

Recherche d'indicateurs moléculaires sanguins de la variation de l'adiposité corporelle par une approche transcriptomique chez le porc en croissance

Maëva JEGOU, Annie VINCENT, Florence GONDRET, Isabelle LOUVEAU

INRA, UMR1348 Pegase, F-35590 Saint-Gilles, France

Agrocampus Ouest, UMR1348 Pegase, F-35000 Rennes, France

Isabelle.Louveau@rennes.inra.fr

Avec la collaboration technique de Christine Tréfeu

Recherche d'indicateurs moléculaires sanguins de la variation d'adiposité corporelle par une approche transcriptomique chez le porc en croissance

L'adiposité corporelle est un paramètre important pour l'efficacité de la production porcine. Des travaux en lien avec l'obésité suggèrent qu'il existe dans le sang des marqueurs moléculaires du métabolisme lipidique tissulaire pour diverses espèces. Notre étude vise à rechercher des indicateurs moléculaires sanguins de la variation de masse adipeuse chez le porc en croissance. Des porcs mâles castrés Large White issus de deux lignées divergentes pour la consommation journalière résiduelle (CMJR) ont été nourris avec des régimes iso-énergétiques et iso-protéiques, riches en céréales (LF) ou comprenant une proportion élevée de fibres peu digestibles et d'huiles végétales (HF) pendant 10 semaines en engraissement (n = 12 par régime et par lignée). A l'abattage à 132 jours d'âge, les proportions de bardièrre, de panne et de poitrine, relativement au poids vif, étaient plus faibles (P < 0,001) chez les porcs ayant reçu le régime HF que chez les porcs ayant reçu le régime LF. Le transcriptome des cellules sanguines, étudié avec une puce à ADN porcine (Agilent), diffère (P < 0,01) fortement entre lignées (2154 oligonucléotides différemment exprimés), avec notamment une surexpression des gènes impliqués dans la réponse immunitaire, le catabolisme protéique et la signalisation cellulaire pour les porcs à faible CMJR. Le nombre d'oligonucléotides dans le sang affectés par le régime alimentaire est faible (92 ; P < 0,01). Associé aux résultats de la littérature, nous suggérons cependant que le gène CPT1A, sur-exprimé chez les porcs HF comparativement aux porcs LF, pourrait constituer un bon indicateur des variations d'adiposité.

Use of whole blood transcriptomics to identify molecular indicators of the variation of body adiposity in growing pigs

Adipose tissue mass is an important trait to be considered for pig production efficiency. Research work related to obesity in different species suggests that blood biomarkers of lipid metabolism can be found. The aim of the current study was to identify whole blood molecular indicators associated with variations in adipose tissue mass in growing pigs. Large White castrated male pigs from two lines divergently selected for residual feed intake (RFI) were fed diets with the same metabolizable energy level and the same protein content, but either rich in cereals (LF) or in crude fiber and lipids (HF) during 10 weeks in the growing period (n=12 by diet and by line). At the same slaughter age (132 d), relative proportions of backfat, perirenal fat and belly, relative to body weight, were lower (P < 0.001) in pigs fed the HF diet than in pigs fed the LF diet. Analyses of the whole blood transcriptome using a porcine microarray (Agilent) revealed large differences between lines (2154 oligonucleotides differentially expressed; P < 0.01). Up-regulations of genes involved in immune response, protein catabolism or cellular signaling were observed in pigs selected for a low RFI. The number of oligonucleotides affected by the diet was low (92; P < 0.01). Our data associated with other reports in literature suggest that CPT1A, which was up-regulated in pigs fed the HF compared with pigs fed the LF diet, could be a good indicator of adiposity.

INTRODUCTION

Pour optimiser la production de viande, il est nécessaire de disposer d'animaux robustes, efficaces, et capables de s'adapter à de nombreuses contraintes d'élevage (Sauvant et Martin, 2010). Ceci nécessite notamment d'évaluer la capacité de l'animal à constituer ses réserves énergétiques sous forme de lipides d'une part, et à mobiliser ces réserves d'autre part pour faire face aux contraintes. Pour mieux comprendre et caractériser cette flexibilité métabolique énergétique, il est nécessaire de disposer d'outils peu invasifs, et surtout qui ne nécessitent pas l'abattage de l'animal. D'après des résultats récents de la littérature, le compartiment sanguin mériterait d'être plus largement exploré. Des travaux en lien avec l'obésité suggèrent en effet qu'il existe des marqueurs moléculaires du métabolisme lipidique chez l'homme (Ghosh *et al.*, 2011) et le porc (Takahashi *et al.*, 2012) dans le sang. Il a aussi été montré que le transcriptome sanguin (ensemble des ARN messagers (ARNm) issu de la transcription du génome) est sensible aux variations de régimes alimentaires (De Mello *et al.*, 2012 ; Konieczna *et al.*, 2014).

L'objectif de cette étude est de déterminer si la variation d'adiposité corporelle chez le porc en croissance est associée à des modifications du transcriptome sanguin. Pour cela, nous avons utilisé un dispositif expérimental qui implique des porcs en croissance sélectionnés pour leur consommation moyenne journalière résiduelle (CMJR), et nourris avec des régimes iso-énergétiques et iso-protéiques contrastés quant à la source d'énergie alimentaire (Gondret *et al.*, 2014). Des calculs de corrélation entre l'expression de certains des gènes identifiés et la proportion de pièces grasses dans la carcasse ont été ensuite réalisés afin d'identifier des indicateurs pertinents pour la variation d'adiposité corporelle.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Dispositif expérimental

Quarante-huit mâles castrés Large White issus de deux lignées divergentes pour la CMJR (génération 8 de sélection), ont été élevés après le sevrage à l'INRA de Saint-Gilles (UMR1348 Pegase). Au début de la période d'engraissement (74 ± 3 jours), les porcs ayant une faible (CMJR⁻) ou une forte (CMJR⁺) CMJR sont répartis entre les régimes expérimentaux LF ou HF (n = 12 par lignée et par régime). Le régime LF a été formulé principalement à base de blé (36%), d'orge (36%) et de tourteau de soja (20%). Le régime HF se caractérise par des quantités importantes de paille broyée (11,5%) et d'huiles (colza et soja, 7,5%) incorporées en substitution partielle des céréales. Les régimes LF et HF sont iso-énergétiques (12,9 MJ/kg d'énergie métabolisable) et iso-protéiques (couvrant les besoins des porcs en acides aminés). Ils sont distribués à volonté sur la base d'une formule croissance pendant les 7 premières semaines, puis d'une formule finition jusqu'à l'abattage des porcs à l'âge de $132,5 \pm 0,5$ jours. La composition détaillée des régimes et l'ensemble des phénotypes animaux ont été précédemment présentés par Gondret *et al.* (2014).

1.2. Abattage et prélèvements

Les porcs ont été abattus à l'abattoir expérimental de l'UMR Pegase, deux heures après le premier repas matinal, afin de

refléter un état physiologique post-prandial des animaux. Les échantillons de sang ont été prélevés lors de la saignée. Un échantillon a été collecté sur EDTA pour les numérations sanguines. Un autre échantillon a été placé sur EDTA en présence d'un volume de tampon de lyse, puis a été stocké à -70°C jusqu'à la réalisation de l'analyse des données transcriptomiques. La panne a été collectée puis pesée le jour de l'abattage. La bardière et la poitrine ont été isolées de la carcasse après 24 h de ressuage puis pesées.

1.3. Numérations sanguines

Le nombre total de lymphocytes, monocytes et granulocytes a été déterminé à l'aide d'un compteur automatique de cellules sanguines calibré pour le porc (MS-9-3[®], Melet Schloesing laboratories).

1.4. Mesure des expressions de gènes

1.4.1. Extraction des ARN

Les ARN totaux ont été extraits à partir de sang total (kit Nucleospin[®] 8 RNA Blood, Macherey-Nagel). Les ARN ont été quantifiés par spectrophotométrie (NanoDrop[®]) et leur qualité a ensuite été vérifiée à l'aide du Bioanalyseur Agilent 2100 (Agilent Technology ; kit RNA 6000 Nano Assay).

1.4.2. Analyse du transcriptome

L'expression des gènes a été mesurée à partir d'une puce d'oligonucléotides (puce Agilent-037880/INRA_Sus scrofa_60K_v1, GPL16524). Les échantillons ont été marqués par le fluorochrome Cy3 (One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis, Agilent). Après hybridation, les puces ont été numérisées à l'aide du scanner de lames Agilent G2505B. Les données brutes d'expression ont été obtenues par traitement de ces images, à l'aide du logiciel Feature Extraction Software v9.5 (Agilent) et ont été filtrées en prenant en compte les valeurs d'intensité du bruit de fond sur la puce, le diamètre, la saturation, et l'uniformité du spot. Ces données ont ensuite été transformées par une fonction logarithme de base 2, puis centrées par échantillon par la médiane des niveaux d'expression des échantillons. Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel R version 3.0.2 (R Development Core Team, 2013). Les données ont été analysées par ANOVA en considérant les effets de la lignée (L), du régime (R) et de l'interaction (L x R). Pour établir la liste de gènes différemment exprimés en fonction de la lignée (CMJR⁻ vs CMJR⁺) et du régime (HF vs LF), un seuil de probabilité $P < 0,01$ a été retenu (Fu *et al.*, 2010).

L'analyse fonctionnelle des gènes différemment exprimés a été réalisée à l'aide de l'outil DAVID (the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery bioinformatics resources). Cet outil est disponible en ligne (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>) et permet de regrouper les gènes par leur fonction moléculaire et le processus biologique dans lequel ils interviennent, processus référencé dans les bases d'ontologie génique (Huang *et al.*, 2009a et b). Seuls les groupes d'ontologies de gènes significativement enrichis par rapport au génome de référence humain ($P < 0,05$, score d'enrichissement $> 1,3$) ont été retenus.

1.4.3. Analyse de gènes cibles par qPCR

Trois gènes codant respectivement pour la carnitine palmitoyl transférase 1A (CPT1A), la lipocaline 2 (LCN2), et la prosaposine (PSAP), identifiés comme différentiels entre les deux régimes par l'approche transcriptomique, ont été

quantifiés par qPCR, réaction de polymérisation en chaîne en temps réel. Après un traitement DNase (kit DNA-free, Ambion®), l'ADN complémentaire a été synthétisé à l'aide du kit High capacity cDNA reverse transcription (Applied Biosystems). Les amorces ont été élaborées à partir de séquences porcines avec le logiciel Primer Express 3.0 (Applied Biosystems). L'expression de chaque gène est normalisée par un facteur calculé comme la moyenne des expressions de deux gènes de référence : TATA box Binding protein 1 (TBP1) et Topoisomérase II β (TOP2B). Les analyses statistiques ont été effectuées par ANOVA en considérant les effets de la lignée (L), du régime (R) et de l'interaction (L x R) par le logiciel R.

1.5. Analyses de corrélations

Pour déterminer les corrélations entre l'expression de gènes cibles et la masse des différentes pièces grasses relativement au poids vif des animaux, une régression linéaire simple a été réalisée à l'aide du logiciel R. La corrélation entre ces paramètres est considérée significative avec $P < 0,05$, et un coefficient de corrélation, r , supérieur à $|0,3|$.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Rappels des effets du régime et de la lignée sur les paramètres phénotypiques

A l'abattage, les proportions relatives de bardière, de poitrine et de panne, relativement au poids vif, sont plus faibles ($P < 0,001$) chez les porcs ayant reçu le régime HF que chez les porcs ayant le régime LF (Tableau 1). La réduction de l'adiposité par le régime HF est en accord avec des travaux basés sur des régimes fibreux chez le porc (Yan *et al.*, 2013). Les proportions de ces différentes pièces ne diffèrent pas significativement entre lignées.

Tableau 1 – Effets de la lignée et du régime alimentaire sur les poids des pièces grasses à l'abattage

	CMJR ⁺		CMJR ⁻		ETR	S ¹
	LF	HF	LF	HF		
Poids vif final (PV), kg	77,6	69,0	82,7	72,9	5,5	L** R***
Bardière, %PV	5,9	4,1	5,7	3,9	0,8	R***
Poitrine, %PV	9,2	8,4	8,8	8,4	0,5	R***
Panne, %PV	0,8	0,5	0,8	0,6	0,1	R***

¹ ANOVA pour les effets de la lignée (L) et du régime (R), et de leur interaction (aucune interaction significative). ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

2.2. Numérations sanguines

Les lymphocytes, monocytes et granulocytes sont des cellules sanguines nucléées chez le porc, et appartiennent au système immunitaire inné. Le nombre de ces cellules est similaire ($P > 0,1$) dans les quatre groupes expérimentaux (Tableau 2). Par conséquent, une variation du niveau d'expression de gènes ne sera pas due à une variation du nombre de cellules nucléées du sang.

Tableau 2 – Effet de la lignée et du régime alimentaire sur le nombre de cellules sanguines nucléées

	CMJR ⁺		CMJR ⁻		ETR
	LF	HF	LF	HF	
Lymphocytes (x1000/mm ³)	12,3	13,1	12,1	13,7	2,1
Monocytes (x1000/mm ³)	0,6	0,6	0,6	0,6	0,1
Granulocytes neutrophiles (x1000/mm ³)	10,6	12,0	11,1	10,5	2,4

L'effet de la lignée, du régime et de l'interaction lignée x régime a été testé pour ces trois populations de cellules. Aucun effet ($P > 0,1$) n'a été observé.

2.3. Analyse des gènes différemment exprimés en fonction du régime et de la lignée

L'analyse des transcriptomes sanguins révèle des différences dans l'expression des gènes entre les deux lignées et entre les deux régimes. L'influence de la lignée sur le nombre d'oligonucléotides différemment exprimés (DE) au seuil de probabilité retenu ($P < 0,01$) est plus élevée que celle du régime alimentaire (Tableau 3). Il existe une interaction ($P < 0,01$) entre la lignée et le régime pour 106 oligonucléotides correspondant à 57 gènes uniques.

Parmi les 2154 oligonucléotides DE selon la lignée, 1216 ont un ratio d'expression supérieur à 1,2 ou inférieur à 0,8 ($=1/1,2$) entre les deux lignées. Ceci correspond à 260 gènes uniques surexprimés (supérieurs à 1,2) et 310 gènes uniques sous-exprimés (inférieurs à 0,8), respectivement, chez les porcs CMJR⁻ comparés aux porcs CMJR⁺. L'analyse fonctionnelle de ces gènes a permis d'identifier les voies métaboliques dans lesquelles les gènes DE sont impliqués. Les gènes DE sous-exprimés chez les CMJR⁻ sont essentiellement associés à la réponse immunitaire (30% des gènes uniques constituent ce groupe) et au transport nucléotidique (23% des gènes uniques constituent ce groupe). De même, les gènes DE surexprimés chez les CMJR⁻ sont essentiellement impliqués dans la réponse immunitaire (45% des gènes uniques constituent ce groupe), ainsi que dans le catabolisme protéique (37% des gènes uniques constituent ce groupe) et la signalisation cellulaire (18% des gènes uniques). Ces observations suggèrent des différences entre lignées sur le plan immunitaire. Elles confortent les résultats d'une étude récente indiquant que le transcriptome sanguin reflète le statut immunitaire chez le porc (Mach *et al.*, 2013).

Tableau 3 – Bilan du nombre de gènes différemment exprimés selon la lignée et le régime alimentaire

	Sondes		Gènes uniques	
	Total	R > 1,2 et < 0,8	R > 1,2	R < 0,8
Lignée ¹	2154	1216	260	310
Régime ²	92	43	16	3
LxR	106	57	-	-

Calcul du ratio d'expression (R) des sondes et des gènes différemment exprimés ($P < 0,01$)¹ entre CMJR⁻ vs CMJR⁺ pour l'effet de la lignée, ² entre HF vs LF pour l'effet du régime.

Parmi les 92 oligonucléotides DE selon le régime, 43 ont un ratio d'expression supérieur à 1,2 (surexprimés dans le régime HF) ou inférieur à 0,8 (sous-exprimés dans le régime HF) entre régimes (Tableau 3). Ces oligonucléotides correspondent à 19 gènes uniques avec 16 gènes surexprimés et 3 gènes sous-exprimés chez les porcs nourris avec le régime HF comparés aux porcs nourris avec le régime LF. Quatre gènes sont associés à la réponse immunitaire et trois gènes sont associés au métabolisme lipidique.

2.4. Relation entre l'expression de gènes influencés par le régime alimentaire et la masse grasse

Parmi les 19 gènes influencés par le régime, nous avons choisi d'étudier plus en détail les trois gènes liés au métabolisme lipidique car ils sont susceptibles d'être associés à la variation de la masse grasse. Il s'agit de la forme hépatique de la carnitine palmitoyl transférase 1A (CPT1A), impliquée dans la β -oxydation des acides gras et sensible aux variations de régime alimentaire (Lyvers Peffer *et al.*, 2004); la prosaposine (PSAP), impliquée dans l'hydrolyse des sphingolipides (O'Brien et Kishimoto, 1991); et la lipocaline 2 (LCN2) également connue sous le nom de neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) impliquée dans de nombreux métabolismes dont l'homéostasie lipidique (Jin *et al.*, 2011).

Tableau 4 – Effet du régime alimentaire sur l'expression des gènes CPT1, LCN2 et PSAP mesurée sur la puce d'oligonucléotides et par qPCR

Gènes	Méthode	Pval	Ratio HF vs LF
CPT1A	Puce	< 0,01	1,3
	qPCR	< 0,001	1,3
LCN2	Puce	< 0,01	1,6
	qPCR	< 0,05	2,3
PSAP	Puce	< 0,01	0,8
	qPCR	> 0,1	0,9

L'étude transcriptomique met en évidence une surexpression des gènes CPT1A et LCN2 et une sous-expression du gène PSAP ($P < 0,01$, Tableau 4) chez les porcs ayant reçu le régime HF comparés aux porcs ayant le régime LF. Le profil d'expression de ces trois gènes évalué par qPCR, est globalement similaire à celui mesuré par l'approche transcriptomique (Tableau 4), à l'exception du gène PSAP dont la différence d'expression entre régimes n'est pas significative lorsqu'elle est mesurée par qPCR. Ces données suggèrent que les gènes CPT1A et LCN2 constituent des candidats intéressants pour permettre d'évaluer de manière indirecte l'adiposité. Pour compléter ces observations, nous avons effectué une étude de corrélation (Tableau 5). Elle montre que l'expression des gènes CPT1A et LCN2, mesurée par l'approche transcriptomique ou par qPCR, est négativement corrélée ($P < 0,05$) avec les masses relatives de la panne, de la bardière et de la poitrine.

La mise en évidence d'une surexpression de la CPT1A dans le sang des animaux les moins gras est en accord avec une étude récente chez le jeune rat soumis à une restriction calorique (Konieczna *et al.*, 2014). A l'inverse, une étude conduite chez le rat plus âgé montre que l'obésité n'est pas associée à une modification de l'expression de ce gène dans les cellules du sang (Oliver *et al.*, 2013).

L'origine de ces différences de résultats n'est pas connue. Une hypothèse est que l'expression de ce gène serait plus sensible à une réduction de la masse grasse qu'à une forte augmentation de celle-ci. Elle correspond aussi à l'idée selon laquelle l'oxydation mitochondriale des acides gras dans les tissus (à laquelle participe l'enzyme codée par CPT1A) est positivement associée au phénotype maigre (Flachs *et al.*, 2013). Il reste à déterminer si la différence d'expression de CPT1A dans le sang est associée à une différence d'expression de ce gène dans le tissu adipeux ou dans le foie des porcs nourris avec les régimes HF ou LF. En effet, des travaux récents indiquent que le transcriptome sanguin pourrait refléter l'expression des gènes dans le foie chez les rongeurs et chez l'homme (Caimari *et al.* 2010, de Mello *et al.*, 2012).

Pour ce qui concerne l'expression du gène LCN2 dans les cellules sanguines, les données de la littérature sont plus rares que pour le gène CPT1A. Chez la souris, une étude montre que l'augmentation de la masse grasse induite par un régime hypercalorique est associée à une augmentation de la lipocaline 2 sérique (Guo *et al.*, 2013). Cette relation est inverse à celle que nous observons au niveau de l'expression du gène dans le sang des porcs en croissance. Toutefois, la concentration de la lipocaline 2 sérique est certainement influencée par la sécrétion de lipocaline 2 par différents tissus (Cowland *et al.*, 1997), dont le tissu adipeux (Guo *et al.*, 2013). La lipocaline serait notamment impliquée dans la réponse immunitaire innée, pour laquelle le tissu adipeux joue un rôle important via la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires tel que l'IFN γ et le TNF α (Zhao *et al.*, 2014).

Tableau 5 – Corrélations entre l'expression de gènes cibles et l'adiposité corporelle

Gènes	Méthode	Bardière	Poitrine	Panne
CPT1A	Puce	-0,50	-0,44	-0,36
	qPCR	-0,52	-0,43	-0,46
LCN2	Puce	-0,55	-0,48	-0,45
	qPCR	-0,52	-0,43	-0,43

Les corrélations sont significatives pour l'ensemble des données ($P < 0,05$).

CONCLUSION

Notre étude montre que le transcriptome sanguin est affecté par le type génétique et le régime alimentaire des porcs. Elle suggère de fortes différences entre lignées quant à la réponse immunitaire qu'il conviendrait de confirmer en présence de challenges immunitaires.

Nos résultats montrent aussi que la réduction de la masse adipeuse associée à la distribution d'un régime fibreux mais riche en lipides est associée à une augmentation de l'expression des gènes CPT1A et LCN2 dans les cellules du sang des porcs. L'expression de ces gènes est négativement corrélée avec la masse relative des différentes pièces grasses. Par conséquent, les gènes codant pour la CPT1A et pour la lipocaline 2 pourraient constituer des indicateurs de l'adiposité chez le porc en croissance.

Toutefois, il conviendra de vérifier le lien entre l'expression de ces gènes au niveau sanguin, le fonctionnement tissulaire et l'adiposité corporelle dans d'autres dispositifs expérimentaux.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient H. Gilbert (GenPhySE) et Y. Billon et A. Priet (INRA, UE1372 GenESI, Le Magneraud, F-17700 Surgères) pour la production des lignées CMJR, P. Roger et J. Delamarre (INRA, UMR Pegase) pour les soins aux animaux,

G. Guillemois (INRA, UMR Pegase) pour la préparation des régimes, et J. Liger et J.F. Rouault (INRA, UMR Pegase) pour les mesures à l'abattage. Cette étude a été financée par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR-11-SVSE7004 FatInteger). La région Bretagne et l'INRA (Département Physiologie Animale et Systèmes d'Élevage) cofinancent la thèse de M. Jégou.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Caimari A., Oliver P., Keijer J., Palou, A., 2010. Peripheral blood mononuclear cells as a model to study the response of energy homeostasis-related genes to acute changes in feeding conditions. *OMICS*, 14, 129-141.
- Cowland J. B., Borregaard N., 1997. Molecular characterization and pattern of tissue expression of the gene for neutrophil gelatinase-associated lipocalin from humans. *Genomics*, 45, 17-23.
- De Mello V. D., Kolehmanien M., Schwab U., Pulkkinen L., Uusitupa M., 2012. Gene expression of peripheral blood mononuclear cells as a tool in dietary intervention studies: What do we know so far? *Mol. Nutr. Food Res.*, 56, 1160-1172.
- Flachs P., Rossmeisl M., Kuda O., Kopecky, J., 2013. Stimulation of mitochondrial oxidative capacity in white fat independent of UCP1: a key to lean phenotype. *Biochim. Biophys. Acta*, 1831, 986-1003.
- Fu W. J., Stromberg A. J., Viele K., Carroll R. J., Wu G., 2010. Statistics and bioinformatics in nutritional sciences: analysis of complex data in the era of systems biology. *J. Nutr. Biochem.*, 21, 561-572.
- Ghosh S., Dent R., Harper M. E., Stuart J., McPherson R., 2011. Blood gene expression reveal pathway differences between diet-sensitive and resistant obese subjects prior to caloric restriction. *Obesity (Silver Spring)* 19, 457-463.
- Gondret F, Louveau I., Mourot J., Duclos M. J., Lagarrigue S, Gilbert H., van Milgen J., 2014. Dietary energy sources affect the partition of body lipids and the hierarchy of energy metabolic pathways in growing pigs differing in feed efficiency. *J. Anim. Sci.*, 92, 4865-4877.
- Guo H., Bazuine M., Jin D., Huang M. M. Cushman S. W., Chen X. 2013. Evidence for the regulatory role of lipocalin 2 in high-fat diet-induced adipose tissue remodeling in male mice. *Endocrinology*, 154, 3525-3538.
- Huang da W., Sherman B. T., Lempicki R. A., 2009a. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protoc.*, 4, 44-57.
- Huang da, W., Sherman B. T., Lempicki R. A., 2009b. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res.*, 37, 1-13.
- Jin D., Guo H., Bu S. Y., Zhang Y., Hannaford J., Mashek D. G., Chen X., 2011. Lipocalin 2 is a selective modulator of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation and function in lipid homeostasis and energy expenditure. *FASEB J.*, 25, 754-764.
- Konieczna J., Sanchez J., van Schothorst E. M., Torrens J. M., Bunschoten A., Palou M., Pico C., Keijer J., Palou A., 2014. Identification of early transcriptome-based biomarkers related to lipid metabolism in peripheral blood mononuclear cells of rats nutritionally programmed for improved metabolic health. *Genes Nutr.*, 9, 366.
- Lyvers Pepper P., Lin X., Jacobi S. K., Gatlin L. A., Woodworth J., Odle J., 2007. Ontogeny of carnitine palmitoyltransferase I activity, carnitine-Km, and mRNA abundance in pigs throughout growth and development. *J. Nutr.*, 137, 898-903.
- Mach N., Gao Y., Lemonnier G., Lecardonnel J., Oswald I. P., Estelle J., Rogel-Gaillard C., 2013. The peripheral blood transcriptome reflects variations in immunity traits in swine: towards the identification of biomarkers. *BMC Genomics*, 14, 894.
- O'Brien J. S., Kishimoto Y., 1991. Saposin proteins: structure, function, and role in human lysosomal storage disorders. *FASEB J.*, 5, 301-308.
- Oliver P., Reynes B., Caimari A., Palou A., 2013. Peripheral blood mononuclear cells: a potential source of homeostatic imbalance markers associated with obesity development. *Pflugers Arch*, 465, 459-468.
- R Development Core Team, 2013. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
- Sauvart D., Martin O., 2010. Robustesse, rusticité, flexibilité, plasticité... les nouveaux critères de qualité des animaux et des systèmes d'élevage: définitions systémique et biologique des différents concepts. *INRA Prod. Anim.*, 23, 5-10.
- Takahashi J., Waki S., Matsumoto R., Odake J., Miyaji T., Tottori J., Iwanaga T., Iwahashi H., 2012. Oligonucleotide microarray analysis of dietary-induced hyperlipidemia gene expression profiles in miniature pigs. *PLoS One*, 7, e37581.
- Yan H., Potu R., Lu H., Vezzoni de Almeida V., Stewart T., Ragland D., Armstrong A., Adeola O., Nakatsu C. H., Ajuwon K. M., 2013. Dietary fat content and fiber type modulate hind gut microbial community and metabolic markers in the pig. *PLoS One*, 8, e59581.
- Zhao P., Elks C. M., Stephens J. M., 2014. The induction of lipocalin-2 protein expression in vivo and in vitro. *J. Biol. Chem.*, 289, 5960-5969.

