

# Effets de la baicaline caractérisés par une approche *in vitro* sur les cellules musculaires et adipeuses des porcelets

Marie-Hélène PERRUCHOT (1), Florence GONDRET (1), Alice HAMARD (2), Fabrice ROBERT (2), Frédéric DESSAUGE (1)

(1) PEGASE, INRAE, Institut Agro, 35590 Saint-Gilles, France

(2) DELTAVIT, Groupe CCPA, Z.A. du Bois de Teillay, Quartie, 35150 Janzé, France

Marie-helene.perruchot@inrae.fr

## Effects of baicalin on muscle and fat cells of piglets

The suckling period is crucial for the early survival and growth of piglets. Pregnant and lactating sows fed diets enriched in baicalin, a natural flavone glycoside extracted from the roots of *Scutellaria baicalensis*, produced more colostrum and milk, and their piglets had better survival and were heavier at weaning. Baicalin is known as an antioxidant flavonoid. Moreover oxidative stress and inflammation are tightly linked; therefore, anti-inflammatory and/or natural antioxidant compounds may help improving piglet growth. Body growth is the cumulative sum of cell proliferation and enlargement in lean and fat tissues. The objective of this study was to determine effects of baicalin on muscle and fat cell development. Cells were isolated from the longissimus muscle and subcutaneous adipose tissue (TASC) of 7-day-old Piétrain x (Large White x Landrace) piglets (n=4). Cell viability, proliferation rate (measured by ELISA), and free radical (ROS) production were determined in response to increasing doses of baicalin in culture media. Baicalin addition in cell media decreased ( $P < 0.001$ ) the ROS production in TASC (-25%, at 10 µg/mL, -75% at 100 µg/mL) and muscle cells (-20%, at 10 µg/mL, -27% at 100 µg/mL). Baicalin addition also decreased the proliferation rates of adipose and muscle cells. Viability was negatively affected by baicalin in muscle cells. These results suggest that baicalin may exert protective antioxidant effects on pig tissues, but has contrasting effects on developmental features of cells.

## INTRODUCTION

La sélection de truies hyper-prolifériques a permis d'accroître la taille des portées en élevage, avec en moyenne un porcelet de plus durant ces 10 dernières années (Quiniou *et al.*, 2012). Cette hyperproliféricité s'accompagne cependant d'une plus faible croissance des porcelets durant la période d'allaitement en raison d'une part de l'augmentation de la proportion de nouveaux nés de faible poids et d'autre part d'une diminution des quantités de lait disponibles pour chaque porcelet. La période de fin de gestation et l'initiation de la lactation sont généralement marquées par l'installation d'un stress oxydant et d'un état inflammatoire chez la truie (Berchieri-Ronchi *et al.*, 2011), liée à l'augmentation des besoins énergétiques pour la production de lait et le basculement d'un état anabolique à un état catabolique, ainsi que le renforcement de différents stress (immunitaire ou comportemental). Le stress oxydant durant la gestation et la lactation influence la production laitière et les performances des portées. Des essais visant à évaluer la relation entre l'inflammation et la production de lait chez les truies hyperprolifériques (Boudal et Roger, 2014) ont montré que l'utilisation d'extrait de *Scutellaria baicalensis* (une plante inscrite dans la pharmacopée chinoise) dans l'aliment de gestation et de lactation augmente le poids au sevrage (+300 g / porcelet) de la portée. La baicaline est considérée comme le glycoside le plus abondant qui contribue à la bioactivité de *S. baicalensis*. Des activités anti-apoptotiques, anti-oxydantes, anti-tumorales, et anti-inflammatoires de la baicaline ainsi que la modulation associée de plusieurs facteurs immunitaires ont été rapportées dans différents types de cellules et de modèles

animaux (Perruchot *et al.*, 2019). Afin de clarifier les mécanismes d'action de la baicaline chez le porcelet, nous avons évalué son effet sur la viabilité, la prolifération et le stress oxydant de cellules isolées de tissu adipeux sous cutané et de muscle (tissus impliqués dans la croissance), mises en culture avec des doses croissantes de ce composé.

## 1. MATERIEL ET METHODES

### 1.1. Prélèvements tissulaires et isolement cellulaire

Des échantillons (15 g) de tissu adipeux sous-cutané dorsal (TASC) et de muscle long dorsal (LM) ont été prélevés sur des 4 porcelets femelles Piétrain x (Large White x Landrace) à l'âge de 7 jours (3,5 ± 0,3 kg) et conservés dans des solutions physiologiques. Les cellules de chaque tissu ont ensuite été isolées par digestion à la collagénase selon Perruchot *et al.* (2013). Elles ont été mises en culture pendant 4 jours dans des milieux de croissance adaptés à chaque type tissulaire, et en présence de doses croissantes de baicaline (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

### 1.2. Viabilité cellulaire, prolifération et production de ROS

#### 1.2.1. La viabilité cellulaire

Elle a été déterminée à l'aide d'un test colorimétrique au MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) reflétant l'activité métabolique des cellules confluentes traitées par différentes doses de baicaline (0, 1, 10, 100 µg/mL) pendant 24 h en milieu DMEM, 20% de sérum de veau fœtal. Les cellules ont été

exposées à 200 µL de sel de tétrazolium (MTT, 0,5 mg/mL) pendant 2h, permettant d'évaluer l'activité mitochondriale, donc le nombre de cellules vivantes dans l'échantillon. La concentration de formazan formé par la réduction du MTT est mesurée par spectrophotométrie à 540 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques (Multiskan, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

### 1.2.2. La prolifération

Pour évaluer leur capacité proliférative, les cellules ont été cultivées pendant 24 h après mise en culture avec des doses croissantes de baicaline (0 à 100 µg/mL), puis marquées et ré-incubées pendant 16 h avec 10 µM par puits de bromodésoxyuridine (BrdU), un nucléoside synthétique incorporé dans l'ADN dans les cellules en cours de réplication. La prolifération a été quantifiée en mesurant l'absorption à 370 nm à l'aide d'un spectrophotomètre à balayage (Mithras LB 940, Berthold Technologies, Oak Ridge, TN, USA). L'augmentation des valeurs de densité optique est proportionnelle au taux de prolifération.

### 1.2.3. La production de Reactive Oxygen Species (ROS)

La production de ROS dans les cellules cultivées en présence de doses croissantes de baicaline (1–100 µg/mL) dans un milieu de culture à 20% de sérum de veau fœtal a été déterminée par un test fluorométrique utilisant un dérivé carboxy de fluoresceïne (DCFDA), (5 µM) ajouté au milieu de culture. Après 90 min d'incubation, la quantité de ROS produits par les cellules a été estimée en quantifiant la dichlorofluoresceïne (DCF) à l'aide d'un lecteur de microplaques spectrophotomètre (Mithras, LB 940) avec des longueurs d'onde d'excitation et d'émission à 485 et 535 nm, respectivement.

### 1.3. Analyses statistiques

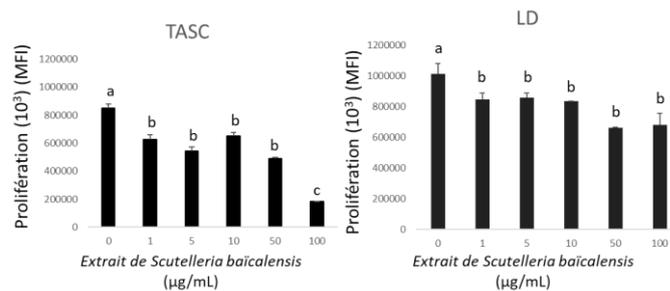
Test de normalité des données puis analyse des données par analyse de variance (ANOVA) en utilisant le modèle suivant:  $y_i = \mu + \text{time}_i + \varepsilon_i$  ( $y$  = viabilité, prolifération, production de ROS,  $\mu$  = moyenne;  $i$  = dose de baicaline et  $\varepsilon$  = résidus). Puis la méthode de Tukey a été utilisée. Les différences ont été considérées comme significatives à  $P < 0,05$  (RStudio Team, 2018).

## 2. RESULTATS

### 2.1. La viabilité

Pour le TASC, nous observons une meilleure viabilité des cellules à la dose 5 µg/mL de baicaline (+20%,  $P < 0,001$ ), comparativement à des milieux sans baicaline ou à la dose de 100 µg/mL (données non présentées). Pour le muscle, la viabilité cellulaire est à l'inverse réduite quelle que soit la dose de baicaline (-28% en moyenne,  $P < 0,05$ ).

### 2.2. La prolifération cellulaire

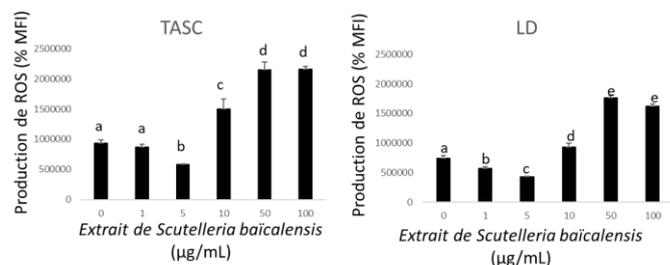


Des lettres différentes indiquent une différence à  $P < 0,05$

**Figure 1** – Prolifération des cellules isolées à partir de TASC et LD en absence ou présence de baicaline.

L'addition de baicaline diminue la prolifération cellulaire par rapport à des milieux sans baicaline, et ceci dès 1 µg/mL et quel que soit le type cellulaire (Figure 1 ;  $P < 0,01$ ). Cette diminution est encore plus marquée dans le TASC à 100 µg/mL de baicaline dans le milieu.

### 2.3. La production de ROS



Des lettres différentes indiquent une différence à  $P < 0,05$

**Figure 2** – Production de ROS par les cellules isolées à partir de TASC et LD en absence ou présence de baicaline.

La présence de baicaline diminue ( $P < 0,001$ ) la production de ROS par les cellules de TASC (-25% à 10 µg/mL et -75% à 100 µg/mL,  $P < 0,001$ ), et par les cellules du muscle (-20% à 10 µg/mL, -27% à 100 µg/mL,  $P < 0,001$ ) (Figure 2).

## CONCLUSION

La baicaline diminue la viabilité des cellules musculaires, et réduit la prolifération des cellules musculaires et adipeuses. Les conséquences sur la capacité des cellules à s'engager dans le processus de différenciation conduisant à l'établissement d'un ensemble tissulaire fonctionnel reste à déterminer. L'addition de baicaline a un fort effet antioxydant sur les cellules du tissu adipeux et du muscle, suggérant un effet protecteur lors de la croissance du porcelet qui reste à confirmer.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Berchieri-Ronchi C. B., Kim S. W., Zhao Y., Correa C. R., Yeum K.J., Ferreira A., 2011. Oxidative stress status of highly prolific sows during gestation and lactation. *Animal*. 5(11):1774–1779.
- Boudal L., Roger L., 2014. *Scutellaria baicalensis* extract improves milk production in hyperprolific sows –EAAP – 347 p.
- Quiniou N., Brossard L., Milgen J., Salaün Y., Quesnel H., Gondret F., Dourmad J.Y., 2012. La variabilité des performances animales en élevage porcin : description et implications pratiques. *INRAE Productions Animales*. 25. 10.20870. 25.1.3191.
- Perruchot M.H., Lefaucheur L., Barreau C., Casteilla L., Louveau I., 2013. Age-related changes in the features of porcine adult stem cells isolated from adipose tissue and skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*. Oct 1;305(7):C728-38.
- Perruchot M.H., Gondret F., Robert F., Dupuis E., Quesnel H., Dessauge F., 2019. Effect of the flavonoid baicalin on the proliferative capacity of bovine mammary cells and their ability to regulate oxidative stress. *PeerJ*. Mar 5;7:e6565.