



[Nutriments](#) . 2018 septembre; 10 (9): 1139.

PMCID: PMC6164394

Publié en ligne 2018 août 22. doi: [10.3390 / nu10091139](https://doi.org/10.3390/nu10091139)

PMID: [30131460](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30131460/)

Un extrait de graine de *Mucuna pruriens* à teneur réduite en lévodopa présente des effets neuroprotecteurs contre la maladie de Parkinson dans les cellules de microglie murine et de neuroblastome humain, *Caenorhabditis elegans* et *Drosophila melanogaster*

[Shelby L. Johnson](#) , ^{1, 2, 3} [Hyun Y. Park](#) , ^{4, 5} [Nicholas A. DaSilva](#) , ^{2, 3} [Dhiraj A. Vattem](#) , ^{4, 5, *} [Hang Ma](#) , ^{1, 2, 3, *} et [Navindra P. Seeram](#) ^{2, 3, *}

¹School of Biotechnology and Health Sciences, Wuyi University; International Healthcare Innovation Institute (Jiangmen), Jiangmen 529020, China; shelby_johnson@uri.edu

²Bioactive Botanical Research Laboratory, Department of Biomedical and Pharmaceutical Sciences, College of Pharmacy, University of Rhode Island, Kingston, RI 02881, USA; ndasilva@my.uri.edu

³George and Anne Ryan Institute for Neuroscience, University of Rhode Island, Kingston, RI 02881, USA

⁴Edison Biotechnology Institute, Ohio University, Athens, OH 45701, USA; parkh4@ohio.edu

⁵ École des sciences de la santé appliquées et du bien-être, Université de l'Ohio, Athens, OH 45701, USA

* Correspondance: vattem@ohio.edu (DAV); hang_ma@uri.edu (HM); nseeram@uri.edu (NPS); Tél .: + 1-740-593-0133 (DAV); + 1-401-874-7654 (HM); + 1-401-874-9367 (NPS)

Reçu le 16 juillet 2018; Accepté le 17 août 2018.

[Copyright](#) © 2018 par les auteurs.

Titulaire de la licence MDPI, Bâle, Suisse. Cet article est un article en accès libre distribué selon les conditions générales de la licence Creative Commons Attribution (CC BY) (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstrait

Mucuna pruriens (*Mucuna*) a été prescrit dans l'Ayurveda pour diverses affections cérébrales, notamment le 'kampavata' (tremblements) ou la maladie de Parkinson (MP). Bien que *Mucuna* soit une source naturelle bien connue de lévodopa (L-dopa), des études publiées suggèrent que d'autres composés bioactifs pourraient également être responsables de ses effets anti-PD. Pour étudier cette hypothèse, un extrait de graines de *M. pruriens* (MPE) réduit en L-dopa (<0,1%) a été préparé et évalué pour ses effets anti-PD dans des cellules (cellules de neuroblastome murines BV-2 et SH-SY5Y humaines), *Caenorhabditis elegans* et *Drosophila melanogaster* des modèles. Dans les cellules BV-2, la MPE (12,5 à 50 µg / mL) réduit la cytotoxicité induite par le peroxyde d'hydrogène (15,7 à 18,6%), diminue la production d'espèces réactives de l'oxygène (29,1 à 61,6%) et réduit l'oxyde nitrique induit par le lipopolysaccharide (LPS) les espèces libérées de 8,9 à 60%. MPE (12,5 à 50 µg / mL) a atténué l'apoptose des cellules SH-SY5Y de 6,9 à 40,0% dans un essai de co-culture sans contact avec des surnageants sans cellules provenant de cellules BV-2 traitées au LPS. La MPE (12,5 à 50 µg / mL) a réduit de 11,85 à 38,5% la mort cellulaire induite par la 6-hydroxydopamine (6-OHDA) des cellules SH-SY5Y. De plus, la MPE (12,5 à 50 µg / mL) augmentait la survie médiane (25%) et maximale (47,8%) de *C. elegans* exposée à la neurotoxine dopaminergique méthyl-4-phénylpyridinium. MPE (40 µg / mL) de la neurotoxine dopaminergique améliorée (6-OHDA et roténone) induite par la précipitation du comportement de géotaxie inné négatif de *D. melanogaster* de 35,3 et 32,8%, respectivement. Par conséquent, MPE contient des composés bioactifs, autres que la L-dopa, qui peuvent conférer des effets neuroprotecteurs contre la MP.

Mots-clés: *Mucuna pruriens* , lévodopa, maladie de Parkinson, neuroprotection, *Caenorhabditis elegans* , *Drosophila melanogaster*

1. Introduction

La maladie de Parkinson (MP) est une maladie neurodégénérative progressive qui entraîne une altération de la motricité et se caractérise par une perte de neurones dopaminergiques dans la substantia nigra. Elle se situe au second rang derrière la maladie d'Alzheimer [1]. L'étiologie et la physiopathologie de la MP ne sont pas très bien comprises et ont par conséquent étouffé le développement d'interventions thérapeutiques efficaces pour la MP. Les preuves accumulées suggèrent qu'une élévation du stress oxydatif et de la neuroinflammation associées à la microgliose et à l'agrégation intracellulaire des molécules d' α -synucléine pourraient être responsables d'une atrophie neuronale dopaminergique et, en définitive, d'une manifestation clinique de la MP [2 , 3 , 4].

Mucuna pruriens, communément appelé Mucuna ou haricot velours, est originaire de l'Inde orientale et des régions occidentales de la Chine. Les graines de Mucuna, une riche source de lévodopa d'origine naturelle (L-dopa; 4–7% des graines de Mucuna) [5], ont été utilisées traditionnellement comme remède efficace contre plusieurs maladies du cerveau, y compris la réduction des tremblements (comme dans la MP), comme indiqué dans l'ancien traité de l'Ayurveda, le système de médecine traditionnel indien [6]. Le manque de traitements pharmaceutiques efficaces a stimulé l'intérêt de la recherche pour Mucuna en tant qu'agent thérapeutique de la MP dans plusieurs études sur des animaux et un nombre limité d'essais cliniques sur l'homme [7 , 8 , 9]. Par exemple, Mucuna, à une dose de 17,5 mg / kg, a amélioré la motricité et réduit la dyskinésie chez les patients atteints de MP avancée avec moins d'effets indésirables, par rapport au traitement conventionnel de la L-dopa associée à un inhibiteur de la dopamine décarboxylase, à savoir la Carbidopa [9]. Il a également été rapporté que Mucuna avait des effets protecteurs contre la MP dans les modèles rongeurs en augmentant l'activité du complexe mitochondrial cérébral I [10] et en réduisant le dysfonctionnement moteur [11 , 12]. Bien que plusieurs études aient attribué les activités anti-PD à des taux élevés de L-dopa naturellement présents à Mucuna, de nouvelles preuves suggèrent que d'autres composés bioactifs que la L-dopa pourraient également avoir des effets neuroprotecteurs. Par exemple, un extrait méthanolique de Mucuna (dose de 0,1%) contenant de faibles concentrations de L-dopa (0,01%) a montré des effets anti-PD, notamment une amélioration de la fonction motrice et de la réponse olfactive dans un modèle génétique de la maladie de *Drosophila melanogaster* [13]. Les effets anti-PD de l'extrait méthanolique de Mucuna étaient supérieurs à ceux du traitement de la L-dopa (0,01%) seul dans le modèle susmentionné de *D. melanogaster*, ce qui suggère que les effets globaux anti-PD de Mucuna étaient le résultat d'autres composés. au-delà de la L-dopa seule [13].

Notre groupe a précédemment rapporté le développement d'un algorithme de potentiel neuroprotecteur pour plusieurs extraits botaniques ayurvédiques, parmi lesquels *M. pruriens* se classait parmi les quatre premiers [14]. Compte tenu de l'intérêt de notre groupe pour la recherche sur cette plante médicinale et pour explorer le rôle de ses bioactifs «non-L-dopa» contre la MP, nous avons préparé un extrait de graine de *M. pruriens* (MPE) contenant de faibles quantités de L-dopa (<0,1%).) avec les objectifs suivants: 1) évaluer les effets antioxydants et anti-inflammatoires du MPE dans les cellules de la microglie murine (BV-2) et du neuroblastome humain (SH-SY5Y); (2) évaluer les effets neuroprotecteurs du MPE sur la cytotoxicité induite par la neurotoxine dans les modèles de PD cellulaire; et (3) évaluer les effets neuroprotecteurs des MPE en utilisant Modèles de *Caenorhabditis elegans* et *D. melanogaster* de la MP induite chimiquement.

2. Matériels et méthodes

2.1. Produits chimiques

Le diméthylsulfoxyde (DMSO), la lévodopa (L-dopa), le resvératrol (Resv), le lipopolysaccharide (LPS), le 2', 7'-dichlorofluoresceine diacétate (DCF-DA), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), la 6-hydroxydopamine (6-OHDA), le 1-méthyl-4-phénylpyridinium (MPP^+) et la roténone ont été achetés chez Sigma-Aldrich Chemical Co. (St Louis, MO, USA). Le milieu Eagle's modifié de Dulbecco (DMEM) / F-12, le milieu DMEM exempt de rouge de phénol et la trypsine-versène ont été achetés chez Life Technologies (Grand Island, NY, États-Unis).

2.2. Préparation de l'extrait de graines de *Mucuna pruriens* (MPE)

Les graines de *Mucuna pruriens* (3–7% de L-dopa) ont été authentifiées botaniquement et fournies généreusement par Verdure Sciences (Noblesville, IN, USA). Les graines de *Mucuna pruriens* ont été authentifiées par le Dr V. Singh (Pharmanza, Gujarat, Inde) avec un spécimen de référence (n° PHPL / HB / 013) déposé dans le jardin Heber-Youngken et la serre du College of Pharmacy de l'Université de Rhode Island, RI, USA. En bref, le sol *M. pruriens* Les graines (150 g) ont été extraites par sonication dans du méthanol (1000 ml) dans un bain à ultrasons (Bransonic 8510; Branson Ultrasonics Corp., Danbury, Connecticut, États-Unis) pendant 0,5 heure et macérées dans du méthanol à température ambiante pendant 24 h pour donner un résultat optimal. extrait méthanolique brut (6,5 g) qui a été séché sous vide (au bain-marie à 35 ° C); reconstitué dans de l'eau; et ensuite partitionné séquentiellement dans des *n*-hexanes, de l'acétate d'éthyle et du butanol avec les détails suivants. L'extrait brut séché (6,5 g) a été reconstitué dans de l'eau distillée (250 ml) et séparé en séquence avec *n*-hexanes, acétate d'éthyle et butanol (250 mL x 3 pour chaque solvant). Chacune de ces fractions, à savoir des hexanes (0,2 g), de l'acétate d'éthyle (0,3 g), du butanol (2,9 g) et la partie restante d'eau (3,0 g), ont été séchées sous vide (dans un bain d'eau à 35 ° C). se permettre des extraits respectifs. Les taux de L-dopa ont été quantifiés dans chaque extrait séché (décrit ci-dessous) et l'extrait présentant le taux le plus faible de L-dopa, à savoir le MPE (extrait de l'acétate d'éthyle de *M. pruriens* ; voir le [tableau 1](#)), a été sélectionné pour une analyse biologique ultérieure. évaluation.

Tableau 1

La teneur en lévodopa (L-dopa) de chaque extrait de graines de *Mucuna pruriens* est déterminée par spectrométrie de masse en tandem par ionisation par électrospray et par chromatographie en phase liquide (LC-ESI-MS / MS).

Extrait	Rendement (%; P / P)	Teneur en L-Dopa (%; P / P)
méthanol	100	28.0
hexanes	3.1	0,54
acétate d'éthyle	4.7	0,03
butanol	45,3	10.05
eau	46,9	21.39

2.3. Quantification de la L-Dopa par chromatographie en phase liquide par spectrométrie de masse en tandem par ionisation Electropray (LC-ESI-MS / MS)

La L-dopa a été quantifiée par spectrométrie de masse en tandem à ionisation électrospray par chromatographie en phase liquide (LC-ESI – MS / MS) en utilisant les méthodes et paramètres publiés par notre groupe et d'autres, avec quelques modifications [[15](#) , [16](#) , [17](#) , [18](#) , [19](#)]. Les quantifications de L-dopa ont été effectuées sur un système de chromatographie en phase liquide ultra-rapide (UFLC) prédominante (Shimadzu, Marlborough, MA, États-Unis) couplé à un système QTRAP 4500 (Applied Biosystems / MDS Sciex, Framingham, MA, États-Unis) avec des données acquises à l'aide de Logiciel Analyst 1.6.3 et traité à l'aide du logiciel MultiQuant 3.0.1 (Sciex, Framingham, MA, USA). Le système UFLC se composait de trois pompes LC-20AD, d'une unité de dégazage DGU-20A, d'un échantillonneur automatique SIL-20AC, d'un four à colonne CTO-20AC et d'un module de bus de communication CBM-20A. La séparation chromatographique a été réalisée en utilisant une colonne XBridge C18 de 100 mm x 4,6 mm, 5 µm (Waters, Milford, MA, USA). La phase mobile est composée de A (eau contenant 0,1% (v / v) d'acide formique) et B (méthanol contenant 0,1% (v / v) acide formique) avec un gradient d'éluion de 1% de B de 0 à 10 min et de 1 à 4% de B de 10 à 20 min. Le débit était de 0,5 mL / min et le volume d'injection de 10 µL. La température de la colonne a été maintenue à 40 ° C. La MS fonctionnait en ionisation électrospray (ESI) en mode positif avec surveillance de réactions multiples (MRM). L'azote était utilisé comme source de gaz dans tous les cas.

Les paramètres ont été optimisés comme suit: tension IonSpray, 4 500 V; gaz nébuliseur, 40 psi; gaz de chauffage auxiliaire, 45 psi; gaz rideau, 20 psi; température du gaz turbo, 300 ° C. En utilisant un authentique standard de L-dopa (acheté chez Sigma-Aldrich Chemical Co. ; Saint-Louis, MO, USA), la L-dopa a été analysée par le mode moniteur à réactions multiples (MRM) en utilisant une transition ionique à m/z valeurs de 198/152. Toutes les analyses de l'étalon et des extraits ont été effectuées en triple (voir les spectres LC-ESI-MS / MS dans les [documents supplémentaires; figure S1](#)). La courbe d'étalonnage ($y = 5006,29x - 13189,13$; $R = 0,99825$) a été obtenue en traçant la surface du pic par rapport aux concentrations nominales de L-dopa. La linéarité était comprise entre 10 et 1000 ng / mL. La présence de L-dopa dans les extraits de *Mucuna* a été identifiée comme un pic avec un temps de rétention de 3,95 min sous la transition ionique 198/152. Le pourcentage de L-dopa dans les différents extraits de *Mucuna* a été calculé comme suit: (ng / ml de L-dopa dans l'extrait) / ($\mu\text{g} / \text{ml}$ d'extrait injecté) x 100%.

2.4. Culture de cellules

Les cellules de microglie murine (BV-2) ont été aimablement fournies par le Dr Grace Y. Sun (Université du Missouri à Columbia, MO, USA) et des cellules de neuroblastome humain (SH-SY5Y) ont été achetées auprès de American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, USA). VA, USA). Les cellules ont été maintenues à 37 ° C dans 5% de CO₂ avec un taux élevé de glucose (4,5 g / L) de DMEM / F-12 accompagné de sérum de veau fœtal inactivé à la chaleur à 10%, et à 1% de P / S (100 U / mL de pénicilline, 100 mg / kg). mg / mL de streptomycine) (Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA). Le MPE a été dissous dans de l'eau distillée pour obtenir une solution mère à 10 mg / ml, puis dilué dans un milieu sans sérum pour les traitements. Le Resv (utilisé comme contrôle positif pour les dosages cellulaires) a été dissous dans du DMSO (10 mM) et dilué dans du milieu à la concentration souhaitée. Les cellules témoins ont été traitées avec 0,1% de DMSO dans un milieu sans sérum.

2.5. Viabilité cellulaire

BV-2 et SH-SY5Y ont étéensemencées dans des plaques à parois blanches à 96 puits à 1×10^5 cellules / ml dans du milieu exempt de sérum. Les effets de cytotoxicité dans les cellules BV-2 et SH-SY5Y ont été évalués pour MPE (12,5, 25 et 50 $\mu\text{g} / \text{mL}$). Après 24 h, la viabilité cellulaire a été déterminée en utilisant le Cell Titer Glo 2.0 (CTG; Promega, Madison, WI, USA) selon les méthodes précédemment décrites par notre groupe [[14](#) , [20](#)]. La MPE a ensuite été évaluée pour ses effets protecteurs cellulaires contre plusieurs agressions oxydatives, comme suit. Les cellules ont été prétraitées au MPE (12,5, 25 et 50 $\mu\text{g} / \text{mL}$), au Resv (20 μM) ou à un contrôle avec un solvant (0,1% de DMSO) pendant 1 h (dans les cellules BV-2) ou 2 h (dans SH-SY5Y). cellules). Un stress oxydatif cellulaire a été induit dans le BV-2 et le SH-SY5Y avec H₂O₂ (100 μM), SH-SY5Y avec 6-OHDA (25 μM) et MPP⁺ (2 mM). La viabilité cellulaire des cellules BV-2 et SH-SY5Y après traitement a été déterminée à 6 h et 24 h, respectivement, par le test CTG susmentionné.

2.6 Détermination des espèces d'oxygène réactif induites par le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) dans des cellules murines de la microglie BV-2

La production d'espèces réactives de l'oxygène induites par H₂O₂ (ROS) dans les cellules BV-2 a été déterminée par une sonde fluorescente (DCF-DA) en utilisant le procédé décrit précédemment avec des modifications [[21](#)]. BV-2 des cellules microgliales sontensemencées dans une plaque noire à 96 puits à 1×10^5 cellules / ml dans du milieu exempt de sérum. Les cellules ont été autorisées à se fixer pendant 24 h et prétraitées au MPE (12,5, 25 et 50 $\mu\text{g} / \text{mL}$), au Resv (20 μM) ou à un solvant témoin (0,1% de DMSO) pendant 1 h. Ensuite, du DCF-DA (20 μM) a été ajouté à chaque puits et incubé pendant 25 min. Les cellules ont été ensuite lavées avec du PBS et incubées avec du H₂O₂ (100 μM) pendant 6 h. Le signal de fluorescence de chaque cellule a été mesuré à des longueurs d'onde d'excitation et d'émission de 495 nm et 529 nm, respectivement, en utilisant un lecteur de plaque SpectraMax M2 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

2.7 Mesure Des Espèces D'oxyde Nitrique Induites (NOS) De Lipopolysaccharide (LPS) Dans Des Cellules Murales De La Microglie BV-2

La production d'espèces d'oxyde nitrique total (NOS) a été déterminée à l'aide du réactif de Griess tel que rapporté précédemment par notre groupe [14 , 20]. Cellules BV-2 ont étéensemencées dans des plaques claires à 24 puits à 1×10^5 cellules / ml dans du milieu exempt de sérum. Les cellules ont été traitées avec du MPE (12,5, 25 et 50 $\mu\text{g} / \text{mL}$), du Resv (20 μM) ou un contrôle avec un solvant (0,1% de DMSO) pendant 1 h. Les cellules ont été exposées à un stress inflammatoire induit par un traitement au LPS (1 $\mu\text{g} / \text{mL}$) pendant 24 h. Ensuite, les milieux de culture de chaque puits ont été transférés sur une plaque à 96 puits et mesurés pour déterminer le NOS total à l'aide du kit de réactif de Griess (Promega, Fitchburg, WI, USA). Les valeurs d'absorbance ont été enregistrées en utilisant le lecteur de plaque SpectraMax M2 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) à 535 nm.

2.8. Essai de co-culture sans contact avec les cellules BV-2 et SH-SY5Y

Le test de co-culture sans contact a été réalisé selon les protocoles précédemment rapportés par notre groupe [22]. En bref, les cellules SH-SY5Y ont étéensemencées dans des plaques à 96 puits à fond transparent et à paroi blanche et laissées adhérer pendant 24 h. Les cellules BV-2 ont été étalées dans des plaques à 24 puits et traitées avec du MPE (12,5, 25 et 50 $\mu\text{g} / \text{mL}$), du Resv (20 μM) ou un contrôle avec solvant (0,1% de DMSO), suivi de LPS (1 $\mu\text{g} / \text{mL}$). traitement pendant 24 h. Les milieux de chaque traitement ont été recueillis et centrifugés à 15 000 tr / min pendant 10 min. Après centrifugation, le surnageant de cellules BV-2 a été utilisé pour traiter les cellules SH-SY5Y pendant 24 h. La viabilité cellulaire des cellules SH-SY5Y a été déterminée en utilisant le test CTG.

2.9 Neurotoxicité Dopaminergique Induite Par Le 1-méthyl-4-phénylpyridinium (MPP⁺) Chez *C. elegans*

Les espèces sauvages de *C. elegans* (N2) ont été maintenues sur des plaques de culture de milieu de croissance pour nématodes à 20 ° C et synchronisées selon l'âge, comme indiqué précédemment par notre groupe [22]. Ensuite, 40 μL de vers L1 synchronisés sur l'âge lavés dans S-complet ont été transférés dans une microplaque à 96 puits (environ 20 vers / puits) avec *Escherichia coli* OP50 (5 mg / mL), MPP⁺ (750 μM) et MPE (20 ou 40 $\mu\text{g} / \text{mL}$) jusqu'à un volume final de 50 μL . Le support S-complete a été utilisé pour les groupes de contrôle. Les vers vivants ont été comptés toutes les 12 h après le traitement jusqu'à ce qu'il ne reste plus de vers vivants.

2.10. *D. melanogaster* Souches et maintenance

Des mouches STR-5 de type sauvage ont été obtenues auprès du Bloomington Stock Center (Département de biologie, Université de l'Indiana, Bloomington, Indiana, États-Unis). Les souches ont été élevées sur du milieu de *drosophile* instantané Formula 4-24[®] (Carolina Biological Supply, Burlington, Caroline du Nord, États-Unis) et élevées sur Bloomington Formulation (Genesee Scientific, San Diego, Californie, États-Unis) à 25 ° C avec une humidité relative de 12%. -heure cycle lumière / obscurité [23]. Environ 40 à 50 couples reproducteurs ont été transférés dans des flacons et autorisés à pondre. Après neuf jours, des mouches mâles nouvellement écloses ont été collectées sur une période de trois jours et utilisées dans d'autres expériences.

2.11. Essai de géotaxe négative (ascension) chez *D. melanogaster*

Les mouches mâles de type sauvage nouvellement écloses (STR-5) ont été séparées au hasard en 10 groupes de 50 mouches chacune et transférées dans des flacons témoins (milieux uniquement) ou dans des flacons de traitement (milieux + 40 $\mu\text{g} / \text{mL}$ MPE). Pour induire une neurotoxicité, tous les quatre jours, des mouches étaient laissées dans des flacons vides pendant 24 h et transférées dans des flacons contenant un papier filtre saturé avec 1 ml de saccharose à 10% (blanc), de 6-OHDA (1 mM) ou de roténone (500 μM).). Au bout de 24 h, les mouches ont été transférées dans des flacons contenant une quantité fraîche de leur régime alimentaire respectif et utilisées pour le test d'escalade le jour 10 après l'éclosion. Les mouches des groupes de contrôle et de traitement ont ensuite été engagées dans le fond du cylindre gradué (diamètre: 2,7 cm, hauteur: 25 cm) superposées avec une règle et autorisées à grimper pendant 10 s. Les mouches ont été photographiées (Canon, Inc., Tokyo, Japon, JP, EOS 50D; Reflex numérique de 15,1 MP) à t_0 et t_{10} secondes pour calculer la distance de montée [24].

2.12. Analyses statistiques

Toutes les données sont présentées sous forme d'erreur moyenne \pm erreur type de trois échantillons biologiques distincts. Les analyses de données cellulaires ont été effectuées par analyse de variance (ANOVA) suivie du test de Dunnett permettant des comparaisons multiples des moyennes de groupe. La méthode de Kaplan – Meier a été utilisée pour comparer les courbes de survie de *C. elegans* et les différences de survie ont été testées pour déterminer leur signification statistique à l'aide du test log rank (Mantel Cox). Pour le test d'escalade de *D. melanogaster*, le test *t* de Welch a été utilisé pour comparer les différents groupes de traitement et générer des valeurs *p* (alpha = 0,05). L'importance comparée au groupe témoin est présentée sous la forme $p \leq 0,05$ (#), $p \leq 0,001$ (###) et $p \leq 0,0001$ (####). La signification de tous les tests comparés au traitement toxique a été définie comme suit: $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***) et $p \leq 0,0001$ (****). Le logiciel GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, Californie, États-Unis) a été utilisé pour calculer des statistiques à la fois pour les analyses in vitro et in vivo.

3. Résultats et discussion

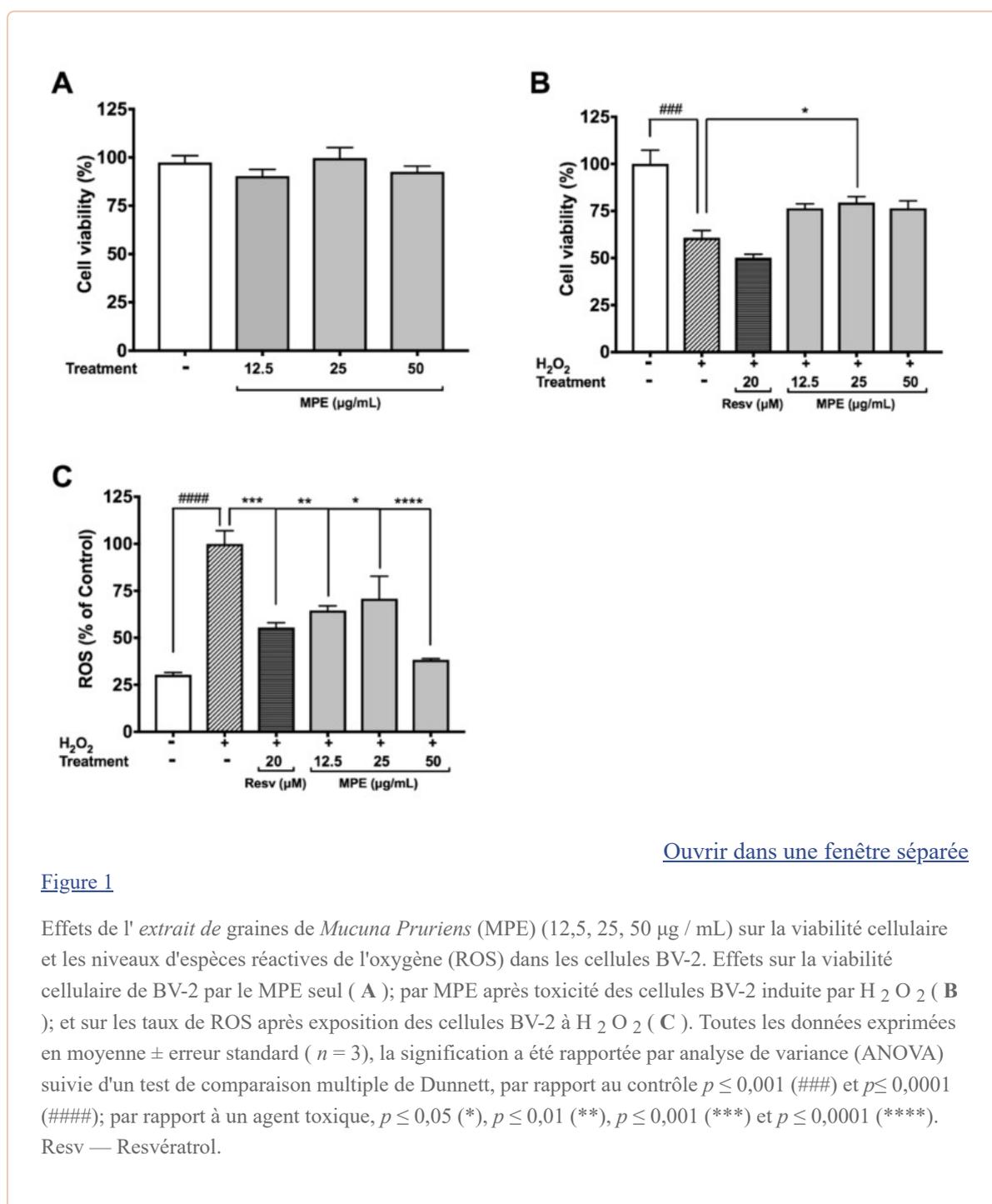
3.1. Préparation de l'extrait de *Mucuna pruriens* (MPE) à la lévodopa (L-Dopa) réduite

Mucuna pruriens est une plante médicinale connue pour contenir naturellement de la L-dopa (4–7%) [5], qui pourrait être attribuée à ses effets neuroprotecteurs contre la MP [6]. Cependant, la présence d'autres substances phytochimiques dans *M. pruriens*, notamment des polyphénols (tanins, flavonoïdes, acide gallique, acides phénoliques), des saponines, des terpénoïdes, des alcaloïdes et des acides gras, a été signalée avec diverses activités pharmacologiques (voir [Matériel supplémentaire; figure S2](#)). et [Tableau S1](#)) [6 , 25 , 26 , 27 , 28 , 29]. Des études récentes suggèrent également que des composés phytochimiques autres que la L-dopa pourraient également contribuer aux activités neuroprotectrices globales de *M. pruriens* [13 , 30]. Par conséquent, dans cette étude, nous avons préparé un extrait de graines de *M. pruriens* (MPE) contenant des taux réduits de L-dopa (<0,1%), qui a ensuite été évalué pour ses effets neuroprotecteurs à l'aide d'un panel d'essais in vitro et in vivo. Les graines de *M. pruriens* ont été extraites / un solvant / solvant partagé dans divers solvants pour obtenir des extraits dont le contenu en L-dopa a été évalué par spectrométrie de masse en tandem par ionisation par électrospray et par chromatographie en phase liquide (LC-ESI – MS / MS). Comme le montre le [tableau 1](#), les taux de L-dopa dans le méthanol initial L' extrait de graines de *M. pruriens* était à 28,0%, ce qui était significativement réduit à 0,03% dans l'acétate d'éthyle, extrait de *M. pruriens* (MPE). Même si ce faible niveau (0,03%) de L-dopa pouvait conférer des effets biologiques, nous avons évalué une solution de L-dopa pure (<0,1%) dans plusieurs des tests in vitro. Nos données préliminaires ont montré que le MPE, mais pas cette L-dopa pure, était actif dans ces analyses (données présentées dans [les figures supplémentaires du matériel S5 et S6](#)). Par conséquent, cet extrait de MPE a été sélectionné pour une évaluation plus approfondie de ses effets neuroprotecteurs dans un panel d'essais biologiques à base de cellules et in vivo, comme décrit ci-dessous.

3.2. MPE réduit la production de toxicité induite par le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans les cellules de la microglie BV-2

Les microglies sont les cellules immunitaires natives du système nerveux central (SNC) activées et proliférées pour réaliser une phagocytose, libérer des cytokines inflammatoires et produire des ROS et des espèces d'azote réactif (RNS) en réponse à une blessure et / ou une infection. L'inflammation non résolue et la production excessive d'oxydant par la microglie sont mortelles pour les cellules neuronales et non neuronales du SNC et ont été associées à la MP. Tous les extraits de *Mucuna*, y compris les extraits de méthanol brut, d'hexanes, d'acétate d'éthyle (MPE), de butanol et d'eau (à 25 $\mu\text{g} / \text{mL}$) ont été évalués pour leurs effets protecteurs contre la toxicité induite par H_2O_2 dans les cellules BV-2. Nos données ont montré que parmi les extraits, seul le MPE augmentait significativement la viabilité des cellules BV-2 exposées à l' H_2O_2 (voir [Matériel supplémentaire Figure S3A](#)). Nous avons donc évalué les effets du MPE sur le stress oxydatif induit par H_2O_2 dans les cellules BV-2 de la microglie. Le MPE (12,5, 25 et 50 $\mu\text{g} / \text{mL}$) était non toxique pour les cellules BV-2 avec une viabilité cellulaire supérieure à 90,3% à 24 h ([Figure 1 A](#)). Comme le montre la [figure 1 B](#), la viabilité cellulaire des

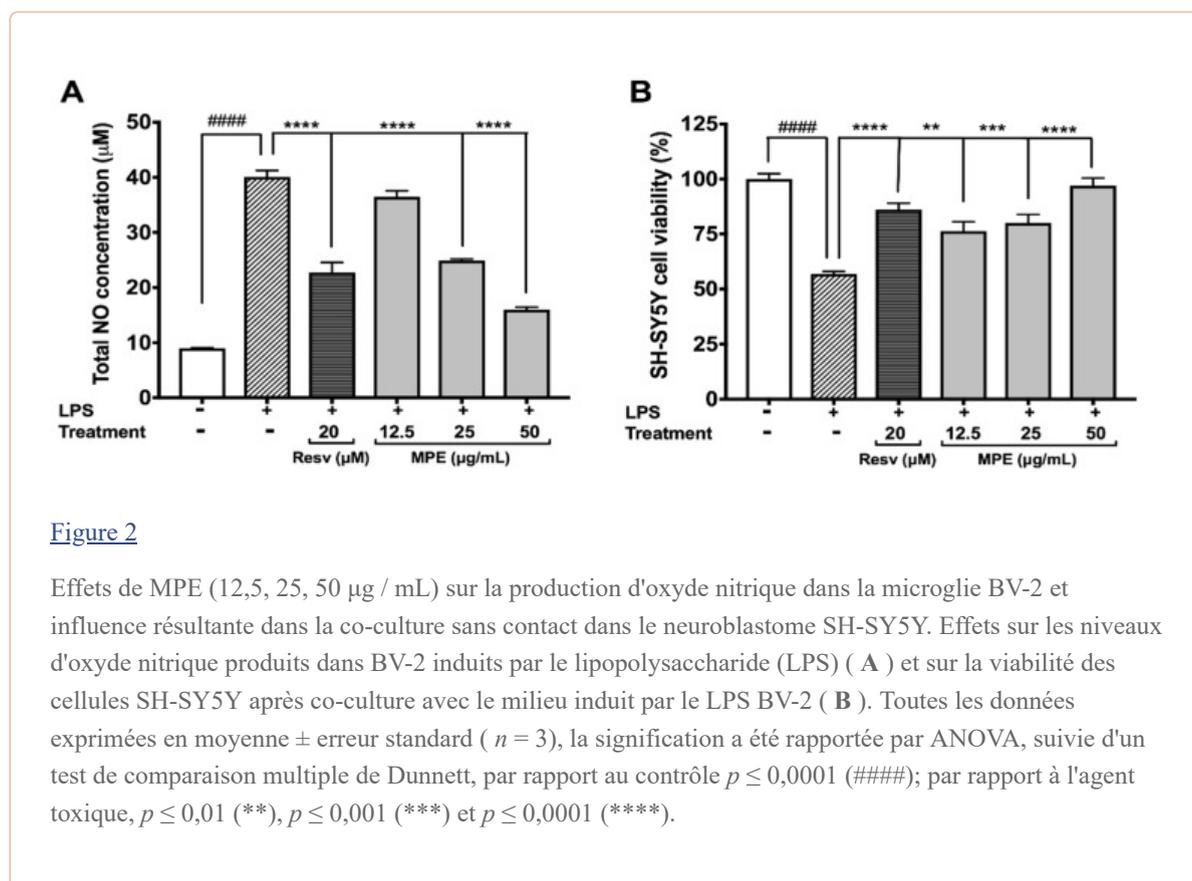
cellules BV-2 traitées avec H_2O_2 a diminué de 39,2% par rapport au groupe témoin. Bien que les MPE, aux concentrations de 12,5, 25 et 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, aient montré une tendance à l'amélioration de la concentration de H_2O_2 cytotoxicité induite dans les cellules BV-2, seul le MPE à une concentration de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a augmenté de 18,6% la viabilité cellulaire des cellules BV-2 traitées à l' H_2O_2 . Les effets protecteurs du MPE contre la production de ROS par H_2O_2 dans des cellules BV-2 ont ensuite été évalués. Comme le montre la [figure 1 C](#), la production de ROS dans les cellules BV-2 traitées avec H_2O_2 était augmentée de 3,29 fois par rapport aux cellules témoins. Les MPE (12,5, 25 et 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ont réduit la production de ROS induite par H_2O_2 de 35,5, 29,1 et 61,6%, respectivement, par rapport à H_2O_2 traitées avec des cellules BV-2. Le resvératrol (Resv; 20 μM), utilisé comme contrôle positif, a réduit de 44,52% la production de ROS induite par H_2O_2 . Ces résultats sont en accord avec notre observation précédente, dans laquelle un extrait d'eau de *M. pruriens* augmentait les viabilités de la microglie murine BV-2 et de cellules neuronales SH-SY5Y humaines différenciées exposées à H_2O_2 [14]. En outre, des études menées par d'autres groupes de recherche ont également révélé que la poudre de graines de *Mucuna* (300 mg / kg / PC dans l'alimentation) réduisait le stress oxydatif dans les spermatozoïdes des rongeurs [31].



[Ouvrir dans une fenêtre séparée](#)

3.3. MPE réduit la production d'espèces d'oxyde nitrique induit par les lipopolysaccharides (LPS) dans des cellules de microglie BV-2 et protège les cellules SH-SY5Y dans un modèle de co-culture

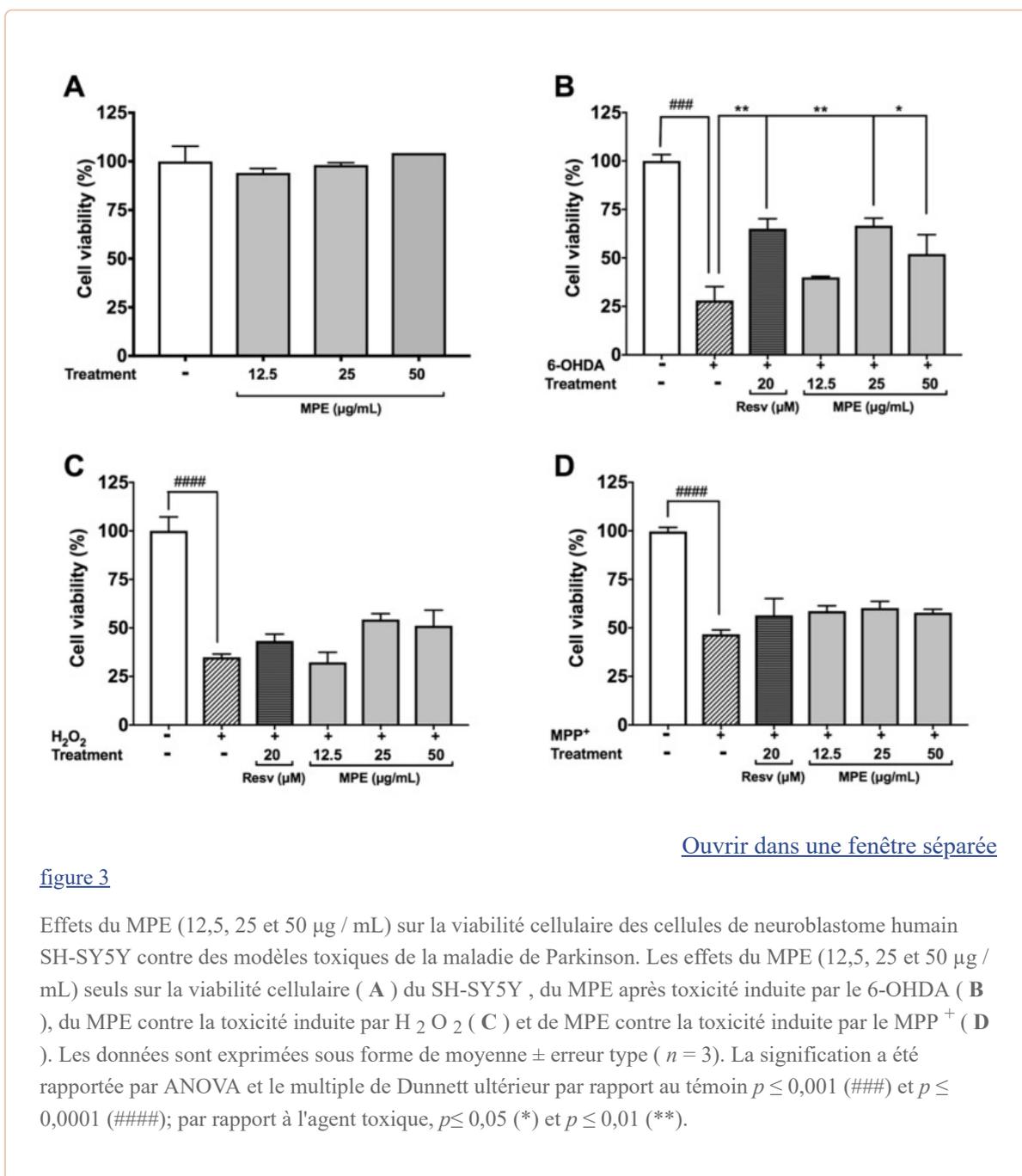
La production élevée de NOS entraînant une mort neuronale massive a été impliquée dans la MP [32]. Tous les extraits de *Mucuna* susmentionnés (à 25 µg / mL) ont été évalués pour leurs effets protecteurs contre la production de NO induite par le LPS dans les cellules BV-2. Parmi les extraits, le MPE a montré la plus grande capacité à réduire la production de NO dans les cellules BV-2 exposées au LPS (voir [Matériel supplémentaire, Figure S3B](#)). Par conséquent, MPE a été évalué pour ses effets protecteurs contre la neuroinflammation induite par le LPS dans les cellules BV-2 et dans un modèle de co-culture sans contact avec des cellules de neuroblastome SH-SY5Y [22]. Comme le montre la [figure 2A](#), LPS a augmenté la production de NOS dans les cellules BV-2 de 4,46 fois par rapport au groupe témoin (témoin: 8,987 µM vs LPS 40,06 µM). Les MPE (12,5, 25 et 50 µg / mL) ont réduit la production de NOS dans les cellules BV-2 stimulées par les LPS de 8,9, 37,8 et 60,1%, respectivement, par rapport aux cellules traitées avec du LPS seul. Resv (contrôle positif; 20 µM), a également réduit la production de NOS de 43,2% dans les cellules BV-2 traitées au LPS et était similaire à notre observation précédente [22]. Dans le modèle de co-culture sans contact ([Figure 2B](#)), le milieu conditionné recueilli à partir de cellules BV-2 traitées avec du LPS seul a réduit de 43,1% la viabilité cellulaire des cellules SH-SY5Y. Le milieu conditionné issu du traitement du LPS et de l'EMP (12,5, 25 et 50 µg / mL) augmentait de manière significative la viabilité cellulaire des cellules SH-SY5Y de 19,4, 23,2% et 40,1%, respectivement, par rapport aux cellules traitées avec le milieu de Cellules BV-2 traitées au LPS. Le contrôle positif, Resv (20 µM), a également augmenté de 29,3% la viabilité cellulaire des cellules SH-SY5Y. Nos résultats corroborent d'autres études sur *Mucuna* faisant état d'une réduction des niveaux de nitrites induite par la 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine (MPTP) dans la région nigrostriatale du cerveau de souris parkinsoniennes [33].



3.4. MPE Réduit La Cytotoxicité Induite Par Le Stress Oxydatif Dans Les Cellules SH-SY5Y

Plusieurs neurotoxines, dont la 6-OHDA et la MPP, induisent une cytotoxicité oxydative dans les neurones dopaminergiques par de multiples mécanismes et sont donc utilisées pour modéliser la MP [2 , 34 , 35]. Les effets protecteurs du MPE ont été évalués dans des cellules de neuroblastome SH-SY5Y contre la neurotoxicité induite par le stress oxydatif. Les MPE (12,5, 25 et 50 µg / mL) n'ont pas induit

de cytotoxicité des cellules SH-SY5Y après 24 h d'incubation (viabilité > 90%) dans le dosage CTG ([Figure 3 A](#)). La toxicité a été induite dans le neuroblastome SH-SY5Y par traitement par 6-OHDA, H₂O₂ et MPP⁺ (25 μM, 100 μM et 2 mM, respectivement). Le traitement à base de 6-OHDA a réduit de 71,9% la viabilité des cellules SH-SY5Y par rapport au groupe témoin, tandis que la MPE (12,5, 25 et 50 μg / mL) a réduit la mort cellulaire induite par la 6-OHDA en augmentant la viabilité cellulaire par rapport au groupe traité par 6-OHDA de 11,9%, 38,5% et 23,9%, respectivement ([Figure 3 B](#)). Le traitement par H₂O₂ a réduit la viabilité des cellules SH-SY5Y de 65,1% par rapport au contrôle, tandis que le MPE (à des concentrations plus élevées de 25 et 50 μg / mL) a montré des effets protecteurs modérés en augmentant la viabilité cellulaire de SH-SY5Y par rapport à la viabilité cellulaire de le groupe traité avec H₂O₂ de 19,5% et 16,3%, respectivement ([Figure 3 C](#)). Député⁺ le traitement a réduit de manière significative la viabilité des cellules SH-SY5Y de 46,7% par rapport au contrôle ([Figure 3 D](#)); Cependant, MPE n'a montré aucun effet protecteur. Nos résultats obtenus à partir de ces modèles de PD cellulaires sont en accord avec les effets neuroprotecteurs de *Mucuna* précédemment rapportés dans des modèles animaux de PD induits par des neurotoxines. Par exemple, le traitement par *Mucuna a* réduit l'appauvrissement en L-dopa induite par la 6-OHDA dans le tractus nigrostriatal de rats présentant des symptômes de MP [[10](#) , [33](#)].



[Ouvrir dans une fenêtre séparée](#)

[figure 3](#)

Effets du MPE (12,5, 25 et 50 μg / mL) sur la viabilité cellulaire des cellules de neuroblastome humain SH-SY5Y contre des modèles toxiques de la maladie de Parkinson. Les effets du MPE (12,5, 25 et 50 μg / mL) seuls sur la viabilité cellulaire ([A](#)) du SH-SY5Y , du MPE après toxicité induite par la 6-OHDA ([B](#)), du MPE contre la toxicité induite par H₂O₂ ([C](#)) et de MPE contre la toxicité induite par le MPP⁺ ([D](#)). Les données sont exprimées sous forme de moyenne ± erreur type (n = 3). La signification a été rapportée par ANOVA et le multiple de Dunnett ultérieur par rapport au témoin p ≤ 0,001 (###) et p ≤ 0,0001 (####); par rapport à l'agent toxique, p ≤ 0,05 (*) et p ≤ 0,01 (**).

3.5. MPE Réduit La Létalité De La Neurotoxicité Dopaminergique Induite Par MPP⁺ Chez *C. elegans*

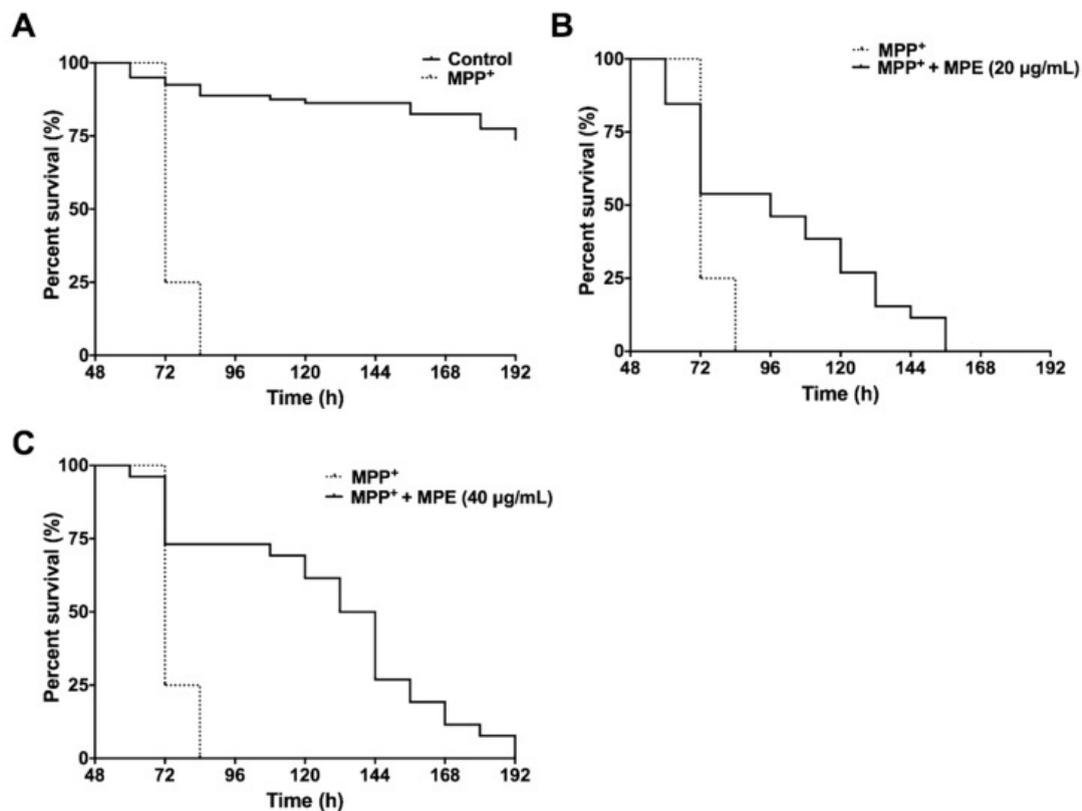
La neurotoxine, la MPTP, est métabolisée en MPP⁺ par la monoamine oxydase-B et est ensuite absorbée par les neurones dopaminergiques, où elle inhibe le complexe mitochondrial I, entraînant une déplétion de l'ATP pour provoquer la mort neuronale [35]. Par conséquent, nous avons évalué les effets du MPE contre la neurotoxicité dopaminergique MPP⁺ chez *C. elegans* de type sauvage . Les effets de la MPE sur la paralysie neurotoxique induite par le MPP⁺ et la létalité sur *C. elegans* ont été évalués à des concentrations de 20 et 40 µg / mL (IC₁₀ = 42,1 µg / mL). La survie médiane et maximale des vers après une exposition à 750 µM de MPP⁺ était de 72 h ([tableau 2](#)).

Tableau 2

Survie (médiane et maximale) de *C. elegans* (N2) par rapport au traitement au 1-méthyl-4-phénylpyridinium (MPP⁺) (750 µM). Le traitement MPE à 20 et 40 µg / mL a significativement augmenté la survie, comme le montre le test du log rank (Mantel Cox), $n > 100$, $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,001$ (***) .

Survie (h)	MPP ⁺	MPP ⁺ + MPE (20 µg / mL)	MPP ⁺ + MPE (40 µg / mL)
Médian	72	96 *	138 ***
Maximum	72	132 *	162 ***

Le traitement de MPP⁺ a significativement réduit la survie médiane et maximale de 3,2 fois (72 h) et de 3,5 fois (72 h), respectivement, par rapport aux vers du groupe témoin ([Figure 4A](#)). L'EMP à 20 µg / mL a augmenté de manière significative ($p < 0,001$) la survie médiane et maximale de 1,3 fois (96 heures) et de 1,9 fois (138 heures), respectivement, par rapport aux vers traités avec MPP⁺ seul ([Figure 4 B](#)). Le MPE à 40 µg / mL a augmenté significativement la survie moyenne et maximale chez *C. elegans* de 1,8 fois (132 h) et 2,25 fois (162 h) respectivement, par rapport aux vers traités avec MPP⁺ seul ([Figure 4 C](#) et [Tableau 2](#)).



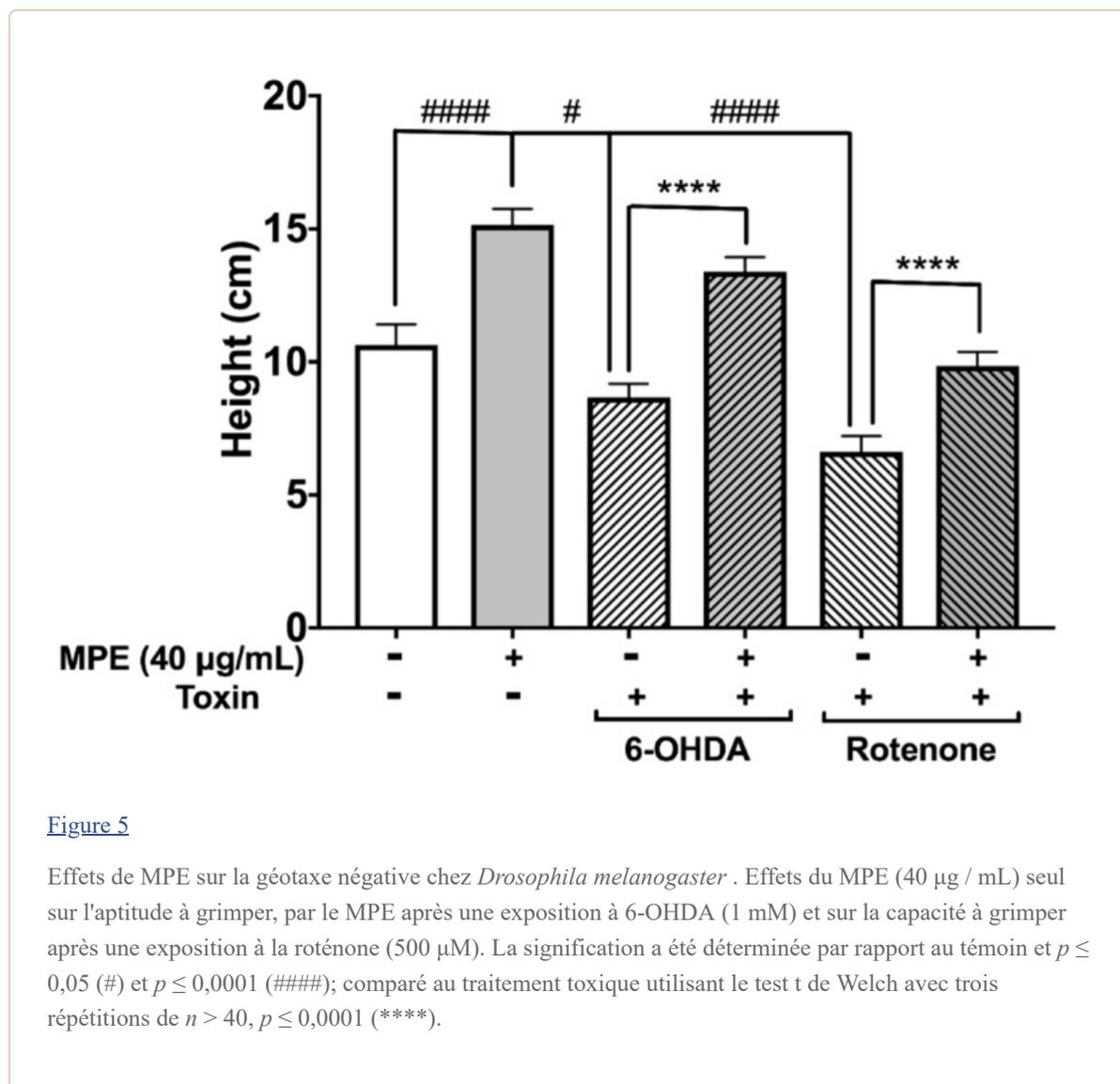
[Figure 4](#)

Effets des MPE (20 et 40 μg / mL) sur la durée de vie de *C. elegans* après exposition au MPP⁺. Le MPP⁺ à une concentration de 750 μM réduit la durée de vie de *C. elegans* par rapport au groupe témoin (**A**). Les MPE à des concentrations de 20 μg / mL (**B**) et de 40 μg / mL (**C**) augmentent la durée de vie de *C. elegans* par rapport à une exposition toxique au MPP⁺ (750 μM). Les courbes de survie de *C. elegans* ont été analysées statistiquement par un test de log rank (Mantel Cox), par rapport au traitement MPP⁺ ($n > 100$).

3.6. MPE abroge la neurotoxicité induite chimiquement chez *D. melanogaster*

Les modifications de plusieurs phénotypes comportementaux de *D. melanogaster* en réponse à une neurotoxicité induite génétiquement ou chimiquement ont été largement exploitées pour évaluer les effets neuroprotecteurs potentiels des agents thérapeutiques [36]. Comme le MPE était significativement plus neuroprotecteur à 40 μg / mL pour réduire la neurotoxicité dopaminergique induite par le MPP⁺ chez *C. elegans* ([Figure 4](#)), nous avons utilisé ce dosage pour déterminer son effet sur le comportement en escalade (géotaxie négative) dans le modèle PD induit par la neurotoxine de *D. melanogaster*. Les deux neurotoxines (6-OHDA et roténone) utilisées dans notre étude induisent un phénotype de type PD chez *D. melanogaster* caractérisé par plusieurs changements comportementaux, y compris une réponse innée négative de la géotaxie négative due à des défauts locomoteurs. Les toxines susmentionnées endommagent généralement les neurones dopaminergiques et provoquent des défauts de comportement, y compris l'escalade, qui peuvent être mesurés par un test de géotaxie négatif. Semblable au MPP⁺, la roténone est un autre inhibiteur du complexe I mitochondrial qui provoque une altération de l'ATP et la production de ROS, et induit la mort neuronale [35]. Dans notre étude, *D. melanogaster* a été exposé à la 6-OHDA et à la roténone pour induire un phénotype semblable à la PD. Après 10 jours, les mouches exposées aux neurotoxines ont montré une capacité d'escalade très atténuée par rapport au groupe témoin. Cette perte de capacité de géotaxie négative a été significativement améliorée lorsque les mouches ont été prétraitées au MPE.

La distance médiane d'escalade des mouches traitées à la 6-OHDA et des mouches traitées à la roténone était de 18,6% (8,7 cm; $p \leq 0,05$) et de 37,8% (6,2 cm, $p \leq 0,001$) inférieure à celle des mouches témoins (10,95 cm), respectivement ([Figure 5](#)). Le traitement du MPE seul a augmenté de manière significative la distance de montée des mouches de 42,5% (15,9 cm) par rapport au groupe témoin ([Figure 5](#)). Le prétraitement au MPE a annulé l'effet des neurotoxines sur le comportement d'escalade. Chez les mouches traitées avec MPE + 6-OHDA, la distance médiane d'escalade était 54,5% (13,95 cm) plus élevée que celle des mouches traitées uniquement avec de la 6-OHDA ([Figure 5](#)). Dans les glossines traitées au MPE + à la roténone, ce taux était de 48,7% (9,9 cm) plus élevé que chez les glossines exposées à la roténone uniquement sans aucun prétraitement du MPE ([Figure 5](#)). Nos résultats sur les effets neuroprotecteurs du MPE sur des modèles de PD induits par des neurotoxines utilisant *C. elegans* et *D. melanogaster* corroborent des études antérieures sur *Mucuna* dans des modèles de PD pour rongeurs utilisant MPTP [33] et 6-OHDA [25] et fournissent de nouvelles preuves sur les neuroprotecteurs. effets des bioactifs non-L-dopa dans les MPE.



4. Conclusions

En résumé, nous avons développé un extrait de *Mucuna pruriens* réduit (MPE) et évalué ses effets neuroprotecteurs dans les cellules murines de la microglie BV-2 et du neuroblastome SH-SY5Y. Le traitement MPE diminue la cytotoxicité de BV-2 et SH-SY5Y induite par le stress oxydatif et l'inflammation. En outre, la MPE a amélioré la létalité induite par la neurotoxine dopaminergique chez SH-SY5Y (6-OHDA), *C. elegans*, et a retrouvé la capacité d'escalade des modèles *D. melanogaster* pour la MP. En prenant ensemble les données des expériences in vitro et in vivo, le MPE a montré des

effets neuroprotecteurs dans nos modèles de PD. Les études sur les effets anti-PD de composés purifiés isolés à partir de MPE et leurs mécanismes d'action potentiels seront poursuivies par notre groupe à l'avenir.

Remerciements

SLJ a été soutenu par une bourse de l'Institut de neuroscience George et Anne Ryan. Les graines de *Mucuna pruriens* ont été généreusement fournies par Verdure Sciences (Noblesville, IN, USA). Les données spectroscopiques ont été obtenues à partir d'instruments situés dans les installations de base du réseau IDEA du Rhode Island et bénéficiant de la subvention n° P20GM103430 de l'Institut national des sciences de la médecine générale des instituts nationaux de la santé.

Matériel supplémentaire

Les éléments suivants sont disponibles en ligne à l'adresse <http://www.mdpi.com/2072-6643/10/9/1139/s1>, Figure S1: spectres LC-ESI-MS / MS pour la quantification de la L-dopa dans des extraits de *Mucuna pruriens*, Figure S2: Chromatogrammes HPLC-DAD d'extraits de *Mucuna pruriens*, Figure S3: Effets des extraits de *Mucuna pruriens* sur la viabilité cellulaire et la production de NO induite par le LPS dans la microglie murine BV-2, Figure S4: Morphologie de la microglie murine BV-2 traitée avec H₂O₂ + MPE, H₂O₂ + 0,07% de L-dopa, LPS + MPE et LPS + 0,07% de L-dopa, Figure S5: Effets du MPE et de 0,07% de L-dopa sur la toxicité induite par H₂O₂ dans la microglie murine de BV-2, Figure S6 : Effets du MPE et de la L-dopa à 0,07% sur la production de NO induite par le LPS dans la microglie murine BV-2, Tableau S1: Composants chimiques de *Mucuna pruriens*.

[Cliquez ici pour un fichier de données supplémentaire.](#) (2.8M, pdf)

Contributions d'auteur

HM, NPS et DAV ont conçu et conçu les expériences; SLJ, HYP et NAD ont réalisé les expériences; SLJ, HYP, HM, DAV et NPS ont analysé les données. DAV et NPS ont fourni des réactifs et du matériel; SLJ, HM, HYP, DAV et NPS ont rédigé le document. Tous les auteurs ont lu et approuvé le manuscrit final.

Le financement

Cette recherche n'a reçu aucun financement externe.

Les conflits d'intérêts

Les auteurs ne déclarent aucun conflit d'intérêt.

Références

1. Abushouk AI, Negida A., Ahmed H., Abdel-Daim MM Mécanismes neuroprotecteurs des extraits de plantes contre la neurotoxicité induite par la MPTP: applications futures dans la maladie de Parkinson. *Biomed. Pharmacother.* 2017; 85 : 635–645. doi: 10.1016 / j.biopha.2016.11.074. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)]
2. Dexter DT, Jenner P. Parkinson: de la pathologie aux mécanismes de maladies moléculaires. *Radic gratuit. Biol. Med.* 2013; 62 : 132-144. doi: 10.1016 / j.freeradbiomed.2013.01.018. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)]
3. Kim SW, Ko HS, Dawson VL, Dawson TM, progrès récents dans notre compréhension de la maladie de Parkinson. *Drug Discov. Aujourd'hui Dis. Mech.* 2005; 2 : 427–433. doi: 10.1016 / j.ddmec.2005.11.015. [[CrossRef](#)]