

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

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**

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

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

IDENTIFICATION DE GÈNES IMPLIQUÉS DANS LE DÉVELOPPEMENT DU TISSU  
ADIPEUX ET CARACTÉRISATION DE PON3 ET DE SON IMPACT SUR DIVERS  
PARAMÈTRES DE PRODUCTION CHEZ LE PORC

par

BENOÎT LABRECQUE

Département de biomédecine vétérinaire

Faculté de médecine vétérinaire

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures et post doctorales

en vue de l'obtention du grade

Philosophiae Doctor (Ph.D.)

en sciences vétérinaires

option reproduction

Décembre 2008

©Benoît Labrecque, 2008

SF

607

USY

2009

V003

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée

IDENTIFICATION DE GÈNES IMPLIQUÉS DANS LE DÉVELOPPEMENT DU TISSU  
ADIPEUX ET CARACTÉRISATION DE PON3 ET DE SON IMPACT SUR DIVERS  
PARAMÈTRES DE PRODUCTION CHEZ LE PORC

présentée par

BENOÎT LABREQUE

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Alan K. Goff, président-rapporteur

Bruce D. Murphy, directeur de recherche

Marie-France Palin, codirecteur

Christopher Price, membre du jury

Yves Deshaies, examinateur externe

Mario Jacques, représentant du doyen de la FÉSP



## Résumé

Le tissu adipeux n'est plus seulement considéré comme un site d'emmagasinage de l'énergie sous forme de triglycérides mais plutôt comme un organe endocrinien de premier ordre. Celui-ci peut en effet sécréter diverses hormones et protéines participant à la régulation de différents processus métaboliques et physiologiques. Les schémas de sélection des dernières années ont contribué à réduire considérablement l'adiposité des carcasses de porc. Le tissu adipeux étant le siège d'une activité métabolique intense, cette pression de sélection pourrait avoir un impact sur la synthèse et la sécrétion de différents facteurs métaboliques. Une meilleure connaissance du transcriptome du tissu adipeux porcine nous permettrait de mieux caractériser ces facteurs et d'identifier les voies métaboliques impliquées dans le développement du tissu adipeux. Parmi l'ensemble des gènes exprimés dans le tissu adipeux lors de l'adipogenèse et/ou de la lipogenèse, nous croyons que certains gènes peuvent non seulement participer à la régulation de la masse adipeuse mais peuvent aussi influencer directement ou indirectement certains caractères de production chez le porc. Le premier objectif de cette étude est d'identifier les gènes activés au cours du développement du tissu adipeux en utilisant un modèle *in vivo* d'adipogenèse/lipogenèse chez le porc. Ce modèle *in vivo* nous permettra de caractériser le transcriptome des cellules adipeuses porcines de même que d'autres cellules (macrophages, cellules endothéliales, etc.) présentes dans le tissu adipeux. Le second objectif est de cloner et caractériser un nouveau gène (Paraoxonase 3 (PON3)), préalablement identifié à l'objectif 1. D'étudier son profil d'expression dans le tissu adipeux de différentes races porcines présentant des phénotypes extrêmes de croissance et de quantité de tissu adipeux et, enfin, d'identifier la présence de polymorphismes dans ce gène et vérifier si certains variants sont associés à différents caractères de production chez le porc.

**Mots clés :** porc, tissu adipeux, adipogenèse, lipogenèse, expression génique, SSH, PON3, polymorphisme.

## Summary

Adipose tissue is no longer considered to be only a place to store energy in the form of triglycerides, but rather a key endocrine organ. This organ can, in fact, secrete various hormones and proteins that contribute to the regulation of different metabolic and physiological processes. The selection pressure of the past few years have contributed to the significant reduction of adiposity in pig carcasses. Since adipose tissue is the centre of intense metabolic activity, this pressure could have an impact on the synthesis and secretion of different metabolic factors. A better knowledge of the transcriptome and proteome of porcine adipose tissue would allow us to better characterize these factors and identify the metabolic pathways involved in the development of this tissue. Among the set of genes expressed in adipose tissue during adipogenesis and/or lipogenesis, we believe that certain genes can contribute not only to the regulation of body fat, but can also directly or indirectly influence certain production traits in pigs. The study's main objective is to examine and identify the genes activated during the development of adipose tissue by using an *in vivo* adipogenesis/lipogenesis model in pigs. This *in vivo* model will enable us to characterize the transcriptome of porcine adipocytes, as well as other cells (macrophage, endothelial cells, etc...) found in adipose tissue. The second objective is to clone and characterize a new gene (Paraoxonase 3 (PON3)), previously identified in the first objective; to study the gene's expression profile in the adipose tissue of various porcine breeds in which extreme growth and fat tissue quantity phenotypes can be found, and; to identify the presence of polymorphisms in this gene and to verify if certain variants are associated with different production traits in pigs.

**Keywords:** pig, adipose tissue, adipogenesis, lipogenesis, gene expression, SSH, PON3, polymorphism.

## Table des matières

|  |           |
|--|-----------|
| Résumé .....   | iii       |
| Summary .....  | iv        |
| Liste des tableaux .....   | xi        |
| Liste des figures .....  | xiii      |
| Liste des abréviations.....  | xv        |
| Remerciements .....  | xviii     |
| <b>Section 1 – Introduction.....</b>   | <b>19</b> |
| 1.1. La production porcine au Canada et au Québec .....  | 19        |
| 1.2. Le porc : un modèle animal de choix pour la recherche sur le tissu adipeux et les complications associées à l'obésité chez l'humain. .... | 20        |
| 1.3. Le projet de recherche.....   | 21        |
| <b>Section 2 - Recension de la littérature.....</b>  | <b>22</b> |
| 2.1. Le tissu adipeux.....   | 22        |
| 2.1.1. La physiologie du tissu adipeux chez le porc.....   | 22        |
| 2.1.1.1. <i>La physiologie du tissu adipeux en développement chez le porc.....</i>   | <i>22</i> |
| 2.1.1.2. <i>La physiologie des adipocytes en développement chez le porc .....</i>  | <i>23</i> |
| 2.1.2. Spécialisation du tissu adipeux .....   | 23        |
| 2.1.2.1. <i>Spécialisation du tissu adipeux : tissu adipeux blanc .....</i>  | <i>23</i> |
| 2.1.2.1.1. <i>Spécialisation du tissu adipeux : le tissu adipeux blanc chez le porc</i>  | <i>26</i> |
| 2.1.2.2. <i>Spécialisation du tissu adipeux : tissu adipeux brun.....</i>  | <i>26</i> |

|   |    |
|---|----|
| 2.1.3. Répartition des dépôts adipeux chez le porc .....  | 27 |
| 2.1.3.1. <i>Spécificités raciales des dépôts adipeux chez le porc</i> .....                     | 28 |
| 2.2. L'adipogenèse et le développement du tissu adipeux .....                                   | 28 |
| 2.2.1. Les principaux modèles expérimentaux de l'adipogenèse .....                              | 28 |
| 2.2.2. Les étapes de l'adipogenèse.....   | 29 |
| 2.2.2.1 <i>Arrêt de la prolifération cellulaire des préadipocytes chez le porc</i> .....        | 32 |
| 2.2.2.2. <i>Changements structuraux de la matrice extracellulaire et du cytosquelette</i> ..... | 32 |
| 2.2.2.3. <i>La différenciation terminale</i> .....  | 33 |
| 2.2.3. Les adipokines .....   | 33 |
| 2.2.4. Les facteurs de transcription initiateurs de l'adipogenèse.....                          | 34 |
| 2.2.4.1. <i>C/EBPs</i> .....  | 34 |
| 2.2.4.1.1. <i>C/EBPs chez le porc</i> .....   | 35 |
| 2.2.4.2. <i>PPARs</i> .....   | 35 |
| 2.2.4.2.1. <i>PPAR<math>\alpha</math></i> .....   | 37 |
| 2.2.4.2.1.1. <i>PPAR<math>\alpha</math> chez le porc</i> .....                                  | 37 |
| 2.2.4.2.2. <i>PPAR<math>\delta</math></i> .....   | 37 |
| 2.2.4.2.3. <i>PPAR<math>\gamma</math></i> .....   | 38 |
| 2.2.4.2.3.1. <i>PPAR<math>\gamma</math> chez le porc</i> .....                                  | 39 |
| 2.2.5. Le développement du tissu adipeux chez le porc .....                                     | 39 |
| 2.2.6 Régulation de l'adipogenèse et du développement du tissu adipeux.....                     | 42 |



|          |   |    |
|----------|---|----|
| 2.2.6.1  | <i>Régulation de l'adipogenèse par les autres types cellulaires</i> .....   | 42 |
| 2.2.6.2  | <i>Les facteurs anti-adipogéniques et pro-adipogéniques</i> .....   | 43 |
| 2.3.     | <b>Le métabolisme des lipides</b> .....   | 45 |
| 2.3.1.   | <b>La lipogenèse à partir de la voie du glucose</b> .....   | 45 |
| 2.3.2.   | <b>La lipogenèse par translocation des acides gras</b> .....  | 48 |
| 2.3.2.1. | <i>La lipogenèse par translocation des acides gras : CD36</i> .....   | 48 |
| 2.3.2.2. | <i>La lipogenèse par translocation des acides gras : FABP</i> .....   | 49 |
| 2.3.3.   | <b>Modification des acides gras pour la synthèse du triacylglycérol</b> .....                                     | 49 |
| 2.3.3.1. | <i>La désaturation et l'élongation des acides gras : SCD1 et ELOVL6</i> .....                                     | 50 |
| 2.3.4.   | <b>La synthèse de triacylglycérol</b> .....   | 53 |
| 2.3.5.   | <b>L'accumulation du triacylglycérol</b> .....  | 55 |
| 2.3.6.   | <b>La lipolyse</b> .....  | 55 |
| 2.4.     | <b>Les principales études transcriptomiques et protéomiques effectuées sur le tissu adipeux blanc</b> .....       | 56 |
| 2.4.1.   | <b>Principales études concernant les adipocytes et le tissu adipeux chez les espèces autres que le porc</b> ..... | 57 |
| 2.4.2.   | <b>Les études transcriptomiques et protéomiques sur le tissu adipeux porcin</b>                                   | 57 |
| 2.4.3.   | <b>Les études transcriptomiques : les techniques</b> .....  | 59 |
| 2.4.3.1  | <i>Hybridation soustractive suppressive (Suppression subtractive hybridization : SSH)</i> .....                   | 60 |
| 2.4.3.2  | <i>Micropuces</i> .....   | 63 |
| 2.5.     | <b>La paraoxonase 3, un facteur impliqué dans l'adipogenèse?</b> .....  | 64 |
| 2.5.1.   | <b>PON3 : l'enzyme</b> .....  | 64 |
| 2.5.2.   | <b>PON3 et le tissu adipeux</b> .....   | 65 |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Section 3 - Objectifs et hypothèses</b> .....  | <b>67</b> |
| <b>3.1. Problématique</b> .....   | <b>67</b> |
| <b>3.2. Hypothèse</b> .....   | <b>67</b> |
| <b>3.3. Objectifs</b> .....   | <b>68</b> |
| <b>Section 4 - Articles rédigés</b> .....   | <b>69</b> |
| <b>4.1. Article 1</b> .....   | <b>69</b> |
| <b>Abstract</b> .....   | <b>71</b> |
| <b>1. Introduction</b> .....  | <b>72</b> |
| <b>2. Material and methods</b> .....  | <b>73</b> |
| <b>2.1. Animals and tissue collection</b> .....   | <b>73</b> |
| <b>2.2. RNA extraction, complementary DNA synthesis and semiquantitative reverse transcription-polymerase chain reactions</b> ..... | <b>74</b> |
| <b>2.3. Suppression subtractive hybridization</b> .....   | <b>75</b> |
| <b>2.4. Differential Screening</b> .....  | <b>75</b> |
| <b>2.5. DNA sequencing and analysis</b> .....   | <b>76</b> |
| <b>2.6. Validation of SSH Clones Using Quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reactions</b> .....                      | <b>77</b> |
| <b>2.7. Tissue distribution of selected SSH clones</b> .....  | <b>78</b> |
| <b>2.8. Statistical analysis</b> .....  | <b>79</b> |
| <b>3. Results</b> .....   | <b>79</b> |
| <b>3.1. Characterization of adipose tissue samples</b> .....  | <b>79</b> |
| <b>3.2. Identification of differentially expressed genes</b> .....  | <b>79</b> |
| <b>3.3. Gene ontology term analysis</b> .....   | <b>80</b> |

|  |            |
|--|------------|
| 3.4. <i>Biological pathways linked to the development of adipose tissues</i> .....                 | 81         |
| 3.5. <i>Validation of the SSH technique</i> .....  | 81         |
| 3.6. <i>Tissue distribution of selected SSH clones</i> .....                                       | 81         |
| <b>4. Discussion</b> .....   | <b>82</b>  |
| 4.1. <i>Abundantly represented genes in the SSH library</i> .....                                  | 84         |
| 4.2. <i>Gene ontology (GO) analysis</i> .....  | 85         |
| 4.3. <i>Biological pathways identified</i> .....   | 86         |
| 4.4. <i>Conclusions</i> .....  | 89         |
| <b>Acknowledgements</b> .....  | <b>89</b>  |
| <b>Figures and legends</b> .....   | <b>90</b>  |
| <b>References</b> .....  | <b>104</b> |
| <b>4.2. Article 2</b> .....  | <b>112</b> |
| Abstract.....  | 113        |
| 1. Introduction.....   | 114        |
| 2. Materials and methods .....   | 115        |
| 2.1. <i>Animals and tissue collection</i> .....  | 115        |
| 2.2. <i>RNA extraction and complementary DNA synthesis</i> .....                                   | 116        |
| 2.3. <i>Cloning and sequencing of porcine PON3 variants</i> .....                                  | 117        |
| 2.4. <i>Tissue distribution of porcine PON3 mRNA</i> .....   | 118        |
| 2.5. <i>Quantitative measurements of porcine paraoxonase 3 transcript in adipose tissues</i> ..... | 119        |
| 2.6. <i>Recombinant porcine paraoxonase 3 production</i> .....                                     | 120        |
| 2.7. <i>Western blot analysis of porcine PON3 protein</i> .....                                    | 121        |

|  |            |
|--|------------|
| 2.8. <i>Polymorphism detection and genotyping</i> .....                            | 122        |
| 2.9. <i>Statistics</i> .....   | 123        |
| <b>3. Results and Discussion</b> .....   | <b>124</b> |
| 3.1. <i>Characterization of PON3 variants</i> .....                                | 124        |
| 3.2. <i>Recombinant PON3 production</i> .....                                      | 126        |
| 3.3. <i>Tissue distribution of porcine PON3 transcripts and protein</i> .....      | 127        |
| 3.4. <i>Expression of paraoxonase 3 mRNA in adipose tissues</i> .....              | 128        |
| 3.5. <i>Porcine PON3 polymorphism identification</i> .....                         | 129        |
| 3.6. <i>Allele frequencies of PON3 polymorphisms and association studies</i> ..... | 130        |
| <i>Conclusion</i> .....  | 131        |
| <b>Acknowledgements</b> .....  | <b>132</b> |
| <b>Figures and legends</b> .....   | <b>133</b> |
| <b>References</b> .....  | <b>147</b> |
| <b>Section 5 - Discussion générale et conclusion</b> .....                         | <b>155</b> |
| <b>Bibliographie</b> .....   | <b>160</b> |

## Liste des tableaux

### Recension de la littérature

**Tableau I.** Principaux facteurs produits par le tissu adipeux chez les mammifères.....25

**Tableau II.** Facteurs anti-adipogéniques et pro-adipogéniques vérifiés chez le porc.....44

### Article 1

**Table 1.** Reverse transcription polymerase chain reaction primer sequences and conditions used for the characterization of subcutaneous adipose tissue.....91

**Table 2.** Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction primer sequences and conditions used for the validation of differentially expressed cDNA.....92

**Table 3.** Reverse transcription polymerase chain reaction primer sequences and conditions used for the tissue distribution of selected SSH clones.....93

**Table 4.** Genes preferentially expressed in subcutaneous adipose tissue of day 90 pregnant sow.....94

**Table 5.** Distribution of over-represented Gene Ontology categories of 91 identified genes according to their biological process and molecular function functional annotations of DAVID databases.....98

**Table 6.** Distribution of overrepresented genes in KEGG PATHWAY. *Homo sapiens* pathways with more than 3 genes are presented .....99

**Table 7.** Relative mRNA abundance of randomly selected SSH clones measured in subcutaneous adipose tissues of day 90 gestating sows and their fetuses.....100

### Article 2

**Table 1.** Primer sequences and optimal PCR conditions used for PCR amplifications of PON3, PPIA and GAPDH transcripts .....135

**Table 2.** Exon-intron boundaries of the porcine paraoxonase 3 gene .....136

**Table 3.** Correlation coefficients between paraoxonase 3 mRNA relative abundance and carcass and metabolic parameters.....137

**Table 4.** Identification of DNA polymorphisms in the porcine paraoxonase 3 gene.....138

**Table 5.** Allele frequencies of DNA polymorphisms within the porcine paraoxonase 3 gene in purebred and crossbred sows.....139

**Table 6.** Association of paraoxonase 3 genotypes with production traits in the Landrace population.....140

## Liste des figures

### Recension de la littérature

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Figure 1.</b> Principales étapes de l'adipogenèse .....  | <b>31</b> |
| <b>Figure 2.</b> Représentation du mécanisme transcriptionnel des PPARs .....   | <b>36</b> |
| <b>Figure 3.</b> Adipogenèse chez le porc .....   | <b>41</b> |
| <b>Figure 4.</b> Cycle de l'acide citrique pour la synthèse des acides gras chez la souris .....                              | <b>47</b> |
| <b>Figure 5.</b> Voie métabolique de la conversion du palmitate en acides gras monoinsaturés dans les hépatocytes de rat..... | <b>52</b> |
| <b>Figure 6.</b> Voie de la biosynthèse du triacylglycérol dans l'adipocyte .....   | <b>54</b> |
| <b>Figure 7.</b> Hybridation soustractive suppressive (SSH) .....   | <b>62</b> |

### Article 1

|   |            |
|---|------------|
| <b>Figure 1.</b> Preliminary verification by RT-PCR amplification confirming the presence of preadipocytes and fully differentiated adipocytes in fetal and maternal adipose tissue respectively..... | <b>101</b> |
| <b>Figure 2.</b> Estimation of the SSH subtraction efficiency .....   | <b>102</b> |
| <b>Figure 3.</b> Tissue distribution of seven selected SSH clones using semiquantitative RT-PCR .....   | <b>103</b> |

### Article 2

|  |            |
|--|------------|
| <b>Figure 1.</b> Schematic representation of porcine paraoxonase 3 variants .....                  | <b>141</b> |
| <b>Figure 2.</b> Deduced amino acid sequence of the porcine paraoxonase 3 protein .....            | <b>142</b> |
| <b>Figure 3.</b> Alignment of deduced amino acid sequences of porcine paraoxonase 3 variants ..... | <b>143</b> |
| <b>Figure 4.</b> Purification of recombinant porcine paraoxonase 3 protein .....                   | <b>144</b> |
| <b>Figure 5.</b> Tissue distribution of paraoxonase 3 transcript and protein .....                 | <b>145</b> |

**Figure 6.** Relative abundance of paraoxonase 3 mRNA in subcutaneous (A) and perirenal (B) adipose tissues from different breeds .....146



## Liste des abréviations

|                |  |
|----------------|--|
| A.a.           | acide aminé  |
| ACBP           | « Acyl-CoA binding protein » ou DBI                                      |
| ACS            | Acyl-CoA synthétase  |
| ADIPOQ         | Adiponectine   |
| ADN            | acide désoxyribonucléique  |
| ADNc           | acide désoxyribonucléique complémentaire                                 |
| ADRP           | « Adipose differentiation-related protein »                              |
| AGT            | Angiotensinogène   |
| ATGL           | « Adipose triglyceride lipase »  |
| ARN            | acide ribonucléique  |
| ARNm           | ARN messenger  |
| ATP            | Adénosine tri-phosphate  |
| CAV1           | « Caveolin 1 »   |
| C/EBP          | « CCAAT/enhancer-binding protein »                                       |
| C/EBP $\alpha$ | « CCAAT/enhancer-binding protein alpha » (protéine)                      |
| C/EBP $\beta$  | « CCAAT/enhancer-binding protein beta » (protéine)                       |
| C/EBP $\delta$ | « CCAAT/enhancer-binding protein delta » (protéine)                      |
| CEPBA          | « CCAAT/enhancer-binding protein alpha »                                 |
| CEBPB          | « CCAAT/enhancer-binding protein beta »                                  |
| CEPBD          | « CCAAT/enhancer-binding protein delta »                                 |
| CD36           | Molécule CD36 ou « fatty acid translocase »                              |
| DBI            | « Diazepam binding inhibitor » ou ACBP                                   |
| DDRT-PCR       | « Differential display reverse transcription polymerase chain reaction » |
| DGAT           | Diacylglycérol acyltransférase   |

|               |   |
|---------------|---|
| ELOVL6        | « Elongation of long chain fatty acid, member 6 »               |
| EST           | « Expressed sequence tag »                                      |
| FABP3         | « Fatty acid protein binding 3 »                                |
| FABP4         | « Fatty acid protein binding 4 »                                |
| g             | gramme  |
| GHR           | « Growth hormone receptor »                                     |
| GLUT4         | « Glucose transporter 4 »                                       |
| HDL           | « High density lipoprotein »                                    |
| HSD11B1       | 11- $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase type 1              |
| HSL           | « Hormone-sensitive lipase »                                    |
| kDa           | kilodalton  |
| kJ            | Kilojoule   |
| LDL           | « Low density protein »   |
| LEP           | Leptine   |
| LPL           | Lipoprotéine lipase   |
| MEC           | Matrice extracellulaire   |
| MMD           | « Monocyte to macrophage differentiation associated »           |
| MYOC          | « Myocilin »  |
| PCR           | Réaction de polymérisation en chaîne                            |
| PLIN          | Pénilipine  |
| PON3          | Paraoxonase 3   |
| PPAR          | « Peroxisome proliferator-activated receptor »                  |
| PPAR $\alpha$ | « Peroxisome proliferator-activated receptor alpha » (protéine) |
| PPARA         | « Peroxisome proliferator-activated receptor alpha »            |
| PPAR $\delta$ | « Peroxisome proliferator-activated receptor delta » (protéine) |
| PPARD         | « Peroxisome proliferator-activated receptor delta »            |

|               |   |
|---------------|---|
| PPAR $\gamma$ | « Peroxisome proliferator-activated receptor gamma » (protéine) |
| PPARG         | « Peroxisome proliferator-activated receptor gamma »            |
| PPRE          | « PPAR response element »                                       |
| RACE          | Amplification rapide des extrémités de l'ADNc                   |
| RT-PCR        | Réaction de polymérisation en chaîne par transcription inverse  |
| RXR $\alpha$  | « Retinoid X receptor alpha » (protéine)                        |
| RXRA          | « Retinoid X receptor alpha »                                   |
| SCD1          | Stéaroyl-CoA désaturase 1                                       |
| SREBF         | « Sterol regulatory element binding transcription factor »      |
| SSH           | Hybridation soustractive suppressive                            |
| TABl          | Tissu adipeux blanc   |
| TABr          | Tissu adipeux brun  |
| UCP1          | « Uncoupling protein 1 »  |
| VLDL          | « Very low density protein »                                    |

## Remerciements

Je tiens à souligner le support inconditionnel de ma directrice de recherche, Dr Marie-France Palin et de son assistante Danièle Beaudry tout au long de mes études. Je remercie également mon directeur de recherche, Dr Bruce Murphy, le Fat Club et le Centre de recherche en reproduction animale (CRRRA) pour l'ensemble des connaissances scientifiques qu'ils m'ont inculquées.

Je remercie tous les membres du laboratoire 211 présents et passés avec une mention spéciale pour les personnes qui ont participé à mon projet de recherche de près ou de loin dont Étienne Lord, Olivier Mathieu, Marian Mayhue, Andrée-Anne Houde, Catherine Hallé et Karine Brochu-Gaudreau. Je tiens à remercier aussi nos voisins de laboratoire, l'indispensable statisticien Steve Méthot, les membres du laboratoire 215 de Dr Nathalie Bissonnette, notre bibliothécaire Diane Roy, ainsi que tous les gens que j'ai rencontrés au Centre de recherche Agriculture et Agroalimentaire Canada de Sherbrooke.

Merci également à l'équipe du Dr Murphy dont plus spécifiquement Mira Dobias-Goff, Joëlle Desmarais et Pavine Lefevre sans oublier Micheline Sicotte pour les nombreux échanges sur divers aspect de mes études.

Finalement, j'aimerais conclure sur des mentions spéciales adressées à Isabelle Guillemette, Caroline Roy, Stephen Hutchison, Guy Page, mes parents et grands-parents, en particulier Jean-Marie Auger et Gilberte Labrecque qui nous ont quittés au cours de mes études doctorales, pour les moments privilégiés qu'ils m'ont accordés et l'incroyable confiance qu'ils me témoignent.

## **Section 1 – Introduction**

### **1.1. La production porcine au Canada et au Québec**

La production porcine génère des retombées économiques annuelles de l'ordre de 1.9 milliard de dollars et environ 28,000 emplois directs et indirects, ce qui en fait la deuxième plus importante production animale au Québec, juste derrière la production laitière (MAPAQ (Ministère de l'Agriculture, 2005). En production porcine, les schémas de sélection génétique des dernières années ont contribué à réduire considérablement les coûts de production, les principaux objectifs étant d'augmenter la taille de la portée, d'accélérer la croissance et de diminuer l'épaisseur de gras dorsal (van Wijk et al., 2005; Nelson et al., 1990). Les producteurs de porcs du Québec étant payés principalement selon le rendement en maigre de leurs carcasses, la sélection effectuée au cours des dernières années a surtout été dirigée vers l'obtention d'animaux de plus en plus maigres. Ainsi, de 1980 à 2007, l'épaisseur de gras dorsal des porcs de race pure a été réduite de près de 50% (Centre Canadien pour l'Amélioration des Porcs (CCAP), 2008). Cette pression de sélection a entraîné des changements concomitants sur le métabolisme et le système endocrinien du porc (Te Pas et al., 2001). De plus, des problèmes de reproduction sont maintenant observés (Chen et al., 2003; Gaughan et al., 1995) ainsi qu'un taux de réforme des truies de plus en plus élevé (Serenius et al., 2006). Bien que les consommateurs préfèrent une viande maigre, laquelle est perçue plus favorable pour leur santé (Ngapo et al., 2004; Grunert, 2002), ceux-ci sont de plus en plus nombreux à affirmer que la qualité de la viande de porc s'est dégradée au cours des dernières années (Schwab et al., 2006; Suzuki et al., 2005). Plusieurs chercheurs ont déterminé un niveau de gras dorsal minimal à atteindre pour subvenir à divers besoins métaboliques du porc (Dourmad et al., 2001; Tarres et al., 2006). Ceci amène plusieurs chercheurs à croire en la nécessité de ramener le niveau de gras dorsal à un seuil minimal acceptable par la sélection génétique. Ils affirment également qu'une gestion adéquate des réserves adipeuses, et par conséquent des produits sécrétés par le tissu adipeux (ex. adipokines), nous permettrait d'améliorer la productivité tout en diminuant les taux de réforme et en augmentant la qualité de la viande (Martel-Kennes et Roy, 2004; Palin, 2006).

## **1.2. Le porc : un modèle animal de choix pour la recherche sur le tissu adipeux et les complications associées à l'obésité chez l'humain.**

Comme modèle animal, le porc et les rongeurs partagent plusieurs avantages. Par exemple, il est relativement facile de contrôler leur régime alimentaire. De plus, pour ces deux espèces, nous avons accès à des animaux clonés, transgéniques ou d'une même portée (Brambilla et Cantafora, 2004; Lunney, 2007). Le modèle porcin est cependant considéré comme un meilleur modèle animal pour l'humain, puisqu'il présente de nombreuses similarités avec ce dernier. Ainsi, le porc est un omnivore (Bergen et Mersmann, 2005) dont le système cardiovasculaire et la proportion de plusieurs organes sont comparables à ceux des humains (Spurlock et Gabler, 2008). De plus, le porc présente un métabolisme du cholestérol (Nafikov et Beitz, 2007), de même qu'une distribution et une composition des lipoprotéines plasmatiques (Terpstra et al., 1982), similaires à l'humain. Tout comme l'humain, il y a absence de tissu adipeux brun à la naissance (Spurlock et Gabler, 2008). Enfin, une plus grande homologie de séquences, observée entre les gènes porcins et humains, de même que les structures chromosomiques très similaires ont permis de confirmer que le porc est un modèle animal beaucoup plus approprié que la souris (Humphray et al., 2007; Lunney, 2007). Le porc est aussi considéré comme un modèle animal de choix pour l'étude du syndrome métabolique chez l'humain, car il peut développer des symptômes similaires (Brambilla et Cantafora, 2004; Lunney, 2007). De plus, il est bien connu que le porc peut aussi développer l'athérosclérose, comme chez l'humain (Moghadasian, 2002; Jiang et Rothschild, 2007). Collectivement, ces travaux démontrent que la recherche en santé humaine tirerait de grands avantages à utiliser le porc comme modèle animal. Ce dernier serait également très utile pour la recherche sur les mécanismes moléculaires modulant le métabolisme des lipides et le développement du tissu adipeux.

### 1.3. Le projet de recherche

La présente étude avait pour premier objectif d'identifier, à l'aide de la technique d'hybridation soustractive suppressive (SSH), les gènes activés au cours du développement du tissu adipeux en utilisant un modèle *in vivo* d'adipogénèse/lipogénèse chez le porc. Ainsi, nous avons pu identifier les gènes différentiellement exprimés dans le tissu adipeux sous-cutané d'une truie gestante (tissu riche en adipocytes) et de ses propres foetus (tissu riche en préadipocytes).

Le second objectif était de choisir un gène parmi la liste des gènes activés (identifiés à l'objectif 1) et de démontrer son rôle possible dans le développement du tissu adipeux chez le porc. Le gène choisi étant la paraoxonase 3 (PON3), son ARNm a tout d'abord été cloné et séquencé. Les niveaux d'expression du transcrite de PON3 dans le tissu adipeux ont ensuite été étudiés chez des races porcines présentant des phénotypes extrêmes de croissance et de quantité de tissu adipeux. Enfin, des polymorphismes d'ADN ont été identifiés dans ce gène et une étude d'association a été effectuée afin de vérifier si certains variants sont associés à différents caractères de production chez le porc.

Cette étude permettra de mieux cibler les gènes et les voies métaboliques impliquées dans le développement du tissu adipeux chez le porc. Cette connaissance pourra éventuellement aider les sélectionneurs et les producteurs à mieux contrôler l'adiposité chez cette espèce dans le but d'optimiser les caractères de croissance, de reproduction et de la qualité de la viande. Une meilleure caractérisation des facteurs impliqués dans le développement du tissu adipeux porcin pourrait également aider à mieux comprendre les mécanismes impliqués dans le développement du tissu adipeux chez l'humain.

## **Section 2 - Recension de la littérature**

### **2.1. Le tissu adipeux**

L'adipocyte ainsi que plusieurs autres types cellulaires contiennent des lipides estérifiés. Cependant, l'adipocyte se distingue par son répertoire de facteurs sécrétés et par sa capacité d'emmagasiner une grande quantité de lipides qu'il peut relâcher rapidement selon le besoin des autres organes (Rosen et Macdougald, 2006). Pour l'ensemble des mammifères, le tissu adipeux n'est plus seulement considéré comme un site d'emmagasinage de l'énergie sous forme de triglycérides mais plutôt comme un organe endocrinien de premier ordre. Ce dernier peut en effet sécréter diverses hormones, cytokines et protéines participant à la régulation de divers processus métaboliques et physiologiques (Rosen et Spiegelman, 2006; Trayhurn, 2005).

#### **2.1.1. La physiologie du tissu adipeux chez le porc**

Le tissu adipeux du porc en croissance contient plusieurs types cellulaires. Bien sûr, on retrouve les adipocytes représentant entre 30 et 60% des cellules du tissu adipeux (Ailhaud et al., 1992). On retrouve aussi des préadipocytes, des cellules endothéliales, immunitaires, et fibroblastiques (Hutley et al., 2001). Les types cellulaires autres que les adipocytes représentent également une importante source de facteurs sécrétés, lesquels peuvent aussi contribuer à la régulation du développement du tissu adipeux (Hausman et al., 2006; Hutley et al., 2001).

##### ***2.1.1.1. La physiologie du tissu adipeux en développement chez le porc***

Le tissu adipeux sous-cutané est le dépôt le mieux caractérisé chez le porc. Il se situe entre la couche dermique inférieure et les couches de cellules musculaires (Montagna et Yun, 1964). Une barrière de tissus conjonctifs sépare le tissu adipeux en deux couches (Mersmann et al., 1975). Au cours du développement du tissu adipeux, la couche située près de la peau contient des vaisseaux sanguins de tailles variées, alors que la couche interne est peu vascularisée, à l'exception des grands vaisseaux sanguins l'irriguant par le dessous (Hausman et Kauffman, 1986a). À l'intérieur du tissu adipeux, les adipocytes sont regroupés sous forme de lobules séparés par du tissu conjonctif. Ces lobules sont



étroitement liés aux capillaires qui leur sont adjacents. Le nombre et la taille de ces regroupements augmentent au cours du développement du tissu. Les premiers regroupements se situent près de l'interface muscle-gras sous-cutané, alors que les derniers créés se situent près de la peau (Hausman et Kauffman, 1986a).

### ***2.1.1.2. La physiologie des adipocytes en développement chez le porc***

À la naissance, les porcelets ont très peu de tissu adipeux et les adipocytes sont multiloculaires, c'est-à-dire qu'ils contiennent une multitude de petites gouttelettes lipidiques. Trois jours après la mise bas, la plupart des adipocytes atteignent l'état uniloculaire, soit une seule goutte lipidique qui occupe presque tout l'espace cytoplasmique. Le noyau se retrouve alors en périphérie en raison de la limite d'espace dans le cytoplasme (Mersmann et al., 1975; Hausman et Kauffman, 1986a). La taille de cette goutte ainsi que la taille de l'adipocyte augmentent avec l'âge de l'animal (Mersmann et al., 1975).

### **2.1.2. Spécialisation du tissu adipeux**

La plupart des mammifères possèdent deux types de tissus adipeux distincts : le tissu adipeux blanc (TABl) et brun (TABr).

#### ***2.1.2.1. Spécialisation du tissu adipeux : tissu adipeux blanc***

Chez les mammifères, le TABl se caractérise par ses adipocytes uniloculaires (Hansen et Kristiansen, 2006). Il est hautement spécialisé dans l'entreposage d'énergie sous forme de triacylglycérol. Le contenu en triglycérides atteint tout près de 95% du volume cellulaire d'un adipocyte (Janke et al., 2001). Cette réserve énergétique offre un substrat de grande valeur calorique, soit 39.1 kJ/g comparé à 15.4 à 17.5 kJ/g pour les glucides, (Trayhurn, 2005). Les adipocytes synthétisent et accumulent les triglycérides durant les périodes d'abondance nutritionnelle et mobilisent les réserves lipidiques lors des périodes de jeûne où le glucose est limité (Rosen et Spiegelman, 2006). Le processus permettant à l'adipocyte

d'accumuler les lipides sous forme de triglycérides se nomme la lipogenèse, alors que la mobilisation des triglycérides se nomme la lipolyse. Les avancées scientifiques des dernières décennies ont démontré que le TABI est aussi un organe endocrinien à part entière contribuant à la régulation de processus métaboliques et physiologiques (Trayhurn, 2005). Outre les acides gras, le tissu adipeux peut synthétiser et relâcher des peptides, des protéines et des prostanoïdes, alors que le cholestérol et le rétinol n'y sont pas synthétisés mais plutôt entreposés avant leur relâche (Trayhurn et Wood, 2004). De plus, la conversion de certaines hormones stéroïdiennes a lieu dans ce tissu dont le cortisol grâce à la présence d'enzymes tels que la 11- $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase de type 1 (HSD11B1) (Monder et White, 1993). Les facteurs sécrétés par le tissu adipeux sont impliqués dans le maintien de la balance énergétique et le contrôle de l'utilisation des substrats nécessaires à la production de l'énergie en réponse aux variations physiologiques et métaboliques (Kokta et al., 2004). Une liste des principaux facteurs produits par le TABI a été dressée dans le Tableau I.

**Tableau I** Principaux facteurs produits par le tissu adipeux chez les mammifères

| <b>Protéines sécrétées</b>                                  | <b>Récepteurs</b>  | <b>Enzymes et transporteurs</b>                                 |
|---|--|---|
|   | <i>Peptide, glycoprotéine</i>                                  | <i>Métabolisme des lipides</i>                                  |
| Leptine (LEP)   |  |   |
| Adiponectine (ADIPOQ)                                       | Récepteur de l'insuline (INSR)                                 | Lipoprotéine lipase (LPL)                                       |
| Résistine (RETN)  | Récepteur du Glucagon (GCGR)                                   | Apolipoprotéine E (APOE)  |
| Facteur nécrosant des tumeurs alpha (TNF)                   | Récepteur de l'hormone stimulant la thyroïde, bêta (TSHR)      | Protéine de transfert de l'ester de cholestérol (CETP)          |
| Interleukine-6 (IL6)  | Récepteur de l'hormone de croissance (GHR)                     | Protéine de liaison des acides gras des adipocytes 4 (FABP4)    |
| Facteur D du complément (CFD)                               | Récepteur de l'angiotensine II (AGTR)                          | Récepteur CD36 (CD36)   |
| Protéine stimulant l'acylation (ASP)                        | Récepteur de la cholécystokinine (CCKBR)                       |   |
| Angiotensinogène (AGT)                                      | Récepteur de l'adiponectine (ADIPOR)                           | <i>Métabolisme des stéroïdes</i>                                |
| Angiopoïétine-like 4 (ANGPTL4)                              |  |   |
| Inhibiteur peptidase serpine, clade E, membre 1 (SERPINE1)  | <i>Cytokine</i>  | Cytochrome P450 famille 19 sous-famille A, membre 1 (CYP19A1)   |
| Facteur de coagulation III (F3)                             |  | 11- $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase de type 1 (HSD11B1) |
| Chémokine motif C-C ligand 2 (CCL2)                         | Récepteurs du facteur nécrosant des tumeurs alpha (TNFR)       | 17- $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase type 1 (HSD17B1)    |
| Facteur de croissance transformant $\beta$ , type 1 (TGFB1) | Récepteur de l'interleukine-6 (IL6R)                           |   |
| Nicotinamide phosphoribosyl transférase (NAMPT)             | Récepteur de la leptine (LEPR)                                 | <i>Métabolisme du glucose</i>                                   |
| Inhibiteur peptidase serpine clade A, membre 12 (SERPINA12) |  |   |
| Protéine de liaison au rétinol 4 (RBP4)                     | <i>Nucléaire</i>   | Récepteur de l'insuline substrat 1 et 2 (IRS1 et IRS2)          |
| Protéine Agouti (ASIP)                                      | Récepteur activé par la prolifération des peroxyosomes (PPARG) | Phosphatidylinositol 3-kinase (PIK3CD)                          |
|   | Récepteurs aux glucocorticoïdes                                | Protéine kinase B (AKT1)  |
|   | Récepteur de l'hormone stimulant la thyroïde, bêta (TSHR)      | Transporteur de glucose insulino-sensible (SLC2A4)              |
|   | Récepteur de l'estrogène (ESR)                                 | Glycogène synthase kinase 3 $\alpha$ (GSK3A)                    |
|   | Récepteur de la progestérone (PGR)                             | Phosphatase homologue à la tensine (PTEN)                       |
|   | Récepteur de l'androgène (AR)                                  | <i>Autres</i>   |
|   | Récepteur de la Vitamine D (VDR)                               |   |
|   | Facteur nucléaire $\kappa$ B (NFKB)                            | Oxide nitrique synthétase inductible (NOS2A)                    |

Adapté de Ahima, 2006.

### ***2.1.2.1.1. Spécialisation du tissu adipeux : le tissu adipeux blanc chez le porc***

Le TABl porcin offre quelques particularités par rapport à la plupart des mammifères. D'abord, la synthèse des acides gras s'effectue quasi exclusivement dans le tissu adipeux, alors que le foie est souvent le site central de la lipogenèse chez plusieurs autres mammifères dont l'homme (O'Hea et Leveille, 1969; Ding et al., 1999; Gondret et al., 2001). De plus, lorsque la balance énergétique est positive, seule la lipogenèse est accélérée chez le porc alors que les ruminants augmentent la cadence de la gluconéogenèse et de la lipogenèse (Nafikov et Beitz, 2007). Enfin, la gestation est une période propice à l'étude de la lipogenèse chez le porc puisque la truie doit reconstituer adéquatement ses réserves corporelles afin de combler les besoins élevés de sa progéniture lors de la lactation (Dourmad et al., 2001).

### ***2.1.2.2. Spécialisation du tissu adipeux : tissu adipeux brun***

Le TABr se distingue du tissu adipeu blanc par ses adipocytes multiloculaires et son contenu mitochondrial élevé (Hansen et Kristiansen, 2006). Fonctionnellement, le TABr permet de dissiper l'énergie plutôt que de l'emmagasiner. Les fonctions reliées à ce tissu sont l'adaptation au froid et la protection contre l'obésité (Rosen et al., 2000). Il a été démontré que plusieurs déterminants moléculaires régulent spécifiquement la différenciation des adipocytes bruns (Hansen et Kristiansen, 2006). Par exemple, la protéine découplante du tissu adipeux brun (UCP1) est exprimée exclusivement dans le TABr (Cannon et al., 1982). Cette protéine s'insère dans la membrane interne des mitochondries et agit comme un canal à protons qui dissipe le gradient électrochimique dû au fonctionnement de la chaîne respiratoire sans permettre la synthèse d'ATP, libérant ainsi l'énergie sous forme de chaleur (Rosen et al., 2000). Ce gène est utilisé comme marqueur de la présence de TABr (Boeuf et al., 2001). Chez le porc, une structure similaire au TABr serait présente chez les porcelets âgés de 2-3 mois (Dauncey et al., 1981). Cependant, UCP1 n'ayant jamais été détecté chez cette espèce, certaines équipes avancent que le porc serait dépourvu de TABr (Trayhurn et al., 1989) et que le frissonnement musculaire serait la stratégie alternative utilisée par les porcelets pour réguler leur température corporelle

(Berthon et al., 1994). D'autres membres de la famille des UCP, soit UCP2 et UCP3, ont récemment été identifiés dans le tissu adipeux porcine (Damon et al., 2000). Ces protéines s'expriment dans les deux types de tissus adipeux (Pedersen et al., 2001). (Oliver et al., 2001) Elles participeraient, entre autres, à la régulation du métabolisme des acides gras, à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et la dépense énergétique (Vidal-Puig et al., 2000; Arsenijevic et al., 2000).

### **2.1.3. Répartition des dépôts adipeux chez le porc**

Les dépôts adipeux se retrouvent à divers endroits de l'anatomie porcine. Habituellement, on les retrouve à des sites riches en tissus conjonctifs lâches : les couches de gras sous-cutanées et les dépôts de gras se situant autour d'organes internes tels le cœur et les reins (Rosen et al., 2000). Les dépôts sont nommés selon leur localisation (périgonadal, épидидymaire, omental, rétropéritonéal, sous-cutané, périrénal, viscéral, mésentérique inguinal, cervical, intramusculaire, etc...). Ces différents dépôts adipeux présentent des aspects uniques en ce qui a trait au métabolisme des lipides et à leur activité cellulaire (Hausman et al., 2001). Ces différences peuvent également dépendre de l'espèce et de la race (Kokta et al., 2004; Kolstad et al., 1996). Certaines de ces particularités ont été répertoriées chez le porc. D'abord, une étude a démontré que le taux de prolifération des préadipocytes, la différenciation cellulaire vers un adipocyte mature, et l'accumulation de triacylglycérols diffèrent selon l'origine du dépôt adipeux chez le porc (Samulin et al., 2008b). Les niveaux d'expression de certains ARNm dépendent également du dépôt (Hishikawa et al., 2005). De plus, le tissu adipeux peut contenir des nodules lymphatiques dont le nombre varie selon la localisation du dépôt. Par exemple, le dépôt mésentérique en contient beaucoup alors qu'il y en a peu ou pas du tout à l'intérieur des dépôts sous-cutané et périrénal (Hausman et al., 2001). Les mécanismes de la spécificité fonctionnelle et morphologique des différents dépôts adipeux restent à être définis. Les dépôts sous-cutanés et périrénaux sont les principaux sites adipeux examinés dans le cadre de mon projet de recherches.

### **2.1.3.1. Spécificités raciales des dépôts adipeux chez le porc**

Entre les différentes races de porc il existe une grande variabilité en ce qui concerne la composition corporelle et la déposition du gras. Au Canada, les porcs de race Duroc et Landrace ont maintenant moins de gras sous-cutané comparés aux animaux de race Yorkshire (Centre Canadien pour l'Amélioration des Porcs (CCAP), 2008). Les truies chinoises Meishan ont, quant à elle, un haut pourcentage de gras corporel par rapport aux truies de races occidentales (White et al., 1995). Une augmentation de l'activité de prolifération des préadipocytes des truies Meishan pourrait en être la cause (Gerfault et al., 1999). Les truies Meishan ont également un taux de croissance lent et une puberté plus précoce que les truies de races occidentales (White et al., 1995; Ford, 1997).

## **2.2. L'adipogenèse et le développement du tissu adipeux**

L'adipogenèse se définit par les événements moléculaires et cellulaires caractérisant la transition d'un préadipocyte, dont la morphologie s'apparente à un fibroblaste, vers un adipocyte mature ayant la forme d'une sphère et pouvant accumuler les lipides sous forme de triglycérides (Gregoire et al., 1998). Le terme « adipogenèse » est habituellement réservé à la différenciation des adipocytes. À plus grande échelle, elle contribue au développement du tissu adipeux.

### **2.2.1. Les principaux modèles expérimentaux de l'adipogenèse**

Plusieurs approches *in vitro* ont permis de caractériser l'adipogenèse chez plusieurs espèces. La culture de cellules à partir de lignées cellulaires a donné de précieux renseignements sur les différentes étapes de l'adipogenèse. Les lignées cellulaires les plus couramment utilisées sont les 3T3-L1 et 3T3-F442A provenant d'embryons de souris. La culture primaire d'adipocytes prélevés à même le tissu adipeux de l'animal a aussi été utilisée comme modèle *in vitro*. Dans ce modèle, les cellules précurseurs des préadipocytes (cellules stromales-vasculaires) sont isolées du tissu adipeux et mises en culture, ce qui a l'avantage de mieux refléter le contexte *in vivo* que les lignées cellulaires. Les cellules

stromales-vasculaires sont diploïdes et elles peuvent être obtenues d'une variété de dépôts adipeux à différentes étapes du développement (Avram et al., 2007). Néanmoins, le choix de ce modèle apporte aussi quelques limitations tel qu'une certaine hétérogénéité cellulaire et une activité de différenciation qui est dépendante de l'animal, du site où le tissu est prélevé et des agents ajoutés au milieu de culture cellulaire (Boone et al., 1999; Akanbi et al., 1994). Les cellules stromales vasculaires, isolées à partir de tissus adipeux prélevés sur les animaux quelques jours après leur naissance, sont déjà à un stade de différenciation plus avancé que les lignées cellulaires murines (Kim et al., 2000b; McNeel et al., 2000).

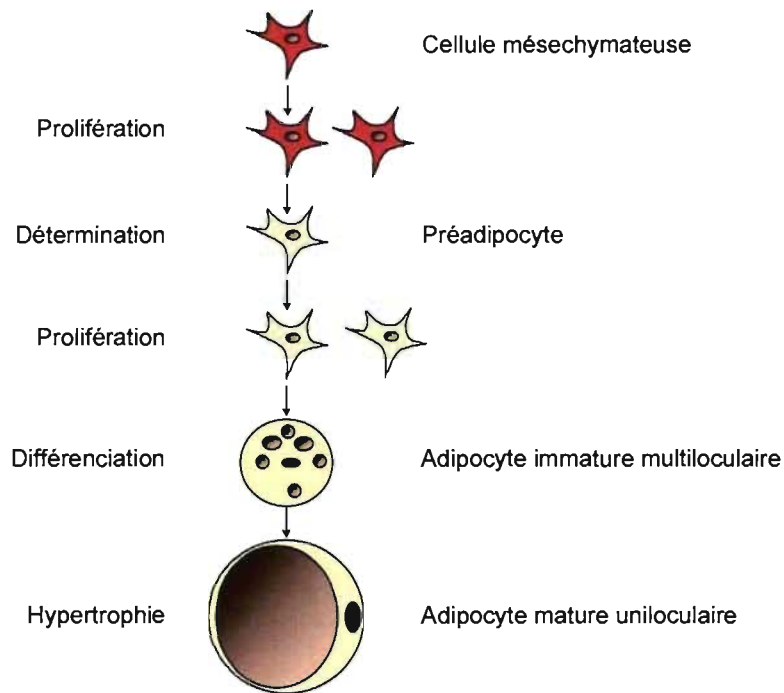
Il existe également plusieurs autres modèles expérimentaux : différentes combinaisons de co-cultures cellulaires et des cultures d'explants ou de tissus. Ces derniers modèles se rapprochent plus du modèle *in vivo* puisqu'ils tiennent compte de la contribution des autres types cellulaires et de l'environnement tridimensionnel créé par l'ensemble des cellules adipeuses et du tissu conjonctif intact (Novakofski, 2004). Cependant, ces études ne sont généralement fiables que sur une courte période d'incubation (Fischbach et al., 2004; Novakofski, 2004; Dietze et al., 2002). Une technique de culture d'explants de tissu adipeux a récemment été développée chez le porc (Jose et al., 2008).

### **2.2.2. Les étapes de l'adipogenèse**

Les événements moléculaires associés à la détermination cellulaire d'une cellule embryonnaire souche vers un adipocyte mature ne sont pas encore clairement définis. Néanmoins, le processus de l'adipogenèse est relativement bien détaillé à partir des cellules multipotentes issues du mésenchyme (mesenchymal stem cells ; MSC) et il implique divers facteurs de transcription et des régulateurs du cycle cellulaire. Les cellules mésenchymateuses sont déterminées en préadipocytes entre deux vagues de prolifération cellulaire occasionnant un accroissement du volume du tissu adipeux (hyperplasie) (Avram et al., 2007). L'étude des lignées cellulaires murines nous a permis d'identifier les quatre principales étapes du passage du préadipocyte à l'adipocyte mature : 1. L'arrêt de la prolifération cellulaire, 2. Les changements de la structure extracellulaire et du cytosquelette, 3. L'entrée, l'entreposage et la conversion des acides gras dans des réserves

lipidiques multiloculaires, 4. La fusion des réserves vers une réserve uniloculaire, la sécrétion de facteurs par le tissu adipeux, l'acquisition de la sensibilité à un ensemble d'hormones clés dont l'insuline, et enfin, l'hypertrophie cellulaire. (Rosen et al., 2000). Les principales étapes de l'adipogénèse sont décrites à la Figure 1 (Gregoire et al., 1998) (Avram et al., 2007).





Adaptée de Avram et al., 2007.

### Figure 1. Principales étapes de l'adipogenèse

L'adipogenèse est un processus qui comporte plusieurs étapes impliquant la communication de régulateurs du cycle cellulaire et des facteurs de différenciation. Deux phases prolifératives (hyperplasie) ont lieu durant l'adipogenèse : avant la détermination des cellules mésenchymateuses et juste avant la différenciation des préadipocytes en adipocytes. Pendant la différenciation, les cellules passent d'une forme fibroblastique à sphérique, laquelle permet de maximiser l'accumulation des lipides. Les réserves lipidiques se retrouvent tout d'abord sous forme de petites gouttelettes à l'intérieur de l'adipocyte immature (multiloculaire). Durant les dernières étapes de la différenciation, les gouttelettes fusionnent pour former une seule gouttelette compressant le noyau sur la paroi de l'adipocyte mature (uniloculaire). Lorsque la différenciation est complète, les adipocytes poursuivent leur croissance et l'accumulation de lipides (hypertrophie).

### ***2.2.2.1 Arrêt de la prolifération cellulaire des préadipocytes chez le porc***

Chez le porc, peu d'informations existent sur le mécanisme de l'arrêt de la prolifération cellulaire des préadipocytes. Les lignées cellulaires murines suggèrent que C/EBP $\alpha$  (protéine de liaison à l'élément amplificateur CCAAT, alpha) et PPAR $\gamma$  (Récepteur activé par la prolifération des peroxyosomes, gamma) seraient les facteurs de transcription initiateurs de cette activité anti-mitotique (Gregoire et al., 1998). La détection de ces deux facteurs de transcription dans le tissu adipeux lors de la vie fœtale suggère qu'un mécanisme semblable existerait chez le porc (Hausman, 2003). Les lecteurs sont invités à consulter la section 2.2.4. pour plus d'information sur le principaux facteurs de transcription participant à l'initiation de l'adipogenèse.

### ***2.2.2.2. Changements structurels de la matrice extracellulaire et du cytosquelette***

Les changements structurels de la matrice extracellulaire et du cytosquelette ne sont pas encore décrits avec précision chez le porc. Ce sont encore les études sur la lignée cellulaire 3T3-L1 qui nous fournissent le plus d'information. Dès les premiers événements de la différenciation, la cellule passe de la forme fibroblastique à une forme sphérique. Ceci résulte en d'importants changements au niveau de la matrice extracellulaire (MEC) et des composantes du cytosquelette via les filaments d'actine qui, eux, sont contrôlés par la protéine RHOA (gène homologue à la famille RAS, membre A, « ras homolog gene family, member A ») (Fève, 2005; McBeath et al., 2004). Ces changements entraînent une modulation de l'interaction des cellules avec leur environnement de manière à influencer la différenciation et la migration cellulaire. La MEC stromale entourant les préadipocytes subit donc une dégradation protéolytique par la cascade des plasminogènes. Cette dégradation est requise pour atteindre la morphologie cellulaire, l'expression des gènes, et l'accumulation des lipides spécifiques aux adipocytes (Gregoire, 2001; Kubo et al., 2000). Cette transformation permet donc une accumulation optimale des lipides à l'intérieur de l'adipocyte. Enfin, il est intéressant de constater que la dégradation des points focaux d'adhésion (structures permettant l'ancrage du cytosquelette d'une cellule à la MEC environnante) s'effectue indépendamment de l'accumulation de triglycérides (Gregoire et

al., 1998; Li et Xie, 2007), suggérant que les changements morphologiques observés sont intrinsèques au processus de l'adipogenèse et non une causalité de l'augmentation des réserves lipidiques.

### **2.2.2.3. La différenciation terminale**

Les étapes de la lipogenèse *do novo* sont considérées comme des signes précoces de la différenciation, alors que de l'autre côté du spectre, la sécrétion des facteurs adipeux est considérée comme un marqueur de la maturité des adipocytes. Néanmoins, les deux dernières étapes de l'adipogenèse sont couramment englobées sous le terme « différenciation terminale » (Gregoire et al., 1998). Lors de la phase terminale, les adipocytes murins en culture montrent une augmentation significative de l'activité lipogénique et acquièrent la sensibilité à l'insuline (Gregoire et al., 1998). Les niveaux d'ARNm, la quantité de protéines et l'activité des enzymes impliqués dans le métabolisme des triacylglycérols décuplent, dont la stéaroyl-CoA désaturase 1 (SCD1) (Gregoire et al., 1998). Les transporteurs de glucose augmentent ainsi que le nombre de récepteurs à l'insuline (Gregoire et al., 1998). Les niveaux d'expression d'autres gènes impliqués dans le métabolisme des lipides augmentent également, dont la protéine de liaison des acides gras des adipocytes 4 (FABP4), CD36 et la périlipine (PLIN). L'implication de certains de ces facteurs, également présents chez le porc, sera décrite plus en détails à la section 2.3. On considère que les adipocytes ont atteint leur pleine maturité lorsqu'ils sécrètent certains facteurs, appelés adipokines, tel que l'adiponectine (ADIPOQ) et la leptine (LEP). Ces derniers sont presque exclusivement produits par les adipocytes (Gregoire, 2001).

### **2.2.3. Les adipokines**

Le tissu adipeux joue un rôle actif sur l'ensemble du métabolisme et de l'homéostasie d'un organisme par la sécrétion de facteurs endocrines et paracrines (MacDougald et Mandrup, 2002). Il est reconnu que plus de 90% des facteurs sécrétés par le tissu adipeux, à l'exception de l'ADIPOQ et de la LEP, peuvent également être attribués à d'autres types cellulaires (Drevon, 2005), dont les macrophages (Dupont et al., 2004). Néanmoins, les

adipocytes sécrètent une importante quantité de protéines (Wang et al., 2004a). Le terme « adipokines » est employé pour désigner les protéines sécrétées spécifiquement par les adipocytes matures (Trayhurn et Wood, 2004). Les adipokines sont impliquées dans un large éventail de fonctions : les cytokines classiques, les facteurs de croissance, la voie alternative du complément, l'hémostase vasculaire, la régulation de la pression sanguine, le métabolisme des lipides, l'homéostasie du glucose, l'angiogenèse, la réponse de la phase aiguë, et la réponse au stress (Trayhurn et Wood, 2004). Plusieurs facteurs produits par les adipocytes, dont LEP, ADIPOQ et AGT (angiotensinogène), sont connus pour être impliqués au niveau de l'homéostasie énergétique (MacDougald et Mandrup, 2002). Chez l'humain, la quantité et le type d'adipokine sécrétée peut varier selon le dépôt adipeux étudié (Fain et al., 2004).

#### **2.2.4. Les facteurs de transcription initiateurs de l'adipogenèse**

La différenciation des adipocytes est majoritairement contrôlée par deux familles de facteurs de transcription : les PPARs et les C/EBPs (Rosen et Macdougald, 2006). L'activation des gènes cibles nécessite un partenariat entre PPAR $\gamma$  (PPARG) et RXR $\alpha$  (récepteur X aux rétinoïdes, alpha, RXRA) et une combinaison de cofacteurs. Cette combinaison induit la transcription et la traduction de C/EBP $\alpha$  (CEBPA), un autre facteur de transcription ciblant plusieurs gènes impliqués dans l'adipogenèse. Une boucle de rétroaction positive est alors amorcée pour augmenter l'expression de CEBPA et PPARG (Rosen et al., 2000). Plusieurs autres facteurs entrent ensuite dans le ballet moléculaire de l'adipogenèse. Voyons plus en détail la contribution de ces deux familles de facteurs de transcription sur les cellules adipeuses de notre modèle animal, le porc.

##### **2.2.4.1. C/EBPs**

La famille des C/EBPs fait partie de la classe des facteurs de transcription des « basic-leucine zipper » (Rosen et al., 2000). Plusieurs niveaux de régulation modulent l'expression de ces facteurs de transcription. Il existe plusieurs isoformes dont trois participent à l'adipogenèse, C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$  et C/EBP $\delta$ . Ces facteurs de transcription se retrouvent

sous forme d'homodimères ou d'hétérodimères avec les autres membres de la famille des C/EBPs. Leur expression n'est pas exclusive à la différenciation des adipocytes. Initialement, la transcription des gènes C/EBPs est activée avant la transcription de PPAR $\gamma$  (Gregoire et al., 1998). Sommairement, les facteurs de transcription C/EBP $\beta$  et C/EBP $\delta$  initient la différenciation. Par contre, ils ne sont pas suffisants pour induire seuls l'adipogenèse sur le modèle cellulaire 3T3-L1 (Auwerx, 1999). L'augmentation de l'expression de C/EBP $\beta$  stimule la production de PPAR $\gamma$ , un facteur de transcription clé pour la différenciation des adipocytes. Lorsque la transcription de CEBP $\beta$  et CEBP $\delta$  décroît, celle de CEBP $\alpha$  prend le relais tout juste avant l'expression de gènes spécifiques menant vers un adipocyte mature.

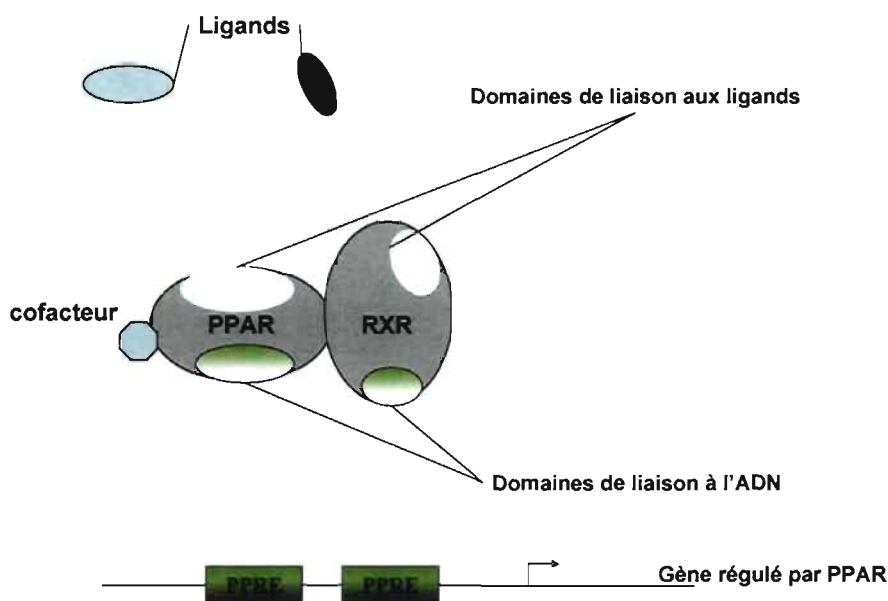
#### ***2.2.4.1.1. C/EBPs chez le porc***

Chez le porc, la colocalisation nucléaire des protéines PPAR $\gamma$  et C/EBP $\alpha$  est associée au maintien et à la régulation de la différenciation des préadipocytes (Hausman, 2003). Néanmoins, C/EBP $\beta$  n'est pas requis pour l'expression de CEBP $\alpha$  et la différenciation des cellules adipeuses du foetus (Kim et al., 2000b).

#### ***2.2.4.2. PPARs***

Les PPARs sont des récepteurs nucléaires membres de la superfamille des facteurs de transcription activés par le ligand. Ils sont impliqués à différents niveaux dans la régulation du métabolisme des lipides, de la balance énergétique et de l'inflammation (Ahmed et al., 2007; Brun et al., 1996). Les PPARs forment un hétérodimère avec le récepteur X aux rétinoïdes (RXR) et ce complexe lie ensuite l'élément de réponse aux PPARs (PPRE) situé au niveau de la séquence promotrice des gènes cibles. Ces PPRE sont composés d'une séquence consensus nucléotidique hexamérique répétée, espacée d'un nucléotide. En l'absence de ligand, l'hétérodimère PPAR-RXR recrute des corépresseurs de la transcription, de même que des déacétylases et autres enzymes modifiant la chromatine.. Ce processus est appelé répression active car il empêche la transcription des gènes cibles. La liaison des ligands (ex. certains acides gras et autres dérivés) induit un changement

conformationnel du complexe PPAR-RXR, échangeant les corépresseurs par des coactivateurs. Le complexe activé par les ligands recrute la machinerie transcriptionnelle au promoteur du gène cible permettant alors l'augmentation de l'expression de ce gène (Barish et al., 2006) (Figure 2).



Adaptée de Ahmed et al., 2007.

### Figure 2. Représentation du mécanisme transcriptionnel des PPARs

Les PPARs sont des récepteurs activés par différents ligands. Les PPARs hétérodimérisent avec le récepteur nucléaire RXR (Retinoid X Receptor). Par ses domaines de liaisons à l'ADN, ce complexe lie les éléments de réponse pour le PPAR (PPRE) situés dans le promoteur du gène cible. En réponse à un ligand spécifique interagissant au domaine de liaison au ligand, l'hétérodimère PPAR-RXR, abandonne ses corépresseurs au profit de coactivateurs permettant le recrutement de la machinerie transcriptionnelle et induisant ainsi l'expression de gènes cibles.

#### **2.2.4.2.1. PPAR $\alpha$**

L'expression de PPARA est détectée dans différents tissus, mais on le retrouve majoritairement dans le foie des mammifères. PPAR $\alpha$  est connu pour moduler l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la  $\beta$ -oxydation des acides gras, du métabolisme des lipides et de l'inflammation (Ahmed et al., 2007). L'hydrolyse des lipoprotéines de très faible densité (VLDL) par la lipoprotéine lipase (LPL) induit fortement l'expression de PPARA au niveau des cellules endothéliales (Ahmed et al., 2007).

##### **2.2.4.2.1.1. PPAR $\alpha$ chez le porc**

L'expression de PPARA est détectée dans le foie et le tissu adipeux du porc (Ding et al., 2000; Luci et al., 2007; Sundvold et al., 2001). Néanmoins, son rôle dans le tissu adipeux du porc reste à être déterminé.

#### **2.2.4.2.2. PPAR $\delta$**

Puisque l'ARNm de PPAR $\delta$  est exprimé de manière ubiquitaire parmi les tissus, ce facteur de transcription n'a pas reçu autant d'attention. Le facteur de transcription PPAR $\delta$  participerait à des fonctions cellulaires de base comme la synthèse et le maintien des lipides membranaires. Il participerait aussi à la prolifération et la différenciation cellulaire (Ahmed et al., 2007). Les souris nulles pour PPAR $\delta$ , lorsqu'elles survivent, montrent une réduction de plus de 60% de leur masse adipeuse. Cependant, lorsque l'inactivation de ce gène est effectuée spécifiquement dans les adipocytes, on observe que PPAR $\delta$  participerait peu à l'adipogenèse et à l'accumulation des lipides (Barak et al., 2002). Pourtant, certains travaux suggèrent que ce facteur de transcription a une action directe sur le tissu adipeux. Par exemple, il serait directement impliqué dans la synthèse des acides gras à longue chaîne (Fève, 2005). De plus, il accélérerait l'adipogenèse, et inhiberait la formation de myotubes dans un modèle *in vitro* de cellules de souris (Yu et al., 2008). Un rôle similaire à celui de PPAR $\alpha$  dans le foie est également proposé pour PPAR $\delta$  dans le tissu adipeux puisqu'il serait impliqué dans l'oxydation des acides gras et la dépense énergétique de ce tissu

(Evans et al., 2004). Ces aspects n'ont pas encore été explorés dans le tissu adipeux du porc.

#### **2.2.4.2.3. PPAR $\gamma$**

Le facteur de transcription PPAR $\gamma$  joue un rôle primordial dans le maintien et la régulation de l'adipogenèse (Chawla et al., 1994). PPARG, à l'instar de PPARA, est abondamment exprimé dans le foie et les adipocytes de la plupart des mammifères (Evans et al., 2004). Le variant PPAR $\gamma$ 2 se distingue de PPAR $\gamma$ 1 par une extension de 29 a.a. en position N-terminale (Grindflek et al., 1998). Les niveaux d'expression de PPARG2 sont plus élevés dans le tissu adipeux (Tontonoz et al., 1994). PPAR $\gamma$ 1 et PPAR $\gamma$ 2 peuvent stimuler l'adipogenèse mais seul PPAR $\gamma$ 2 est requis pour induire la différenciation cellulaire (Ren et al., 2002). Il a aussi été démontré que PPAR $\gamma$ 2 est requis et suffisant pour amorcer l'adipogenèse *in vivo* chez l'humain (Rosen et al., 2000). Plusieurs équipes de recherche ont tenté de déterminer l'identité des ligands des PPARs. Il a été rapporté que les ligands naturels de PPAR $\gamma$  pourraient être les acides gras polyinsaturés à longue chaîne (acide linoléique, acide linoléique et acide arachidonique), l'acide lysophosphatidique, d'autres acides gras dont les acides gras azotés, certains phospholipides et l'acide hydroxydécanoïque, et potentiellement certaines prostaglandines (Ahmed et al., 2007). Fait étonnant, une étude récente rapporte que le domaine de liaison aux ligands ne serait pas requis pour l'adipogenèse (Walkey et Spiegelman, 2008). Tel que mentionné précédemment, PPAR $\gamma$  doit s'hétérodimériser avec le facteur de transcription RXR $\alpha$  pour qu'il y ait initiation de la transcription des gènes cibles. Suite à l'ajout de cofacteurs, ce complexe lie les PPREs situés dans la région du promoteur. Cette liaison entraîne une cascade d'événements qui résultent en une modulation de l'expression de différents gènes cibles impliqués dans la différenciation des adipocytes (Rosen et Spiegelman, 2001) (Figure 2). La plupart des gènes contenant la séquence consensus PPRE sont impliqués dans l'entreposage des lipides et le contrôle du métabolisme des lipides dont FABP4, PCK2 (phosphoénolpyruvate carboxykinase 2), ACSS2 (membre 2 de la famille des acyl-CoA synthétase à courte chaîne, « acyl-CoA synthetase short chain family member 2 »),



SLC27A1 (membre 1 de la famille du transporteur de soluté 27, « solute carrier family 27, member 1 »), CD36 et LPL. Hormis l'adipogenèse, PPAR $\gamma$  intervient au niveau du métabolisme des lipides extracellulaires et des lipoprotéines (via LPL), de l'inflammation et de la réponse immunitaire, de l'athérogénèse, de l'homéostasie du glucose, et de l'angiogénèse (Ricote et Glass, 2007; Desvergne et al., 2006; Margeli et al., 2003; Auwerx, 1999).

#### ***2.2.4.2.3.1. PPAR $\gamma$ chez le porc***

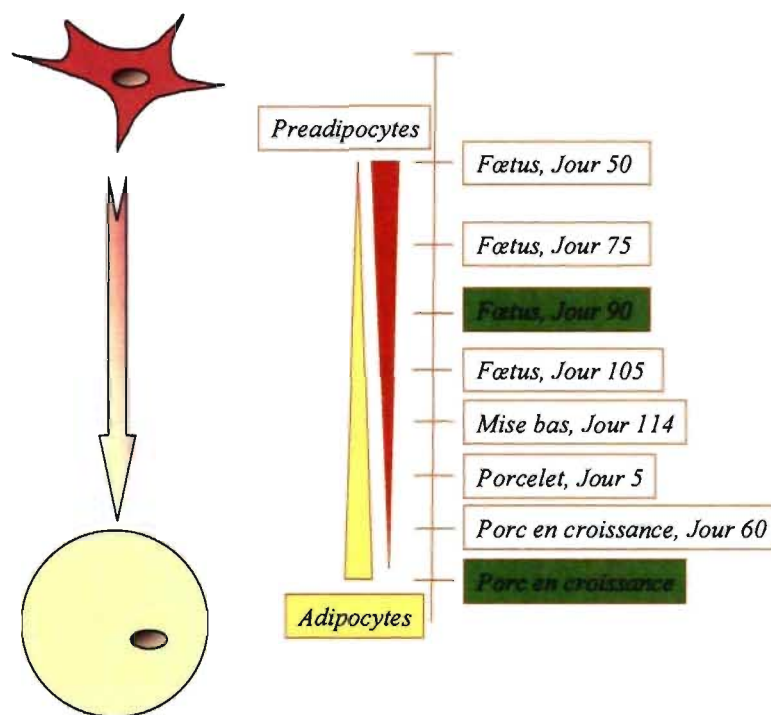
Contrairement à la plupart des mammifères, PPARG n'est fortement exprimé que dans les adipocytes chez le porc (Ding et al., 2000). On retrouve les deux principaux variants à l'intérieur des cellules adipeuses porcines : PPARG1 et PPARG2 (Spurlock et al., 2002). La forte expression de PPARG2, quasi exclusive au tissu adipeux, a aussi été observée chez le porc (Houseknecht et al., 1998). Chez le porc, les niveaux d'ARNm de PPARG2 dans le tissu adipeux varient selon la race et l'âge de l'animal (Grindflek et al., 1998). D'autres variants ont été rapportés mais aucune fonction ne leur ont encore été associée (Omi et al., 2005). La transcription de PPARG est contrôlée par plusieurs éléments. Par exemple, une diète hypocalorique, l'insuline et les glucocorticoïdes induisent l'expression de PPARG chez le porc (Hausman, 2003), alors qu'une alimentation riche en lipides et la cytokine TNF $\alpha$  (facteur nécrosant des tumeurs alpha) entraînent une diminution de l'expression. La leptine peut également moduler l'expression de PPARG selon les circonstances (Ajuwon et al., 2003).

#### **2.2.5. Le développement du tissu adipeux chez le porc**

La chronologie des événements déterminant le développement du tissu adipeux dépend de l'espèce et du dépôt adipeux (Gregoire et al., 1998). Chez les mammifères, le mésoderme embryonnaire, plus précisément les cellules souches mésenchymateuses, est la source de plusieurs cellules hautement spécialisées dont les myocytes, les ostéocytes, les chondrocytes et les adipocytes (MacDougald et Mandrup, 2002; Cornelius et al., 1994). À ce groupe, nous pouvons ajouter les cellules endothéliales. Les adipocytes porcins foetaux

et les cellules endothéliales associées expriment les mêmes marqueurs de surface cellulaire suggérant qu'ils sont issus d'ancêtres communs (Wright et Hausman, 1990). À l'intérieur du tissu sous-cutané dorsal porcin, la différenciation vers des cellules adipeuses matures débute officiellement dès le jour 50 (sur 114) de la vie foetale d'après la détection de l'expression de PPAR $\gamma$  et de CEBPA (Kim et al., 2000b). L'adipogenèse chez le porc se distingue de la différenciation des adipocytes 3T3-L1 par la présence des transcrits des isoformes des facteurs de transcription C/EBPs et PPAR $\gamma$  (Hausman, 2003). C/EBP $\beta$  et C/EBP $\delta$  initient l'adipogenèse chez les cellules 3T3-L1, alors qu'il est suggéré que ces 2 facteurs de transcription n'auraient pas de rôles majeurs dans le développement des adipocytes porcins. Chez le porc, la régulation de l'adipogénèse passerait principalement par C/EBP $\alpha$ . Au jour 45 de la gestation débute une période intense de la mitose des cellules stromales-vasculaires et le tissu conjonctif est désorganisé (Hausman et Kauffman, 1986b; Hausman et Kauffman, 1986a). Au même moment, des amas de cellules primitives, qui deviendront les adipocytes, se forment au pourtour des capillaires (Ailhaud et al., 1992). L'analyse du tissu adipeux porcin a permis de déterminer que l'angiogenèse précède généralement l'adipogenèse, selon le dépôt adipeux (Hausman et Richardson, 2004; Crandall et al., 1997). Cependant, une régulation réciproque de l'angiogenèse et de l'adipogénèse est suggérée chez les mammifères puisqu'une inhibition de l'adipogénèse réduit l'angiogenèse (Fukumura et al., 2003). Le recrutement des préadipocytes se situe entre le jour 50 et le jour 75 (Hausman et Thomas, 1984). La détection de l'accumulation de lipides ne débute pas avant le jour 60 de la gestation et elle se situe alors au niveau de la couche interne du tissu adipeux en construction (Hausman et Kauffman, 1986a). La taille et le nombre des gouttelettes lipidiques augmentent avec l'âge du fœtus (Hausman et Kauffman, 1986a). Au jour 90, le tissu adipeux sous-cutané du fœtus est à mi-chemin de son développement, selon des études *in vivo* et *in vitro* (Hausman G.J. et Hausman, 1993) (Figure 3). Après la naissance, le nombre d'adipocytes matures continue de croître (hyperplasie). Ensuite, les cellules prennent rapidement de l'expansion suite à une augmentation de l'activité lipogénique, laquelle culmine vers l'âge de 5 mois (hypertrophie) (Gurr et al., 1977; Anderson et Kauffman, 1973). La masse adipeuse varie

en fonction du nombre d'adipocytes et de leur volume (Gregoire, 2001), et cette masse peut prendre de l'expansion jusqu'à l'âge adulte (Boone et al., 1999). L'apoptose et la dédifférenciation cellulaire sont deux processus suggérés afin de contrôler, en partie, le nombre d'adipocytes (Prins et O'Rahilly, 1997; Kim et al., 2000a).



**Figure 3. Adipogenèse chez le porc**

Les facteurs de transcription initiant l'adipogenèse sont détectés dès le jour 50 de la vie fœtale. Le développement du tissu adipeux fœtal est considéré être à mi-parcours au jour 90. Après la naissance, le nombre d'adipocytes continue de croître jusqu'à 5-6 semaines.

## **2.2.6 Régulation de l'adipogenèse et du développement du tissu adipeux**

Des mécanismes biologiques à court terme et à long terme permettent la régulation de l'ensemble des activités métaboliques et du développement du tissu adipeux. Les adaptations à long terme, induites par des facteurs hormonaux, nutritionnels et développementaux, peuvent prendre quelques heures à quelques jours. Diverses activités ou états influencent le niveau d'adiposité tels que l'exercice physique, la diète, la gestation, le stress, etc. (Drevon, 2005; Kawaguchi et al., 2003). Les mécanismes reliés à ces adaptations métaboliques impliquent des évènements pré- et/ou post-traductionnels qui agiront sur la quantité ou l'activité de protéines, récepteurs et/ou de transporteurs (Fried et Moustaid-Moussa, 2001).

### ***2.2.6.1 Régulation de l'adipogenèse par les autres types cellulaires***

Les mécanismes de la régulation de l'adipogenèse peuvent être sous l'influence de molécules ou facteurs sécrétés par d'autres types cellulaires qui se retrouvent à l'intérieur du tissu adipeux. Par exemple, certains facteurs sécrétés par les macrophages inhibent la formation d'adipocytes matures. À l'opposé, certains agonistes de PPAR $\gamma$  semblent inhiber l'activation des macrophages et limiter leur production de cytokines (Lacasa et al., 2007). Les interactions entre les cellules myogéniques et les adipocytes jouent aussi un rôle significatif sur la croissance et le développement du tissu adipeux en agissant surtout au niveau de l'adipogenèse et de la lipogenèse/lipolyse (Kokta et al., 2004). De plus, l'énergie libérée lors de la lipolyse serait principalement utilisée par les cellules musculaires (Kokta et al., 2004). Les cellules musculaires ne sont pas les seules à moduler l'activité des adipocytes. Des systèmes de co-cultures entre cellules endothéliales et adipocytes ont montré que les cellules endothéliales promeuvent le recrutement des préadipocytes et la différenciation vers des adipocytes matures en comparaison avec un système de culture contenant uniquement des adipocytes (Aoki et al., 2003).

Le développement du tissu adipeux serait également contrôlé par le système nerveux. Ainsi, des études morphologiques ont démontré la présence de fibres adrénrgiques parcourant le tissu adipeux (Hausman et Richardson, 1987), alors que des études immunocytochimiques ont montré qu'il existe un lien entre les neurones de l'hypothalamus porcin et la régulation du métabolisme des lipides (Czaja et al., 2003; Czaja et al., 2007).

Les dépôts adipeux sont abondamment innervés par des fibres du système nerveux sympathique et l'activation de ces fibres est associée à une augmentation de la lipolyse et au contrôle de la cellularité du tissu (Rosen et Spiegelman, 2006).

#### ***2.2.6.2 Les facteurs anti-adipogéniques et pro-adipogéniques***

Les facteurs favorisant l'adipogenèse sont appelés pro-adipogéniques alors que les régulateurs négatifs sont des facteurs anti-adipogéniques. La balance entre ces facteurs module la détermination des adipocytes (Feve, 2005). La complexité des stimuli influençant les préadipocytes *in vivo* est significativement plus grande que ceux imités lors d'études *in vitro* (MacDougald et Mandrup, 2002). De plus, la régulation de l'adipogenèse peut différer d'une espèce à l'autre (Boone et al., 1999). De plus, les résultats d'études effectuées chez le porc peuvent différer selon le modèle *in vitro* utilisé (Boone et al., 2000). Les principaux facteurs modulant positivement et négativement la différenciation des adipocytes porcins sont énumérés dans le Tableau II.

*Tableau II* Facteurs anti-adipogéniques et pro-adipogéniques vérifiés chez le porc

| Facteurs  | Pro-adipogénique | Anti-adipogénique | Références   |
|---|------------------|-------------------|--|
| <i>Facteurs de transcription</i>                      |                  |                   |  |
| RAR $\alpha$ (récepteur de l'acide rétinolique)       |                  | X                 | (Suryawan et Hu, 1997)<br>(Brandebourg et Hu, 2005)          |
| FoxO1 (forkhead box O1)                               |                  | X                 | (Pang et al., 2008)  |
| PPAR $\gamma$   | X                |                   | (Yu et al., 2006)  |
| <i>Hormones</i>                                       |                  |                   |  |
| DHEA<br>(déhydroépiandrostérone)                      |                  | X                 | (McIntosh et al., 1998)                                      |
| GH (hormone de croissance)                            |                  | X                 | (Louveau et Gondret, 2004)                                   |
| Insuline  | X                |                   | (Suryawan et al., 1997; Suryawan et Hu, 1993; Hausman, 1989) |
| Glucocorticoïdes                                      | X                |                   | (Suryawan et al., 1997; Suryawan et Hu, 1993)                |
| IGF-I (facteur de croissance I analogue à l'insuline) | X                |                   | (Hausman, 1989; Boone et al., 2000)                          |
| <i>Cytokines</i>                                      |                  |                   |  |
| TNF $\alpha$  |                  | X                 | (Boone et al., 2000)   |
| TGF $\beta$ (Facteur de croissance des tumeurs, bêta) |                  | X                 | (Richardson et al., 1989; Richardson et al., 1992)           |
| <i>Acides gras</i>                                    |                  |                   |  |
| Acides gras insaturés<br>(C18 :1, C18 :2, C18 :3)     | X                |                   | (Ding et al., 2003; Ding et Mersmann, 2001)                  |
| Acide arachidonique<br>(C20 :4)                       | X                |                   | (Ding et al., 2002)  |

## 2.3. Le métabolisme des lipides

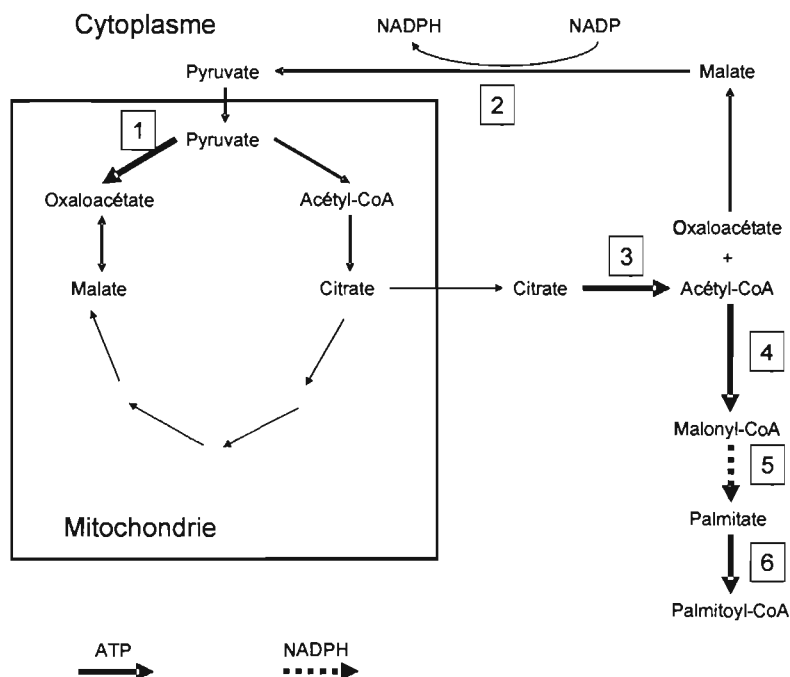
Les principales voies métaboliques utilisées par les adipocytes matures sont celles reliées au métabolisme des lipides. La lipogénèse est la voie métabolique formant et accumulant le triacylglycérol à l'intérieur de l'adipocyte, soit par l'incorporation d'acides gras libres, soit par les acides gras nouvellement synthétisés à partir de précurseurs à base de carbone (Louveau et Gondret, 2004). À l'inverse, la lipolyse correspond à la mobilisation des réserves lipidiques par l'hydrolyse des triglycérides afin que les acides gras soient relâchés pour produire de l'énergie ou être exportés vers la circulation sanguine (Mersmann, 1998). Chez les mammifères, l'activité des enzymes clés de la biosynthèse du triacylglycérol et de la lipolyse est étroitement contrôlée par divers facteurs nutritionnels et hormonaux (Paulauskis et Sul, 1989). Chez le porc, l'expression des gènes reliés au métabolisme des lipides varie selon le dépôt adipeux et la race (Mourot et al., 1996). Nous effectuerons un bref survol des principaux aspects reliés au métabolisme des lipides avec une emphase sur la lipogénèse. Au cours de ce processus, les acides gras peuvent être synthétisés *de novo* à partir du glucose ou ils peuvent provenir directement de l'alimentation.

### 2.3.1. La lipogénèse à partir de la voie du glucose

Chez le porc, il est estimé que plus de 80% des lipides sont synthétisés à partir du glucose (Mourot et Hermier, 2001; Henry, 1977). Ce pourcentage décroît avec l'âge de l'animal au profit de l'estérification du palmitate (Etherton et al., 1981; Etherton et Allen, 1980). Chez le porc, l'insuline et l'adénosine jouent un rôle majeur dans la lipogénèse et semblent favoriser la voie du glucose d'une manière qui se rapproche du mécanisme observé chez les rongeurs (Mills, 1999). L'insuline favorise l'entrée du glucose et diminue l'activité lipolytique en inhibant la lipase hormono-sensible (HSL) (Evans et al., 2004). Le glucose entre dans l'adipocyte à l'aide des protéines de la famille de transporteurs de glucose (GLUT) qui sont intégrés à la membrane plasmique. L'isoforme GLUT4 a une grande affinité pour le glucose et il est la forme la plus abondante dans le tissu adipeux. Quoique détecté lors de l'adipogénèse (McNeel et al., 2000) dans les adipocytes et utilisé comme marqueur de la synthèse d'acide gras *do novo* (Donkin et al., 1996), GLUT4 et les autres

membres de sa famille ont été peu caractérisés dans le tissu adipeux porcin. Une fois à l'intérieur de la cellule, le glucose est converti en pyruvate, puis le pyruvate est converti en citrate dans la mitochondrie. Le citrate est ensuite transporté dans le cytosol où l'ATP citrate lyase (ACLY) l'utilise comme substrat pour produire l'acétyl-CoA (Figure 4) (Kopecky et al., 2001). L'acétyl-CoA est carboxylé pour produire le malonyl-CoA qui sera utilisé pour produire le palmitoyl-CoA (C16 :0), au niveau du cytoplasme, à l'aide des enzymes acétyl-CoA carboxylase 1 (ACAC) et acide gras synthase (« fatty acid synthase », FASN) et du cofacteur nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) (Wakil, 1989). La synthèse des acides gras de plus de 16 carbones s'effectue à l'intérieur des microsomes et utilise le malonyl-CoA comme source de carbone. Par la suite, les acides gras sont modifiés (section 2.3.3.) et entreposés sous forme de triacylglycérols (section 2.3.4.).





Adaptée de Kopecky et al., 2001.

#### Figure 4. Cycle de l'acide citrique pour la synthèse des acides gras chez la souris

Les acétyl-CoA nécessaires à la synthèse des acides gras sont formés par le cycle du pyruvate. À l'intérieur de la mitochondrie, il y a conversion du pyruvate en oxaloacétate d'une part, et en citrate d'autre part. Ensuite, le citrate est transporté vers le cytoplasme pour être clivé en acétyl-CoA et en oxaloacétate. Le NADH (nicotinamide adénine dinucléotide) réduit l'oxaloacétate cytosolique en malate, et le malate est décarboxylé en pyruvate pour générer du NADPH. Enfin, le pyruvate retourne à l'intérieur de la mitochondrie. Ce cycle contribue à la production d'acétyl-CoA et de NADPH requis pour la synthèse des acides gras, le reste du NADPH étant fourni par le cycle des pentoses. Les réactions dépendantes de l'ATP ou NADPH sont identifiées par des flèches différentes telles que montrées sur la figure. Enzymes : 1. Pyruvate carboxylase (PC); 2. enzyme malique (ME); 3. ATP citrate-lyase; 4. Acétyl-CoA carboxylase; 5. L'acide gras synthase; 6. Acyl-CoA synthétase (ACS).

### **2.3.2. La lipogenèse par translocation des acides gras**

Contrairement au porc, la source d'acide gras provenant de l'alimentation est la voie métabolique la plus couramment utilisée chez l'humain (Frayn et al., 2003). Un mécanisme de régulation établit alors l'équilibre entre la lipogenèse par la voie du glucose et celle par la translocation des acides gras selon les concentrations de glucose et de lipides dans le sang (Frayn, 2003). Différentes molécules et facteurs contrôlent l'incorporation des acides gras à l'intérieur de la cellule. Tout d'abord, la lipoprotéine lipase (LPL), sécrétée par plusieurs types cellulaires, dont les adipocytes matures (Gregoire et al., 1998; Ding et al., 1999; McNeel et al., 2000), joue un rôle essentiel dans le contrôle de l'accumulation des lipides (Weinstock et al., 1997). Cette enzyme est transportée vers la surface luminaire des cellules endothéliales des capillaires localisés dans le tissu adipeux et le muscle. Elle clive les acides gras des triacylglycérols circulants afin de permettre à ces derniers d'entrer à l'intérieur de l'adipocyte (Mersmann, 1998). Chez le porc, l'activité de la LPL augmente avec l'âge et le poids de l'animal et diffère selon la race (Lee et Kauffman, 1974; Steffen et al., 1978). Dans le sérum, les lipoprotéines ne sont pas les seuls transporteurs des acides gras. L'albumine plasmatique lie les acides gras non-estérifiés mobilisés par le tissu adipeux lors de la lipolyse ou libérés suite à l'activité de la LPL sur le triacylglycérol plasmatique (Large et al., 2004). Les acides gras libres sont ensuite captés par le tissu adipeux grâce à des transporteurs spécifiques tels FABP et CD36. Une fois à l'intérieur de la cellule, les acides gras pourront être entreposés sous forme de triacylglycérol.

#### ***2.3.2.1. La lipogenèse par translocation des acides gras : CD36***

CD36 est une glycoprotéine intégrée à la membrane cellulaire. Elle se retrouve dans plusieurs types cellulaires (Febbraio et al., 2002) et est fortement induite lors de la différenciation des adipocytes (Teboul et al., 2001). Son rôle principal est de permettre la translocation des acides gras (Large et al., 2004). CD36 agit aussi comme récepteur pour les HDL (lipoprotéine de haute densité) et les LDL (lipoprotéine de faible densité) oxydées (Rigotti et al., 2003; Endemann et al., 1993). Plusieurs études ont approfondi le rôle de CD36 et des LDL oxydées dans les macrophages afin de déterminer leur implication au

niveau de l'athérosclérose (Collot-Teixeira et al., 2007). Récemment, la modulation de l'adipogenèse par les LDL oxydées et CD36 a été mise en évidence dans les cellules 3T3-L1 (Masella et al., 2006; D'Archivio et al., 2008). Jusqu'à maintenant, il n'existe que peu d'information sur CD36 chez le porc à l'exception que cette molécule a été détectée dans le tissu adipeux lors d'une étude transcriptomique (Chen et al., 2006).

### **2.3.2.2. La lipogenèse par translocation des acides gras : FABP**

La famille des FABP permet la translocation des acides gras par un processus d'adsorption-désorption (Chmurzynska, 2006). Il procure également aux acides gras à longue chaîne, et autres ligands hydrophobes, la solubilité nécessaire au transport intracellulaire (Chmurzynska, 2006). Le tissu adipeux porcine exprime quatre sous-types de FABP dont la régulation s'effectue à des moments précis lors de l'adipogenèse (Samulin et al., 2008a). FABP3 et FABP4 sont parmi les FABP les plus fortement exprimées lors de la différenciation des adipocytes (Li et al., 2007; Samulin et al., 2008a). Une étude a rapporté que les FABPs seraient particulièrement efficaces pour transporter l'acide oléique, l'acide gras le plus abondant à l'intérieur des adipocytes (Zimmerman et Veerkamp, 2002).

### **2.3.3. Modification des acides gras pour la synthèse du triacylglycérol**

Les acides gras subissent des modifications structurelles à l'intérieur de la cellule par l'action de divers enzymes. Ces modifications sont principalement causées par les activités enzymatiques de désaturation et d'élongation. Ces voies sont critiques pour les produits finaux de la synthèse des lipides et leur entreposage. La composition en acides gras du triacylglycérol est en perpétuel changement dans les adipocytes porcins (Suzuki et al., 2008). Le palmitate et l'oléate (C16 :0 et C18 :1) sont les principaux acides gras composant le triacylglycérol des adipocytes porcins (Timon et al., 2002; Otten et al., 1993; Eder et al., 2001). Ils sont aussi les principaux constituants des phospholipides de la membrane, influençant sa fluidité (Ntambi, 1995). Les acides gras saturés (aucune liaison double dans la chaîne de carbones) sont plus abondants dans la couche interne du tissu adipeux sous-cutané (C16 :0, C18 :0). L'inverse est observé pour la couche externe, laquelle contient

davantage d'acides gras insaturés (contenant au moins une liaison double à l'intérieur de la chaîne de carbones) (C18 :1, C18 :2) (Suzuki et al., 2006). L'élongation et la désaturation sont les étapes-clé pour convertir les produits finaux de la lipogenèse, soit le palmitate (16 :0), en acides gras monoinsaturés.

### ***2.3.3.1. La désaturation et l'élongation des acides gras : SCD1 et ELOVL6***

La stéaroyl-coenzyme désaturase 1 est l'enzyme limitante de la conversion du palmitoyl-CoA et du stéaroyl-CoA en leur forme  $\Delta 9$  insaturé correspondante, soit le palmitoléoyl-CoA et oléoyl-CoA. Ces derniers mèneront à la synthèse des acides palmitoléiques et oléiques (C16 :1, C18 :1) (Ntambi, 1995). L'enzyme SCD1 fait partie d'un complexe enzymatique avec le « cytochrome *b5* » et le « cytochrome *b5* reductase » (Ntambi, 1995). Le gène SCD1, connu pour être modulé par PPAR $\gamma$  et C/EBP $\alpha$  (Gregoire et al., 1998), a été cloné et caractérisé chez le porc (Ren et al., 2004b). Au moins 5 polymorphismes d'ADN ont été identifiés dans ce gène (Ren et al., 2004a). SCD1 apparaît important pour la différenciation des adipocytes porcins (Wang et al., 2004b) et l'expression de SCD1 est considérée comme un bon marqueur de la différenciation terminale chez le porc (Smith et al., 1999). Le gène est pratiquement indétectable à la naissance et augmente de près de 20 fois chez des porcs âgés de 7 semaines (Smith et al., 1999). L'expression du gène SCD1 est étroitement liée à l'hypertrophie des adipocytes et elle augmente en présence d'une diète riche en gras saturés (Smith et al., 1999). Le rôle de SCD1 est considéré primordial au niveau de la régulation du poids corporel chez l'humain (Dobrzyn et Ntambi, 2004).

La voie métabolique permettant l'élongation des acides gras s'exécute à l'intérieur des microsomes. Le malonyl-CoA et l'acyl-CoA sont utilisés comme substrats pour additionner deux carbones à l'extrémité de la chaîne d'un acide gras. Cette voie est composée de 4 étapes enzymatiques : une condensation, une réduction, une déshydratation et finalement une seconde réduction (Moon et Horton, 2003). ELOVL6 (membre 6 de la famille de l'élongation des acides gras à très longue chaîne, « elongation of very long chain fatty acids, member 6 ») est le gène associé à la première étape enzymatique de la cascade de l'élongation des acides gras. Il permet l'allongement spécifique des acides gras saturés et

monoinsaturés composés d'une chaîne de 12 à 16 carbones (Leonard et al., 2004). Ce gène est induit par PPARA et est contrôlé par SREBF1 (facteur de transcription 1 liant à l'élément de régulation des stérols, « sterol regulatory element-binding transcription factor 1 ») chez la souris, le rat et l'homme, au même titre que SCD1 (Wang et al., 2006; Moon et al., 2001). Des études sur le foie de rat ont permis de constater que la transcription de ELOVL6 est régulée par le glucose, les lipides ainsi que l'insuline (Wang et al., 2005; Wang et al., 2006). Néanmoins, une alimentation riche en lipides réprime l'expression de ce gène (Wang et al., 2006). Le contrôle de l'expression d'ELOVL6 par les facteurs de transcription diffère de celui de SCD1, suggérant des mécanismes spécifiques de régulation (Wang et al., 2006). Par contre, il est important de mentionner que SCD1 et ELOVL6 ont surtout été caractérisés dans le foie, cet organe étant le site principal du métabolisme des lipides de la souris, le rat et l'homme (Figure 5). En ce qui concerne le porc, la lipogenèse se produit principalement dans le tissu adipeux (O'Hea et Leveille, 1969) et la régulation de ces voies métaboliques reste à être déterminée.



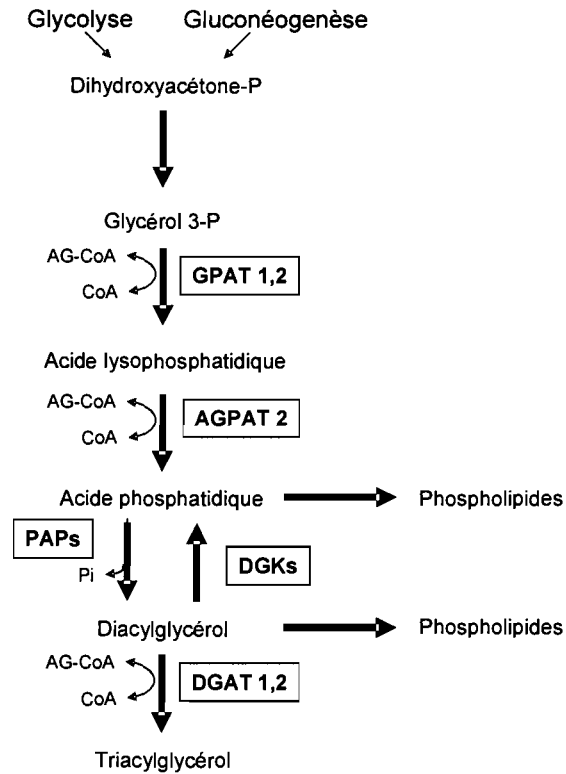
Adaptée de Wang et al., 2006.

**Figure 5. Voie métabolique de la conversion du palmitate en acides gras monoinsaturés dans les hépatocytes de rat**

L'étape de désaturation permet l'introduction d'une liaison double dans la chaîne de carbones de l'acide gras à l'aide de l'enzyme stéaroyl-Coenzyme A désaturase 1 (SCD1). L'étape d'élongation permet l'addition de 2 carbones à l'acide gras à l'aide de l'enzyme « elongation of very long chain fatty acids-like 6 » (ELOVL6).

#### **2.3.4. La synthèse de triacylglycérol**

La production de glycérol et d'acides gras est nécessaire afin de les transformer en glycérol-3-phosphate et en acides gras sous forme d'acyl-CoA pour obtenir les composantes de base de la synthèse du triacylglycérol. D'une part, le glycérol-3-phosphate est produit à partir du glucose, lors de la première étape de la glycolyse, et à partir de divers substrats dont le pyruvate, lorsque le glucose est moins disponible (Reshef et al., 2003). Pour les cellules adipeuses porcines, ces étapes doivent être confirmées. D'autre part, les acides gras et coenzymes sont estérifiés en acyl-CoA par l'enzyme acyl-CoA synthétase. Les acides gras estérifiés sont ensuite transportés à travers la cellule par la protéine liant l'acyl-CoA (ACBP ou DBI « diazepam binding inhibitor ») (Kragelund et al., 1999). DBI est d'ailleurs considéré comme un marqueur de différenciation tardif de l'adipogenèse (Ailhaud et al., 1992) et son expression (ARNm) augmente suite à l'induction de la lipogenèse (Hansen et al., 1991). Chez le porc, la protéine DBI a été purifiée (Chen et al., 1988). L'assemblage du triacylglycérol se déroule principalement dans les microsomes et comporte trois étapes successives d'estérification des groupements alcools du glycerol-3-phosphate par différents enzymes (Figure 6). Cette voie métabolique est utilisée dans le tissu adipeux porcine avec la particularité qu'une grande proportion du triacylglycérol synthétisé est composée de palmitate à la position 2 du glycérol (Stokes et Tove, 1975).



Adaptée de Large et al., 2004.

### Figure 6. Voie de la biosynthèse du triacylglycérol dans l'adipocyte

Issu de la glycolyse et/ou de la gluconéogenèse, le dihydroxyacétone-phosphate est converti en glycérol 3-phosphate. Par la suite, les groupements alcool du glycérol-3-phosphate sont successivement estérifiés afin d'accepter les acides gras. Lors de la dernière estérification, le glycérol doit d'abord perdre son groupement phosphate (Pi) en position 3 afin d'ajouter le dernier acide gras. AG-CoA : acide gras acyl-Coenzyme A; GAPT: glycérol-3-phosphate acyltransférase; AGPAT: 1-acylglycérol-3-phosphate acyltransférase; PAPS : phosphatidate phosphohydrolase; DGKs : diacylglycérol kinase; DGAT : diacylglycérol acyltransférase.



### **2.3.5. L'accumulation du triacylglycérol**

Les événements moléculaires associés à la formation de gouttelettes lipidiques par l'accumulation de triacylglycérol ne sont pas clairement définis. Mais la plupart des modèles s'entendent pour affirmer que la contribution du réticulum endoplasmique est importante (Ducharme et Bickel, 2008). En plus du triacylglycérol, les gouttelettes lipidiques contiennent aussi des esters de cholestérol et autres lipides qui une fois réunis, sont entourés d'une couche de phospholipides (Brown, 2001). Plusieurs protéines sont également localisées à la surface des gouttelettes lipidiques dont les plus connues sont ADRP (protéine reliée à la différenciation du tissu adipeux) et PLIN (péripiline) (Brown, 2001). Contrairement à PLIN qui n'est retrouvée que dans les adipocytes matures et les cellules stéroïdogéniques, l'ARNm de ADRP est détecté dans la plupart des tissus (Brasaemle et al., 1997). Dans les cellules 3T3-L1, ADRP s'associerait d'abord aux gouttelettes lipidiques naissantes avant d'être remplacée par PLIN et être dégradée par la voie ubiquitine/protéasome (Xu et al., 2005; Wang et al., 2003). Une équipe a constaté que PLIN facilite l'hydrolyse et l'entreposage des triacylglycérols, lui prêtant ainsi un rôle important dans les fonctions propres à l'adipocyte (Brasaemle et al., 2000; Brasaemle et al., 2004). Finalement, les fonctions exactes de ces molécules ne sont pas encore clairement établies, mais elles sont importantes pour la formation des gouttelettes lipidiques et pour le contrôle de la lipolyse (Ducharme et Bickel, 2008). Chez le porc, ADRP et PLIN ont été clonées et localisées sur les chromosomes 1 et 7 respectivement (Tao et al., 2008; Kim et al., 2005).

### **2.3.6. La lipolyse**

La lipolyse est en quelque sorte la voie métabolique inverse de la lipogénèse. Elle se définit par le processus par lequel les adipocytes clivent le triacylglycérol et relâchent les acides gras et le glycérol (Wang et al., 2008). Les événements typiques pouvant amorcer la lipolyse sont le jeûne prolongé et les périodes de stress (Wang et al., 2008). Chez le porc, la lipolyse peut être initiée par une variété de molécules dont les catécholamines (Mersmann et al., 1976) et Il-15 (Ahima, 2006; Ajuwon et Spurlock, 2004). L'hydrolyse des

triglycérides est essentiellement catalysée par deux enzymes : l'« adipose triglyceride lipase » (ATGL) et HSL. ATGL hydrolyse le premier lien ester du triacylglycérol (Zimmermann et al., 2004). On le retrouve abondamment exprimé dans le tissu adipeux porcin où il est soumis à une régulation hormonale par l'insuline et l'épinéphrine (Deiuliis et al., 2008). Le diacylglycérol est ensuite hydrolysé par la forme active de HSL qui possède une plus grande affinité pour le diacylglycérol que le triacylglycérol (Fredrikson et al., 1981). Chez le porc, la transcription des gènes HSL et AGTL augmente de façon significative durant l'adipogenèse, démontrant ainsi que les processus de lipolyse et de lipogénèse peuvent coexister à l'intérieur des adipocytes matures (McNeel et al., 2000; Deiuliis et al., 2008). Les protéines localisées à la surface des gouttelettes lipidiques ont également un rôle à jouer pendant la lipolyse. Par exemple, PLIN et la cavéoline 1 (CAV1) facilitent l'hydrolyse du triacylglycérol (Cohen et al., 2004; Brasaemle et al., 2004). Lorsque l'hydrolyse des triglycérides est complétée, les acides gras et le glycérol peuvent être relâchés vers la circulation sanguine pour répondre aux besoins de différents tissus. Ils y seront alors dégradés par les voies cataboliques de la  $\beta$ -oxydation, de l'acétogénèse ou de la cétogénèse.

#### **2.4. Les principales études transcriptomiques et protéomiques effectuées sur le tissu adipeux blanc**

De nombreuses études transcriptomiques et protéomiques ont été effectuées afin de caractériser l'adipogenèse et les voies métaboliques utilisées par les adipocytes. L'étude du transcriptome analyse les transcrits (ARNm) présents dans une cellule ou un tissu cible, ce qui donne un aperçu des molécules et des voies métaboliques potentiellement activées dans le modèle à l'étude. De son côté, l'étude de la protéomique permet de révéler la présence d'un certain nombre de protéines et de familles de protéines participant à l'adipogenèse et dont la régulation ne s'effectue pas au niveau transcriptionnel (Welsh et al., 2004). Quant à l'étude du sécrétome, un dérivé de la protéomique, elle permet d'identifier les protéines sécrétées susceptibles de communiquer avec l'environnement immédiat de la cellule ou du tissu ou encore à des organes-cibles plus éloignés via la circulation sanguine.

#### **2.4.1. Principales études concernant les adipocytes et le tissu adipeux chez les espèces autres que le porc**

De nombreuses études transcriptomiques et protéomiques ont permis de décortiquer le processus de l'adipogenèse en utilisant la lignée cellulaire murine 3T3-L1 comme modèle *in vitro*. Plusieurs équipes ont utilisé ce modèle à différents temps et sous l'influence de divers activateurs (Albrektsen et al., 2002; Gerhold et al., 2002; Guo et Liao, 2000; Burton et al., 2002; Jessen et Stevens, 2002; Burton et al., 2004; Welsh et al., 2004; Johmura, 2007), ou inhibiteurs (Ross et al., 2002; Sugimoto et al., 2004) et ont effectué des comparaisons avec d'autres modèles de l'adipogenèse (Soukas et al., 2001). Des cellules 3T3-L1 déficientes pour PPAR $\gamma$  infectées par des vecteurs contenant chacun des isoformes de PPAR $\gamma$  ont aussi été utilisées (Mueller et al., 2002). Le transcriptome du tissu adipeux humain a été examiné selon le site de prélèvement du dépôt adipeux (Yang et al., 2003; Linder et al., 2004; Urs et al., 2004), et à partir de cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse (hMSC) (Nakamura et al., 2003; Sekiya et al., 2004) ou de cellules souches dérivées du tissu adipeux adulte (ADAS) (DeLany et al., 2005; Zvonic et al., 2007). Les études ont ensuite été étendues aux tissus adipeux de plusieurs espèces dont la souris (Bolduc et al., 2004a; Bolduc et al., 2004b; Bluher et al., 2004), le rat (Chen et al., 2005), le bœuf (Tan et al., 2006; Taniguchi et al., 2008; Oishi et al., 2000) et le poulet (Wang et al., 2006; Wang et al., 2007). Bref, la liste des études « omiques » ne cesse de s'allonger. Les chercheurs espèrent que l'étude du transcriptome et du protéome du tissu adipeux permettra de comprendre et peut-être de diminuer les complications associées au syndrome métabolique chez l'humain (Nadler et Attie, 2001). Ces études permettront également de mieux comprendre les mécanismes impliqués pendant l'adipogenèse et éventuellement d'en arriver à exercer un meilleur contrôle sur le développement du tissu adipeux chez les animaux d'élevage (Sillence, 2004; Novakofski, 2004).

#### **2.4.2. Les études transcriptomiques et protéomiques sur le tissu adipeux porcin**

Avant la venue de la transcriptomique, l'approche «gène candidat» était le plus souvent utilisée pour l'étude de l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme des lipides et la différenciation des adipocytes de porc (Ding et al., 2000; Ding et al., 1999; McNeel et al., 2000). Par la suite, plusieurs techniques ont été utilisées afin de dresser un portrait global de l'expression des gènes lors de l'adipogenèse et de l'activité métabolique du tissu adipeux lors de diverses conditions. Des librairies conventionnelles et normalisées d'ADNc, réalisées à partir de plusieurs races de porc, ont généré des étiquettes de séquences exprimées («expressed sequence tags », (ESTs)) (Mikawa et al., 2004; Kim et al., 2006; Gorodkin et al., 2007). Une autre étude rapporte la création d'une librairie d'ADNc pleine longueur en utilisant du tissu adipeux de porcs de race Lee-Sung (Chen et al., 2006). Le DDRT-PCR (affichage différentiel de la polymérisation par réaction en chaîne par transcription inverse) a aussi été utilisé pour comparer les transcrits présents dans les dépôts adipeux sous-cutané et viscéral. (Hishikawa et al., 2005). Récemment, Wang et al. (Wang et al., 2006) ont utilisé la technique du SSH (hybridation soustractive suppressive) pour comparer des adipocytes différenciés à la fraction de cellules stromales-vasculaires du tissu adipeux de porc de race Lee-Sung. En utilisant la technique de micropuce, l'expression des apolipoprotéines et des cytokines (Hausman et al., 2007) ainsi que l'expression des hormones et des facteurs de croissance (Hausman et al., 2008) ont été comparées entre la couche externe et la couche interne du tissu adipeux porcin. Cette technique a aussi permis d'évaluer l'effet d'un inhibiteur de l'accumulation de lipides dans les adipocytes (Zhang et al., 2007) et de comparer les transcrits du tissu adipeux de deux races porcines présentant des phénotypes très différents en terme de dépôt adipeux (Guo et al., 2008). Enfin, en combinant une analyse de micropuces à une analyse protéomique, Hausman et al. (Hausman et al., 2006) ont caractérisé le sécrétome et le transcriptome du tissu adipeux et des cellules stromales-vasculaires provenant de fœtus et de porcelets nouveau-nés.

Globalement, l'ensemble de ces études confirme que les gènes fortement exprimés dans le tissu adipeux sont ceux qui participent activement à l'adipogenèse et au métabolisme des lipides. Parmi ces gènes, SCD1 et LPL se retrouvent pratiquement dans toutes les études

reliées à l'adipogenèse, confirmant une forte activité lipogénique. Une représentation marquée des gènes impliqués dans la matrice extracellulaire est aussi observée (Gorodkin et al., 2007). La plupart des gènes impliqués dans le métabolisme des lipides ont été rapportés précédemment au cours d'études transcriptomiques sur des adipocytes provenant d'autres espèces. Cependant, de nouveaux gènes sont fréquemment identifiés dépendamment du modèle utilisé. Ainsi, la source de l'échantillon utilisé pour effectuer une étude transcriptomique influence grandement les résultats. De plus, des distinctions ont été rapportées entre le transcriptome d'adipocytes issus de modèles *in vivo* et *in vitro* (McNeel et al., 2000; Soukas et al., 2001). Par exemple, Ding et al (Ding et al., 1999) ont observé que la quantité d'adipocytes matures est supérieure dans le tissu adipeux à celle observée en culture primaire puisque le degré de différenciation d'une culture primaire (estimé par coloration à l'Oil-Red-O) est de 2% à l'initiation de la différenciation (jour 0), 12% au jour 4 et de seulement 32% au 10<sup>e</sup> jour. Enfin, il est essentiel de considérer que l'hétérogénéité des cellules présentes dans le tissu adipeux apporte une nouvelle dimension à l'analyse du transcriptome. Ainsi, la régulation de la différenciation des adipocytes peut être fort différente dans un modèle *in vivo* puisqu'il faut alors tenir compte de la contribution des autres types cellulaires présents dans le tissu adipeux (facteurs paracrines), de même que des facteurs endocrines provenant de la circulation sanguine.

### **2.4.3. Les études transcriptomiques : les techniques**

Au cours des deux dernières décennies, de nombreuses méthodes ont été développées afin de mieux caractériser le transcriptome d'une cellule ou d'un tissu à un stade ou dans un état précis. Les analyses Northern, les protections à la nucléase et les « slot blot » ont été remplacées par des techniques à plus haut débit telles que les micropuces, la technique d'hybridation soustractive suppressive (SSH) et le pyroséquençage en parallèle à haute densité. Dans cette thèse, nous nous limiterons à décrire plus en détails la technique choisie pour notre projet de recherche, soit le SSH, que nous comparerons à la technique des micropuces, plus couramment utilisée dans les études transcriptomiques.

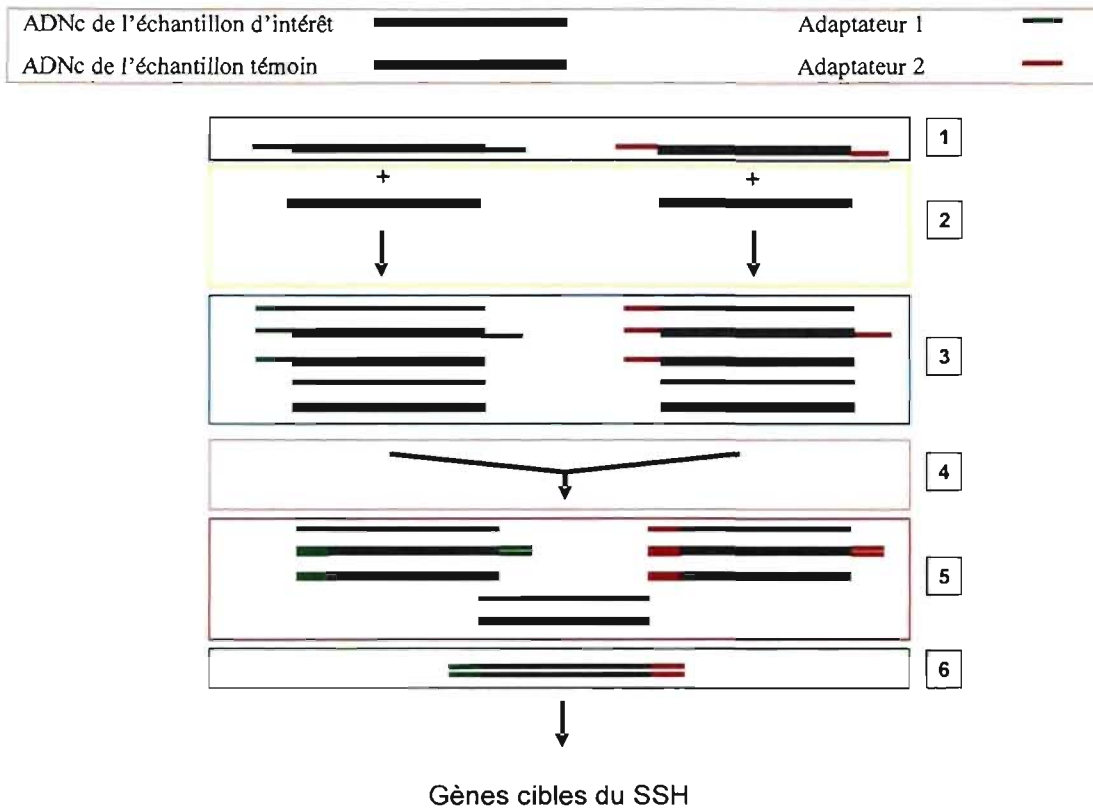
### ***2.4.3.1 Hybridation soustractive suppressive (Suppression subtractive hybridization : SSH)***

Les techniques d'hybridation soustractive sont d'excellents outils pour identifier les gènes différentiellement exprimés et impliqués dans divers types cellulaires, à différents temps ou après divers traitements (Diatchenko et al., 1999). Le principal avantage de la technique SSH, par rapport aux autres techniques d'hybridation soustractive, est qu'elle permet la normalisation de l'abondance des transcrits, ramenant ainsi les transcrits faiblement et fortement exprimés au même niveau. Cette technique est fondée à la fois sur la cinétique de réassociation des brins d'ADN ainsi que sur l'effet supprimeur du PCR.

Brièvement, l'ARNm de l'échantillon d'intérêt et de l'échantillon témoin est isolé et converti en ADNc à l'aide d'une transcriptase inverse. L'ADNc synthétisé est digéré à l'aide d'une enzyme de restriction permettant de générer des fragments de petites tailles à bouts francs. Cette fragmentation facilite les étapes subséquentes de l'hybridation en plus d'assurer une meilleure représentativité de chaque transcrit. Ensuite, l'ADNc de l'échantillon d'intérêt est divisé en deux fractions égales (Figure 7, étape 1). L'ADNc de chaque fraction sera lié à une paire de longs adaptateurs distinctifs. L'ADNc des échantillons (les deux fractions de l'échantillon d'intérêt et l'échantillon témoin) est dénaturé. L'ADNc de l'échantillon témoin est ajouté en excès à chacune des fractions d'ADNc de l'échantillon d'intérêt (Figure 7, étape 2). Ces mélanges d'ADNc sont laissés à la réhybridation (Figure 7, étape 3). Suite à cette réhybridation, nous retrouvons des séquences monocaténares n'ayant pas trouvé leur brin complémentaire (futurs gènes cibles du SSH), des séquences double brin homohybrides (appariements entre séquences du même échantillon causant l'effet normalisateur de la cinétique d'hybridation), et des séquences double brin hétérohybrides (appariement entre séquences de l'échantillon d'intérêt et témoin représentant l'effet soustractif de l'hybridation). Par la suite, les fractions de l'échantillon d'intérêt sont regroupées pour une seconde phase de réhybridation (Figure 7, étape 4). Un deuxième type de séquences homohybrides se forme ; l'appariement entre séquences de chaque groupe de l'échantillon d'intérêt qui se distingue par leurs adaptateurs. Ce sont les séquences cibles du SSH. Après le remplissage des extrémités 3'

en regard avec l'adaptateur, on procède à une amplification PCR des séquences cibles à l'aide d'une paire d'amorces complémentaires aux deux types d'adaptateurs utilisés (Figure 7, étape 5). Ainsi, les séquences homohybrides sans adaptateurs ne seront pas amplifiées. Les séquences hétérohybrides avec un seul adaptateur seront amplifiées, mais linéairement. Les séquences homohybrides (appariements entre les deux échantillons d'intérêt) possédant un même adaptateur à chacune de leur extrémité subiront l'effet suppresseur du PCR grâce à la présence de séquences complémentaires aux extrémités de chaque brin. Enfin, seules les hybridations entre les séquences de chaque lot de l'échantillon d'intérêt contenant les 2 types d'adaptateurs pourront être amplifiées exponentiellement (Figure 7, étape 6).

La technique du SSH est idéale pour identifier de nouveaux gènes ou de nouveaux variants puisqu'elle permet l'identification de gènes faiblement exprimés ou qui ne sont pas représentés sur les micropuces disponibles commercialement (Cao et al., 2004). En contrepartie, le SSH n'offre qu'une image partielle de l'ensemble des gènes différentiellement exprimés. De plus, il est possible de manquer certains gènes exprimés si ces derniers ne possèdent pas ou peu de sites de restriction pour l'enzyme de restriction utilisé. Il faut également prendre en considération que l'efficacité de l'amplification PCR dépend de la séquence et par conséquent, certaines séquences de la librairie peuvent être sur ou sous-représentées (Ji et al., 2002). Aussi, l'enrichissement par PCR est hautement dépendant du ratio de la concentration des gènes différentiellement exprimés, c'est-à-dire que l'enrichissement est de loin le plus efficace pour les gènes qui démontrent le plus grand écart d'expression entre les deux populations (Ji et al., 2002). Enfin, cette technique ayant tendance à générer une quantité non négligeable de faux positifs, il est essentiel d'effectuer une étape de validation (ex. PCR quantitatif en temps réel, dot blots) pour confirmer les différences d'expression des transcrits identifiés.



Adapté de Diatchenko et al., 1999.

### Figure 7. Hybridation soustractive suppressive (SSH)

Hybridation soustractive suppressive (SSH). 1. Suite à la digestion par une enzyme de restriction, l'ADNc de l'échantillon d'intérêt (bandes grises) est divisé en 2 parts égales, donc chacun sera associé à une paire d'adaptateurs différents (bandes rouges et vertes). 2. Dénaturation, suivie de la première hybridation avec un excès d'ADNc digérés de l'échantillon témoin. 3. Normalisation et soustraction; résultats des différentes combinaisons de l'appariement de séquences. Les séquences appariées ne pourront participer à la seconde hybridation. 4. Seconde hybridation : hybridation entre l'ADNc des deux lots de l'échantillon d'intérêt. 5. Résultats des différentes combinaisons d'appariement qui seront amplifiées linéairement ou qui ne pourront être amplifiées. 6. Résultat de l'hybridation qui mènera à l'amplification exponentielle des séquences correspondant aux gènes cibles du SSH.



### 2.4.3.2 *Micropuces*

Il existe principalement deux types de micropuce, soit les micropuces à cDNA et les micropuces à oligonucléotides (oligoarray). Dans les deux cas, des milliers de gènes peuvent être représentés sur un support solide, habituellement une simple lame de verre. L'ARNm de deux échantillons biologiques distincts est isolé. Chaque population d'ARNm ou ADNc est marquée par un fluorochrome différent. Les sondes, nouvellement créées, sont ensuite mélangées dans des proportions équimolaires et hybridées sur la micropuce. Après quelques lavages, un détecteur estime avec précision l'intensité de chaque fluorochrome associé à chacun des gènes représenté sur la lame. L'information est normalement représentée sous forme de ratio d'expression entre les deux populations d'ARNm. Ce type d'expérience génère une grande quantité d'information et nécessite donc l'utilisation de logiciels spécialisés pour effectuer les analyses. Il est possible d'analyser le profil d'expression de milliers de gènes simultanément pour un coût relativement modeste. Par l'analyse de ces résultats, de nouvelles interactions entre gènes connus et les voies biochimiques peuvent être identifiées. Il est également possible d'identifier les gènes altérés suite à une maladie ou en présence d'une drogue (Forster et al., 2003). L'achèvement du séquençage du génome porcine et l'accumulation de ESTs et de gènes clonés dans les banques de données publiques (ex. GenBank) contribuent à l'émergence de nouvelles plates-formes de micropuces pour analyses du transcriptome du porc (Caetano et al., 2003; Rothschild, 2003). Entre-temps, des hybridations inter espèces ont été effectuées en utilisant, par exemple, des tissus porcins qui sont hybridés à des micropuces humaines (Vallee et al., 2006; Tuggle et al., 2007). Le principal avantage des micropuces est de traiter une énorme quantité d'information en une seule expérimentation. Par l'utilisation de différents fluorochromes, il est possible de comparer directement l'abondance relative des transcrits entre deux populations. Contrairement à la technique du SSH, la micropuce ne permet pas de découvrir l'expression de nouveaux gènes puisque seuls les gènes connus ou les ESTs déjà identifiés peuvent se retrouver sur les lames. Les micropuces sont également moins sensibles à la détection des gènes faiblement exprimés à comparer au buvardage de type Northern et au QRT-PCR (Liang et al., 2004).

## **2.5. La paraoxonase 3, un facteur impliqué dans l'adipogenèse?**

Le transcrite de la paraoxonase 3 (PON3) a été identifié parmi les gènes différentiellement exprimés suite à une analyse SSH visant à identifier les gènes activés dans le tissu adipeux en développement chez la truie (voir section 4.1). Ces résultats suggèrent que PON3 serait impliqué dans le processus de l'adipogenèse et/ou de la lipogenèse. PON3 est un membre de la famille des paraoxonases (PON), laquelle inclut également PON2 et PON1. Chez l'humain, ces trois gènes sont positionnés les uns à côté des autres sur le chromosome 7 et ils présentent une forte homologie structurelle, avec une séquence d'acides aminés identique à 65% (Primo-Parmo et al., 1996). Chez les mammifères, les gènes de cette famille sont hautement conservés, suggérant un rôle physiologique important (Draganov et La Du, 2004). Chez l'humain, les paraoxonases, en particulier PON1, sont associés à une multitude de maladies reliées au syndrome métabolique (Senti et al., 2003) telles que l'hypercholestérolémie familiale, le diabète insulino-dépendant, l'athérosclérose (Aviram et Rosenblat, 2004), la défaillance rénale (Durrington et al., 2001), les maladies coronariennes (Aviram et al., 2005; Li et al., 2003; Ng et al., 2005; Burdon et al., 2005; van Himbergen et al., 2006) et le syndrome des ovaires polykystiques (PCOS) (Dursun et al., 2006).

### **2.5.1. PON3 : l'enzyme**

Une grande variété d'activités enzymatiques ont été attribuée aux membres de la famille des PONs, mais l'activité lactonase est la seule activité commune à toutes les trois (Teiber et al., 2003; Draganov et al., 2005). Contrairement à PON1, PON3 offre une activité arylestérase très faible et aucune activité paraoxonase. PON3 hydrolyse rapidement les lactones aromatiques et les lactones cycliques à 5 et 6 carbones contenant des chaînes aliphatiques. Ce n'est pas le cas pour les lactones contenant des chaînes polaires ou encore de simples lactones (Teiber et al., 2003; Draganov et al., 2000; Draganov et al., 2005). Récemment, les esters d'estrogènes ont été suggérés comme substrat naturel de PON3 (Teiber et al., 2007). La traduction de PON3 produit une protéine de 40 kDa. Comme PON1, elle serait associée à la fraction sérique des HDL, mais absente des LDL tant chez l'humain que chez le lapin (Reddy et al., 2001; Draganov et al., 2000). La protéine PON1

est 200 fois plus abondante dans le sérum de lapin que PON3. Mais des résultats *in vitro* sur l'activité antioxydante de ces molécules montrent que PON3 est beaucoup plus efficace que PON1 (Draganov et al., 2000). Le rôle de PON1 et PON3 serait de protéger les LDL de l'oxydation (Draganov et al., 2000). Plus spécifiquement, PON3 protège les LDL contre l'accumulation de lipides hydroperoxydés et inactive les phospholipides oxydés capables d'induire l'activité chimotactique des monocytes, suggérant que PON3 pourrait contrer l'athérosclérose (Reddy et al., 2001). Cependant, les possibilités que ce soit la fonction première de PON3 ont été atténuées lorsqu'il a été constaté que l'expression du gène PON3 n'est pas contrôlée par les lipides oxydés (Reddy et al., 2001; Van Lenten et al., 2001) alors que l'expression de PON1 est sensible à ces mêmes molécules (Rosenblat et al., 2003). De surcroît, l'association de PON3 aux HDL a été récemment mise en doute chez l'humain et la souris (Draganov, 2007; Shih et al., 2007). D'autres recherches seront nécessaires pour résoudre la fonction métabolique de PON3.

### **2.5.2. PON3 et le tissu adipeux**

Chez l'humain, l'ARNm de PON3 est surtout exprimé dans le foie, et dans une moindre mesure, dans le rein et le tube gastro-intestinal (Reddy et al., 2001; Shamir et al., 2005). Cependant, ces études n'ont pas vérifié l'expression de PON3 dans le tissu adipeux. Les paraoxonases ont d'abord été localisées intracellulairement au niveau des microsomes, le site de synthèse du triacylglycérol (Gil et al., 1993; Gonzalvo et al., 1998; Rosenblat et al., 2003; Rodrigo et al., 2003). L'expression de PON3 dans le tissu adipeux a été évaluée pour la première fois chez la souris où une corrélation négative a été rapportée entre les niveaux d'ARNm de PON3 dans le tissu adipeux et le poids total du tissu adipeux (Shih et al., 2007). Enfin, une réduction de l'adiposité a été observée chez des souris transgéniques surexprimant PON3, mais cette réduction n'est significative que pour les individus mâles, suggérant une possible interaction entre PON3 et certaines hormones sexuelles et/ou certains gènes liés au chromosome Y (Shih et al., 2007). La présence de transcrits de PON3 dans le tissu adipeux de souris suggère un rôle probable de PON3 dans le processus de la lipolyse et/ou de la lipogénèse. De plus en plus d'indices laissent présager une

association étroite entre le stress oxydatif systémique et l'obésité (Keaney et al., 2003; Olusi, 2002). L'augmentation du stress oxydatif est liée à l'accumulation de lipides dans le tissu adipeux, suggérant que ce processus serait un élément précurseur du syndrome métabolique chez l'humain (Furukawa et al., 2004). Puisque PON3 possède des propriétés anti-oxydatives, il pourrait intervenir favorablement pour contrer ce dérèglement métabolique. Cependant, les rôles exacts et les mécanismes d'action de PON3 dans le tissu adipeux restent à être déterminés.

## Section 3 - Objectifs et hypothèses

### 3.1. Problématique

Le tissu adipeux est maintenant reconnu comme un organe endocrinien à part entière ayant un rôle clé dans la balance énergétique, le métabolisme des lipides, la réponse immunitaire et même la reproduction. Les schémas de sélection génétique des dernières années ont contribué à réduire considérablement l'adiposité des carcasses de porc. Le tissu adipeux étant le siège d'une activité métabolique intense, nous croyons qu'une forte diminution du niveau d'adiposité, chez le porc, pourrait entraîner des problèmes de reproduction, une baisse de la qualité de la viande et des taux de réforme plus élevés. De plus, nous croyons qu'une gestion adéquate des réserves adipeuses, et par conséquent des produits sécrétés (ex. adipokines) par le tissu adipeux, nous permettrait d'améliorer la croissance, la productivité et la qualité de la viande chez le porc.

Une meilleure connaissance du transcriptome du tissu adipeux porcine nous permettrait de mieux caractériser les facteurs produits et les voies métaboliques utilisées dans les processus d'adipogenèse et/ou de lipogenèse. Il en résulterait aussi une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la croissance du tissu adipeux. Bien que plusieurs études transcriptomiques et protéomiques aient été récemment rapportées dans la littérature pour étudier les processus d'adipogenèse et/ou de lipogenèse, très peu ont utilisé des modèles *in vivo*. Le modèle *in vivo* utilisé dans cette étude nous permettra de caractériser le transcriptome des cellules adipeuses porcines de même que des autres cellules présentes dans le tissu adipeux. Nous avons choisi d'utiliser ce modèle puisqu'il reflète plus fidèlement le tissu adipeux dans son entier et qu'il tient compte de la contribution de toutes les cellules présentes.

### 3.2. Hypothèse

Parmi l'ensemble des gènes exprimés dans le tissu adipeux lors de l'adipogenèse et/ou de la lipogenèse, certains gènes peuvent non seulement participer à la régulation de la masse adipeuse mais peuvent aussi influencer directement ou indirectement certains caractères de production chez le porc.

### 3.3. Objectifs

1. Identifier, à l'aide de la technique de SSH, les gènes activés au cours du développement du tissu adipeux en utilisant un modèle *in vivo* d'adipogenèse/lipogenèse chez le porc.
2. Parmi la liste de gènes activés (identifiés à l'objectif 1), cloner et caractériser un nouveau gène (PON3). Étudier son profil d'expression dans le tissu adipeux de différentes races porcines présentant des phénotypes extrêmes de croissance et de quantité du tissu adipeux. Identifier la présence de polymorphismes dans ce gène et vérifier si certains variants sont associés à différents caractères de production chez le porc.

## **Section 4 - Articles rédigés**

### **4.1. Article 1**

**Identification of differentially expressed genes in a porcine *in vivo* model of adipogenesis using suppression subtractive hybridization.**

L'article présentée dans cette section sera publiée dans la revue « Comparative Biochemistry and Physiology part D » sous la référence suivante :

Labrecque, B., Mathieu, O., Bordignon, V. Murphy, B.D., Palin, M.F. 2008. Identification of differentially expressed genes in a porcine *in vivo* model of adipogenesis using suppression subtractive hybridization. Comparative Biochemistry and Physiology part D : Genomics and Proteomics. doi: 10.1016/j.cbd.2008.10.002

**Identification of differentially expressed genes in a porcine *in vivo* model of adipogenesis using suppression subtractive hybridization.**

Benoît Labrecque <sup>a</sup>, Olivier Mathieu <sup>b</sup>, Vilceu Bordignon <sup>c</sup>, Bruce D. Murphy <sup>a</sup>, Marie-France Palin <sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Centre de Recherche en Reproduction Animale, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Quebec, Canada, J2S 7C6; <sup>b</sup> Dairy and Swine Research and Development Centre, Agriculture and Agri-Food Canada, Sherbrooke, Quebec, Canada, J1M 1Z3. <sup>c</sup> Department of Animal Science, McGill University, Ste-Anne de-Bellevue, Quebec, Canada H9X 3V9.

Marie-France Palin, Agriculture and Agri-Food Canada

2000 rue Collège, C.P. 90, Sherbrooke, Quebec, Canada, J1M 1Z3

(Telephone: 819-565-9174 ext. 207; FAX: 819-564-5507; E-mail adress:

████████████████████



## Abstract

Although they provide valuable information, *in vitro* models of adipocyte development often require high doses of hormones and growth factors, which may influence gene expression and adipocyte differentiation patterns. To overcome these problems, a novel *in vivo* model of adipose tissue development was used to characterize genes involved in adipogenesis. The suppression subtractive hybridization technique was used to identify genes showing differential expression between the adipose tissue of a day 90 gestating sow, which is enriched in adipocytes, and day 90 fetal adipose tissue, which is enriched in preadipocytes. A total of 149 expressed sequence tags corresponding to identify genes and tentative consensus sequences emerged. Thirty-seven clones matched expressed sequence tags or genomic DNA sequences and six novel sequences were also identified. Adipogenesis-related genes were identified, many of which have never been reported to be expressed in mammalian adipose tissue, and may play a role in regulation of adipose tissue differentiation. Validation of differentially expressed genes was confirmed for perilipin, monocyte to macrophage differentiation-associated, myocilin, paraoxonase 3, stearoyl-CoA desaturase, angiotensinogen and adiponectin genes using real-time RT-PCR.

*Keywords:* Adipocytes; Adipogenesis; Adipose tissue; Gene expression; Gene expression profiling; Swine.

## 1. Introduction

In mammals, the principal function of the white adipose tissue (WAT) was long believed to be limited to energy storage in the form of triacylglycerols and release of fatty acids during periods of negative energy balance. Scientific advances of the last decades have revealed that the WAT is also a highly dynamic endocrine organ that contributes to the regulation of physiological and metabolic processes (Trayhurn, 2005; Rosen and Spiegelman, 2006).

As a first step towards the identification of genes involved in adipogenesis, efforts were made to characterize the transcriptome and proteome of adipose tissue and adipocytes in humans and rodents under different conditions. *In vivo* studies have been conducted in humans and rodents using microarray analysis to describe adipose tissue gene expression profiles (Soukas et al., 2000; Lopez et al., 2003; Taleb et al., 2006). Most studies, nonetheless have investigated global gene or protein expression during adipocyte differentiation and were performed on *in vitro* models of adipogenesis such as the 3T3-L1 adipogenic cell line (Kratchmarova et al., 2002; Gerhold et al., 2002; Welsh et al., 2004; Burton et al., 2004; Burton and McGehee, 2004; Hackl et al., 2005) or primary cultures of adipose-derived stem cells (Urs et al., 2004; DeLany et al., 2005). These models require high doses of hormones and growth factors to induce adipocyte differentiation, treatments that are expected to influence gene expression and adipocyte differentiation patterns. Such influence was recently reported by Soukas et al. (Soukas et al., 2001), who found that gene expression profiles differed for preadipocytes and adipocytes from *in vitro* cell cultures compared with the stromal and adipocyte fractions of WAT. In pigs, differences in the abundance of adipocyte transcripts have also been observed between stromal-vascular (S/V) cell cultures and WAT collected from animals (Ding et al., 1999).

There are few studies on the global expression profile of porcine WAT or adipocytes. Chen et al. (Chen et al., 2006) identified 1,527 unique cDNA sequences using a full-length cDNA library from WAT of 18-month-old Lee-Sung pigs. Similarly, a total of 5,008 unique full-length cDNA sequences were identified from pooled RNA samples extracted from WAT of 1, 7, 12, 18 and 24 week-old Landrace × Large White crossbred pigs (Kim et al., 2006). Using the suppression subtractive hybridization (SSH) technique, Wang et al (Wang et al., 2006) identified 122 cDNA fragments that are differentially expressed between S/V cells and adipocytes isolated from WAT of 2-month-old Lee-Sung pigs.

Recently, microarray and proteomic analyses were used to identify proteins secreted by neonatal and fetal porcine adipocytes and adipose tissue (Hausman et al., 2006), and to determine the pattern of gene expression in subcutaneous (s.c.) adipose tissue of growing gilts (Hausman et al., 2008). Finally, a cDNA microarray study allowed the identification of cytokines and apolipoproteins in outer and middle s.c. adipose tissue depots from 90-, 150-, and 210-d-old pigs (Hausman et al., 2007). None of the porcine studies has so far compared the transcription profile of fully differentiated WAT of an adult pig with fetal adipose tissue, which is enriched in preadipocytes. To address our objective of establishment of an *in vivo* model that would allow the identification of genes having key roles in adipogenesis, the SSH technique was used to identify genes that are differentially expressed between s.c. adipose tissue of a Day 90 pregnant sow, a source of differentiated adipocytes, and s.c. adipose tissue from the sow's fetuses, a source of preadipocytes. Adipogenesis-related genes were identified, many of which have never been reported to be expressed in mammalian adipose tissue and which may play a role in the regulation of adipose tissue development.

## **2. Material and methods**

### *2.1. Animals and tissue collection*

Subcutaneous adipose tissues were collected from one multiparous Yorkshire-Landrace (YL) gestating sow (*Sus scrofa*) (day 90) and her fetal pigs (n = 7) to perform the SSH library and QRT-PCR analysis. Three additional multiparous YL gestating sows (day 90) and their fetuses (n = 6), generously provided by Génétiporc (St-Bernard, Qc, Canada), were used to perform validation of selected SSH clones. All sows received 2.5 kg daily of a basal diet (50% [w/w] corn, 20% barley, 20% wheat bran, 5% soybean) and had free access to water. Heat detection was performed twice a day, between 8:00 and 9:00 am and between 4:00 and 5:00 pm, by introducing a boar into the pen. Sows were inseminated twice with Landrace mix semen (pooled semen from three Landrace boars of proven fertility [CIPQ, Inc. St-Lambert, QC, Canada]), 12 h and 24 h after oestrus detection. The time of the first insemination was considered as day 0. Two cyclic sows (Duroc × YL) were also used for tissue distribution analysis.

All procedures involving animals were approved by the local Animal Care Committee following the guidelines of the Canadian Council on Animal Care (1993). The rationale for choosing day 90 gestating sows and their fetuses stems from previous studies reporting that maximal s.c. adipose tissue depth is reached between day 85 of gestation and weaning day in sows (Dourmad et al., 2001), thus providing a rich source of fully differentiated adipocytes. It also relates to the fact that day 90 fetuses provide a good source of preadipocytes (Hausman et al., 2006) and to the relative ease of isolating adipose tissues from skeletal muscle tissue at that specific time.

Adipose tissue samples were collected from backfat locations on animals used in the SSH library and for QRT-PCR analysis. Samples collected from cyclic sows included s.c. and perirenal adipose tissues, lung, liver, ovary, uterus, pituitary, kidney, skeletal muscle, stomach and heart. All samples were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C.

## *2.2. RNA extraction, complementary DNA synthesis and semiquantitative reverse transcription-polymerase chain reactions*

Total RNA extraction and complementary DNA synthesis were performed as previously reported (Lord et al., 2005). Since the demarcation between fetal s.c. adipose and skeletal muscle tissues was not always clear-cut, preliminary verifications were performed prior to the SSH analysis to confirm muscle cells would not be taken with s.c. adipose tissue samples. PCR analyses were performed on cDNA from s.c. adipose tissues of day 90 YL gestating sow and her fetuses. Amplification of troponin T type 1 (TNNT1) was performed to verify the presence of skeletal muscle cells in s.c. adipose tissue samples, and amplification of delta-like 1 homolog (DLK1) isoforms was used to confirm the presence of preadipocytes. The adiponectin (ADIPOQ) gene was amplified to confirm the presence of mature adipocytes in adipose tissues. Porcine peptidylprolyl isomerase A (PPIA; EC 5.2.1.8) was used as an internal control. Skeletal muscle tissue was used as a positive control for TNNT1 amplification and lung tissue was used as negative control of TNNT1 and ADIPOQ genes.

Primers were designed based on available porcine GenBank sequences (Table 1). For each gene, the 50- $\mu$ l PCR reaction contained 200  $\mu$ M dNTPs, corresponding concentrations of

MgCl<sub>2</sub> (Table 1), 2.5 U of *Taq* polymerase in 1x *Taq* polymerase buffer (Amersham Biosciences, Baie d'Urfée, QC, Canada) and corresponding concentrations of primers (Table 1). For each gene, the PCR profiles consisted of an initial denaturing step at 94°C for 2 min, an appropriate number of cycles of denaturing at 94°C for 1 min, annealing at the corresponding temperature (Table 1) for 1 min, extension at 72°C for 1 min, and a final extension at 72°C for 5 min in a programmable PTC-100 thermal cycler (MJ Research, Inc., Watertown, MA, USA). The PCR-amplified products were run on a 1.5% (w/v) agarose gel and stained with ethidium bromide. Pictures of resulting gels were taken on Polaroid films (Polaroid Co., Cambridge, MA, USA). The PCR reactions were done in duplicate.

### *2.3. Suppression subtractive hybridization*

One µg of total RNA from s.c. adipose tissue of a day 90 gestating sow (tester) and from day 90 fetus (driver) was used for cDNA production. The mRNAs were reverse transcribed and the cDNA were amplified using the BD SMART<sup>tm</sup> PCR cDNA Synthesis Kit (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA, USA). The SSH was performed with the PCR-Select cDNA Subtraction Kit (BD Biosciences Clontech) as described by the manufacturer. The PCR amplifications were performed according to a standard protocol (PCR-Select cDNA Subtraction Kit) in an Eppendorf Mastercycler PCR (Brinkmann Instruments, Inc., Westbury, NY, USA). The cDNA subtraction efficiency was estimated by comparing glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; EC 1.2.1.12) cDNA abundance before and after subtraction through the use of increasing numbers of PCR cycles. Subtracted PCR products generated by SSH were cloned into pCR II vector and transformed into DH5α MAX Efficiency competent cells (Invitrogen Life Technologies). One thousand clones were randomly selected from subtracted library.

### *2.4. Differential Screening*

The cDNA inserts obtained from the different clones were amplified by PCR. Briefly, a bacterial colony was picked and resuspended in 200 µl Luria Bertoni (LB) Broth with ampicillin (100 µg/ml) and grown for 2h at 37°C. The PCR amplifications were carried out on 2 µl of bacterial suspension with the Advantage 2 polymerase mix (BD Biosciences Clontech), using nested primer 1 (5'-TCGAGCGGCCCGCCCGGCAGGT-3') and primer

2R (5'-AGCGTGGTCGCGGCCGAGGT-3') (BD Biosciences Clontech), according to the manufacturer's instructions. To identify insert-containing clones, 5 µl from each PCR reaction was electrophoresed in a 2% agarose gel. The PCR products from insert-containing clones were then dotted onto 8 identical Hybond-N+ membranes (Amersham Biosciences). Forward and reverse subtracted PCR products as well as nonsubtracted cDNA from testers and drivers were used as probes to hybridize each identical dot blot membrane containing the PCR-amplified cDNA inserts. The latter procedure was performed in duplicate. Probes were labelled using PCR-Select Subtraction Hybridization Kit (BD Biosciences Clontech) in the presence of [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP (Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA). The labelled probes were purified using CHROMA SPIN-100 Columns (BD Biosciences Clontech). Membranes were prehybridized with the ExpressHyb Solution (BD Biosciences Clontech) for 2 h at 72°C with continuous agitation. Membranes were then hybridized with equivalent amounts of labelled probes and then washed according to standard protocols. Results were digitized using a Storm 840 PhosphoImager and analysed with the ImageQuant software (Amersham Biosciences). Clones selected for sequencing were those showing  $\geq$  5-fold differences in signal intensity between forward and reverse libraries.

### *2.5. DNA sequencing and analysis*

DNA sequencing was performed using an automated ABI 377 DNA Sequencer (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Sequence reactions were carried out with the Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (PE Applied Biosystems), using M13 FWD (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3') and M13 REV (5'-AACAGCTATGACCATG-3') primers. The resulting porcine cDNA sequences were trimmed from vector and adaptor sequences using the National Centre for Biotechnology Information (NCBI) VecScreen program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html>). To search for sequence similarity, trimmed sequences were compared against the non-redundant (nr) and expressed sequence tag NCBI GenBank databases using the online Basic Local Alignment Search Tool (Blastn) program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). All cDNA sequences identified in the current study were submitted to GenBank (Accession nos. **DT654433** to **DT654630**). Sequences that could not be annotated through GenBank

databases were compared against the Dana-Farber Cancer Institute (DFCI) *Sus scrofa* Gene Index (SsGI; release 12.0) database (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/tgipage.html>). The SsGI is based on clustering of EST sequences in high-fidelity virtual transcripts, called tentative consensus (TC) sequences. Using the Expression Analysis Systematic Explorer (EASE) 2.0 software linked to the Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery (DAVID; <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) (Hosack et al., 2003), genes were categorized to proper GO terms from the Gene Ontology Consortium annotation categories for molecular functions and biological processes. This tool was used to generate a list of over-represented GO terms from our list of annotated genes (91 genes). Gene annotation enrichment analysis and over-represented genes in biological pathways were categorized using the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG PATHWAY; <http://www.genome.jp/kegg/>) (Kanehisa et al., 2002) and DAVID (Huang da et al., 2007) databases.

#### *2.6. Validation of SSH Clones Using Quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reactions*

Validation of 10 randomly selected SSH clones was carried out using QRT-PCR analyses. Total RNA from s.c. adipose tissue of day 90 YL gestating sows (n = 4) and day 90 fetuses (n = 7) was extracted and reverse-transcribed as previously described (Lord et al., 2005). Primers were designed based on available sequences of cloned SSH cDNA fragments (Table 2) and were selected using the Primer Express software (PE Applied BioSystems). The QRT-PCR amplifications were performed in 25- $\mu$ l reaction volume consisting of 300 nM of each primer, 12.5  $\mu$ l of 2x SYBRGreen Master Mix (PE Applied BioSystems), and 5  $\mu$ l of cDNA. Cycling conditions were 10 min at 95°C, followed by 40 cycles of 15 sec at 95°C and annealing and polymerization at corresponding temperatures for 1 min (Table 2). Amplification, detection and data analysis were performed with an ABI 7700 Prism Sequence Detector (PE Applied BioSystems). Samples were normalized using PPIA and GAPDH as housekeeping genes (HKG). It was earlier demonstrated that GAPDH is one of the best suited HKG for studies in human adipocytes and preadipocytes (Gorzelnik et al., 2001). All QRT-PCR amplifications were performed in triplicate and standard curves were prepared for each gene. Target genes and HKG were run in separate assays. A pool of s.c.

adipose tissue cDNA (from all gestating sows and fetuses) was used to create a standard curve for quantification of transcripts using the relative standard curve method as described by Applied BioSystems (Applied Biosystems, 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 HKG mRNA was determined from the corresponding standard curves. Relative quantity ratios were obtained by dividing the relative quantity units of selected genes by those of HKG. Mean values from triplicates were then used to perform statistical analyses. Specificity of amplified products was verified on 3% agarose gel and with the melting curve analysis.

### *2.7. Tissue distribution of selected SSH clones*

Tissue distribution of selected differentially expressed SSH clones was performed using semiquantitative RT-PCR assay. Total RNA from s.c. and perirenal adipose tissues, lung, liver, ovary, uterus, pituitary, kidney, skeletal muscle, stomach and heart of cyclic sows was extracted and reverse-transcribed. Briefly, first strand cDNA was synthesized with Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen Life Technologies) from 2 µg of total RNA. Primers were designed based on the available sequences of cloned SSH cDNA fragments (Table 3). The PCR amplifications were performed in a 50-µl total volume containing a 2-µl aliquot of the reverse transcription product, corresponding concentrations of forward and reverse primers and MgCl<sub>2</sub> (Table 3), 200 µM dNTPs and 0.5 unit of *Taq* polymerase in 1 X *Taq* polymerase buffer (Amersham Biosciences). The PCR profiles consisted of an initial denaturation step at 94°C for 2 min, followed by various cycle numbers of denaturing at 94°C for 1 min, annealing at corresponding temperature (Table 3) for 1 min, extension at 72°C for 1 min, and a final extension at 72°C for 5 min. The relative mRNA levels of each gene were determined with the FluorChem SP imaging system densitometer using the associated quantification software program (Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA). The optical density value of each sample was normalized to PPIA optical density value since this HKG showed the least variation among samples. Amplifications were performed in duplicate using tissue samples from two animals and



results were reported as percentage of s.c. adipose tissue, which was given a value of 100%.

### *2.8. Statistical analysis*

Data from QRT-PCR were analysed using the MIXED Procedure of SAS (2002). Comparison of relative mRNA abundance in s.c. adipose tissue of maternal and fetal origin was performed using a one-way ANOVA (Student t-test). Tissue distribution results were analyzed using a one-way ANOVA and each tissue was then compared with the s.c. adipose tissue, which was given a value of 100%, using a Dunnett correction. Results are presented as least-square means  $\pm$  SEM and were considered to be significant when  $P < 0.05$ .

## **3. Results**

### *3.1. Characterization of adipose tissue samples*

To verify whether the collected adipose tissues contained the expected adipocytes and preadipocytes, and were not contaminated with skeletal muscle cells, a preliminary verification was performed using semiquantitative RT-PCR analyses (Fig. 1). The amplification of DLK1 isoforms (Deiuliis et al., 2006) confirmed the presence of preadipocytes in s.c. adipose tissue of all tested fetuses. The absence of DLK1 amplicons in the sow subcutaneous adipose tissue is consistent with the rarity of preadipocytes in that tissue. Sequencing of amplified fragments confirmed the presence of 4 isoforms for the porcine DLK1 gene (data not shown). The TNNT1 transcript was found in adipose tissues from all fetuses except for fetus No. 3 (Fig. 1). The decision was made to keep only s.c. adipose tissue sample from fetus No 3, since it was the only one that did not contain skeletal muscle cells. Amplification of ADIPOQ was observed in all tested adipose tissues but higher expression levels were found in subcutaneous adipose tissue from the gestating sow.

### *3.2. Identification of differentially expressed genes*

The present study used SSH to identify differentially expressed cDNAs between adipose tissue from a day 90 gestating sow, which is enriched in adipocytes, and day 90 fetal

adipose tissue, which is enriched in preadipocytes. Fig. 2 shows the assessment of subtraction efficiency determined by PCR amplification of the porcine GAPDH gene. The amount of GAPDH cDNA was significantly reduced in the subtracted cDNA library relative to the nonsubtracted library as a total of 33 PCR cycles were required to detect GAPDH transcripts in the subtracted library compared to 18 cycles in the nonsubtracted library.

After the subtracted cDNAs were cloned and transformed, a total of 1,000 SSH clones were randomly selected. The PCR amplifications of cDNA inserts then revealed that 776 clones were insert-containing clones. The cloned insert sizes ranged from 75 to 1,250 base pairs (bp), and the average fragment size was 514 bp. The differential screening procedure identified 348 cDNA clones that had a hybridization signal  $\geq 5$  between sow and fetal adipose tissues. All of these differentially expressed clones were then analyzed by DNA sequencing. Following bioinformatic analysis, 192 non-redundant expressed sequence tags (ESTs) were obtained: 149 ESTs corresponded to identified and tentative consensus (TC) sequences, 37 ESTs to GenBank ESTs or genomic DNA sequences and 6 clones to novel sequences (Table 4). A total of 42 genes were represented by more than 2 clones and the top five most redundant clones were stearoyl-CoA desaturase (SCD, 86 clones), apolipoprotein R (C4BPA, 22 clones), Annexin A2 (ANXA2, 10 clones), fatty acid translocase CD36 (CD36, 9 clones) and elongation of long chain fatty acids family member 6 (ELOVL6, 8 clones).

### 3.3. Gene ontology term analysis

To gain further information on the biological importance of transcripts that were differentially expressed, the total list of non-redundant identified genes (Total of 91) was subjected to functional annotation based on the Gene Ontology Consortium annotation categories for molecular functions and biological processes using the *Homo sapiens* DAVID bioinformatics resources. Table 5 shows the distribution of Gene Ontology categories having  $P$  values  $\leq 0.10$ . Some of the differentially expressed genes could be classified in more than one category. Among the biological process categories, transport, generation of precursor metabolites and energy and cell organization and biogenesis contributed for 28.6%, 15.4% and 14.3% of the total identified SSH genes, respectively.

Catalytic activity (44%), protein binding (33%) and oxidoreductase activity (18%) were the principal molecular function categories identified.

#### *3.4. Biological pathways linked to the development of adipose tissues*

Predominant biological pathways directed by adipose tissue development were suggested using KEGG PATHWAY and DAVID Functional Annotation databases (Table 6). Pathways were classified by associated gene number using the *Homo sapiens* KEGG PATHWAY search and DAVID Functional Annotation programs with the group of 91 identified genes. The peroxisome proliferator-activator receptor (PPAR) signalling pathway was the most relevant with 7 associated genes followed by the Tight junction pathway with 4 genes. Three differentially expressed genes were found in each of the following pathways: glutathione metabolism; valine, leucine and isoleucine degradation; oxidative phosphorylation; tryptophan metabolism; and leucocyte transendothelial migration.

#### *3.5. Validation of the SSH technique*

To further verify and validate results obtained with the SSH technique, quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (QRT-PCR) analyses were performed on 10 randomly selected cDNAs consisting of 3 unknown sequences and 7 identified genes: perilipin (PLIN); monocyte to macrophage differentiation-associated (MMD); myocilin (MYOC); paraoxonase 3 (PON3); angiotensinogen (AGT); SCD and ADIPOQ (Table 7). The QRT-PCR analyses were performed on maternal and fetal s.c. adipose tissues from day 90 gestating sows (n = 4) and their fetuses (n = 7) to confirm the differential expression of selected candidates. Among the 10 clones that were validated, 9 showed greater mRNA levels in s.c. adipose tissues collected from sows compared with s.c. adipose tissue of fetal origin ( $P < 0.05$ ). These results demonstrate the low false positive rate associated with the SSH technique in this experiment.

#### *3.6. Tissue distribution of selected SSH clones*

Seven clones (MMD; PLIN; MYOC; AGT and clones 306, 549 and 819) of 10 randomly selected candidates were chosen for determination of mRNA abundance in porcine tissues. Stearoyl-CoA desaturase and ADIPOQ genes were not included in this analysis since their

mRNA tissue distribution was previously reported in pigs (Ren et al., 2004; Lord et al., 2005), whereas PON3 tissue distribution described in section 4.2. For the genes that were chosen, the highest mRNA abundance was found in perirenal and s.c. adipose tissues (Fig. 3). The differentially expressed genes of unknown identity represented by clones 306, 549 and 819 and the MMD gene were likewise expressed in all the porcine tissues tested. The MYOC and PLIN genes were principally present in adipose tissues with marginal expression found in other tissues. Finally, the AGT mRNA abundance was high in liver and adipose tissues, moderate in lung and heart tissues and barely detectable in other tissues.

#### **4. Discussion**

The *in vivo* biological model used in the current study compared s.c. adipose tissue of fetal origin, which is enriched in preadipocytes, and s.c. adipose tissue from an adult sow, which is enriched in differentiated adipocytes. The adipose tissue from growing pigs also contains non-adipocyte cell types such as endothelial, immune and fibroblast cells whose secreted factors also play a role in the regulation of adipose tissue growth (Hutley et al., 2001). *In vitro* models of stromal vascular fraction and of adipogenic cell lines do not consider the contribution of these non-adipocyte cell types in adipocyte differentiation, as did the present biological model. Moreover, because non-adipocyte cells represent a smaller cell fraction, as compared with differentiated adipocytes, we believe that the SSH technique is a more appropriate tool since it allows the identification of low-abundance transcripts, which are often missed in microarray analyses. In the current study, adipogenesis-related genes were identified, many of which had previously been reported in mammalian adipose tissues and adipogenic cell lines (ex. ADIPOQ, lipoprotein lipase (LPL) and diazepam binding inhibitor (DBI)). These genes validate our biological model and the SSH method used while strengthening previous studies. However, we cannot rule out the possibility that some specific genes may have been identified because of the pregnancy status of the sow and that these genes may not be relevant to the adipogenesis process itself. Moreover, the low false positive rate observed with the QRT-PCR analyses provides an additional confirmation of the validity of our SSH data. Interestingly, several differentially expressed genes identified in the current study had not previously been reported to be expressed in mammalian adipose tissue (ex. MYOC, CCR4-NOT transcription complex subunit 4 (CNOT4) and

epidermal retinal dehydrogenase isoform 2 (RDHE2)). This may be due, in part, to the presence of non-adipocyte cells in our model and also to the fact that the SSH technique enables the detection of low abundance transcripts (Cao et al., 2004). Some adipocyte-specific genes, such as peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARG), were not identified in our SSH library. However, many PPARG downstream targets (DBI, fatty acid binding protein 3 (FABP3), LPL, PLIN, SCD, ADIPOQ and CD36) were found to be differentially expressed. The absence of this important regulator of adipose tissue differentiation (Arimura et al., 2004) may be attributed to our limitation of sequencing to SSH clones having a cut-off limit  $\geq 5$ , after the differential screening, which might have resulted in the omission of genes having lower expression level differences between sow and fetal adipose tissues. Alternatively, PPARG mRNA abundance in the s.c. adipose tissue may have reached a similar level in day 90 fetuses and day 90 pregnant sow. This would agree with a previous study reporting that PPARG is expressed in the adipose tissue as early as 50 days of the pig fetal development, which is several days before lipid filling begins (Kim et al., 2000).

Seven of the ten randomly selected genes were further analyzed to determine the tissue distribution of their transcripts. Myocilin and PLIN gene expression were higher in perirenal and s.c. adipose tissues compared with the other tissues. Myocilin was initially cloned from a human retina-specific cDNA library (Kubota et al., 1997) and mutations in this gene were found to be associated with primary open-angle glaucoma (Gong et al., 2004). Previous studies have also found MYOC transcripts in skeletal and heart muscles (Ortego et al., 1997; Kubota et al., 1997) but, to our knowledge, this is the first time that MYOC gene expression has been reported in adipose tissues. Perilipin is a major adipocyte protein whose expression is restricted to adipocytes and steroidogenic cells (Servetnick et al., 1995; Tao et al., 2008). This protein plays a central role in the accumulation and mobilization of triacylglycerol in adipocytes, and it is a downstream target of PPARG, a key regulator of adipogenesis (Arimura et al., 2004). In our study, three unknown genes (306, 549 and 819) and the MMD gene transcripts were ubiquitously expressed, with the highest levels found in adipose tissues. Although the MMD gene was identified in macrophages some time ago (Rehli et al., 1995), its specific role remains to be elucidated. Nevertheless, the identification of MMD transcripts in our SSH library may reflect the

higher accumulation of macrophages within fully differentiated adipose tissue. Previous studies have demonstrated that adipose tissue macrophage numbers increase in obesity and are involved in the development of a state of chronic inflammation, which contributes to insulin resistance and type 2 diabetes (Xu et al., 2003; Weisberg et al., 2003). As we observed in the current study, white adipose tissue is a major extrahepatic site of synthesis of AGT, the precursor of angiotensin II (Engeli et al., 2000). Interestingly, a targeted overexpression of AGT in mice adipose tissue resulted in adipocyte hypertrophy, fat mass enlargement, enhanced secretion of AGT in blood and increased blood pressure, suggesting that adipose AGT may be involved in hypertension development in obese subjects (Massiera et al., 2001).

#### *4.1. Abundantly represented genes in the SSH library*

Some of the differentially expressed clones accounted for a large proportion of the SSH library. For example, 86 cDNAs corresponded to the SCD gene. Similarly, SCD was previously identified as an abundantly expressed gene in various large-scale transcriptome studies related to adipose tissue and adipocyte differentiation in cattle and swine, (Wang et al., 2006; Chen et al., 2006; Tan et al., 2006). Stearoyl-CoA desaturase is a membrane-bound enzyme whose principal product is oleic acid (18:1, n-9), which is mainly incorporated in triacylglycerols, the adipocyte energy reserve (Nakamura and Nara, 2002). Moreover, SCD is considered one of the major lipogenic genes, whose expression increases in differentiating adipocytes (Wang et al., 2006) and whose deficiency activates fatty acid oxidation and reduces triglyceride synthesis (Ntambi et al., 2002).

Among our abundantly represented genes, 22 clones corresponded to the apolipoprotein R gene. This gene encodes for a 23-kDa protein found in very low-density lipoproteins (VLDL) and chylomicrons in pig plasma (Cooper and Attie, 1992). Although its biological function remains to be determined in adipose tissue, this gene was recently reported to be abundantly expressed in a porcine adipose tissue cDNA library (Chen et al., 2006).

In the current study, a total of 10 SSH clones corresponded to the ANXA2 gene, a calcium-dependent phospholipid-binding protein found on many cell types. Similarly, ANXA2 was found to be abundantly expressed in porcine adipose tissue in a study that used an expressed sequence tag approach (Chen et al., 2006). This protein binds acidic

phospholipids, heparin and F-actin in a calcium-dependent manner (Rescher and Gerke, 2004). ANXA2 was recently described as a thiazolidinedione response gene involved in insulin-induced glucose transporter (solute carrier family 2 (SLC2A4)) translocation in 3T3-L1 adipocytes (Huang et al., 2004). Moreover, the ANXA2 protein level is lower in small adipocytes than in large ones, suggesting a key role in lipogenesis (Bluher et al., 2004).

Nine clones in our SSH library corresponded to the CD36 gene, which is a membrane glycoprotein known to play an important role in the transport of long-chain fatty acids. Studies using CD36-deficient mice have demonstrated the gene's key role in adipocyte lipid accumulation, with the CD36  $-/-$  mice being leaner and protected from high fat diet-induced obesity (Hajri et al., 2007). Interestingly, CD36 gene expression in adipose tissue is dependent upon the transcriptional activation of PPARs through the use of PPAR-responsive elements found in the CD36 promoter (Teboul et al., 2001).

Finally, among the abundantly represented clones, a total of 8 clones corresponded to the ELOVL6 gene, which was previously reported to be an abundantly expressed gene in pig adipose tissue (Chen et al., 2006). This gene encodes for an elongase that catalyzes the conversion of palmitate to stearate and is now recognized as a member of the mammalian lipogenic enzymes that are regulated by sterol regulatory element binding transcription factor 1 (SREBF1) (Matsuzaka et al., 2002).

#### 4.2. Gene ontology (GO) analysis

In order to increase our understanding of the biological processes involved in our model, the 91 non-redundant identified genes were classified according to their biological process and molecular function GO terms. With respect to the molecular function GO term, 44% and 41.8% of identified genes were distributed in the catalytic activity and binding categories, respectively. These two categories were also found to exhibit the highest number of genes in *in vitro* models of adipogenesis (Tan et al., 2006; Taniguchi et al., 2008) or in large-scale expressed sequence tag studies of porcine WAT (Chen et al., 2006; Kim et al., 2006). Genes involved in oxidoreductase activity (18 genes) and in monooxygenase activity (4 genes) accounted for a large proportion of those over-represented in the catalytic activity category. The presence of these genes is consistent with

the idea that the adipose tissue is a metabolically active tissue supporting a wide array of cellular functions. The binding category was mostly represented by genes having protein binding (30 genes) and lipid binding (6 genes) activities. It is not surprising to find a large proportion of our identified genes in the binding category, as this molecular function is required for transcriptional activation and cell signalling, two highly active processes in adipogenesis.

A major function of the mammalian adipose cell is the synthesis, storage and degradation of triacylglycerols, that account for up to 80% of the adipocyte weight. As expected, we found biological process categories such as lipid metabolism (8 genes), lipid transport (3 genes), acyl-CoA metabolism (3 genes) and generation of precursor metabolites and energy (14 genes) to be well represented. Four genes were classified in the tricarboxylic acid cycle intermediate metabolism GO term. This cycle is part of a metabolic pathway involved in the conversion of fats into carbon dioxide and water, thus generating energy. The identification of genes related to the glucose metabolism GO term is not surprising in our *in vivo* model of adipogenesis since it was recently demonstrated that high glucose concentrations have an adipogenic effect on adipose-derived stem cells (Aguari et al., 2008). Finally, a large proportion of our identified genes (26 genes) were categorized in the transport GO term, many of which were then found within the electron transport (6 genes), nucleocytoplasmic transport (4 genes) and lipid transport (3 genes) GO terms. In a previous study, genes in this category were also well-represented and found to be upregulated in human adipocytes (Urs et al., 2004).

#### *4.3. Biological pathways identified*

Because PPARs are well-known transcription factors and key regulators of adipogenesis (Gregoire, 2001), it was not surprising to identify the KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) PPAR signalling pathway in the current study. Genes known to be involved in lipid metabolism (SCD, DBI, FABP3, LPL and CD36) or having active roles in adipocyte differentiation (PLIN and ADIPOQ) were identified in this pathway. PPARs are nuclear receptors involved in the transcriptional regulation of lipid metabolism, energy balance, inflammation, and atherosclerosis (Ahmed et al., 2007). It was reported that PPARG expression levels are induced during the differentiation of preadipocytes to



adipocytes in pigs (Grindflek et al., 1998) and in 3T3-L1 cells (Chawla et al., 1994; Ding et al., 1999). In addition, an increase in expression/activation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARA) results in the terminal differentiation of preadipocytes into adipocytes (Chawla and Lazar, 1994; Brun et al., 1996).

In this study, the KEGG oxidative phosphorylation pathway that includes three members of the mitochondrial respiratory chain (mitochondrially encoded ATP synthase 6 (MT-ATP6), mitochondrially encoded ATP synthase 8 (MT-ATP8) and NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha, subcomplex 9 (NDUFA9)) was prominent. Porcine white adipose tissue is relatively rich in mitochondria and thus possesses the enzymatic machinery needed to sustain a high beta-oxidative rate (Koekemoer and Oelofsen, 2001). Interestingly, a chemical inhibition of the mitochondrial respiratory chain results in decreased fat accumulation in *C. elegans* and in 3T3-L1 cell line, showing that the mitochondria play a key role in adipogenesis (McKay et al., 2003). Using a PPARG-null 3T3 fibroblast cell line, Mueller et al. (Mueller et al., 2002) demonstrated that addition of PPARG to these cells induced the expression of seven members of the mitochondrial respiratory chain. These results suggest a close interaction between the KEGG PPAR signalling and oxidative phosphorylation pathways.

Enzymes involved in glutathione metabolism have been shown to play key roles in the control of proteins and lipids redox state. In our study, cytosolic glutathione peroxidase (GPX1), microsomal glutathione S-transferase 1 (MGST1) and soluble NADP (+) isocitrate dehydrogenase (IDH1) genes were all over-represented in the KEGG glutathione metabolism pathway. These genes play well-known roles in the protection of adipose cells from oxidative lipid damage and new evidence exists that these enzymes also have key roles in adipogenesis. For example, GPX1 gene expression is substantially greater in human adipocytes compared to preadipocytes (Urs et al., 2004) and during adipogenic differentiation in cattle (Yamasaki et al., 2006). Furthermore, the MGST1 gene has been identified as an abundantly expressed gene in pig adipose tissue (Chen et al., 2006) and its gene expression was found to be up-regulated during *in vitro* bovine adipogenesis (Tan et al., 2006). Finally, it was recently demonstrated that IDH1 plays a critical role in fat biosynthesis, showing increased activity and protein content during 3T3-L1 adipocyte differentiation (Koh et al., 2004).

The presence of endothelial cells in the adipose tissue samples used in the current study may account for the over-representation of genes in the KEGG tight junction and KEGG leukocyte transendothelial migration pathways. The platelet/endothelial cell adhesion molecule (PECAM1) and F11 receptor (F11R) genes are major constituents of the endothelial cell adherens and tight junctions, respectively (Newman, 1997; Naik and Eckfeld, 2003), and both genes are involved in leukocyte transmigration (Muller et al., 1993; Naik and Eckfeld, 2003). The Ras homolog gene family, member A (RHOA) is a key player in the control of endothelial cell contractile machinery and is known to increase endothelial cell permeability by disrupting intercellular adhesion (e.g. adherens junctions) (van Nieuw Amerongen et al., 2000). Finally, the spectrin alpha, non-erythrocytic 1 (SPTAN1) protein, also known as Fodrin and  $\alpha$ II-spectrin, was found to be located at cell-cell junctions and to be involved in endothelial permeability (Benz et al., 2008). Because establishment of the microvascular endothelial cell network precedes adipogenesis and the network has the capacity to grow throughout the adult life (Crandall et al., 1997), the identification of these genes might reflect the presence of a higher-order microvascular network in adult relative to fetal adipose tissue.

Three mitochondrial genes (hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase/3-ketoacyl-Coenzyme A thiolase/enoyl-Coenzyme A hydratase (trifunctional protein), alpha subunit (HADHA), 3-oxoacid CoA transferase 1 (OXCT1) and methylcrotonoyl-Coenzyme A carboxylase 1 (MCCC1)) were represented in the valine, leucine and isoleucine degradation pathway. Catabolism of these branched amino acids is known to provide the acetyl-CoA needed for fatty acid biosynthesis in the adipose tissue, and for the differentiation of 3T3-L1 cells into adipocytes induces the branched chain  $\alpha$ -ketoacid dehydrogenase complex, which catalyzes the oxidation of the first carbon of valine, leucine and isoleucine (Kedishvili et al., 1994).

Finally, three genes (HADHA, CNOT4 and catalase (CAT)) were over-represented in the tryptophan metabolism pathway. The nature and extent of involvement of tryptophan metabolism in the tissue remains to be determined. However, the porcine CAT gene was recently reported to be up-regulated during adipose cell differentiation (Samulin et al., 2008), and HADHA gene is known to be involved in the  $\beta$ -oxidation of C12 to C16 fatty acids (Hiltunen and Qin, 2000). The CNOT4 protein is a component of the CCR4-NOT

complex, which associates with the proteasome and regulates histone methylation (Laribee et al., 2007). As with other genes in this pathway, the role played by CNOT4 protein during adipogenesis is still not known, and to our knowledge, this is the first time that CNOT4 expression has been reported in adipose tissue.

#### 4.4. Conclusions

Using the SSH technique we were able to identify adipogenesis-related genes, some of which have never before been reported to be expressed in adipose tissue. Moreover, our *in vivo* model of adipogenesis allowed the identification of non-adipocyte genes, which may have key roles in adipocyte differentiation. However, further work is needed to determine if newly identified genes are specifically expressed in adipocytes and/or in other cell types, which are present within the adipose tissue. The gene ontology categories and biological pathways identified in the current study represent significant contributions which will assist in the identification of the molecular and biochemical pathways underlying adipose tissue development. However, further analyses are required to determine the functional significance of the newly identified differentially expressed genes in various models of adipogenesis.

#### **Acknowledgements**

We are grateful to Danièle Beaudry for technical assistance and to Steve Méthot for the statistical analyses. This work was financially supported by the Natural Sciences and Engineering Council of Canada (NSERC) Strategic Grant No. 322101-05. Sherbrooke contribution No. 975.

## Figures and legends

Fig. 1. Preliminary verification by RT-PCR amplification confirming the presence of preadipocytes and fully differentiated adipocytes in fetal and maternal adipose tissue respectively. The amplification of delta-like homolog 1 (DLK1) was used to confirm the presence of preadipocytes. The four amplified fragments corresponded to DLK1 isoforms as confirmed by sequencing. The amplification of troponin T1 (TNNT1) demonstrated the presence of skeletal muscle cells in some fat tissue samples. Adiponectin (ADIPOQ) amplification demonstrated the presence of differentiated adipose cells. Skeletal muscle tissue was used as a positive control for TNNT1 amplification and lung tissue was used as a negative control for TNNT1 and ADIPOQ genes. Peptidylprolyl isomerase A (PPIA) was used as a housekeeping gene.

Fig. 2. Estimation of the SSH subtraction efficiency. Subtraction efficiency was determined by analysing the amount of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) present in both subtracted and nonsubtracted cDNA libraries through the use of increasing numbers of PCR cycles. The number of cycles is indicated above each well.

Fig. 3. Tissue distribution of seven selected SSH clones using semiquantitative RT-PCR. Data represent least-square means  $\pm$  SEM of duplicates from 2 cyclic sows. Peptidylprolyl isomerase A gene was used to perform normalisation, and expression levels were then compared to the subcutaneous adipose tissue expression levels adjusted to 100%. L, lung; S, stomach; H, heart; M, skeletal muscle; P, pituitary; K, kidney; V, liver; O, ovary; U, uterus; PF, perirenal adipose tissue; SF, subcutaneous adipose tissue. \*,  $P>0.05$ ; \*\*,  $P>0.01$ ; \*\*\*,  $P>0.001$ .

Table 1. Reverse transcription polymerase chain reaction primer sequences and conditions used for the characterization of subcutaneous adipose tissue.

| GenBank Accession No. | Gene Symbol <sup>1</sup> | Position (bp) | Primer sequences <sup>2</sup><br>5'→3' | MgCl <sub>2</sub> (mM) | Primer (nM) | Annealing temp (°C) | Cycles No. | Product size (bp) |
|-----------------------|--------------------------|---------------|--|------------------------|-------------|---------------------|------------|-------------------|
| <u>NM 213748</u>      | TNNT1                    | 187-206       | F CGCGTGGACTTCGATGACAT                 | 1.0                    | 150         | 61                  | 35         | 566               |
|                       |                          | 752-733       | R AACTTCTGGGCGTGGCTGAT                 |                        |             |                     |            |                   |
| <u>NM 001048187</u>   | DLK1                     | 598-617       | F CCGGCTTCATGGACAAGACC                 | 1.0                    | 300         | 66                  | 36         | 195               |
|                       |                          | 792-773       | R TGAGCACGCCAGGATGGTA                  |                        |             |                     |            |                   |
| <u>NM 214370</u>      | ADIPOQ                   | 59-79         | F TGGCTCTGCTCCACACCTGA                 | 1.5                    | 200         | 62                  | 35         | 822               |
|                       |                          | 880-858       | R GTCTCCTAATGACACTGAAGAC               |                        |             |                     |            |                   |
| <u>AK231482</u>       | PPIA                     | 60-80         | F ACCGCTTCTTCGACATCGC                  | 1.0                    | 150         | 60                  | 35         | 450               |
|                       |                          | 509-490       | F CTTGCTGGTCTTGCCATICC                 |                        |             |                     |            |                   |

<sup>1</sup> TNNT1, Troponin T1; DLK1, Delta-like homolog 1; ADIPOQ, Adiponectin; PPIA, Peptidylprolyl isomerase A. <sup>2</sup> F, forward; R, reverse.

Table 2. Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction primer sequences and conditions used for the validation of differentially expressed cDNA.

| GenBank Accession No.  | Gene Symbol <sup>1</sup> | Position (bp) | Primer sequences <sup>2</sup><br>5'→3' | Annealing temp (°C) | Product size (bp) |
|------------------------|--------------------------|---------------|--|---------------------|-------------------|
| <b><u>AY008846</u></b> | PPIA                     | 192-210       | F GCACTGGTGGCAAGTCCAT                  | 60                  | 71                |
|                        |                          | 262-243       | R AGGACCCGTATGCTTCAGGA                 |                     |                   |
| <b><u>AF017079</u></b> | GAPDH                    | 776-795       | F CAGCAATGCCTCCTGTACCA                 | 60                  | 70                |
|                        |                          | 845-826       | R GATGCCGAAGTTGTCATGGA                 |                     |                   |
| <b><u>DT654577</u></b> | Unknown 306              | 29-51         | F TTTGTAAGCCCTTCGACAGACCT              | 60                  | 71                |
|                        |                          | 99-76         | R CCTTTGGTTTTATTTGTGCCTTCC             |                     |                   |
| <b><u>DT654580</u></b> | Unknown 549              | 167-191       | F ATATTTGCTCTGCTCTATGGCACTT            | 59                  | 67                |
|                        |                          | 233-209       | R ACACTCCATTCAGGAAGACAACCTGT           |                     |                   |
| <b><u>DT654529</u></b> | Unknown 819              | 190-208       | F CCCACCCAGCAATTTCAA                   | 60                  | 71                |
|                        |                          | 260-237       | R GTCGTGCATCTGTCTTCTAACTC              |                     |                   |
| <b><u>DT654538</u></b> | PLIN                     | 160-178       | F CAAGCGGGAGATCCTGACA                  | 58                  | 71                |
|                        |                          | 230-210       | R TGCTGCGAACCTGGATACTCA                |                     |                   |
| <b><u>DT654623</u></b> | MMD                      | 314-339       | F GTTGTCTCTTGTGGAATGTTGACA             | 60                  | 71                |
|                        |                          | 384-365       | R CGCATCTTCTGGGTTCTC                   |                     |                   |
| <b><u>DT654434</u></b> | MYOC                     | 159-178       | F CAGTGTAGCCACCCAGGAG                  | 60                  | 73                |
|                        |                          | 231-210       | R CTGAAGGCTGAGAAGGAAATCC               |                     |                   |
| <b><u>DT654489</u></b> | PON3                     | 335-360       | F ACCTAACCTCCCTTGGACTGTAGAA            | 59                  | 73                |
|                        |                          | 407-383       | R TGGCAACATTAGAGATAGTCCTGGA            |                     |                   |
| <b><u>DT654438</u></b> | SCD                      | 69-90         | F GGCCAGGATTTAAAGAAGTGGGA              | 60                  | 75                |
|                        |                          | 143-123       | R TCAGAAAAGGAACCCAAGGGA                |                     |                   |
| <b><u>DT654523</u></b> | AGT                      | 145-166       | F AGGAAGGCACTGTGGTTTCTG                | 59                  | 71                |
|                        |                          | 215-195       | R TCTTCATTGCCCCAGACTCA                 |                     |                   |
| <b><u>DT654454</u></b> | ADIPOQ                   | 330-352       | F GTGCTCATCATTCAATGTTGTGG              | 59                  | 71                |
|                        |                          | 400-376       | R CTATGCTGACAATGTCAATGACTCC            |                     |                   |

<sup>1</sup> PPIA, Peptidylprolyl isomerase A; GAPDH, Glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase; PLIN, Perilipin; MMD, Monocyte to macrophage differentiation-associated; MYOC, Myocilin; PON3, Paraoxonase 3; SCD, Stearoyl-CoA desaturase; AGT, Angiotensinogen; ADIPOQ, Adiponectin. <sup>2</sup> F, forward; R, reverse.

Table 3. Reverse transcription polymerase chain reaction primer sequences and conditions used for the tissue distribution of selected SSH clones.

| GenBank Accession No.   | Gene Symbol <sup>1</sup> | Position (bp) | Primer sequences <sup>2</sup><br>5'→3' | MgCl <sub>2</sub><br>(mM) | Primer<br>(nM) | Annealing<br>temp (°C) | Cycles<br>No. | Product<br>size (bp) |
|-------------------------|--------------------------|---------------|--|---------------------------|----------------|------------------------|---------------|----------------------|
| <b><u>NM_214353</u></b> | PPIA                     | 17-36         | F ACCGCTTCTTCGACATCGC                  | 1.0                       | 150            | 60                     | 35            | 449                  |
|                         |                          | 466-447       | R CTTGCTGGTCTTGCCATTCC                 |                           |                |                        |               |                      |
| <b><u>U48832</u></b>    | GAPDH                    | 28-50         | F CTGGCAAAGTGGACATTGTCGCC              | 1.5                       | 150            | 68                     | 32            | 570                  |
|                         |                          | 579-599       | R CTTGGCAGCGCCGGTAGAAGC                |                           |                |                        |               |                      |
| <b><u>DT654577</u></b>  | Unknown 306              | 141-160       | F CAGTAGCCAGGGCATTGACA                 | 1.5                       | 150            | 60                     | 32            | 207                  |
|                         |                          | 347-328       | R GCATCTGCCACCCCTGATTA                 |                           |                |                        |               |                      |
| <b><u>DT654580</u></b>  | Unknown 549              | 154-175       | F TCCCAGCACTGAATATTGTC                 | 1.5                       | 150            | 55                     | 32            | 249                  |
|                         |                          | 402-383       | R TTCCAGATGGTTGGGCTTTC                 |                           |                |                        |               |                      |
| <b><u>DT654529</u></b>  | Unknown 819              | 95-114        | F AATGCCAAGCAGCTGATGAA                 | 1.5                       | 150            | 60                     | 31            | 209                  |
|                         |                          | 303-284       | R CCAGACCTGTGCTGGAATTG                 |                           |                |                        |               |                      |
| <b><u>DT654538</u></b>  | PLIN                     | 36-59         | F CTTGATCTCTCGCTTATTGACCA              | 1.0                       | 150            | 62                     | 30            | 205                  |
|                         |                          | 240-221       | R CAAAGTGGTCTGCTGCGAAC                 |                           |                |                        |               |                      |
| <b><u>DT654623</u></b>  | MMD                      | 63-82         | F TAGGCATCCGCTGTTGAGAA                 | 1.0                       | 300            | 57                     | 31            | 288                  |
|                         |                          | 350-330       | R TTGCAGCAAGCTGTCAACATT                |                           |                |                        |               |                      |
| <b><u>DT654434</u></b>  | MYOC                     | 104-123       | F GCCTCCGTGCTGTAGATGAC                 | 1.0                       | 150            | 57                     | 30            | 203                  |
|                         |                          | 306-287       | R AGGTACCAGGGCAGCCTCTA                 |                           |                |                        |               |                      |
| <b><u>DT654523</u></b>  | AGT                      | 38-57         | F AGCCGCAGGATTACGGTCTA                 | 1.0                       | 150            | 60                     | 30            | 266                  |
|                         |                          | 303-284       | R TGAACACACCGGCTTATTGG                 |                           |                |                        |               |                      |

<sup>1</sup> PPIA, Peptidylprolyl isomerase A; GAPDH, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; PLIN, Perilipin; MMD, Monocyte to macrophage differentiation-associated; MYOC, Myocilin; AGT, Angiotensinogen.

<sup>2</sup> F, forward; R, reverse.

Table 4. Genes preferentially expressed in subcutaneous adipose tissue of day 90 pregnant sow.

| GenBank accession No <sup>1</sup>  | Gene name  | Gene symbol               | No. of clones | Best match Accession No. <sup>2</sup>                     |
|--|--|---------------------------|---------------|---|
| <i>Identified genes</i>  |  |                           |               |   |
| <u>DT654604</u> to <u>DT654602</u> , <u>DT654447</u> to <u>DT654437</u>                                    | Stearoyl-CoA desaturase  | SCD                       | 86            | <u>AY487830</u> , <u>AY487829</u>                         |
| <u>DT654457</u> , <u>DT654456</u>  | Apolipoprotein R / Complement component 4 binding protein, alpha                   | C4BPA                     | 22            | <u>NM_213942</u>  |
| <u>DT654450</u> to <u>DT654448</u>   | Annexin A2   | ANXA2                     | 10            | <u>NM_001005726</u>                                       |
| <u>DT654610</u> , <u>DT654609</u> , <u>DT654477</u> , <u>DT654476</u>                                      | Fatty acid translocase/CD36  | CD36                      | 9             | <u>NM_001044622</u>                                       |
| <u>DT654607</u> , <u>DT654460</u> to <u>DT654458</u>   | Mitochondrial genes (ATP synthase 8, ATP synthase 6, and Cytochrome c oxidase III) | MT-ATP8, MT-ATP6, MT-COX3 | 9             | <u>AF034253</u>   |
| <u>DT654601</u> , <u>DT654534</u> , <u>DT654533</u> , <u>DT654526</u> , <u>DT654518</u> to <u>DT654516</u> | Elongation of long chain fatty acids family member 6                               | ELOVL6                    | 8             | <u>NM_024090</u> , <u>XM_001089418</u> , <u>NM_130450</u> |
| <u>DT654511</u> to <u>DT654508</u>   | Aldo-keto reductase family 1, member C-like 1                                      | AKR1CL1                   | 6             | <u>NM_001038626</u> , TC259510                            |
| <u>DT654470</u> , <u>DT654469</u>  | Aquaporin 3  | AQP3                      | 6             | <u>EU024115</u>   |
| <u>DT654435</u> , <u>DT654434</u>  | Myocilin   | MYOC                      | 5             | <u>NM_213986</u>  |
| <u>DT654416</u> to <u>DT654614</u>   | Four and a half LIM domains 1, isoform C   | FHL1C                     | 5             | <u>NM_214375</u>  |
| <u>DT654465</u> , <u>DT654464</u>  | Epidermal retinal dehydrogenase 2  | RDHE2                     | 4             | <u>NM_138969</u>  |
| <u>DT654463</u>  | Decorin  | DCN                       | 4             | <u>NM_213920</u>  |
| <u>DT654461</u>  | Diazepam binding inhibitor   | DBI                       | 4             | <u>NM_214119</u>  |
| <u>DT654611</u> , <u>DT654481</u>  | Cell death-inducing DFFA-like effector c   | CIDEc                     | 4             | <u>NM_001076031</u> , <u>NM_001112689</u>                 |
| <u>DT654554</u> , <u>DT654462</u>  | Phosphoserine aminotransferase 1   | PSAT1                     | 4             | <u>NM_001102150</u>                                       |
| <u>DT654523</u>  | Angiotensinogen  | AGT                       | 3             | <u>D17520</u>   |
| <u>DT654453</u> , <u>DT654452</u>  | Glutathione peroxidase 1   | GPX1                      | 3             | <u>NM_214201</u>  |
| <u>DT654475</u>  | Fatty acid-binding protein 3, heart and muscle                                     | FABP3                     | 3             | <u>AJ416019</u>   |
| <u>DT654468</u> to <u>DT654466</u>   | Lipoprotein lipase   | LPL                       | 3             | <u>NM_214286</u>  |
| <u>DT654454</u> , <u>DT654571</u> , <u>DT654432</u>  | Adiponectin  | ADIPOQ                    | 3             | <u>EF601160</u>   |
| <u>DT654630</u> , <u>DT654619</u>  | Flavin-containing monooxygenase 1  | FMO1                      | 3             | <u>NM_214064</u>  |
| <u>DT654551</u> , <u>DT654550</u>  | Pyruvate dehydrogenase (lipoamide) alpha 1   | PDHA1                     | 3             | TC246956, <u>NM_001101046</u>                             |
| <u>DT654562</u>  | TIMP metalloproteinase inhibitor 3   | TIMP3                     | 2             | <u>NM_000362</u>  |
| <u>DT654621</u> , <u>DT654620</u>  | 3-oxoacid CoA transferase 1  | OXCT1                     | 2             | <u>NM_213938</u>  |
| <u>DT654617</u>  | Platelet/endothelial cell adhesion molecule  | PECAM1                    | 2             | <u>NM_213907</u>  |
| <u>DT654492</u>  | Secretory leukocyte peptidase inhibitor  | SLPI                      | 2             | <u>NM_213870</u>  |
| <u>DT654480</u>  | Microsomal glutathione S-transferase 1   | MGST1                     | 2             | <u>NM_214300</u>  |
| <u>DT654625</u>  | Gelsolin   | GSN                       | 2             | <u>X13871</u>   |
| <u>DT654502</u>  | CD9 molecule   | CD9                       | 2             | <u>AF525029</u>   |
| <u>DT654473</u>  | Choline phosphotransferase 1   | CHPT1                     | 2             | <u>NM_001075507</u>                                       |
| <u>DT654568</u>  | Adipose differentiation-related protein  | ADFP                      | 2             | <u>BC102211</u>   |
| <u>DT654608</u> , <u>DT654472</u>  | Nucleoporin 205kDa   | NUP205                    | 2             | <u>NM_015135</u>  |
| <u>DT654623</u> , <u>DT654478</u>  | Monocyte to macrophage differentiation-associated                                  | MMD                       | 2             | <u>NM_001044595</u>                                       |
| <u>DT654491</u> , <u>DT654489</u>  | Paraoxonase 3  | PON3                      | 2             | <u>EF537043</u>   |
| <u>DT654493</u>  | Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta       | YWHAZ                     | 2             | <u>NM_145690</u>  |



Table 4. (Continued)

| GenBank accession No. <sup>1</sup> | Gene name   | Gene symbol | No. of clones | Best match Accession No. <sup>2</sup> |
|------------------------------------|---|-------------|---------------|---------------------------------------|
| <u>DT654627</u> , <u>DT654612</u>  | Serine carboxypeptidase I   | SCPEP1      | 2             | <u>NM 021626</u>                      |
| <u>DT654488</u> , <u>DT654487</u>  | S100 calcium binding protein A1   | S100A1      | 2             | <u>BC014392</u>                       |
| <u>DT654599</u> , <u>DT654598</u>  | Flavin-containing monooxygenase 2 (non-functional)  | FMO2        | 2             | <u>NM 001075162</u>                   |
| <u>DT654606</u> , <u>DT654605</u>  | Cytochrome P450, family 4, subfamily B, polypeptide I   | CYP4B1      | 2             | <u>NM 001076202</u>                   |
| <u>DT654613</u> , <u>DT654538</u>  | Perilipin   | PLIN        | 2             | <u>NM 001083699</u>                   |
| <u>DT654436</u>                    | DCPI Decapping enzyme homologue A   | DCPIA       | 1             | <u>NM 018403</u>                      |
| <u>DT654455</u>                    | Cathepsin L2  | CTSL2       | 1             | <u>NM 213892</u>                      |
| <u>DT654474</u>                    | Growth hormone receptor   | GHR         | 1             | <u>NM 214254</u>                      |
| <u>DT654484</u>                    | Fc fragment of IgG, low affinity, IIb, receptor   | FCGR3B      | 1             | <u>NM 214391</u>                      |
| <u>DT654486</u>                    | Lactate dehydrogenase B   | LDHB        | 1             | <u>NM 001113287</u>                   |
| <u>DT654498</u>                    | Catalase  | CAT         | 1             | <u>NM 214301</u>                      |
| <u>DT654499</u>                    | Hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase/3-ketoacyl-Coenzyme A thiolase/enoyl-Coenzyme A hydratase (trifunctional protein), alpha subunit | HADHA       | 1             | <u>NM 213966</u>                      |
| <u>DT654500</u>                    | Malate dehydrogenase I  | MDH1        | 1             | <u>NM 213874</u>                      |
| <u>DT654628</u>                    | Hydroxysteroid (11-beta) dehydrogenase I  | HSD11B1     | 1             | <u>NM 214248</u>                      |
| <u>DT654506</u>                    | Caveolin I  | CAVI        | 1             | <u>NM 214438</u>                      |
| <u>DT654618</u>                    | VAMP (vesicle-associated membrane protein)-associated protein A   | VAPA        | 1             | <u>NM 001075733</u>                   |
| <u>DT654471</u>                    | Very low-density lipoprotein receptor   | VLDLR       | 1             | <u>NM 174489</u>                      |
| <u>DT654479</u>                    | Palmdelphin   | PALMD       | 1             | <u>NM 001038645</u>                   |
| <u>DT654482</u>                    | NADH dehydrogenase (ubiquinone) I alpha subcomplex, 9, 39kDa  | NDUFA9      | 1             | <u>NM 205817</u>                      |
| <u>DT654483</u>                    | Amyloid beta (A4) precursor-like protein 2  | APLP2       | 1             | <u>NM 001102456</u>                   |
| <u>DT654622</u>                    | Adenylate kinase 3-like 1   | AK3L1       | 1             | <u>NM 001044597</u>                   |
| <u>DT654626</u>                    | methylcrotonoyl-Coenzyme A carboxylase I (alpha)  | MCCCI       | 1             | <u>NM 020166</u>                      |
| <u>DT654600</u>                    | Pyruvate dehydrogenase kinase isozyme 4   | PDK4        | 1             | <u>NM 001101883</u>                   |
| <u>DT654597</u>                    | F11 receptor  | F11R        | 1             | <u>NM 174095</u>                      |
| <u>DT654576</u>                    | Cytochrome b reductase I  | CYBRD1      | 1             | <u>NM 024843</u>                      |
| <u>DT654574</u>                    | Cell cycle progression I  | CCPG1       | 1             | <u>NM 004748</u>                      |
| <u>DT654565</u>                    | Similar to hypothetical protein XP_865566   |             | 1             | TC241538                              |
| <u>DT654564</u>                    | Brain protein 44  | BRP44       | 1             | <u>BC109938</u>                       |
| <u>DT654563</u>                    | GLI pathogenesis-related 1 (glioma)   | GLIPR1      | 1             | <u>NM 001076984</u>                   |
| <u>DT654521</u>                    | Muscleblind-like (Drosophila)   | MBNLI       | 1             | <u>NM 207296</u>                      |
| <u>DT654548</u>                    | Cyclin I  | CCNI        | 1             | <u>NM 001083373</u>                   |
| <u>DT654544</u>                    | CCR4-NOT transcription complex, subunit I   | CNOT1       | 1             | <u>NM 016284</u>                      |
| <u>DT654542</u>                    | Chromosome 10 open reading frame 58   | C10orf58    | 1             | <u>NM 001034599</u>                   |
| <u>DT654536</u>                    | Uncharacterized hematopoietic stem/progenitor cells protein MDS027, Brk1-like protein   |             | 1             | <u>NM 018462</u>                      |
| <u>DT654527</u>                    | Coenzyme Q5 homolog, methyltransferase (S. cerevisiae)  | COQ5        | 1             | <u>NM 001075984</u>                   |
| <u>DT654552</u>                    | Isocitrate dehydrogenase I (NADP+), soluble   | IDH1        | 1             | <u>NM 181012</u>                      |

Table 4. (Continued)

| GenBank accession No <sup>1</sup>   | Gene name  | Gene symbol | No. of clones | Best match Accession No. <sup>2</sup>          |
|-------------------------------------|--|-------------|---------------|--|
| <u>DT654507</u>                     | Unc-50 homolog ( <i>C. elegans</i> )   | UNC50       | 1             | <u>NM 001014921</u>                            |
| <u>DT654505</u>                     | SPARC-like 1 (mast9, hev1n)  | SPARCL1     | 1             | <u>NM 001097422</u>                            |
| <u>DT654504</u>                     | Alcohol dehydrogenase, iron containing, 1  | ADHFE1      | 1             | <u>NM 144650</u>                               |
| <u>DT654557</u>                     | Microtubule-associated protein 1 light chain 3 alpha                                     | MAP1LC3A    | 1             | <u>NM 001001169</u>                            |
| <u>DT654497</u>                     | Ubiquitin specific peptidase 38  | USP38       | 1             | <u>BC068975</u>                                |
| <u>DT654496</u>                     | Ubiquitin specific peptidase 9, X-linked   | USP9X       | 1             | <u>NM 001039591</u>                            |
| <u>DT654494</u>                     | Sequestosome 1   | SQSTM1      | 1             | <u>NM 176641</u>                               |
| <u>DT654490</u>                     | Ras homolog gene family, member A  | RHOA        | 1             | <u>NM 176645</u>                               |
| <u>DT654593</u>                     | Elongation of long chain fatty acids, member 7   | ELOVL7      | 1             | <u>NM 001078042</u>                            |
| <u>DT654569</u>                     | Spectrin, alpha, non-erythrocytic 1 (alpha-fodrin)                                       | SPTAN1      | 1             | <u>NM 003127</u>                               |
| <u>DT654572</u>                     | Pleckstrin homology-like domain, family B, member 2                                      | PHLDB2      | 1             | <u>AJ496194</u>                                |
| <u>DT654570</u>                     | TBC1 domain family, member 20  | TBC1D20     | 1             | <u>NM 001038029</u>                            |
| <u>DT654567</u>                     | Transmembrane protein 50B  | TMEM50B     | 1             | <u>AM229679</u>                                |
| <u>DT654543</u>                     | Engulfment and cell motility 2   | ELMO2       | 1             | <u>NM 133171</u>                               |
| <u>DT654485</u>                     | Sjogren syndrome antigen B (autoantigen La)  | SSB         | 1             | <u>NM 176665</u>                               |
| <u>DT654537</u>                     | Splicing factor proline/glutamine rich (polypyrimidine tract binding protein associated) | SFPQ        | 1             | <u>BC033603</u>                                |
| <u>DT654624</u>                     | Nucleophosmin (nucleolar phosphoprotein B23, numatrin)                                   | NPM1        | 1             | <u>NM 002520</u>                               |
| <u>DT654530</u>                     | (Q9Y2K2) KIAA0999 protein  |             | 1             | <u>NM 025164</u>                               |
| <u>DT654501</u>                     | WNK lysine deficient protein kinase 1  | WNK1        | 1             | <u>NM 018979</u>                               |
| <u>DT654495</u>                     | CTD (carboxy-terminal domain, RNA polymerase II, polypeptide A) small phosphatase-like   | CTDSP1      | 1             | <u>NM 001008392</u>                            |
| <u>DT654451</u>                     | Eukaryotic translation initiation factor 2C, 1   | EIF2C1      | 1             | <u>NM 012199</u>                               |
| <u>DT654433</u>                     | Interferon, gamma-inducible protein 16   | IFI16       | 1             | <u>NM 005531</u>                               |
| <u>DT654553</u>                     | FK506-binding protein 5  | FKBP5       | 1             | <u>NM 004117</u>                               |
| <i>EST or genomic DNA sequence</i>  |  |             |               |  |
| <u>DT654525, DT654524</u>           | Unknown 641 and 108  |             | 7             | <u>TC268453, AK026192, CK463118</u>            |
| <u>DT654561, DT654540, DT654539</u> | Unknown 42, 821 and 901  |             | 3             | <u>TC264770, TC240404, NR 001464, AK231048</u> |
| <u>DT654577</u>                     | Unknown 306  |             | 2             | <u>NM 001080908</u>                            |
| <u>DT654541</u>                     | Unknown 991  |             | 2             | <u>TC239694, AK238136</u>                      |
| <u>DT654580</u>                     | Unknown 549  |             | 2             | <u>AC093770</u>                                |
| <u>DT654503</u>                     | Unknown 199  |             | 1             | <u>XM 878863</u>                               |
| <u>DT654596</u>                     | Unknown 72   |             | 1             | <u>AK124900</u>                                |
| <u>DT654560</u>                     | Unknown 25   |             | 1             | <u>XM 582882</u>                               |
| <u>DT654549</u>                     | Unknown 373  |             | 1             | <u>TC290158</u>                                |

Table 4. (Continued)

| GenBank accession No <sup>1</sup> | Gene name   | Gene symbol | No. of clones | Best match Accession No <sup>2</sup> |
|-----------------------------------|-------------|-------------|---------------|--------------------------------------|
| <u>DT654545</u>                   | Unknown 229 |             |               | TC261539, <u>DV228737</u>            |
| <u>DT654529</u>                   | Unknown 819 |             |               | TC277155, <u>DY415822</u>            |
| <u>DT654528</u>                   | Unknown 803 |             |               | <u>AK230888</u>                      |
| <u>DT654629</u>                   | Unknown 383 |             |               | <u>NM_001101046</u>                  |
| <u>DT654594</u>                   | Unknown 739 |             |               | <u>AK234632</u>                      |
| <u>DT654575</u>                   | Unknown 28  |             |               | <u>NM_019083</u>                     |
| <u>DT654566</u>                   | Unknown 188 |             |               | <u>AK238028</u>                      |
| <u>DT654558</u>                   | Unknown 10  |             |               | <u>AK235938</u>                      |
| <u>DT654555</u>                   | Unknown 799 |             |               | <u>NM_182657</u>                     |
| <u>DT654535</u>                   | Unknown 317 |             |               | <u>BP441081</u>                      |
| <u>DT654531</u>                   | Unknown 884 |             |               | <u>BP437202</u>                      |
| <u>DT654522</u>                   | Unknown 618 |             |               | <u>BP439037</u>                      |
| <u>DT654520</u>                   | Unknown 578 |             |               | <u>AK235866</u>                      |
| <u>DT654515</u>                   | Unknown 590 |             |               | <u>BP443633</u>                      |
| <u>DT654512</u>                   | Unknown 557 |             |               | <u>CF787624</u>                      |
| <u>DT654595</u>                   | Unknown 103 |             |               | <u>NM_005160</u>                     |
| <u>DT654592</u>                   | Unknown 73  |             |               | <u>Z97989</u>                        |
| <u>DT654582</u>                   | Unknown 629 |             |               | <u>AC027304</u>                      |
| <u>DT654590</u>                   | Unknown 430 |             |               | <u>AC002366</u>                      |
| <u>DT654589</u>                   | Unknown 246 |             |               | <u>AC027335</u>                      |
| <u>DT654588</u>                   | Unknown 236 |             |               | <u>AC013526</u>                      |
| <u>DT654587</u>                   | Unknown 228 |             |               | <u>AC114802</u>                      |
| <u>DT654586</u>                   | Unknown 889 |             |               | <u>AC006345</u>                      |
| <u>DT654579</u>                   | Unknown 606 |             |               | <u>AC019181</u>                      |
| <u>DT654573</u>                   | Unknown 203 |             |               | <u>BQ599560</u>                      |
| <i>Novel sequences</i>            |             |             |               |                                      |
| <u>DT654584</u>                   | Unknown 643 |             |               |                                      |
| <u>DT654583</u>                   | Unknown 640 |             |               |                                      |
| <u>DT654585</u>                   | Unknown 452 |             |               |                                      |
| <u>DT654581</u>                   | Unknown 14  |             |               |                                      |
| <u>DT654578</u>                   | Unknown 899 |             |               |                                      |
| <u>DT654591</u>                   | Unknown 739 |             |               |                                      |
| Total: 192                        |             |             | Total: 348    |                                      |

<sup>1</sup> GenBank accession numbers of differentially expressed cDNA clones from the current study.

<sup>2</sup> Accession numbers of the best match similarity obtained through nucleotide sequence comparisons via Blastn search in GenBank (nr and EST) or *Sus scrofa* Gene Index (SsGI) databases. Clones are selected with an e-value of at least  $e^{-20}$  for GenBank or with a minimal coverage of 10% for tentative consensus sequences (TCs). Accession numbers beginning with the prefix TC originate from the SsGI database.

Table 5. Distribution of over-represented Gene Ontology categories of 91 identified genes according to their biological process and molecular function functional annotations of DAVID databases.

| GO Terms <sup>1</sup>                            | Genes   | Count <sup>2</sup> | % <sup>3</sup> | P <sup>4</sup> |
|--|---|--------------------|----------------|----------------|
| <i>Biological process</i>                        |   |                    |                |                |
| Transport  | ADIPOQ, AQP3, MT-ATP6, MT-ATP8, CAT, CAV1, CD36, MT-CO3, CYBRD1, CYP4B1, C4BPA, DBI, ELMO2, FABP3, FMO1, FMO2, GHR, NDUFA9, NPM1, NUP205, RHOA, SQSTM1, SSB, VAPA, VLDLR, WNK1,   | 26                 | 28.6           | 0.00           |
| Generation of precursor metabolites and energy   | ADIPOQ, MT-ATP6, MT-ATP8, CAT, MT-CO3, CYBRD1, CYP4B1, FMO1, FMO2, IDH1, LDHB, MDH1, OXCT1, PDHA1   | 14                 | 15.4           | 0.00           |
| Cell organization and biogenesis                 | CD9, CHPT1, FHL1, GSN, MAP1LC3A, NPM1, NUP205, PALMD, RHOA, SPTAN1, SQSTM1, SSB, VAPA   | 13                 | 14.3           | 0.10           |
| Catabolism                                       | CAT, DCP1A, IDH1, LDHB, LPL, MCCC1, MDH1, PDHA1, USP9X, USP38,  | 10                 | 11.0           | 0.01           |
| Lipid metabolism                                 | CD36, CHPT1, HADHA, HSD11B1, LPL, PLIN, SCD, VLDLR,   | 8                  | 8.8            | 0.04           |
| Cell death                                       | CIDEA, ELMO2, IFI16, MMD, NPM1, SQSTM1, TIMP3   | 7                  | 7.7            | 0.08           |
| Electron transport                               | CAT, MT-CO3, CYBRD1, CYP4B1, FMO1, FMO2,  | 6                  | 6.6            | 0.09           |
| Reproduction                                     | AGT, CCNI, CD9, PI3, USP9X  | 5                  | 5.5            | 0.05           |
| Alcohol metabolism                               | LDHB, MDH1, PDHA1,  | 5                  | 5.5            | 0.07           |
| Tricarboxylic acid cycle intermediate metabolism | IDH1, LDHB, MDH1, OXCT1,  | 4                  | 4.4            | 0.00           |
| Nucleocytoplasmic transport                      | NPM1, NUP205, RHOA, SSB,  | 4                  | 4.4            | 0.02           |
| Glucose metabolism                               | LDHB, MDH1, PDHA1, PDK4   | 4                  | 4.4            | 0.02           |
| Acetyl-CoA metabolism                            | IDH1, MDH1, PDHA1   | 3                  | 3.3            | 0.01           |
| Lipid transport                                  | CAV1, C4BPA, VLDLR,   | 3                  | 3.3            | 0.05           |
| <i>Molecular function</i>                        |   |                    |                |                |
| Catalytic activity                               | ADHFE1, AK3L1, AKR1C1, MT-ATP6, MT-ATP8, CAT, CHPT1, COQ5, MT-CO3, CTDSPL, CTS2L2, CYP4B1, DCP1A, FKBP5, FMO1, FMO2, FI1R, GPX1, HADHA, HSD11B1, IDH1, LDHB, LPL, MCCC1, MDH1, MGST1, NDUFA9, OXCT1, PDHA1, PDK4, PON3, PSAT1, RDHE2, RHOA, SCD, SCPEP1, USP9X, USP38, WNK1, YWHAZ, | 40                 | 44.0           | 0.00           |
| Protein binding                                  | ADIPOQ, AGT, ANXA2, APLP2, CAV1, CD9, CD36, CIDEA, DBI, DCN, DCP1A, EIF2C1, FCGR3B, FKBP5, GHR, GSN, IFI16, NPM1, NUP205, PECAM1, PI3, RHOA, SFPQ, SPTAN1, SQSTM1, S100A1, USP9X, VLDLR, WNK1, YWHAZ,   | 30                 | 33.0           | 0.02           |
| Oxidoreductase activity                          | ADHFE1, AKR1C1, CAT, MT-CO3, CYP4B1, FMO1, FMO2, GPX1, HADHA, HSD11B1, IDH1, LDHB, MDH1, NDUFA9, PDHA1, RDHE2, SCD, YWHAZ   | 18                 | 19.8           | 0.00           |
| Enzyme inhibitor activity                        | AGT, ANXA2, APLP2, PI3, TIMP3, WNK1   | 6                  | 6.6            | 0.01           |
| Lipid binding                                    | ANXA2, CHPT1, DBI, FABP3, PLIN, USP9X   | 6                  | 6.6            | 0.01           |
| Monoxygenase activity                            | CYP4B1, FMO1, FMO2, YWHAZ   | 4                  | 4.4            | 0.02           |
| Endopeptidase inhibitor activity                 | AGT, APLP2, PI3, TIMP3  | 4                  | 4.4            | 0.03           |
| Lipid transporter activity                       | FABP3, LPL, VLDLR,  | 3                  | 3.3            | 0.05           |
| Lactate dehydrogenase activity                   | LDL, MDH1   | 2                  | 2.2            | 0.05           |
| NADP binding                                     | FMO1, FMO2  | 2                  | 2.2            | 0.06           |

<sup>1</sup> Gene ontology (GO) categories of biological process and molecular function functional classes.

<sup>2</sup> Observed number of genes in the category.

<sup>3</sup> Percentage of genes in each category.

<sup>4</sup> Fisher exact P-values of the enrichment significance obtained from DAVID annotation system.

Table 6. Distribution of overrepresented genes in KEGG PATHWAY. *Homo sapiens* pathways with more than 3 genes are presented.

| <b>Number of genes</b> | <b>KEGG ID<sup>3</sup></b> | <b>Pathways</b>   | <b>Gene symbol</b>                                   |
|------------------------|----------------------------|---|--|
| 7                      | hsa03320                   | PPAR signaling pathways <sup>1,2</sup>                    | DBI<br>FABP3<br>LPL<br>PLIN<br>SCD<br>ADIPOQ<br>CD36 |
| 4                      | hsa04530                   | Tight junction <sup>1</sup>                               | RHOA<br>F11R<br>SPTAN1<br>VAPA                       |
| 3                      | hsa00480                   | Glutathione metabolism <sup>1,2</sup>                     | GPX1<br>IDH1<br>MGST1                                |
| 3                      | hsa00280                   | Valine, Leucine and Isoleucine degradation <sup>1,2</sup> | HADHA<br>OXCT1<br>MCCC1                              |
| 3                      | hsa00190                   | Oxidative phosphorylation <sup>1</sup>                    | MTATP6<br>MTATP8<br>NDUFA9                           |
| 3                      | hsa0380                    | Tryptophan metabolism <sup>1</sup>                        | HADHA<br>CNOT4<br>CAT                                |
| 3                      | hsa04670                   | Leucocytes transendothelial migration <sup>1</sup>        | RHOA<br>F11R<br>PECAM1                               |

<sup>1</sup> KEGG PATHWAY search result

<sup>2</sup> DAVID Functional Annotation Chart KEGG PATHWAY

<sup>3</sup> KEGG Reference number

Table 7. Relative mRNA abundance of randomly selected SSH clones measured in subcutaneous adipose tissues of day 90 gestating sows and their fetuses.

| GenBank Accession No. <sup>1</sup> | Gene Symbol <sup>2</sup> | Fetuses <sup>3</sup> | SEM <sup>3</sup> | Sows <sup>3</sup> | SEM <sup>3</sup> | Ratio S/F <sup>4</sup> | P-values <sup>5</sup> |
|------------------------------------|--------------------------|----------------------|------------------|-------------------|------------------|------------------------|-----------------------|
| <b><u>DT654577</u></b>             | Unknown 306              | 0.004                | 0.0009           | 0.033             | 0.0009           | 7.59                   | 0.0000                |
| <b><u>DT654580</u></b>             | Unknown 549              | 0.003                | 0.0008           | 0.037             | 0.0105           | 13.71                  | 0.0200                |
| <b><u>DT654529</u></b>             | Unknown 819              | 0.007                | 0.0018           | 0.023             | 0.0025           | 3.45                   | 0.0017                |
| <b><u>DT654538</u></b>             | PLIN                     | 0.003                | 0.0004           | 0.013             | 0.0009           | 3.78                   | 0.0001                |
| <b><u>DT654623</u></b>             | MMD                      | 0.003                | 0.0005           | 0.020             | 0.0028           | 5.98                   | 0.0009                |
| <b><u>DT654434</u></b>             | MYOC                     | 0.002                | 0.0008           | 0.109             | 0.0241           | 53.16                  | 0.0044                |
| <b><u>DT654489</u></b>             | PON3                     | 0.004                | 0.0009           | 0.554             | 0.0511           | 137.36                 | 0.0000                |
| <b><u>DT654438</u></b>             | SCD                      | 0.005                | 0.0010           | 1.555             | 0.9664           | 309.47                 | 0.1598                |
| <b><u>DT654523</u></b>             | AGT                      | 0.003                | 0.0006           | 0.067             | 0.0079           | 21.28                  | 0.0002                |
| <b><u>DT654454</u></b>             | ADIPOQ                   | 0.003                | 0.0005           | 0.010             | 0.0009           | 3.37                   | 0.0005                |

<sup>1</sup> GenBank accession numbers of SSH cDNA clones identified in the current study.

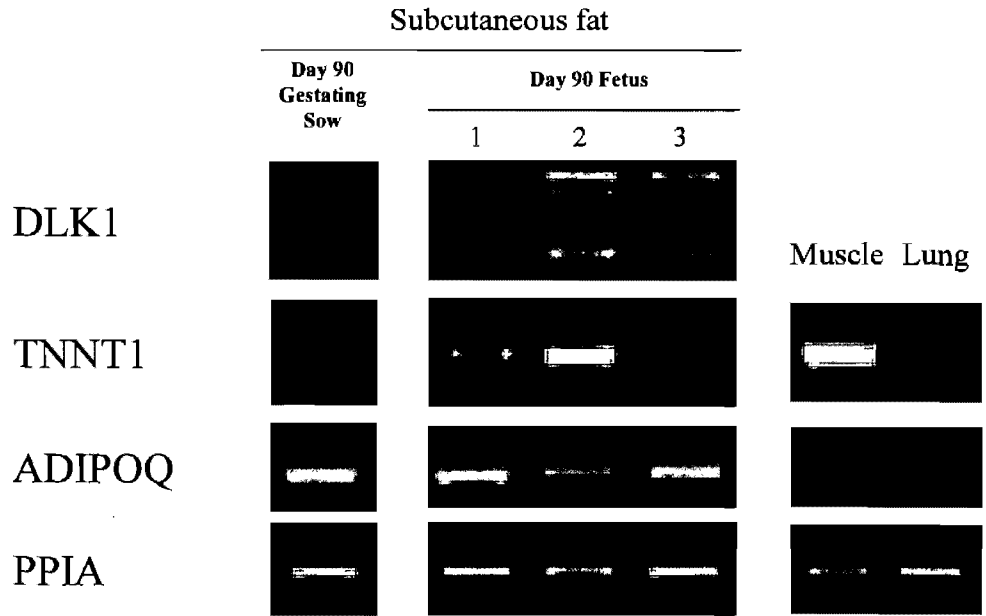
<sup>2</sup> PLIN, Perilipin; MMD, Monocyte to macrophage differentiation-associated; MYOC, Myocilin; PON3, Paraoxonase 3; SCD, Stearoyl-CoA desaturase; AGT, Angiotensinogen; ADIPOQ, Adiponectin.

<sup>3</sup> Data represents least-square means  $\pm$  SEM of 3 experimental replicates from n = 4 sows and n = 7 fetuses.

<sup>4</sup> Fold change of relative mRNA abundance, S, sows; F, fetuses.

<sup>5</sup> P-values, statistical analysis were considered significant when  $P < 0.05$ .

Figure 1



**Figure 2**

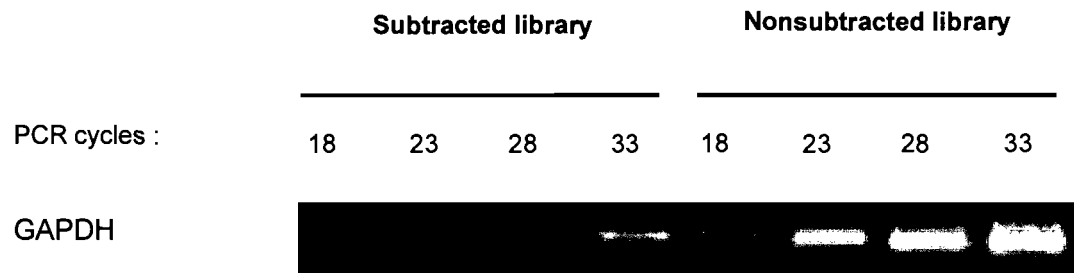
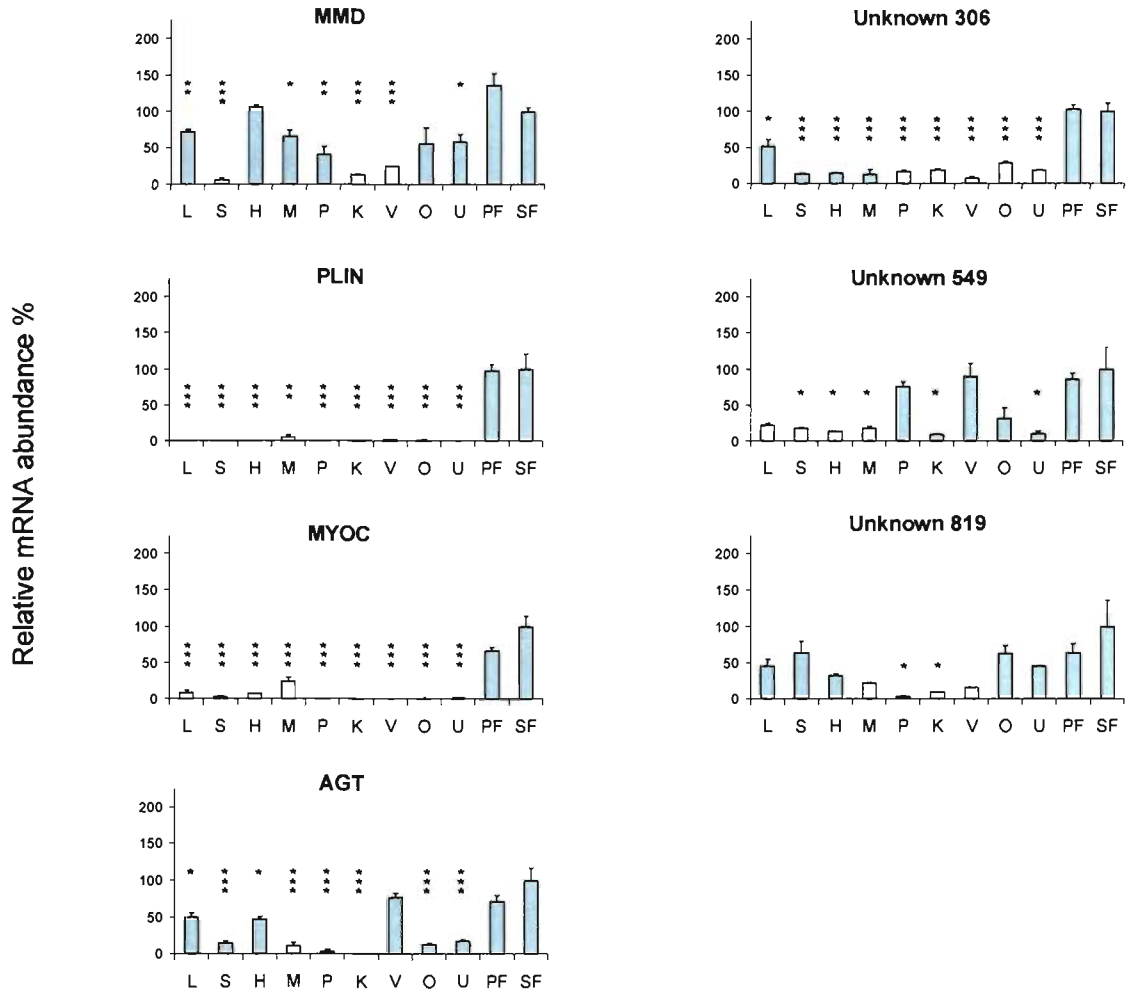




Figure 3.



## References

- Aguiari, P., Leo, S., Zavan, B., Vindigni, V., Rimessi, A., Bianchi, K., Franzin, C., Cortivo, R., Rossato, M., Vettor, R., Abatangelo, G., Pozzan, T., Pinton, P., Rizzuto, R., 2008. High glucose induces adipogenic differentiation of muscle-derived stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 1226-31.
- Ahmed, W., Ziouzenkova, O., Brown, J., Devchand, P., Francis, S., Kadakia, M., Kanda, T., Orasanu, G., Sharlach, M., Zandbergen, F., Plutzky, J., 2007. PPARs and their metabolic modulation: new mechanisms for transcriptional regulation? *J. Intern. Med.* 262, 184-98.
- Applied Biosystems, 1997. ABI PRISM 7700 Sequence Detection System. User bulletin #2.
- Arimura, N., Horiba, T., Imagawa, M., Shimizu, M., Sato, R., 2004. The peroxisome proliferator-activated receptor gamma regulates expression of the perilipin gene in adipocytes. *J. Biol. Chem.* 279, 10070-6.
- Benz, P. M., Blume, C., Moebius, J., Oschatz, C., Schuh, K., Sickmann, A., Walter, U., Feller, S. M., Renne, T., 2008. Cytoskeleton assembly at endothelial cell-cell contacts is regulated by alphaII-spectrin-VASP complexes. *J. Cell. Biol.* 180, 205-19.
- Bluher, M., Wilson-Fritch, L., Leszyk, J., Laustsen, P. G., Corvera, S., Kahn, C. R., 2004. Role of insulin action and cell size on protein expression patterns in adipocytes. *J. Biol. Chem.* 279, 31902-9.
- Brun, R. P., Tontonoz, P., Forman, B. M., Ellis, R., Chen, J., Evans, R. M., Spiegelman, B. M., 1996. Differential activation of adipogenesis by multiple PPAR isoforms. *Genes Dev.* 10, 974-84.
- Burton, G. R. and McGehee, R. E. Jr, 2004. Identification of candidate genes involved in the regulation of adipocyte differentiation using microarray-based gene expression profiling. *Nutrition* 20, 109-14.
- Burton, G. R., Nagarajan, R., Peterson, C. A., McGehee, R. E. Jr, 2004. Microarray analysis of differentiation-specific gene expression during 3T3-L1 adipogenesis. *Gene* 329, 167-85.
- Can. Counc. Anim. Care (CCAC). 1993. Guide to the Care and Use of Experimental Animals . Ontario, Canada.
- Cao, W., Epstein, C., Liu, H., DeLoughery, C., Ge, N., Lin, J., Diao, R., Cao, H., Long, F., Zhang, X., Chen, Y., Wright, P. S., Busch, S., Wenck, M., Wong, K., Saltzman, A. G., Tang, Z., Liu, L., Zilberstein, A., 2004. Comparing gene discovery from Affymetrix GeneChip microarrays and Clontech PCR-select cDNA subtraction: a case study. *BMC Genomics* 5, 26.

Chawla, A. and Lazar, M. A., 1994. Peroxisome proliferator and retinoid signaling pathways co-regulate preadipocyte phenotype and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 1786-90.

Chawla, A., Schwarz, E. J., Dimaculangan, D. D., Lazar, M. A., 1994. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma: adipose-predominant expression and induction early in adipocyte differentiation. *Endocrinology* 135, 798-800.

Chen, C. H., Lin, E. C., Cheng, W. T., Sun, H. S., Mersmann, H. J., Ding, S. T., 2006. Abundantly expressed genes in pig adipose tissue: an expressed sequence tag approach. *J. Anim. Sci.* 84, 2673-83.

Cooper, S. T. and Attie, A. D., 1992. Pig apolipoprotein R: a new member of the short consensus repeat family of proteins. *Biochemistry* 31, 12328-36.

Crandall, D. L., Hausman, G. J., Kral, J. G., 1997. A review of the microcirculation of adipose tissue: anatomic, metabolic, and angiogenic perspectives. *Microcirculation* 4, 211-32.

Deiuliis, J. A., Li, B., Lyvers-Peffer, P. A., Moeller, S. J., Lee, K., 2006. Alternative splicing of delta-like 1 homolog (DLK1) in the pig and human. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 145, 50-9.

DeLany, J. P., Floyd, Z. E., Zvonic, S., Smith, A., Gravois, A., Reiners, E., Wu, X., Kilroy, G., Lefevre, M., Gimble, J. M., 2005. Proteomic analysis of primary cultures of human adipose-derived stem cells: modulation by Adipogenesis. *Mol. Cell Proteomics* 4, 731-40.

Ding, S. T., McNeel, R. L., Mersmann, H. J., 1999. Expression of porcine adipocyte transcripts: tissue distribution and differentiation in vitro and in vivo. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 123, 307-18.

Dourmad, J. Y., M. Etienne, and J. Noblet. Mesurer l'epaisseur de lard dorsal des truies pour definir leurs programmes alimentaires. *INRA Prod. Anim.* 14, 41-50. 2001.

Engeli, S., Negrel, R., Sharma, A. M., 2000. Physiology and pathophysiology of the adipose tissue renin-angiotensin system. *Hypertension* 35, 1270-7.

Gerhold, D. L., Liu, F., Jiang, G., Li, Z., Xu, J., Lu, M., Sachs, J. R., Bagchi, A., Fridman, A., Holder, D. J., Doebber, T. W., Berger, J., Elbrecht, A., Moller, D. E., Zhang, B. B., 2002. Gene expression profile of adipocyte differentiation and its regulation by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists. *Endocrinology* 143, 2106-18.

Gong, G., Kosoko-Lasaki, O., Haynatzki, G. R., Wilson, M. R., 2004. Genetic dissection of myocilin glaucoma. *Hum. Mol. Genet.* 13 Spec No 1, R91-102.

Gorzelnia, K., Janke, J., Engeli, S., Sharma, A. M., 2001. Validation of endogenous controls for gene expression studies in human adipocytes and preadipocytes. *Horm. Metab. Res.* 33, 625-7.

Gregoire, F. M., 2001. Adipocyte differentiation: from fibroblast to endocrine cell. *Exp. Biol. Med.* (Maywood) 226, 997-1002.

Grindflek, E., Sundvold, H., Klungland, H., Lien, S., 1998. Characterisation of porcine peroxisome proliferator-activated receptors gamma 1 and gamma 2: detection of breed and age differences in gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 249, 713-8.

Hackl, H., Burkard, T. R., Sturn, A., Rubio, R., Schleiffer, A., Tian, S., Quackenbush, J., Eisenhaber, F., Trajanoski, Z., 2005. Molecular processes during fat cell development revealed by gene expression profiling and functional annotation. *Genome Biol.* 6, R108.

Hajri, T., Hall, A. M., Jensen, D. R., Pietka, T. A., Drover, V. A., Tao, H., Eckel, R., Abumrad, N. A., 2007. CD36-facilitated fatty acid uptake inhibits leptin production and signaling in adipose tissue. *Diabetes* 56, 1872-80.

Hausman, G. J., Barb, C. R., Dean, R. G., 2007. Patterns of gene expression in pig adipose tissue: transforming growth factors, interferons, interleukins, and apolipoproteins. *J Anim Sci* 85, 2445-56.

Hausman, G. J., Barb, C. R., Dean, R. G., 2008. Patterns of gene expression in pig adipose tissue: Insulin-like growth factor system proteins, neuropeptide Y (NPY), NPY receptors, neurotrophic factors and other secreted factors. *Domest. Anim. Endocrinol.* 35, 34-34.

Hausman, G. J., Poulos, S. P., Richardson, R. L., Barb, C. R., Andacht, T., Kirk, H. C., Mynatt, R. L., 2006. Secreted proteins and genes in fetal and neonatal pig adipose tissue and stromal-vascular cells. *J. Anim. Sci.* 84, 1666-81.

Hiltunen, J. K. and Qin, Y., 2000. beta-oxidation - strategies for the metabolism of a wide variety of acyl-CoA esters. *Biochim. Biophys. Acta* 1484, 117-28.

Hosack, D. A., Dennis, G. Jr, Sherman, B. T., Lane, H. C., Lempicki, R. A., 2003. Identifying biological themes within lists of genes with EASE. *Genome Biol.* 4, R70.

Huang da, W., Sherman, B. T., Tan, Q., Kir, J., Liu, D., Bryant, D., Guo, Y., Stephens, R., Baseler, M. W.,

Lane, H. C., Lempicki, R. A., 2007. DAVID Bioinformatics Resources: expanded annotation database and novel algorithms to better extract biology from large gene lists. *Nucleic Acids Res.* 35, W169-75.

Huang, J., Hsia, S. H., Imamura, T., Usui, I., Olefsky, J. M., 2004. Annexin II is a thiazolidinedione-responsive gene involved in insulin-induced glucose transporter isoform 4 translocation in 3T3-L1 adipocytes. *Endocrinology* 145, 1579-86.

Hutley, L. J., Herington, A. C., Shurety, W., Cheung, C., Vesey, D. A., Cameron, D. P., Prins, J. B., 2001. Human adipose tissue endothelial cells promote preadipocyte proliferation. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 281, E1037-44.

Kanehisa, M., Goto, S., Kawashima, S., Nakaya, A., 2002. The KEGG databases at GenomeNet. *Nucleic Acids Res.* 30, 42-6.

Kedishvili, N. Y., Popov, K. M., Jaskiewicz, J. A., Harris, R. A., 1994. Coordinated expression of valine catabolic enzymes during adipogenesis: analysis of activity, mRNA, protein levels, and metabolic consequences. *Arch. Biochem. Biophys.* 315, 317-22.

Kim, H. S., Hausman, G. J., Hausman, D. B., Martin, R. J., Dean, R. G., 2000. The expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in pig fetal tissue and primary stromal-vascular cultures. *Obes Res* 8, 83-8.

Kim, T. H., Kim, N. S., Lim, D., Lee, K. T., Oh, J. H., Park, H. S., Jang, G. W., Kim, H. Y., Jeon, M., Choi, B. H., Lee, H. Y., Chung, H. Y., Kim, H., 2006. Generation and analysis of large-scale expressed sequence tags (ESTs) from a full-length enriched cDNA library of porcine backfat tissue. *BMC Genomics* 7, 36.

Koekemoer, T. C. and Oelofsen, W., 2001. Biochemical properties of porcine white adipose tissue mitochondria and relevance to fatty acid oxidation. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 129, 797-807.

Koh, H. J., Lee, S. M., Son, B. G., Lee, S. H., Ryoo, Z. Y., Chang, K. T., Park, J. W., Park, D. C., Song, B. J., Veech, R. L., Song, H., Huh, T. L., 2004. Cytosolic NADP<sup>+</sup>-dependent isocitrate dehydrogenase plays a key role in lipid metabolism. *J. Biol. Chem.* 279, 39968-74.

Kratchmarova, I., Kalume, D. E., Blagoev, B., Scherer, P. E., Podtelejnikov, A. V., Molina, H., Bickel, P. E., Andersen, J. S., Fernandez, M. M., Bunkenborg, J., Roepstorff, P., Kristiansen, K., Lodish, H. F., Mann, M., Pandey, A., 2002. A proteomic approach for identification of secreted proteins during the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes to adipocytes. *Mol Cell Proteomics* 1, 213-22.

Kubota, R., Noda, S., Wang, Y., Minoshima, S., Asakawa, S., Kudoh, J., Mashima, Y., Oguchi, Y., Shimizu,

N., 1997. A novel myosin-like protein (myocilin) expressed in the connecting cilium of the photoreceptor: molecular cloning, tissue expression, and chromosomal mapping. *Genomics* 41, 360-9.

Laribee, R. N., Shibata, Y., Mersman, D. P., Collins, S. R., Kemmeren, P., Roguev, A., Weissman, J. S., Briggs, S. D., Krogan, N. J., Strahl, B. D., 2007. CCR4/NOT complex associates with the proteasome and regulates histone methylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 5836-41.

Lopez, I. P., Marti, A., Milagro, F. I., Zulet Md Mde, L., Moreno-Aliaga, M. J., Martinez, J. A., De Miguel, C., 2003. DNA microarray analysis of genes differentially expressed in diet-induced (cafeteria) obese rats. *Obes. Res.* 11, 188-94.

Lord, E., Ledoux, S., Murphy, B. D., Beaudry, D., Palin, M. F., 2005. Expression of adiponectin and its receptors in swine. *J. Anim. Sci.* 83, 565-78.

Massiera, F., Bloch-Faure, M., Ceiler, D., Murakami, K., Fukamizu, A., Gasc, J. M., Quignard-Boulangé, A., Negrel, R., Ailhaud, G., Seydoux, J., Meneton, P., Teboul, M., 2001. Adipose angiotensinogen is involved in adipose tissue growth and blood pressure regulation. *FASEB J.* 15, 2727-9.

Matsuzaka, T., Shimano, H., Yahagi, N., Yoshikawa, T., Amemiya-Kudo, M., Hasty, A. H., Okazaki, H., Tamura, Y., Iizuka, Y., Ohashi, K., Osuga, J., Takahashi, A., Yato, S., Sone, H., Ishibashi, S., Yamada, N., 2002. Cloning and characterization of a mammalian fatty acyl-CoA elongase as a lipogenic enzyme regulated by SREBPs. *J. Lipid Res.* 43, 911-20.

McKay, R. M., McKay, J. P., Avery, L., Graff, J. M., 2003. *C. elegans*: a model for exploring the genetics of fat storage. *Dev. Cell* 4, 131-42.

Mueller, E., Drori, S., Aiyer, A., Yie, J., Sarraf, P., Chen, H., Hauser, S., Rosen, E. D., Ge, K., Roeder, R. G., Spiegelman, B. M., 2002. Genetic analysis of adipogenesis through peroxisome proliferator-activated receptor gamma isoforms. *J. Biol. Chem.* 277, 41925-30.

Muller, W. A., Weigl, S. A., Deng, X., Phillips, D. M., 1993. PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J. Exp. Med.* 178, 449-60.

Naik, U. P. and Eckfeld, K., 2003. Junctional adhesion molecule 1 (JAM-1). *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* 17, 341-7.

Nakamura, M. T. and Nara, T. Y., 2002. Gene regulation of mammalian desaturases. *Biochem. Soc. Trans.* 30,

1076-9.

Newman, P. J., 1997. The biology of PECAM-1. *J. Clin. Invest.* 99, 3-8.

Ntambi, J. M., Miyazaki, M., Stoehr, J. P., Lan, H., Kendzierski, C. M., Yandell, B. S., Song, Y., Cohen, P., Friedman, J. M., Attie, A. D., 2002. Loss of stearoyl-CoA desaturase-1 function protects mice against adiposity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 11482-6.

Ortego, J., Escribano, J., Coca-Prados, M., 1997. Cloning and characterization of subtracted cDNAs from a human ciliary body library encoding TIGR, a protein involved in juvenile open angle glaucoma with homology to myosin and olfactomedin. *FEBS Lett.* 413, 349-53.

Rehli, M., Krause, S. W., Schwarzfischer, L., Kreutz, M., Andreesen, R., 1995. Molecular cloning of a novel macrophage maturation-associated transcript encoding a protein with several potential transmembrane domains. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 217, 661-7.

Ren, J., Knorr, C., Huang, L., Brenig, B., 2004. Isolation and molecular characterization of the porcine stearoyl-CoA desaturase gene. *Gene* 340, 19-30.

Rescher, U. and Gerke, V., 2004. Annexins--unique membrane binding proteins with diverse functions. *J Cell Sci* 117, 2631-9.

Rosen, E. D. and Spiegelman, B. M., 2006. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature* 444, 847-53.

Samulin, J., Lien, S., Grindflek, E., Berget, I., Ruyter, B., Sundvold, H., 2008. Depot specific differences during adipogenesis of porcine stromal-vascular cells. *Cell. Biol. Int.* 32, 525-31.

SAS Statistical Analysis System. 2002. Release 9.1. SAS Institute Inc, Cary NC.

Servetnick, D. A., Brasaemle, D. L., Gruia-Gray, J., Kimmel, A. R., Wolff, J., Londos, C., 1995. Perilipins are associated with cholesteryl ester droplets in steroidogenic adrenal cortical and Leydig cells. *J. Biol. Chem.* 270, 16970-3.

Soukas, A., Cohen, P., Socci, N. D., Friedman, J. M., 2000. Leptin-specific patterns of gene expression in white adipose tissue. *Genes Dev.* 14, 963-80.

Soukas, A., Socci, N. D., Saatkamp, B. D., Novelli, S., Friedman, J. M., 2001. Distinct transcriptional profiles

of adipogenesis in vivo and in vitro. *J. Biol. Chem.* 276, 34167-74.

Taleb, S., Van Haaften, R., Henegar, C., Hukshorn, C., Canello, R., Pelloux, V., Hanczar, B., Viguerie, N., Langin, D., Evelo, C., Zucker, J., Clement, K., Saris, W. H., 2006. Microarray profiling of human white adipose tissue after exogenous leptin injection. *Eur. J. Clin. Invest.* 36, 153-63.

Tan, S. H., Reverter, A., Wang, Y., Byrne, K. A., McWilliam, S. M., Lehnert, S. A., 2006. Gene expression profiling of bovine in vitro adipogenesis using a cDNA microarray. *Funct. Integr. Genomics* 6, 235-49.

Taniguchi, M., Guan le, L., Zhang, B., Dodson, M. V., Okine, E., Moore, S. S., 2008. Gene expression patterns of bovine perimuscular preadipocytes during adipogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 366, 346-51.

Tao, X., Jihong, Y., Li, G., Bin, F., Yi, Z., Xiaodong, C., Peichao, Z., Yang, Z., 2008. Cloning, chromosome mapping and expression pattern of porcine PLIN and M6PRBP1 genes. *Genet. Sel. Evol.* 40, 215-26.

Teboul, L., Febbraio, M., Gaillard, D., Amri, E. Z., Silverstein, R., Grimaldi, P. A., 2001. Structural and functional characterization of the mouse fatty acid translocase promoter: activation during adipose differentiation. *Biochem. J.* 360, 305-12.

Trayhurn, P., 2005. Endocrine and signalling role of adipose tissue: new perspectives on fat. *Acta Physiol. Scand.* 184, 285-93.

Urs, S., Smith, C., Campbell, B., Saxton, A. M., Taylor, J., Zhang, B., Snoddy, J., Jones Voy, B., Moustaid-Moussa, N., 2004. Gene expression profiling in human preadipocytes and adipocytes by microarray analysis. *J. Nutr.* 134, 762-70.

van Nieuw Amerongen, G. P., van Delft, S., Vermeer, M. A., Collard, J. G., van Hinsbergh, V. W., 2000. Activation of RhoA by thrombin in endothelial hyperpermeability: role of Rho kinase and protein tyrosine kinases. *Circ. Res.* 87, 335-40.

Wang, H. C., Ko, Y. H., Mersmann, H. J., Chen, C. L., Ding, S. T., 2006. The expression of genes related to adipocyte differentiation in pigs. *J. Anim. Sci.* 84, 1059-66.

Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L., Ferrante, A. W. Jr, 2003. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112, 1796-808.

Welsh, G. I., Griffiths, M. R., Webster, K. J., Page, M. J., Tavare, J. M., 2004. Proteome analysis of adipogenesis. *Proteomics* 4, 1042-51.



Xu, H., Barnes, G. T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C. J., Sole, J., Nichols, A., Ross, J. S., Tartaglia, L. A., Chen, H., 2003. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 112, 1821-30.

Yamasaki, T., Tahara, K., Takano, S., Inoue-Murayama, M., Rose, M. T., Minashima, T., Aso, H., Ito, S., 2006. Mechanism of plasma glutathione peroxidase production in bovine adipocytes. *Cell Tissue Res.* 326, 139-47.

## 4.2. Article 2

### **Molecular characterization and expression analysis of the porcine paraoxonase 3 (PON3) gene**

Benoît Labrecque <sup>a,b</sup>, Danièle Beaudry <sup>a</sup>, Marian Mayhue <sup>a</sup>, Catherine Hallé <sup>a</sup>, Vilceu Bordignon <sup>c</sup>, Bruce D. Murphy <sup>b</sup>, Marie-France Palin <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Dairy and Swine Research and Development Centre, Agriculture and Agri-Food Canada, Sherbrooke, Québec, Canada J1M 1Z3


<sup>b</sup> Centre de Recherche en Reproduction Animale, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, Canada, J2S 7C6

<sup>c</sup> McGill University, 21111, Lakeshore road, Ste-Anne-de-Bellevue, Québec, Canada, H9X 3V9

\* Corresponding author:

Marie-France Palin, Agriculture and Agri-Food Canada

2000 rue Collège, C.P. 90, Sherbrooke, Québec, Canada

(Tel.: 819-565-9174 ext. 207; Fax.: 819-564-5507; *E-mail address:* 

## Abstract

The paraoxonase (PON) gene family has 3 members, PON1, PON2 and PON3, which are known to be involved in oxidative stress-associated processes such as dyslipidemia, diabetes and coronary heart disease. Although PON3 is the least studied paraoxonase, recent findings have shown that it can significantly reduce atherosclerotic lesion formation and obesity in PON3 transgenic mice. Here, we describe the isolation and molecular characterization of the cDNA encoding the porcine PON3 gene. We also report the cloning of three porcine PON3 transcript variants resulting from alternate splicing of exons. Our results show that PON3 mRNA and protein are ubiquitously expressed in pig tissues. Moreover, the relative abundance of PON3 mRNA, measured in peri-renal and subcutaneous fat tissues, is higher in obese Upton Meishan gilts compared with the leaner Large White and Ham Line gilts. PON3 mRNA levels measured in fat tissues positively correlate with subcutaneous, visceral and total body fat weights. Four single nucleotide polymorphisms (SNP) were identified in the PON3 coding sequence, and among these, an association was found between the c.449G>A polymorphism and the Longissimus dorsi depth estimated breeding value (EBV) trait. Knowledge of the structure, distribution and expression profile of the porcine PON3 gene provides insights into its physiological function. Our results provide further support for involvement of PON3 in obesity-related disorders.

*Abbreviations:* EBV, estimated breeding value; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; HDL, high density lipoprotein; HKG, house keeping gene; HL, Ham Line; LDL, low density lipoprotein; LW, Large White; PBS, phosphate buffer saline; PON, paraoxonase; PPIA, peptidyl prolyl isomerase A; p.r., perirenal; QRT-PCR, quantitative reverse transcription–polymerase chain reaction; RACE, rapid amplification of the cDNA ends; s.c., subcutaneous; SNP, single nucleotide polymorphisms; TBST, Tris-buffered saline containing 0.1% Tween-20; UM, Upton Meishan.

*Keywords:* Adipose tissue; Gene expression; Isoform, Paraoxonase 3; Pig; SNP.

## 1. Introduction

The paraoxonase gene family includes three members, PON1, PON2 and PON3, positioned adjacent to each other on human chromosome 7 and on chromosome 6 in mouse (Primo-Parmo et al., 1996). These genes share considerable structural homology and may have arisen from a common evolutionary precursor by gene duplication. In mammals, PON orthologs share 79 to 95% identity, whereas paralogs exhibit 60 to 65% identity at the amino acid (aa) level (Primo-Parmo et al., 1996; Draganov and La Du, 2004). Despite their considerable structural homology, these paraoxonases display different cell and tissue distributions (Ng et al., 2001; Ng et al., 2005; Marsillach et al., 2008), as well as different regulation of expression, suggesting distinct physiological roles.

In the circulation, PON1 and PON3 are reported to be high density lipoprotein (HDL) associated proteins, whereas PON2 remains within cell membranes (Sorenson et al., 1999; Draganov et al., 2000; Ng et al., 2001; Reddy et al., 2001). Recent studies have demonstrated that the three paraoxonases are lactonases, with differing substrate specificity, and it has been suggested that the physiological role of PONs relates to the metabolism of lipid mediators produced by the oxidation of polyunsaturated fatty acids (Teiber et al., 2003; Draganov et al., 2005). Studies of PON1- and PON2-deficient mice and of PON1- and PON3- overexpressing mice revealed that these paraoxonases possess anti-atherogenic properties (Shih et al., 1998; Ng et al., 2006; Ng et al., 2007; Shih et al., 2007). Moreover, *in vitro* studies have demonstrated that the paraoxonases can protect low density lipoproteins (LDL) from oxidation (Mackness et al., 1991; Draganov et al., 2000; Ng et al., 2001).

Paraoxonase 1 is by far the most studied member of the PON family. In human, serum PON1 activity level was found to be lower, and lipid peroxidation higher, in subjects with the metabolic syndrome compared with unaffected controls (Senti et al., 2003). Moreover, lower PON1 activity and, in particular, PON1 genotypes, were found to be associated with cardiovascular diseases (Mackness et al., 2003; Ng et al., 2005) and atherosclerosis (Shih et al., 1998; Tward et al., 2002; Mackness et al., 2006b) in humans and mice. Serum PON1 activity levels were also reported to be low in type 2 diabetes mellitus (Gugliucci et al., 2006; Mackness et al., 2006a; Dullaart et al., 2008). Polymorphism in the PON2 gene is

also associated with coronary heart disease and type 2 diabetes (Hegele et al., 1997; Sanghera et al., 1998; Leus et al., 2001).

Mice overexpressing human PON3 had lower adiposity and lower circulating leptin levels as compared with wild type mice. However, these differences were only significant in males, suggesting a possible interaction between PON3 and sex hormones and/or Y-linked genes (Shih et al., 2007). Accumulating evidence points to a close association between obesity and systemic oxidative stress (Olusi, 2002; Keaney et al., 2003) and, more recently, Furukawa et al. revealed that increased oxidative stress occurs in accumulated fat and is an early instigator of metabolic syndrome (Furukawa et al., 2004). The domestic pig, *Sus scrofa*, has served as a useful model for medical studies of a number of human disorders including diabetes, atherosclerosis, obesity and cardiovascular pathology (Nafikov and Beitz, 2007). Moreover, it is one of the best animal models for studying human lipid metabolism because of the similarity in lipoprotein profiles (Terpstra et al., 1982), lipid metabolism and lipoprotein response to diets (Moghadasian, 2002; Navarro et al., 2004). In light of evidence showing an association between obesity and increased systemic oxidative stress, it is of interest to determine whether paraoxonases play an important role in this regard. We observed an up-regulation of the porcine PON3 transcript with adipose tissue development (Labrecque et al., 2008), and were interested in further characterization of the porcine paraoxonase 3 gene in adipose tissue and investigation into whether its expression is modulated with the development of obesity. Therefore, the objectives of the current study were (1) to clone and characterize the porcine PON3 gene, (2) to determine its tissue distribution, (3) to study its adipose tissue gene expression in breeds of pigs showing extreme phenotypes of growth and body fat weights and (4) to search for the presence of particular PON3 transcript variants that might be associated with carcass and growth traits in the pig.

## **2. Materials and methods**

### *2.1. Animals and tissue collection*

A total of 30 gilts were used for quantitative reverse transcription–polymerase chain reaction (QRT-PCR) analyses and polymorphism identification. These included Chinese Upton Meishan (UM, n = 10), Large White (LW, n = 10) and Ham Line (HL, n = 10) pigs (Hypor, Regina, SK, Canada). These breeds differ considerably in carcass composition, with the HL gilts being heavily muscled and having less body fat, whereas the UM gilts have the opposite characteristics. LW gilts were used in order to have a breed that is intermediate with respect to body composition and fat distribution. Least-square (LS) means of body weight and carcass fat distribution were previously reported for these same gilts (Lord et al., 2005). Pigs were fed a commercial diet (50% corn, 20% barley, 20% wheat bran, and 5% soybean; as-fed basis) *ad libitum* and had free access to water. Visceral, subcutaneous (s.c.) and total body fat weight (kg) measurements were taken as described in Lord et al. (Lord et al., 2005). Estimation of allele frequencies was performed on a total of 305 randomly selected unrelated purebred and crossbred sows: Landrace (LL, n = 100), Duroc (DD, n = 50), Yorkshire (YY, n = 83) and Meishan-Landrace (ML, n = 72). In addition, association studies were performed in a larger Landrace pig population (n = 692 pigs) for which growth and backfat data were available. These animals were taken from a larger population (n = 1593 available pigs), previously described in Houde et al. (Houde et al., 2008). Finally, two Duroc x Yorkshire-Landrace sows were used to perform PON3 tissue distribution analyses. Collected tissues were s.c. and peri-renal (p.r.) adipose tissues, lung, liver, pituitary, kidney, skeletal muscle, stomach and heart. Tissue samples were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. Animals were managed according to the recommended code of practice of the Canadian Council on Animal Care (Anonymous1993). All procedures were approved by the local animal care committee.

## 2.2. RNA extraction and complementary DNA synthesis

Total RNA was extracted from the collected tissues using TRIzol reagent (Invitrogen Life Technologies, Burlington, ON, Canada). The extracted RNA was dissolved in water and quantified spectrophotometrically. An RNA aliquot was electrophoresed in a 1% agarose gel to verify its integrity. For each sample, 1 µg of total RNA was treated with DNase I

(amplification grade, Invitrogen Life Technologies) to remove contaminating genomic DNA. First strand cDNA was synthesised with the Superscript II Reverse Transcriptase using oligo dT(12-18) as primers (Invitrogen Life Technologies) in a 20- $\mu$ l reaction volume. Upon completion of cDNA synthesis, the reaction volume was divided between two different tubes. In one of these, a dilution (15X) was performed with sterile water. This dilution was later used for real-time PCR analyses. A 5X dilution was done in the second tube, which was used for standard curves needed in real-time PCR analyses.

### *2.3. Cloning and sequencing of porcine PON3 variants*

In a previous study (Labrecque et al., 2008), two partial porcine PON3 mRNA sequences were obtained (GenBank accession no. DT654489 and DT654491). Primers used to carry out the 5' and 3' rapid amplification of cDNA ends (RACE) were designed based on the first of these PON3 sequences. The RACE was performed using the Marathon<sup>TM</sup> cDNA amplification kit (Clontech, a Takara Bio company, Mountain View, CA) according to the manufacturer's instructions. Briefly, poly A<sup>+</sup> RNA from sow perirenal fat tissue was isolated using the Nucleotrap mRNA purification kit (Clontech). One  $\mu$ g of poly A<sup>+</sup> RNA was reverse-transcribed using the Marathon cDNA synthesis primer. Second strand cDNA was synthesized and a Marathon adaptor was ligated. The PON3 5' end amplification was performed using the PON3-5-RACE primer (5'-GAGACTGTGATCCCATTTGGCAG-3'), whereas the PON3-3-RACE primer (5'-CTGCCAATGGGATCACAGTCTC-3') was used to amplify the 3' end sequence. The 5' RACE generated a single fragment of 683 bp and one fragment of 1181 bp was obtained for the 3' RACE. These amplified fragments were cloned in the TA Cloning Kit with pCR-II vector (Invitrogen Life Technologies) and sequenced using an ABI 377 DNA sequencer (PE Applied Biosystems, Foster City, CA). Sequence reactions were carried out with the Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (PE Applied Biosystems). Sequences were compared against the nonredundant (nr) and EST NCBI GenBank databases using the online BLAST program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Sequences were then assembled using the AutoAssembler 2.0 software (PE Applied Biosystem) to determine mRNA sequences of

porcine PON3. Lastly, the PON3 cDNA sequence was confirmed by sequencing PCR fragments that were amplified with the PON3-CO3-F (5'-AGCTGGTGGCTCTGACTC-3') and SS-PON3-2AS (5'-TACAAAAGTCAGATTAGCCCTG-3') primers. The resulting PON3 sequence was deposited on GenBank (GenBank Accession No. EF537043). The porcine PON3 putative cleavage site was identified using the Signal-P online program (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). Predicted N-glycosylation sites (Asn-Xaa-Ser/Thr) were determined with the NetNGlyc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>).

Two PON3 transcript variants (GenBank accession no. EF537044 and EF537045) were identified while searching for DNA polymorphisms in the porcine PON3 mRNA sequence. These were identified as shorter fragments after PCR amplification of PON3 mRNA using PON3-CO3-F and PON3-COD2-R (5'-ATCCATGAGAAAAGCTGGACAT-3') primers (GenBank accession no. EF537043). Sequencing of these PON3 transcript variants was performed as described above. The putative aa sequence of variants V1 and V2 was deduced using the NCBI's ORF finder program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>).

#### *2.4. Tissue distribution of porcine PON3 mRNA*

Tissue distribution of PON3 mRNA was performed using semiquantitative RT-PCR analysis. Total RNA from s.c. and p.r. adipose tissues, lung, liver, pituitary, kidney, skeletal muscle, stomach and heart was extracted and reverse-transcribed as described above. The PCR amplifications were performed in a 50  $\mu$ l total volume which contained a 2  $\mu$ l aliquot of the reverse transcription product, 150 nM of forward and reverse primers (Table 1), 1.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 200  $\mu$ M dNTPs and 0.5 u of *Taq* polymerase in 1 X *Taq* polymerase buffer (Amersham Pharmacia Biotech, Baie d'Urfé, QC, Canada). Primers were designed based on the porcine PON3 sequence (Table 1; Genbank accession no. EF537043). The PCR profiles involved an initial denaturation step at 94 °C for 2 min, followed by 30 cycles of denaturing at 94 °C for 1 min, annealing at 57 °C for 1 min, extension at 72 °C for 1 min, and a final



extension at 72 °C for 5 min. Amplified fragments were separated on a 1.5% agarose gel and stained with ethidium bromide (EtdBr). The relative PON3 mRNA levels were determined with a FluorChem SP imaging system densitometer using the associated quantification software program (Alpha Innotech, San Leandro, CA). The density value of each sample was normalized to the density value of the porcine peptidylprolyl isomerase A (PPIA) gene. This housekeeping gene (HKG) was chosen because its transcript abundance did not vary significantly among the tested tissues. The PPIA PCR reactions were performed as previously reported (Labrecque et al., 2008) using 150 nM of forward and reverse primers (Table 1). The PCR amplifications were performed in duplicate, using tissue samples from two animals. Results were reported as percentage of s.c. adipose tissue, which was given a value of 100%.

#### *2.5. Quantitative measurements of porcine paraoxonase 3 transcript in adipose tissues*

Porcine PON3 relative mRNA abundance was measured using QRT-PCR analysis. Total RNA was extracted from p.r. and s.c. adipose tissues of the Hypor gilt population (n = 30) and reverse-transcribed as described above. Primers were designed based on the available porcine PON3 sequence (Table 1) and were selected using the Primer Express software 3.0 (PE Applied BioSystems). Amplification of PPIA and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) HKG was also performed using the forward and reverse primers described in Table 1. The PCR amplifications were performed in a 10- $\mu$ l reaction volume consisting of corresponding concentrations of each primer (Table 1), 5  $\mu$ l of 2x Power SYBRGreen Master Mix (PE Applied BioSystems), and 3  $\mu$ l of 15X diluted cDNA. Cycling conditions were 2 min at 50°C to activate the amperase, 10 min at 95°C, followed by 40 cycles of 3 sec at 95°C and annealing and polymerization at 60°C for 30 sec. Amplification, detection, and data analysis were performed with an ABI 7500 Fast Real-Time PCR System (PE Applied BioSystems). Specificity of amplified fragments was verified through melting curve analysis. Amplifications were performed in triplicate and standard curves were prepared for each gene. The PON3 and HKG amplifications were run in separate assays. A pool of s.c. and p.r. fat tissue cDNA was used to create a standard curve for quantification

of the transcripts using the relative standard curve method as described by Applied BioSystems (Applied Biosystems, 1997). Standard curve arbitrary units were set at 1 for the 5X diluted cDNA pool, which was used to perform dilutions of 0.4, 0.3, 0.2, 0.1, 0.04, 0.02, 0.01 and 0.002. For each experimental sample, the amount of target gene mRNA relative to HKG mRNA was determined from the corresponding standard curves. Relative quantity ratios were then obtained by dividing the relative quantity units of selected genes by those of HKG.

### 2.6. Recombinant porcine paraoxonase 3 production

The complete PON3 coding sequence, excluding the signal sequence (nt 1-69), was obtained by PCR amplification using the PON3rec-F and PON3rec-R primers (Table 1). These primers were designed based on the porcine PON3 sequence (GenBank Accession no. EF537043) and *Nco*I and *Bgl*II restriction cleavage sites were added at their 5' end. The amplified fragment was purified using a gel extraction kit (QIAGEN, Mississauga, ON, Canada) and digested with *Nco*I and *Bgl*II restriction enzymes. The digested fragment was then cloned into the pQE60 expression vector (QIAGEN), which adds six histidine residues (His-tag) at the C-terminal position of the recombinant protein. The cloned fragment was sequenced in both directions as described above using the pQE type III-IV and pQE-Reverse primers provided with the pQE60 expression vector. *Escherichia coli* strain M15[pREP4] (QIAGEN) was used for transformation of the expression vector. Ten ml of an O/N culture was inoculated to 1 L of LB broth containing Ap (100 µg/ml) and Km (25 µg/ml). Expression of the recombinant protein was induced by adding 0.5 mM IPTG to the bacterial cell culture once it has reached an optical density of 0.6-0.7 at 600 nm. After 5 h of growth at 25 °C, the bacterial pellet was collected by centrifugation at 4,000 x g for 20 min. The pellet was then resuspended in lysis buffer (100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris-HCl, 6M GuHCl, pH 8). Cells were ruptured by sonication using a high intensity ultrasonic processor at 10-15 W for 3 x 10 sec pulses (with 1 min delay between pulses) with a 1/8 in. probe (VC60, Sonics and Materials, Danbury, CT). The lysate was then centrifuged at 10,000 x g for 20 min. Pre-equilibrated Ni-NTA agarose resin (QIAGEN) were added to the

supernatant and gently mixed for 45 min at room temperature. This mixture was then loaded into an empty column supplied with Ni-NTA beads. The bound proteins were then washed with native buffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole 0.1% Triton, pH 8) using increasing concentrations of imidazole (10, 20, 40 and 80 mM). Elution of the recombinant protein was performed using 4 x 0.5 ml of 250 mM imidazole elution buffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole, 0.1% Triton, pH 8). Eluted proteins were dialysed overnight at 4°C in phosphate buffer saline (PBS). A 1x final concentration of complete mini EDTA-free protease inhibitor cocktail was added to the eluted protein (Roche, Mississauga, ON, Canada). Protein concentration was determined using the DC Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Purified proteins were resolved by one-dimensional 12% SDS-PAGE electrophoresis and resulting gels were transferred to nitrocellulose membranes of 0.45 µm (Bio-Rad Laboratories). The identity of purified PON3 was confirmed by immunoblotting, using rabbit polyclonal Ab raised against a human PON3-conjugated peptide, kindly provided by Dr.Srinivasa T. Reddy (Reddy et al., 2001). The purified recombinant protein was used to produce rabbit polyclonal Ab raised against porcine PON3, a task contracted to the Biotechnology Research Institute (BRI, Montreal, QC, Canada).

### *2.7. Western blot analysis of porcine PON3 protein*

The tissue distribution of porcine PON3 protein was determined using Western blot analysis. Tissues included on blots were as follows: the pituitary, liver, heart, kidney, stomach, lung, skeletal muscle, p.r. and s.c. fat tissues. Protein extraction was performed as previously described in Palin et al (Palin et al., 2008). Five micrograms of proteins were separated on 10% SDS-PAGE gels and then transferred to nitrocellulose membranes of 0.45 µm (Bio-Rad Laboratories). Following transfer, membranes were blocked in blocking solution for 2h at 4°C; the solution was composed of Tris-buffered saline containing 0.1% Tween-20 (TBST) and 10% skim milk. Blots were washed 3 times at room temperature for 10 min in TBST and membranes were then incubated with rabbit polyclonal Ab (1:2500) raised against recombinant porcine PON3 protein. Blots were then washed 3 times for 10

min in TBST and incubated for 1 h in TBST containing whole Ab-HRP conjugated goat anti-rabbit IgG (1:5000) (Alpha Diagnostic Intl. Inc., San Antonio, TX). Membranes were washed 3 times (10 min/wash) using TBST and then 2 times with TBS to remove Tween. Detection was initiated using the Amersham ECL Western blotting reagent (GE Healthcare, Baie d'Urfé, QC, Canada). Chemiluminescence was detected using a 16-bit megapixel CCD camera FluorChem 8800 (Alpha Innotech). Tissue samples were also analyzed in blots that were hybridized with preimmune serum to check for Ab specificity.

### *2.8. Polymorphism detection and genotyping*

Detection of PON3 DNA polymorphisms was performed on p.r. adipose tissue cDNA from the Hypor gilt population (n = 30). The coding region of the PON3 gene was amplified using PON3-CO3-F and PON3-COD2-R primers described above, which hybridize at position 8-25 and 1173-1194 nt, respectively, of the porcine PON3 mRNA sequence (GenBank accession no. EF537043). The 1186 bp PCR products were then sequenced as described above. Nucleotide sequences were assembled and analyzed using the Seqscape software (Applied Biosystems) and were compared against the Genbank accession no. EF537043 sequence to identify DNA polymorphisms. Genotyping was performed on genomic DNA using the TaqMan single nucleotide polymorphism genotyping assay [also known as the minor groove binding (MGB) assay] on an ABI 7500 FAST Real-time PCR System (Applied Biosystems)(Tafe et al., 2007). Amplification of the PON3 genomic flanking sequences for the c.449G>A polymorphism was performed using forward 5'-CCCACATGGAGTCCACTGT-3' and reverse 5'-AGCTCGTGTTTTATAGTTTTTCAGGTGTAT-3' primers. Sense MGB probes (reporter) that bind over the SNP site were 5'-FAM-ACAACAACATTCTCTG-3' and 5'-VIC-ACAACAACGTTCTCTG-3', thus allowing the identification of the A and G alleles. For the c.896C>T polymorphism, 5'-GCCATCCTAATGCCATCAAGCT-3' and 5'-GCTTTTCCCATAAGCTCAGAGAAGT-3' flanking primers were used and antisense MGB primers were 5'-FAM-TTCTGATCCTAGC GGATC-3' and 5'-VIC-CTGATCCTGC GGATC-3'. All primers were designed using the File Builder 3.1

software (PE Applied BioSystems). The PCR reactions (5  $\mu$ l) contained 25 ng of genomic DNA, 1X final TaqMan Universal PCR Master Mix with the passive reference ROX (PE Applied BioSystems), 900 nM of each amplification primer and 200 nM of each MGB probe. The PCR conditions were 2 min at 50°C, 10 min at 95°C, followed by 40 cycles of 15 sec at 95°C and 1 min at 60°C. Allele discrimination was performed by running end-point detection using the ABI 7500 Fast System SDS software. Genotyping results were confirmed by visual inspection of the real-time PCR multicomponent plots. Allele frequencies of the c.449G>A and c.896C>T polymorphisms were then calculated within each breed of pig (n = 305; LL, DD, YY and ML) and genotyping was also carried out in the larger Landrace sow population (n = 692) for association studies. Studied traits were age at 100 kg (days), backfat thickness at 100 kg (mm), longissimus dorsi thickness at 100 kg (mm), estimated breeding values of age (EBV, days), EBV of fat (mm) and EBV of longissimus dorsi depth (mm) at 100 kg. Backfat thickness measurements were performed by ultrasonography at the P2 position (at the level of the last rib and 65 mm off the midline).

### 2.9. Statistics

Data were analyzed using SAS, Version 9.1 (SAS, 2002). Relative abundance values from the quantitative real-time PCR analyses are presented as LS means  $\pm$  SEM. Differences among breeds were analyzed using the all pairwise multiple comparison procedure with a Tukey adjustment. Pearson correlation coefficients were calculated using the CORR procedure. The relationship between allele frequencies and breeds was evaluated through the LOGISTIC procedure and comparisons between breeds were conducted through contrast statements. Associations among DNA polymorphisms and studied traits were evaluated through the MIXED procedure in a one-way analysis of variance model.

$$y_{ij} = \mu + G_i + e_{ij}$$

Where  $y_{ij}$  is the observation of the studied trait for sow  $j$  having genotype  $i$ ,  $\mu$  is the general mean,  $G_i$  is the effect of genotype  $i$ , and  $e_{ij}$  is the random error. Validation for the global effect of genotype was obtained through a Kruskal-Wallis test. Statistical significance was set at  $P < 0.05$  and  $P \leq 0.10$  was considered a tendency.

### 3. Results and Discussion

#### 3.1. Characterization of PON3 variants

In the current study, three porcine PON3 variants were identified (Figure 1, PON3 original sequence, EF537043; variant V1, EF537044 and variant V2, EF537045). The complete PON3 mRNA sequence was obtained using the 5' and 3' RACE technique, starting with a partial coding sequence of the porcine PON3 gene, previously identified in a subtractive library (GenBank accession no. DT654489, (Labrecque et al., 2008). Variants V1 and V2 were identified by conventional RT-PCR amplifications while searching for DNA polymorphisms in the PON3 sequence. Once the complete PON3 mRNA sequence was obtained, intron/exon boundaries for the porcine PON3 gene were determined using our own porcine PON3 sequence (GenBank accession no. EF537043) and the available PON3 genomic sequence (GenBank accession no. AC104478). A total of 9 exons, ranging in size from 56 to 936 bp were identified (Table 2). Porcine paraoxonase 3 splice junction sequences all have the canonical dinucleotides GT and AG for donor and acceptor sites, respectively (Table 2) (Bursset et al., 2000; Smith and Valcarcel, 2000). Sequence analysis revealed that exon 9 has four putative polyadenylation sites, being located 47 (AGTAAA), 82 (AGTAAA), 761 (ATTAAA) and 766 (AATAAA) nt downstream of the stop codon (data not shown; EF537043). However, only one site corresponds to a canonical polyadenylation site (position 766) (Sheets et al., 1990). These results suggest that the porcine PON3 gene may use alternative polyadenylation signals to generate different lengths of 3'-UTR. However, in the current study we identified only one 3'-UTR length of 777 nt.

The porcine PON3 ORF encodes for a 354 aa protein that has a predicted molecular mass of 39.6 kDa (Figure 2). Analysis of the deduced PON3 aa sequence revealed 81%, 80% and 79% sequence identity with the human (NM\_000940), rabbit (NM\_001082078) and rat (NM\_001004086) sequences, respectively (Figure 2). At the nucleotide level, the porcine PON3 coding sequence exhibits 87%, 84% and 81% sequence identity with human, rabbit, and rat sequences, respectively. Using the NetNGlyc 1.0 Server, three putative N-glycosylation sites (Asn-Xaa-Ser/Thr) were identified at positions 50, 101 and 268 of the porcine PON3 protein sequence, the N-glycosylation site located at position 101 is unique to the porcine sequence and the one located at position 268 is common to the porcine, human, rabbit and rat species (Figure 2). Therefore, different PON3 glycosylation patterns can be found among the porcine, human, rabbit and rat aa sequences (Figure 2). These differences may result in PON3 proteins having differing activities and stability, as glycosylation is known to affect protein folding, oligomerization and stability (Mitra et al., 2006). In contrast, it was reported earlier that glycosylation of human PON3 protein is not essential for its enzymatic activity (Draganov et al., 2005). Serum-purified and baculovirus-expressed human PON3 proteins are glycosylated with complex-type and high-mannose-type sugars, respectively, and the incubation of recombinant PON3 with endoglycosidase H does not eliminate its activity (Draganov et al., 2005). Similarly, it was reported that glycosylation is not required for the stability and enzymatic functions of recombinant PON3 protein produced in *E. coli* (Aharoni et al., 2004). Since the porcine PON3 protein has putative N-glycosylation sites that differs from those found in the human PON3, we cannot rule out the possible involvement of these posttranslational modifications in the protein stability and activity.

Three cysteine residues, located at positions 42, 283 and 352, are conserved among the porcine, human, rabbit and rat PON3 protein sequences (Figure 2). Earlier work performed on the rabbit PON3 protein identified Cys<sup>42</sup> as a free cysteine, whereas a disulphide bond was assigned between residues Cys<sup>283</sup> and Cys<sup>352</sup> (Ozols, 1999). In contrast, Cys<sup>283</sup> was identified as the free cysteine in human PON1 protein (Sorenson et al., 1995) and this residue was found to be essential for protection against LDL oxidation (Aviram et al., 1998) but not for PON arylesterase activity (Sorenson et al., 1995).

Residues His<sup>115</sup> and His<sup>134</sup> are conserved throughout the PON family and were also found to be conserved in the porcine PON3 protein sequence (Figure 2, His<sup>114</sup> and His<sup>133</sup>). Site-directed mutagenesis studies have demonstrated that these residues are essential for the lactonase activity of PON1 and PON3, for the esterase activity of PON1 (Khersonsky and Tawfik, 2006) and for PON1 protection against LDL oxidation (Rosenblat et al., 2006).

Paraoxonase 3 variant V1 is characterized by the absence of exons 3 and 4, whereas exons 3 and 5 are missing from variant V2 (Figure 1). After submitting the PON3 variant 1 sequence to the ORF Finder program of NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/orfig.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/orfig.cgi)), one of the proposed reading frames was identified as a putative shorter PON3 protein consisting of 280 aa (Figure 3). This truncated PON3 protein uses the same PON3 start and stop codons but lacks exon 3 and 4 and the consequent aa. The ORF Finder program further revealed that the N-terminal sequence of the predicted PON3 V2 protein uses the same start codon and has 48 aa in common with the original PON3 protein sequence. However, the next 13 aa differ from the porcine PON3 protein sequence owing to a shift in the reading frame (Figure 3). At the C-terminal end of variant V2, the ORF Finder program identified 108 aa that are identical to the original porcine PON3 protein, and which terminates at the same stop codon. Transcript variants, which originate from alternative splicing, were previously identified for the human PON2 gene (Mochizuki et al., 1998) but, to our knowledge, this is the first report of alternate use of exons in the PON3 gene. It is not clear at this point whether these new variants are translated into protein isoforms, or what the biological significance of such variations might be.

### *3.2. Recombinant PON3 production*

Recombinant porcine PON3 protein (minus the signal peptide) was produced in order to raise polyclonal Ab that would be specific to the pig PON3 protein. The SDS-PAGE analysis of the final purification eluate revealed the presence of a single band at the expected molecular weight (36.5 kDa, Figure 4). The authenticity of the purified protein



was confirmed by Western analysis using rabbit polyclonal Ab raised against a human PON3-conjugated peptide (Figure 4).

### *3.3. Tissue distribution of porcine PON3 transcripts and protein*

The relative abundance of PON3 mRNA was assessed in various pig tissues using semi-quantitative RT-PCR analyses (Figure 5A). A single fragment of 258 bp was detected in all pig tissues examined, being highest in liver, peri-renal fat and subcutaneous fat tissues and lowest in the pituitary gland, stomach, kidney and lung. Similarly, PON3 mRNA was also found in human stomach biopsies (Shamir et al., 2005) and in human liver and kidney (Reddy et al., 2001). However, in this latter study, the authors were unable to detect any expression of PON3 mRNA in heart, lung, muscle or stomach tissues. These discrepancies may be attributable to the greater sensitivity of the RT-PCR method used in the present study as compared with the Northern blot analyses used in Reddy et al. (Reddy et al., 2001). Nevertheless, the presence of PON3 transcript was confirmed in lung, stomach, heart, muscle, pituitary, kidney, liver and adipose tissues from various species when using the EST Expression Profile viewer from NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>) (UniGene Hs.440967; Mm.912; Rn.16469; Bt.61272 and Ssc.21810).

Western blot analyses using Ab raised against the recombinant porcine PON3 protein revealed the presence of six distinct bands (53, 43.5, 40, 34.5, 19.5 and 18 kDa, Figure 5C). Rabbit Ab raised against the porcine PON3 protein was also used to detect purified recombinant porcine PON3 protein, showing a molecular weight of 36.5 kDa in immunoblots (Data not shown). All tissue samples were also analyzed in blots that were hybridized with preimmune serum. For these immunoblots, no bands could be detected (data not shown). As previously reported for the purified rabbit serum PON3 protein (Draganov et al., 2000) and in agreement with the predicted value from the deduced aa sequence of PON3 cDNA, the expected molecular mass of the porcine PON3 protein is 40 kDa. A 40 kDa band was found in liver, subcutaneous and perirenal adipose tissues, but was absent from other tested tissues. Our Ab also detected a 34.5 kDa band, which is present in kidney and liver and, to a lesser extent, in perirenal fat tissue. This band may be a degradation product of PON3 or it might correspond to a different glycoform of PON3, as

previously described (Draganov et al., 2005). Since there is at least 60% aa identity between the PON1, 2 and 3 proteins in the humans or mice (Draganov and La Du, 2004), we cannot rule out the possible cross-reactivity of our polyclonal PON3 Ab with PON1 and PON2 proteins. Such cross-reactivity was previously demonstrated with an antihuman PON2 Ab able to detect both PON2 (43 kDa) and PON3 (40 kDa) proteins in macrophages (Rosenblat et al., 2003). Therefore, the 53 kDa band, observed in the liver, and the 43.5 kDa band, present in the heart, may well correspond to other paraoxonase proteins cross-reacting with our polyclonal anti PON3 Ab. Alternatively, these bands could also correspond to a specific glycoform of PON3. Low molecular weight bands of 19.5 and 18 kDa were also detected in the heart and skeletal muscle tissues, respectively. These bands might correspond to shorter PON3 isoforms or simply represent protein degradation products.

In the present study, the paraoxonase 3 protein was undetectable in porcine serum (data not shown). Similarly, the PON3 protein was absent from mouse serum and HDL fraction (Ng et al., 2005; Ng et al., 2007). These results suggest that the PON3 protein remains associated with cells and is not secreted into the circulation in pig and mouse species or is in very low abundance. By contrast, PON3 protein was found to be associated with the HDL fraction in human and rabbit serum (Draganov et al., 2000; Reddy et al., 2001). These species differences may be attributable to the different distal N-terminal sequences of PON3 proteins, which were identified as the major determinant of translocation and secretion (Draganov et al., 2002).

#### *3.4. Expression of paraoxonase 3 mRNA in adipose tissues*

In a previous work, the porcine PON3 transcript was identified among genes that were found to be up-regulated with adipose tissue development in pigs, thus suggesting a possible involvement of PON3 in adipogenesis (Labrecque et al., 2008). In the current study, the relative abundance of PON3 mRNA, measured in peri-renal and subcutaneous fat tissues, was significantly higher in obese UM gilts compared with the LW and HL gilts ( $P < 0.05$ ; Figure 6), whereas there was no significant difference in PON3 gene expression between

HL and LW gilts ( $P > 0.05$ ). Moreover, positive correlations were obtained between PON3 gene expression and subcutaneous fat ( $P < 0.05$ ), visceral fat ( $P < 0.05$  in s.c. fat;  $P = 0.056$  in p.r. fat) and total body fat ( $P < 0.05$ ) weights (Table 3). These results clearly show that PON3 mRNA abundance in fat tissues of the pig increases in parallel with adiposity. However, the mechanisms by which accumulation of fat tissue leads to an increase in PON3 mRNA abundance remain unknown. It was reported earlier that an increased oxidative stress occurs in accumulated fat cells, leading to dysregulated production of adipokines, along with increased reactive oxygen species production (Furukawa et al., 2004). Thus, fat accumulation in UM gilts can result in higher oxidative stress in fat cells, which could in turn modulate PON3 mRNA expression. Such modulation was previously reported for PON1 since its mRNA expression was found to be repressed by oxidized phospholipids in HepG2 cells (Reddy et al., 2001). However, unlike PON1, PON3 mRNA was not affected by oxidized phospholipids (Reddy et al., 2001). Interestingly, a recent study reported that PON3 overexpression can have a protective effect against obesity, an effect that could be observed only in male PON3 transgenic mice (Shih et al., 2007). Moreover, an inverse correlation was observed between PON3 mRNA level and fat pad weight in male and female mice (Shih et al., 2007), which stands in contrast to the results reported herein. Species differences in regulation of PON3 transcription might contribute to these discrepancies. However, further work will be needed to determine if PON3 mRNA is indeed up-regulated with adipogenesis and if obesity-related oxidative stress can modulate the transcription of PON3 gene in pig.

There was no significant correlation between PON3 transcript levels and fasting glucose and insulin (Table 3). Similarly, an earlier study reported that transgenic mice overexpressing PON3 did not exhibit significant differences in glucose and insulin levels (Shih et al., 2007).

### *3.5. Porcine PON3 polymorphism identification*

In this study, four SNPs were identified in the porcine PON3 coding sequence (Table 4). Two of these were silent mutations (c.87T>C and c.300A>T) and two corresponded to non-

synonymous polymorphisms (c.449G>A and c.896C>T). The c.449G>A polymorphism encodes for an arginine-to-histidine aa replacement at position 150, whereas the c.896C>T polymorphism encodes for a proline-to-leucine replacement at position 299 of the porcine PON3 protein. No further analyses were performed for the c.87T>C and c.300A>T SNPs since they did not alter the paraoxonase 3 protein sequence.

### *3.6. Allele frequencies of PON3 polymorphisms and association studies*

An allele-frequency analysis for the c.449G>A and c.896C>T SNPs was conducted on 305 unrelated animals representing four different breeds (Table 5). The mutant allele of the c.449G>A SNP is present in all breeds, with the highest and lowest mutant allele frequencies being found in YY and DD sows, respectively ( $P < 0.05$ ). The c.896C>T mutant allele is absent from LL and DD sows and is found at a low frequency in YY sows (only one heterozygous animal). The highest frequency of the c.896C>T mutant allele was found in UM sows. The *PON3* c.449G>A SNP was also analyzed in the larger Landrace sow population. The c.896C>T SNP was excluded from the association studies because of its null frequency in LL sows.

Polymorphisms were previously identified in the human *PON3* gene (Campo et al., 2004; Pasdar et al., 2006; Carlson et al., 2006; Erlich et al., 2006) but none have been reported previously in the porcine *PON3* gene. Moreover, none of the human polymorphisms identified so far are located in the same regions of the protein as the polymorphisms found in the current study. Few association studies have been reported for *PON3* polymorphisms. To date, genetic variations in the human *PON3* gene have been found to be associated with serum PON1 activity (Sanghera et al., 2008) and with Alzheimer's disease in African American families (Erlich et al., 2006). A weak association was also reported between a *PON3* polymorphism and females with large vessel disease and consequent strokes (Pasdar et al., 2006). Since a positive correlation was observed between *PON3* mRNA abundance and subcutaneous, visceral and total body fat weights and because the UM sows had the highest *PON3* mRNA level, association studies were first performed on growth and fat

traits. Data on these production traits were only available for the larger Landrace sow population. For all traits, only one significant association was found: the PON3 c.449AA genotype is significantly associated with higher EBVs for Longissimus dorsi depth, whereas the c.449GG genotype is associated with the lowest EBVs (Table 6;  $P < 0.01$ ). Although the longissimus dorsi depth at 100 kg did not reach the significance level, its distribution among PON3 genotypes is similar to that observed for Longissimus dorsi depth EBV (Table 6). These results suggest that the c.449AA genotype have a positive influence on the Longissimus dorsi lean meat deposition. In the current study, expression of PON3 mRNA and protein was reported in porcine skeletal muscle and PON3 protein was found in mouse muscle fibres (Marsillach et al., 2008). This local production of PON3 may be related with the intense production of free radicals by skeletal muscle. However, the exact role of PON3 in muscle cell growth and metabolism remains to be determined.

The c.449G>A SNP results in an arginine-to-histidine aa replacement at position 150. This substitution may not induce conformational changes in the protein since both aa are highly hydrophilic. However, histidine is often found in active enzyme sites where its imidazole ring can catalyze the forming and breaking of bonds (Gutteridge and Thornton, 2005). Moreover, Arg<sup>150</sup> is located in close proximity to two highly conserved His<sup>115</sup> and His<sup>134</sup> residues, known to be essential for the lactonase activity of PON1 and PON3 (Khersonsky and Tawfik, 2006). Therefore, the different PON3 c.449G>A genetic variants might cause PON3 protein to differ in their catalytic activity, which may have an as-yet unknown effect on muscle growth.

### *Conclusion*

In conclusion, we have reported results related to the cloning and sequencing of three porcine PON3 transcript variants that result from the alternate use of exons. The presence of PON3 mRNA and protein in various pig tissues suggest that it might play a role in the reduction of intracellular or local oxidative stress. Our results show clearly that PON3 mRNA abundance in fat tissues of pigs increases in parallel with adiposity. Further work will be needed to gain insight into the mechanisms by which the accumulation of fat cells

leads to an increase in PON3 transcription. Finally, the link between the PON3 c.449G>A SNP with Longissimus dorsi lean meat deposition further suggests that PON3 may play a role in skeletal muscle growth.

### **Acknowledgements**

This work was supported by the National Sciences and Engineering Research Council of Canada through Strategic Grant no. 322101-05 made to B.D. Murphy, V. Bordignon and M.F. Palin, by Genetiporc Inc. (St-Bernard, QC, Canada), by Agriculture and Agri-Food Canada and by Hypor (formerly Genex Swine Group, Regina, SK, Canada). The authors are grateful to S. Méthot for performing the statistical analyses, Professor Srinivasa T. Reddy, of the University of California, for providing the Ab rose against human PON3, and to the staff of the Swine Complex for animal care. Sherbrooke Dairy and Swine R&D Centre contribution no XXX.

## Figures and legends

Figure 1. Schematic representation of porcine paraoxonase 3 variants. Exons are shown as boxes and shaded areas represent protein coding regions. The striped area represents putative reading frames as proposed by the NCBI ORF Finder program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>). White areas represent untranslated exonic regions. Numbers above and below boxes indicate exon length and exon number, respectively.

Figure 2. Deduced amino acid sequence of the porcine paraoxonase 3 protein. Alignment of the predicted aa sequences of pig (EF537043), human (NM\_000940), rabbit (NM\_001082078) and rat (NM\_001004086) PON3 proteins. Residues identical to the pig sequence are indicated by hyphens. The porcine PON3 putative cleavage site, predicted by Signal-P (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), is indicated by a vertical arrow. Conserved cysteine residues are indicated by asterisks (\*). Contrasted H letters are conserved putative catalytic histidine residues. Predicted N-glycosylation sites (Asn-Xaa-Ser/Thr) are underlined and were determined using the NetNGlyc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>).

Figure 3. Alignment of deduced amino acid sequences of porcine paraoxonase 3 variants. Amino acid sequences of variants V1 and V2 (GenBank Accession No. EF537044 and EF537045) were deduced using the NCBI ORF finder program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>) and must be considered as putative protein sequences. Absence of aa residues is indicated by hyphens. The porcine PON3 putative cleavage site, predicted by Signal-P (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), is indicated by a vertical arrow. Underlined are potential N-glycosylation sites (Asn-Xaa-Ser/Thr) as determined through the NetNGlyc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>). Letters in boldface represent the two nonsynonymous mutations identified in the current study (R150H and P299L). Lowercase letters represent different aa residues from the original PON3 sequence. Contrasted H letters are conserved putative catalytic histidine residues.

Figure 4. Purification of recombinant porcine paraoxonase 3 protein. Left panel, SDS-PAGE (12% acrylamide gel) analysis of recombinant protein after the final elution from the Ni-NTA-agarose resin. Proteins were stained with Coomassie blue. M, protein molecular weight markers. E, final eluate. Right panel, immunoblotting analysis of purified recombinant protein detected with an Ab raised against human paraoxonase 3. PON3r, recombinant PON3 protein. 36.5 kDa.

Figure 5. Tissue distribution of paraoxonase 3 transcript and protein. (A) Semiquantitative RT-PCR amplifications were performed in duplicate using tissue samples collected from two adult Duroc x Yorkshire-Landrace sows. Results are reported as percentage of subcutaneous fat, which was given a value of 100%. The relative mRNA abundance of PON3 was normalized to endogenous porcine peptidylprolyl isomerase A (PPIA) mRNA. Kb+, 1kb Plus DNA ladder; (-), PCR amplification negative control without cDNA. (B) Distribution of paraoxonase 3 protein in various tissues. Five micrograms of proteins were loaded per lane. Blots were incubated with primary Ab raised against recombinant porcine PON3 protein and the second Ab was a goat anti-rabbit IgG.

Figure 6. Relative abundance of paraoxonase 3 mRNA in subcutaneous (A) and perirenal (B) adipose tissues from different breeds. Values ( $\pm$  S.E.M. max) are expressed as relative mRNA quantities adjusted to the porcine peptidylprolyl isomerase A (PPIA) transcript. HL, Ham Line (n = 10), LW, Large White (n = 10), UM, Upton-Meishan (n = 10). Asterisks indicate that means differed at  $*P < 0.05$ .



Table 1

Primer sequences and optimal PCR conditions used for PCR amplifications of PON3, PPIA and GAPDH transcripts

| Gene symbol <sup>a</sup>                   | Primer identity | Primer sequences (5'-3') <sup>b</sup>   | GenBank Accession No | Hybridization, nt | MgCl <sub>2</sub> , mM | Primer, nM | Annealing T, °C | Cycles, No. | Product size, nt |
|--|-----------------|---|----------------------|-------------------|------------------------|------------|-----------------|-------------|------------------|
| <i>Tissue distribution</i>                 |                 |   |                      |                   |                        |            |                 |             |                  |
| PPIA                                       | PPIA-F          | ACCGTCTTCTTCGACATCGC                    | NM_214353            | 17-36             | 1.0                    | 150        | 60              | 35          | 450              |
|  | PPIA-R          | CTTGCTGGTCTTGCCATTCC                    |                      | 447-466           | 1.0                    | 150        |                 |             |                  |
| PON3                                       | SSH403-F        | GGTGGTGGCCAAAGGATTTA                    | EF537043             | 639-658           | 1.0                    | 150        | 57              | 30          | 260              |
|  | SSH403-R        | CTGGCGGATCCTCAGTGTTA                    |                      | 879-898           | 1.0                    | 150        |                 |             |                  |
| <i>Quantitative real-time PCR analyses</i> |                 |   |                      |                   |                        |            |                 |             |                  |
| PPIA                                       | PPIA-RT-F       | GCACTGGTGGCAAGTCCAT                     | AY008846             | 192-210           | -                      | 300        | 60              | 40          | 71               |
|  | PPIA-RT-R       | AGGACCCGTATGCTTCAGGA                    |                      | 243-262           | -                      | 150        |                 |             |                  |
| GAPDH                                      | GAPDH-RT-F      | CAGCAATGCCTCCTGTACCA                    | AF017079             | 776-795           | -                      | 300        | 60              | 40          | 70               |
|  | GAPDH-RT-R      | GATGCCGAAGTTGTCATGGA                    |                      | 826-845           | -                      | 300        |                 |             |                  |
| PON3                                       | SSH403 RT-F     | TGGCAACATTAGAGATAGCCTGGA                | EF537043             | 569-593           | -                      | 300        | 60              | 40          | 73               |
|  | SSH403 RT-R     | ACCTTAACCTCCCTTGGACTGTAGAA              |                      | 616-641           | -                      | 300        |                 |             |                  |
| <i>PON3 recombinant protein</i>            |                 |   |                      |                   |                        |            |                 |             |                  |
| PON3                                       | PON3rec-F       | ATGCCATGGGGTTAAGAGAAAAAACTAATGCATATCGAG | EF537043             | 70-97             | -                      | 100        | 55              | 33          | 1012             |
| PON3                                       | PON3rec-R       | GAAGATCTGAGCACACAGTACAGAGCTTTGTGAAATA   | EF537043             | 1034-1062         | -                      | 100        |                 |             |                  |

<sup>a</sup> PPIA, porcine peptidylprolyl isomerase A; PON3, paraoxonase 3; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.<sup>b</sup> CCATGG, *Nco*I restriction site; AGATCT, *Bgl*II restriction site.

Table 2

## Exon-intron boundaries of the porcine paraoxonase 3 gene

| Exon/intron | Exon size<br>(bp) | 5' splice donor                | 3' splice acceptor                     | Intron size<br>(bp) |
|-------------|-------------------|--------------------------------|--|---------------------|
| 1           | 78                | TGGCATTAAAG <b>g</b> taaattggc | tgctgctc <b>ag</b> GATCATGGGG          | 1365                |
| 2           | 71                | GAGGGACTTG <b>g</b> tatgatgt   | tttttac <b>ag</b> AGAAAAAACT           | 6295                |
| 3           | 56                | TATCTCTACC <b>g</b> tgagtatt   | tctttg <b>ag</b> AAAATGGCTC            | 5203                |
| 4           | 166               | ATTGACAAA <b>G</b> gtaaaactg   | tttttaa <b>ag</b> GGATTAAACT           | 5194                |
| 5           | 127               | TTCTCAAAA <b>G</b> gtatggaatt  | cccactt <b>ag</b> ACCATACTGT           | 3520                |
| 6           | 201               | CAGACAAGAA <b>g</b> taagctctt  | tttcatt <b>ag</b> TGTGAATGAC           | 948                 |
| 7           | 82                | TCCACTCAAG <b>g</b> taaaagtgg  | tattt <b>aa</b> agGTATATCTAT           | 246                 |
| 8           | 129               | AGGATCAGAA <b>g</b> taagttta   | ttatt <b>g</b> aaagGTAATACAG           | 2321                |
| 9           | 936               |                                | tccta <b>ac</b> g <b>ag</b> GTGCTTCGTA |                     |

Exon sequences are shown in uppercase letters, and intron sequences are shown in lowercase letters.

Conserved **gt-ag** junctions are marked in boldface type.

Splice junction positions were determined by using our own porcine PON3 sequence (Accession No. EF537043) and the available PON3 genomic sequence (Accession No. AC104478).

Table 3

Correlation coefficients between paraoxonase 3 mRNA relative abundance and carcass and metabolic parameters

| Traits                  | n  | Subcutaneous fat | Perirenal fat     |
|-------------------------|----|------------------|-------------------|
| Subcutaneous fat weight | 30 | 0.40*            | 0.38*             |
| Visceral fat weight     | 30 | 0.38*            | 0.35 <sup>†</sup> |
| Total body fat weight   | 29 | 0.40*            | 0.38*             |
| Fasting glucose         | 28 | -0.15            | -0.09             |
| Fasting insulin         | 28 | -0.06            | 0.06              |

Values are Pearson correlation coefficients.

<sup>†</sup> $P < 0.1$ ; \* $P < 0.05$ .

Table 4

## Identification of DNA polymorphisms in the porcine paraoxonase 3 gene

| Polymorphisms <sup>1</sup> | Location | Effect    |
|----------------------------|----------|-----------|
| c.87T>C                    | Exon 2   | Silent    |
| c.300A>T                   | Exon 4   | Silent    |
| c.449G>A                   | Exon 5   | Arg150His |
| c.896C>T                   | Exon 8   | Pro299Leu |

<sup>1</sup> Position of polymorphism beginning at the start codon of the PON3 cDNA sequence (GenBank Accession No. EF537043).

Table 5

Allele frequencies of DNA polymorphisms within the porcine paraoxonase 3 gene in purebred and crossbred sows

| Polymorphisms <sup>1</sup> | Alleles <sup>2</sup> | LL (n = 100)      | DD (n = 50)       | YY (n = 83)       | ML (n = 72)        |
|----------------------------|----------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|
| c.449G>A                   | G                    | 0.59 <sup>b</sup> | 0.83 <sup>c</sup> | 0.31 <sup>a</sup> | 0.48 <sup>ab</sup> |
|                            | A                    | 0.41 <sup>b</sup> | 0.17 <sup>c</sup> | 0.69 <sup>a</sup> | 0.52 <sup>ab</sup> |
| c.896C>T                   | C                    | 1.00 <sup>b</sup> | 1.00 <sup>b</sup> | 0.99 <sup>b</sup> | 0.91 <sup>a</sup>  |
|                            | T                    | 0.00 <sup>b</sup> | 0.00 <sup>b</sup> | 0.01 <sup>b</sup> | 0.09 <sup>a</sup>  |

<sup>1</sup> Position of polymorphism beginning at the start codon of the PON3 cDNA sequence (GenBank Accession No. EF537043).

<sup>2</sup> Allele frequencies in rows followed by different letters differ at  $P < 0.05$ .

Table 6

Association of paraoxonase 3 genotypes with production traits in the Landrace population

| Traits <sup>1</sup>                    | c.449G>A |        |        | SEM max | P-value |
|--|----------|--------|--------|---------|---------|
|  | GG       | GA     | AA     |         |         |
| Genotypic frequencies                  | 0.36     | 0.47   | 0.17   |         |         |
| Age at 100 kg (days)                   | 150.14   | 150.03 | 149.95 | 0.67    | 0.969   |
| Backfat at 100 kg (mm)                 | 10.13    | 10.33  | 10.43  | 0.18    | 0.303   |
| Longissimus dorsi depth at 100 kg (mm) | 59.23    | 59.96  | 60.97  | 0.73    | 0.187   |
| Age EBV (days)                         | 4.66     | 4.38   | 4.75   | 0.30    | 0.444   |
| Backfat thickness EBV (mm)             | -0.52    | -0.49  | -0.34  | 0.09    | 0.255   |
| Longissimus dorsi depth EBV (mm)       | -0.69    | -0.17  | 0.51   | 0.28    | 0.004   |
| N                                      | 249      | 327    | 116    |         |         |

<sup>1</sup>EBV, estimated breeding values

Figure 1.

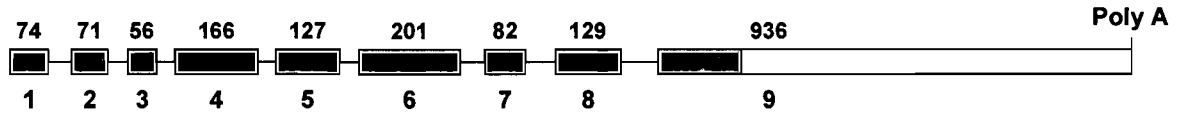
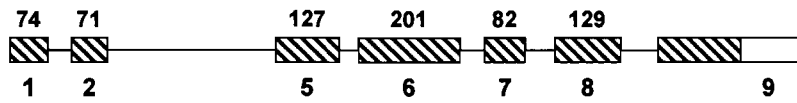
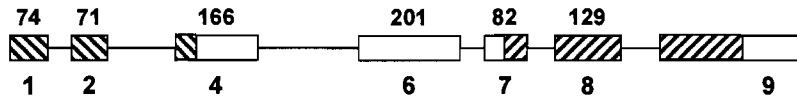
**PON3 GB#EF537043****PON3 V1 GB#EF537044****PON3 V2 GB#EF537045**

Figure 2.

|        |   |   |     |
|--------|---|---|-----|
|        | ↓   | * |     |
| Pig    | MGKLVALTLLGAFLLALIGERLVALREKTNAYREVEPVEPQNCHLIEGLENGSEDIDILPS             |   | 60  |
| Human  | -----V---VG-S-V--MFL-F--RV--S-----E-----E--S-----                         |   | 60  |
| Rabbit | -A--LL-----S--FV----L-F-NSFG-VQ-L-----V-----                              |   | 60  |
| Rat    | -----V---S---L---LNF--RVSTS--IK-T-----                                    |   | 60  |
|        |   |   |     |
| Pig    | GLAFISTGLNYPGMVNFAPDKPGQIFLMDLNEPNPRVQALNISDGFDKASFNP <sup>h</sup> GISTFI |   | 120 |
| Human  | -----S--K---P-----E--K-----Q---A---E--G---EL-----I--                      |   | 120 |
| Rabbit | -----S--K---P-----E--K---I-M--K---A-E-E--N--E-E-----                      |   | 120 |
| Rat    | -----K---PS-----R-----Y-KA--E-----QD-L-----                               |   | 120 |
|        |   |   |     |
| Pig    | DKDHTVYLYVVN <sup>h</sup> PHMESTVEIFKFEEQQRSLIHLKTIKHELLKSVNDIVVLGAEQFYAT |   | 180 |
| Human  | ---N-----K-----VY-----P-----  |   | 180 |
| Rabbit | -----K-----V-----N---P-----   |   | 180 |
| Rat    | ---N---A-----D-----P---V-----FE-----P-----                                |   | 180 |
|        |   |   |     |
| Pig    | RDHYFTNFFLATLEIVLDDLHWTYVLFYSPREVKVVAKGFNSANGITVSSDKKYIYVADV              |   | 240 |
| Human  | -----SL-SFF-MI---R-----C-----A-Q--V---A                                   |   | 240 |
| Rabbit | -----YV--L--MF-----S-----K-----S-----L---V---AT                           |   | 240 |
| Rat    | -----SH--VL--MI--P--S-----K-----Q--S-----L-Q--V---T                       |   | 240 |
|        |   |   |     |
|        |   | * |     |
| Pig    | DKNIHVMKKHDNWDLTPLKVIQLD <sup>h</sup> TLVDNLTIDPDTGDIWAGHPNAIKLVIYNTEDPPG |   | 300 |
| Human  | A---I-E-----Q-----G-----V--A---L-----PM--LN--P----                        |   | 300 |
| Rabbit | A--V---E-----E---H-----SV--A---L-----GM--LN--P----                        |   | 300 |
| Rat    | A---I---N-----V-----G-----V--A---L-----PM--L---P----                      |   | 300 |
|        |   |   |     |
|        |   | * |     |
| Pig    | SEVLRIQNALSEKPRISTEYANTGSVLQSSVASVYK GKLLIGTVFHKALYCVL                    |   | 354 |
| Human  | -----V-----V--V--N-----T-----H--I-----T---E-                              |   | 354 |
| Rabbit | -----V-----V--V-T-D-----T-----Q--I---I---T----                            |   | 354 |
| Rat    | -----DP--DN--V--L-S-N-----T-----HK-M---I-----E-                           |   | 354 |



Figure 3.

↓

```

EF537043  MGKLVALTLLGAFLALIGERLVALREKTNAYREVEPVEPQNCHLIEGLENGSEIDIDILPS 60
EF537044  MGKLVALTLLGAFLALIGERLVALREKTNAYREVEPVEPQNCHLIEGL----- 48
EF537045  MGKLVALTLLGAFLALIGERLVALREKTNAYREVEPVEPQNCHLIEGLgiklsrhgklet 60

EF537043  GLAFISTGLNYPGMVNFAPDKPGQIFLMDLNEPNPRVQALNISDGFDKASFNPHGISTFI 120
EF537044  -----
EF537045  r----- 61

EF537043  DKDHTVYLYVVNPHMESTVEIFKFEEQQRSLIHLKTIKHELLKSVNDIVVLGAEQFYAT 180
EF537044  --
EF537045  ----- 106

EF537043  RDHYFTNFFLATLEIVLDLHWTYVLFYSPREVKVAKGFNSANGITVSSDKKIYVADV 240
EF537044  RDHYFTNFFLATLEIVLDLHWTYVLFYSPREVKVAKGFNSANGITVSSDKKIYVADV 166
EF537045  -----

EF537043  DKNIHVMKKHDNWDLTPLKVIQLDTLVDNLTIDPDTGDIWAGCHPNAIKLVIYNTEDPPG 300
EF537044  DKNIHVMKKHDNWDLTPLKVIQLDTLVDNLTIDPDTGDIWAGCHPNAIKLVIYNTEDPPG 226
EF537045  -----MKKHDNWDLTPLKVIQLDTLVDNLTIDPDTGDIWAGCHPNAIKLVIYNTEDPPG 54

EF537043  SEVLRIQNALSEKPRISTEYANTGSVLQGSSVASVYKGKLLIGTVFHKALYCVL 354
EF537044  SEVLRIQNALSEKPRISTEYANTGSVLQGSSVASVYKGKLLIGTVFHKALYCVL 280
EF537045  SEVLRIQNALSEKPRISTEYANTGSVLQGSSVASVYKGKLLIGTVFHKALYCVL 108

```

Figure 4.

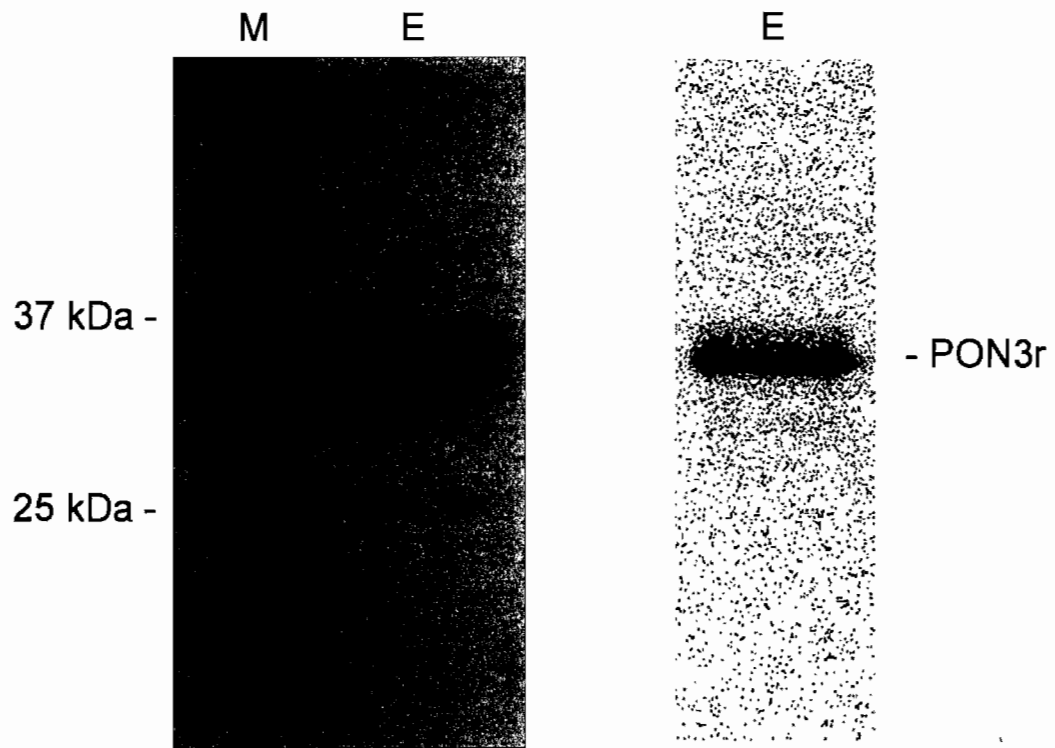
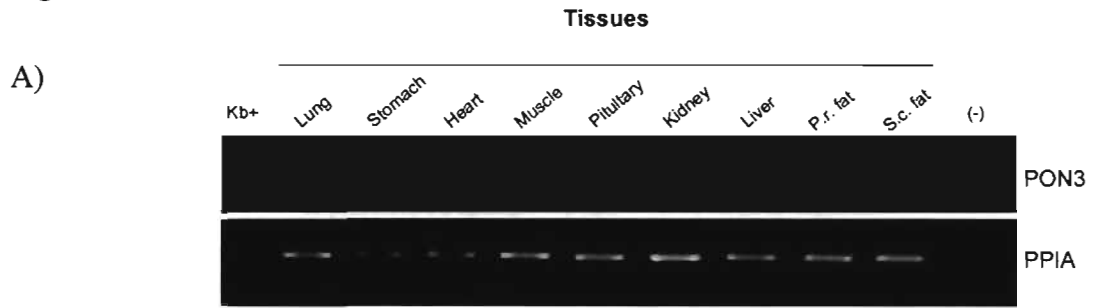
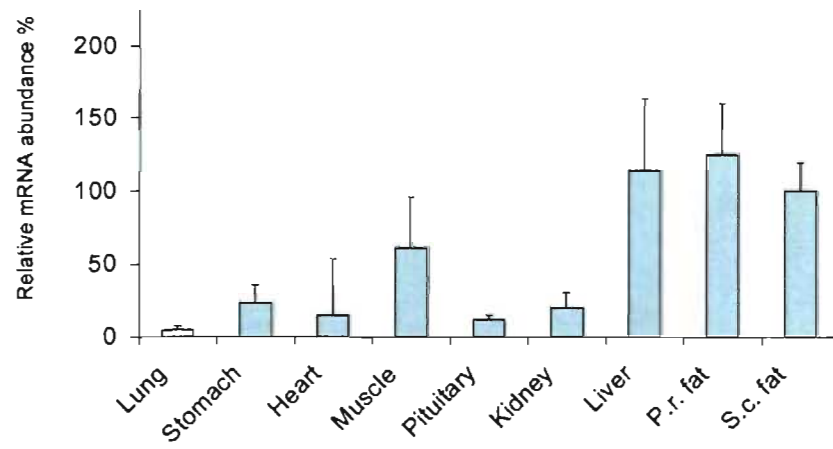


Figure 5.



B)



C)

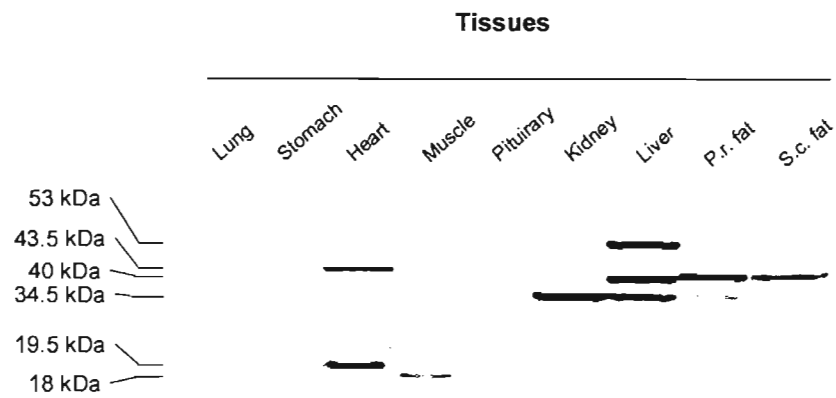
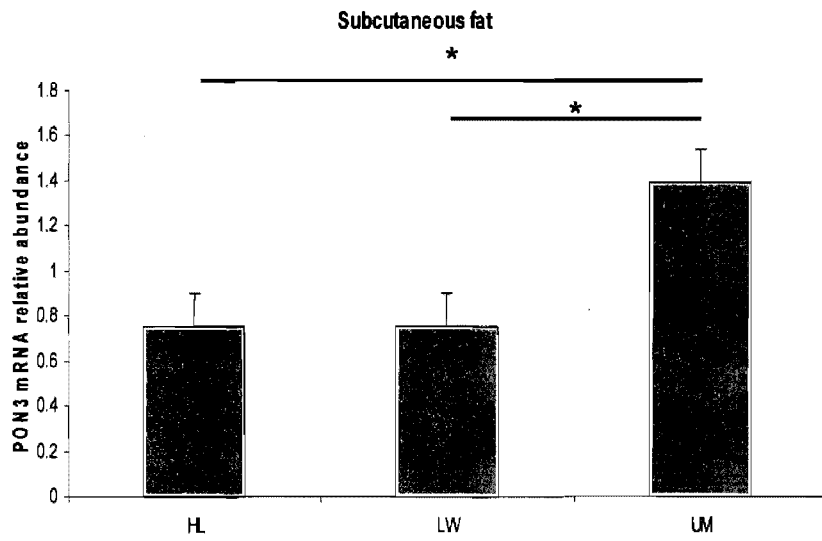
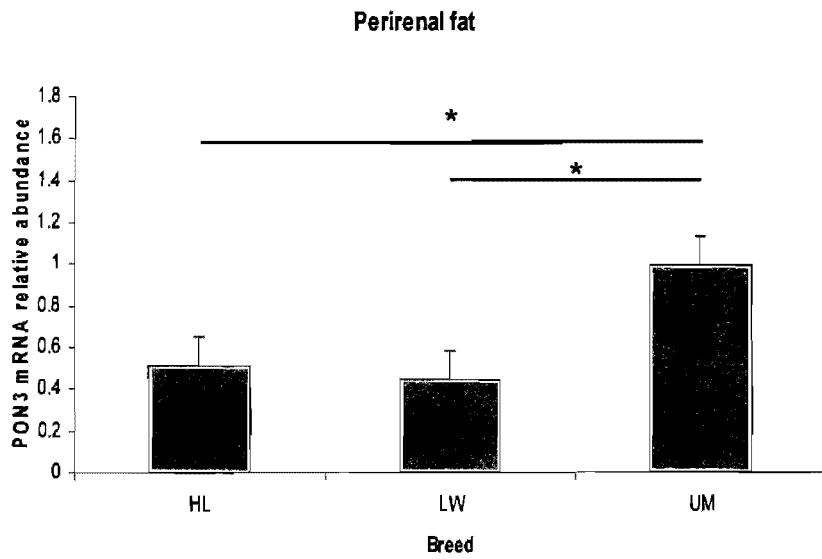


Figure 6.

A)



B)



## References

Aharoni, A., Gaidukov, L., Yagur, S., Toker, L., Silman, I. and Tawfik, D.S., 2004. Directed evolution of mammalian paraoxonases PON1 and PON3 for bacterial expression and catalytic specialization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 482-7.

Applied Biosystems, 1997 . ABI PRISM 7700 Sequence Detection System. User bulletin #2.

Aviram, M., Billecke, S., Sorenson, R., Bisgaier, C., Newton, R., Rosenblat, M., Erogul, J., Hsu, C., Dunlop, C. and La Du, B., 1998. Paraoxonase active site required for protection against LDL oxidation involves its free sulfhydryl group and is different from that required for its arylesterase/paraoxonase activities: selective action of human paraoxonase allozymes Q and R. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18, 1617-24.

Burset, M., Seledtsov, I.A. and Solovyev, V.V., 2000. Analysis of canonical and non-canonical splice sites in mammalian genomes. *Nucleic Acids Res.* 28, 4364-75.

Campo, S., Sardo, A.M., Campo, G.M., Avenoso, A., Castaldo, M., D'Ascola, A., Giunta, E., Calatroni, A. and Saitta, A., 2004. Identification of paraoxonase 3 gene (PON3) missense mutations in a population of southern Italy. *Mutat. Res.* 546, 75-80.

Can. Counc. Anim. Care (CCAC): Guide to the Care and Use of Experimental Animals. Ontario, Canada, 1993.

Carlson, C.S., Heagerty, P.J., Hatsukami, T.S., Richter, R.J., Ranchalis, J., Lewis, J., Bacus, T.J., McKinstry, L.A., Schellenberg, G.D., Rieder, M., Nickerson, D., Furlong, C.E., Chait, A. and Jarvik, G.P., 2006. TagSNP analyses of the PON gene cluster: effects on PON1 activity, LDL oxidative susceptibility, and vascular disease. *J. Lipid Res.* 47, 1014-24.

Draganov, D.I. and La Du, B.N., 2004. Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 369, 78-88.

Draganov, D.I., Sass, K.M., Watson, C.E., Bisgaier, C.L., Reddy, S.T., Teiber, J.F. and La Du, B.N., 2002. The N-terminal sequences of human paraoxonase-1 (PON1) and paraoxonase-3 (PON3) are responsible for their different translocation and secretion. *Circulation* 106, 123 (Abstract)

Draganov, D.I., Stetson, P.L., Watson, C.E., Billecke, S.S. and La Du, B.N., 2000. Rabbit serum paraoxonase 3 (PON3) is a high density lipoprotein-associated lactonase and protects low density lipoprotein against oxidation. *J. Biol. Chem.* 275, 33435-42.

Draganov, D.I., Teiber, J.F., Speelman, A., Osawa, Y., Sunahara, R. and La Du, B.N., 2005. Human paraoxonases (PON1, PON2, and PON3) are lactonases with overlapping and distinct substrate specificities. *J. Lipid Res.* 46, 1239-47.

Dullaart, R.P., de Vries, R., Sluiter, W.J. and Voorbij, H.A., 2008. High plasma C-reactive protein is related to low paraoxonase-I activity independently of high leptin and low adiponectin in Type 2 diabetes mellitus. *Clin. Endocrinol. (Oxf)* doi: 10.1111/j.1365-2265.2008.03306.x.

Erlich, P.M., Lunetta, K.L., Cupples, L.A., Huyck, M., Green, R.C., Baldwin, C.T. and Farrer, L.A., 2006. Polymorphisms in the PON gene cluster are associated with Alzheimer disease. *Hum. Mol. Genet.* 15, 77-85.

Furukawa, S., Fujita, T., Shimabukuro, M., Iwaki, M., Yamada, Y., Nakajima, Y., Nakayama, O., Makishima, M., Matsuda, M. and Shimomura, I., 2004. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J. Clin. Invest.* 114, 1752-61.

Gugliucci, A., Hermo, R., Tsuji, M. and Kimura, S., 2006. Lower serum paraoxonase-1 activity in type 2 diabetic patients correlates with nitrated apolipoprotein A-I levels. *Clin. Chim. Acta* 368, 201-2.

Gutteridge, A. and Thornton, J.M., 2005. Understanding nature's catalytic toolkit. *Trends Biochem. Sci.* 30, 622-9.

Hegele, R.A., Connelly, P.W., Scherer, S.W., Hanley, A.J., Harris, S.B., Tsui, L.C. and

Zinman, B., 1997. Paraoxonase-2 gene (PON2) G148 variant associated with elevated fasting plasma glucose in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82, 3373-7.

Houde, A.A., Murphy, B.D., Mathieu, O., Bordignon, V. and Palin, M.F., 2008. Characterization of swine adiponectin and adiponectin receptor polymorphisms and their association with reproductive traits. *Anim. Genet.* 39, 249-57.

Keaney, J.F. Jr, Larson, M.G., Vasan, R.S., Wilson, P.W., Lipinska, I., Corey, D., Massaro, J.M., Sutherland, P., Vita, J.A. and Benjamin, E.J., 2003. Obesity and systemic oxidative stress: clinical correlates of oxidative stress in the Framingham Study. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23, 434-9.

Khersonsky, O. and Tawfik, D.S., 2006. The histidine 115-histidine 134 dyad mediates the lactonase activity of mammalian serum paraoxonases. *J. Biol. Chem.* 281, 7649-56.

Labrecque, B., Mathieu, O., Bordignon, V., Murphy, B.D. and Palin, M.F., 2008. Identification of differentially expressed genes in a porcine in vivo model of adipogenesis using suppression subtractive hybridization. *Comp. Biol. Physio. D*

Leus, F.R., Zwart, M., Kastelein, J.J. and Voorbij, H.A., 2001. PON2 gene variants are associated with clinical manifestations of cardiovascular disease in familial hypercholesterolemia patients. *Atherosclerosis* 154, 641-9.

Lord, E., Ledoux, S., Murphy, B.D., Beaudry, D. and Palin, M.F., 2005. Expression of adiponectin and its receptors in swine. *J. Anim. Sci.* 83, 565-78.

Mackness, B., Durrington, P., McElduff, P., Yarnell, J., Azam, N., Watt, M. and Mackness, M., 2003. Low paraoxonase activity predicts coronary events in the Caerphilly Prospective Study. *Circulation* 107, 2775-9.

Mackness, B., Hine, D., McElduff, P. and Mackness, M., 2006a. High C-reactive protein and low paraoxonase1 in diabetes as risk factors for coronary heart disease. *Atherosclerosis* 186, 396-401.

Mackness, B., Quarck, R., Verreth, W., Mackness, M. and Holvoet, P., 2006b. Human paraoxonase-1 overexpression inhibits atherosclerosis in a mouse model of metabolic syndrome. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26, 1545-50.

Mackness, M.I., Arrol, S. and Durrington, P.N., 1991. Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. *FEBS Lett.* 286, 152-4.

Marsillach, J., Mackness, B., Mackness, M., Riu, F., Beltran, R., Joven, J. and Camps, J., 2008. Immunohistochemical analysis of paraoxonases-1, 2, and 3 expression in normal mouse tissues. *Free Radic. Biol. Med.* 45, 146-57.

Mitra, N., Sinha, S., Ramya, T.N. and Surolia, A., 2006. N-linked oligosaccharides as outfitters for glycoprotein folding, form and function. *Trends Biochem. Sci.* 31, 156-63.

Mochizuki, H., Scherer, S.W., Xi, T., Nickle, D.C., Majer, M., Huizenga, J.J., Tsui, L.C. and Prochazka, M., 1998. Human PON2 gene at 7q21.3: cloning, multiple mRNA forms, and missense polymorphisms in the coding sequence. *Gene* 213, 149-57.

Moghadasian, M.H., 2002. Experimental atherosclerosis: a historical overview. *Life Sci.* 70, 855-65.

Nafikov, R.A. and Beitz, D.C., 2007. Carbohydrate and lipid metabolism in farm animals. *J. Nutr.* 137, 702-5.

Navarro, M.A., Acin, S., Carnicer, R., Guzman-Garcia, M.A., Arbones-Mainar, J.M., Surra, J.C., Cebrian, J.A., Arnal, C., Isabel, B., Lopez-Bote, C.J. and Osada, J., 2004. Response of ApoA-IV in pigs to long-term increased dietary oil intake and to the degree of unsaturation of the fatty acids. *Br. J. Nutr.* 92, 763-9.

Ng, C.J., Bourquard, N., Grijalva, V., Hama, S., Shih, D.M., Navab, M., Fogelman, A.M., Lusis, A.J., Young, S. and Reddy, S.T., 2006. Paraoxonase-2 deficiency aggravates atherosclerosis in mice despite lower apolipoprotein-B-containing lipoproteins: anti-atherogenic role for paraoxonase-2. *J. Biol. Chem.* 281, 29491-500.



Ng, C.J., Bourquard, N., Hama, S.Y., Shih, D., Grijalva, V.R., Navab, M., Fogelman, A.M. and Reddy, S.T., 2007. Adenovirus-mediated expression of human paraoxonase 3 protects against the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27, 1368-74.

Ng, C.J., Shih, D.M., Hama, S.Y., Villa, N., Navab, M. and Reddy, S.T., 2005. The paraoxonase gene family and atherosclerosis. *Free Radic. Biol. Med.* 38, 153-63.

Ng, C.J., Wadleigh, D.J., Gangopadhyay, A., Hama, S., Grijalva, V.R., Navab, M., Fogelman, A.M. and Reddy, S.T., 2001. Paraoxonase-2 is a ubiquitously expressed protein with antioxidant properties and is capable of preventing cell-mediated oxidative modification of low density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* 276, 44444-9.

Olusi, S.O., 2002. Obesity is an independent risk factor for plasma lipid peroxidation and depletion of erythrocyte cytoprotective enzymes in humans. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 26, 1159-64.

Ozols, J., 1999. Isolation and complete covalent structure of liver microsomal paraoxonase. *Biochem. J.* 338 ( Pt 2), 265-72.

Palin, M.F., Labrecque, B., Beaudry, D., Mayhue, M., Bordignon, V. and Murphy, B.D., 2008. Visfatin expression is not associated with adipose tissue abundance in the porcine model. *Domest. Anim. Endocrinol.* 35, 58-73.

Pasdar, A., Ross-Adams, H., Cumming, A., Cheung, J., Whalley, L., St Clair, D. and MacLeod, M.J., 2006. Paraoxonase gene polymorphisms and haplotype analysis in a stroke population. *BMC Med. Genet.* 7, 28.

Primo-Parmo, S.L., Sorenson, R.C., Teiber, J. and La Du, B.N., 1996. The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family. *Genomics* 33, 498-507.

Reddy, S.T., Wadleigh, D.J., Grijalva, V., Ng, C., Hama, S., Gangopadhyay, A., Shih, D.M., Lusi, A.J., Navab, M. and Fogelman, A.M., 2001. Human paraoxonase-3 is an HDL-

associated enzyme with biological activity similar to paraoxonase-1 protein but is not regulated by oxidized lipids. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21, 542-7.

Rosenblat, M., Draganov, D., Watson, C.E., Bisgaier, C.L., La Du, B.N. and Aviram, M., 2003. Mouse macrophage paraoxonase 2 activity is increased whereas cellular paraoxonase 3 activity is decreased under oxidative stress. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23, 468-74.

Rosenblat, M., Gaidukov, L., Khersonsky, O., Vaya, J., Oren, R., Tawfik, D.S. and Aviram, M., 2006. The catalytic histidine dyad of high density lipoprotein-associated serum paraoxonase-1 (PON1) is essential for PON1-mediated inhibition of low density lipoprotein oxidation and stimulation of macrophage cholesterol efflux. *J. Biol. Chem.* 281, 7657-65.

Sanghera, D.K., Aston, C.E., Saha, N. and Kamboh, M.I., 1998. DNA polymorphisms in two paraoxonase genes (PON1 and PON2) are associated with the risk of coronary heart disease. *Am. J. Hum. Genet.* 62, 36-44.

Sanghera, D.K., Manzi, S., Minster, R.L., Shaw, P., Kao, A., Bontempo, F. and Kamboh, M.I., 2008. Genetic Variation in the Paraoxonase-3 (PON3) Gene is Associated with Serum PON1 Activity. *Ann. Hum. Genet.* 72, 72-81.

SAS Statistical Analysis System: Release 9.1. SAS Institute Inc, Cary NC, 2002.

Senti, M., Tomas, M., Fito, M., Weinbrenner, T., Covas, M.I., Sala, J., Masia, R. and Marrugat, J., 2003. Antioxidant paraoxonase 1 activity in the metabolic syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88, 5422-6.

Shamir, R., Hartman, C., Karry, R., Pavlotzky, E., Eliakim, R., Lachter, J., Suissa, A. and Aviram, M., 2005. Paraoxonases (PONs) 1, 2, and 3 are expressed in human and mouse gastrointestinal tract and in Caco-2 cell line: selective secretion of PON1 and PON2. *Free Radic. Biol. Med.* 39, 336-44.

Sheets, M.D., Ogg, S.C. and Wickens, M.P., 1990. Point mutations in AAUAAA and the poly (A) addition site: effects on the accuracy and efficiency of cleavage and

polyadenylation in vitro. *Nucleic Acids Res.* 18, 5799-805.

Shih, D.M., Gu, L., Xia, Y.R., Navab, M., Li, W.F., Hama, S., Castellani, L.W., Furlong, C.E., Costa, L.G., Fogelman, A.M. and Lusis, A.J., 1998. Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. *Nature* 394, 284-7.

Shih, D.M., Xia, Y.R., Wang, X.P., Wang, S.S., Bourquard, N., Fogelman, A.M., Lusis, A.J. and Reddy, S.T., 2007. Decreased obesity and atherosclerosis in human paraoxonase 3 transgenic mice. *Circ. Res.* 100, 1200-7.

Smith, C.W. and Valcarcel, J., 2000. Alternative pre-mRNA splicing: the logic of combinatorial control. *Trends Biochem. Sci.* 25, 381-8.

Sorenson, R.C., Bisgaier, C.L., Aviram, M., Hsu, C., Billecke, S. and La Du, B.N., 1999. Human serum Paraoxonase/Arylesterase's retained hydrophobic N-terminal leader sequence associates with HDLs by binding phospholipids : apolipoprotein A-I stabilizes activity. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19, 2214-25.

Sorenson, R.C., Primo-Parmo, S.L., Kuo, C.L., Adkins, S., Lockridge, O. and La Du, B.N., 1995. Reconsideration of the catalytic center and mechanism of mammalian paraoxonase/arylesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 7187-91.

Tafe, L.J., Belloni, D.R. and Tsongalis, G.J., 2007. Detection of the C282Y and H63D polymorphisms associated with hereditary hemochromatosis using the ABI 7500 fast real time PCR platform. *Diagn. Mol. Pathol.* 16, 112-5.

Teiber, J.F., Draganov, D.I. and La Du, B.N., 2003. Lactonase and lactonizing activities of human serum paraoxonase (PON1) and rabbit serum PON3. *Biochem. Pharmacol.* 66, 887-96.

Terpstra, A.H., Sanchez-Muniz, F.J., West, C.E. and Woodward, C.J., 1982. The density profile and cholesterol concentration of serum lipoproteins in domestic and laboratory animals. *Comp. Biochem. Physiol. B* 71, 669-73.

Tward, A., Xia, Y.R., Wang, X.P., Shi, Y.S., Park, C., Castellani, L.W., Lusis, A.J. and Shih, D.M., 2002. Decreased atherosclerotic lesion formation in human serum paraoxonase transgenic mice. *Circulation* 106, 484-90.

## Section 5 - Discussion générale et conclusion

Les objectifs de cette étude étaient d'identifier les principaux gènes participant à l'adipogenèse et à la lipogenèse chez le porc (premier article) et ensuite de caractériser un nouveau gène (PON3) dont l'expression est associée au développement du tissu adipeux (deuxième article).

Le premier article nous présente les résultats obtenus suite à la réalisation d'une librairie de soustraction (SSH) sur le tissu adipeux sous-cutané d'une truie gestante et de ses fœtus âgés de 90 jours. Cette expérimentation nous a permis d'identifier 192 séquences non-redondantes : 149 correspondent à des gènes identifiés, 37 séquences sont similaires à des ESTs (« expressed sequence tag ») ou des séquences génomiques retrouvées dans la base de données GenBank, et enfin nous avons rapporté 6 nouvelles séquences. Le SSH a été utilisé puisque cette technique permet d'identifier de nouveaux gènes et de détecter les gènes faiblement exprimés. Une validation de la différence d'expression de l'ARNm pour une dizaine de séquences choisies au hasard (PLIN, MMD (Protéine reliée à la différenciation du monocyte vers le macrophage), MYOC (Myociline), PON3, SCD1, AGT, ADIPOQ et trois séquences inconnues) a été effectuée en utilisant la technique de RT-PCR quantitatif en temps réel, confirmant ainsi l'efficacité du SSH.

Dans la liste de gènes différentiellement exprimés, certains avaient déjà été rapportés dans la littérature et sont déjà reconnus pour participer à l'adipogenèse, à la lipogenèse et à l'entreposage des triglycérides. La présence de ces gènes confirme la validité du modèle expérimental utilisé dans notre étude. De plus, l'utilisation d'un modèle *in vivo* d'adipogenèse nous a permis d'identifier des gènes n'ayant encore jamais été associés au développement du tissu adipeux. Dans le tissu adipeux, la présence de cellules autres que les adipocytes pourrait expliquer l'identification de ces gènes. Par exemple, il est maintenant connu que certains produits sécrétés par les macrophages peuvent avoir un effet sur le développement du tissu adipeux (Lacasa et al., 2007).

Afin d'obtenir plus d'informations sur les voies impliquées dans le développement du tissu adipeux chez la truie, une analyse bioinformatique a été réalisée afin de faire ressortir les termes ontologiques reliés aux processus biologiques et aux fonctions moléculaires les plus

susceptibles d'être représentés par l'ensemble de notre librairie SSH. Le même exercice a été effectué afin de discerner les voies métaboliques actives. Sans surprise, les activités enzymatiques et de transport, ainsi que les voies métaboliques associées au métabolisme des lipides ressortent du lot. Plus spécifiquement, la voie de signalisation aux PPARs, la phosphorylation oxydative et le métabolisme du glutathion sont des voies moléculaires dont le rôle et la participation au niveau de l'adipogenèse ont déjà été rapportés (Brun et al., 1996; Yamasaki et al., 2006; McKay et al., 2003). En outre, d'autres voies moins intuitives ont été mises en évidence. D'abord, le SSH a révélé quelques gènes participant à la formation de jonctions serrées. À l'intérieur du tissu adipeux, on ne trouve des jonctions intercellulaires qu'au niveau des cellules endothéliales (Crandall et al., 1997). Cela suggère que les cellules endothéliales du tissu adipeux d'une truie adulte sont soit plus nombreuses, soit plus différenciées que celles retrouvées au niveau du tissu adipeux fœtal à 90 jours. Ensuite, les voies du catabolisme de la valine, de la leucine et de l'isoleucine, ainsi que la voie du métabolisme du tryptophane ont également été révélées. La première voie est impliquée dans l'approvisionnement en acétyl-CoA nécessaire à la biosynthèse des acides gras (Kedishvili et al., 1994). Par contre, il existe peu d'indice dans la littérature sur le rôle de la voie du tryptophane dans le tissu adipeux. De par les résultats présentés dans cet article, un ensemble de gènes participant à l'adipogenèse et à la lipogenèse chez le porc a été identifié. Aussi, de nouvelles séquences, de nouveaux gènes et de nouvelles voies métaboliques ont été révélés et de futures investigations seront nécessaires pour déterminer quelle est leur implication exacte dans le développement du tissu adipeux porcin. Pour faire suite à ces travaux, il serait intéressant d'identifier le type cellulaire où origine l'expression de chacun des gènes identifiés. Ceci nous permettrait, entre autre, de confirmer la contribution des différents types cellulaires dans le développement du tissu adipeux et aussi de préciser l'utilisation de certaines voies métaboliques. Par la suite, il serait intéressant de mesurer la contribution des différents types cellulaires au processus de l'adipogenèse. De plus, la recherche de polymorphismes sur les gènes provenant de cette étude pourrait révéler d'autres associations avec des caractères de production, de reproduction, ou de qualité de la viande. À plus long terme, ces polymorphismes pourraient être utilisés comme marqueurs pour assister la sélection génétique en production porcine.

Le deuxième article met en évidence un gène (PON3) identifié dans notre librairie SSH (premier article). L'objectif de cette étude était de caractériser un nouveau gène dont l'expression est associée au développement du tissu adipeux. Bien que plusieurs gènes identifiés soient aussi considérés comme des candidats intéressants, nous avons choisis PON3. Cette enzyme avait été détectée dans le sérum par d'autres équipes de recherche, nous suggérant ainsi que cette protéine sécrétée par le tissu adipeux pourrait avoir un rôle pléiotropique. De plus, notre s'est arrêté sur PON3 puisque ce dernier possède une activité antioxydante reconnue et qu'il existe une association positive entre le stress oxydatif et l'accumulation de lipides dans le tissu adipeux (Furukawa et al., 2004). Jusqu'à tout récemment (Shih et al., 2007), la présence de PON3 dans le tissu adipeux n'avait jamais été rapportée. Dans la présente étude, nous avons d'abord cloné et déterminé la séquence entière du transcrite de PON3 chez le porc. De plus, nous avons identifié trois isoformes de PON3. La séquence nucléotidique et la séquence en acides aminés sont relativement bien conservées en comparaison à d'autres espèces. Les acides aminés importants pour la structure et les activités enzymatiques de PON3 sont tous présents dans la séquence porcine, laissant présager que l'activité lactonase et l'activité de protection au stress oxydatif sont préservées pour cette espèce. Il sera tout de même intéressant de vérifier l'impact des différences observées dans la séquence en acides aminés sur les modifications post-traductionnelles et sur l'activité enzymatique de PON3.

Les niveaux d'ARNm ont été mesurés dans les gras sous-cutané et viscéral, et ensuite comparés entre différentes races porcines : les truies obèses Upton-Meishan et les races plus maigres, Large White et Ham-Line. Les plus hauts niveaux d'expression ont été retrouvés chez les truies Upton-Meishan. De plus, l'expression de l'ARNm de PON3 corrèle avec le poids du gras sous-cutané, viscéral et total de l'animal. L'ensemble de ces résultats montre que l'expression de l'ARNm de PON3 augmente en parallèle avec l'adiposité chez la truie. Ceci va à l'encontre du modèle murin où les niveaux d'ARNm de PON3 corrélaient inversement au poids des dépôts adipeux (Shih et al., 2007). Il est donc difficile, pour le moment, de déterminer quels sont les paramètres exacts de cette divergence, laquelle peut se baser sur une différence interspèce et/ou sur le type d'expérimentation exécutée.

Chez le lapin, une équipe a observé que PON3 était associée aux HDL, tout comme PON1 chez plusieurs espèces (Draganov et al., 2000). Cependant, pour PON3, cette association est contestée chez l'humain et la souris (Draganov, 2007; Ng et al., 2007). En ce qui nous concerne, la protéine n'a pu être détectée dans le sérum, suggérant que PON3 ne serait pas associée aux HDL chez le porc. Collectivement, ces résultats démontrent que des différences interespèces existent en ce qui concerne la capacité de PON3 à lier les HDL.

Quatre polymorphismes ont été identifiés dans la séquence codante de PON3. L'un d'entre eux, c.449G>A, modifie une arginine pour une histidine à la position 150. Ce SNP est associé à l'indice de progrès génétique (EBV, estimated breeding value) de l'épaisseur du muscle *Longissimus dorsi*. L'indice de progrès génétique se définit par une estimation de la valeur génétique d'un animal pour un caractère en tenant compte de l'héritabilité de ce caractère, de la quantité d'informations disponibles pour chaque animal et ses descendants, du croisement génétique où les animaux sont développés, et du changement génétique de la lignée au cours du temps. Des études d'associations additionnelles seront nécessaires afin de confirmer l'association de ce SNP à l'EBV de l'épaisseur du muscle *Longissimus dorsi*. Nous avons observé l'expression de l'ARNm de PON3 dans le muscle mais en ce qui concerne l'expression de la protéine, nos résultats sont moins probants. Une investigation plus poussée sera nécessaire afin de confirmer l'expression de cette protéine dans le muscle et aussi de vérifier si elle est réellement exprimée par les myocytes. Il sera aussi intéressant de mesurer les niveaux d'expression de PON3 dans le muscle en relation avec les génotypes observés. La confirmation de l'implication de PON3 sur le muscle susciterait un certain intérêt, puisque PON3 possède des propriétés antioxydantes et que l'oxydation des lipides est l'une des causes identifiées de la détérioration de la qualité de la viande porcine (Wood et Enser, 1997). Il serait donc intéressant de déterminer si les propriétés antioxydantes de PON3 pourraient avoir un impact sur la croissance du muscle squelettique chez le porc?

En conclusion, les travaux présentés dans cette thèse auront permis d'identifier de nouveaux gènes participant à l'adipogenèse et à la lipogenèse chez le porc. Grâce à notre modèle d'étude *in vivo*, une image globale de l'activité cellulaire et des principales voies métaboliques utilisées lors du développement du tissu adipeux porcine a pu être générée à



partir des gènes différentiellement exprimés. L'un des gènes participant au développement du tissu adipeux porcine, PON3, a été caractérisé. L'analyse de l'expression de l'ARNm et de la protéine de PON3 suggère un rôle important de cette molécule au niveau du tissu adipeux. De plus, l'analyse d'association suggère que certains allèles de PON3 pourraient avoir un impact sur la croissance du muscle squelettique chez le porc. Néanmoins, des études supplémentaires seront nécessaires pour déterminer les fonctions et les mécanismes d'action de PON3 dans le tissu adipeux. Ces études seront utiles pour comprendre l'effet de la réduction des dépôts adipeux par la sélection génétique sur le métabolisme du porc. Enfin, les résultats permettront également de caractériser davantage le tissu adipeux porcine en vue de l'utilisation de cet animal comme modèle d'étude pour caractériser les complications (obésité, diabète de type 2, athérosclérose, etc.) reliées au syndrome métabolique chez l'humain.

## Bibliographie

Ahima, R.S., 2006. Adipose tissue as an endocrine organ. *Obesity (Silver Spring)* 14: Suppl 5, 242S-249S.

Ahmed, W., Ziouzenkova, O., Brown, J., Devchand, P., Francis, S., Kadakia, M., Kanda, T., Orasanu, G., Sharlach, M., Zandbergen, F. et Plutzky, J., 2007. PPARs and their metabolic modulation: new mechanisms for transcriptional regulation? *J. Intern. Med.* 262, 184-98.

Ailhaud, G., Grimaldi, P. et Negrel, R., 1992. Cellular and molecular aspects of adipose tissue development. *Annu. Rev. Nutr.* 12, 207-33.

Ajuwon, K.M., Kuske, J.L., Anderson, D.B., Hancock, D.L., Houseknecht, K.L., Adeola, O. et Spurlock, M.E., 2003. Chronic leptin administration increases serum NEFA in the pig and differentially regulates PPAR expression in adipose tissue. *J. Nutr. Biochem.* 14, 576-83.

Ajuwon, K.M. et Spurlock, M.E., 2004. Direct regulation of lipolysis by interleukin-15 in primary pig adipocytes. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 287, R608-11.

Akanbi, K.A., Brodie, A.E., Suryawan, A. et Hu, C.Y., 1994. Effect of age on the differentiation of porcine adipose stromal-vascular cells in culture. *J. Anim. Sci.* 72, 2828-35.

Albrektsen, T., Frederiksen, K.S., Holmes, W.E., Boel, E., Taylor, K. et Fleckner, J., 2002. Novel genes regulated by the insulin sensitizer rosiglitazone during adipocyte differentiation. *Diabetes* 51, 1042-51.

Anderson, D.B. et Kauffman, R.G., 1973. Cellular and enzymatic changes in porcine adipose tissue during growth. *J. Lipid Res.* 14, 160-8.

Aoki, S., Toda, S., Sakemi, T. et Sugihara, H., 2003. Coculture of endothelial cells and mature adipocytes actively promotes immature preadipocyte development in vitro. *Cell Struct. Funct.* 28, 55-60.

- Arsenijevic, D., Onuma, H., Pecqueur, C., Raimbault, S., Manning, B.S., Miroux, B., Couplan, E., Alves-Guerra, M.C., Gubern, M., Surwit, R., Bouillaud, F., Richard, D., Collins, S. et Ricquier, D., 2000. Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production. *Nat. Genet.* 26, 435-9.
- Auwerx, J., 1999. PPARgamma, the ultimate thrifty gene. *Diabetologia* 42, 1033-49.
- Aviram, M., Kaplan, M., Rosenblat, M. et Fuhrman, B., 2005. Dietary antioxidants and paraoxonases against LDL oxidation and atherosclerosis development. *Handb. Exp. Pharmacol.* 263-300.
- Aviram, M. et Rosenblat, M., 2004. Paraoxonases 1, 2, and 3, oxidative stress, and macrophage foam cell formation during atherosclerosis development. *Free Radic. Biol. Med.* 37, 1304-16.
- Avram, M.M., Avram, A.S. et James, W.D., 2007. Subcutaneous fat in normal and diseased states 3. Adipogenesis: from stem cell to fat cell. *J. Am. Acad. Dermatol.* 56, 472-92.
- Barak, Y., Liao, D., He, W., Ong, E.S., Nelson, M.C., Olefsky, J.M., Boland, R. et Evans, R.M., 2002. Effects of peroxisome proliferator-activated receptor delta on placentation, adiposity, and colorectal cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 303-8.
- Barish, G.D., Narkar, V.A. et Evans, R.M., 2006. PPAR delta: a dagger in the heart of the metabolic syndrome. *J. Clin. Invest.* 116, 590-7.
- Bergen, W.G. et Mersmann, H.J., 2005. Comparative aspects of lipid metabolism: impact on contemporary research and use of animal models. *J. Nutr.* 135, 2499-502.
- Berthon, D., Herpin, P. et Le Dividich, J., 1994. Shivering thermogenesis in the neonatal pig. *Journal of Thermal Biology* 19, 413-418.
- Bluher, M., Wilson-Fritch, L., Leszyk, J., Laustsen, P.G., Corvera, S. et Kahn, C.R., 2004. Role of insulin action and cell size on protein expression patterns in adipocytes. *J. Biol. Chem.* 279, 31902-9.

- Boeuf, S., Klingenspor, M., Van Hal, N.L., Schneider, T., Keijer, J. et Klaus, S., 2001. Differential gene expression in white and brown preadipocytes. *Physiol. Genomics* 7, 15-25.
- Bolduc, C., Larose, M., Lafond, N., Yoshioka, M., Rodrigue, M.A., Morissette, J., Labrie, C., Raymond, V. et St-Amand, J., 2004a. Adipose tissue transcriptome by serial analysis of gene expression. *Obes. Res.* 12, 750-7.
- Bolduc, C., Larose, M., Yoshioka, M., Ye, P., Belleau, P., Labrie, C., Morissette, J., Raymond, V., Labrie, F. et St-Amand, J., 2004b. Effects of dihydrotestosterone on adipose tissue measured by serial analysis of gene expression. *J. Mol. Endocrinol.* 33, 429-44.
- Boone, C., Gregoire, F. et Remacle, C., 1999. Regulation of porcine adipogenesis in vitro, as compared with other species. *Domest. Anim. Endocrinol.* 17, 257-67.
- Boone, C., Gregoire, F. et Remacle, C., 2000. Culture of porcine stromal-vascular cells in serum-free medium: differential action of various hormonal agents on adipose conversion. *J. Anim. Sci.* 78, 885-95.
- Brambilla, G. et Cantafora, A., 2004. Metabolic and cardiovascular disorders in highly inbred lines for intensive pig farming: how animal welfare evaluation could improve the basic knowledge of human obesity. *Ann. Ist. Super. Sanita* 40, 241-4.
- Brandebourg, T.D. et Hu, C.Y., 2005. Regulation of differentiating pig preadipocytes by retinoic acid. *J. Anim. Sci.* 83, 98-107.
- Brasaemle, D.L., Barber, T., Wolins, N.E., Serrero, G., Blanchette-Mackie, E.J. et Londos, C., 1997. Adipose differentiation-related protein is an ubiquitously expressed lipid storage droplet-associated protein. *J. Lipid Res.* 38, 2249-63.
- Brasaemle, D.L., Dolios, G., Shapiro, L. et Wang, R., 2004. Proteomic analysis of proteins associated with lipid droplets of basal and lipolytically stimulated 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* 279, 46835-42.

- Brasaemle, D.L., Rubin, B., Harten, I.A., Gruia-Gray, J., Kimmel, A.R. et Londos, C., 2000. Perilipin A increases triacylglycerol storage by decreasing the rate of triacylglycerol hydrolysis. *J. Biol. Chem.* 275, 38486-93.
- Brown, D.A., 2001. Lipid droplets: proteins floating on a pool of fat. *Curr. Biol.* 11, R446-9.
- Brun, R.P., Tontonoz, P., Forman, B.M., Ellis, R., Chen, J., Evans, R.M. et Spiegelman, B.M., 1996. Differential activation of adipogenesis by multiple PPAR isoforms. *Genes Dev.* 10, 974-84.
- Burdon, K.P., Langefeld, C.D., Beck, S.R., Wagenknecht, L.E., Carr, J.J., Freedman, B.I., Herrington, D. et Bowden, D.W., 2005. Association of genes of lipid metabolism with measures of subclinical cardiovascular disease in the Diabetes Heart Study. *J. Med. Genet.* 42, 720-4.
- Burton, G.R., Guan, Y., Nagarajan, R. et McGehee, R.E. Jr, 2002. Microarray analysis of gene expression during early adipocyte differentiation. *Gene* 293, 21-31.
- Burton, G.R., Nagarajan, R., Peterson, C.A. et McGehee, R.E. Jr, 2004. Microarray analysis of differentiation-specific gene expression during 3T3-L1 adipogenesis. *Gene* 329, 167-85.
- Caetano, A.R., Johnson, R.K. et Pomp, D., 2003. Generation and sequence characterization of a normalized cDNA library from swine ovarian follicles. *Mamm. Genome* 14, 65-70.
- Cannon, B., Hedin, A. et Nedergaard, J., 1982. Exclusive occurrence of thermogenin antigen in brown adipose tissue. *FEBS Lett.* 150, 129-32.
- Cao, W., Epstein, C., Liu, H., DeLoughery, C., Ge, N., Lin, J., Diao, R., Cao, H., Long, F., Zhang, X., Chen, Y., Wright, P.S., Busch, S., Wenck, M., Wong, K., Saltzman, A.G., Tang, Z., Liu, L. et Zilberstein, A., 2004. Comparing gene discovery from Affymetrix GeneChip microarrays and Clontech PCR-select cDNA subtraction: a case study. *BMC Genomics* 5, 26.

Centre Canadien pour l'Amélioration des Porcs (CCAP), 2008. Rapport Annuel 2007-2008. 38

Chawla, A., Schwarz, E.J., Dimaculangan, D.D. et Lazar, M.A., 1994. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma: adipose-predominant expression and induction early in adipocyte differentiation. *Endocrinology* 135, 798-800.

Chen, C.H., Lin, E.C., Cheng, W.T., Sun, H.S., Mersmann, H.J. et Ding, S.T., 2006. Abundantly expressed genes in pig adipose tissue: an expressed sequence tag approach. *J. Anim. Sci.* 84, 2673-83.

Chen, P., Baas, T.J., Mabry, J.W. et Koehler, K.J., 2003. Genetic correlations between lean growth and litter traits in U.S. Yorkshire, Duroc, Hampshire, and Landrace pigs. *J. Anim. Sci.* 81, 1700-5.

Chen, X., Cushman, S.W., Pannell, L.K. et Hess, S., 2005. Quantitative proteomic analysis of the secretory proteins from rat adipose cells using a 2D liquid chromatography-MS/MS approach. *J. Proteome Res.* 4, 570-7.

Chen, Z.W., Agerberth, B., Gell, K., Andersson, M., Mutt, V., Ostenson, C.G., Efendic, S., Barros-Soderling, J., Persson, B. et Jornvall, H., 1988. Isolation and characterization of porcine diazepam-binding inhibitor, a polypeptide not only of cerebral occurrence but also common in intestinal tissues and with effects on regulation of insulin release. *Eur. J. Biochem.* 174, 239-45.

Chmurzynska, A., 2006. The multigene family of fatty acid-binding proteins (FABPs): function, structure and polymorphism. *J. Appl. Genet.* 47, 39-48.

Cohen, A.W., Razani, B., Schubert, W., Williams, T.M., Wang, X.B., Iyengar, P., Brasaemle, D.L., Scherer, P.E. et Lisanti, M.P., 2004. Role of caveolin-1 in the modulation of lipolysis and lipid droplet formation. *Diabetes* 53, 1261-70.

Collot-Teixeira, S., Martin, J., McDermott-Roe, C., Poston, R. et McGregor, J.L., 2007. CD36 and macrophages in atherosclerosis. *Cardiovasc. Res.* 75, 468-77.

- Cornelius, P., MacDougald, O.A. et Lane, M.D., 1994. Regulation of adipocyte development. *Annu. Rev. Nutr.* 14, 99-129.
- Crandall, D.L., Hausman, G.J. et Kral, J.G., 1997. A review of the microcirculation of adipose tissue: anatomic, metabolic, and angiogenic perspectives. *Microcirculation* 4, 211-32.
- Czaja, K., Barb, C.R. et Kraeling, R.R., 2007. Hypothalamic neurons innervating fat tissue in the pig express leptin receptor immunoreactivity. *Neurosci. Lett.* 425, 6-11.
- Czaja, K., Kraeling, R.R. et Barb, C.R., 2003. Are hypothalamic neurons transsynaptically connected to porcine adipose tissue? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 311, 482-5.
- D'Archivio, M., Scazzocchio, B., Filesi, C., Vari, R., Maggiorella, M.T., Sernicola, L., Santangelo, C., Giovannini, C. et Masella, R., 2008. Oxidised LDL up-regulate CD36 expression by the Nrf2 pathway in 3T3-L1 preadipocytes. *FEBS Lett.* 582, 2291-8.
- Damon, M., Vincent, A., Lombardi, A. et Herpin, P., 2000. First evidence of uncoupling protein-2 (UCP-2) and -3 (UCP-3) gene expression in piglet skeletal muscle and adipose tissue. *Gene* 246, 133-41.
- Dauncey, M.J., Wooding, F.B. et Ingram, D.L., 1981. Evidence for the presence of brown adipose tissue in the pig. *Res. Vet. Sci.* 31, 76-81.
- Deiuliis, J.A., Shin, J., Bae, D., Azain, M.J., Barb, R. et Lee, K., 2008. Developmental, hormonal, and nutritional regulation of porcine adipose triglyceride lipase (ATGL). *Lipids* 43, 215-25.
- DeLany, J.P., Floyd, Z.E., Zvonic, S., Smith, A., Gravois, A., Reiners, E., Wu, X., Kilroy, G., Lefevre, M. et Gimble, J.M., 2005. Proteomic analysis of primary cultures of human adipose-derived stem cells: modulation by Adipogenesis. *Mol. Cell Proteomics* 4, 731-40.
- Desvergne, B., Michalik, L. et Wahli, W., 2006. Transcriptional regulation of metabolism. *Physiol. Rev.* 86, 465-514.

- Diatchenko, L., Lukyanov, S., Lau, Y.F. et Siebert, P.D., 1999. Suppression subtractive hybridization: a versatile method for identifying differentially expressed genes. *Methods Enzymol.* 303, 349-80.
- Dietze, D., Koenen, M., Rohrig, K., Horikoshi, H., Hauner, H. et Eckel, J., 2002. Impairment of insulin signaling in human skeletal muscle cells by co-culture with human adipocytes. *Diabetes* 51, 2369-76.
- Ding, S. et Mersmann, H.J., 2001. Fatty acids modulate porcine adipocyte differentiation and transcripts for transcription factors and adipocyte-characteristic proteins\*. *J. Nutr. Biochem.* 12, 101-108.
- Ding, S.T., McNeel, R.L. et Mersmann, H.J., 1999. Expression of porcine adipocyte transcripts: tissue distribution and differentiation in vitro and in vivo. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 123, 307-18.
- Ding, S.T., McNeel, R.L. et Mersmann, H.J., 2002. Modulation of adipocyte determination and differentiation-dependent factor 1 by selected polyunsaturated fatty acids. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 38, 352-7.
- Ding, S.T., Schinckel, A.P., Weber, T.E. et Mersmann, H.J., 2000. Expression of porcine transcription factors and genes related to fatty acid metabolism in different tissues and genetic populations. *J. Anim. Sci.* 78, 2127-34.
- Ding, S.-T., Wang, J.-C. et Mersmann, H.J., 2003. Effect of unsaturated fatty acids on porcine adipocyte differentiation. *Nutrition Research* 23, 1059-1069.
- Dobrzyn, A. et Ntambi, J.M., 2004. The role of stearoyl-CoA desaturase in body weight regulation. *Trends Cardiovasc. Med.* 14, 77-81.
- Donkin, S.S., Chiu, P.Y., Yin, D., Louveau, I., Swencki, B., Vockroth, J., Evock-Clover, C.M., Peters, J.L. et Etherton, T.D., 1996. Porcine somatotrophin differentially down-regulates expression of the GLUT4 and fatty acid synthase genes in pig adipose tissue. *J. Nutr.* 126, 2568-77.



Dourmad, J.Y., Etienne, M. et Noblet, J., 2001. Mesurer l'épaisseur de lard dorsal des truies pour définir leurs programmes alimentaires. *INRA Prod. Anim.* 14, 41-50.

Draganov, D.I., 2007. Human PON3, effects beyond the HDL: clues from human PON3 transgenic mice. *Circ. Res.* 100, 1104-5.

Draganov, D.I. et La Du, B.N., 2004. Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 369, 78-88.

Draganov, D.I., Stetson, P.L., Watson, C.E., Billecke, S.S. et La Du, B.N., 2000. Rabbit serum paraoxonase 3 (PON3) is a high density lipoprotein-associated lactonase and protects low density lipoprotein against oxidation. *J. Biol. Chem.* 275, 33435-42.

Draganov, D.I., Teiber, J.F., Speelman, A., Osawa, Y., Sunahara, R. et La Du, B.N., 2005. Human paraoxonases (PON1, PON2, and PON3) are lactonases with overlapping and distinct substrate specificities. *J. Lipid Res.* 46, 1239-47.

Drevon, C.A., 2005. Fatty acids and expression of adipokines. *Biochim. Biophys. Acta* 1740, 287-92.

Ducharme, N.A. et Bickel, P.E., 2008. Lipid droplets in lipogenesis and lipolysis. *Endocrinology* 149, 942-9.

Dupont, A., Tokarski, C., Dekeyser, O., Guihot, A.L., Amouyel, P., Rolando, C. et Pinet, F., 2004. Two-dimensional maps and databases of the human macrophage proteome and secretome. *Proteomics* 4, 1761-78.

Durrington, P.N., Mackness, B. et Mackness, M.I., 2001. Paraoxonase and atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21, 473-80.

Dursun, P., Demirtas, E., Bayrak, A. et Yarali, H., 2006. Decreased serum paraoxonase 1 (PON1) activity: an additional risk factor for atherosclerotic heart disease in patients with PCOS? *Hum. Reprod.* 21, 104-8.

Eder, K., Nonn, H. et Kluge, H., 2001. The fatty acid composition of lipids from muscle

and adipose tissues of pigs fed various oil mixtures differing in their ratio between oleic acid and linoleic acid. *European Journal of Lipid Science and Technology* 103, 668-676.

Endemann, G., Stanton, L.W., Madden, K.S., Bryant, C.M., White, R.T. et Protter, A.A., 1993. CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* 268, 11811-6.

Etherton, T.D., Aberle, E.D., Thompson, E.H. et Allen, C.E., 1981. Effects of cell size and animal age on glucose metabolism in pig adipose tissue. *J. Lipid Res.* 22, 72-80.

Etherton, T.D. et Allen, C.E., 1980. Effects of age and adipocyte size on glucose and palmitate metabolism and oxidation in pigs. *J. Anim. Sci.* 50, 1073-84.

Evans, R.M., Barish, G.D. et Wang, Y.X., 2004. PPARs and the complex journey to obesity. *Nat. Med.* 10, 355-61.

Fain, J.N., Madan, A.K., Hiler, M.L., Cheema, P. et Bahouth, S.W., 2004. Comparison 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, 2273-82.

Febbraio, M., Guy, E., Coburn, C., Knapp, F.F. Jr, Beets, A.L., Abumrad, N.A. et Silverstein, R.L., 2002. The impact of overexpression and deficiency of fatty acid translocase (FAT)/CD36. *Mol. Cell Biochem.* 239, 193-7.

Feve, B., 2005. Adipogenesis: cellular and molecular aspects. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 19, 483-99.

Fischbach, C., Seufert, J., Staiger, H., Hacker, M., Neubauer, M., Gopferich, A. et Blunk, T., 2004. Three-dimensional in vitro model of adipogenesis: comparison of culture conditions. *Tissue Eng.* 10, 215-29.

Ford, S.P., 1997. Embryonic and fetal development in different genotypes in pigs. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 52, 165-76.

Forster, T., Roy, D. et Ghazal, P., 2003. Experiments using microarray technology: limitations and standard operating procedures. *J. Endocrinol.* 178, 195-204.

Frayn, K.N., 2003. The glucose-fatty acid cycle: a physiological perspective. *Biochem. Soc. Trans.* 31, 1115-9.

Frayn, K.N., Karpe, F., Fielding, B.A., Macdonald, I.A. et Coppack, S.W., 2003. Integrative physiology of human adipose tissue. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 27, 875-88.

Fredrikson, G., Stralfors, P., Nilsson, N.O. et Belfrage, P., 1981. Hormone-sensitive lipase of rat adipose tissue. Purification and some properties. *J. Biol. Chem.* 256, 6311-20.

Fried, S.K. et Moustaid-Moussa, N., 2001. Culture of adipose tissue and isolated adipocytes. *Methods Mol. Biol.* 155, 197-212.

Fukumura, D., Ushiyama, A., Duda, D.G., Xu, L., Tam, J., Krishna, V., Chatterjee, K., Garkavtsev, I. et Jain, R.K., 2003. Paracrine regulation of angiogenesis and adipocyte differentiation during in vivo adipogenesis. *Circ. Res.* 93, e88-97.

Furukawa, S., Fujita, T., Shimabukuro, M., Iwaki, M., Yamada, Y., Nakajima, Y., Nakayama, O., Makishima, M., Matsuda, M. et Shimomura, I., 2004. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J. Clin. Invest.* 114, 1752-61.

Gaughan, J.B., Cameron, R.D.A., Dryden, G.M. et Josey, M.J., 1995. Effect of selection for leanness on overall reproductive performance in Large White sows. *Anim. Sci.* 61, 561-564.

Gerfault, V., Louveau, I. et Mourot, J., 1999. The effect of GH and IGF-I on preadipocytes from Large White and Meishan pigs in primary culture. *Gen. Comp. Endocrinol.* 114, 396-404.

Gerhold, D.L., Liu, F., Jiang, G., Li, Z., Xu, J., Lu, M., Sachs, J.R., Bagchi, A., Fridman, A., Holder, D.J., Doebber, T.W., Berger, J., Elbrecht, A., Moller, D.E. et Zhang, B.B.,

2002. Gene expression profile of adipocyte differentiation and its regulation by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists. *Endocrinology* 143, 2106-18.

Gil, F., Pla, A., Gonzalvo, M.C., Hernandez, A.F. et Villanueva, E., 1993. Rat liver paraoxonase: subcellular distribution and characterization. *Chem. Biol. Interact.* 87, 149-54.

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. *J. Lipid Res.* 42, 106-13.

Gonzalvo, M.C., Gil, F., Hernandez, A.F., Rodrigo, L., Villanueva, E. et Pla, A., 1998. Human liver paraoxonase (PON1): subcellular distribution and characterization. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 12, 61-9.

Gorodkin, J., Cirera, S., Hedegaard, J., Gilchrist, M.J., Panitz, F., Jorgensen, C., Scheibye-Knudsen, K., Arvin, T., Lumholdt, S., Sawera, M., Green, T., Nielsen, B.J., Havgaard, J.H., Rosenkilde, C., Wang, J., Li, H., Li, R., Liu, B., Hu, S., Dong, W., Li, W., Yu, J., Wang, J., Staefeldt, H.H., Wernersson, R., Madsen, L.B., Thomsen, B., Hornshoj, H., Bujie, Z., Wang, X., Wang, X., Bolund, L., Brunak, S., Yang, H., Bendixen, C. et Fredholm, M., 2007. Porcine transcriptome analysis based on 97 non-normalized cDNA libraries and assembly of 1,021,891 expressed sequence tags. *Genome Biol.* 8, R45

Gregoire, F.M., 2001. Adipocyte differentiation: from fibroblast to endocrine cell. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* 226, 997-1002.

Gregoire, F.M., Smas, C.M. et Sul, H.S., 1998. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol. Rev.* 78, 783-809.

Grindflek, E., Sundvold, H., Klungland, H. et Lien, S., 1998. Characterisation of porcine peroxisome proliferator-activated receptors gamma 1 and gamma 2: detection of breed and age differences in gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 249, 713-8.

Grunert, K.G., 2002. Current issues in the understanding of consumer food choice. *Trends in Food Science and Technology* 13, 275-285.

Guo, W., Wang, S.H., Cao, H.J., Xu, K., Zhang, J., Du, Z.L., Lu, W., Feng, J.D., Li, N., Wu, C.H. et Zhang, L., 2008. Gene microarray analysis for porcine adipose tissue: Comparison of gene expression between Chinese Xiang pig and large white. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 21, 11-18.

Guo, X. et Liao, K., 2000. Analysis of gene expression profile during 3T3-L1 preadipocyte differentiation. *Gene* 251, 45-53.

Gurr, M.I., Kirtland, J., Phillip, M. et Robinson, M.P., 1977. The consequences of early overnutrition for fat cell size and number: the pig as an experimental model for human obesity. *Int. J. Obes.* 1, 151-70.

Hansen, H.O., Andreasen, P.H., Mandrup, S., Kristiansen, K. et Knudsen, J., 1991. Induction of acyl-CoA-binding protein and its mRNA in 3T3-L1 cells by insulin during preadipocyte-to-adipocyte differentiation. *Biochem. J.* 277 (Pt 2), 341-4.

Hansen, J.B. et Kristiansen, K., 2006. Regulatory circuits controlling white versus brown adipocyte differentiation. *Biochem. J.* 398, 153-68.

Hausman, D.B., DiGirolamo, M., Bartness, T.J., Hausman, G.J. et Martin, R.J., 2001. The biology of white adipocyte proliferation. *Obes. Rev.* 2, 239-54.

Hausman, G.J., 1989. The influence of insulin, triiodothyronine (T3) and insulin-like growth factor-I (IGF-1) on the differentiation of preadipocytes in serum-free cultures of pig stromal-vascular cells. *J. Anim. Sci.* 67, 3136-43.

Hausman, G.J., 2003. Dexamethasone induced preadipocyte recruitment and expression of CCAAT/enhancing binding protein alpha and peroxisome proliferator activated receptor-gamma proteins in porcine stromal-vascular (S-V) cell cultures obtained before and after the onset of fetal adipogenesis. *Gen. Comp. Endocrinol.* 133, 61-70.

Hausman, G.J., Barb, C.R. et Dean, R.G., 2007. Patterns of gene expression in pig adipose tissue: transforming growth factors, interferons, interleukins, and apolipoproteins. *J. Anim. Sci.* 85, 2445-56.

Hausman, G.J., Barb, C.R. et Dean, R.G., 2008. Patterns of gene expression in pig adipose tissue: Insulin-like growth factor system proteins, neuropeptide Y (NPY), NPY receptors, neurotrophic factors and other secreted factors. *Domest. Anim. Endocrinol.* 35, 34-34.

Hausman G.J. et Hausman, D.B.: Endocrine regulation of porcine adipose tissue development: cellular and metabolic aspects. In *Anonymous Growth of the pig*. CAB Int., Wallingford, UK, 1993, pp.49-74.

Hausman, G.J. et Kauffman, R.G., 1986a. The histology of developing porcine adipose tissue. *J. Anim. Sci.* 63, 642-58.

Hausman, G.J. et Kauffman, R.G., 1986b. Mitotic activity in fetal and early postnatal porcine adipose tissue. *J. Anim. Sci.* 63, 659-73.

Hausman, G.J., Poulos, S.P., Richardson, R.L., Barb, C.R., Andacht, T., Kirk, H.C. et Mynatt, R.L., 2006. Secreted proteins and genes in fetal and neonatal pig adipose tissue and stromal-vascular cells. *J. Anim. Sci.* 84, 1666-81.

Hausman, G.J. et Richardson, R.L., 1987. Adrenergic innervation of fetal pig adipose tissue. Histochemical and ultrastructural studies. *Acta Anat. (Basel)* 130, 291-7.

Hausman, G.J. et Richardson, R.L., 2004. Adipose tissue angiogenesis. *J. Anim. Sci.* 82, 925-34.

Hausman, G.J. et Thomas, G.B., 1984. The development of the inner layer of backfat in fetal and young pigs. *J. Anim. Sci.* 58, 1550-60.

Henry, Y., 1977. Morphological and metabolic development of adipose tissue in the pig as affected by selection, feeding and management: "Développement morphologique et métabolique de tissu adipeux chez le porc: influence de la sélection, de l'alimentation et du mode d'élevage". *Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique* 17, 923-952.

Hishikawa, D., Hong, Y.H., Roh, S.G., Miyahara, H., Nishimura, Y., Tomimatsu, A., Tsuzuki, H., Gotoh, C., Kuno, M., Choi, K.C., Lee, H.G., Cho, K.K., Hidari, H. et Sasaki,

S., 2005. Identification of genes expressed differentially in subcutaneous and visceral fat of cattle, pig, and mouse. *Physiol. Genomics* 21, 343-50.

Houseknecht, K.L., Bidwell, C.A., Portocarrero, C.P. et Spurlock, M.E., 1998. Expression and cDNA cloning of porcine peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma). *Gene* 225, 89-96.

Humphray, S.J., Scott, C.E., Clark, R., Marron, B., Bender, C., Camm, N., Davis, J., Jenks, A., Noon, A., Patel, M., Sehra, H., Yang, F., Rogatcheva, M.B., Milan, D., Chardon, P., Rohrer, G., Nonneman, D., de Jong, P., Meyers, S.N., Archibald, A., Beever, J.E., Schook, L.B. et Rogers, J., 2007. A high utility integrated map of the pig genome. *Genome Biol.* 8, R139

Hutley, L.J., Herington, A.C., Shurety, W., Cheung, C., Vesey, D.A., Cameron, D.P. et Prins, J.B., 2001. Human adipose tissue endothelial cells promote preadipocyte proliferation. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 281, E1037-44.

Janke, J., Engeli, S., Gorzelnik, K. et Sharma, A.M., 2001. Extraction of total RNA from adipocytes. *Horm. Metab. Res.* 33, 213-5.

Jessen, B.A. et Stevens, G.J., 2002. Expression profiling during adipocyte differentiation of 3T3-L1 fibroblasts. *Gene* 299, 95-100.

Ji, W., Wright, M.B., Cai, L., Flament, A. et Lindpaintner, K., 2002. Efficacy of SSH PCR in isolating differentially expressed genes. *BMC Genomics* 3, 12.

Jiang, Z. et Rothschild, M.F., 2007. Swine genome science comes of age. *Int. J. Biol. Sci.* 3, 129-31.

Johmura, Y., 2007. [Characterization of novel genes regulating adipocyte differentiation]. *Yakugaku Zasshi* 127, 135-42.

Jose, A.A., Gama, M.A. et Lanna, D.D., 2008. Effects of trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid on gene expression and lipid metabolism of adipose tissue of growing pigs.

Genet. Mol. Res. 7, 284-94.

Kawaguchi, K., Sugiyama, T., Hibasami, H. et Toyoda, N., 2003. PPAR-gamma, TNF-alpha messenger RNA levels and lipase activity in the pregnant and lactating rat. *Life Sci.* 72, 1655-63.

Keaney, J.F.J., Larson, M.G., Vasan, R.S., Wilson, P.W., Lipinska, I., Corey, D., Massaro, J.M., Sutherland, P., Vita, J.A. et Benjamin, E.J., 2003. Obesity and systemic oxidative stress: clinical correlates of oxidative stress in the Framingham Study. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23, 434-9.

Kedishvili, N.Y., Popov, K.M., Jaskiewicz, J.A. et Harris, R.A., 1994. Coordinated expression of valine catabolic enzymes during adipogenesis: analysis of activity, mRNA, protein levels, and metabolic consequences. *Arch. Biochem. Biophys.* 315, 317-22.

Kim, H.S., Hausman, D.B., Compton, M.M., Dean, R.G., Martin, R.J., Hausman, G.J., Hartzell, D.L. et Baile, C.A., 2000a. Induction of apoptosis by all-trans-retinoic acid and C2-ceramide treatment in rat stromal-vascular cultures. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 270, 76-80.

Kim, H.S., Hausman, G.J., Hausman, D.B., Martin, R.J. et Dean, R.G., 2000b. The expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in pig fetal tissue and primary stromal-vascular cultures. *Obes. Res.* 8, 83-8.

Kim, T.H., Choi, B.H., Chang, G.W., Lee, K.T., Lee, H.Y., Lee, J.H., Kim, K.S., Park, C.K. et Moran, C., 2005. Molecular characterization and chromosomal mapping of porcine adipose differentiation-related protein (ADRP). *J. Anim. Breed Genet.* 122, 240-6.

Kim, T.H., Kim, N.S., Lim, D., Lee, K.T., Oh, J.H., Park, H.S., Jang, G.W., Kim, H.Y., Jeon, M., Choi, B.H., Lee, H.Y., Chung, H.Y. et Kim, H., 2006. Generation and analysis of large-scale expressed sequence tags (ESTs) from a full-length enriched cDNA library of porcine backfat tissue. *BMC Genomics* 7, 36

Kokta, T.A., Dodson, M.V., Gertler, A. et Hill, R.A., 2004. Intercellular signaling between



adipose tissue and muscle tissue. *Domest. Anim. Endocrinol.* 27, 303-31.

Kolstad, K., Jopson, N.B. et Vangen, O., 1996. Breed and sex differences in fat distribution and mobilization in growing pigs fed at maintenance. *Livestock Production Science* 47, 33-41.

Kopecky, J., Rossmeisl, M., Flachs, P., Bardova, K. et Brauner, P., 2001. Mitochondrial uncoupling and lipid metabolism in adipocytes. *Biochem Soc Trans* 29, 791-7.

Kragelund, B.B., Knudsen, J. et Poulsen, F.M., 1999. Acyl-coenzyme A binding protein (ACBP). *Biochim. Biophys. Acta* 1441, 150-61.

Kubo, Y., Kaidzu, S., Nakajima, I., Takenouchi, K. et Nakamura, F., 2000. Organization of extracellular matrix components during differentiation of adipocytes in long-term culture. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 36, 38-44.

Lacasa, D., Taleb, S., Keophiphath, M., Miranville, A. et Clement, K., 2007. Macrophage-secreted factors impair human adipogenesis: involvement of proinflammatory state in preadipocytes. *Endocrinology* 148, 868-77.

Large, V., Peroni, O., Letexier, D., Ray, H. et Beylot, M., 2004. Metabolism of lipids in human white adipocyte. *Diabetes Metab.* 30, 294-309.

Lee, Y.B. et Kauffman, R.G., 1974. Cellular and enzymatic changes with animal growth in porcine intramuscular adipose tissue. *J. Anim. Sci.* 38, 532-7.

Leonard, A.E., Pereira, S.L., Sprecher, H. et Huang, Y.S., 2004. Elongation of long-chain fatty acids. *Prog. Lipid Res.* 43, 36-54.

Li, B., Zerby, H.N. et Lee, K., 2007. Heart fatty acid binding protein is upregulated during porcine adipocyte development. *J. Anim. Sci.* 85, 1651-9.

Li, H.L., Liu, D.P. et Liang, C.C., 2003. Paraoxonase gene polymorphisms, oxidative stress, and diseases. *J. Mol. Med.* 81, 766-79.

Li, J.J. et Xie, D., 2007. Cleavage of focal adhesion kinase (FAK) is essential in adipocyte differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 357, 648-54.

Liang, M., Cowley, A.W. et Greene, A.S., 2004. High throughput gene expression profiling: a molecular approach to integrative physiology. *J. Physiol.* 554, 22-30.

Linder, K., Arner, P., Flores-Morales, A., Tollet-Egnell, P. et Norstedt, G., 2004. Differentially expressed genes in visceral or subcutaneous adipose tissue of obese men and women. *J. Lipid Res.* 45, 148-54.

Louveau, I. et Gondret, F., 2004. Regulation of development and metabolism of adipose tissue by growth hormone and the insulin-like growth factor system. *Domest. Anim. Endocrinol.* 27, 241-55.

Luci, S., Giemsa, B., Kluge, H. et Eder, K., 2007. Clofibrate causes an upregulation of PPAR- $\alpha$  target genes but does not alter expression of SREBP target genes in liver and adipose tissue of pigs. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 293, R70-7.

Lunney, J.K., 2007. Advances in swine biomedical model genomics. *Int. J. Biol. Sci.* 3, 179-84.

MacDougald, O.A. et Mandrup, S., 2002. Adipogenesis: forces that tip the scales. *Trends Endocrinol. Metab.* 13, 5-11.

MAPAQ (Ministère de l'Agriculture, Pêcheries et Alimentation du Québec), 2005. Portrait économique de la production porcine. 2

Margeli, A., Kouraklis, G. et Theocharis, S., 2003. Peroxisome proliferator activated receptor-gamma (PPAR-gamma) ligands and angiogenesis. *Angiogenesis* 6, 165-9.

Martel-Kennes, Y. et Roy, M. 2004. Le gras dorsal dans le collimateur. *Le Coopérateur agricole.* 33(3), 58.

Masella, R., Vari, R., D'Archivio, M., Santangelo, C., Scazzocchio, B., Maggiorella, M.T.,

- Sernicola, L., Titti, F., Sanchez, M., Di Mario, U., Leto, G. et Giovannini, C., 2006. Oxidised LDL modulate adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes by affecting the balance between cell proliferation and differentiation. *FEBS Lett.* 580, 2421-9.
- McBeath, R., Pirone, D.M., Nelson, C.M., Bhadriraju, K. et Chen, C.S., 2004. Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Dev. Cell* 6, 483-95.
- McIntosh, M., Hausman, D., Martin, R. et Hausman, G., 1998. Dehydroepiandrosterone attenuates preadipocyte growth in primary cultures of stromal-vascular cells. *Am. J. Physiol.* 275, E285-93.
- McKay, R.M., McKay, J.P., Avery, L. et Graff, J.M., 2003. *C elegans*: a model for exploring the genetics of fat storage. *Dev. Cell* 4, 131-42.
- McNeel, R.L., Ding, S.T., Smith, E.O. et Mersmann, H.J., 2000. Expression of porcine adipocyte transcripts during differentiation in vitro and in vivo. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 126, 291-302.
- Mersmann, H.J., 1998. Lipoprotein and hormone-sensitive lipases in porcine adipose tissue. *J. Anim. Sci.* 76, 1396-404.
- Mersmann, H.J., Brown, L.J., Beuving, R.D. et Arakelian, M.C., 1976. Lipolytic activity of swine adipocytes. *Am. J. Physiol.* 230, 1439-43.
- Mersmann, H.J., Goodman, J.R. et Brown, L.J., 1975. Development of swine adipose tissue: morphology and chemical composition. *J. Lipid Res.* 16, 269-79.
- Mikawa, A., Suzuki, H., Suzuki, K., Toki, D., Uenishi, H., Awata, T. et Hamasima, N., 2004. Characterization of 298 ESTs from porcine back fat tissue and their assignment to the SSRH radiation hybrid map. *Mamm. Genome* 15, 315-22.
- Mills, S.E., 1999. Regulation of porcine adipocyte metabolism by insulin and adenosine. *J. Anim. Sci.* 77, 3201-7.

- Moghadasian, M.H., 2002. Experimental atherosclerosis: a historical overview. *Life Sci.* 70, 855-65.
- Monder, C. et White, P.C., 1993. 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Vitam. Horm.* 47, 187-271.
- Montagna, W. et Yun, J.S., 1964. The skin of the domestic pig. *J. Invest. Dermatol.* 42, 11-21.
- Moon, Y.A. et Horton, J.D., 2003. Identification of two mammalian reductases involved in the two-carbon fatty acyl elongation cascade. *J. Biol. Chem.* 278, 7335-43.
- Moon, Y.A., Shah, N.A., Mohapatra, S., Warrington, J.A. et Horton, J.D., 2001. Identification of a mammalian long chain fatty acyl elongase regulated by sterol regulatory element-binding proteins. *J. Biol. Chem.* 276, 45358-66.
- Mouroit, J. et Hermier, D., 2001. Lipids in monogastric animal meat. *Reprod. Nutr. Dev.* 41, 109-18.
- Mouroit, 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 - B Biochemistry and Molecular Biology* 115, 383-388.
- Mueller, E., Drori, S., Aiyer, A., Yie, J., Sarraf, P., Chen, H., Hauser, S., Rosen, E.D., Ge, K., Roeder, R.G. et Spiegelman, B.M., 2002. Genetic analysis of adipogenesis through peroxisome proliferator-activated receptor gamma isoforms. *J. Biol. Chem.* 277, 41925-30.
- Nadler, S.T. et Attie, A.D., 2001. Please pass the chips: genomic insights into obesity and diabetes. *J. Nutr.* 131, 2078-81.
- Nafikov, R.A. et Beitz, D.C., 2007. Carbohydrate and lipid metabolism in farm animals. *J. Nutr.* 137, 702-5.

Nakamura, T., Shiojima, S., Hirai, Y., Iwama, T., Tsuruzoe, N., Hirasawa, A., Katsuma, S. et Tsujimoto, G., 2003. Temporal gene expression changes during adipogenesis in human mesenchymal stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 303, 306-12.

Nelson, A.H., Mabry, J.W., Benyshek, L.L. et Marks, M.A., 1990. Correlated response in reproduction, growth and composition to selection in gilts for extremes in age at puberty and backfat. *Livestock Production Science* 24, 237-247.

Ng, C.J., Bourquard, N., Hama, S.Y., Shih, D., Grijalva, V.R., Navab, M., Fogelman, A.M. et Reddy, S.T., 2007. Adenovirus-mediated expression of human paraoxonase 3 protects against the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27, 1368-74.

Ng, C.J., Shih, D.M., Hama, S.Y., Villa, N., Navab, M. et Reddy, S.T., 2005. The paraoxonase gene family and atherosclerosis. *Free Radic. Biol. Med.* 38, 153-63.

Ngapo, T.M., Martin, J.-F. et Dransfield, E., 2004. Consumer choices of pork chops: results from three panels in France. *Food Quality and Preference* 15, 349-359.

Novakofski, J., 2004. Adipogenesis: usefulness of in vitro and in vivo experimental models. *J. Anim. Sci.* 82, 905-15.

Ntambi, J.M., 1995. The regulation of stearoyl-CoA desaturase (SCD). *Prog. Lipid Res.* 34, 139-50.

O'Hea, E.K. et Leveille, G.A., 1969. Significance of adipose tissue and liver as sites of fatty acid synthesis in the pig and the efficiency of utilization of various substrates for lipogenesis. *J. Nutr.* 99, 338-44.

Oishi, M., Taniguchi, Y., Nishimura, K., Yamada, T. et Sasaki, Y., 2000. Characterisation of gene expression in bovine adipose tissue before and after fattening. *Anim. Genet.* 31, 166-70.

Oliver, P., Pico, C. et Palou, A., 2001. Differential expression of genes for uncoupling

proteins 1, 2 and 3 in brown and white adipose tissue depots during rat development. *Cell Mol. Life Sci.* 58, 470-6.

Olusi, S.O., 2002. Obesity is an independent risk factor for plasma lipid peroxidation and depletion of erythrocyte cytoprotective enzymes in humans. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 26, 1159-64.

Omi, T., Brenig, B., Spilar Kramer, S., Iwamoto, S., Stranzinger, G. et Neuenschwander, S., 2005. Identification and characterization of novel peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma) transcriptional variants in pig and human. *J. Anim. Breed Genet.* 122 Suppl 1, 45-53.

Otten, W., Wirth, C., Iaizzo, P.A. et Eichinger, H.M., 1993. A high omega 3 fatty acid diet alters fatty acid composition of heart, liver, kidney, adipose tissue and skeletal muscle in swine. *Ann. Nutr. Metab.* 37, 134-41.

Palin, M. F. Importance du tissu adipeux pour la reproduction chez la truie. 27e Colloque sur la production porcine du Centre de référence en agriculture et agroalimentaire du Québec (CRAAQ), 78-87. 2006.

Pang, W.J., Yu, T.Y., Bai, L., Yang, Y.J. et Yang, G.S., 2008. Tissue expression of porcine FoxO1 and its negative regulation during primary preadipocyte differentiation. *Mol. Biol. Rep.*

Paulauskis, J.D. et Sul, H.S., 1989. Hormonal regulation of mouse fatty acid synthase gene transcription in liver. *J. Biol. Chem.* 264, 574-7.

Pedersen, S.B., Bruun, J.M., Kristensen, K. et Richelsen, B., 2001. Regulation of UCP1, UCP2, and UCP3 mRNA expression in brown adipose tissue, white adipose tissue, and skeletal muscle in rats by estrogen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 288, 191-7.

Primo-Parmo, S.L., Sorenson, R.C., Teiber, J. et La Du, B.N., 1996. The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family. *Genomics* 33, 498-507.

Prins, J.B. et O'Rahilly, S., 1997. Regulation of adipose cell number in man. *Clin. Sci. (Lond)* 92, 3-11.

Reddy, S.T., Wadleigh, D.J., Grijalva, V., Ng, C., Hama, S., Gangopadhyay, A., Shih, D.M., Lusic, A.J., Navab, M. et Fogelman, A.M., 2001. Human paraoxonase-3 is an HDL-associated enzyme with biological activity similar to paraoxonase-1 protein but is not regulated by oxidized lipids. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21, 542-7.

Ren, D., Collingwood, T.N., Rebar, E.J., Wolffe, A.P. et Camp, H.S., 2002. PPARgamma knockdown by engineered transcription factors: exogenous PPARgamma2 but not PPARgamma1 reactivates adipogenesis. *Genes Dev.* 16, 27-32.

Ren, J., Knorr, C., Guo, Y.M., Ding, N.S., Ai, H.S., Brenig, B. et Huang, L.S., 2004a. Characterization of five single nucleotide polymorphisms in the porcine stearoyl-CoA desaturase (SCD) gene. *Anim. Genet.* 35, 255-7.

Ren, J., Knorr, C., Huang, L. et Brenig, B., 2004b. Isolation and molecular characterization of the porcine stearoyl-CoA desaturase gene. *Gene* 340, 19-30.

Reshef, L., Olswang, Y., Cassuto, H., Blum, B., Croniger, C.M., Kalhan, S.C., Tilghman, S.M. et Hanson, R.W., 2003. Glyceroneogenesis and the triglyceride/fatty acid cycle. *J. Biol. Chem.* 278, 30413-6.

Richardson, R.L., Champion, D.R., Hausman, G.J. et Wright, J.T., 1989. Transforming growth factor type beta (TGF-beta) and adipogenesis in pigs. *J. Anim. Sci.* 67, 2171-80.

Richardson, R.L., Hausman, G.J. et Gaskins, H.R., 1992. Effect of transforming growth factor-beta on insulin-like growth factor 1- and dexamethasone-induced proliferation and differentiation in primary cultures of pig preadipocytes. *Acta Anat. (Basel)* 145, 321-6.

Ricote, M. et Glass, C.K., 2007. PPARs and molecular mechanisms of transrepression. *Biochim. Biophys. Acta* 1771, 926-35.

Rigotti, A., Miettinen, H.E. et Krieger, M., 2003. The role of the high-density lipoprotein

receptor SR-BI in the lipid metabolism of endocrine and other tissues. *Endocr. Rev.* 24, 357-87.

Rodrigo, L., Gil, F., Hernandez, A.F., Lopez, O. et Pla, A., 2003. Identification of paraoxonase 3 in rat liver microsomes: purification and biochemical properties. *Biochem. J.* 376, 261-8.

Rosen, E.D. et Macdougald, O.A., 2006. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 7, 885-96.

Rosen, E.D. et Spiegelman, B.M., 2001. PPARgamma : a nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth. *J. Biol. Chem.* 276, 37731-4.

Rosen, E.D. et Spiegelman, B.M., 2006. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature* 444, 847-53.

Rosen, E.D., Walkey, C.J., Puigserver, P. et Spiegelman, B.M., 2000. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev.* 14, 1293-307.

Rosenblat, M., Draganov, D., Watson, C.E., Bisgaier, C.L., La Du, B.N. et Aviram, M., 2003. Mouse macrophage paraoxonase 2 activity is increased whereas cellular paraoxonase 3 activity is decreased under oxidative stress. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23, 468-74.

Ross, S.E., Erickson, R.L., Gerin, I., DeRose, P.M., Bajnok, L., Longo, K.A., Misek, D.E., Kuick, R., Hanash, S.M., Atkins, K.B., Andresen, S.M., Nebb, H.I., Madsen, L., Kristiansen, K. et MacDougald, O.A., 2002. Microarray analyses during adipogenesis: understanding the effects of Wnt signaling on adipogenesis and the roles of liver X receptor alpha in adipocyte metabolism. *Mol. Cell. Biol.* 22, 5989-99.

Rothschild, M.F., 2003. From a sow's ear to a silk purse: real progress in porcine genomics. *Cytogenet. Genome Res.* 102, 95-9.

Samulin, J., Berget, I., Lien, S. et Sundvold, H., 2008a. Differential gene expression of



fatty acid binding proteins during porcine adipogenesis. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 151, 147-52.

Samulin, J., Lien, S., Grindflek, E., Berget, I., Ruyter, B. et Sundvold, H., 2008b. Depot specific differences during adipogenesis of porcine stromal-vascular cells. *Cell. Biol. Int.* 32, 525-31.

Schwab, C.R., Baas, T.J., Stalder, K.J. et Mabry, J.W., 2006. Effect of long-term selection for increased leanness on meat and eating quality traits in Duroc swine. *J. Anim. Sci.* 84, 1577-83.

Sekiya, I., Larson, B.L., Vuoristo, J.T., Cui, J.G. et Prockop, D.J., 2004. Adipogenic differentiation of human adult stem cells from bone marrow stroma (MSCs). *J. Bone Miner. Res.* 19, 256-64.

Senti, M., Tomas, M., Fito, M., Weinbrenner, T., Covas, M.I., Sala, J., Masia, R. et Marrugat, J., 2003. Antioxidant paraoxonase 1 activity in the metabolic syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88, 5422-6.

Serenius, T., Stalder, K.J., Baas, T.J., Mabry, J.W., Goodwin, R.N., Johnson, R.K., Robison, O.W., Tokach, M. et Miller, R.K., 2006. National Pork Producers Council Maternal Line National Genetic Evaluation Program: a comparison of sow longevity and trait associations with sow longevity. *J. Anim. Sci.* 84, 2590-5.

Shamir, R., Hartman, C., Karry, R., Pavlotzky, E., Eliakim, R., Lachter, J., Suissa, A. et Aviram, M., 2005. Paraoxonases (PONs) 1, 2, and 3 are expressed in human and mouse gastrointestinal tract and in Caco-2 cell line: selective secretion of PON1 and PON2. *Free Radic. Biol. Med.* 39, 336-44.

Shih, D.M., Xia, Y.R., Wang, X.P., Wang, S.S., Bourquard, N., Fogelman, A.M., Lusis, A.J. et Reddy, S.T., 2007. Decreased obesity and atherosclerosis in human paraoxonase 3 transgenic mice. *Circ. Res.* 100, 1200-7.

Sillence, M.N., 2004. Technologies for the control of fat and lean deposition in livestock.

Vet. J. 167, 242-57.

Smith, S.B., Mersmann, H.J., Smith, E.O. et Britain, K.G., 1999. Stearoyl-coenzyme A desaturase gene expression during growth in adipose tissue from obese and crossbred pigs. *J. Anim. Sci.* 77, 1710-6.

Soukas, A., Socci, N.D., Saatkamp, B.D., Novelli, S. et Friedman, J.M., 2001. Distinct transcriptional profiles of adipogenesis in vivo and in vitro. *J. Biol. Chem.* 276, 34167-74.

Spurlock, M.E., Bidwell, C.A., Houseknecht, K.L., Kuske, J.L., Camacho-Rea, C., Frank, G.R. et Willis, G.M., 2002. Nutritionally induced adipose hypertrophy in young pigs is transient and independent of changes in the expression of the obese and peroxisome proliferator activated receptor genes. *J. Nutr. Biochem.* 13, 112-120.

Spurlock, M.E. et Gabler, N.K., 2008. The development of porcine models of obesity and the metabolic syndrome. *J. Nutr.* 138, 397-402.

Steffen, D.G., Brown, L.J. et Mersmann, H.J., 1978. Ontogenic development of swine (*Sus domesticus*) adipose tissue lipases. *Comp. Biochem. Physiol. B* 59, 195-8.

Stokes, G.B. et Tove, S.B., 1975. Evidence for a factor in pig adipose tissue controlling the specificity of the acyltransferase(s) of triacylglycerol synthesis. *J. Biol. Chem.* 250, 6315-9.

Sugimoto, Y., Tsuboi, H., Okuno, Y., Tamba, S., Tsuchiya, S., Tsujimoto, G. et Ichikawa, A., 2004. Microarray evaluation of EP4 receptor-mediated prostaglandin E2 suppression of 3T3-L1 adipocyte differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 322, 911-7.

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, 105-13.

Suryawan, A. et Hu, C.Y., 1993. Effect of serum on differentiation of porcine adipose stromal-vascular cells in primary culture. *Comp. Biochem. Physiol. Comp. Physiol.* 105,

485-92.

Suryawan, A. et Hu, C.Y., 1997. Effect of retinoic acid on differentiation of cultured pig preadipocytes. *J. Anim. Sci.* 75, 112-7.

Suryawan, A., Swanson, L.V. et Hu, C.Y., 1997. Insulin and hydrocortisone, but not triiodothyronine, are required for the differentiation of pig preadipocytes in primary culture. *J. Anim. Sci.* 75, 105-11.

Suzuki, K., Irie, M., Kadowaki, H., Shibata, T., Kumagai, M. et Nishida, A., 2005. Genetic parameter estimates of meat quality traits in Duroc pigs selected for average daily gain, longissimus muscle area, backfat thickness, and intramuscular fat content. *J. Anim. Sci.* 83, 2058-65.

Suzuki, K., Ishida, M., Kadowaki, H., Shibata, T., Uchida, H. et Nishida, A., 2006. Genetic correlations among fatty acid compositions in different sites of fat tissues, meat production, and meat quality traits in Duroc pigs. *J. Anim. Sci.* 84, 2026-34.

Suzuki, S., Ishikawa, S., Arihara, K. et Itoh, M., 2008. Continuous changes in triacylglycerol molecular species composition by fatty acids in porcine adipocytes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72, 1212-8.

Tan, S.H., Reverter, A., Wang, Y., Byrne, K.A., McWilliam, S.M. et Lehnert, S.A., 2006. Gene expression profiling of bovine in vitro adipogenesis using a cDNA microarray. *Funct. Integr. Genomics* 6, 235-49.

Taniguchi, M., Guan le, L., Zhang, B., Dodson, M.V., Okine, E. et Moore, S.S., 2008. Gene expression patterns of bovine perimuscular preadipocytes during adipogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 366, 346-51.

Tao, X., Jihong, Y., Li, G., Bin, F., Yi, Z., Xiaodong, C., Peichao, Z. et Yang, Z., 2008. Cloning, chromosome mapping and expression pattern of porcine PLIN and M6PRBP1 genes. *Genet. Sel. Evol.* 40, 215-26.

- Tarres, J., Tibau, J., Piedrafita, J., Fabrega, E. et Reixach, J., 2006. Factors affecting longevity in maternal Duroc swine lines. *Livestock Science* 100, 121-131.
- Te Pas, M.F., Freriksen, J.W., van Bijnen, A.J., Gerritsen, C.L., van den Bosch, T.J., Harders, F.H., Verburg, F.J., Visscher, A.H. et de Greef, K.H., 2001. Selection for growth rate or against back fat thickness in pigs is associated with changes in growth hormone axis plasma protein concentration and mRNA level. *Domest. Anim. Endocrinol.* 20, 165-84.
- Teboul, L., Febbraio, M., Gaillard, D., Amri, E.Z., Silverstein, R. et Grimaldi, P.A., 2001. Structural and functional characterization of the mouse fatty acid translocase promoter: activation during adipose differentiation. *Biochem. J.* 360, 305-12.
- Teiber, J.F., Billecke, S.S., La Du, B.N. et Draganov, D.I., 2007. Estrogen esters as substrates for human paraoxonases. *Arch. Biochem. Biophys.* 461, 24-9.
- Teiber, J.F., Draganov, D.I. et La Du, B.N., 2003. Lactonase and lactonizing activities of human serum paraoxonase (PON1) and rabbit serum PON3. *Biochem. Pharmacol.* 66, 887-96.
- Terpstra, A.H., Sanchez-Muniz, F.J., West, C.E. et Woodward, C.J., 1982. The density profile and cholesterol concentration of serum lipoproteins in domestic and laboratory animals. *Comp. Biochem. Physiol. B* 71, 669-73.
- Timon, M.L., Martin, L., Petron, M.J., Jurado, A. et Garcia, C., 2002. Composition of subcutaneous fat from dry-cured iberian hams as influenced by pig feeding. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 82, 186-191.
- Tontonoz, P., Hu, E., Graves, R.A., Budavari, A.I. et Spiegelman, B.M., 1994. mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev.* 8, 1224-34.
- Trayhurn, P., 2005. Endocrine and signalling role of adipose tissue: new perspectives on fat. *Acta Physiol. Scand.* 184, 285-93.
- Trayhurn, P., Temple, N.J. et Van Aerde, J., 1989. Evidence from immunoblotting studies

on uncoupling protein that brown adipose tissue is not present in the domestic pig. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 67, 1480-5.

Trayhurn, P. et Wood, I.S., 2004. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br. J. Nutr.* 92, 347-55.

Tuggle, C.K., Wang, Y. et Couture, O., 2007. Advances in swine transcriptomics. *Int. J. Biol. Sci.* 3, 132-52.

Urs, S., Smith, C., Campbell, B., Saxton, A.M., Taylor, J., Zhang, B., Snoddy, J., Jones Voy, B. et Moustaid-Moussa, N., 2004. Gene expression profiling in human preadipocytes and adipocytes by microarray analysis. *J. Nutr.* 134, 762-70.

Vallee, M., Robert, C., Methot, S., Palin, M.F. et Sirard, M.A., 2006. Cross-species hybridizations on a multi-species cDNA microarray to identify evolutionarily conserved genes expressed in oocytes. *BMC Genomics* 7, 113

van Himbergen, T.M., van Tits, L.J., Roest, M. et Stalenhoef, A.F., 2006. The story of PON1: how an organophosphate-hydrolysing enzyme is becoming a player in cardiovascular medicine. *Neth. J. Med.* 64, 34-8.

Van Lenten, B.J., Wagner, A.C., Navab, M. et Fogelman, A.M., 2001. Oxidized phospholipids induce changes in hepatic paraoxonase and ApoJ but not monocyte chemoattractant protein-1 via interleukin-6. *J. Biol. Chem.* 276, 1923-9.

van Wijk, H.J., Arts, D.J., Matthews, J.O., Webster, M., Ducro, B.J. et Knol, E.F., 2005. Genetic parameters for carcass composition and pork quality estimated in a commercial production chain. *J. Anim. Sci.* 83, 324-33.

Vidal-Puig, A.J., Grujic, D., Zhang, C.Y., Hagen, T., Boss, O., Ido, Y., Szczepanik, A., Wade, J., Mootha, V., Cortright, R., Muoio, D.M. et Lowell, B.B., 2000. Energy metabolism in uncoupling protein 3 gene knockout mice. *J. Biol. Chem.* 275, 16258-66.

Wakil, S.J., 1989. Fatty acid synthase, a proficient multifunctional enzyme. *Biochemistry*

28, 4523-30.

Walkey, C.J. et Spiegelman, B.M., 2008. A functional PPARgamma ligand binding domain is not required for adipogenesis. *J. Biol. Chem.* 283, 24290-4.

Wang, H., Li, H., Wang, Q., Wang, Y., Han, H. et Shi, H., 2006. Microarray analysis of adipose tissue gene expression profiles between two chicken breeds. *J. Biosci.* 31, 565-73.

Wang, H.B., Li, H., Wang, Q.G., Zhang, X.Y., Wang, S.Z., Wang, Y.X. et Wang, X.P., 2007. Profiling of chicken adipose tissue gene expression by genome array. *BMC Genomics* 8, 193

Wang, H.C., Ko, Y.H., Mersmann, H.J., Chen, C.L. et Ding, S.T., 2006. The expression of genes related to adipocyte differentiation in pigs. *J. Anim. Sci.* 84, 1059-66.

Wang, P., Mariman, E., Keijer, J., Bouwman, F., Noben, J.P., Robben, J. et Renes, J., 2004a. Profiling of the secreted proteins during 3T3-L1 adipocyte differentiation leads to the identification of novel adipokines. *Cell. Mol. Life Sci.* 61, 2405-17.

Wang, P.H., Ko, Y.H., Liu, B.H., Peng, H.M., Lee, M.Y., Chen, C.Y., Li, Y.C. et Ding, S.T., 2004b. The expression of porcine adiponectin and stearoyl coenzyme a desaturase genes in differentiating adipocytes. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 17, 588-593.

Wang, S., Soni, K.G., Semache, M., Casavant, S., Fortier, M., Pan, L. et Mitchell, G.A., 2008. Lipolysis and the integrated physiology of lipid energy metabolism. *Mol. Genet. Metab.* 95, 117-26.

Wang, S.M., Hwang, R.D., Greenberg, A.S. et Yeo, H.L., 2003. Temporal and spatial assembly of lipid droplet-associated proteins in 3T3-L1 preadipocytes. *Histochem. Cell Biol.* 120, 285-92.

Wang, Y., Botolin, D., Christian, B., Busik, J., Xu, J. et Jump, D.B., 2005. Tissue-specific, nutritional, and developmental regulation of rat fatty acid elongases. *J. Lipid Res.* 46, 706-

15.

Wang, Y., Botolin, D., Xu, J., Christian, B., Mitchell, E., Jayaprakasam, B., Nair, M.G., Peters, J.M., Busik, J.V., Olson, L.K. et Jump, D.B., 2006. Regulation of hepatic fatty acid elongase and desaturase expression in diabetes and obesity. *J. Lipid Res.* 47, 2028-41.

Weinstock, P.H., Levak-Frank, S., Hudgins, L.C., Radner, H., Friedman, J.M., Zechner, R. et Breslow, J.L., 1997. Lipoprotein lipase controls fatty acid entry into adipose tissue, but fat mass is preserved by endogenous synthesis in mice deficient in adipose tissue lipoprotein lipase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 10261-6.

Welsh, G.I., Griffiths, M.R., Webster, K.J., Page, M.J. et Tavaré, J.M., 2004. Proteome analysis of adipogenesis. *Proteomics* 4, 1042-51.

White, B.R., Lan, Y.H., McKeith, F.K., Novakofski, J., Wheeler, M.B. et McLaren, D.G., 1995. Growth and body composition of Meishan and Yorkshire barrows and gilts. *J. Anim. Sci.* 73, 738-49.

Wood, J.D. et Enser, M., 1997. Factors influencing fatty acids in meat and the role of antioxidants in improving meat quality. *Br. J. Nutr.* 78 Suppl 1, S49-60.

Wright, J.T. et Hausman, G.J., 1990. Adipose tissue development in the fetal pig examined using monoclonal antibodies. *J. Anim. Sci.* 68, 1170-5.

Xu, G., Sztalryd, C., Lu, X., Tansey, J.T., Gan, J., Dorward, H., Kimmel, A.R. et Londos, C., 2005. Post-translational regulation of adipose differentiation-related protein by the ubiquitin/proteasome pathway. *J. Biol. Chem.* 280, 42841-7.

Yamasaki, T., Tahara, K., Takano, S., Inoue-Murayama, M., Rose, M.T., Minashima, T., Aso, H. et Ito, S., 2006. Mechanism of plasma glutathione peroxidase production in bovine adipocytes. *Cell Tissue Res.* 326, 139-47.

Yang, Y.S., Song, H.D., Li, R.Y., Zhou, L.B., Zhu, Z.D., Hu, R.M., Han, Z.G. et Chen, J.L., 2003. The gene expression profiling of human visceral adipose tissue and its secretory

functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 300, 839-46.

Yu, Y.H., Liu, B.H., Mersmann, H.J. et Ding, S.T., 2006. Porcine peroxisome proliferator-activated receptor gamma induces transdifferentiation of myocytes into adipocytes. *J. Anim. Sci.* 84, 2655-65.

Yu, Y.H., Wu, S.C., Cheng, W.T., Mersmann, H.J. et Ding, S.T., 2008. Ectopic expression of porcine peroxisome proliferator-activated receptor delta regulates adipogenesis in mouse myoblasts. *J. Anim. Sci.* 86, 64-72.

Zhang, J., He, Q., Liu, Q.Y., Guo, W., Deng, X.M., Zhang, W.W., Hu, X.X. et Li, N., 2007. Differential gene expression profile in pig adipose tissue treated with/without clenbuterol. *BMC Genomics* 8, 433

Zimmerman, A.W. et Veerkamp, J.H., 2002. New insights into the structure and function of fatty acid-binding proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* 59, 1096-116.

Zimmermann, R., Strauss, J.G., Haemmerle, G., Schoiswohl, G., Birner-Gruenberger, R., Riederer, M., Lass, A., Neuberger, G., Eisenhaber, F., Hermetter, A. et Zechner, R., 2004. Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science* 306, 1383-6.

Zvonic, S., Lefevre, M., Kilroy, G., Floyd, Z.E., DeLany, J.P., Kheterpal, I., Gravois, A., Dow, R., White, A., Wu, X. et Gimble, J.M., 2007. Secretome of primary cultures of human adipose-derived stem cells: modulation of serpins by adipogenesis. *Mol. Cell Proteomics* 6, 18-28.



## Liste des coauteurs des articles inclus dans la thèse de Benoît Labrecque

| <u>Nom</u> | <u>Prénom</u> |
|------------|---------------|
| Beaudry    | Danièle       |
| Bordignon  | Vilceu        |
| Hallé      | Catherine     |
| Mathieu    | Olivier       |
| Mayhue     | Marian        |
| Murphy     | Bruce         |
| Palin      | Marie-France  |