attachment sites of a day 15 pregnant sow; PPAR δ protein is localized in luminal and glandular epithelium; minor staining is detected in the first cell layer of subepithelial stroma. **C** and **D**, tissue from between attachment sites of a day 15 pregnant sow; PPAR δ is detected in luminal and glandular epithelium. **E** and **F**, attachment sites of a day 25 pregnant sow; PPAR δ immunostaining present in trophoblast and weak signal is detected in the luminal epithelium; PPAR δ protein is absent from stroma and glands. **G** and **H**, between attachment sites of a day 25 pregnant sow; PPAR δ is observed in the luminal epithelium and in glands located near the luminal epithelium; no signal detected in glands adjacent to the myometrium **I** and **J**, Day 15 cycling sow; immunostaining is

present in luminal and glandular epithelium. **K and L**, Negative controls for localization. e, luminal epithelium; g, glandular epithelium; s, stroma; my, myometrium; mv, maternal blood vessel; t, trophoblast; Bars = 80 μ m.

Figure 4. Immunohistochemical localization of PPAR γ in pig uterus. **A and B**, attachment sites of a day 15 pregnant sow; PPAR γ is detected in luminal and glandular epithelium; faint staining is also detected in subepithelial stroma. **C and D**, between attachment sites of a day 15 pregnant sow; immunostaining is observed in luminal and glandular epithelium. **E and F**, at attachment sites of a day 25 pregnant sow; PPAR γ protein is detected in trophoblast cells and in luminal epithelium with no immunostaining in glands. **G and H**, between attachments sites of a day 25 pregnant sow; PPAR γ staining in luminal epithelium cells and weak signal in glands. **I and J**, Day 15 cycling sow; PPAR γ immunoreactivity is detected in both the luminal and glandular epithelium. e, luminal epithelium; g, glandular epithelium; s, stroma; my, myometrium; mv, maternal blood vessel; t, trophoblast; Bars = 80 μ m.

Figure 5 Parity effects on relative expression of PPAR δ (a), PPAR γ 1 (b), PPAR γ 2 (c), ANGPTL4 (d) and ADD1 (e) mRNA in endometrial tissue from day 25 pregnant Yorkshire-Landrace sows. Data are ratios of selected genes relative mRNA levels normalized to cyclophilin housekeeping gene mRNA levels. Each bar represents least square means \pm SEM. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

Figure 6 Effects of the day of pregnancy and site of endometrial tissue sampling on relative expression of PPAR δ (a), PPAR γ 1 (b), PPAR γ 2 (c), ANGPTL4 (d) and ADD1 (e) mRNA in endometrial tissue. Sows were from Duroc x Yorkshire-Landrace breed. Data are ratios of selected genes relative mRNA levels normalized to cyclophilin

housekeeping gene mRNA levels. At site, endometrial tissue sample taken at embryo attachment sites; Intersite, endometrial tissue sample taken between attachment sites. Each bar represents least square means \pm SEM, *, $P < 0.05$.

Figure 7 Effects of the day of pregnancy and pregnancy status on relative expression of PPAR δ (a), PPAR γ 1 (b), PPAR γ 2 (c), ANGPTL4(d) and ADD1 (e) mRNA in endometrial tissue of Meishan-Landrace sows at day 15 of the oestrous cycle (cycling) and at days 15 or 25 of pregnancy. Data are ratios of selected genes relative mRNA levels normalized to cyclophilin housekeeping gene mRNA levels. Each bar represents least square means \pm SEM, *, $P < 0.05$.

Table 1 Description of the population of sows used by breed and distribution in experimental groups

Groups	Breed and parity of sows	Days of pregnancy (P) or estrous (E) cycle	Sows (n)
1	Yorkshire-Landrace multiparous (YL)	P d25	22
	Yorkshire-Landrace nulliparous (YLn)	P d25	22
2	Duroc x Yorkshire-Landrace multiparous (DYL15)	P d15	14
	Duroc x Yorkshire-Landrace multiparous (DYL25)	P d25	10
3	Meishan-Landrace multiparous (MLc)	E d15	6
	Meishan-Landrace multiparous (ML15)	P d15	13
	Meishan-Landrace multiparous (ML25)	P d25	11

Table 2 Oligonucleotide primers used for cloning, tissue distribution and real-time PCR of selected porcine genes

Primers name	Primers sequences (5'-3') ^a	Primer position (nt)	GenBank accession no.	Length (bp)
<i>Cloning</i>				
PPARD-F PPARD-R	CAAGGCMTCRGGCTTCCACTA CTGAAGYTGGGGATGYTCTTG	518-538 1073-1093	NM_214152	576
<i>Tissue distribution</i>				
PPARD-t-F PPARD-t-R	CCGCATGAAGCTGGAGTACGAG CTGCCACAACGTCTCGATGTCG	587-608 923-944	NM_214152	358
ADD1-t-F ADD1-t-R	CTCGCAGATCCAGCAGGTC TTTCATGGTCGTCAGGAGCA	700-718 759-778	AY496867	79
ANGPTL4-t-F ANGPTL4-t-R	CAGGATGGCTCGGTGGACTT TCTTGGCGCAGTTCTTGCTC	70-89 389-409	AY307772	340
<i>Real-time PCR</i>				
PPARD-rt-F PPARD-rt-R	CGCATGAAGCTGGAGTACGA TGGCACTTGTGCGTTCT	588-607 640-658	NM_214152	71
PPARG1-F PPARG1-R	GCCAACTCTAAGCCACTAACATACAG TGGTCACCTCGCTAAAAGATGA	66-91 117-138	AJ006756	73
PPARG2-F PPARG2-R	TGTTATGGGTGAAACTCTGGGAG GAAATGTTTGCAGACAGCGTG	12-34 69-89	AF103946	78
ANGPTL4-F ANGPTL4-R	TGGCTCGGTGGACTTTAACC TCACCTTTGGGATCTCCGAA	75-94 121-140	AY307772	66
Cyclophilin-F Cyclophilin-R	GCACTGGTGGCAAGTCCAT AGGACCCGTATGCTTCAGGA	219-237 270-289	AY266299	71

^a Degenerated primers where M = A or C, R = A or G, Y = C or T. ^b F-Forward; R-Reverse

Figure 1

Pig	MEQPPEEAFVREEEKKQKVEAEAGGPELNGGPEHSLPSSSCTDLSQSCSPFALLDQLQMGCDGASCGGLSMECR	75
Human	---Q---T---A---E---E---A---Q---A---Y---R---S---S---N---	75
Rat	---Q---T---A---E---TGD---A---T---NS---SS---G---S---N---	74
Mouse	---Q---T---A---E---MGD---A---T---A---NS---SS---G---S---N---	74
DNA-binding		
Pig	VCGDKASGFHYGVHACEGCKGFFRRTIRMKLEYEKERICIKIQKQNRNKQYCRFQKCLALGMSHNAIRFGRMPE	150
Human	-----S-----	150
Rat	-----K---D-----	149
Mouse	-----D-----	149
Pig	AEKRKLVAGLTANEGSQHNPPQVADLKAFSKHLYSAYLKNFNMTKKKARAILTGKASHTAPFVIHDIETLWQAEKG	225
Human	-----Y-----I-N-----S-----	225
Rat	-----S---C---Q---L-----I-N-----S---S---N---I-----	224
Mouse	-----S---C---L-----I-N-----S---S---N-----	224
Pig	LVWKQLVNLPPYKEISVHVFYRCQCTTVE TVRELTEFAKSI PSFDHFFLNDQVTLTKYGVHEAIFAMLASIVNK	300
Human	-----SSL-----	300
Rat	-----PR---N-----S---D-----N---N---SSL---Q-----	299
Mouse	-----N-----S-----N---N---SSL-----	299
Ligand-binding		
Pig	DGLLVANGTGFVTRFLRSIRKPFSDIIEPKFEFAVKFNALEDDSDLALFIAAIIILCGDRPGLMNVSQVEAIQD	375
Human	-----S-----L-----PR-----	375
Rat	-----S---H-----L-----P-----	374
Mouse	-----S---H-----L-----P-----	374
Pig	TTLRALEFHLQANHPDAQYLFPKLLQKMDLRQLVTEHAQMMQRKKTETETSLHPLLQEIYKDMY	441
Human	-----	441
Rat	---Q---V---S-----WL---S---L-----	440
Mouse	---V---S-----WL---S---L-----	440

Figure 3

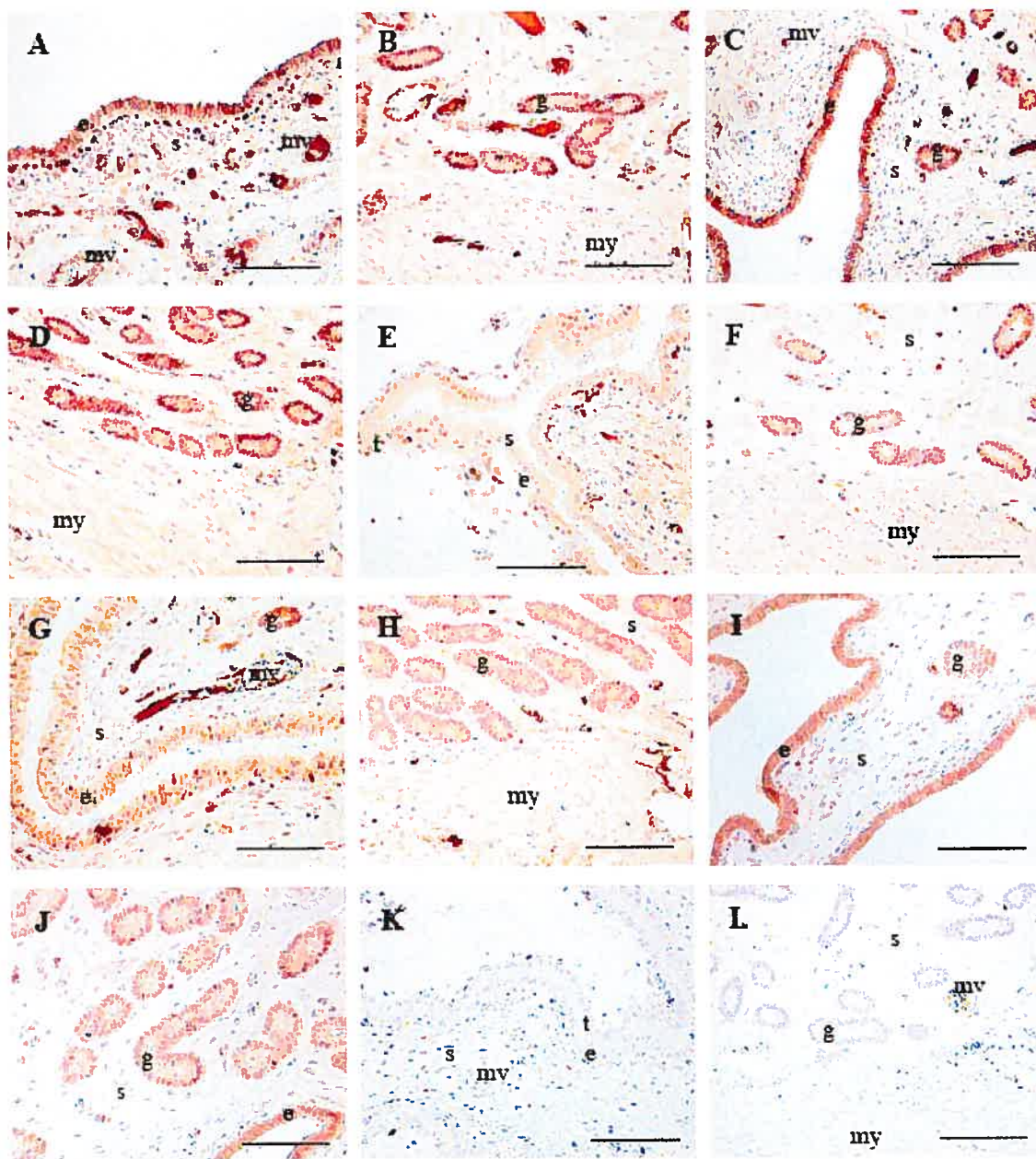


Figure 4

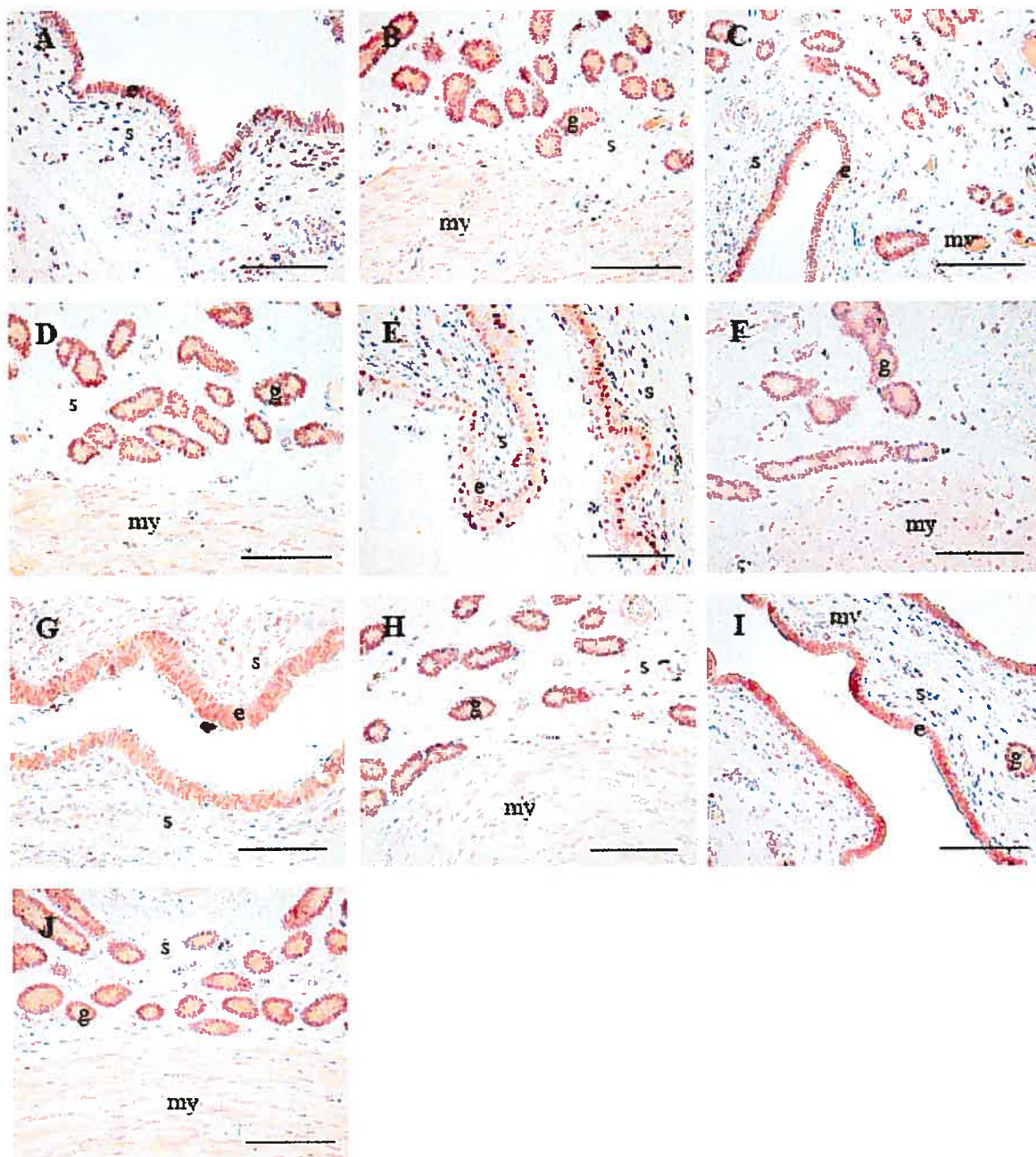


Figure 5

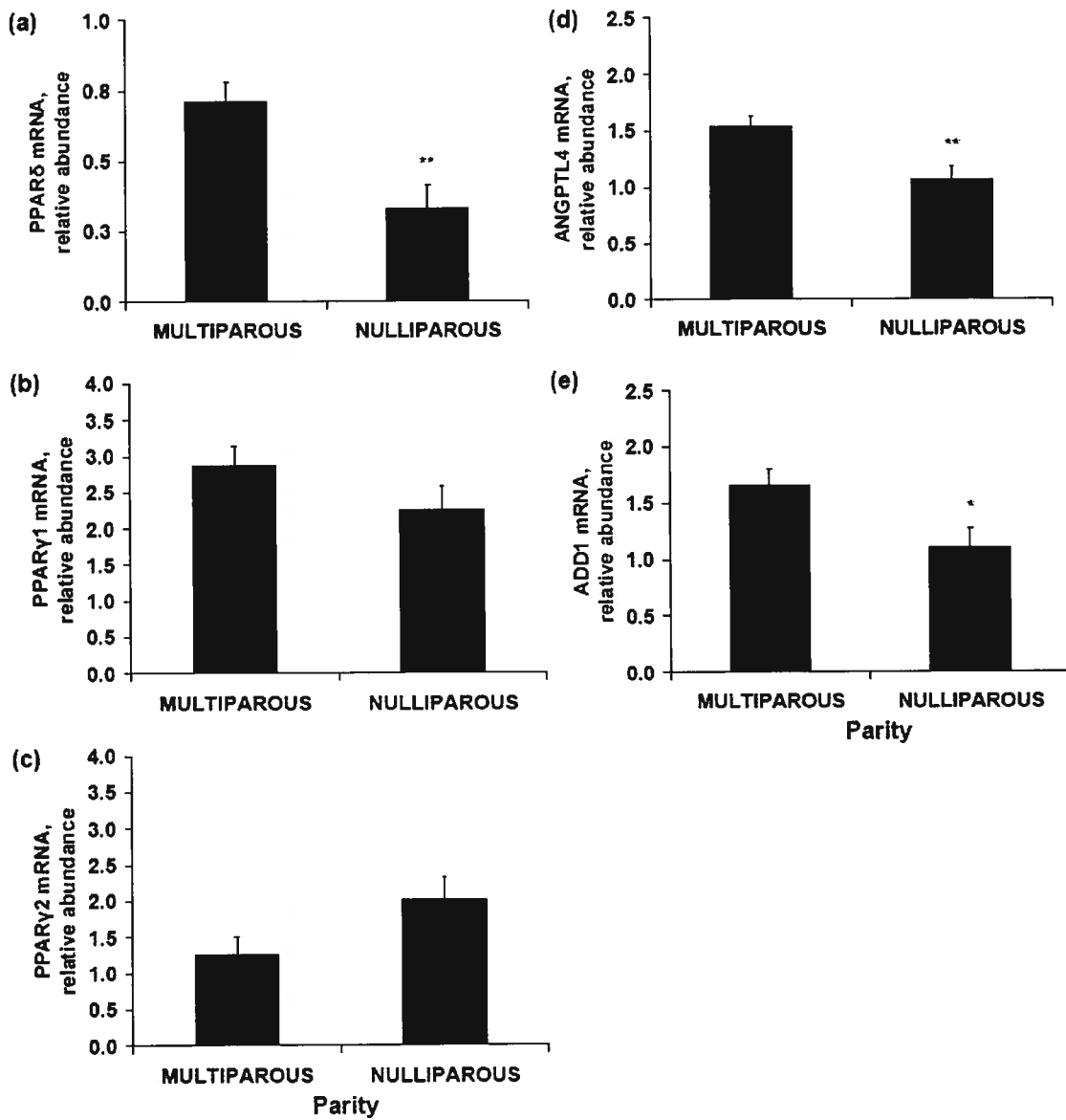


Figure 6

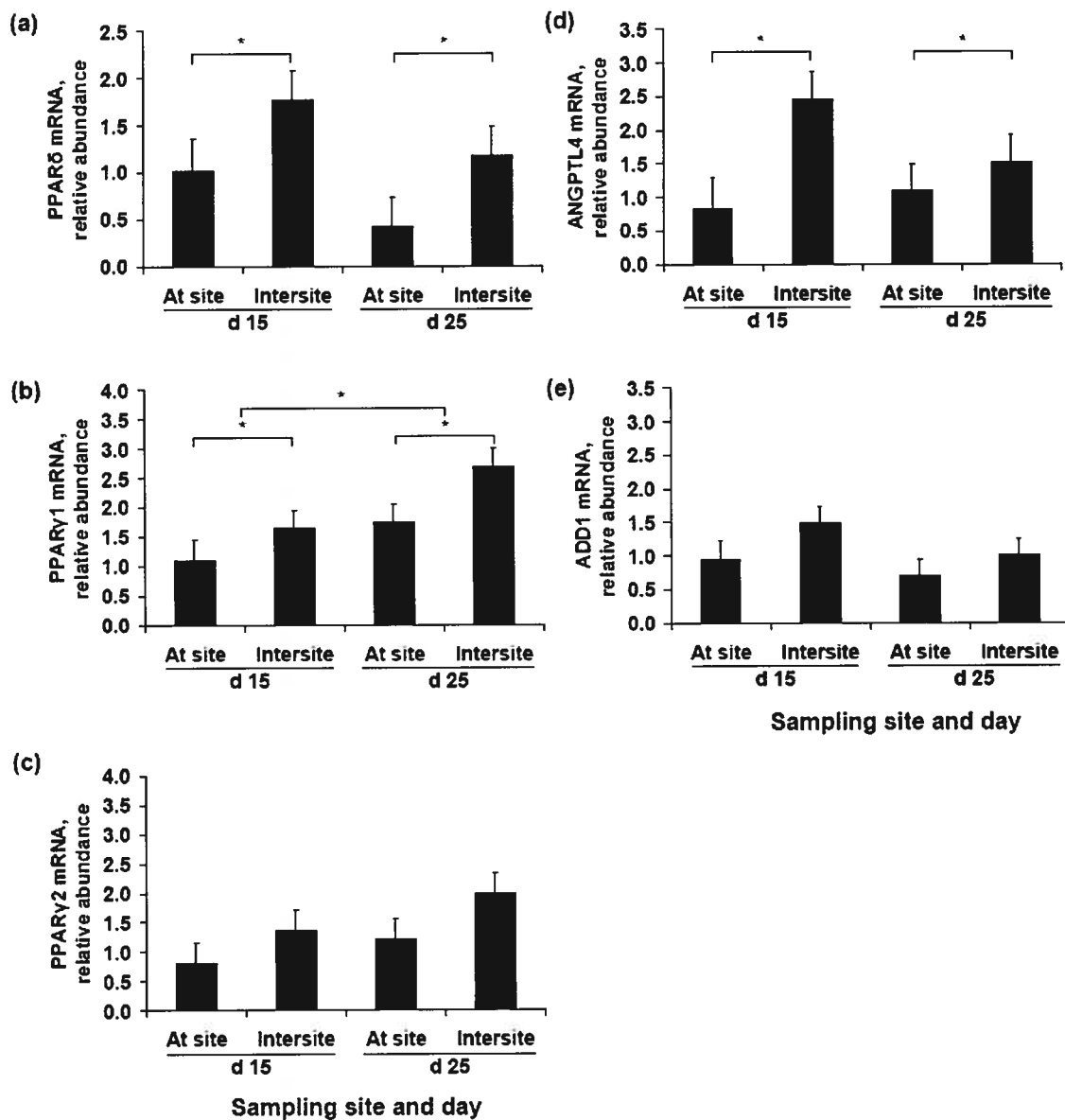
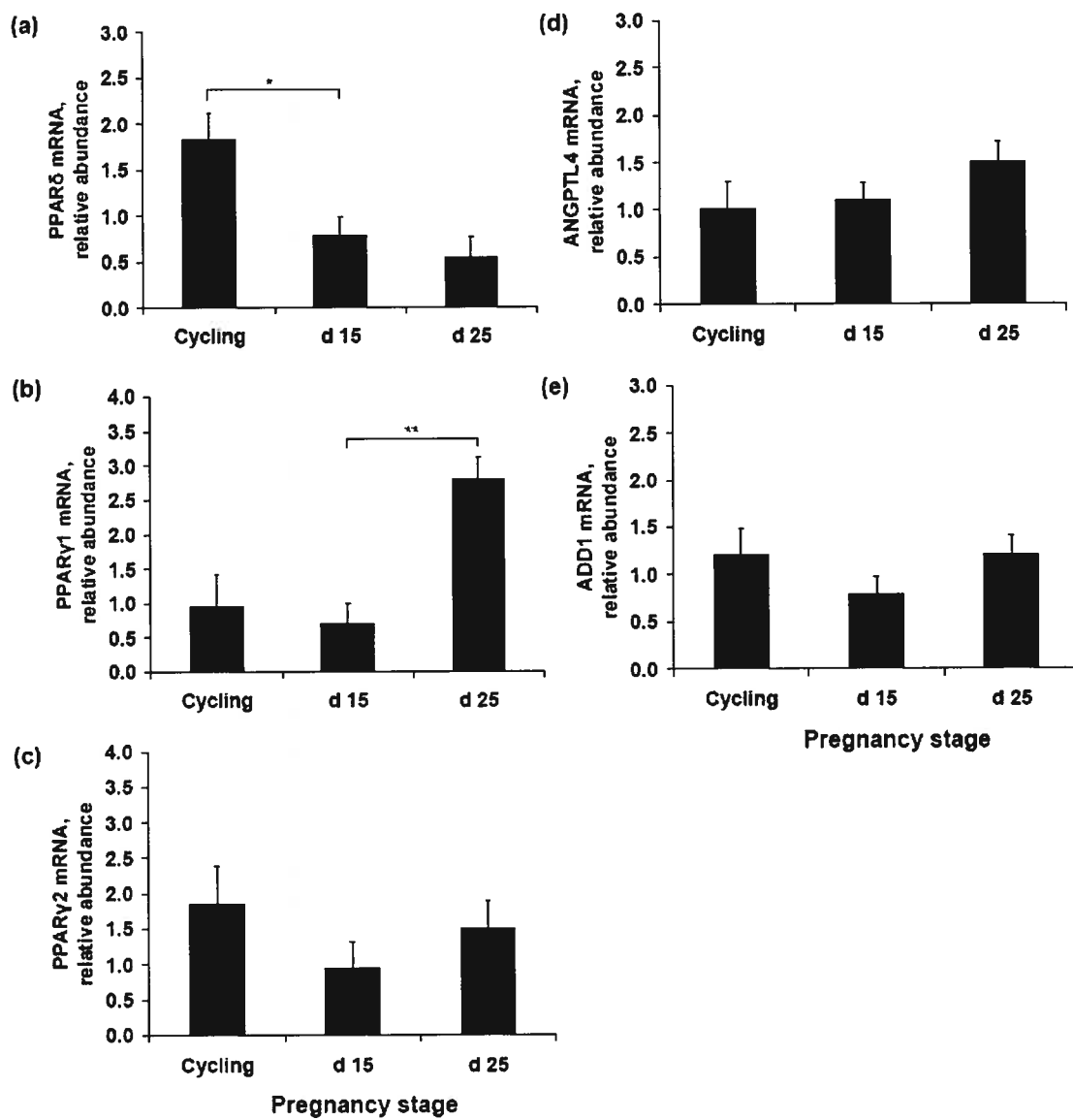


Figure 7



Chapitre 3. Conclusions et perspectives

Les travaux réalisés dans le cadre de cette étude font partie d'un projet plus vaste menant à l'identification de facteurs ou de gènes impliqués à la fois dans le développement du gras dorsal, chez le porc, mais aussi dans certains caractères favorisant une meilleure reproduction.

Dans le premier article, la présence des récepteurs AdipoR1 et AdipoR2 dans le tissu adipeux sous-cutané et viscéral, suggère une action paracrine probable pour l'adiponectine dans ces tissus. De plus, l'adiponectine circulante pourrait aussi se lier à ses récepteurs pour diminuer la lipogenèse. Un tel rôle a récemment été observé par Jacobi *et al.* (2004), qui rapporte un effet direct de l'adiponectine sur l'atténuation de la lipogenèse dans des adipocytes porcins isolés.

Les résultats obtenus nous amènent aussi à croire que le récepteur AdipoR2 jouerait un rôle plus important que AdipoR1 en ce qui concerne la médiation de l'action de l'adiponectine sur les tissus adipeux. Cette conclusion peut être avancée suite à l'observation d'une association inverse entre les niveaux d'ARNm de AdipoR2 (et non de AdipoR1), mesurés dans le tissu adipeux viscéral, et le poids du tissu adipeux sous-cutané, viscéral et de la carcasse entière.

De plus, nous avons observé que l'addition de TNF α au milieu de culture de cellules «stromal-vascular» porcines amène une diminution significative des transcrits de l'adiponectine et de AdipoR2, sans affecter ceux de AdipoR1. Ces résultats sont en accord avec ceux de Fasshauer *et al.* (2002), qui ont observé une diminution significative de l'expression et de la sécrétion d'adiponectine dans des préadipocytes murins 3T3-L1 traitées avec TNF α . Ces auteurs suggèrent que TNF α pourrait avoir un rôle actif sur la diminution d'adiponectine circulante, observée chez les sujets obèses. À la lumière de nos résultats et de ceux publiés par Fasshauer *et al.* (2002), il serait intéressant de vérifier l'hypothèse selon laquelle TNF α pourrait entraîner une réduction de transcription de l'adiponectine, via une réduction de la transcription de son récepteur

AdipoR2. L'adiponectine se retrouve sous plusieurs formes (native, globulaire, hexamérique et multimérique) chez la souris (Hug *et al.* 2004). Cependant, seul l'expression des transcrits des récepteurs de la forme native et globulaire (AdipoR1 et AdipoR2) a été vérifiée chez le porc. Il serait intéressant de vérifier le patron d'expression du récepteur des formes hexamériques et multimériques de l'adiponectine, ainsi que de vérifier la présence et la concentration des différentes formes de l'adiponectine circulante chez le porc.

De plus, les analyses de distribution tissulaire (multi-tissus) ont révélé la présence des transcrits d'AdipoR1 et AdipoR2 dans l'ovaire et l'utérus porcin, suggérant ainsi que l'adiponectine circulante pourrait également avoir un effet sur certains caractères de reproduction chez la truie. Fait intéressant, une surexpression de l'adiponectine cause l'infertilité chez la souris (Combs *et al.* 2004). Or, les porcs présentant une adiposité corporelle réduite, tels que les porcs de race Ham Line, ont une production plus élevée d'ARNm d'adiponectine dans leurs tissus adipeux, comparativement à des porcs présentant une plus grande adiposité corporelle (ex. porc de race Meishan; Lord *et al.* 2005). De plus, il est bien connu que les porcs ayant une adiposité faible présentent des tailles de portée diminuées comparativement à des porcs ayant une adiposité plus élevée (Gaughan *et al.* 1995). Ainsi, il serait intéressant de vérifier l'effet de l'injection d'adiponectine recombinante à des porcs de race Meishan en début de gestation pour voir si la mortalité embryonnaire serait augmentée. En parallèle, l'étude plus en profondeur des effets de l'adiponectine sur les tissus reproducteurs porcins (granulosa, CL, endomètre, etc.) et la variation des transcrits des récepteurs de l'adiponectine : AdipoR1, AdipoR2 et cadhérine-T selon la parité (i.e. multipares vs nullipares), le stade physiologique (i.e. truies cycliques vs gestantes), le type cellulaire ou le site de prélèvement des échantillons (i.e. utérus, aux sites ou entre les sites d'implantation) permettrait une meilleure compréhension de ces rôles en reproduction chez le porc.

Un effet anti-angiogénique de l'adiponectine a été avancé tout récemment (Brakenhielm *et al.* 2004). Ainsi, un modèle *in vitro* d'angiogenèse (par ajout de VEGF)

en utilisant du tissu utérin (ex. cellules endométriales, cellules folliculaires) ou du tissu adipeux porcin pourrait être développé et servir à étudier l'effet de l'ajout d'adiponectine ou de son agoniste (osmotin; Narasimhan *et al.* 2005) sur l'expression et/ou l'activation des récepteurs AdipoR1, AdipoR2 et cadhérine-T. Ce modèle d'angiogenèse porcin pourrait également servir à vérifier l'effet anti-angiogénique de ANGPTL4 qui est encore controversé (Ito *et al.* 2003).

Dans le deuxième article, nous avons démontré que certains gènes candidats, connus pour leurs rôles dans le métabolisme des lipides, seraient également importants pour certains caractères de reproduction chez la truie. Ainsi, nous rapportons pour la première fois, la présence des transcrits de SREBP1c et de ANGPTL4 dans les ovaires et l'endomètre porcin. De plus, bien que le rôle des PPAR ait été étudié chez le porc en relation avec le métabolisme des lipides, nous sommes les premiers à démontrer un rôle probable des PPAR dans certains caractères de reproduction. Ainsi, dans cette étude, nous avons observé la présence des transcrits de PPAR δ , PPAR γ 1 et PPAR γ 2 dans l'endomètre de truies gestantes et la modulation de PPAR δ et PPAR γ 1 selon la parité, le stade de gestation et le site de prélèvement des échantillons dans l'endomètre. Nos résultats montrent aussi que PPAR γ 2 aurait probablement un rôle mineur pendant la période de péri-implantation puisque ses niveaux d'ARNm sont demeurés inchangés.

Récemment, un rôle possible de PPAR δ dans les processus de réparation tissulaire, chez des souris PPAR δ ^{-/-} a été démontré (Tan *et al.* 2005), sa présence augmentant la vitesse de réparation de la peau, PPAR γ serait impliqué dans le contrôle de l'entrée des acides gras dans les trophoblastes (Schaff *et al.* 2005) et aurait une action anti-angiogénique (Vonnahme et Ford, 2003). Puisque nous avons démontré, dans l'endomètre porcin, une diminution des transcrits de PPAR δ et, à l'inverse, une augmentation de ceux de PPAR γ entre les jours 15 à 25 de la gestation, une hypothèse quant à l'action angiogénique de PPAR δ et anti-angiogénique de PPAR γ , dans l'endomètre porcin, pourrait être proposée. Le modèle *in vitro* d'angiogenèse, suggéré précédemment, pourrait également servir à tester cette hypothèse en y ajoutant un antagoniste de PPAR γ et PPAR δ (GW9662; Seimandi *et al.* 2005). De cette façon, il

serait possible de voir si les deux récepteurs sont essentiels à ce processus d'angiogénèse. L'étude du niveau d'expression de PPAR γ et PPAR δ , en relation avec des gènes reconnus pour leur rôle angiogénique (ex. VEGF), pourrait aussi être réalisée dans les tissus reproducteurs porcins en début de gestation. Enfin, puisque le début de la gestation chez la truie est caractérisé par de nombreux et importants changements survenant à tous les jours, il serait pertinent d'étudier la modulation de l'expression de ces gènes à des stades de gestation plus et moins avancés, notre étude s'étant limitée aux jours 15 et 25.

En conclusion, les travaux présentés dans ce mémoire démontrent que le tissu adipeux aurait également un rôle important pour le contrôle de certains caractères de reproduction. La présence de récepteurs de l'adiponectine dans l'endomètre et l'ovaire porcine, de même que la modulation de certains facteurs de transcription activés par des acides gras, tels que les PPAR, dans l'endomètre en début de gestation chez la truie, viennent appuyer ce nouveau rôle du tissu adipeux. Les producteurs de porc canadiens étant payés selon le rendement en maigre de leurs carcasses, les schémas de sélection des dernières années ont été dirigés vers l'obtention de carcasses de plus en plus maigres. Cette pression de sélection a entraîné du même coup de nombreux problèmes de reproduction et un taux de réforme des truies de plus en plus élevé. Les travaux de recherche axés sur la démonstration du lien existant entre les niveaux de tissu adipeux et les caractères de reproduction seront de plus en plus importants pour convaincre les producteurs de ramener le niveau de gras dorsal à un seuil minimal acceptable. Les abattoirs devront également être de la partie, afin qu'ils ne pénalisent plus les producteurs qui auront de plus faibles rendements en viandes maigres. Ainsi, un mode de paiement tenant compte de la qualité de la viande, et non seulement de la quantité, pourrait aussi convaincre les producteurs du bien fondé d'un seuil minimal d'adiposité pour les truies.

Bibliographie

Abumrad, NA., Forest, CC., Regen, DM., et Sanders, S. 1991. Increase in membrane uptake of long-chain fatty acids early during preadipocyte differentiation. *Proceeding of the National Academy of Science U.S.A.* 88:6008-6012.

Abumrad, NA., El Maghrabi, R., Amri, EZ., Lopoez, E., et Grimaldi, P. 1993. Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport long-chain fatty acids that is induced during adipocytes differentiation. Homology with human CD36. *Journal of Biological Chemistry.* 268:17665-17668.

Abumrad, N., Coburn, C., et Ibrahimi, A. 1999. Membrane proteins implicated in long-chain fatty acid uptake by mammalian cells: CD36, FATP and FABPm. *Biochimica and Biophysica Acta.* 1441:4-13.

Adachi, Y., Takeuchi, T., Sonobe, H., Ohtsuki, Y. 2005. An adiponectin receptor, T-cadherin, was selectively expressed in intratumoral capillary endothelial cells in hepatocellular carcinoma: possible cross talk between T-cadherin and FGF-2 pathways. *Virchows Arch.* 5:1-8.

Agura, E., Howard, M., Collins, S. 1992. Identification and sequence analysis of the promoter for the leukocyte integrin beta-subunit (CD-18): A retinoic acid-inducible gene. *Blood.* 79:602-609.

Ahima, RS., et Flier, JS. 2000. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends in Endocrinology and Metabolism.* 11:327-332.

Ailhaud, G. 2000. Adipose tissue as an endocrine organ. *International Journal of Obesity Related Metabolic Disorders.* 24, Supplement 2:1-3.

Ailhaud, G., Grimaldie, P., et Negrel, R. 1992. Cellular and molecular aspects of adipose tissue development. *Annual Review of Nutrition.* 12:207-233.

Ajuwon, KM., et Spurlock, ME. 2004. Adiponectin inhibits LPS-induced NF- κ B activation and IL-6 production and increases PPAR $\{\gamma\}$ 2 expression in adipocytes. 2005. *American Journal of Physiological, Regulatory, Integrative and Comparative Physiology.* 288:1220-1225.

Akune, T., Ohba, S., Kamekura, S., Yamaguchi, M., Chung, UI., Kubota, N., Terauchi, Y., Harada, Y., Azuma, Y., Nakamura, K., Kadowaki, T., et Kawaguchi, H. 2004. PPAR γ insufficiency enhances osteogenesis through osteoblast formation from bone marrow progenitors. *Journal of Clinical Investigation.* 113:846-855.

Amri, EZ., Bonimo, F., Ailhaud, G., Abumrad, NA., et Grimaldi, PA. 1995. Cloning of a protein that mediates transcriptional effects of fatty acids in preadipocytes. *Journal of Biological Chemistry*. 270:2367-2371.

Anderson, LL. 1978. Growth, protein content and distribution of early pig embryos. *The Anatomical Record*. 190:143-153.

Aranda, A., et Pascual, A. 2001. Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiological Reviews*. 81:1269-1295.

Arita, Y., Kihara, S., Ouchi, N., Takahashi, M., Maeda, K., Miyagawa, J., Hotta, K., Shimomura, I., Nakamura, T., Miyaoka, K., Kuriyama, H., Nishida, M., Yamashita, S., Okubo, K., Matsubara, K., Muraguchi, M., Ohmoto, Y., Funahashi, T., et Matsuzawa, Y. 1999. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 257:79-81.

Armstrong, MK., Bernlohr, DA., Storch, J., et Clarke, SD. 1990. The purification and characterization of a fatty acid binding protein specific to pig (*Sus domesticus*) adipose tissue. *Biochemical Journal*. 267:373-378.

Ashworth, CJ., Haley, CS., Aitken, RP., et Wilmut, I. 1990. Embryo survival and conceptus growth after reciprocal embryo transfer between Chinese Meishan and Landrace x Large White gilts. *Journal of Reproduction and Fertility*. 90:595-603.

Ashworth, C., Haley, C., et Wilmut, I. 1992. Effect of Regumate on ovulation rate, embryo survival and conceptus growth in Meishan and Landrace x Large White gilts. *Theriogenology*. 37:433-443.

Auboeuf, D., Rieusset, J., Fajas, L., Vallier, P., Frering, V., Riou, JP., Staels, B., Auwerx, J., Laville, M., et Vidal, H. 1997. Tissue distribution and quantification of the expression of mRNAs of peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptor α in humans. *Diabetes*. 46:1319-1327.

Asshauer, M., Klein, J., Kralisch, S., Klier, M., Lossner, U., Bluher, M., et Paschke, R. 2004. Growth hormone is a positive regulator of adiponectin receptor 2 in 3T3-L1 adipocytes. *FEBS Letters*. 558:27-32.

Baniahmad A. 2005. Nuclear hormone receptor co-repressors. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 93:89-97.

Barak, Y., Nelson, MC., Ong, ES., Jones, YZ., Ruiz-Lozano, P., Chien, KR., Koder, A., et Evans, RM. 1999. PPAR Gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Molecular Cell*. 4:585-595.

Barak, Y., Liao, D., He, W., Ong, ES., Nelson, MC., Olefsky, JM., Boland, R., et Evans, RM. 2002. Effects of peroxisome proliferator-activated receptor delta on placentation,

adiposity, and colorectal cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 99:303-308.

Barb, CR. 1999. The brain-pituitary-adipocyte axis: role of leptin in modulating neuroendocrine function. *Journal of Animal Science.* 77:1249-1257.

Barb, CR., et Kraeling, RR. 2004. Role of leptin in the regulation of gonadotropin secretion in farm animals. *Animal Reproductive Science.* 82-83:155-167.

Barb, CR., et Barrett, JB., Kraeling, RR. 2004. Role of leptin in modulating the hypothalamic-pituitary axis and luteinizing hormone secretion in the prepuberal gilt. *Domestic Animal Endocrinology.* 26:201-214.

Barb, CR., Hausman, GJ., et Houseknecht, KL. 2001. Biology of leptin in the pig. *Domestic Animal Endocrinology.* 21:297-317.

Barb, CR., Hausman, GJ., et Czaja, K. 2005. Leptin: a metabolic signal affecting central regulation of reproduction in the pig. *Domestic Animal Endocrinology.* 29:186-192.

Barends, PM., Stroband, HW., Taverne, N., te Kronnie, G., Leen, MP., et Blommers, PC. 1989. Integrity of the preimplantation pig blastocyst during expansion and loss of polar trophoderm (Rauber cells) and the morphology of the embryoblast as an indicator for developmental stage. *Journal of Reproduction and Fertility.* 87:715-726.

Bartness, TJ., et Bamshad, M. 1998. Innervations of mammalian white adipose tissue: implications for the regulation of total body fat. *American Journal of Physiology.* 275:1399-1411.

Bastie, C., Luquet, S., Hoslst, D., Jehl-Pietri, C., et Grimaldi, PA. 2000. Alterations of peroxisome proliferator-activated receptor delta activity affect fatty-acid-controlled adipose differentiation. *Journal of Biological Chemistry.* 275:38768-38773.

Bastien, J., et Rochette-Egly, C. 2004. Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes. *Gene.* 328:1-16.

Bazer, FW., Marengo, SR., Geisert, RD., et Thatcher, WW. 1984. Exocrine versus endocrine secretion of prostaglandin F in the control of pregnancy in swine. *Animal Reproduction. Science.* 7:115-132.

Bazer, FW., Vallet, JL., Roberts, RM., Sharp, DC., et Thatcher, WW. 1986. Role of conceptus secretory products in establishment of pregnancy. *Journal of Reproduction and Fertility.* 76:841-850.

Bazer, FW., Thatcher, WW., Martinat-Botté, F., et Terqui, M. 1988. Conceptus development in Large White and prolific Chinese Meishan pigs. *Journal of Reproduction and Fertility*. 84:37-42.

Bazer, FW., Thatcher, WW., Matinat-Botte, F., Terqui, M., Lacroix, MC., Bernard, S., Revault, M., et Dubois, DH. 1991. Composition of uterine flushings from Large White and prolific Chinese Meishan gilts. *Reproduction, Fertility, and Development*. 3:51-60.

Beach, FA. 1976. Sexual attractivity, proceptivity, and receptivity in female mammals. *Hormones and Behavior*. 7:105-138.

Beier, HM., Beier-Hellwig, K., et Delbos, R. 1983. *Hormones and proteins involved in uterinepreparation for implantation*. Dans: Fertilization of human egg in vitro. Éditeurs Beier, HM., et Lindner, HR., Édition Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 307-327.

Belanger, AJ., Lu, H., Date, T., Liu, LX., Vincent, KA., Akita, GY., Cheng, SH., Gregory, RJ., et Jiang, C. 2002. Hypoxia up-regulates expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma angiopoietin-related gene (PGAR) in cardiomyocytes: role of hypoxia inducible factor 1alpha. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 34:765-774.

Bennett, GL., et Leymaster, KA. 1989. Integration of ovulation rate, potential embryonic viability and uterine capacity into a model of litter size in swine. *Journal of Animal Science*. 67:1230-1241.

Berg, AH., Combs, TP., Du, X., Brownlee, M., et Scherer, PE. 2001. The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nature Medecine*. 7:947-953.

Berger, J., et Moller, DE. 2002. The mechanisms of actions of PPARs. *Annual Reviews of Medicine*. 53:409-435

Beutler, B., et Cerami, A. 1989. The biology of cachectin/TNF- α primary mediator of the host response. *Annual Review of Immunology*. 7:625-655.

Bidanel, JP., Caritez, JC., et Legault, C. 1989. Estimation of crossbreeding parameters between Large White and Meishan porcine breeds. I. Reproductive performance. *Genetics, Selection, Evolution*. 21:507-526.

Bidanel, JP., Caritez, JC., et Legault, C. 1990. Estimation of crossbreeding parameters between Large White and Meishan porcine breeds. II. Growth before weaning and growth of females during the growing and reproductive periods. *Genetics, selection, evolution*. 22:431-445.

Biensen, NJ., Wilson, ME., et Ford, SP. 1998. The impact of either a Meishan or Yorkshire uterus on Meishan or Yorkshire fetal and placental development to days 70, 90, and 110 of gestation. *Journal of Animal Science*. 76:2169-2176.

- Biensen, NJ., Wilson, ME., Ford, SP. 1999. The impacts of uterine environment and fetal genotype on conceptus size and placental vascularity during late gestation in pigs. *Journal of Animal Science*. 77:954-959.
- Boden, G. 1997. Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes*. 46:3-10.
- Bolet, G., Martinat-Botté, F., Locatelli, P., Gruand, J., Terqui, M., et Berthelot, F. 1986. Components of prolificacy of hyperprolific Large White sows. Comparison with Meishan and control Large White sows. *Genetics, Selection, Evolution*. 18:333-342.
- Boone, C., Grégoire, F., De Clerq, L., et Remacle, C. 1999a. The modulation of cell shape influences porcine preadipocyte differentiation. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*. 35:61-63.
- Boone, C., Grégoire, F., et Remacle, C. 1999b. Regulation of porcine adipogenesis in vitro, as compared with other species. *Domestic Animal Endocrinology*. 17:257-267.
- Bottner, A., Kratzsch, J., Muller, G., Kapellen, TM., Bluher, S., Keller, E., Bluher, M., et Kiess W. 2004. Gender differences of adiponectin levels develop during the progression of puberty and are related to serum androgen levels. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 89:4053-4061.
- Braissant, O., Foufelle, F., Scotto, C., Dauca, M., et Wahli, W. 1996. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR- α , - β - γ in adult rats. *Endocrinology*. 137:354-366.
- Braissant, O. et Wahli, W. 1998. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptor- α , - β - γ in rat central nervous system. *Journal of Neurochemistry*. 70:1366-1375.
- Brakenhielm, E., Veitonmaki, N., Cao, R., Kihara, S., Matsuzawa, Y., Zhivotovsky, B., Funahashi, T., et Cao, Y. 2004. Adiponectin-induced antiangiogenesis and antitumor activity involve caspase-mediated endothelial cell apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.* 101:2476-2481.
- Brown, MS., et Goldstein, JL. 1997. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell*. 89:331-340.
- Brown, R., Wiesner, G., Ur, E., et Wilkinson, M. 2005. Pituitary resistin gene expression is upregulated in vitro and in vivo by dexamethasone but is unaffected by rosiglitazone. *Neuroendocrinology*. 81:41-48.

Brun, RP., Kim, JB., Hu, E., Altiock, S., et Spiegelman, BM. 1996. Adipocyte differentiation: a transcriptional regulatory cascade. *Current Opinion in Cell Biology*. 8:826-832.

Brun, RP., et Spiegelman, BM. 1997. PPAR gamma and the molecular control of adipogenesis. *Journal of Endocrinology*. 155:217-218.

Bruun, JM., Verdich, C., Toubro, S., Astrup, A., et Richelsen, B. 2003. Association between measures of insulin sensitivity and circulating levels of interleukin-8, interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha. Effect of weight loss in obese men. *European Journal of Endocrinology*. 148:535-542.

Camara, M., Mourot, J., Chérot, P., et Mounier, A. 1994. Évolution de la composition lipidique de la bavière en fonction de l'âge: comparaison entre le porc Large White et le porc Meishan. *Journal de la Recherche Porcine (France)*. 26:163-168.

Cao, Z., Umek, RM., et McKnight, SL. 1991. Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Genes and Development*. 5:1538-1552.

Chabot, V., Lambert, RD., Laforest, JP., St-Jacques, S., Matte, JJ., Guay, F., Palin, MF., et Lessard, M. 2004. Effect of estrous cycle and early pregnancy on uterine production and expression of immune regulatory factors in gilts. *Animal Reproductive Science*. 81:137-149.

Chawla, A., Schwarz, EJ., Dimaculangan, DD., et Lazar, MA. 1994. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) gamma: Adipose-Predominant Expression and Induction Early in adipose differentiation. *Endocrinology*. 135:798-800.

Chehab, FF., Lim, ME., et Lu, R. 1996. Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. *Nature Genetic*. 12:318-320.

Chen, P., Baas, TJ., Mabry, JW., et Koehler, KJ. 2003. Genetic correlations between lean growth and litter traits in U.S. Yorkshire, Duroc, Hampshire, and Landrace pigs. *Journal of Animal Science*. 81:1700-1705.

Chen, XD., Lei, T., Xia, T., Gan, L., et Yang ZQ. 2004. Increased expression of resistin and tumour necrosis factor-alpha in pig adipose tissue as well as effect of feeding treatment on resistin and cAMP pathway. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 6:271-279.

Cheng, P. 1983. A highly prolific pig breed of China – The Taihu pig. Parts I and II. *Pig News and Information*. 4:407-425.

- Chiu, PY., Chaudhuri, S., Harding, PA., Kopchick, JJ., Donkin, S., et Etherton, TD. 1994. Cloning of a pig glucose transporter 4 cDNA fragment: use in developing a sensitive ribonuclease protection assay for quantifying low-abundance glucose transporter 4 mRNA in porcine adipose tissue. *Journal of Animal Science.* 72:1196-1203.
- Christenson, RK., Leymaster, KA., Young, LD. 1987. Justification of unilateral hysterectomy-ovariectomy as a model to evaluate uterine capacity in swine. *Journal of Animal Science.* 65:738-744.
- Christenson, RK., Vallet, JL., Leymaster, KA., et Young, LD. 1993. Uterine function in Meishan pigs. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement* 48:279-289.
- Christenson, RK. 1993. Ovulation rate and embryonic survival in Chinese Meishan and White crossbred pigs. *Journal of Animal Science.* 71:3060-3066.
- Coleman, RA., Lewin, TM., et Muoio, DM. 2000. Physiological and nutritional regulation of enzymes of triacylglycerol synthesis. *Annual Reviews of Nutrition.* 20:77-103.
- Combs, TP., Berg, AH., Rajala, MW., Klebanov, S., Iyengar, P., Jimenez-Chillaron, JC., Patti, ME., Klein, SL., Weinstein, RS., et Scherer, PE. 2003. Sexual differentiation, pregnancy, calorie restriction, and aging affect the adipocyte-specific secretory protein adiponectin. *Diabetes.* 52:268-276.
- Combs, TP., Pajvani, UB., Berg, AH., Lin, Y., Jelicks, LA., Laplante, M., Nawrocki, AR., Rajala, MW., Parlow, AF., Cheeseboro, L., Ding, YY., Russell, RG., Lindemann, D., Hartley, A., Baker, GR., Obici, S., Deshaies, Y., Ludgate, M., Rossetti, L., et Scherer, PE. 2004. A transgenic mouse with a deletion in the collagenous domain of adiponectin displays elevated circulating adiponectin and improved insulin sensitivity. *Endocrinology.* 145:367-383.
- Cousin, B., Munoz, O., Andre, M., Fontanilles, AM., Dani, C., Cousin, JL., Laharrague, P., Casteilla, L., et Pénicaud, L. 1999. A role for preadipocytes as macrophage-like cells. *FASEB Journal.* 13:305-312.
- Craig, JA., Zhu, H., Dyce, PW., Wen, L., et Li, J. 2005. Leptin enhances porcine preimplantation embryo development in vitro. *Molecular Cell Endocrinology.* 229:141-147.
- Dai, MH., Xia, T., Chen, XD., Gan, L., Feng, SQ., Qiu, H., Peng, Y., et Yang, ZQ. 2006. Cloning and characterization of porcine resistin gene. *Domestic Animal Endocrinology.* 30:88-97.

Damon, AM., Vincenta, A., Lombardib, A., et Herpina, P. 1998. First evidence of uncoupling protein-2 (UCP-2) and -3 (UCP-3) gene expression in piglet skeletal muscle and adipose tissue. *Gene*. 246:133-141.

Dantzer, V. 1985. Electron microscopy of the initial stages of placentation in the pig. *Anatomy and Embryology (Berlin)*. 172:281-293.

De Biasi, SN., Apfelbaum, LI., et Apfelbaum, ME. 2001. In vitro effect of leptin on LH release by anterior pituitary glands from female rats at the time of spontaneous and steroid-induced LH surge. *European Journal of Endocrinology*. 145:659-665.

Degerman, E., Belfrage, P., et Manganiello, VC. 1997. Structure, localization and regulation of cGMP-inhibited phosphodiesterase (PDE3). *Journal of Biological Chemistry*. 272:6823-6826.

Desnoyers, F., et Vodovar, N. 1977. Étude histologique comparée entre le porc et le rat du tissu adipeux périrénal au stade de son apparition. *Biological Cell*. 29:177-182.

Desvergne, B., et Wahli, W. 1999. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocrine Reviews*. 20:649-688.

Diez, JJ., et Iglesias, P. 2003. The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease. *European Journal of Endocrinology*. 148:293-300.

Ding, ST., McNeel, RL., et Mersmann, HJ. 1999. Expression of porcine adipocyte transcripts: tissue distribution and differentiation in vitro and in vivo. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part. B*. 123:307-318.

Ding, ST., Schinckel, AP., Weber, TE., et Mersmann, HJ. 2000. Expression of porcine transcription factors and genes related to fatty acid metabolism in different tissues and genetic population. *Journal of Animal Science*. 78:2127-2134.

Ding, NZ., Ma, XH., Diao, HL., Xu, LB., et Yang, ZM. 2003. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptor delta at implantation sites and in decidual cells of rat uterus. *Reproduction*. 125:817-825.

Ding, ST., Liu, BH., et Ko, YH. 2004. Cloning and expression of porcine adiponectin and adiponectin receptor 1 and 2 genes in pigs. *Journal of Animal Science*. 82:3162-3174.

Dhindsa, DS., et Dziuk, PJ. 1968. Effect on pregnancy in the pig after killing embryos or fetuses in one uterine horn in early gestation. *Journal of Animal Science*. 27:122-126.

Duggal, PS., Van Der Hoek, KH., Milner, CR., Ryan, NK., Armstrong, DT., Magoffin, DA., et Norman, RJ. 2000. The in vivo and in vitro effects of exogenous leptin on ovulation in the rat. *Endocrinology*. 141:1971-1976.

Edwards, PA., Tabor, D., Kast, HR., et Venkateswaran, A. 2000. Regulation of gene expression by SREBP and SCAP. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1529:103-113.

Egan, JJ. Greenberg, AS. Chang, MK. Wek, SA. Moos, MC Jr. et Londos, C. 1992. Mechanism of hormone-stimulated lipolysis in adipocytes: translocation of hormone-sensitive lipase to the lipid storage droplet. *Proceeding of the National Academy of Science U.S.A.* 89:8537-8541.

Fain, JN., Madan, AK., Hiler, ML., Cheema, P., et Bahouth, SW. 2004. Comparaison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology* 145:2273-2282.

Fajas, L., Fruchart, JC., et Auwerx, J. 1998. PPAR gamma 3 mRNA: a distinct PPAR gamma mRNA subtype transcribed from an independent promoter. *FEBS Letters*. 438:55-60.

Fajas, L., Schoonjans, K., Gelman, L., Kim, JB., Najib, J., Martin, G., Fruchart, JC., Briggs, M., Spiegelman, BM., et Auwerx, J. 1999. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression by adipocyte differentiation and determination factor 1/sterol regulatory element binding protein 1: implications for adipocyte differentiation and metabolism. *Molecular and Cellular Biology*. 19:5495-5503.

Fasshauer, M., Klein, J., Neumann, S., Eszlinger, M., et Paschke, R. 2002. Hormonal regulation of adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 290:1084-1089.

Febbraio, M., Guy, E., Coburn, C., Knapp, FF Jr., Beets, AL., Abumrad, NA., et Silverstein, RL. 2002. The impact of overexpression and deficiency of fatty acid translocase (FAT)/CD36. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 239:193-197.

Fenton, FR., Schwartz, FL., Bazer, FW., Robison, OW., et Ulberg, LC. 1972. Stage of gestation when uterine capacity limits embryo survival in gilts. *Journal of Animal Science*. 35:383-388.

Fink, T., Abildtrup, L., Fogd, K., Abdallah, BM., Kassem, M., Ebbesen, P., et Zachar, V. 2004. Induction of adipocyte-like phenotype in human mesenchymal stem cells by hypoxia. *Stem Cells*. 22:1346-1355.

Fisher, RM., Thörne, A., Hamsten, A., et Arner, P. 2002. Fatty acid binding protein expression in different human adipose tissue depots in relation to rates of lipolysis and insulin concentration in obese individuals. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 239:95-100.

Flier, JS. 2004. Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic.

Cell. 116:337-350.

Flint, APF. 1981. A unifying hypothesis for the control of blastocyst growth based on observations on the pig. *Journal of Reproduction and Fertility*. Supplement 29:215-227.

Ford, SP. 1997. Embryonic and fetal development in different genotypes in pigs. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*. 52:165-76

Ford, SP., et Youngs, CR. 1993. Early embryonic development in prolific Meishan pigs. *Journal of Reproduction and Fertility*. Supplement 48:271-278.

Ford, SP., Vonnahme, KA., et Wilson, ME. 2002. Uterine capacity in the pig reflects a combination of uterine environment and conceptus genotype effects. *Journal of Animal Science* 80. Supplement 1:66-73.

Frayn, KN., Karpe, F., Fielding, BA., Macdonald, IA., et Coppack, SW. 2003. Integrative physiology of human adipose tissue. *International Journal of Obesity Related Metabolic Disorders*. 27:875-888.

Fruebis, J., Tsao, TS., Javorschi, S., Ebbets-Reed, D., Erickson, MR., Yen, FT., Bihain, BE., et Lodish, HF. 2001. Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proceeding of the National Academy of Sciences U S A*. 98:2005-2010.

Fruhbeck, G., Gomez-Ambrosi, J., Muruzabal, FJ., et Burrell, MA. 2001. The Adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism*. 280:827-847.

Galvin, JM., Wilmut, I., Day, BN., Ritchie, M., Thomson, M., et Haley, CS. 1993. Reproductive performance in relation to uterine and embryonic traits during early gestation in Meishan, large white and crossbred sows. *Journal of Reproduction and Fertility*. 98:377-384.

Garcia de Herreros, A., et Birnbaum, MJ. 1989. The acquisition of increase insulin-responsive hexose transport in 3T3-L1 adipocytes correlates with expression of a novel transporter gene. *Journal of Biological Chemistry*. 264:19994-19999

Garton, AJ., Campbell, DG., Carling, D., Hardie, DG., Colbran, RJ., et Yeaman, SJ. 1989. Phosphorylation of bovine hormone-sensitive lipase by the AMP-activated protein kinase. A possible antilipolytic mechanism. *European Journal of Biochemistry*. 179:249-254.

Gaughan, JB., Cameron, RDA., Dryden, G., et Josey, MJ. 1995. Effect of selection for leanness on overall reproductive performance in Large White sows. *Animal Science*. 61:561-564.

Gaughan, JB., Cameron, RD., Dryden, GM., et Young, BA. 1997. Effect of body composition at selection on reproductive development in large white gilts. *Journal of Animal Science*. 75:1764-1772.

Ge, H., Yang, G., Huang, L., Motola, DL., Pourbahrami, T., et Li, C. 2003. Oligomerization and regulated proteolytic processing of angiopoietin-like protein 4. *Journal of Biological Chemistry*. 279:2038-2045.

Ge, H., Yang, G., Yu, X., Pourbahrami, T., et Li, C. 2004. Oligomerization state-dependent hyperlipidemic effect of angiopoietin-like protein 4. *Journal of Lipids Research*. 45:2071-2079.

Geisert, RD., Renegar, RH., Thatcher, WW., Roberts, RM., et Bazer, FW. 1982a. Establishment of pregnancy in the pig: I. Interrelationships between preimplantation development of the pig blastocyst and uterine endometrial secretions. *Biology of Reproduction*. 27:925-939.

Geisert, RD., Brookbank, JW., Roberts, RM., et Bazer, FW. 1982b. Establishment of pregnancy in the pig: II. Cellular remodeling of the porcine blastocyst during elongation on day 12 of pregnancy. *Biology of Reproduction*. 27:941-955.

Geisert, RD., Rasby, RJ., Minton, JE. et Wettemann, RP. 1986. Role of prostaglandins in development of porcine blastocysts. *Prostaglandins*. 31:191-204.

Geisert, RF., Zavy, RT., Moffattm RJ., Blair, RM., et Yellin, T. 1990. Embryonic steroids and the establishment of pregnancy in pigs. *Journal of Reproduction and Fertility*. Supplement 40:293-305.

Geisert, RD., et Yelich, JV. 1997. Regulation of conceptus development and attachment in pigs. *Journal of Reproduction and Fertility*. Supplement 52:133-149.

Gelman, L., Michalik, L., Desvergne, B., et Wahli, W. 2005. Kinase signaling cascades that modulate peroxisome proliferator-activated receptors. *Current Opinion in Cell Biology*. 17:216-222.

Gerbens, F., Jansen, A., van Erp, AJM., Harders, F., Meuwissen, THE., Rettenberger, G., Veerkamp, JH., et te Pas, MFW. 1998. The adipocyte fatty acid-binding protein locus: characterization and association with intramuscular fat content in pigs. *Mammalian Genome*. 9:1022-1026.

Goldstein, JL., Rawson, RB., et Brown, MS. 2002. Mutant mammalian cells as tools to delineate the sterol regulatory element-binding protein pathway for feedback regulation of lipid synthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 397:139-148.

Gondret, F., Ferre, P., et Dugail, I. 2001. ADD-1/SREBP-1 is a major determinant of tissue differential lipogenic capacity in mammalian and avian species. *Journal of Lipids Research*. 42:106-113.

Grant, SA., Hunter, MG., et Foxcroft, GR. 1989. Morphological and biochemical characteristics during ovarian follicular development in the pig. *Journal of Reproduction and Fertility*. 86:171-183.

Green, H., et Kehinde, O. 1974. An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. *Cell*. 1:113-116.

Greenberg, AS., Shen, WJ., Muliro, K., Patel, S., Souza, SC., Roth, RA., et Kraemer, 2001. Stimulation of lipolysis and hormone-sensitive lipase via the extracellular signal-regulated kinase pathway. *Journal of Biological Chemistry*. 276:45456-45461.

Greenwalt, DE., Lipsky, RH., Ockenhouse, CF., Ikeda, H., Trandon, NN., et Jamieson, GA. 1992. Membrane glycoprotein CD36 : a review of its roles in adherence signal transduction, and transfusion medicine. *Blood*. 80:1105-1115.

Grégoire, FM., Smas, CM., et Sul, AHS. 1998. Understanding Adipocyte Differentiation. *Physiological Reviews*. 78:783-809.

Grégoire, FM. 2001. Adipocyte differentiation: from fibroblast to endocrine cell. *Experimental Biology and Medicine*. 226:997-1002.

Gregoraszcuk, EL., Wojtowicz, AK., Ptak, A., et Nowak, K. 2003. In vitro effect of leptin on steroids' secretion by FSH- and LH-treated porcine small, medium and large preovulatory follicles. *Reproductive Biology*. 3:227-239.

Gries, LK., Geisert, RD., Zavy, MT., Garrett, JE., et Morgan, JL. 1989. Uterine secretory alterations coincident with embryonic mortality in the gilt after exogenous estrogen administration. *Journal of Animal Science*. 67:276-284.

Grindflek, E., Sundvold, H., Klungland, H., et Lien, S. 1998. Characterisation of porcine peroxisome proliferator-activated receptors .1 and .2: detection of breed and age differences in gene expression. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 249:713-718.

Grunfeld, C., et Feingold, KR. 1991. The metabolic effects of tumor necrosis factor and other cytokines. *Biotherapy*. 3:143-158.

Guesnet, PH., et Demarne, Y. 1987. *La régulation de la lipogenese et de la lipolyse chez les mammifères*. Édition INRA, Paris. 153 p.

Halleux, CM., Takahashi, M., Delporte, ML., Detry, R., Funahashi, T., Matsuzawa, Y., et Brichard, SM. 2001. Secretion of adiponectin and regulation of apM1 gene expression

in human visceral adipose tissue. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 288:1102-1107.

Haley, CS., et Lee, GJ. 1990. *Genetic components of litter size in Meishan and large White pigs and their crosses*. Éditeurs Hill, WG., Thompson, R., et Woolliams, JA. Proceeding of the 4th World Congress. *Genetics Applied to Livestock Production*. XV:458.

Haley, CS., D'Agaro, E., et Ellis, M. 1992. Genetic components of growth and ultrasonic fat depth traits in Meishan and Large White pigs and their reciprocal crosses. *Animal Production*. 266:105-115.

Haley, CS., et Lee, GJ. 1993. Genetic basis of prolificacy in Meishan pigs. *Journal of Reproduction and Fertility*. Supplement 48:247-259.

Haley, CS., Lee, GJ., et Ritchie, M. 1995. Comparative reproductive performance in Meishan and Large White pigs and their crosses. *Animal Science*. 60:259-267.

Hannah, VC., Ou, J., Luong, A., Goldstein, JL., et Brown, MS. 2001. Unsaturated fatty acids down-regulate srebp isoforms 1a and 1c by two mechanisms in HEK-293 cells. *Journal of Biological Chemistry*. 276:4365-4372.

Harper, AF., Lindemann, MD., et Kornegay, ET. 1996. Fetal survival and conceptus development after 42 days of gestation in gilts and sows in response to folic acid supplementation. *Canadian Journal of Animal Science*. 76:157-160.

Haugen, F., Ranheim, T., Harsem, NK., Lips, E., Staff, AC., et Drevon, CA. 2006. Increased plasma levels of adipokines in preeclampsia: relationship to placenta and adipose tissue gene expression. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*. 290:326-333.

Hauer, H., Petruschke, T., Russ, M., Rohrig, K., et Eckel, J. 1995. Effects of tumour necrosis factor alpha (TNF alpha) on glucose transport and lipid metabolism of newly-differentiated human fat cells in cell culture. *Diabetologia*. 38:764-771.

Hausman, DB., Hausman, GJ., et Martin, RJ, 1993. Influence of the pituitary on lipolysis and lipogenesis in fetal pig adipose tissue. *Hormone and Metabolic Research*. 25:17-20.

Hausman, GJ. 1985. *The comparative anatomy of adipose tissue*. In *New Perspective in Adipose Tissue: Structure, Function and Development*. Éditeurs Cryer, A., et Van, RL. London, Butterworths. pp. 1-21.

Hausman, GJ. 2003. Dexamethasone induced preadipocyte recruitment and expression of CCAAT/enhancing binding protein alpha and peroxisome proliferator activated receptor-gamma in porcine stromal-vascular (S-V) cell cultures obtained before and

after the onset of fetal adipogenesis. *General and Comparative. Endocrinology.* 133:61-70.

Hausman, GJ., et Kauffman, RG. 1986. Mitotic activity in fetal and early postnatal porcine adipose tissue. *Journal of Animal Science.* 63:659-673.

Hausman, GJ., et Richardson, RL. 2004. Adipose tissue angiogenesis. *Journal of Animal Science.* 82:925-934.

Helliwell, RJ., Berry, EB., O'Carroll, SJ., et Mitchell, MD. 2004. Nuclear prostaglandin receptors: role in pregnancy and parturition? *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids.* 70:149-165.

Hehnke-Vagnoni, KE., Clark, CL., Taylor, MJ., et Ford, SP. 1995. Presence and localization of tumor necrosis factor alpha in the corpus luteum of nonpregnant and pregnant pigs. *Biology of Reproduction.* 53:1339-1344.

Himms-Hagen, J. 2001. Does brown adipose Tissue (BAT) have a role in the physiology or treatment of human obesity. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders.* 2:395-401

Holm, C., Belfrage, P., et Fredrikson, G. 1989. Human adipose tissue hormone-sensitive lipase: identification and comparison with other species. *Biochimical and Biophysical Acta.* 1006:193-197.

Holm, C., Osterlund, T., Laurell, H., et Contreras, JA. 2000. Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Annual Reviews of Nutrition.* 20:365-393.

Holm, C. 2003. Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Biochemical Society Transaction.* 31:1120-1124.

Holm, B., Bakken, M., Klemetsdal, G., et Vangen, O. 2004. Genetic correlations between reproduction and production traits in swine. *Journal of Animal Science.* 82:3458-3464.

Hotamisligil, GS., Shargill, NS., et Spiegelman, BM. 1993. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science.* 259:87-91.

Hotamisligil, GS., Budavari, A., Murray, D., et Spiegelman, BM. 1994. Reduced tyrosine kinase activity of the insulin receptor in obesity-diabetes: Central role of tumor necrosis factor- α . *Journal of Clinical Investigation.* 94:1543-1549.

- Hotamisligil, GS., Arner, P., Caro, JF., Atkinson, RL., et Spiegelman, BM. 1995. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation*. 95:2409-2415.
- Holcomb, IN., Kabakoff, RC., Chan, B., Baker, TW., Gurney, A., Henzel, W., Nelson, C., Lowman, HB., Wright, BD., Skelton, NJ., Frantz, GD., Tumas, DB., Peale, FV Jr., Shelton, DL., et Hebert, CC. 2000. FIZZ1, a novel cysteine-rich secreted protein associated with pulmonary inflammation, defines a new gene family. *EMBO Journal*. 19:4046-4055.
- Hotta, K., Funahashi, T., Arita, Y., Takahashi, M., Matsuda, M., Okamoto, Y., Iwahashi, H., Kuriyama, H., Ouchi, N., Maeda, K., Nishida, M., Kihara, S., Sakai, N., Nakajima, T., Hasegawa, K., Muraguchi, M., Ohmoto, Y., Nakamura, T., Yamashita, S., Hanafusa, T., et Matsuzawa, Y. 2000. Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 20:1595-1599.
- Houseknecht, KL., Bidwell, CA., Portocarrero, CP., Spurlock, ME. 1998. Expression and cDNA cloning of porcine peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma). *Gene*. 225:89-96.
- Hu, E., Liang, P., et Spiegelman, BM. 1996. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *Journal of Biological Chemistry*. 271:10697-10708.
- Huff, BG., et Esbenshade, KL. 1992. Induction of follicular development and estrus in prepubertal gilts with gonadotropins. *Animal Reproduction Science*. 27:183-194.
- Hug, C., Wang, J., Ahmad, NS., Bogan, JS., Tsao, TS., Lodish, HF. 2004. T-cadherin is a receptor for hexameric and high-molecular-weight forms of Acrp30/adiponectin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 101:10308-10313.
- Hunt, CR., Ro, JHS., Dobson, DE., Min, HY., et Spiegelman, DM. 1986. Adipocyte P2 gene: developmental expression and homology of 5'-flanking sequences among fat cell-specific genes. *Proceeding of the National Academy of Science U.S.A.* 83:3786-3790.
- Hunter, MG., Picton, HM., Biggs, C., Mann, GE., McNeilly, AS., Foxcroft, GR. 1996. Periovarian endocrinology in high ovulating Meishan sows. *Journal of Endocrinology*. 150:141-147.
- Ivanov, DB., Philippova, MP., et Tkachuk, VA. 2001. Structure and functions of classical cadherins. *Biochemistry (Moscow)*. 66:1174-1186.
- Ito, Y., Oike, Y., Yasunaga, K., Hamada, K., Miyata, K., Matsumoto, S., Sugano, S., Tanihara, H., Masuho, Y., et Suda, T. 2003. Inhibition of angiogenesis and vascular leakiness by angiopoietin-related protein 4. *Cancer Research*. 63:6651-6657.

- Jacobi, SK., Ajuwon, KM., Weber, TE., Kuske, JL., Dyer, CJ., et Spurlock, ME. 2004. Cloning and expression of porcine adiponectin, and its relationship to adiposity, lipogenesis and the acute phase response. *Journal of Endocrinology*. 182:133-144.
- Jhun, BS., Jin, Q., Oh, YT., Kim, SS., Kong, Y., Cho, YH., Ha, J., Baik, HH., et Kang, I. 2004. 5-Aminoimidazole-4-carboxamide riboside suppresses lipopolysaccharide-induced TNF- α production through inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt activation in RAW 264.7 murine macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 318:372-380.
- Johnson, RK., Zimmerman, DR., Lamberson, WR., et Sasaki, S. 1985. Influencing prolificacy of sows by selection for physiological factors. *Journal of Reproduction and Fertility*. Supplement 33:139-149.
- Johnson, SA., Morgan, G., et Wooding, FB. 1988. Alterations in uterine epithelial tight junction structure during the oestrous cycle and implantation in the pig. *Journal of Reproduction and Fertility*. 83:915-922.
- Johnson, JL., Coffey, MT., Esbenshade, KL., Schrickler, BR., et Pilkington, DH. 1990. The effect of human growth hormone-releasing factor or porcine somatotropin on serum hormones and metabolites, growth performance and carcass traits in swine. *Journal of Animal Science*. 68:3204-3211.
- Kadowaki, T., et Yamauchi, T. 2005. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocrine Reviews*. 439-451.
- Katsuki, A., Sumida, Y., Murashima, S., Murata, K., Takarada, Y., Ito, K., Fujii, M., Tsuchihashi, K., Goto, H., Nakatani, K., et Yano, Y. 1998. Serum levels of tumor necrosis factor-alpha are increased in obese patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 83:859-862.
- Kemp, B., et Soede, NM. 1997. Consequences of variation in interval from insemination to ovulation on fertilization in pigs. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*. 52:79-89.
- Kennes, YM., Murphy, BD., Pothier, F., et Palin, MF. 2001. Characterization of swine leptin (LEP) polymorphisms and their association with production traits. *Animal Genetic*. 32:215-218.
- Kern, PA., Ranganathan, S., Li, C., Wood, L., et Ranganathan, G. 2001. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism*. 280:745-751.
- Kersten, S. 2005. Regulation of lipid metabolism via angiopoietin-like proteins. *Biochemical Society Transactions*. 33:1059-1062.

Kersten, S., Mandard, S., Tan, NS., Escher, P., Metzger, D., Chambon, P., Gonzalez, FJ., Desvergne, B., et Wahli, W. 2000. Characterization of the fasting-induced adipose factor FIAF, a novel peroxisome proliferator-activated receptor target gene. *Journal of Biological Chemistry*. 275:28488-28493.

Kim, I., Kim, HG., Kim, H., Kim, HH., Park, SK., Uhm, CS., Lee, ZH., et Koh, GY. 2000. Hepatic expression, synthesis and secretion of a novel fibrinogen/angiopoietin-related protein that prevents endothelial-cell apoptosis. *Biochemical Journal*. 346:603-610.

Kim, JB., Wright, HM., Wright, M., et Spiegelman, BM. 1998. ADD1/SREBP1 activates PPAR γ through the production of endogenous ligands. *Proceeding of the National Academy of Science U.S.A* 95:4333-4337.

Kim, S., et Moustaid-Moussa, N. 2000. Secretory, endocrine and autocrine/paracrine function of the adipocyte. *Journal of Nutrition*. 130:3110-3115.

Kita, A., Yamasaki, H., Kuwahara, H., Moriuchi, A., Fukushima, K., Kobayashi, M., Fukushima, T., Takahashi, R., Abiru, N., Uotani, S., Kawasaki, E., et Eguchi, K. 2005. Identification of the promoter region required for human adiponectin gene transcription: Association with CCAAT/enhancer binding protein-beta and tumor necrosis factor-alpha. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 331:484-490.

Kharroubi, I., Rasschaert, J., Eizirik, DL., et Cnop, M. 2003. Expression of adiponectin receptors in pancreatic beta cells. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 312:1118-1122.

Kliwer, SA., Umesono, K., Nooman, DJ., Heyman, RA., et Evans, RM. 1992. Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferators signaling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature*. 358:771-774.

Klingenberg, M. 1990. Mechanism and evolution of the uncoupling protein of brown adipose tissue. *Trends in Biochemical Science*. 15:108-112.

Knowler, JT., et Beaumont, JM. 1985. The mechanism of action of oestrogens. *Essays in Biochemistry*. 20:1-39.

Kobayashi, K. 2005. Adipokines: therapeutic targets for metabolic syndrome. *Current Drug Targets*. 6:525-529.

Koster, A., Chao, YB., Mosior, M., Ford, A., Gonzalez-DeWhitt, PA., Hale, JE., Li, D., Qiu, Y., Fraser, CC., Yang, DD., Heuer, JG., Jaskunas, SR., Eacho, P. 2005. Transgenic angiopoietin-like (angptl) 4 overexpression and targeted disruption of angptl4 and angptl3: regulation of triglyceride metabolism. *Endocrinology*. 146:4943-4950.

- Krey, G., Braissant, O., L'Horset, F., Kalkhoven, E., Perroud, M., Parker, MG., et Wahli, W. 1997. Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay. *Molecular Endocrinology*. 11:779-791.
- Krzymowski, T., et Stefanczyk-Krzymowska, S. 2002. Uterine blood supply as a main factor involved in the regulation of the estrous cycle--a new theory. *Reproductive Biology*. 2:93-114.
- Kubota, N., Terauchi, Y., Yamauchi, T., Kubota, T., Moroi, M., Matsui, J., Eto, K., Yamashita, T., Kamon, J., Satoh, H., Yano, W., Froguel, P., Nagai, R., Kimura, S., Kadowaki, T., et Noda, T. 2002. Disruption of adiponectin causes insulin resistance and neointimal formation. *Journal of Biological Chemistry*. 277:25863-25866.
- Lammer, EJ., Chen, DT., Hoar, RM., Agnish, ND., Benke, PJ., Braun, JT., Curry, CJ., Fernhoff, PM., Grix, AW Jr., Lott, IT *et al.* 1985. Retinoic acid embryopathy. *The New England Journal of Medicine*. 313:837-841.
- Larsen, LK., Amri, EZ., Mandrup, S., Pacot, C., et Kristiansen, K. 2002. Genomic organization of the mouse peroxisome proliferator-activated receptor β/δ gene: alternative promoter usage and splicing yield transcripts exhibiting differential translational efficiency. *Biochemical Journal*. 366:767-775.
- Lazennec, G., Canaple, L., Saugy, D., et Wahli, W. 2000. Activation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) by their ligands and protein kinase A activators. *Molecular Endocrinology*. 14:1962-1975.
- Lawrence, TLJ., Fowler, VR. 2002. *Growth of farm animals*. Second Edition. CABI Publishing, New York, USA 347 p.
- Le Jan, S., Amy, C., Cazes, A., Monnot, C., Lamande, N., Favier, J., Philippe, J., Sibony, M., Gasc, JM., Corvol, P., et Germain, S. 2003. Angiotensin-like 4 is a proangiogenic factor produced during ischemia and in conventional renal cell carcinoma. *American Journal of Pathology*. 162:1521-1528.
- Leenhouwers, JI., Knol, EF., de Groot, PN., Vos, H., et van der Lende, T. 2001. *Fetal development in the pig in relation to genetic merit for piglet survival*. In *Biologic Aspects of Genetic Differences in Piglet Survival*, Doctoral Thesis. Wageningen, The Netherlands.
- Lefebvre, AM., Laville, M., Vega, N., Riou, JP., van Gaal, L., Auwerx, J., et Vidal, H. 1998. Depot-specific differences in adipose tissue gene expression in lean and obese subjects. *Diabetes*. 47:98-103.
- Lehmann, JM., Moore, LB., Smith-Oliver, TA., Wilkison, WO., Willson, TM., et Kliewer, SA. 1995. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for

peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *Journal of Biological Chemistry*. 270:12953-12956.

Lekstrom-Himes, J., et Xanthopoulos, KG. 1998. Biological role of the CCAAT/enhancer-binding protein family of transcription factors. *Journal of Biological Chemistry*. 273:28545-28548.

Lee, GJ., Ritchie, M., Thomson, M., Macdonald, AA., Blasco, A., Santacreu, MA., Argente, MJ., et Haley, CS. 1995. Uterine capacity and prenatal survival in Meishan and Large White pigs. *Animal Science*. 60:471-479.

Lee, K., Hausman, GJ., et Dean, RG. 1998. Expression of C/EBP alpha, beta and delta in fetal and postnatal subcutaneous adipose tissue. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 178:269-274.

Liang, G., Yang, J., Horton, JD., Hammer, RE., Goldstein, JL., et Brown, MS. 2002. Diminished hepatic response to fasting/refeeding and liver X receptor agonists in mice with selective deficiency of sterol regulatory element-binding protein-1c. *Journal of Biological Chemistry*. 277:9520-9528.

Liebich, HG. 1993. *Funktionelle Histologie*. Verlag Schattauer, Stuttgart, NY. pp. 268-269.

Lim, H., Paria, BC., Das, SK., Dinchuk, JE., Langenbach, R., Trzaskos, JM., et Dey, SK. 1997. Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. *Cell* 91:197-208.

Lim, H., Gupta, RA., Ma, WG., Paria, BC., Moller, DE., Morrow, JD., DuBois, RN., Trzaskos, JM., et Dey, SK. 1999. Cyclooxygenase-2 derived prostacyclin mediates embryo implantation in the mouse via PPARdelta. *Genes and Development*. 13:1561-1574.

Lin, FT., et Lane, MD. 1992. Antisense CCAAT/enhancer-binding protein RNA suppresses coordinate gene expression and triglyceride accumulation during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Genes and Development*. 6:533-544.

Linville, RC., Pomp, D., Johnson, RK., Rothschild, MF. 2001. Candidate gene analysis for loci affecting litter size and ovulation rate in swine. *Journal of Animal Science*. 79:60-67.

Lord, E., Ledoux, S., Murphy, BD., Beaudry, D., et Palin, MF. 2005. Expression of adiponectin and its receptors in swine. *Journal of Animal Science*. 83:565-578.

Lord, E., Murphy, BD., Ledoux, S., Beaudry, D., Matte, JJ., et Palin, MF. 2006. Modulation of peroxisome proliferator-activated receptor delta and gamma transcripts in swine endometrial tissue in early gestation. *Reproduction (Article accepté, non publié)*.

- Ma, K., Cabrero, A., Saha, PK., Kojima, H., Li, L., Chang, BH., Paul, A., et Chan, L. Increased beta -oxidation but no insulin resistance or glucose intolerance in mice lacking adiponectin. *Journal of Biological Chemistry*. 277:34658-34661.
- MacDougald, OA., et Lane, MD. 1995. Transcriptional regulation of gene expression during adipocyte differentiation. *Annual Reviews of Biochemistry*. 64:345-373.
- Maeda, K., Okubo, K., Shimomura, I., Funahashi, T., Matsuzawa, Y., et Matsubara, K. 1996. cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 221:286-289.
- Mandard, S., Zandbergen, F., Tan, NS., Escher, P., Patsouris, D., Koenig, W., Kleemann, R., Bakker, A., Veenman, F., Wahli, W., Muller, M., et Kersten, S. 2004. The direct peroxisome proliferator-activated receptor target fasting-induced adipose factor (FIAF/PGAR/ANGPTL4) is present in blood plasma as a truncated protein that is increased by fenofibrate treatment. *Journal of Biological Chemistry*. 279:34411-34420.
- Mandard, S., Zandbergen, F., van Straten, E., Wahli, W., Kuipers, F., Muller, M., et Kersten, S. 2006. The fasting-induced adipose factor/angiopoietin-like protein 4 is physically associated with lipoproteins and governs plasma lipid levels and adiposity. *Journal of Biological Chemistry*. 281:934-944.
- Mandrup, S., et Lane, DM. 1997. Regulating adipogenesis. *Journal of Biological Chemistry*. 272:5367-5370.
- Mangelsdorf, DJ., Borgmeyer, U., Heyman, RA., Zhou, JY., Ong, ES., Oro, AE., Kakizuka, A., et Evans, RM. 1992. Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9-cis retinoic acid. *Genes and Development*. 6:329-344.
- Marjeri, A., Kouraklis, G., et Theocharis, S. 2003. Peroxysome proliferator activated receptor gamma (PPAR-gamma) ligands and angiogenesis. *Angiogenesis*. 6:165-169.
- Marko, O., Cascieri, MA., Ayad, N., Strader, CD., et Candelore, MR. 1995. Isolation of a preadipocyte cell line from rat bone marrow and differentiation to adipocyte, *Endocrinology*. 136:4582-4588.
- Martinat-Botté, F., Quesnel, H., Prunier, A., Tournut, J., et Terqui, M. 1996. Reproduction de la truie : bases physiologiques et maîtrise. 1^{ère} partie. *Revue de Médecine Vétérinaire*. 147:33-46.
- Marvin, W., Eykholt, RL., Keelan, JA., Sato, TA., et Mitchell, MD. 2000. The 15-deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J(2)receptor, peroxisome proliferator activated receptor-gamma (PPARgamma) is expressed in human gestational tissues and is functionally active in JEG3 choriocarcinoma cells. *Placenta*. 21:436-440.

Mattson, BA., Overstrom, EW., et Albertini, DF. 1990. Transitions in trophoctoderm, cellular shape and cytoskeletal organization in the elongating pig blastocyst. *Biology of Reproduction*. 42:195-205.

McLaren, A. 1982. *Reproduction in mammals: 2. Embryonic and fetal development*. In *The embryo*. Éditeurs Austin, CR., et Short, RV. Cambridge University Press, Cambridge, UK. pp. 1-26.

McPherson, R., et Gauthier, A. 2004. Molecular regulation of SREBP function: the Insig-SCAP connection and isoform-specific modulation of lipid synthesis. *Biochemical and Cellular Biology*. 82:201-211.

Mei, B., Zhao, L., Chen, L., et Sul, HS. 2002. Only the large soluble form of preadipocyte factor-1 (Pref-1), but not the small soluble and membrane forms, inhibits adipocyte differentiation: role of alternative splicing. *Biochemical Journal*. 364:137-144.

Mersmann, HJ., Carey, GB., et Smith, EO. 1997. Adipose tissue B-adrenergic and A1 Adenosine receptors in suckling pigs. *Journal of Animal Science*. 75:3161-3168.

Mersmann, HJ. 1998. Lipoprotein and hormone-sensitize lipase in porcine adipose tissue. *Journal of Animal Science*. 76:1396-1404.

Michalik, L., Desvergne, B., Tan, NS., Basu-Modak, S., Escher, P., Rieusset, J., Peters, JM., Kaya, G., Gonzalez, FJ., Zakany, J., Metzger, D., Chambon, P., Duboule, D., et Wahli, W. 2001. Impaired skin wound healing in peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and PPARbeta mutant mice. *Journal of Cell Biology*. 154:799-814.

Michalik, L., Desvergne, B., Dreyer, C., Gavillet, M., Laurini, RN., et Wahli, W. 2002. PPAR expression and function during vertebrate development. *International Journal of Developmental Biology*. 46:105-114.

Minokoshi, Y., Kahn, CR., et Kahn, BB. 2003. Tissue-specific ablation of the GLUT4 glucose transporter or the insulin receptor challenges assumptions about insulin action and glucose homeostasis. *Journal of Biological Chemistry*. 278:33609-33612.

Mitchell, M., Armstrong, DT., Robker, RL., et Norman, RJ. 2005. Adipokines: implications for female fertility and obesity. *Reproduction*. 130:583-597.

Miyamoto, Y., Sakumoto, R., Sakabe, Y., Miyake, M., Okano, A., et Okuda, K. 2002. Tumour necrosis factor-alpha receptors are present in the corpus luteum throughout the oestrous cycle and during the early gestation period in pigs. *Reproduction in Domestic Animals*. 37:105-110.

Montague, CT., Prins, JB., Sanders, L., Zhang, J., Sewter, CP., Digby, J., Byrne, CD., et O'Rahilly, S. 1998. Depot-related gene expression in human subcutaneous and omental adipocytes. *Diabetes*. 47:1384-1391.

Morgan, GL., Geisert, RD., Zavy, MT., Shawley, RV., et Fazleabas, AT. 1987. Development of pig blastocysts in a uterine environment advanced by exogenous estrogen. *Journal of Reproduction and Fertility*. 80:125-131.

Morrison, RF., et Farmer, SR. 1999. Insights into the Transcriptional control of adipocyte differentiation. *Journal of Biological Chemistry*. Supplement 32:59-67.

Mostyn, A, Litten, JC., Perkins, KS., Alves-Guerra, MC., Pecqueur, C., Miroux, B., Symonds, ME., et Clarke, L. 2004. Influence of genotype on the differential ontogeny of uncoupling protein 2 and 3 in subcutaneous adipose tissue and muscle in neonatal pigs. *Journal of Endocrinology*. 183:121-131.

Mourot, J., Kouba, M., et Bonneau, M. 1996. Comparative study of in vitro lipogenesis in various adipose tissues in the growing Meishan pig: comparison with the Large White pig (*sus domesticus*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*. 115:383-388.

Mukherjee, R., Jow, L., Croston, GE., et Paterniti, JR Jr. 1997. Identification, characterization, and tissue distribution of human peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) isoforms PPAR γ 2 versus PPAR γ 1 and activation with retinoid X receptor agonists and antagonists. *Journal of Biological Chemistry*. 272:8071-8076.

Munir, I., Yen, HW., Baruth, T., Tarkowski, R., Azziz, R., Magoffin, DA., Jakimiuk, AJ. 2005. Resistin stimulation of 17 α -hydroxylase activity in ovarian theca cells in vitro: relevance to polycystic ovary syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 90:4852-4857.

Nagatani, S., Guthikonda, P., Thompson, RC., Tsukamura, H., Maeda, KI., et Foster, 1998. Evidence for GnRH regulation by leptin: leptin administration prevents reduced pulsatile LH secretion during fasting. *Neuroendocrinology*. 67:370-376.

Nakajima, I., Muroya, S., et Chikuni, K. 2003. Growth arrest by octanoate is required for porcine preadipocyte differentiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 309:702-708.

Nakamura, MT., Cheon, Y., Li, Y., et Nara, TY. 2004. Mechanisms of regulation of gene expression by fatty acids. *Lipids*. 39:1077-1083.

Nakano, Y., Tobe, T., Choi-Miura, NH., Mazda, T., et Tomita, M. 1996. Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma. *Journal of Biochemistry (Tokyo)*. 120:803-812.

Nakayama, M., Manabe, N., Inoue, N., Matsui, T., et Miyamoto, H. 2003. Changes in the expression of tumor necrosis factor (TNF) alpha, TNFalpha receptor (TNFR) 2, and TNFR-associated factor 2 in granulosa cells during atresia in pig ovaries. *Biology of Reproduction*. 68:530-535.

Narasimhan, ML., Coca, MA., Jin, J., Yamauchi, T., Ito, Y., Kadowaki, T., Kim, KK., Pardo, JM., Damsz, B., Hasegawa, PM., Yun, DJ., et Bressan, RA. 2005. Osmotin is a homolog of mammalian adiponectin and controls apoptosis in yeast through a homolog of mammalian adiponectin receptor. *Molecular Cell*. 17:171-180.

Niswender, GD., Juengel, JL., McGuire, WJ., Belfiore, CJ., et Wiltbank, MC. 1994. Luteal function: the estrous cycle and early pregnancy. *Biology of Reproduction*. 50:239-247.

Norman, RJ., et Clark, AM. 1998. Obesity and reproductive disorders: a review. *Reproduction, Fertility, and Development*. 10:55-63.

Ntambi, JM., et Kim, YC. 2000. Adipocyte differentiation and Gene Expression. *Journal of Nutrition*. 130:3122S-3126S.

Oberkofler, H., Dallinger, G., Liu, YM., Hell, E., Krempler, F., et Patsch, W. 1997. Uncoupling protein gene: quantification of expression levels in adipose tissues of obese and non-obese humans. *Journal of Lipid Research*. 38:2125-2133.

Ogura, K., Irahara, M., Kiyokawa, M., Tezuka, M., Matsuzaki, T., Yasui, T., Kamada, M., et Aono, T. 2001. Effects of leptin on secretion of LH and FSH from primary cultured female rat pituitary cells. *European Journal of Endocrinology*. 144:653-658.

Okamoto, Y., Arita, Y., Nishida, M., Muraguchi, M., Ouchi, N., Takahashi, M., Igura, T., Inui, Y., Kihara, S., Nakamura, T., Yamashita, S., Miyagawa, J., Funahashi, T., et Matsuzawa, Y. 2000. An adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, adheres to injured vascular walls. *Hormonal Metabolic Research*. 32:47-50.

Ostlund, RE., Yang, JW., Klein, S., et Gingerich, R. 1996. Relation between plasma leptin concentration and body fat, gender, diet, age, and metabolic covariates. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 81:3909-3913.

Pagano, C., Calcagno, A., Giacomelli, L., Poletti, A., Macchi, V., Vettor, R., De Caro, R., et Federspil, G. 2004. Molecular and morphometric description of adipose tissue during weight changes: a quantitative tool for assessment of tissue texture. *International Journal of Molecular Medicine*. 14:897-902.

Page, ST., Herbst, KL., Amory, JK., Coviello, AD., Anawalt, BD., Matsumoto, AM., Bremner, WJ. 2005. Testosterone administration suppresses adiponectin levels in men.

Asian Journal of Andrology. 26:85-92.

Papaioannou, VE., et Ebert, KM. 1988. The preimplantation pig embryo: cell number and allocation to trophectoderm and inner cell mass of the blastocyst in vivo and in vitro. *Development*. 102:793–803.

Pennica, D., Nedwin, GE., Hayflick, JS., Seeburg, PH., Derynck, R., Palladino, MA., Kohr, WJ., Aggarwal, BB., et Goeddel, DV. 1984. Human tumor necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature*. 312:724-727.

Perry, JS. 1960. The incidence of embryonic mortality as a characteristic of the individual sow. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1:71-83.

Pittenger, MF., Mackay, AM., Beck, SC., Jaiswal, RK., Douglas, R., Mosca, JD., Moorman, MA., Simonetti, DW., Craig, S., et Marshak, DR. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284:143-147.

Pond, CM. 1999. Physiological specialisation of adipose tissue. *Progress in Lipids Research*. 38:225-248.

Poissonnet, CM., Burdi, AR., et Bookstein, FL. 1983. Growth and development of human adipose tissue during early gestation. *Early Human Development*. 8:1-11.

Pope, WF. 1988. Uterine asynchrony: a cause of embryonic loss. *Biology of Reproduction* 39:999-1003.

Pope, WF. 1994. *Embryonic mortality in swine*. Dans: *Embryonic Mortality in Domestic Species*. Éditeurs Geisert, RD., et Zavy, MT. CRC Press, Boca Raton, FL.. pp 53–78.

Prather, RS. 1993. Nuclear control of early embryonic development in domestic pigs. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*. 48:17-29.

Prins, JB., Niesler, CU., Winterford, CM., Bright, NA., Siddle, K., Orahilly, S., Walker, NI., et Cameron, DP. 1997. Tumor necrosis factor- α induces apoptosis of human adipose cells. *Diabetes* 46:1939–1944.

Pusateri, AE., Rothschild, MF., Warner, CM., et Ford, SP. 1990. Changes in morphology, cell number, cell size and cellular estrogen content or individual littermate pig conceptus at days 9 to 12 of gestation. *Journal of Animal Science*. 68:3727-3735.

Qi, Y., Takahashi, N., Hileman, SM., Patel, HR., Berg, AH., Pajvani, UB., Scherer, PE., et Ahima, RS. 2004. Adiponectin acts in the brain to decrease body weight. *Nature Medicine* 10: 524–529.

Qian, H., Barb, CR., Compton, MM., Hausman, GJ., Azain, MJ., Kraeling, RR., et Baile, CA. 1999. Leptin mRNA expression and serum leptin concentrations as

influenced by age, weight, and estradiol in pigs. *Domestic Animal Endocrinology*. 16:135-143

Qin, M., Zeng, Z., Zheng, J., Shah, PK., Schwartz, SM., Adams, LD., et Sharifi, BG. 2003. Suppression subtractive hybridization identifies distinctive expression markers for coronary and internal mammary arteries Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. 23:425-433.

Ramsay, TG., Yan, X., et Morrison, C. 1998. The obesity gene in swine: sequence and expression of porcine leptin. *Journal of Animal Science*. 76:484-490.

Ranscht, B., et Dours-Zimmermann, MT. 1991. T-cadherin, a novel cadherin cell adhesion molecule in the nervous system lacks the conserved cytoplasmic region. *Neuron*. 7:391-402.

Ricote, M., Li, AC., Willson, TM., Kelly, CJ., et Glass, CK. 1998. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature*. 391:79-82.

Rivera, RM., Youngs, CR., et Ford., SP. 1996. A comparison of the number of inner cell mass and trophectoderm cells of preimplantation Meishan and Yorkshire pig embryos at similar developmental stages. *Journal of Reproduction and Fertility*. 106:111-116.

Roberts, RM., et Bazer, FW. 1988. The functions of uterine secretions. *Journal of Reproduction and Fertility*. 82:875-892.

Roberts, RM., Xie, S., et Trout, WE. 1993. Embryo-uterine interactions in pigs during week 2 of pregnancy. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement* 48:171-186.

Robyr, D., Wolffe, AP., et Wahli, W. 2000. Nuclear hormone receptor coregulator in action: Diversity for shared tasks. *Molecular Endocrinology* 14:329-347.

Roehe, R., Plastow, GS., et Knap, PW. 2003. Quantitative and molecular genetic determination of protein and fat deposition. *Homo*. 54:119-131.

Rosen, ED., et Spiegelman, BM. 2000. Molecular regulation of adipogenesis. *Annual Review in Cell Biology*. 16:145-171.

Rosen, ED., Walkey, CJ., Puigserver, P., et Spiegelman, BM. 2000. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes and Development*. 14:1293-1307.

Rosen, ED., Hsu, CH., Wang, H., Sakai, S., Freeman, MW., Gonzalez, FJ., et Spiegelman, BM. 2001. C/EBP alpha induces adipogenesis through PPAR-gamma: a unified pathway. *Genes and Development*. 16:22-26.

Rothschild, M., Jacobson, C., Vaske, D., Tuggle, C., Wang, L., Short, T., Eckardt, G., Sasaki, S., Vincent, A., McLaren, D., Southwood, O., van der Steen, H., Mileham, A., Plastow, G. 1996. The estrogen receptor locus is associated with a major gene influencing litter size in pigs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 93:201-205.

Rothschild, MF., et Bidanel, JP. 1998. *Biology and genetics of reproduction*. In *The genetics of the pigs*. Éditeurs M. F. Rothschild et A. Ruvinsky. CAB International. New York, N.Y. pp. 313-343.

Rothwell, NJ., et Stock, MJ. 1985. Biological distribution and significance of brown adipose tissue. *Comparative and Biochemistry and Physiology. Part. A.* 4:745-751.

Rothwell, NJ., et Stock, MJ. 1986. Whither brown fat? *Bioscience Reports.* 6:3-18.

Ruiz-Cortes, ZT., Men, T., Palin, MF., Downey, BR., Lacroix, DA., et Murphy, BD. 2000. Porcine leptin receptor: molecular structure and expression in the ovary. *Molecular Reproduction and Development.* 56:465-474.

Ruiz-Cortes, ZT., Martel-Kennes, Y., Gevry, NY., Downey, BR., Palin, MF., et Murphy, BD. 2003. Biphasic effects of leptin in porcine granulosa cells. *Biology of Reproduction.* 68:789-796.

Ryden, M., Arvidsson, E., Blomqvist, L., Perbeck, L., Dicker, A., et Arner, P. 2004. Targets for TNF- α induced lipolysis in human adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communication.* 318:168-175.

Saito, K., Tobe, T., Minoshima, S., Asakawa, S., Sumiya, J., Yoda, M., Nakano, Y., Shimizu, N., et Tomita, M. 1999. Organization of the gene for gelatin-binding protein (GBP28). *Gene.* 229:67-73.

Saltiel, AR., et Kahn, CR. 2001. Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature.* 414:799-806.

Sato, R., Yang, J., Wang, X., Evans, MJ., Ho, YK., Goldstein, JL., et Brown, MS. 1994. Assignment of the membrane attachment, DNA binding, and transcriptional activation domains of sterol regulatory element-binding protein-1 (SREBP-1). *Journal of Biological Chemistry.* 269:17267-17273.

Schaiff, WT., Bildirici, I., Cheong, M., Chern, PL., Nelson, DM., et Sadovsky, Y. 2005. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and retinoid X receptor signaling regulate fatty acid uptake by primary human placental trophoblasts. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* 90:4267-4275.

- Scherer, PE., Williams, S., Fogliano, M., Baldini, G., et Lodish, HF. 1995. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *Journal of Biological Chemistry*. 270:26746-26749.
- Schmidt, A., Endo, N., Rutledge, SJ., Vogel, R., Shinar, D., et Rodan, GA. 1992. Identification of a new member of the steroid hormone receptor superfamily that is activated by peroxisome proliferator and fatty acids. *Molecular Endocrinology*. 6:1634-1641.
- Schneider, JE. 2004. Energy balance and reproduction. *Physiology & Behavior*. 81:289-317.
- Schule, R., Umesono, K., Mangelsdorf, DJ., Bolado, J., Pike, JW., et Evans, RM. 1990. Jun-Fos and receptors for vitamins A and D recognize a common response element in the human osteocalcin gene. *Cell*. 61:497-504.
- Sen A., Lea-Currie, YR., Sujkowsak, D., Franklin, DM., Wilkison, WO., Halvorsen, YD., et Gimble, JM. 2001. Adipogenic potential of human adipose derived stromal cells from multiple donors is heterogeneous. *Journal of Cellular Biochemistry*. 81:312-319.
- Sfeir, Z., Ibrahimi, A., Amri, EZ., Grimaldi, P., et Abumrad, N. 1999. CD36 antisense expression in 3T3-F442A preadipocytes. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 192:3-8.
- Seimandi, M., Lemaire, G., Pillon, A., Perrin, A., Carlvann, I., Voegel, JJ., Vignon, F., Nicolas, JC., et Balaguer, P. 2005. Differential responses of PPARalpha, PPARdelta, and PPARgamma reporter cell lines to selective PPAR synthetic ligands. *Analytical Biochemistry*. 344:8-15.
- Shapiro, L., et Scherer, PE. 1998. The crystal structure of a complement-1q family protein suggests an evolutionary link to tumor necrosis factor. *Currents Biology*. 8:335-338.
- Shea-Eaton, WK., Trinidad, MJ., Lopez, D., Nackley, A., et McLean, MP. 2001. Sterol regulatory element binding protein-1a regulation of the steroidogenic acute regulatory protein gene. *Endocrinology*. 42:1525-1533.
- Shen, WJ., Sridhar, K., Bernlohr, DA., et Kraemer, FB. 1999. Interaction of rat hormone-sensitive lipase with adipocyte lipid-binding protein. *Proceeding of the National Academy of Science U.S.A.* 96:5528-5532.
- Shepherd, PR., Gibbs, EM., Wesslau, C., Gould, GW., et Kahn, BB. 1992. Human small intestine facilitative fructose/glucose transporter (GLUT5) is also present in insulin-responsive tissues and brain. Investigation of biochemical characteristics and translocation. *Diabetes*. 41:1360-1365.

- Shimomura, I., Shimano, H., Horton, JD., Goldstein, JL., et Brown, MS. 1997. Differential expression of exons 1a and 1c in mRNAs for sterol regulatory element binding protein-1 in human and mouse organs and cultured cells. *Journal of Clinical Investigation*. 99:838-845.
- Shimomura, I., Bashmakov, Y., Ikemoto, S., Horton, JD., Brown, MS., et Goldstein, JL. 1999. Insulin selectively increases SREBP-1c mRNA in the livers of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 96:13656-13661.
- Shimomura, I., Matsuda, M., Hammer, RE., Bashmakov, Y., Brown, MS., Goldstein, JL. 2000. Decreased IRS-2 and increased SREBP-1c lead to mixed insulin resistance and sensitivity in livers of lipodystrophic and ob/ob mice. *Molecular Cell*. 6:77-86.
- Shrago, E., Spennetta, T., et Gordon, E. 1969. Fatty acid synthesis in human adipose tissue. *Journal of Biological Chemistry*. 244:2761-2766.
- Smas, CM., et Sul, HS. 1993. Pref-1, a protein containing EGF-like repeats, inhibits adipocyte differentiation. *Cell*. 73:725-734.
- Soede, NM., Helmond, FA., et Kemp, B. 1994. Perioovulatory profiles of oestradiol, LH and progesterone in relation to oestrus and embryo mortality in multiparous sows using transrectal ultrasonography to detect ovulation. *Journal of Reproduction and Fertility*. 101:633-641.
- Soede, NM., Wetzels, CC., Zondag, W., Hazeleger, W., et Kemp, B. 1995. Effects of a second insemination after ovulation on fertilization rate and accessory sperm count in sows. *Journal of Reproduction and Fertility*. 105:135-140.
- Spiegelman, BM. et Farmer, SR. 1982. Decreases in tubulin and actin gene expression prior to morphological differentiation of 3T3 adipocytes. *Cell*. 29:53-60.
- Spiegelman, BM., Frank, M., et Green, H. 1983. Molecular cloning of mRNA from 3T3 adipocytes. Regulation of mRNA content for glycerophosphate dehydrogenase and other differentiation dependent proteins during adipocytes differentiation. *Journal of Biological Chemistry*. 258:10083-10089.
- Spiegelman, BM., Choy, L., Hotamisligil, GS., Graves, RA., et Tontonoz, P. 1993. Regulation of adipocyte gene expression in differentiation and syndromes of obesity/diabetes. *Journal of Biological Chemistry*. 268:6823-6826.
- Stefan, N., Bunt, JC., Salbe, AD., Funahashi, T., Matsuzawa, Y., et Tataranni, PA. 2002. Plasma adiponectin concentrations in children: relationships with obesity and insulinemia. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 87:4652-4656.

- Stocco, DM., et Clark, BJ. 1996. Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells. *Endocrine Reviews*. 17:221–244.
- Stroband, HW., Taverne, N., Langenfeld, K., et Barends, PM. 1986. The ultrastructure of the uterine epithelium of the pig during the estrous cycle and early pregnancy. *Cell and Tissue Research*. 246:81-89.
- Stroband, HW., et Van der Lende, T. 1990. Embryonic and uterine development during early pregnancy in pigs. *Journal of Reproduction and Fertility*. Supplement. 40:261-277.
- Sugawara, T., Holt, JA., Driscoll, D., Strauss, JF., Lin, D., Miller, WL., Patterson, D., Clancy, KP., Hart, I M., Clark, BJ., et Stocco, DM. 1995. Human steroidogenic acute regulatory protein: functional activity in COS-1 cells, tissue-specific expression, and mapping of the structural gene to 8p11.2 and a pseudogene to chromosome 13. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 92:4778-4782.
- Sundvold, H., Grindflek, E., et Lien, S. 2001. Tissue distribution of porcine peroxisome proliferator-activated receptor alpha: detection of an alternatively spliced mRNA. *Gene*. 273:105-113.
- Tan, GD., Debard, C., Funahashi, T., Humphreys, SM., Matsuzawa, Y., Frayn, KN., Karpe, F., et Vidal, H.. 2005. Changes in adiponectin receptor expression in muscle and adipose tissue of type 2 diabetic patients during rosiglitazone therapy. *Diabetologia*. 48:1585-1589.
- Town, SC., Patterson, JL., Pereira, CZ., Gourley, G., et Foxcroft, GR. 2005. Embryonic and fetal development in a commercial dam-line genotype. *Animal Reproduction Science*. 85:301-316.
- Thompson, JN., Howell, JM., et Pitt, GA. 1964. Vitamin A and reproduction in rats. *Proceedings of the Royal Society of London*. 159:510-535.
- Trout, WE., Hall, JA., Stallings-Mann, ML., Galvin, JM., Anthony, RV., et Roberts, RM. 1992. Steroid regulation of the synthesis and secretion of retinol-binding protein by the uterus of the pig. *Endocrinology*. 130:2557–2564.
- Xie, S., Broermann, DM., Nephew, KP., Geisert, RD., et Pope, WF. 1990. Ovulation and early embryogenesis in swine. *Biology of Reproduction*. 43 :236-240.
- Xu, A., Chan, KW., Hoo, RL., Wang, Y., Tan, KC., Zhang, J., Chen, B., Lam, MC., Tse, C., Cooper, GJ., Lam, KS. 2005a. Testosterone selectively reduces the high molecular weight form of adiponectin by inhibiting its secretion from adipocytes. *Journal of Biological Chemistry* 280:18073-18080.

- Tan, NS., Michalik, L., Desvergne, B., et Wahli, W. 2005a. Multiple expression control mechanisms of peroxisome proliferator-activated receptors and their target genes. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 93:99-105.
- Tan, NS., Michalik, L., Desvergne, B., et Wahli, W. 2005b. Genetic- or transforming growth factor-beta 1-induced changes in epidermal peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta expression dictate wound repair kinetics. *Journal of Biological Chemistry*. 280:18163-18170.
- Teboul, L., Febbraio, M., Gaillard, D., Amri, EZ., Silverstein, R., et Grimaldi, PA. 2001. Structural and functional characterization of the mouse fatty acid translocase promoter: activation during adipose differentiation. *Biochemical Journal*. 360:305-312.
- Thoennes, SR., Tate, PL., Price, TM., et Kilgore, MW. 2000. Differential transcriptional activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma by omega-3 and omega-6 fatty acids in MCF-7 cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* 160:67-73.
- Tontonoz, P., Kim, JB., Graves, RA., et Spiegelman, BM. 1993. ADD1: a novel helix-loop-helix transcription factor associated with adipocyte determination and differentiation. *Molecular and Cellular Biology*. 13:4753-4759.
- Town, SC., Patterson, JL., Pereira, CZ., Gourley, G., et Foxcroft, GR. 2005. Embryonic and fetal development in a commercial dam-line genotype. *Animal Reproductive Science*. 85:301-316.
- Trayhurn, P. 1989a. Brown adipose tissue and nutritional energetics-where are we now? *Proceedings of the Nutrition Society*. 48:165-175.
- Trayhurn, P. Temple, NJ. et Van Aerde J. 1989b. Evidence from immunoblotting studies on uncoupling protein that brown adipose tissue is not present in the domestic pig. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 67:1480-1485.
- Trayhurn, P., et Beattie, JH. 2001. Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proceedings of the Nutrition Society*. 60:329-339.
- Tsao, TS., Tomas, E., Murrey, HE., Hug, C., Lee, DH., Ruderman, NB., Heuser, JE., et Lodish, HF. 2003. Role of disulfide bonds in Acrp30/adiponectin structure and signalling specificity. Different oligomers activate different signal transduction pathways. *Journal of Biological Chemistry*. 278:50810-5080.
- Vallee, M., Beaudry, D., Roberge, C., Matte, JJ., Blouin, R., et Palin, MF. 2003. Isolation of differentially expressed genes in conceptuses and endometrial tissue of sows in early gestation. *Biology of Reproduction*. 69:1697-1706.

Vallet, JL., Christenson, RK., Trout, WE., et Klemcke, HG. 1998. Conceptus, progesterone, and breed effects on uterine protein secretion in swine. *Journal of Animal Science*. 76:2657-2670.

Van der Vusse, GJ., Bilsen, M., Glatz, JFC., Hasselbaink, DM., et Luiken, JJFP. 2002. Critical steps in cellular fatty acid uptake and utilization. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 239:9-15.

Veerkamp, JH., Van kuppevelt, THMSM., Maatman, RGHJ., et Prinsen, CFM. 1993. Structural and functional aspects of cytosolic fatty acid binding proteins. *Prostaglandins, Leukotriens and Essentials Fatty Acids*. 49:887-906.

Vonnahme, KA., Wilson, ME., et Ford, SP. 2001. Relationship between placental vascular endothelial growth factor expression and placental/endometrial vascularity in the pig. *Biology of Reproduction*. 64:1821-1825.

Wakil, SJ. 1989. Fatty acid synthase, a proficient multifunctional enzyme. *Biochemistry* 28:4523-4530.

Wang, YX., Lee, CH., Tiep, S., Yu, RT., Ham, J., Kang, H., et Evans, RM. 2003. Peroxisome-proliferator activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell*. 113:159-170.

Ward, NL et Dumont, DJ. 2002. The angiopoietins and Tie2/Tek: adding to the complexity of cardiovascular development. *Seminars in Cell Development Biology*. 13:19-27.

Waki, H., Yamauchi, T., Kamon, J., Ito, Y., Uchida, S., Kita, S., Hara, K., Hada, Y., Vasseur, F., Froguel, P., Kimura, S., Nagai, R., et Kadowaki, T. 2003. Impaired multimerization of human adiponectin mutants associated with diabetes. Molecular structure and multimer formation of adiponectin. *Journal of Biological Chemistry*. 278:40352-40363.

Watt, MJ., Steinberg, GR., Chan, S., Garnham, A., Kemp, BE., et Febbraio, MA. 2004. Beta-adrenergic stimulation of skeletal muscle HSL can be overridden by AMPK signaling. *FASEB Journal*. 18:1445-1446.

Weatherman, RW., Fletterick, RJ., et Scanlan, S. 1999. Nuclear-receptor ligands and ligand-binding domains. *Annual Review of Biochemistry*. 68:559-581.

Werman, A., Hollenberg, A., Solanes, G., Bjorbaek, C., Vidal-Puig, AJ., et Flier, JS. 1997. Ligand-independent activation domain in the N terminus of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma). Differential activity of PPARgamma1 and -2 isoforms and influence of insulin. *Journal of Biological Chemistry*. 272:20230-20235.

- Wiesner, G., Morash, BA., Ur, E., et Wilkinson, M. 2004. Food restriction regulates adipose-specific cytokines in pituitary gland but not in hypothalamus. *Journal of Endocrinology*. 180:1-6.
- Willis, HJ., Zak, LJ., et Foxcroft, GR. 2003. Duration of lactation, endocrine and metabolic state, and fertility of primiparous sows. *Journal of Animal Science*. 81:2088-2102..
- Wilmut, I., Ritchie, WA., Haley, CS., Ashworth, CJ., et Aitken., RP. 1992. A comparison of rate and uniformity of embryo development in Meishan and European white pigs. *Journal of Reproduction and Fertility*. 95:45-56.
- Wilson, ME., et Ford, SP. 1997. Differences in trophoctoderm mitotic rate and P450 17a-hydroxylase expression between late preimplantation Meishan and Yorkshire conceptus. *Biology of Reproduction* 56:380-385.
- Wilson, ME., Biensen, NJ., Youngs, CR., et Ford., SP. 1998. Development of Meishan and Yorkshire littermate conceptuses in either a Meishan or Yorkshire uterine environment to day 90 of gestation and to term. *Biology of Reproduction*. 58:905-910.
- Wooding, FB. 1992. Current topic :the synepitheliochorial placenta of ruminants : binucleate cell fusions and hormone production. *Placenta*. 13:101-113.
- Wright, GL., Huang, BS., Johnson, PJ., et McCumbee, WD. 1988. Hypertensive factor: calcium stimulatory activity obtained from different tissues and animal species. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 66:1278-1281.
- Wu, Z., Bucher, NL., et Farmer, SR. 1996. Induction of peroxisome proliferator-activated receptor gamma during the conversion of 3T3 fibroblast into adipocytes is mediated by C/EBP β and C/EBP δ , and glucocorticoids. *Molecular and Cellular Biology*. 16:4128-4136.
- Wu, Z., Xie, Y., Morrison, RF., Bucher, NLR., et Farmer, SR. 1998. PPAR gamma induces the insulin-dependent glucose transporter GLUT4 in the absence of C/EBP alpha during the conversion of 3T3 fibroblast into adipocytes. *Journal of Clinical Investigation*. 101:22-32.
- Wulster-Radcliffe, MC., Ajuwon, KM., Wang, J., Christian, JA., et Spurlock, ME. 2004. Adiponectin differentially regulates cytokines in porcine macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 316: 924-929.
- Xu, J., Cho, H., O'Malley, S., Park, JH., Clarke, SD. 2002. Dietary polyunsaturated fats regulate rat liver sterol regulatory element binding proteins-1 and -2 in three distinct stages and by different mechanisms. *Journal of Nutrition* 132:3333-3339.

Xu, X., Faillace, LS., Harding, RT., Foxcroft, GR., Hunter, MG.1998. Evidence that Meishan and large-white hybrid preovulatory follicles may differentially affect oocyte in vitro maturation and fertilization. *Animal Reproduction Science*. 51:307-319.

Yamakawa, K., Hosoi, M., Koyama, H., Tanaka, S., Fukumoto, S., Morii, H., et Nishizawa, Y. 2000. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists increase vascular endothelial growth factor expression in human vascular smooth muscle cells. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 271:571-574.

Yamauchi, T., Kamon, J., Waki, H., Terauchi, Y., Kubota, N., Hara, K., Mori, Y., Ide, T., Murakami, K., Tsuboyama-Kasaoka, N., Ezaki, O., Akanuma, Y., Gavrilova, O., Vinson, C., Reitman, ML., Kagechika, H., Shudo, K., Yoda, M., Nakano, Y., Tobe, K., Nagai, R., Kimura, S., Tomita, M., Froguel, P., et Kadowaki, T. 2001. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipotrophy and obesity. *Nature Medecine*. 7: 941–946.

Yamauchi, T., Kamon, J., Minokoshi, Y., Ito, Y., Waki, H., Uchida, S., Yamashita, S., Noda, M., Kita, S., Ueki, K., Eto, K., Akanuma, Y., Froguel, P., Foufelle, F., Ferre, P., Carling, D., Kimura, S., Nagai, R., Kahn, BB., et Kadowaki, T. 2002. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature Medecine*. 8:1288-1295.

Yamauchi, T., Kamon, J., Ito, Y., Tsuchida, A., Yokomizo, T., Kita, S., Sugiyama, T., Miyagishi, M., Hara, K., Tsunoda, M., Murakami, K., Ohteki, T., Uchida, S., Takekawa, S., Waki, H., Tsuno, NH., Shibata, Y., Terauchi, Y., Froguel, P., Tobe, K., Koyasu, S., Taira, K., Kitamura, T., Shimizu, T., Nagai, R., et Kadowaki, T. 2003. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature*. 423: 762–769.

Yoda-Murakami, M., Taniguchi, M., Takahashi, K., Kawamata, S., Saito, K., Choi-Miura, NH., Tomita, M., 2001. Change in expression of GBP28/adiponectin in carbon tetrachloride-administrated mouse liver. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 285: 372-377.

Yoon, JC. Chickering, TW. Rosen, ED. Dussault, B. Qin, Y. Soukas, A. Friedman, JM. Holmes, WE. Et Spiegelman, BM. 2000. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma target gene encoding a novel angiopoietin-related protein associated with adipose differentiation. *Molecular and Cellular Biology*. 20:5343-5349.

Youngs, CR., Ford, SP., McGinnis, LK., et Anderson, LH. 1993. Investigations into the control of litter size in swine: I. Comparative studies on in vitro development of Meishan and Yorkshire preimplantation embryos. *Journal of Animal Science*. 71:1561-1565.

Yoshida, K., Shimizugawa, T., Ono, M., et Furukawa, H.2002. Angiopoietin-like protein 4 is a potent hyperlipidemia-inducing factor in mice and inhibitor of lipoprotein lipase. *Journal of Lipids Research*. 43:1770-1772.

Yu, Z., Gordon, JR., Kendall, J., et Thacker, PA. 1998. Elevation in tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) messenger RNA levels in the uterus of pregnant gilts after oestrogen treatment. *Animal Reproduction Science*. 50:57-67.

Ziecik, AJ. 2002. Old, new and newest concepts of inhibition of luteolysis during early pregnancy in pig. *Domestic Animal Endocrinology*. 23:265-275.

Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., et Friedman, JM. 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 372:425-432.

Zhang, L., Lan, GE., Parimoo, S., Stenn, K., et Prouty, SM. 1999. Human stearoyl-CoA desaturase: alternative transcripts generated from a single gene by usage of tandem polyadenylation sites. *Biochemical Journal*. 340:255-264.

Zhou, J., Wilson, KM., et Medh, JD. 2002. Genetic analysis of four novel PPAR Gamma splice variants in monkey macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 293:274-283.

Zorzano, A., Wilkinson, W., Kotliar, N., Thoidis, G., Wadzinski, BE., Ruoho, AE., et Pilch, PF. 1989. Insulin-regulated glucose uptake in rat adipocytes is mediated by two transporter isoforms present in at least two vesicle populations. *Journal of Biological Chemistry*. 264:12358-12363.

ACCORD ET PERMISSION DES COAUTEURS D'UN ARTICLE¹

IDENTIFICATION DE L'ÉTUDIANT

Nom de l'étudiant Etienne Lord		
Sigle du programme M.Sc.	Titre du programme Sciences vétérinaires	Option Reproduction

DESCRIPTION DE L'ARTICLE

Auteurs E. Lord, S. Ledoux, B. D. Murphy, D. Beaudry, and M. F. Palin	
Titre Expression of adiponectin, and its receptors in swine	
Revue Journal of Animal Science	Date de publication Accepté, 8 déc. 2004

DÉCLARATION DES COAUTEURS

Déclaration <i>A titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, j'autorise le microfilmage du mémoire et je suis d'accord que (nom de l'étudiant) inclut cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre (titre du mémoire).</i>		
Coauteur Sandra Ledoux		Date 5/Jan/2005
Coauteur Bruce D. Murphy		Date 25/01/05
Coauteur Danièle Beaudry		Date 10/01/05
Coauteur Marie-France Palin		Date 10/01/2005

Envoyé à la FÉS le <i>29 dec. 2005</i>
--

¹Annexe II du Guide de présentation et d'évaluation des mémoires de maîtrise et des thèses de doctorat, mars 2001

ACCORD ET PERMISSION DES COAUTEURS D'UN ARTICLE

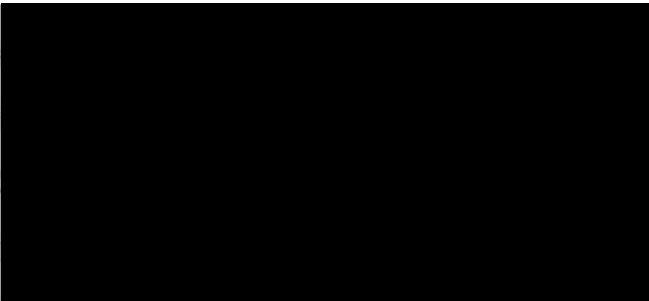
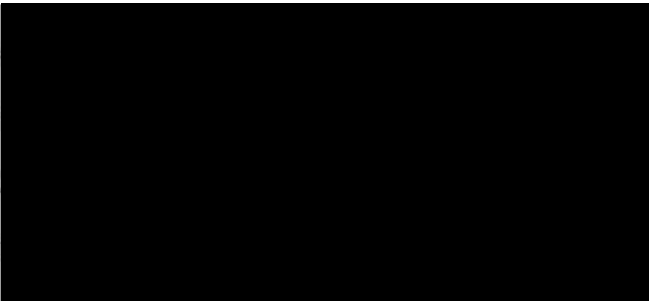
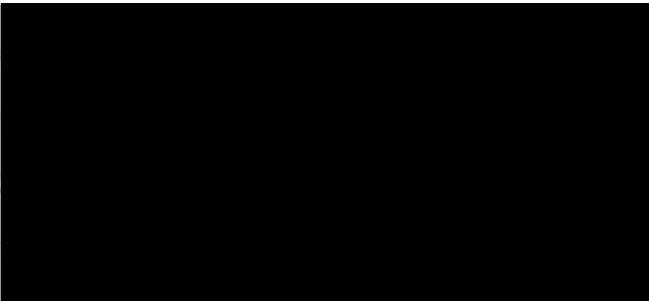
IDENTIFICATION DE L'ETUDIANT

Nom de l'étudiant Etienne Lord		
Sigle du programme M.Sc.	Titre du programme Sciences vétérinaires	Option Reproduction

DESCRIPTION DE L'ARTICLE

Auteurs Etienne Lord, Bruce D. Murphy, Sandra Ledoux, Danièle Beaudry and Marie-France Palin	
Titre Modulation of peroxisome proliferator-activated receptor delta and gamma transcripts in swine endometrial tissue during early gestation.	
Revue Reproduction (REP 657) – Article soumis	Date de publication Soumis 2005

DECLARATION DES COAUTEURS

Déclaration <i>À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, j'autorise le microfilmage du mémoire et je suis d'accord que (nom de l'étudiant) inclut cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre (titre du mémoire).</i>		
Coauteur MARIE-FRANCE PALIN		Date 21-12-2005
Coauteur DANIELE BEAUDRY		Date 21-12-2005
Coauteur BRUCE D. MURPHY		Date 22-12-2005
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date

EDITOR PERMISSION FOR A JOURNAL OR A BOOK

STUDENT IDENTIFICATION

Student name Etienne Lord		
Program title Veterinary Science	Option Reproduction	Grade M. Sc.

ARTICLE DESCRIPTION

Authors Etienne Lord, Sandra Ledoux, Bruce D. Murphy, Daniele Beaudry, and Marie-France Palin.		
Title Expression of adiponectin, and its receptors in swine		
Journal Journal of Animal Science	Pages 83(3):565-578	Date 2005

JOURNAL IDENTIFICATION

Complete journal name Journal of Animal Science (American Society of Animal Science)	
Address 1111 N. Dunlap Ave., Savoy, IL 61874, USA	Date 15 Dec. 2005

EDITOR DECLARATION

Editor Susan Pollock FASS, Director of Editorial and Production	
Declaration <i>As Director, I agree to the microfilming of Etienne Lord master thesis which includes this article. The thesis will be entitled: "Identification of key genes implicated in back fat deposition and in control of reproduction traits in pig."</i>	
Editor Managing Editor of J. of Anim. Sci.	Date 15 Dec. 2005

Date: Wed, 21 Dec 2005 14:03:40 -0000

De: [REDACTED]
[REDACTED]

Objet: Copyright Request

Dear Mr Lord,

"Modulation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Delta and Gamma transcripts in swine endometrial tissue during early gestation" Reproduction 657 2005

Authors: Lord,E., Murphy, BD., Beaudry,D., Martin,JJ., Palin,MF.

With reference to your request to reproduce the above paper from Reproduction in your master thesis, permission is granted subject to the following conditions:

1. Copyright for the material must be held by the Society for Reproduction and Fertility (SRF). If SRF does not hold copyright there will be an acknowledgement line by the material. In this case, you must obtain separate permission from the copyright owners.
2. The agreement of the authors must be obtained by you.
3. An acknowledgement should appear contiguous to the reproduced material, and should include the bibliographic details of the original publication (e.g. author(s), year, journal title, volume, page) together with "© Society for Reproduction and Fertility (year). Reproduced by permission".

As this article is still undergoing review and has not yet been accepted by Reproduction for publication, it must be stated that the article has, at present, only been submitted to Reproduction.

Yours sincerely

Sarah Gundry
Peer Review Administrator
Society for Endocrinology
& BioScientifica Ltd
Tel: (+44) (0) 1454 642220
Fax:(+44) (0) 1454 642222
[REDACTED]

ONLINE JOURNALS via
www.endocrinology.org & www.bioscientifica.com

SUBMIT YOUR ARTICLE ONLINE at
<http://www.endocrinology.org/sfe/online.htm>

Society for Endocrinology (limited by guarantee)
Reg. in England No. 349408 Reg. Charity No. 266813

BioScientifica Ltd
Reg. in England no.3190519

SOCIETY FOR ENDOCRINOLOGY
22 APEX COURT
WOODLANDS
BRADLEY STOKE