

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA - Bejaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie physico-chimique



Réf :

Mémoire

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE MASTER

Spécialité : Biochimie Fondamentale

Thème

**Effets des additifs alimentaires sur les cellules β
pancréatiques**

Présenté par : BOUREGAA AHMED

Soutenu le : 04 juillet 2024

Devant le jury composé de :

Dr. AMIROUCHE A.

Pr. KHETTAL B.

Pr. SOBHI W.

Dr. GHIDOUCHE A.

Président

Promotrice

Co-Promotrice

Examineur

Année universitaire : 2023 / 2024

Remerciements

Tout d'abord, Je tiens à exprimer ma profonde gratitude aux membres du jury de ma thèse Dr AMIROUCHE A et Dr GUIDOUCHE A.

Je remercie Dr AMIROUCHE A., Président du jury, pour avoir dirigé les délibérations et pour ses précieux conseils tout au long de ce processus.

Je remercie Dr GUIDOUCHE A., pour sa lecture attentive de mon mémoire de master, ses remarques pertinentes et ses suggestions constructives qui permettront d'améliorer la qualité de ce travail.

Je suis très reconnaissant au Pr. KHETTAL B., ma promotrice, pour son encadrement, ses encouragements et ses orientations précieuses qui ont grandement contribué à la réalisation de ce travail.

Je tiens également à exprimer ma profonde reconnaissance au Pr. SOBHI W., ma Co-promotrice, qui m'a reçu à l'unité de culture cellulaire au niveau du CRBT de Constantine où j'ai réalisé mon stage de master et pour son encadrement et ses conseils avisés.

Tous mes remerciements à toute personne qui a contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail, particulièrement les doctorantes : Anfal, Rachda et Fatima-Zahra.

Dédicaces

Je dédie ce mémoire à mes parents, pour leur amour inconditionnel, leur soutien moral et financier, et leur croyance en moi. Votre encouragement constant m'ont permis de surmonter les moments les plus difficiles.

Ce mémoire est dédié avec tous mon amour et ma gratitude éternelle à toi, ma bien-aimée grand-mère « *Ma Saliha* », pour ton amour inconditionnel, ta sagesse infinie, et tes encouragements constants. Ta présence chaleureuse et ton soutien indéfectible m'ont toujours inspiré et motivé à poursuivre mes rêves.

À ma sœur, pour sa patience, sa compréhension et son soutien tout au long de ce parcours académique.

À mes tantes, mes oncles, mes petits cousins et cousines.

À mes amis et collègues, pour leur camaraderie et leurs encouragements. Votre présence a rendu cette expérience mémorable et enrichissante.

Enfin, à tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à l'accomplissement de ce mémoire, je vous exprime ma profonde gratitude

Ahmed

Liste des abréviations

| | |
|---------------|--|
| HLA | Human leukocyte antigens |
| AAI | Anticorps anti-insuline |
| GAD | Anti- glutamate décarboxylase |
| IA2 | anti-tyrosine phosphatase |
| HPO | Human Phenotype Ontology |
| CMH | Complexe d'histocompatibilité majeur |
| DPP4 | Les inhibiteurs de la dipeptidyl peptidase-4 |
| GLP-1 | Glucagon-like peptide-1 |
| iSGLT2 | Inhibiteurs des cotransporteurs sodium-glucose de type 2 |
| AGI | Inhibiteurs de Alpha-glucosidase |
| ATP | Adénosine triphosphate |
| GIP | Polypeptide insulino-trope dépendant du glucose |
| AGIs | Inhibiteurs de l'alpha-glucosidase intestinale |
| SGLT2 | Cotransporteurs sodium-glucose de type 2 |
| GABA | Gamma-aminobutyric acid |
| CRH | Corticotropine releasing hormone |
| GLUT | Glucose transporters |
| ADP | Adenosine Diphosphate |
| IAPP | Islet Amyloid Polypeptide |
| GHIH | Growth hormone inhibitory hormone |
| SRIF | Somatotropin release-inhibiting factor |
| SNC | Système nerveux central |
| SST | Somatotrophin-release inhibiting hormone |
| PPYR1 | Pancreatic polypeptide receptor 1 |
| ROS | Reactive oxygen species |
| STZ | Streptozotocine |
| ADN | Acide désoxyribonucléique |
| AMP | Adenosine monophosphate |
| ARNm | Acide Ribonucléique messenger |
| BPA | Bisphénol A |
| AhR | Hydrocarbures aromatic receptors |
| HBSS | Hank's Balanced Salt Solution |
| ELISA | The enzyme-linked immunosorbent assay |
| DCFDA | Dichlorodihydrofluorescein diacetate |
| IL-1 β | Interleukin-1 beta |
| IL-6 | interleukine 6 |
| TNF- α | Tumor necrosis factor α |
| LDH | Lactate dehydrogenase |
| P53 | Protein 53 |
| LC3 | Light chain 3 |
| Atg 5 | Autophagy protein 5 |

Liste des figures

| N° | Titre de la figure | Pg. |
|----|--|-----|
| 1 | Illustration de la physiopathologie complexe du diabète de type 2 | 04 |
| 2 | Les antidiabétiques oraux et leurs sites d'action. | 07 |
| 3 | Le pancréas organe du système digestif | 09 |
| 4 | Structure d'un îlot de Langerhans | 11 |
| 5 | Schéma de l'îlot pancréatique et ses différents types de cellules. | 12 |
| 6 | Réponses métabolique, électrique et sécrétoire d'une cellule β stimulée par le Glucose et influence des couplages entre les cellules β | 13 |
| 7 | Structure de l'alloxane | 16 |
| 8 | Formation des ROS via le cycle redox de l'alloxane | 17 |
| 9 | Structure de la streptozotocine | 18 |
| 10 | Structure du bisphénol | 20 |
| 11 | Mécanismes d'induction du stress oxydant par les pesticides | 21 |
| 12 | La formule structurale du propionate de sodium | 21 |
| 13 | Structure chimique de nitrite de sodium | 22 |
| 14 | Conditions d'hébergement des souris utilisées dans l'expérimentation | 24 |
| 15 | Ablation du pancréas de souris | 25 |
| 16 | Ilots récoltés dans une autre boîte de Pétri contenant du HBSS (1X) | 26 |
| 17 | Mécanisme de la sonde H2DCFDA des ROS | 31 |
| 18 | Observation au microscope à phase inversée des ilots de Langerhans isolés (G x10) | 32 |
| 19 | Histogramme représentant les taux de viabilité des cellules des ilots de Langerhans traitées au propionate de sodium, nitrite de sodium et STZ. | 33 |
| 20 | Voies potentielles impliquées dans le mécanisme de cytotoxicité des substances diabétogènes comme le bisphénol | 35 |
| 21 | Les taux de viabilité des cellules NIT-1 traitées | 36 |
| 22 | Les taux de ROS produite par les cellules NIT-1 traitées | 39 |
| 23 | Les taux d'insuline produite par les cellules NIT-1 traitées | 41 |

Introduction

Les maladies métaboliques, telles que le diabète, représentent un défi de santé publique majeur dans le monde entier. Le diabète, en particulier, est une maladie chronique qui affecte la manière dont le corps utilise le glucose, entraînant des niveaux de sucre dans le sang anormalement élevé. Bien que les facteurs génétiques jouent un rôle crucial dans le développement du diabète, des preuves croissantes suggèrent que des facteurs environnementaux et alimentaires, y compris les additifs alimentaires, peuvent également influencer la survenue de cette maladie. (**Simon, 2016**)

Les additifs alimentaires sont largement utilisés dans l'industrie alimentaire pour améliorer la conservation, l'apparence, le goût et la texture des aliments. (**World Health Organization, 2024**). Cependant, certaines études ont montré que certains de ces additifs peuvent avoir des effets néfastes sur la santé métabolique. Parmi ces additifs, le propionate de sodium et les nitrites ont été identifiés comme pouvant induire des effets diabétogènes. (**Adler et al., 2021**)

Le propionate de sodium, utilisé comme conservateur dans divers produits alimentaires, peut augmenter les niveaux de glucagon, de norépinéphrine et de la protéine FABP4, perturbant ainsi le métabolisme du glucose et induisant une hyperglycémie et une résistance à l'insuline, caractéristiques du diabète. (**Tirosh et al., 2019**) Les nitrites, utilisés dans la conservation des viandes transformées, peuvent augmenter la production d'espèces réactives de l'oxygène, causant un stress oxydatif qui endommage les cellules bêta du pancréas, réduisant leur capacité à produire de l'insuline (**Valko et al., 2006**) Ils peuvent également provoquer des inflammations chroniques et perturber la signalisation de l'insuline, aggravant ainsi la régulation de la glycémie

L'objectif principal de ce travail pratique est d'examiner l'impact de ces deux additifs alimentaires sur l'induction du diabète. Plus précisément, nous visons à déterminer si ces additifs peuvent provoquer le diabète par des effets cytotoxiques entraînant la destruction apoptotique des cellules bêta pancréatiques, ou par une altération de la fonction cellulaire, perturbant ainsi la production et/ou l'action de l'insuline, ce qui conduit à une hyperglycémie persistante, caractéristique du diabète

Pour ce faire, nous utiliserons un modèle cellulaire de cellule bêta pancréatiques, les cellules de la lignée NIT-1 pour évaluer les effets cytotoxiques de ces additifs, leur effet sur la production de l'insuline ainsi que leurs potentiels à induire un stress oxydant au niveau de ces cellules.

Introduction

Ce travail est structuré en plusieurs sections. La première partie présente une revue de la littérature sur le diabète, les ilots de Langerhans et les substances diabétogènes. La deuxième partie décrit la méthodologie employée pour mener les expériences. La troisième partie discute des résultats obtenus et de leur interprétation. Enfin, la conclusion résume les principales découvertes et suggère des directions pour des travaux futures.

En explorant ces questions, nous espérons contribuer à une meilleure compréhension des risques associés à la consommation de certains additifs alimentaires et à la prévention du diabète, en fournissant des données scientifiques solides qui pourraient informer les politiques de santé publique et les recommandations nutritionnelles.

I. REVUE
BIBLIOGRAPHIQUE

I. Revue bibliographique

I.1. Le diabète : généralités et approches thérapeutiques

I.1.1. Définition

Le diabète est une maladie chronique caractérisée par une élévation persistante du taux de glucose (sucre) dans le sang, due à une production insuffisante d'insuline par le pancréas, une résistance à l'action de l'insuline, ou les deux. L'insuline est une hormone essentielle qui permet aux cellules de l'organisme d'absorber le glucose du sang pour l'utiliser comme source d'énergie. Le diabète perturbe le métabolisme des glucides, des protéines et des lipides, et peut entraîner, à long terme, des complications graves affectant divers systèmes corporels, notamment les systèmes vasculaire et neurologique. (**American Diabetes Association. 2021**).

I.1.2. Principaux types de diabètes

Il existe plusieurs types de diabète : le diabète dit « de type 1 », dû à une absence de sécrétion d'insuline par le pancréas et le diabète dit « de type 2 », dû à une mauvaise utilisation de l'insuline par les cellules de l'organisme, le diabète gestationnel et le diabète secondaire. Les causes, les mécanismes et le traitement diffèrent selon la forme de diabète (**American Diabètes Association. 2021**).

I.1.2.1. Diabète de type 1

Le diabète de type 1 est, typiquement, une maladie auto-immune qui aboutit à la destruction sélective des cellules β des îlots de Langerhans du pancréas. Il atteint surtout les sujets jeunes puisque la moitié environ des personnes atteintes ont développé la maladie avant l'âge de 20 ans et l'immense majorité avant l'âge de 40 ans. Il existe un terrain génétique de prédisposition lié au complexe HLA considéré comme responsable d'environ 50 % de la susceptibilité génétique. Ainsi, il existe des haplotypes aggravant le risque de diabète de type 1 (DQA1*0301-DQB1*302 et DQA1*0501-DQB1*0201) et d'autres haplotypes protecteurs contre la maladie (DQA1*0102- DQB1*0602). (**Kukreja & Maclaren, 1999**).

L'origine auto-immune est démontrée par la présence caractéristique d'anticorps circulants contre différents antigènes de la cellule β . Ainsi, il existe des anticorps anti-insuline (AAI), anti-glutamate décarboxylase (GAD) et anti-tyrosine phosphatase (IA2). (**Pihoker et al., 2005**). La destruction des cellules β résulte de l'intervention de lymphocytes activés libérant diverses cytokines cytotoxiques (**Bonnotte, 2004**). 80 % des cellules β sont déjà détruites lorsque l'hyperglycémie devient symptomatique et conduit au diagnostic de diabète dit inaugural. Les cellules β résiduelles vont disparaître complètement, un à deux ans suivant le diagnostic, ce qui

I. Revue bibliographique

pourra être vérifié sur le plan biologique par un taux de peptide-C (normalement secrété de façon équimolaire avec l'insuline) indétectable. (Eisenbarth, 2012).

I.1.2.2. Diabète de type 2

Le diabète de type 2 a une prévalence dix fois plus forte que celle du diabète de type 1. Il s'agit d'une maladie dont l'étiopathogénie et la physiopathologie sont complexes (Fig. 1). Il survient incontestablement sur un terrain génétique de prédisposition et est favorisé par un style de vie inapproprié, avec alimentation trop riche et trop grasse et sédentarité excessive. Il existe une relation extrêmement forte entre l'obésité, particulièrement à distribution abdominale, et le diabète de type 2. (Golay & Ybarra, 2005)

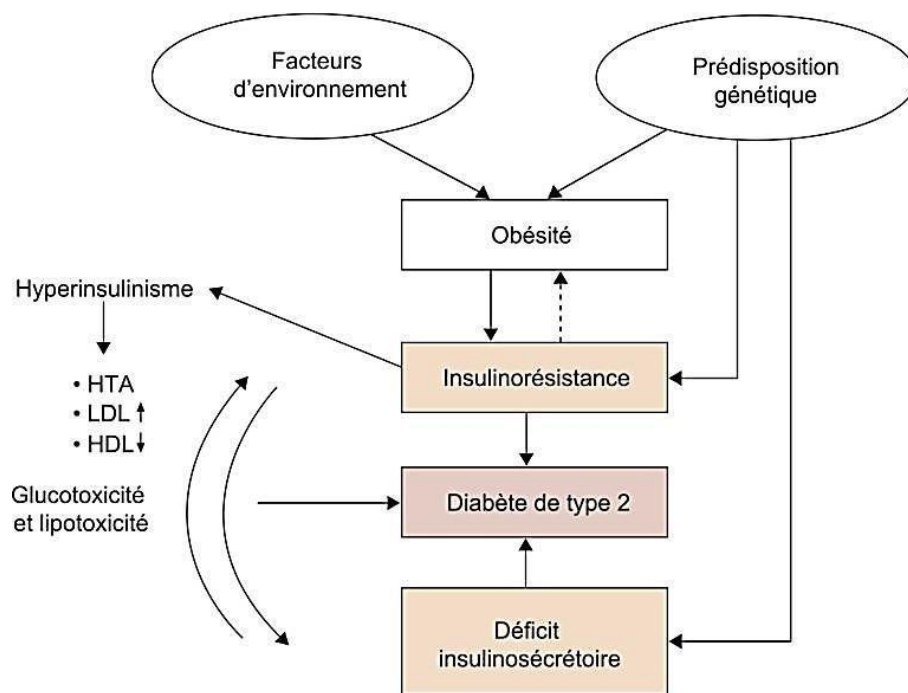


Figure 1 : Illustration de la physiopathologie complexe du diabète de type 2 (Rorive et al., 2005)

Le diabète de type 2 est une maladie bipolaire, avec une combinaison de deux anomalies : d'une part, un déficit relatif de l'insulinosécrétion, d'autre part, une insulinorésistance des différents organes périphériques, dont le muscle squelettique et le foie (Stumvoll et al., 2005).

Le diabète de type 2 se développe en deux temps. En premier, l'insulinorésistance est compensée par une augmentation de l'insulinosécrétion. Dans un second temps, l'insulinosécrétion défaille progressivement, ce qui conduit à une augmentation de la glycémie, d'abord en période post-prandiale (ou lors d'une HPO), puis à jeun. On estime qu'il se passe,

I. Revue bibliographique

en moyenne, une dizaine d'années entre le début de l'augmentation de la glycémie, asymptomatique, et la pose du diagnostic de diabète de type 2, au moment où apparaissent les premiers symptômes évocateurs. (Scheen, 2007)

La progression de la maladie est accélérée par les phénomènes de Lipotoxicité et de glucotoxicité. La perte de la capacité insulinosécrétoire s'accompagne d'une élévation progressive de l'hyperglycémie, ce qui va exiger des adaptations successives de la stratégie thérapeutique (Stumvoll et al., 2005).

I.1.3. Facteurs favorisant le diabète

Les Facteurs favorisant le diabète type 1 sont :

A. Facteurs immunitaires

Le diabète de type 1 est principalement causé par une réaction auto-immune où le système immunitaire attaque les cellules bêta productrices d'insuline dans le pancréas. Cette destruction progressive des cellules bêta conduit à une carence en insuline. Les auto-anticorps, comme ceux contre les îlots de Langerhans, l'insuline, et la décarboxylase de l'acide glutamique (GAD), sont souvent présents dans le sang des personnes atteintes de diabète de type 1 et peuvent être détectés avant l'apparition des symptômes cliniques.(Spinas & Lehmann, 2001)

B. Facteurs Génétiques

Les prédispositions génétiques jouent un rôle important dans le développement du diabète de type 1. Les gènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), en particulier les gènes HLA (Human Leukocyte Antigen), sont fortement associés à cette maladie. Les variations spécifiques dans ces gènes peuvent augmenter la susceptibilité à la maladie. Par exemple, les haplotypes HLA-DR3 et HLA-DR4 sont fréquemment trouvés chez les personnes atteintes de diabète de type 1. Avoir des antécédents familiaux de diabète de type 1 augmente également le risque. (Spinas & Lehmann, 2001)

C. Facteurs Environnementaux

Plusieurs facteurs environnementaux sont suspectés de déclencher le processus auto-immun chez les individus génétiquement prédisposés :

Infections Virales : Des virus comme les entérovirus, les virus Coxsackie B, et le virus de la rubéole peuvent initier ou accélérer la destruction auto-immune des cellules bêta. Ces infections

I. Revue bibliographique

virales peuvent provoquer une inflammation du pancréas et déclencher une réponse immunitaire anormale. **(Spinas & Lehmann, 2001)**

Exposition à des Toxines : Certaines toxines environnementales peuvent endommager les cellules bêta ou stimuler une réponse auto-immune. Par exemple, l'exposition à la nitrosamine, présente dans certains aliments et produits chimiques, a été associée à une incidence plus élevée de diabète de type 1. **(Bahadoran et al., 2016)**

Facteurs Diététiques : Des études suggèrent que l'alimentation pendant la petite enfance peut influencer le risque de diabète de type 1. L'introduction précoce de lait de vache dans l'alimentation des nourrissons et la carence en vitamine D ont été proposées comme facteurs de risque potentiels. La vitamine D joue un rôle dans la modulation du système immunitaire, et une carence pourrait favoriser le développement de maladies auto-immunes. **(Dubois-Laforgue & Timsit, 2000)**

Les facteurs favorisant le diabète type 2 sont groupés en des facteurs Primaires et des facteurs secondaires **(Boitard, 2020)**;

Facteurs primaires :

- L'obésité, en particulier la graisse abdominale, perturbe l'homéostasie du glucose et augmente la résistance à l'insuline.
- L'inactivité physique réduit la sensibilité à l'insuline et perturbe le métabolisme du glucose.
- Un régime riche en calories, sucres simples, et graisses saturées augmente le risque de diabète.
- Les antécédents familiaux de diabète augmentent le risque de développer la maladie.
- Le risque augmente avec l'âge, particulièrement après 45 ans. Certaines populations ethniques sont plus à risque.

Facteurs Secondaires :

- Hypertension et Dyslipidémie augmentent la résistance à l'insuline et perturbent le métabolisme du glucose. **(Dubois-Laforgue & Timsit, 2000)**
- La grossesse et troubles endocriniens augmentent le risque du diabète.
- Le stress chronique et le mauvais sommeil affectent la régulation du glucose et augmentent l'insulino-résistance. **(Rorive et al., 2005)**.

I. Revue bibliographique

- L'exposition aux Toxines et polluants chimiques comme le bisphénol A peuvent perturber le métabolisme du glucose.
- Les facteurs de risque interagissant, augmentant le risque de diabète. Par exemple, l'obésité et la sédentarité peuvent conduire à une résistance à l'insuline exacerbée par une mauvaise alimentation, surtout chez les individus génétiquement prédisposés. (Boitard, 2020).

I.1.4. Approches Thérapeutiques du diabète : les antidiabétiques oraux

Les traitements actuels du diabète visent à maintenir un contrôle optimal de la glycémie, améliorer la sensibilité à l'insuline en limitant en particulier la glucotoxicité et la lipotoxicité et gérer les facteurs de risque cardiovasculaire (tabac, hypertension artérielle, dyslipidémie). Les méthodes incluent l'activité physique régulière, un équilibre nutritionnel (limitation des sucres rapides, contrôle des lipides, réduction de l'apport calorique en cas de surcharge pondérale), ainsi que l'utilisation de traitements oraux et l'administration d'insuline (Zerifi et al., 2008).

Les antidiabétiques oraux, couramment utilisés pour traiter le diabète, contrôler la glycémie et prévenir les complications associées au diabète incluent : la metformine, les sulfamides, les glinides, les inhibiteurs de la dipeptidyl peptidase-4 (DPP4), les agonistes de récepteur GLP-1, les inhibiteurs des cotransporteurs sodium-glucose de type 2 (iSGLT2) et les inhibiteurs de l' α -glucosidase (AGI) (Fig. 2)

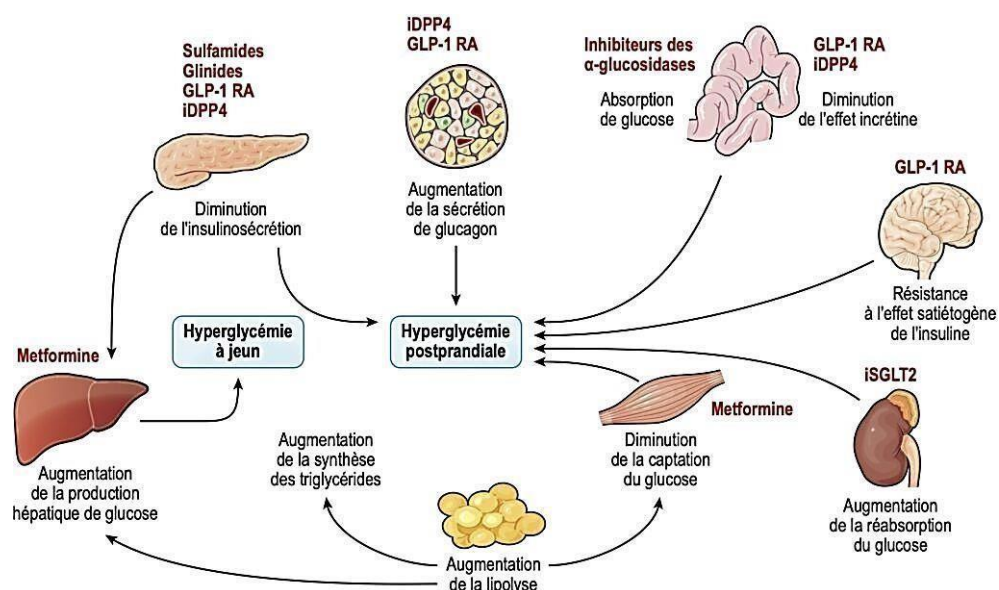


Figure 2. Les antidiabétiques oraux et leurs sites d'action.

(<https://www.s fendocrino.org/diabete-de-type-2/>)

I. Revue bibliographique

Les sulfamides hypoglycémisants agissent en stimulant la sécrétion d'insuline suite à la fermeture des canaux potassiques des cellules B des îlots de Langerhans. **(Scheen, 2002.)**

Les biguanides comme la metformine n'agit pas en stimulant la sécrétion d'insuline. Son activité anti-hyperglycémisante fait appel à différents mécanismes encore imparfaitement connus qui contribuent à améliorer le métabolisme du glucose et à accroître la sensibilité à l'insuline, en particulier dans le foie. **(Scheen, 2002.)**

Les glinides sont des agents insulinosécréteurs, incluant le répaglinide, le natéglinide et le mitiglinide, qui constituent un type de sécrétagogue de l'insuline à jeun pouvant aider à imiter la libération d'insuline de phase précoce, offrant ainsi un meilleur contrôle des niveaux de glucose postprandial. Les glinides stimulent la sécrétion d'insuline en inhibant les canaux potassiques sensibles à l'ATP dans la membrane des cellules β pancréatiques. **(Chen et al., 2015)**

Les inhibiteurs de la dipeptidyl peptidase-4 (DPP4) (Gliptine) augmentent les concentrations à la fois de GLP-1 et de polypeptide insulinothrompe dépendant du glucose (GIP) en bloquant leur dégradation par l'enzyme DPP-4. Le GLP-1 est libéré par les cellules α du pancréas en réponse à l'apport alimentaire. Le GLP-1 joue un rôle dans la régulation de la glycémie en augmentant la sécrétion d'insuline par le pancréas de manière dépendante du glucose. Le GLP-1 aide également à réguler la sécrétion de glucagon et diminue la production hépatique de glucose. **(Mane et al., 2012)**

Les agonistes de récepteur GLP-1 (glucagon-like peptide-1) (GLP-1RA) agissent en stimulant la sécrétion d'insuline de manière glucose-dépendante, ce qui signifie qu'ils augmentent la libération d'insuline en réponse à une augmentation de la glycémie. De plus, ces médicaments ralentissent la vidange gastrique et augmentent la sensation de satiété, aidant ainsi à contrôler la prise alimentaire et à réduire le poids corporel, ce qui est bénéfique pour les patients diabétiques. **(Buxeraud & Faure, 2017, Paquot, 2021)**

Les inhibiteurs de l'alpha-glucosidase intestinale (AGIs) inhibent de manière compétitive les enzymes α -glucosidase au niveau de la bordure en brosse des entérocytes. L'absorption des glucides consommés est retardée, ce qui entraîne une réduction de la glycémie plasmatique. Il n'y a pas d'effet direct sur la sécrétion d'insuline, mais il existe des preuves que la sécrétion de GLP-1 est améliorée. **(Stein et al., 2013).**

Les gliflozines sont des médicaments antidiabétiques oraux qui font partie des inhibiteurs de la SGLT2 (cotransporteurs sodium-glucose de type 2). Leur mode d'action consiste à augmenter

I. Revue bibliographique

l'élimination du glucose par les reins en bloquant la réabsorption par le système de récepteurs à haute capacité et faible affinité, connus sous le nom de récepteurs de type 2 ou SGLT-2. Ces récepteurs jouent un rôle crucial dans la réabsorption de 90 % du glucose filtré par le rein, utilisant un processus actif impliquant le sodium et l'énergie fournie par le système Na/K/ATP-ase pour transporter le glucose contre son gradient de concentration. (Verdecchia et al., 2023).

I.2. Pancréas exocrine et Îlots de Langerhans

I.2.1. Fonction du pancréas

Le pancréas est une glande du système digestif. Il est situé dans l'abdomen, logé en profondeur derrière l'estomac et dans le cadre formé par la première partie de l'intestin grêle, le duodénum (Fig. 3).

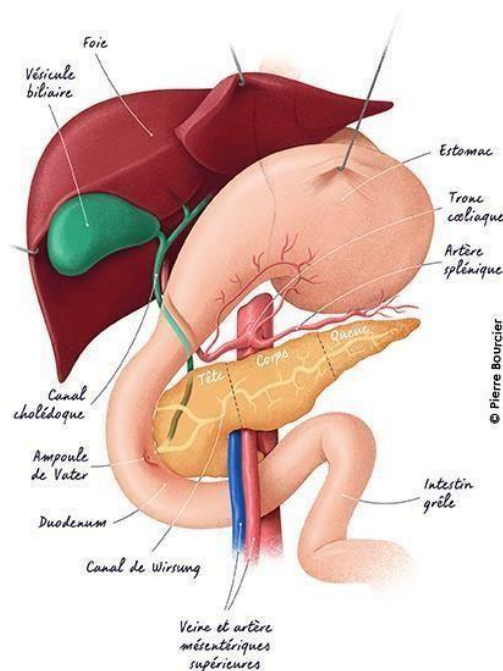


Figure 3 : Le pancréas organe du système digestif

Le pancréas présente une forme allongée. Sa partie supérieure, ou "poignée", est constituée par la tête de la glande, étroitement liée aux deux tiers distaux du duodénum. Le reste du pancréas, formant le "corps" et la "queue", est enveloppé par la paroi postérieure de l'estomac et s'achève près du hile splénique. À l'échelle macroscopique, il présente une teinte jaunâtre-rosée et une texture qui peut varier de molle à ferme en fonction du degré de fibrose et d'accumulation de graisse. (In't Veld & Marichal, 2010).

I. Revue bibliographique

Le pancréas est une glande qui exerce deux fonctions distinctes, exocrine et endocrine. La fonction exocrine (pancréas exocrine) consiste en la production par les cellules acinaires d'un mélange d'enzymes digestives qui dégradent les aliments dans le duodénum et du bicarbonate.

La fonction endocrine du pancréas est cruciale pour maintenir la glycémie dans une plage étroite, assurant ainsi un contrôle précis du sucre, la principale source d'énergie cellulaire. Les hormones pancréatiques régulent la libération et la capture du glucose par le foie, les muscles, le tissu adipeux et le cerveau, et influencent également la prise alimentaire. Les déséquilibres glycémiques, comme l'hypoglycémie ou l'hyperglycémie prolongée dans le diabète, peuvent avoir des conséquences graves sur les organes et le système nerveux. L'homéostasie glucidique, complexe et interconnectée avec le métabolisme des acides aminés et des lipides, nécessite une coordination précise entre plusieurs organes. **(Fischer et al., 2021)**

Les cellules exocrines, formant 98 % du parenchyme, sont organisées en acini. Les cellules endocrines, représentant 1 à 2 % du parenchyme, libèrent des hormones dans la veine porte. Ces cellules forment petits organes dispersés entre les acini et les structures canaux dans le parenchyme exocrine qu'on appelle les îlots d'îlots de Langerhans. **(In't Veld & Marichal, 2010)**

I.2.2. Définition des îlots de Langerhans

Les îlots de Langerhans, ou îlots pancréatiques, sont des cellules endocrines regroupées en petits amas disséminés dans les lobules pancréatiques. Nommés par Edouard Laguesse en 1893 en hommage à Paul Langerhans, qui les a décrits pour la première fois en 1868. Ces îlots jouent un rôle crucial dans l'homéostasie du glucose **(In't Veld & Marichal, 2010)**. Ils produisent l'insuline et le glucagon, hormones régulant la glycémie, et sécrètent également des immunoglobulines. **(Barbieux, 2017)**

Chez l'adulte, le pancréas endocrine est composé en moyenne d'un million d'îlots de Langerhans, variant en taille de 30 à 500 µm, représentant de 1 à 2 % du volume total du pancréas **(Buchwald et al., 2016)**.

I.2.3. Structure et composition des îlots de Langerhans

Les îlots de Langerhans, dispersés dans le tissu exocrine pancréatique, se présentent en grappes et sont alimentés par des capillaires à endothélium fenêtré. Constitués de cellules endocrines regroupées en petits amas, ils sont situés dans les acini, les lobules pancréatiques et la paroi des canaux pancréatiques. Occasionnellement, ils peuvent fusionner pour former des structures

I. Revue bibliographique

visibles à l'œil nu. Chez l'homme, on compte plusieurs millions d'îlots, tandis que la souris en possède environ 1 000. (Barbieux, 2017)

Les îlots de Langerhans sont composés de cinq types majeurs de cellules endocrines ; 50 à 85 % de cellules β productrices d'insuline, 10 à 45 % de cellules α productrices de glucagon, 2 à 25 % de cellules δ sécrétrices de gastrine et de somatostatine et, dans une moindre mesure, des cellules ϵ sécrétrices de la ghréline et des cellules PP ou γ productrices de polypeptide pancréatique et des cellules (Fig. 4) (Papoz, 2022).

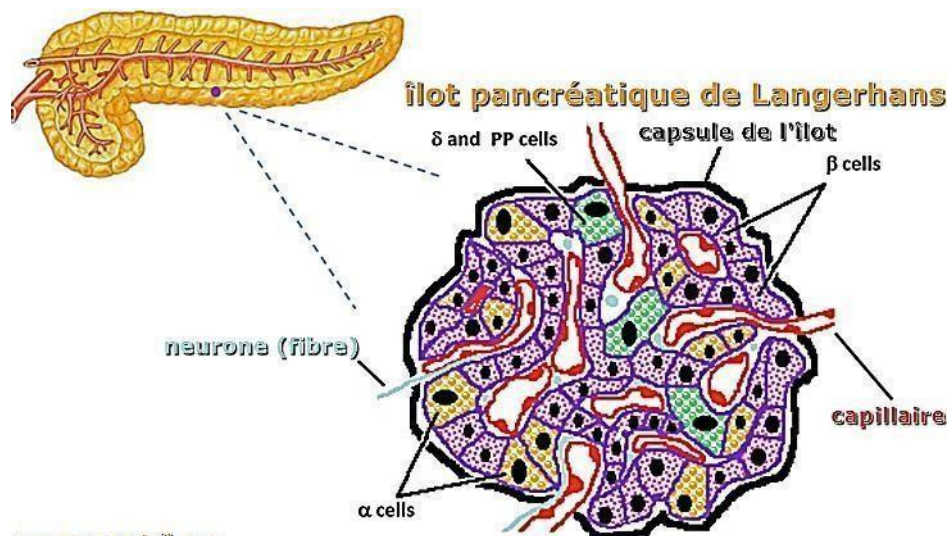


Figure 4 : Structure d'un îlot de Langerhans

<https://www.aquaportail.com/dictionnaire/definition/9854/ilot-de-langerhans>

Dans chaque îlot, un flux sanguin artériel alimente les cellules et permet un échange bidirectionnel entre la circulation sanguine et les cellules endocrines, qui sont abondamment vascularisées. La sécrétion hormonale est étroitement régulée par une innervation très dense des nerfs sympathiques et parasympathiques. (Papoz, 2022).

I.2.4. Les cellules des îlots de Langerhans

Les cinq types de cellules identifiés dans les îlots pancréatiques sont responsables de la sécrétion de différentes hormones impliquées directement ou indirectement dans la régulation de la glycémie (Fig. 5).

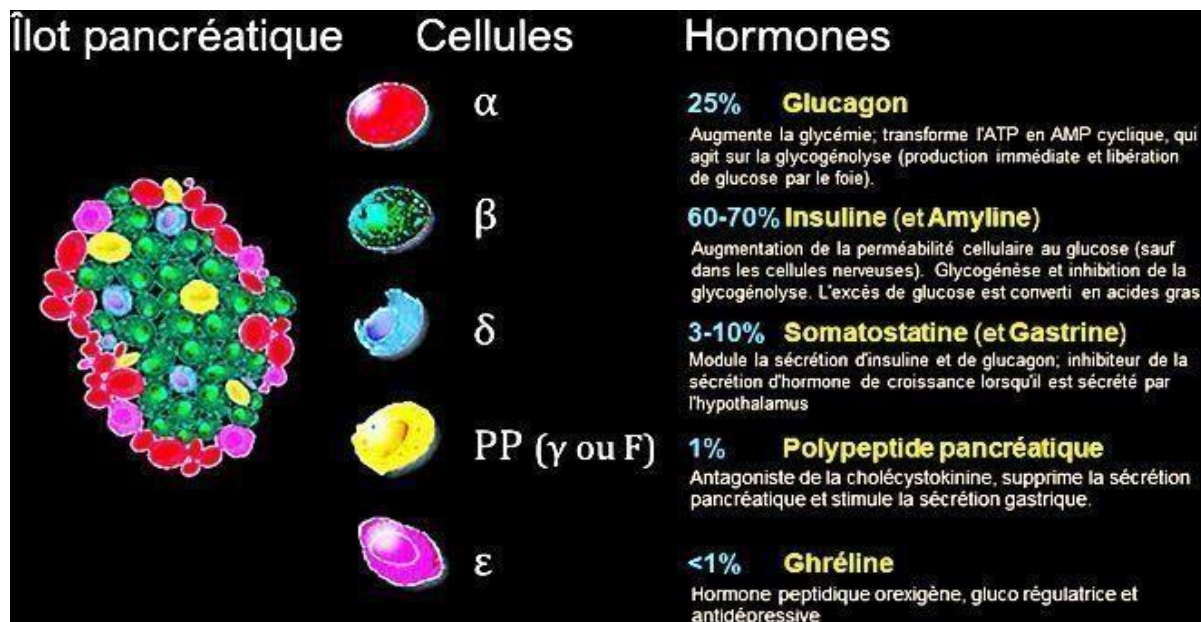


Figure 5 : Schéma de l'îlot pancréatique et ses différents types de cellules. (Mandarim-de-Lacerda, 2019)

I.2.4.1 Les Cellules β

La cellule β est la plus étudiée des cellules d'îlots, en raison de son nombre et de son rôle dans les diabètes sucrés. Elle intègre des signaux nutritionnels, hormonaux et nerveux pour ajuster en permanence sa sécrétion d'insuline. Elle reçoit également des signaux via d'autres messagers libérés au sein même des îlots par les cellules β voisines (e.g. acide gamma-aminobutyrique [GABA], sérotonine, zinc) et par les cellules non β (e.g. glucagon, acétylcholine, somatostatine, corticolibérine [ou CRH, corticotropine releasing hormone]) (Huising, 2020)

Les Cellules β produisent l'insuline, une hormone hypoglycémisante, formée de deux chaînes polypeptidiques A et B reliées par des ponts disulfures. L'insuline est stockée au niveau du cytoplasme dans des vésicules sécrétoires spécifiques caractérisées par leur contenu en zinc et leur morphologie cristalline. La libération de l'insuline estimée à environ 10^{12} granules sécrétoires par jour par cellule β , peut être déclenchée soit par la présence de nutriments, soit de manière constitutive. Ce processus implique la fusion des granules avec la membrane cellulaire et l'ouverture temporaire de pores entre les granules et l'environnement extracellulaire. Le glucose est le principal stimulus des cellules β . Il pénètre dans la cellule par des transporteurs spécifiques (GLUT), où il est métabolisé, produisant ainsi des molécules de couplage dont la principale est l'ATP (Figure 2). L'augmentation du ratio ATP/ADP dans le cytosol induit la fermeture des canaux potassiques dépendants de l'ATP, conduisant à une dépolarisation de la membrane plasmique, puis à une activation et une inactivation séquentielle

I. Revue bibliographique

de canaux ioniques dépendants du potentiel de membrane. Un signal électrique est alors généré et l'entrée de calcium qui en résulte, avec une dynamique bien précise, déclenche l'exocytose des vésicules d'insuline (Fig 6) (**Huising, 2020**). Les cellules β sécrètent l'insuline de manière coordonnée, notamment grâce à des jonctions communicantes (ou jonctions GAP) formées entre elles par les connexines 36 F. Ainsi connectées, les cellules β sécrètent plus efficacement l'insuline que lorsqu'elles fonctionnent indépendamment les unes des autres. (**Jaffredo et al., 2021**)

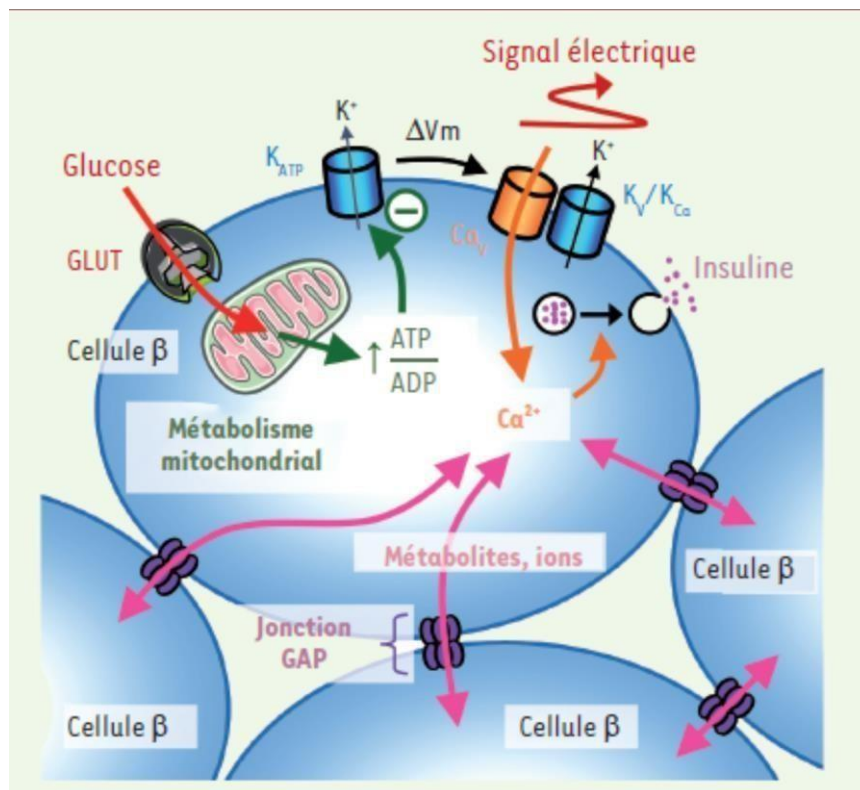


Figure 6 : Réponses métabolique, électrique et sécrétoire d'une cellule β stimulée par le glucose et influence des couplages entre les cellules β (**Fischer et al, 2021**)

Outre l'insuline, les granules sécrétoires contiennent l'IAPP un peptide associé aux îlots et divers composés, notamment du calcium, des nucléotides adénine, des amines biogènes et d'autres hormones peptidiques. Les variations dans la granulation, la taille cellulaire et la taille des noyaux des cellules β peuvent refléter leur réponse au glucose et leur activité de synthèse. (**In't Veld & Marichal, 2010**). En vieillissant, les cellules β peuvent accumuler des lysosomes auto-fluorescents, similaires à ceux observés dans les neurones vieillissants. (**In't Veld & Marichal, 2010**)

I. Revue bibliographique

I.2.4.2 Les cellules α

Les cellules α , constituant environ 15 à 20 % du nombre total de cellules pancréatiques, présentent une répartition variable dans les îlots, certains îlots contenant jusqu'à 65 % de cellules α . Localisées principalement dans la partie dorsale du pancréas et pratiquement absentes de la partie ventrale (**In't Veld & Marichal, 2010**), ces cellules α sécrètent le glucagon, un peptide de 29 acides aminés augmentant la glycémie. La sécrétion de glucagon atteint son maximum à faible concentration de glucose, décroît à mesure que le glucose augmente jusqu'à environ 6 mM, et reste inhibée même à des concentrations élevées. Cette régulation du glucagon altérée dans le diabète de type 2, avec une réduction de la sécrétion en cas d'hypoglycémie et une augmentation en cas d'hyperglycémie, pourrait contribuer au développement de la maladie (**Gilon, 2020**).

En plus du glucagon, d'autres molécules telles que le GLP-1, le GLP-2 et la glicentine peuvent être produites par la cellule α . Le glucagon est stocké dans des granules de sécrétion qui présentent une structure morphologique spécifique, avec un noyau électrodense et un manteau périphérique grisâtre. (**Bossart et al., 2022**).

I.2.4.3 Les cellules δ

Les cellules δ (ou D) secrète la somatostatine, Également connue sous le nom d'hormone inhibitrice de la croissance (GHIH) ou d'hormone inhibitrice de la libération de la somatotropine (SRIF), elle inhibe la plupart des sécrétions cellulaires. Les cellules δ (delta) sont également présentes dans l'hypothalamus, le système nerveux central (SNC), les neurones périphériques et le tractus gastro-intestinal. (**In't Veld & Marichal, 2010**) Cette hormone peptidique exerce une forte inhibition sur la libération du glucagon et de l'insuline. (**Brereton et al., 2015**)

La somatostatine est synthétisée à partir d'un précurseur, le preprosomatostatine (116 acides aminés), qui est rapidement cliver en pro-somatostatine (92 acides aminés). Ce dernier est converti dans les granules sécrétoires par une protéine convertase pour donner deux formes actives, l'une composée de 14 acides aminés et l'autre de 28 acides aminés. Les cellules δ sécrètent principalement le SST-14, alors que SST-28 est produit dans les cellules intestinales. (**Brereton et al., 2015**)

Bien que toutes les cellules des îlots de Langerhans présentent des caractéristiques neuronales, les cellules D se rapprochent davantage des neurones, car elles forment souvent de longs processus minces terminés par une extrémité dense en granules sécrétoires, rappelant un bouton,

I. Revue bibliographique

à proximité des capillaires. Cette morphologie suggère une sécrétion ciblée, potentiellement de type paracrine. Les cellules D occupent généralement entre 5 et 10% du volume total de l'îlot de Langerhans. **(In't Veld & Marichal, 2010)**

I.2.4.4 Les cellules ϵ

Le plus récent type cellulaire identifié dans les îlots de Langerhans sont les cellules ϵ sécrétrices de la ghréline. À l'origine isolée à partir de l'estomac du rat, l'hormone ghréline a ensuite été identifiée dans un type cellulaire spécifique des îlots de Langerhans chez l'adulte humain. Les îlots adultes ne contiennent généralement pas plus de 1 % de cellules epsilon. On suppose que la ghréline joue un rôle crucial dans la libération de l'hormone de croissance, la régulation métabolique et l'équilibre énergétique, mais son exacte implication dans les cellules des îlots reste encore à établir. **(Sakata et al., 2019)**

I.2.4.5 Les cellules PP

Les cellules PP secrètent un polypeptide pancréatique PP de 36 acides aminés. Moins étudiée parmi les hormones des îlots, ce peptide a été identifié par immunocytochimie dans deux types cellulaires morphologiquement distincts : les cellules F immunoréactives à la PP (autrefois appelées cellules F) qui se caractérisent par des granules sécrétoires arrondis à anguleux et se trouvent dans la partie céphalique ventrale du pancréas et les cellules à petits granules, anciennement appelées D1 présentes dans la partie dorsale.

Dans le pancréas humain, la proportion de cellules PP dans la région ventrale est significative, pouvant représenter jusqu'à 80 % des cellules, Bien que la sécrétion de PP soit stimulée par l'arginine, le glucose n'a aucun effet. Le PP exerce principalement des actions inhibitrices dans l'intestin, réduisant la vidange gastrique et l'activité motrice intestinale par des actions sur le récepteur Y4 (également connu sous le nom de PPYR1). L'infusion de PP n'a aucun effet sur la sécrétion d'insuline *in vivo* mais a montré une inhibition de la sécrétion de glucagon à de faibles concentrations de glucose via les récepteurs PPYR1 sur les cellules α . Ces données suggèrent que le PP pourrait agir comme un régulateur intra-îlots de la sécrétion. **(Brereton et al., 2015).**

I. Revue bibliographique

I.3. Substances diabétoènes

I.3.1. Définition

Les substances diabétoènes sont des agents chimiques ou biologiques capables de provoquer une augmentation persistante des concentrations de glucose sanguin, ce qui peut contribuer au développement du diabète *mellitus* (Boucher & Burgess, 2014), une maladie caractérisée par une hyperglycémie chronique résultant de dysfonctionnements dans la sécrétion d'insuline, l'action de l'insuline, ou les deux.

Ces substances peuvent agir de diverses manières pour perturber le métabolisme normal du glucose, par exemple en inhibant la production d'insuline, en augmentant la résistance à l'insuline, ou en perturbant la fonction des cellules bêta du pancréas (Furman et al., 2007).

I.3.2. Types de Substances Diabétoènes

I.3.2.1. Substances utilisées dans le cadre des recherches scientifique

A. Alloxane

L'alloxane, également connu sous le nom de mésoxalylurée, est un composé organique possédant une structure pyrimidine hétérocyclique (Fig. 7). Principalement présent sous forme de monohydrate, il se cristallise en prismes incolores et peut également exister sous forme tétrahydratée, cristallisant alors sous forme orthorhombique (Barton, Chapman et Petrox, 1950).

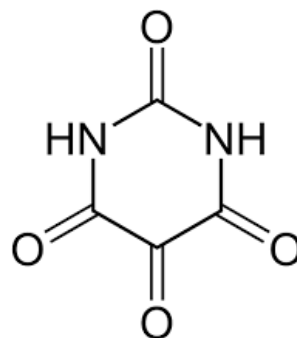


Figure 7 : Structure de l'alloxane (De Long & Holloway, 2018)

La production de ce composé résulte de l'oxydation de l'acide urique par l'acide nitrique. L'alloxane agit comme un agent oxydant extrêmement puissant, formant avec son produit réduit, l'acide dialurique, un hémiacétal connu sous le nom d'alloxantine. Ce composé trouve diverses applications : il est utilisé dans la production de murexide, un pigment pourpre, il sert

I. Revue bibliographique

d'indicateur dans le titrage du calcium et d'autres métaux, et sa forme monohydratée est également utilisée dans la synthèse des barbituriques (**Barton, Chapman et Petrox, 1950**).

L'alloxane est utilisé en laboratoire pour induire expérimentalement un diabète insulino-dépendant chez les modèles animaux en ciblant spécifiquement les cellules pancréatiques productrices d'insuline. Sa structure chimique similaire au glucose lui permet de pénétrer sélectivement dans les cellules bêta du pancréas via le transporteur GLUT 2 (**Rohilla et Ali, 2012**). À l'intérieur des cellules bêta, l'alloxane est métabolisé en radicaux libres d'oxygène (Fig.8), notamment des superoxydes, qui endommagent les enzymes glycolytiques, diminuent la production d'ATP et induisent un stress oxydatif sévère. Ce processus entraîne une apoptose rapide des cellules bêta, réduisant leur nombre et altérant leur capacité à sécréter de l'insuline de manière efficace, reproduisant ainsi un modèle expérimental de diabète chez les animaux de laboratoire (**Lenzen, 2008 ; Rohilla et Ali, 2012**).

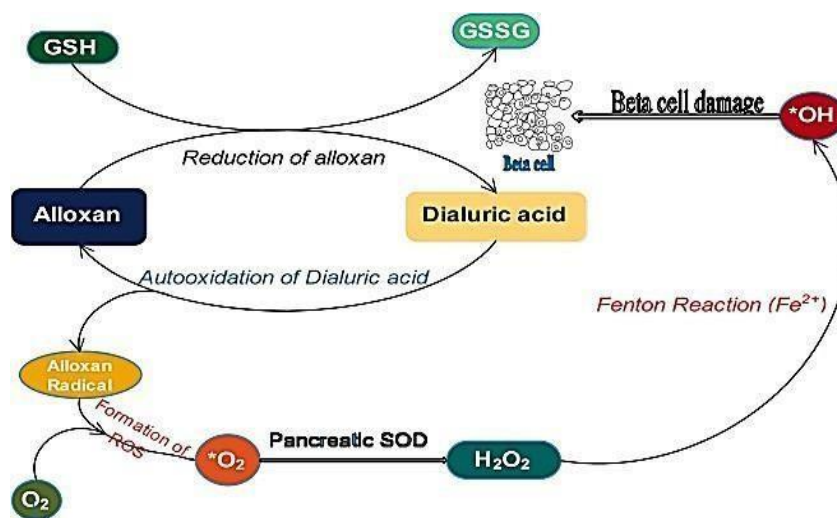


Figure 8 : Formation des ROS via le cycle redox de l'alloxane (**Macdonald Ighodaro et al., 2017**).

La toxicité de l'alloxane sur le pancréas n'est pas établie chez les humains, même à des doses élevées, en raison probablement de différences dans le mécanisme de transport du glucose entre les humains et les rongeurs. Toutefois, l'alloxane montre une toxicité hépatique et rénale à des doses élevées (**Tyrberg et al., 2001**)

B. Streptozotocine (STZ)

I. Revue bibliographique

La streptozotocine (STZ) (Fig.9) est un composé chimique de la classe des nitrosourées largement employé en recherche biomédicale pour induire expérimentalement le diabète chez les animaux de laboratoire, principalement chez les rongeurs. Son mécanisme d'action principal consiste en la destruction sélective des cellules bêta du pancréas. (Szkudelski, 2001).

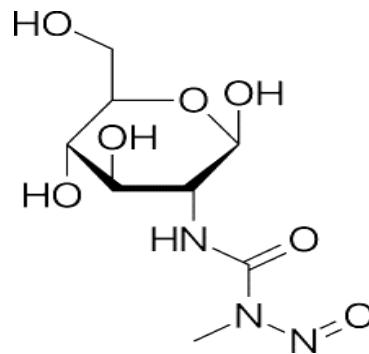


Figure 9 : Structure de la streptozotocine (Fischer, 2021)

La streptozotocine (STZ) est particulièrement toxique pour les cellules β des îlots de Langerhans chez les mammifères, altérant l'ADN et réduisant la sécrétion d'insuline, ce qui conduit à une hyperglycémie persistante, simulant le diabète de type 1 (Abdollahi et Hosseini, 2019). STZ est un dérivé de 2-désoxy-D-glucose, qui pénètre sélectivement dans les cellules β via le transporteur GLUT1, expliquant sa toxicité spécifique envers ces cellules. En tant qu'agent alkylant, STZ méthyle les bases puriques de l'ADN des cellules β , perturbant la réplication de l'ADN et induisant des cassures dans les brins d'ADN (Bolzán & Bianchi, 2002). STZ induit également une production accrue de radicaux libres et de stress oxydatif, résultant de la réparation de l'ADN endommagé ou de l'inhibition de la glycolyse, entraînant une accumulation de sorbitol et une augmentation de la production de radicaux libres (Lenzen, 2008). Ces dommages perturbent la fonction cellulaire, réduisant le nombre de cellules β fonctionnelles et induisant souvent leur apoptose, ce qui diminue la production d'insuline (Lenzen, 2008).

I.3.2.2. Médicaments diabétogènes

A. Les Glucocorticoïdes

Les glucocorticoïdes sont utilisés pour leurs propriétés anti-inflammatoires et immunosuppressives, mais ils peuvent induire une hyperglycémie en augmentant la production hépatique de glucose et en réduisant l'absorption de glucose par les tissus périphériques (Singh & Rajini, 2008). Des études, *in vitro*, sur des cellules β pancréatiques murines et des lignées

I. Revue bibliographique

cellulaires humaines exposées à la dexaméthasone, un corticostéroïde, ont identifié plusieurs mécanismes impliqués (**Rorsman et Braun, 2021 ; Feldman & Abdel-Hafez, 2022**):

- Inhibition de la sécrétion d'insuline par l'augmentation de l'expression des récepteurs α_2 -adrénergiques.
- Diminution des niveaux d'AMP cyclique.
- Réduction de la protéine GLUT2 à la membrane plasmique des cellules β .
- Régulation négative de l'ARNm de la glucokinase.
- Augmentation de l'activité des canaux potassiques voltage-dépendants.
- Induction de l'apoptose des cellules β par l'activation de la phosphatase calcineurine et des récepteurs des corticostéroïdes

B. Les inhibiteurs de la calcineurine

Les inhibiteurs de la calcineurine sont des médicaments immunosuppresseurs utilisés principalement pour prévenir le rejet de greffe chez les patients transplantés. Ces médicaments, tels que la ciclosporine et le tacrolimus, sont associés à un risque accru de développer un diabète de type 2.

Les inhibiteurs de la calcineurine, tels que la ciclosporine et le tacrolimus, sont des immunosuppresseurs utilisés principalement pour prévenir le rejet de greffe chez les patients transplantés. Cependant, ces médicaments augmentent le risque de développer un diabète de type 2. En inhibant l'activité de la calcineurine, ils interfèrent avec le métabolisme du glucose, entraînant une résistance à l'insuline, augmentant la production hépatique de glucose et diminuant l'absorption périphérique du glucose, contribuant ainsi à l'hyperglycémie et au diabète. De plus, ils exercent un effet toxique direct sur les cellules β , augmentant leur apoptose et provoquant la dégénérescence des cellules β des îlots, ce qui supprime la sécrétion d'insuline pancréatique (**Rosselin et al., 2006**)

I.3.2.3. Substances chimiques

A. Bisphénol A

Le bisphénol A (BPA) (4,4'-(propan-2-ylidène) diphénol ou de p, p'-isopropylidènebisphénol) est un composé organique aromatique obtenu par la réaction entre deux équivalents de phénol et un équivalent d'acétone, ce qui lui confère deux groupements fonctionnels phénol. (**Dursun et al., 2016**).

I. Revue bibliographique

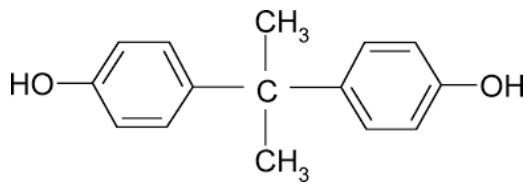


Figure 10 : Structure du bisphénol (Pérez-Bermejo et al., 2021)

Le bisphénol A (BPA) est un composé utilisé principalement dans la production de plastiques polycarbonates et de résines époxy. Des études récentes ont montré que le BPA possède des propriétés perturbatrices endocriniennes, et plusieurs recherches ont établi un lien entre l'exposition au BPA et le développement de troubles métaboliques, y compris le diabète de type 2. (Alonso-Magdalena et al., 2011).

Le BPA Le bisphénol A (BPA) peut perturber la signalisation de l'insuline en se liant aux récepteurs des œstrogènes, ce qui entraîne une résistance à l'insuline et une augmentation des niveaux de glucose sanguin (Song et al., 2014). De plus, le BPA induit un stress oxydatif dans les cellules β pancréatiques, réduisant leur capacité à sécréter de l'insuline et contribuant au développement du diabète de type 2. Le BPA influence également les enzymes hépatiques impliquées dans la production et le stockage du glucose, perturbant ainsi le métabolisme du glucose. Enfin, le BPA peut modifier l'expression des gènes via des mécanismes épigénétiques, affectant la régulation métabolique et contribuant au diabète (Rubin, 2011).

I.3.2.4 Les pesticides

Les pesticides sont des substances utilisées pour détruire, contrôler ou repousser des organismes vivants, incluant les produits phytopharmaceutiques (PP). Ces derniers se divisent en phytopharmaceutiques d'origine chimique et organochlorée, avec les produits organochlorés ayant un risque plus élevé de provoquer le diabète de type 2. Les pesticides possèdent un risque diabétogène tant au niveau professionnel qu'au niveau des consommateurs (Rives et al., 2022).

Les produits phytopharmaceutiques sont des composés pro-oxydants qui stimulent la production accrue de radicaux libres. Leur action peut perturber les mitochondries, influencer les processus de détoxification, et moduler des facteurs de transcription qui régulent l'expression des enzymes antioxydantes (Fig.11) (Rives et al., 2022).

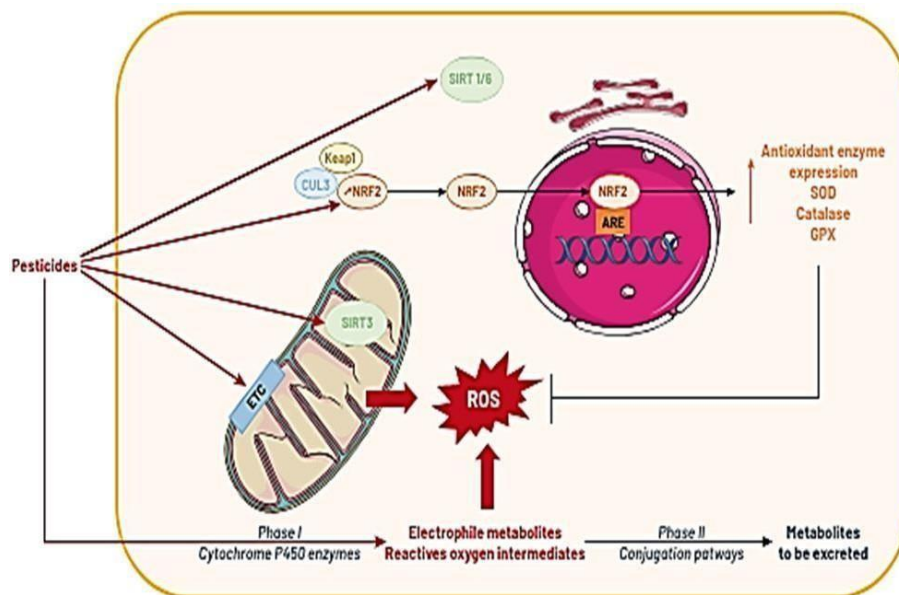


Figure 11 : mécanismes d'induction du stress oxydant par les pesticides (Rives et al., 2022)

Ils peuvent affecter l'homéostasie métabolique en altérant l'activité des mitochondries, les voies de signalisation contrôlant la prolifération, la survie, la différenciation, et le statut oxydo-réducteur. Les pesticides peuvent aussi interagir avec des facteurs de transcription tels que le récepteur aux hydrocarbures aromatiques (AhR) et les récepteurs nucléaires impliqués dans la régulation endocrine (AR et ER), ainsi que dans la détoxification et le métabolisme (CAR, PXR, PPAR α) (Rives et al., 2022).

I.3.2.5 Les additifs alimentaires à risque diabétogène

A. Propionate de sodium

Le propionate de sodium (Fig.12) est un sel de sodium de l'acide propionique, un acide carboxylique à chaîne courte. Il est couramment utilisé comme additif alimentaire sous le numéro E281 pour ses propriétés de conservation et d'inhibition de la croissance des moisissures.

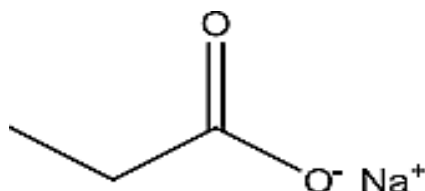


Figure 12 : La formule structurale du propionate de sodium (EFSA Journal , 2014)

I. Revue bibliographique

Le propionate de sodium est principalement utilisé comme agent conservateur dans les aliments et comme additif dans l'industrie alimentaire, en particulier dans les produits de boulangerie et les produits laitiers, pour prévenir la croissance des moisissures et prolonger la durée de conservation des produits. Le propionate de sodium est considéré comme sûr par les autorités réglementaires. Des études récentes ont suggéré qu'une exposition excessive pourrait être associée à des effets indésirables tels que des troubles gastro-intestinaux, une perturbation de plusieurs hormones associées au risque d'obésité et de diabète, (**Tirosh et al., 2019**).

Tirosh et al., (2019) ont montré que la consommation de propionate augmenter les niveaux de glucagon, de norépinéphrine et de la protéine de liaison aux acides gras 4 (FABP4). Ces hormones jouent des rôles significatifs dans le métabolisme du glucose et l'équilibre énergétique, et leur élévation peut contribuer à l'hyperglycémie et à la résistance à l'insuline, qui sont des caractéristiques clés du diabète.

Plus récemment, **Adler et al., (2021)** ont montré que l'exposition chronique au propionate entraîne une résistance à l'insuline chez les souris. Cela signifie que les cellules deviennent moins sensibles à l'insuline, nécessitant des niveaux plus élevés d'insuline pour maintenir la glycémie. Cette condition est un précurseur du diabète de type 2. Selon **Adler et al., (2021)**, une augmentation de la gluconéogenèse et de la mobilisation des acides gras peut entraîner un stress oxydatif sur les mitochondries qui contribuera à la résistance à l'insuline en endommageant les cellules et en perturbant la signalisation de l'insuline.

B. Nitrite de sodium

Le nitrite de sodium est un composé inorganique dont la formule chimique est NaNO_2 (Fig. 13). C'est une poudre cristalline blanche à légèrement jaunâtre, très soluble dans l'eau et hygroscopique (qui absorbe l'humidité de l'air) (**Laue et al., 2000**).

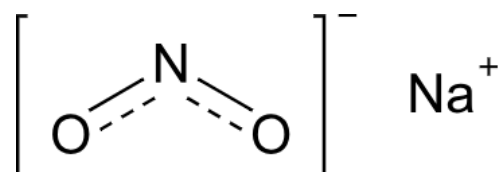


Figure 13 : structure chimique de nitrite de sodium

D'un point de vue industriel, c'est le sel de nitrite le plus important. Il sert de précurseur à divers composés organiques, tels que des produits pharmaceutiques, des colorants et des pesticides.

I. Revue bibliographique

Cependant, il est probablement mieux connu comme additif alimentaire sous le nom E250 et utilisé dans le poisson et les viandes transformées. Le nitrite de sodium est employé pour accélérer le processus de maturation de la viande. Il empêche la germination des spores de *Clostridium botulinum* et donne à la viande une couleur rose attrayante (**Lerfall & Østerlie, 2011**). Le nitrite réagit avec la myoglobine de la viande, d'abord en se transformant en nitrosomyoglobine (rouge vif), puis, lors de la cuisson, en nitrosohémochrome (pigment rose)

Les nitrites peuvent induire un stress oxydatif en augmentant la production d'espèces réactives de l'oxygène, endommageant ainsi les cellules bêta du pancréas et réduisant leur capacité à sécréter de l'insuline (**Valko et al., 2006**). De plus, ils déclenchent des voies inflammatoires qui perturbent la signalisation de l'insuline et favorisent la résistance à l'insuline (**Calder et al., 2011**).

Les nitrites peuvent directement endommager les cellules bêta, ce qui compromet la régulation de la glycémie et peut contribuer au développement du diabète. En perturbant le métabolisme du glucose, ils diminuent l'efficacité de son utilisation et de son stockage, entraînant une élévation de la glycémie et une résistance à l'insuline. Enfin, les réactions des nitrites avec les amines pour former des nitrosamines peuvent également être toxiques pour les cellules bêta pancréatiques et perturber le métabolisme du glucose (**Muoio & Newgard, 2008**).

II. MATERIEL ET METHODES

II. Matériel et méthodes

II.1 Matériel biologiques

II.1.1. Souris Balb/C

Les souris utilisées pour l'isolement des ilots de Langerhans sont de type Balb/C, de sexe femelle, âgées de 16 semaines et fournis par l'institut pasteur de Constantine. Dès réception, les souris ont été mises dans des cage à raison de 4 souris/cage et hébergées dans des conditions de lumière et de température contrôlées (12 heures d'éclairage / Température de 25). Les souris ont eu un accès continu à l'eau et à la nourriture ad libitum. (Fig. 14).



Figure 14 : Conditions d'hébergement des souris utilisées dans l'expérimentation

II.1.2. Lignée cellulaire NIT-1

La lignée cellulaire NIT-1 a été établie à partir des insulinomes développés chez les souris transgéniques NOD, la lignée cellulaire NIT-1 possède de nombreuses caractéristiques et caractéristiques ultra structurales des cellules β pancréatiques normales différenciées de souris, telles qu'un réticulum endoplasmique rugueux bien développé, un appareil de Golgi étendu et des granules bêta. Les cellules NIT-1 fournissent une quantité substantielle de cellules β immortalisées, qui sont normalement difficiles à obtenir (**Hamaguchi et al., 1991**)

Les cellules NIT-1 ont été cultivées dans un milieu RPMI-1640 qui contient 10 % de sérum de veau fœtal, 1 % de pénicilline-streptomycine. Les cellules sont mises en culture à 37° C dans incubateur humide à 5 % de CO₂ et laissées proliférer jusqu'à 70 % de confluence.

II. Matériel et méthodes

II.2. Méthodes

II.2.1. Isolement des îlots de Langerhans

La technique employée pour l'isolement des îlots a été celle décrite par Stull et *al.*, (2012) L'isolement du pancréas a été réalisé par dissection d'une souris anesthésiée au chloroforme. L'ablation du pancréas a été réalisée dans des conditions aseptique après perfusion de 5 ml de solution glacée de collagénase P (0,3 mg/ml) dans les voies biliaires. (Fig. 15)



Figure 15 : Ablation du pancréas de souris

Les graisses et tous les tissus indésirables ont été disséqués et le pancréas a été transféré dans un béccher stérile contenant la collagénase P dans un milieu HBSS où il a été finement haché en très petits morceaux de 2 mm de longueur. La désagrégation mécanique a ensuite été complétée par une digestion enzymatique. La suspension obtenue a été incubée pendant 10 min en présence de collagénase P dans un incubateur à 37 °C sous agitation légère de temps en temps. L'action de la collagénase P a été ensuite bloquée par l'ajout d'une solution saline équilibrée de Hank froide sans calcium ni magnésium (HBSS 1X). La suspension a été ensuite centrifugée à 500 rpm pendant 5min. Le culot récupéré a été remis en suspension dans du milieu HBSS (1X) glacé. La suspension de pellets a ensuite été transférée dans une boîte de Petri en plastique et les îlots libérés ont été récoltés dans une autre boîte de Pétri contenant du HBSS (1X). Tandis que le tissu non dissocié a été trituré avec une pipette Pasteur jusqu'à l'obtention d'une suspension à un seul îlot. Un autre cycle de centrifugation de la suspension d'îlots purifiée a également été réalisé. Ensuite, le surnageant a été aspiré tandis que le culot a ensuite été remis en suspension et dispersé dans du milieu RPMI -1640 par pipetage répété et doux (Fig. 16)

II. Matériel et méthodes

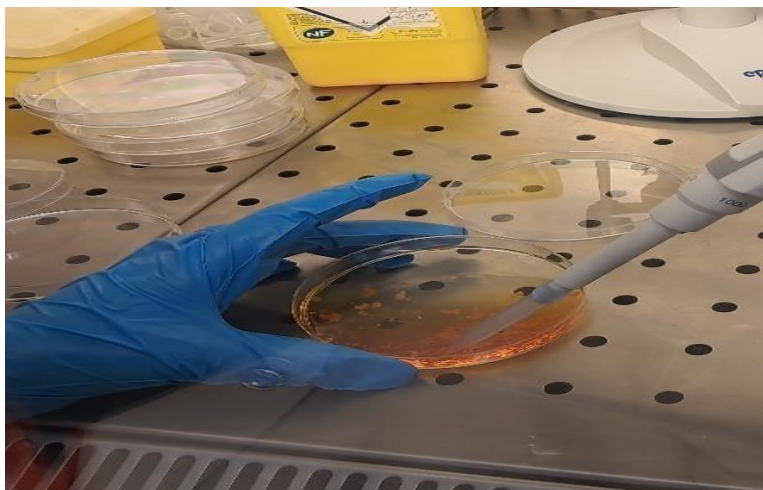


Figure 16 : Ilots récoltés dans une autre boîte de Pétri contenant du HBSS (1X).

II.2.2. Mesure de la viabilité des îlots de Langerhans traités par le propionate et du nitrite de sodium.

L'effet des additifs alimentaires sur la viabilité des îlots de Langerhans a été testée par une méthode colorimétrique par le bleu de trypan (**Horaguchi & Merrell, 1981**)

Principe

Utilisation du bleu de trypan , un colorant vital (d'exclusion), qui pénètre dans les cellules mortes alors que les cellules intactes ne sont pas colorée (**Strober, 1997**). La proportion relative des cellules colorées ou non est un reflet exact du nombre de cellules vivantes ou mortes et donc de la viabilité de l'ensemble de la population cellulaire, en relation directe avec la concentration du toxique étudié.

Mode opératoire

Les îlots pancréatiques isolés ont été pré-incubés dans le milieu de culture RPMI contenant du nitrite de sodium ou du propionate de sodium à des concentrations de 100 µg/ml, 10 µg/ml et 1µg/ml dans des puits de culture d'une plaque à 24puits. Après 24 heures d'incubation à 37°C et 5% de CO₂, les îlots ont subi une digestion par la trypsine. La suspension unicellulaire résultante a été ensuite soumise à une centrifugation 500 rpm pendant 5min. Le culot de cellules des îlots a ensuite été remis en suspension dans un nouveau milieu frais et la proportion de cellules viables a été estimée en diluant un petit volume de suspension cellulaire par la solution de bleu trypan (4%). Le comptage des cellules vivantes et mortes a été réalisé à l'aide de la cellule Nauber (hémocytomètre) sous microscope optique.(**Strober, 1997**)

II. Matériel et méthodes

Expression des résultats

Les pourcentages des cellules mortes et vivantes ont été déterminés par l'équation (1) et (2) et la concentration cellulaire a été calculée par l'équation (3) :

$$\text{Eq. (1).....} \quad C_v (\%) = \frac{N_{cv}}{N_{ct}} \times 100$$

N_{cv} : Nombre de cellules vivante comptées par carre de la cellule de Nauber

N_{ct} : Nombre de cellules totale comptées par carre de la cellule de Nauber

$$\text{Eq. (2).....} \quad C_m (\%) = \frac{N_{cm}}{N_{ct}} \times 100$$

N_{cm} : Nombre de cellules mortes comptées par carre de la cellule de Nauber

N_{ct} : Nombre de cellules totale comptées par carre de la cellule de Nauber

$$\text{Eq. (3).....} \quad C \text{ (nc/ml)} = \frac{NC}{N_c \times 10^{-4} \text{ mL}}$$

C : nombre de cellule /ml

N_c : Nombre de cellules comptées par carre de la cellule de Nauber

N_c : nombre de carre par cellule de Nauber

II.2.3. Mesure de la viabilité des cellules NIT-1 traitées par le propionate ou le nitrite de sodium

II.2.3.1. Préparation de la culture cellulaire de la lignée NIT-1

Les cellules NIT-1 ont été cultivées dans un flacon T-25 dans un milieu RPMI-1640 filtré. Le milieu contient 10 % de SVF, 1 % de pénicilline-streptomycine et un antifongique. Le flacon a ensuite été conservé à 37 °C dans un incubateur humide à 5 % de CO₂ et les cellules ont pu croître au moins jusqu'à 70 % de confluence. Une suspension unicellulaire a ensuite été produite en retirant le milieu de culture et en réincubant les cellules adhérentes avec une solution de trypsine à 0,25 % d'EDTA pendant 3 à 5 min. Après le détachement cellulaire, l'action de la trypsine a été arrêtée par l'ajout de milieu RPMI-1640 contenant du sérum comme inhibiteur de la trypsine. (JoVE Science Education Database., 2024)

Enfin, la suspension cellulaire a été transférée dans un tube conique stérile suivi d'une centrifugation. Le surnageant a été jeté tandis que le culot cellulaire a été remis en suspension dans un milieu de culture supplémenté à la concentration d'ensemencement appropriée et utilisé pour différents tests.

II. Matériel et méthodes

II.2.3.2. Evaluation de l'effet cytotoxique par test XTT

L'effet des additifs alimentaires sur la viabilité des cellules NIT a été évalué par la méthode colorimétrique XTT

Principe

Le test au XTT est utilisé pour mesurer l'activité métabolique des cellules, en tant qu'indicateur de la viabilité, de la prolifération et de la toxicité cellulaires. Ce dosage colorimétrique repose sur la réduction du sel de tétrazolium (sel sodique hydraté de l'acide 3'-[1-(phénylaminocarbonyl)-3,4-tétrazolium]-bis(4-méthoxy-6-nitro)benzènesulfonique), connu sous le nom de XTT, en un colorant orange, le formazan, par des cellules métaboliquement actives (**Roehem et al., 1991**). Le formazan formé est soluble en solution aqueuse, il est directement quantifié à l'aide d'un spectrophotomètre à balayage multi-puits. Une augmentation du nombre de cellules vivantes entraîne une hausse de l'activité des déshydrogénases mitochondriales présentes dans l'échantillon. Cette hausse est directement corrélée avec la quantité de formazan orange formé, dont l'absorbance permet de suivre l'évolution (**Jost et al., 1992**).

Préparation du mélange de marquage au XTT

Mélanger 5 ml du réactif de marquage au XTT à 1 mg/ml dans milieu de culture du RPMI 1640) avec 0.1ml du réactif de couplage électronique PMS (méthylsulfate de N-méthyl-dibenzopyrazine) au bain-marie à 37 °C. Bien mélanger chaque flacon de façon à obtenir une solution limpide.

Mesure de la viabilité cellulaire

Le Protocole utilisé pour déterminer l'effets cytotoxique du propionate de sodium et nitrate de sodium sur les cellules β est celui décrit par Scediero *et al.*, (**1988**). Les cellules NIT-1 ont étéensemencées dans des puits de culture d'une plaque à 96 puits à fond plat à raison de 10^4 cellules/puits dans 190 μ l de milieu de culture. Les cellules ont été incubées pendant 24 heures à 37 °C sous 5 % de CO₂ puis 10 μ l de propionate ou nitrate de sodium solubilisée préalablement dans du tampon PBS à différentes concentrations (2,5 μ g/ml à 20 μ g/ml) ont été ajoutées. Après incubation pendant 72h à 37°C et 5% de CO₂, les cellules ont été lavées avec du tampon PBS et 200 μ l du milieu de culture contenant 50 μ l du mélange de marquage au XTT ont été ajoutés à chaque puit de culture. Les cultures ont ensuite été ré-incubées pendant 4

II. Matériel et méthodes

heures à 37 °C sous 5 % de CO₂. Ensuite, les absorbances du formazan à 490 nm ont été mesurées à l'aide d'un lecteur de microplaques. Les absorbances de références ont été mesurées à 660 nm.

Les cellules incubées dans le milieu de culture sans additifs alimentaires ont servi de contrôle (100 % de viabilité).

Le taux de viabilité est calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ viabilité} = \frac{\Delta\text{Abs Control} - \Delta\text{Abs Essai}}{\Delta\text{Abs Control}} \times 100$$

II.2.4. Dosage de l'insuline produite par cellules NIT-1 traités au propionate de sodium ou nitrate de sodium

L'effet du propionate de sodium et du nitrite de sodium sur la production d'insuline par les cellules NIT-1 a été évalué à l'aide d'un kit ELISA sandwich spécifique pour l'insuline (**Even et al., 2007**)

Les îlots pancréatiques pré-isolés ont été étalés dans une microplaque dans un milieu RPMI-1640 supplémenté en sérum et conservés à 37 °C dans 5 % de CO₂ et 95 % d'air pendant la nuit. Un jour après, les molécules propionate et nitrite de sodium ont été ajoutés à des concentrations 20 µg/ml et 10 µg/ml. Après 24 heures d'incubation, le milieu de culture a été aspiré et remplacé par un milieu à faible teneur en glucose en DMEM. Après 2 heures autres heures d'incubation, le milieu de culture a été récupéré pour réaliser le dosage de l'insuline produite.

Le dosage de l'insuline a été réalisé par Kit "*Mouse Ins1/ Insulin ELISA Kit*" selon la méthode décrite par Even et al., (**2007**):

1. 100 µL d'anticorps monoclonaux anti-insuline dilués dans un tampon de revêtement sont ajoutés à chaque puits, puis incubés à 4°C pendant la nuit.
2. Après élimination de l'excès d'anticorps, les puits sont lavés avec du tampon de lavage et 200 µL de la solution de blocage sont ajoutés à chaque puits pour saturer les sites non spécifiques, suivis d'une incubation de 1 à 2 heures à température ambiante.

II. Matériel et méthodes

3. La solution de blocage est retirée et les puits sont lavés trois fois avec le tampon de lavage. Ensuite, 100 μL des surnageant de culture des ilots de Langerhans ou de cellule NIT-1 traités ou non avec du propionate de Na ou du nitrite de Na sont ajoutés dans les puits appropriés et incubés pendant 1 à 2 heures à température ambiante. Les surnageants sont éliminés et les puits sont lavés 3 fois avec la solution de lavage.
4. 100 μL des anticorps polyclonaux anti-insuline conjugués à peroxydase de raifort sont ajoutés dans chaque puits et laissé incubé 2 heures à température ambiante. L'excès de l'anticorps conjugué est éliminé et les puits sont lavés quatre fois avec le tampon de lavage.
5. 100 μL du substrat chromogénique TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) sont ajoutés dans chaque puit. Les plaques d'ELISA sont mis à incuber à l'abri de la lumière jusqu'à ce qu'une coloration se développe (environ 10-30 minutes), puis 50 μL de solution H_2SO_4 sont ajoutés à chaque puits pour arrêter la réaction enzymatique, stabilisant ainsi la couleur développée.
6. La densité optique (OD) de chaque puits est mesurée à 450 nm à l'aide d'un lecteur de plaque ELISA.

Les résultats du dosage sont déterminés en se référant à courbe d'étalonnage obtenue avec une série de concentrations connues d'insuline standard dosée avec le même Kit dans les mêmes conditions.

II.2.5. Mesure de la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS)

Principe

La production de ROS intracellulaires dans NIT-1 potentiellement induite par le propionate de sodium ou le nitrite de sodium est déterminée par spectrophotomètre de fluorescence (**Hillegass et al., 2010**).

Le test implique la détection des espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans les cellules en utilisant une sonde fluorescente telle que le DCFDA (Dichlorodihydrofluorescéine diacétate) qui pénètre dans les cellules et sert d'indicateur indirect des niveaux intracellulaires de ROS. À l'intérieur de la cellule, le groupes diacétate du CM-H2DCFDA sont clivés par des estérases intracellulaires, transformant le composé en DCFH non fluorescent, qui réagit avec les ROS pour produire le DCF, un composé fluorescent vert intense (Fig. 17) détectable par spectroscopie de plaque de fluorescence (**Hillegass et al., 2010**). L'intensité de la fluorescence, mesurée généralement à $\text{Ex/Em} = 495/529$ nm reflète la quantité de ROS intracellulaire

II. Matériel et méthodes

présente. (Kim & Xue, 2020)

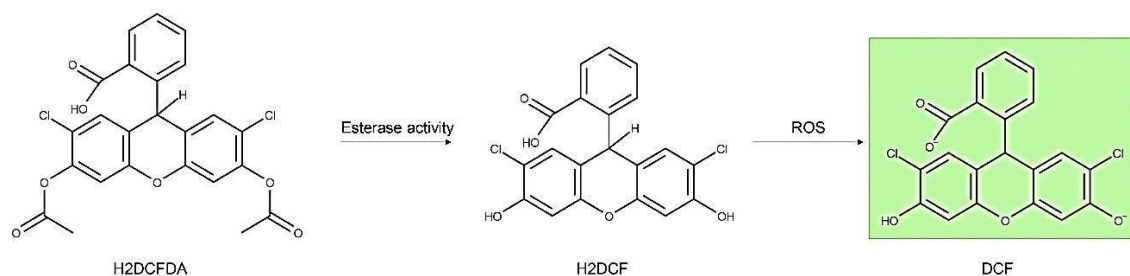


Figure 17. Mécanisme de la sonde H2DCFDA de détection des ROS. (Ng et Ooi, 2021)

Le H2DCFDA est clivé par les estérases intracellulaires en H2DCF non fluorescent, ce dernier est oxydé par divers ROS en DCF fluorescent vert.

Protocole expérimentale

10^5 cellules de la lignée NIT-1 ont été semées par puits dans une plaque à 96 puits, atteignant une confluence de 70 à 80 % en 24 heures. Les cellules adhérentes ont ensuite été traitées séparément avec 20 $\mu\text{g/ml}$ et 10 $\mu\text{g/ml}$ de propionate de sodium ou de nitrite de sodium. Après une incubation de 24 heures à 37°C sous 5% de CO_2 , les cellules ont été lavées avec 100 μl de PBS. Ensuite, 100 μl de DCFDA dilué dans du PBS ont été ajoutés à chaque puits contenant les cellules adhérentes prétraitées avec le propionate ou le nitrite. Après incubation de 72 heures, le DCFDA n'ayant pas réagi a été éliminé et 100 μl de PBS ont été ajoutés aux cultures et l'intensité de la fluorescence a été immédiatement mesurée à $\text{Ex/Em} = 495/529 \text{ nm}$ (Kim & Xue, 2020). Le contrôle a été réalisé avec une culture de cellule NIT-1 non traité au propionate ou au nitrite.

II.2.6. Analyse statistique

L'analyse statistique a été réalisée par le programme Graph Pad Prisme 10 en utilisant l'analyse statistique one way Anova.

***III. RESULTATS ET
DISCUSSIONS***

III. Résultats et discussions

III.1. Ilots de Langerhans isolés

Les ilots ont été isolés à partir des souris Balb/C normales pour tester leur viabilité après leurs traitements aux deux additifs alimentaires E250 ‘Nitrite de sodium’ et E281 ‘Propionate de sodium’. Les ilots isolés étaient en bon état comme le montre la photographie de la figure 18.

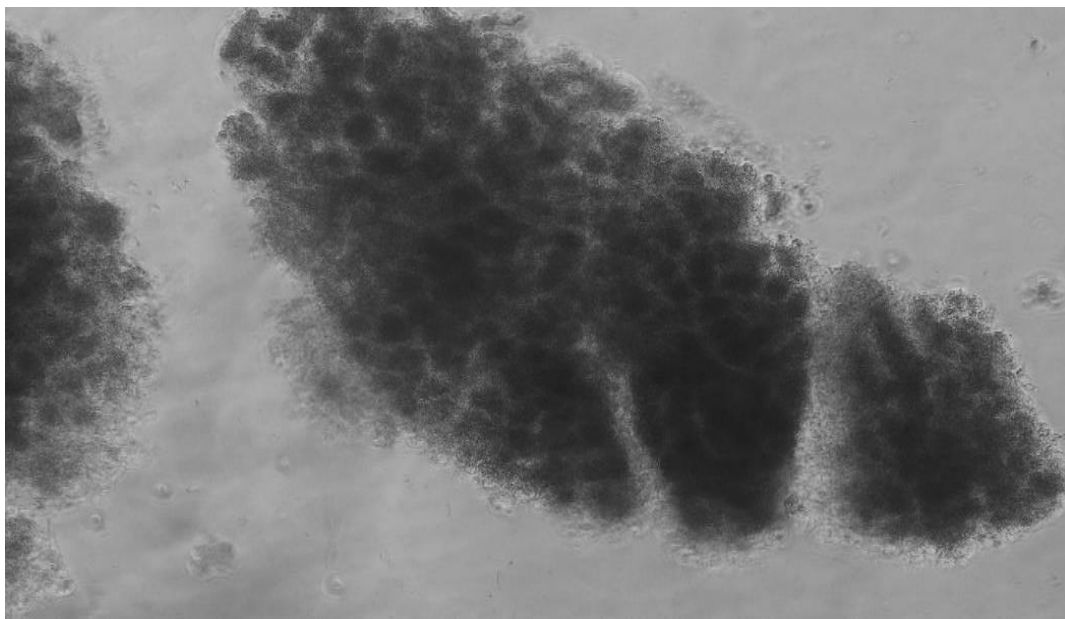


Figure 18 : Observation au microscope à phase inversée des ilots de Langerhans isolés (G x10)

Le principal objectif de l'isolement des îlots pancréatiques, pour la réalisation des études *in vitro*, est d'obtenir des îlots purifiés viables qui répondent de manière cohérente avec leur fonction *in vivo*. Les éléments clés d'une procédure réussie d'isolement des îlots sont : La digestion enzymatique des tissus reliant les îlots au tissu exocrine, séparation des îlots des tissus non îlots, et culture des îlots isolés dans un environnement qui maintient la viabilité cellulaire (Carter et al., 2009).

III.2. Effet du E281 et E250 sur la viabilité des îlots de Langerhans

Les résultats du test de viabilité réalisé par méthode colorimétrique en utilisant le bleu de trypan, des ilots de Langerhans isolés de souris et traités par 1µg/ml, 10µg/ml et 100µg/ml de propionate de sodium (E281) ou nitrite de sodium (E250) ainsi que par une dose unique de streptozotocine (2mM) sont illustrés dans l'histogramme de la Fig.19.

III. Résultats et discussions

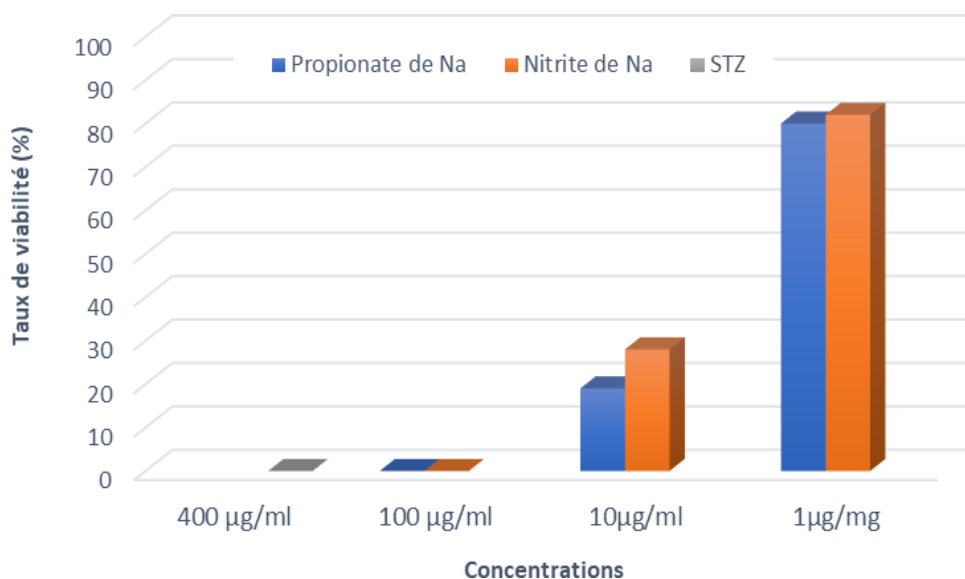


Figure 19 : Histogramme représentant les taux de viabilité des cellules des îlots de Langerhans traitées au propionate de sodium (E281), nitrite de sodium (E250) et STZ.

L'application de la streptozotocine utilisée comme référence à une concentration de 1mM a entraîné une viabilité cellulaire des îlots de Langerhans de 0 %, signifiant la mort totale de toutes les cellules. La streptozotocine (STZ), utilisée pour induire un modèle de diabète en raison de sa toxicité sélective envers les cellules β pancréatiques, présente une concentration cytotoxique qui varie en fonction de plusieurs facteurs, notamment le type de cellule, les conditions de culture et la durée d'exposition.

En général, les concentrations cytotoxiques de STZ pour les cellules β se situent entre 100 $\mu\text{g/ml}$ et 1 mg/ml (Szkudelski, 2001 ; Lenzen, 2008 ; Bolzán & Bianchi, 2002). Une concentration de 400 $\mu\text{g/ml}$ entraîne une mortalité cellulaire totale (0 % de viabilité) pour les îlots de Langerhans, ce qui est attendu pour une substance hautement toxique et extrêmement Diabétogène comme la STZ (Abdollahi & Hosseini, 2014)

L'application de différentes concentrations de nitrite de sodium (E250) a donné les résultats suivants :

- À 100 $\mu\text{g/ml}$, la viabilité cellulaire est de 0 %, indiquant une toxicité maximale et une mortalité totale des cellules.

III. Résultats et discussions

- À 10 µg/ml, la viabilité cellulaire est de 28 %, montrant une toxicité significative mais moins sévère que celle observée à la concentration la plus élevée.
- À 1 µg/ml, la viabilité cellulaire est de 65 %, ce qui indique que cette concentration a un effet toxique moins prononcé, permettant à une majorité des cellules de survivre.

Pour le propionate de sodium (E281), l'application de différentes concentrations a donné les résultats suivants :

- À 100 µg/ml, la viabilité cellulaire est de 0 %, démontrant une toxicité maximale similaire à celle observée avec la STZ et le nitrite de sodium à haute dose.
- À 10 µg/ml, la viabilité cellulaire est de 19 %, indiquant une toxicité importante mais moindre par rapport à 100 µg/ml.
- À 1 µg/ml, la viabilité cellulaire est de 80 %, suggérant une toxicité relativement faible à cette concentration et une survie majoritaire des cellules

Le nitrite de sodium et le propionate de sodium ont tous deux montré une cytotoxicité dépendante de la dose ; les concentrations élevées entraînent une mortalité totale de toutes les cellules des îlots de Langerhans et les concentrations plus faibles affichant une réduction progressive de la toxicité. À titre de comparaison, à une concentration de 10 µg/ml, le nitrite de sodium s'est révélé plus toxique que le propionate de sodium, bien que les deux substances présentent une toxicité réduite à cette faible concentration.

La cytotoxicité de ces deux additifs alimentaire forte à concentrations élevées et modérée à concentrations plus faibles peut impliquer plusieurs mécanismes. En comparant aux résultats des études réalisées sur la cytotoxique du bisphénol envers les îlots pancréatiques, différentes voies sont impliquées dans la cytotoxicité des additifs E281 et 245 (Fig. 20) (**Banerjee et al., 2022**).

III. Résultats et discussions

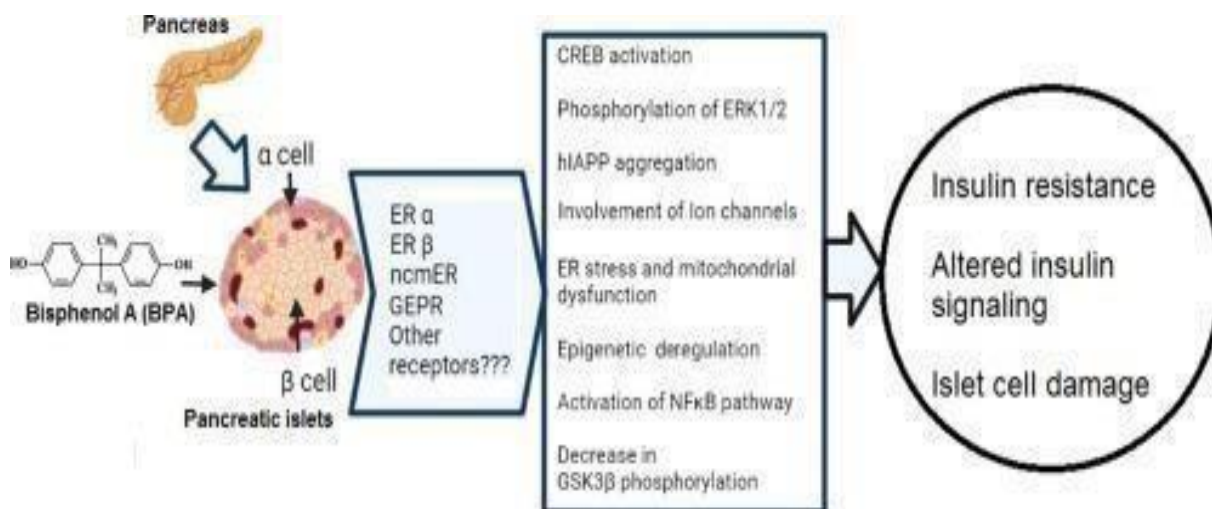


Figure 20 : Voies potentielles impliquées dans le mécanisme de cytotoxicité des substances diabétogènes comme le bisphénol (Banerjee et al., 2022)

Les voies cellulaires et moléculaires potentielles par lesquelles une substance chimique diabétogène agit sur les îlots pancréatiques peuvent mettre en jeu l'action sur les récepteurs des œstrogènes α et β , mais aussi des récepteurs non canoniques membranaires et des récepteurs couplés aux protéines G. Ils peuvent moduler les canaux ioniques et les facteurs de transcription, provoquant l'agrégation de polypeptides amyloïdes (Gong et al., 2013), l'installation du stress du réticulum endoplasmique et mitochondrial, et peuvent activer les facteurs NF κ B dans les cellules β pancréatiques. L'altération du rapport entre les cellules β et α des îlots, perturbant ainsi la sécrétion de glucagon, est une autre voie qui peut être impliquée, (Banerjee et al., 2022).

Il est crucial de comprendre comment les additifs alimentaires diabétogènes agissent afin d'évaluer les risques liés à leur exposition à différentes doses.

III.3. Effet du E281 et E250 sur la viabilité des cellules de la lignée NIT-1

Les taux de viabilité des cellules β (NIT-1) traitées pendant 72heurs avec du nitrite de sodium (E250) et du propionate de sodium (E281) à des concentrations de 20 μ g/ml, 10 μ g/ml sont représentés dans la Fig. 21.

III. Résultats et discussions

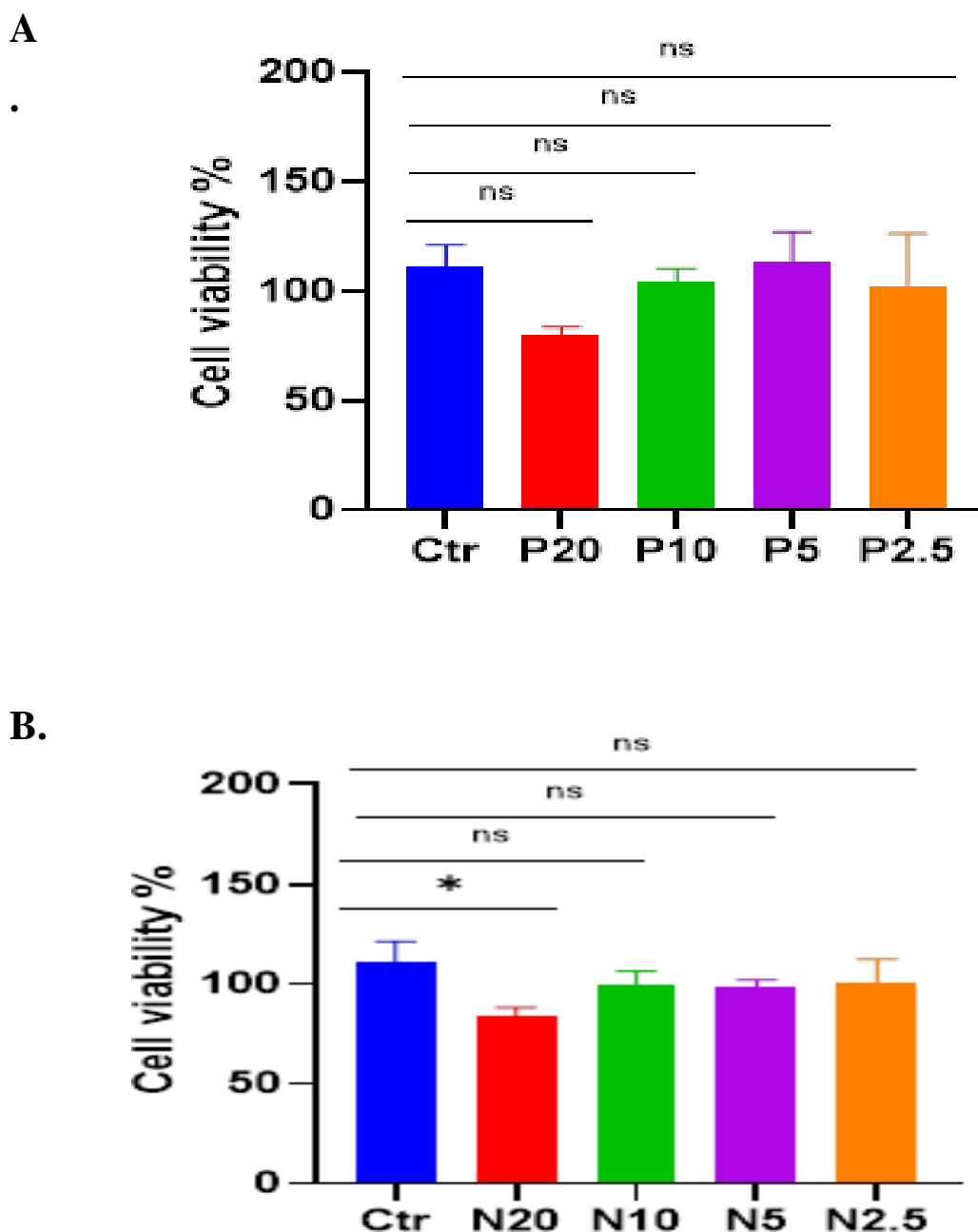


Figure 21 : Histogramme représentant les taux de viabilité des cellules NIT-1 traitées avec 20µg/ml, 10µg/ml, 5µg/ml et 2,5µg/ml de propionate de sodium (A) ou de nitrite de sodium, (B). Ctr : le control (cellules non traitées). Les données sont présentées sous forme de moyenne \pm écart-type. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide d'une analyse de variance (ANOVA) unidirectionnelle suivie d'un Post-test de Brown-Forsythe, avec une signification * $p < 0,05$.

Les résultats obtenus (Fig 20) montrent que l'effet des deux additifs alimentaires sur la viabilité cellulaire diminue en fonction de la diminution de la concentration des deux produits révélant que la cytotoxicité sur les cellules NIT-1 observée est dose-dépendante.

III. Résultats et discussions

Les résultats indiquent qu'à 20µg/ml, le propionate de sodium et le Nitrite réduisent la viabilité cellulaire d'environ 16 et 24 % respectivement. Bien que le test statistique ne montre pas de signification que pour le nitrite de sodium (viabilité de 76% uniquement), le propionate peut aussi être considéré comme relativement toxique sur les cellules β en même titre que le nitrite de sodium. À des concentrations plus faibles, la viabilité cellulaire est moins affectée, suggérant que les cellules peuvent tolérer des doses inférieures de ces deux additifs.

Le nitrate de sodium est un conservateur synthétique qui suscite des préoccupations en raison de sa toxicité potentielle. La dose journalière admissible peut être rapidement atteinte à partir des additifs alimentaires, de la présence naturelle dans les aliments et des contaminants environnementaux. Les nitrates en eux-mêmes ne sont pas particulièrement toxiques, mais leur transformation en nitrites dans l'organisme, et leur combinaison avec des protéines alimentaires pour former des nitrosamines. **(Hamon, 2007)**

Selon notre recherche bibliographique, on n'a pas trouvé d'études de cytotoxicité du nitrite de sodium sur cellules β pancréatiques. En revanche, des études de ce composé sur des cellules tumorales ont été réalisées notamment en ce qui concerne sa capacité à induire l'apoptose qui peut être lié à l'induction d'un stress oxydatif, conduisant à des dommages et mort cellulaires. **(Özen et al., 2014)**

Par exemple, l'étude de Sun et al., **(2006)** a montré qu'à concentrations élevées, le nitrite de sodium entraîne une diminution dose-dépendante de la prolifération des cellules épithéliales d'adénocarcinome gastrique humain avec augmentation de la libération des cytokines inflammatoires -interleukine 1 bêta (IL-1 β), d'interleukine 6 (IL-6) et de facteur de nécrose tumorale (TNF- α).

Plus récemment, **Liu et al., (2015)** ont montré que les cellules AGS traitées avec des concentrations élevées de nitrite de sodium ou pendant des durées prolongées montrent un effet cytotoxique marqué se traduisant par une augmentation significative de la mort cellulaire, une libération accrue de LDH et l'induction de l'apoptose par activation des cascades caspase-9, caspase-3 (voie intrinsèque) et caspase-6. En revanche, l'activité de la caspase-8 est restée inchangée, indiquant que l'apoptose ne passe pas par la voie extrinsèque.

III. Résultats et discussions

Le propionate de sodium (E281) est couramment utilisé comme conservateur pour inhiber la croissance de moisissures et autres micro-organismes dans les produits alimentaires. (Salih, 2022). Des études de toxicité ont été faites par l'EFSA pour évaluer la sécurité du propionate de sodium qui a conclu qu'il est sans danger dans les limites d'utilisation autorisées. Cependant, des études montrent qu'à des concentrations plus élevées, il peut être toxique pour les cellules. (EFSA Journal, 2014).

L'effet cytotoxique du propionate de sodium observé sur les cellules β NIT-1 conduisant à la mort cellulaire de l'augmentation peut résulter de l'activation à la fois des voies de l'apoptose et de l'autophagie. En effet, sur des cellules tumorales, il a été démontré que le propionate de sodium augmente les niveaux d'expression des protéines pro-apoptotiques p53, caspase-3 et BAX, tout en réduisant l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2. De plus, il favorise l'autophagie en augmentant les niveaux d'expression de LC3, Beclin-1 et Atg5, et en diminuant les niveaux de p62. (Filippone et al., 2022)

Kim et al., (2019) ont montré que le propionate de sodium, induit l'apoptose et la régulation du cycle cellulaire dans les cellules cancéreuses, en inhibant la prolifération des cellules cancéreuses en induisant l'arrêt de cycle cellulaire en phase G2/M ce qui pourrait avoir des implications sur les différentes cellules du pancréas régulant la survie cellulaire et l'apoptose.

II.3.1. Induction de la production des ROS

L'induction d'un stress cellulaire au niveau des cellules NIT-1 par le propionate de sodium (E281) et le nitrite de sodium (E250) a été suivie par mesure de la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS) par spectrophotométrie de fluorescence à l'aide de la sonde fluorescente DCFDA. Les résultats obtenus et traités statistiquement par le test ANOVA sont représentés par les histogrammes de la Fig. 22.

III. Résultats et discussions

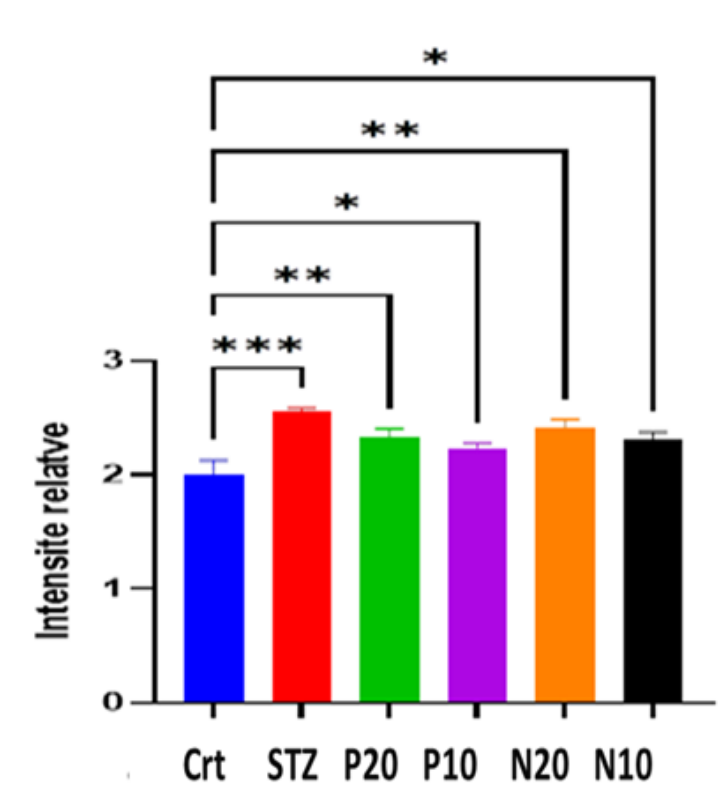


Figure 22 : Histogramme représentant les taux de ROS produite par les cellules NIT-1 traitées avec 20 μ g/ml et 10 μ g/ml de propionate de sodium ou de nitrite de sodium. Ctr : le control négatif ; SZT (control positif). Les données sont présentées sous forme de moyenne \pm écart-type. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide d'une analyse de variance (ANOVA) unidirectionnelle suivie d'un Post-test de Brown-Forsythe, avec une signification * $p < 0,05$.

Le contrôle négatif, où aucun additif n'est ajouté au milieu de culture, présente la plus faible intensité de fluorescence moyenne, indiquant une production de ROS de base dans les cellules NIT-1 non soumises à un traitement potentiellement inducteur de stress oxydatif.

Pour la streptozotocine, un agent cytotoxique de référence, on observe une augmentation notable de l'intensité moyenne de fluorescence, ce qui reflète une augmentation de la production de ROS, indiquant ainsi une forte induction de stress oxydatif.

Pour les cellules NIT-1 traitées au Propionate de sodium :

- À 20 μ g/ml, on observe une augmentation de la production de ROS par rapport au contrôle négatif, mais cette augmentation est inférieure à celle provoquée par la STZ.

III. Résultats et discussions

- À 10 µg/ml, il y a également une augmentation de la production de ROS par rapport au contrôle négatif, bien que moins prononcée qu'à 20 µg/ml et que celle induite par la streptozotocine.

Pour les cellules NIT-1 traitées au Nitrite de sodium :

- À 20 µg/ml, l'histogramme montre une augmentation de la production de ROS par rapport au contrôle négatif, légèrement plus élevée que celle du propionate de sodium à la même concentration, mais inférieure à celle de la streptozotocine.
- À 10 µg/ml, la production de ROS est encore plus élevée que le contrôle négatif, mais inférieure à celle observée à 100 µg/ml de nitrite de sodium et bien sûr inférieure à celle de la streptozotocine.

Une étude menée par Ding et al. (2021) sur les tissus intestinaux de Zebra fish (*Danio rerio*) a révélé que le propionate de sodium induisait un stress oxydatif. Les chercheurs ont observé que la propionylation de l'enzyme superoxyde dismutase 2 (SOD2) à la lysine 132 réduisait son activité, entraînant ainsi une augmentation du stress oxydatif et des dommages dans les tissus intestinaux des poissons zèbres. Ce stress oxydatif provoqué par le propionate a également altéré la composition du microbiote intestinal des poissons zèbres, suggérant des effets systémiques sur la santé intestinale.

Dans une étude menée par Ansari et al. (2015), l'effet du nitrite de sodium (NaNO₂) sur les érythrocytes humains en conditions *in vitro* a été investigué. Les résultats ont révélé une diminution dose-dépendante des niveaux de glutathion réduit, de groupes sulfhydriles totaux et de groupes amine. Cette diminution s'est accompagnée d'une augmentation de l'oxydation et de l'agrégation de l'hémoglobine, de la peroxydation lipidique, de l'oxydation des protéines et des niveaux de peroxyde d'hydrogène, indiquant ainsi une induction de stress oxydatif. De plus, les activités des principales enzymes de défense antioxydante étaient réduites au niveau des érythrocytes exposés au NaNO₂. Les activités des enzymes des voies glycolytique et des pentoses phosphates étaient également compromises. En revanche, une augmentation significative de l'acide phosphatase ainsi que de l'AMP désaminase, marqueurs du stress oxydatif des érythrocytes, a été observée.

L'étude menée par Halliwell et Gutteridge (2015) a démontré que le traitement au NaNO₂ entraîne une augmentation significative du niveau de H₂O₂, qui peut réagir avec des métaux

III. Résultats et discussions

de transition tels que le fer pour produire le radical hydroxyle, nocif pour les cellules. Cette augmentation contribue également à une peroxydation lipidique accrue, potentiellement due à l'augmentation des niveaux de radical superoxyde et de H₂O₂, étant donné que les activités de la SOD et de la catalase, enzymes utilisant ces composés comme substrats, diminuent. De plus, une augmentation notable, jusqu'à trois fois, du contenu en carbonyle des protéines a été observée, attribuée à l'introduction de groupes carbonyles par les ROS dans les résidus d'acides aminés

III.3.3. Inhibition de la Production de l'insuline

Les résultats du dosage par ELISA de l'insuline secrétée par les cellules β de la lignée NIT-1 traitées au propionate ou nitrite de Na sont représentés dans la Fig. 23.

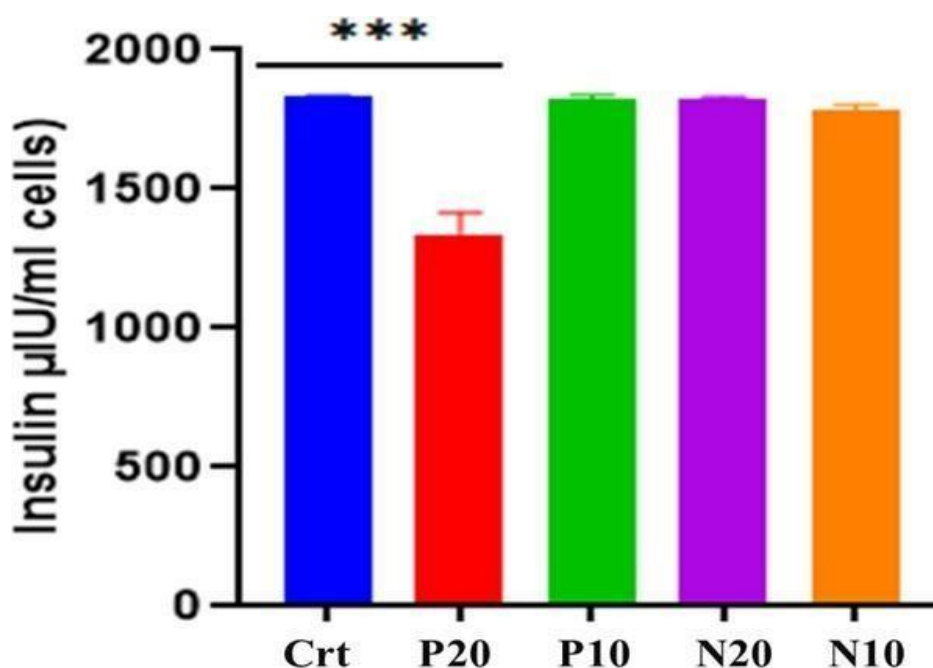


Figure 23 : Histogramme représentant les taux d'insuline produite par les cellules NIT-1 traitées avec 20µg/ml et 10µg/ml de propionate de sodium ou de nitrite de sodium. Ctr : le control négatif. Les données sont présentées sous forme de moyenne \pm écart-type. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide d'une analyse de variance (ANOVA) unidirectionnelle suivie d'un Post-test de Brown-Forsythe, avec une signification * $p < 0,05$.

III. Résultats et discussions

Les résultats indiquent que l'exposition des cellules NIT-1 à 10 µg/ml de propionate de sodium ou de nitrate de sodium, n'a pas affecté significativement leur production d'insuline. Cependant, à une concentration de 20 µg/ml, le propionate de sodium a significativement réduit la sécrétion d'insuline par les NIT-1 par rapport au groupe témoin, tandis que le nitrite de sodium à cette même concentration n'a montré aucun effet significatif sur la production d'insuline par ces cellules.

Les résultats suggèrent que le propionate de sodium, à une concentration plus élevée (20 µg/ml), pourrait avoir un impact négatif sur la sécrétion d'insuline des cellules NIT-1. Cela pourrait être dû à divers mécanismes, tels que des altérations dans les voies métaboliques ou des effets directs sur la fonction des cellules β-pancréatiques responsables de la production d'insuline. En revanche, le nitrite de sodium à la même concentration n'a pas montré d'effet significatif, ce qui pourrait indiquer une différence dans la manière dont ces composés influencent la sécrétion d'insuline dans ce modèle cellulaire spécifique.

Une étude menée par Ximenes et al. (2007) sur les îlots pancréatiques de rats albinos a montré que l'exposition au propionate a entraîné une diminution significative de la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose. Les chercheurs ont expliqué que cette inhibition de la sécrétion d'insuline par le propionate résulte principalement de la diminution des niveaux d'ATP intracellulaire, perturbant ainsi l'activité des canaux potassique ATP dépendant et réduisant l'entrée de calcium nécessaire à la sécrétion d'insuline.

Récemment, l'étude réalisé par Prasad et al., (2023) ont révélé que le propionate pouvait influencer la survie et la fonction des cellules bêta. Dans des modèles murins et humains, le propionate à provoque une augmentation de la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose,

CONCLUSION

Conclusion

L'objectif de notre étude est d'évaluer l'effet cytotoxique des additifs alimentaires, le nitrite de sodium (E250) et le propionate de sodium (E281), sur les cellules β pancréatiques et sur la production des ROS et de l'insuline. Les résultats obtenus ont mis en évidence des résultats significatifs concernant la viabilité cellulaire, la production d'insuline et l'induction du stress oxydatif.

Sur la viabilité Cellulaire, l'études a montré qu'à concentrations de 100 μ g/ml, tant le nitrite de sodium que le propionate de sodium ont provoqué une mortalité cellulaire totale de toutes les cellules des ilots pancréatiques. À concentration plus faible de 10 μ g/ml, la toxicité a significativement diminué (taux de viabilité de 20-25 %). En revanche, l'effet de ces additifs est moins toxique sur les cellules β NIT-1 avec des taux de viabilité d'environ 75 et 95 % au concentrations respectives de 20 μ g/ml et 10 μ g/ml.

L'exposition des cellules β pancréatiques model (NIT-1) à 20 μ g/ml de ces additifs alimentaires a entraîné une diminution significative de la production d'insuline et une augmentation de la production de ROS par rapport au contrôle négatif. À 10 μ g/ml, il y a également une altération de la production de l'insuline et des ROS mais moins prononcée qu'à 20 μ g/ml.

Suite à ces résultats, plusieurs perspectives d'études expérimentales pourraient être envisagées pour approfondir la compréhension des effets des additifs alimentaires sur les cellules β pancréatiques et leur implication dans la régulation de l'insuline et le stress oxydatif citant :

- ✚ Détermination des concentrations seuils des additifs alimentaires en dessous desquelles ils n'ont pas d'effet cytotoxique sur les ilots et les cellules β pancréatiques.
- ✚ Réalisation d'études *in vivo* pour confirmer les résultats observés *in vitro* dans un contexte physiologique complet.
- ✚ Étude de l'effet protecteur potentiel d'antioxydants ou d'autres composés bioactifs contre l'induction de stress oxydatif et la cytotoxicité des additifs alimentaires
- ✚ Évaluation de l'impact de l'exposition aux additifs alimentaires sur l'organisme entier, en particulier sur le métabolisme glucidique et la fonction pancréatique.

*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques

1. Abdollahi, A. and Hosseini, A. (2014) 'Streptozotocin', in Wexler, P. (ed.) *Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)*. Academic Press, pp. 402-404.
2. Abdollahi, M. & Hosseini, R. (2019) 'Streptozotocin-induced diabetic models: Pathophysiology and considerations in rats', *Methods in Molecular Biology*, vol. 1965, pp. 295-303.
3. Adler, A. I., Stratton, I. M., Neil, H. A. W., Yudkin, J. S., Matthews, D. R., Cull, C. A., Wright, A. D., Turner, R. C. & Holman, R. R. (2021) 'Additives in Processed Foods and Their Impact on Metabolic Health', *Journal of Metabolic Disorders*, vol. 45, no. 3, pp. 205-213.
4. Adler, G.K., Hornik, E.S., Murray, G., Bhandari, S., Yadav, Y., Heydarpour, M., Basu, R., Garg, R. & Tirosh, A. (2021) 'Acute effects of the food preservative propionic acid on glucose metabolism in humans', *BMJ Open Diabetes Research and Care*, vol. 9, no. 1, p. e002336.
5. Alonso-Magdalena, P., Quesada, I. & Nadal, A. (2011) 'Endocrine disruptors in the etiology of type 2 diabetes mellitus', *Nature Reviews Endocrinology*, vol. 7, no. 6, pp. 346-353.
6. American Diabetes Association (2021) 'Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus', *Diabetes Care*, vol. 44, Supplement 1, pp. S15-S33.
7. Ansari, F.A., Ali, S.N. & Mahmood, R. (2015) 'Sodium nitrite-induced oxidative stress causes membrane damage, protein oxidation, lipid peroxidation and alters major metabolic pathways in human erythrocytes', *Toxicology in Vitro*, vol. 29, no. 7, pp. 1878-1886.
8. Bahadoran, Z., Ghasemi, A., Mirmiran, P., Azizi, F. & Hadaegh, F. (2016) 'Nitrate-nitrite-nitrosamines exposure and the risk of type 1 diabetes: a review of current data', *World Journal of Diabetes*, vol. 7, no. 18, p. 433.
9. Banerjee, O., Singh, S., Saha, I., Pal, S., Banerjee, M., Kundu, S., Syamal, A.K., Maji, B.K. & Mukherjee, S. (2022) 'Molecular dissection of cellular response of pancreatic islet cells to Bisphenol-A (BPA): A comprehensive review', *Biochemical Pharmacology*, vol. 201, p. 115068.
10. Barbieux, C. (2017) *Relations intercellulaires dans les îlots de Langerhans et leur rôle dans la sécrétion du glucagon*.
11. Barton, D. H. R., Chapman, R. F. & Petrow, B. W. (1950) 'The Constitution and Synthesis of Alloxan', *Journal of the Chemical Society*, pp. 1885-1891.
12. Bolzán, A. D. & Bianchi, M. S. (2002) 'Genotoxicity of streptozotocin', *Mutation Research*, vol. 512, no. 2-3, pp. 121-134.
13. Bolzán, A. D. & Bianchi, M. S. (2002) 'Genotoxicity of streptozotocin', *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, vol. 512, no. 2-3, pp. 121-134.
14. Bonnotte, B. (2004) 'Physiopathologie des maladies auto-immunes', *La revue de médecine interne*, vol. 25, no. 9, pp. 648-658.
15. Bossart, M., Wagner, M., Elvert, R., Evers, A., Hübschle, T., Kloeckener, T., Lorenz, K., Moessinger, C., Eriksson, O., Velikyan, I. & Pierrou, S. (2022) 'Effects on weight loss and glycemic control with SAR441255, a potent unimolecular peptide GLP-1/GIP/GCG receptor triagonist', *Cell Metabolism*, vol. 34, no. 1, pp. 59-74.
16. Boucher, A., Lu, D. & Burgess, S. (2014) 'Diabetes mellitus', in *Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)*, Academic Press, pp. 545-547.

17. Brereton, M. F., Vergari, E., Zhang, Q. & Clark, A. (2015) 'Alpha-, delta- and PP-cells: are they the architectural cornerstones of islet structure and coordination?', *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, vol. 63, no. 8, pp. 575-591.
18. Buchwald, P., Bernal, A., Echeverri, F., Tamayo-Garcia, A., Linetsky, E. & Ricordi, C. (2016) 'Fully automated islet cell counter (ICC) for the assessment of islet mass, purity, and size distribution by digital image analysis', *Cell Transplantation*, vol. 25, no. 10, pp. 1747-1761.
19. Buxeraud, J. and Faure, S. (2017) 'Les nouveaux médicaments en diabétologie et en endocrinologie', *Actualités Pharmaceutiques*, 56(567), pp. 14-21.
20. Calder, P. C., Albers, R., Antoine, J. M., Blum, S., Bourdet-Sicard, R., Ferns, G. A., ... van Loo, J. (2011) 'Inflammatory processes in obesity: Focus on endothelial function and atherogenesis', *Atherosclerosis*, 219(2), pp. 311-320.
21. Carter, J. D., Dula, S. B., Corbin, K. L., Wu, R. and Nunemaker, C. S. (2009) 'A practical guide to rodent islet isolation and assessment', *Biological Procedures Online*, 11, pp. 3-31.
22. Chen, M., Hu, C. and Jia, W. (2015) 'Pharmacogenomics of glinides', *Pharmacogenomics*, 16(1), pp. 45-60.
23. Ding, Q., Zhang, Z., Li, Y., Liu, H., Hao, Q., Yang, Y., Ringø, E., Olsen, R.E., Clarke, J.L., Ran, C. and Zhou, Z. (2021) 'Propionate induces intestinal oxidative stress via Sod2 propionylation in zebrafish', *iScience*, 24(6).
24. Dubois-Laforgue, D. and Timsit, J. (2000) 'Diabète de type 1 et environnement'.
25. EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS) (2014) 'Scientific Opinion on the re-evaluation of propionic acid (E 280), sodium propionate (E 281), calcium propionate (E 282) and potassium propionate (E 283) as food additives', *EFSA Journal*, 12(7), p. 3779.
26. Eisenbarth, G.S. (2012) 'Prevention of type 1A diabetes mellitus', *Endocrine Practice*, 18(5), pp. 745-749.
27. Eizirik, D., Pipeleers, D., Ling, Z., Welsh, N., Hellerström, C. and Andersson, A. (1994) 'Major species differences between humans and rodents in the susceptibility to pancreatic beta-cell injury', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(20), pp. 9253-9256.
28. Even, M.S., Sandusky, C.B., Barnard, N.D., Mistry, J. and Sinha, M.K. (2007) 'Development of a novel ELISA for human insulin using monoclonal antibodies produced in serum-free cell culture medium', *Clinical Biochemistry*, 40(1-2), pp. 98-103.
29. Feldman, R. D. and Abdel-Hafez, A. A. (2022) 'Glucocorticoid-Induced Hyperglycemia: Mechanisms and Management', *Current Diabetes Reports*, 22(7), p. 22.
30. Filippone, A., Casili, G., Scuderi, S.A., Mannino, D., Lanza, M., Campolo, M., Paterniti, I., Capra, A.P., Colarossi, C., Bonasera, A. and Lombardo, S.P. (2022) 'Sodium propionate contributes to tumor cell growth inhibition through PPAR- γ signaling', *Cancers*, 15(1), p. 217.
31. Fischer, K. L., Jaffredo, M., Lang, J. and Raoux, M. (2021) 'Cellules α et β du pancréas : Meilleures ennemies ou partenaires pour la vie ?', *Médecine/Sciences*, 37(8-9), pp. 752-758.
32. Furman, B. L. (2007) 'Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats', in Burcelin, R. and Blondeau, B. (eds.) *Animal Models in Diabetes Research*. Humana Press, pp. 209-219.

Références bibliographiques

33. Gilon, P. (2020) 'The role of α -cells in islet function and glucose homeostasis in health and type 2 diabetes', *Journal of Molecular Biology*, 432(5), pp. 1367-1394.
34. Golay, A. and Ybarra, J. (2005) 'Link between obesity and type 2 diabetes', *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 19(4), pp. 649-663.
35. Gong, H., Zhang, X., Cheng, B., Sun, Y., Li, C., Li, T., Zheng, L. and Huang, K. (2013) 'Bisphenol A accelerates toxic amyloid formation of human islet amyloid polypeptide: a possible link between bisphenol A exposure and type 2 diabetes', *PLoS ONE*, 8(1), p. e54198.
36. Gujral, U.P., Weber, M.B., Staimez, L.R. and Narayan, K.V. (2018) 'Diabetes among non-overweight individuals: an emerging public health challenge', *Current Diabetes Reports*, 18, pp. 1-10.
37. Halliwell, B. and Gutteridge, J.M. (2015) *Free Radicals in Biology and Medicine*. 5th edn. Oxford: Oxford University Press.
38. Hamaguchi, K., Gaskins, H.R. and Leiter, E.H. (1991) 'NIT-1, a pancreatic beta-cell line established from a transgenic NOD/Lt mouse', *Diabetes*, 40, pp. 842-849.
39. Hamon, M. (2007) 'Les nitrates peuvent-ils induire une toxicité indirecte?', in *Annales pharmaceutiques françaises*, 65(5), pp. 347-355. Elsevier Masson.
40. Hillegass, J.M., Shukla, A., MacPherson, M.B., Lathrop, S.A., Alexeeva, V., Perkins, T.N., van der Vliet, A., Vacek, P.M., Gunter, M.E. and Mossman, B.T. (2010) 'Mechanisms of oxidative stress and alterations in gene expression by Libby six-mix in human mesothelial cells', *Particle and Fibre Toxicology*, 7, pp. 1-15.
41. Horaguchi, A. and Merrell, R.C. (1981) 'Preparation of viable islet cells from dogs by a new method', *Diabetes*, 30(5), pp. 455-458.
42. Huising, M. O. (2020) 'Paracrine regulation of insulin secretion', *Diabetologia*, 63, pp. 2057-2063.
43. In't Veld, P. and Marichal, M. (2010) 'Microscopic anatomy of the human islet of Langerhans', in Malaisse-Lagae, M., Sener, M. and Malaisse, F. (eds.) *The Islets of Langerhans*. Springer, pp. 1-19.
44. Jaffredo, M., Bertin, E., Pirog, A., Puginier, E., Gaitan, J., Oucherif, S., Lebreton, F., Bosco, D., Catargi, B., Cattaert, D. and Renaud, S. (2021) 'Dynamic uni- and multicellular patterns encode biphasic activity in pancreatic islets', *Diabetes*, 70(4), pp. 878-888.
45. Johansen, J.S., Harris, A.K., Rychly, D.J. and Ergul, A. (2005) 'Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: Linking basic science to clinical practice', *Cardiovascular Diabetology*, 4(1), p. 5.
46. Jost, L., Kirkwood, J. and Whiteside, T. (1992) 'Improved short- and long-term XTT-based colorimetric cellular cytotoxicity assay for melanoma and other tumor cells', *Journal of Immunological Methods*, 147(2), pp. 153-165.
47. JoVE Science Education Database (2024) *Basic Methods in Cellular and Molecular Biology. Passage des cellules*. JoVE, Cambridge, MA.
48. Kim, H. and Xue, X. (2020) 'Detection of total reactive oxygen species in adherent cells by 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate staining', *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (160), p. e60682.

49. Kim, K., Kwon, O., Ryu, T.Y., Jung, C.R., Kim, J., Min, J.K., Kim, D.S., Son, M.Y. and Cho, H.S. (2019) 'Propionate of a microbiota metabolite induces cell apoptosis and cell cycle arrest in lung cancer', *Molecular Medicine Reports*, 20(2), pp. 1569-1574.
50. Kukreja, A. and Maclaren, N.K. (1999) 'Autoimmunity and diabetes', *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 84(12), pp. 4371-4378.
51. Lenzen, S. (2008) 'The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes', *Diabetologia*, 51(2), pp. 216-226.
52. Liu, Y., Qin, Q., Bo, A., Zhang, H., Zhang, Q., Hao, W., Hu, Y. and Sun, J. (2015) 'The effect of sodium nitrite on induction of apoptosis in human gastric adenocarcinoma epithelia (AGS) cells', *Pharmacology & Pharmacy*, 6(11), pp. 496-501.
53. Macdonald Ighodaro, O., Mohammed Adeosun, A. and Adeboye Akinloye, O. (2017) 'Alloxan-induced diabetes, a common model for evaluating the glycemic-control potential of therapeutic compounds and plant extracts in experimental studies', *Medicina*, 53(6), pp. 365-374.
54. Mallone, R. Le diabète de type 1 : une maladie auto-immune et de la cellule bêta.
55. Mandarim-de-Lacerda, C.A. (2019) 'L'îlot pancréatique: ce que nous savons 150 ans après Langerhans', *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine*, 203(8-9), pp. 670-682.
56. Mane, P.B., Antre, R.V. and Oswal, R.J. (2012) 'Antidiabetic drugs: An overview', *International Journal of Pharmaceutical and Chemical Sciences*, 1(1), pp. 301-306.
57. Muoio, D.M. and Newgard, C.B. (2008) 'Mechanisms of disease: Molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and beta-cell failure in type 2 diabetes', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(3), pp. 193-205.
58. Ng, N.S. and Ooi, L. (2021) 'A simple microplate assay for reactive oxygen species generation and rapid cellular protein normalization', *Bio-protocol*, 11(1), pp. e3877-e3877.
59. Özen, H., Kamber, U., Karaman, M., Gül, S., Atakişi, E., Özcan, K. and Atakişi, O. (2014) 'Histopathologic, biochemical and genotoxic investigations on chronic sodium nitrite toxicity in mice', *Experimental and Toxicologic Pathology*, 66(8), pp. 367-375.
60. Pal, M., Devrani, M. and Dufour, O. (2018) 'Application de différentes techniques de conservation de la viande', *Journal of Experimental Food Chemistry*.
61. Papoz, A., Clément, F., Laporte, C., Tubbs, E., Gidrol, X. and Pitaval, A. (2022) 'Les Langerhanoïdes, des organoïdes d'îlots pancréatiques', *Médecine/Sciences*, 38(1), pp. 52-55.
62. Paquot, N. (2021) 'Le médicament du mois. Le sémaglutide oral, premier agoniste des récepteurs du GLP-1 administré par voie orale (Rybelsus®)', *Revue Médicale de Liège*, 76(12).
63. Pihoker, C., Gilliam, L.K., Hampe, C.S. and Lernmark, A. (2005) 'Autoantibodies in diabetes', *Diabetes*, 54 (Suppl 2), pp. S52-S61.
64. Prasad, M.K., Mohandas, S. and Ramkumar, K.M. (2023) 'Dysfunctions, molecular mechanisms, and therapeutic strategies of pancreatic β -cells in diabetes', *Apoptosis*, 28(7), pp. 958-976.
65. Rafacho, A., Ortsäter, H., Nadal, A., Quesada, I. and Magnusson, M.O. (2007) 'Glucocorticoid treatment and endocrine pancreas function: implications for glucose homeostasis, insulin resistance and diabetes', *Journal of Endocrinology*, 195(3), pp. 343-354.
66. Robertson, R.P., Harmon, J., Tran, P.O. and Tanaka, Y. (2003) 'Glucose toxicity in beta-cells: Type 2 diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection', *Diabetes*, 52(3), pp. 581-587.

Références bibliographiques

67. Roehm, N.W., Rodgers, G.H., Hatfield, S.M. and Glasebrook, A.L. (1991) 'An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT', *Journal of Immunological Methods*, 142(2), pp. 257-265.
68. Rohilla, A. and Ali, S. (2012) 'Alloxan induced diabetes: mechanisms and effects', *International Journal of Research in Pharmacy and Biomedical Sciences*, 3(2), pp. 819–823.
69. Rorive, M., Letiexhe, M., Scheen, A. and Ziegler, O. (2005) 'Obesité et diabète de type 2', *Revue Médicale de Liège*, 60(5-6).
70. Rorsman, P. and Braun, M. (2021) 'Regulation of Insulin Secretion in Human Pancreatic Islets', *Annual Review of Physiology*, 83, pp. 191-217.
71. Rosselin, G., Smith, A. and Jones, B. (2006) 'Effects of calcineurin inhibitors on pancreatic β -cell function and apoptosis in vitro and in vivo', *Journal of Endocrinology*, 210(3), pp. 187-194.
72. Rubin, B.S. (2011) 'Bisphenol A: An endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects', *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 127(1-2), pp. 27-34.
73. Ruzzin, J., Wagman, A.S., Jensen, J. and Jobin, C. (2005) 'Glucocorticoid-induced insulin resistance in vitro: evidence for a role of the adipocyte', *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 94(1-3), pp. 307-313.
74. Sakata, N., Yoshimatsu, G. and Kodama, S. (2019) 'Development and characteristics of pancreatic epsilon cells', *International Journal of Molecular Sciences*, 20(8), p. 1867.
75. Salih, G. (2022) 'Additifs alimentaires et auxiliaires technologiques utilisés dans la panification: intérêt technologique et les tendances futures', *African and Mediterranean Agricultural Journal-AI Awamia*, (134), pp. 60-75.
76. Scheen, A. (2002) 'Pièges et conseils à propos de l'utilisation des antidiabétiques oraux conventionnels', *Revue Médicale de Liège*, 57(5).
77. Scheen, A.J. (2007) 'Le diabète : de la connaissance clinique à la préoccupation de santé publique', *Journal de la Société de Biologie*, 201(2), pp. 133-140.
78. Scudiero, D.A., Shoemaker, R.H., Paull, K.D., Monks, A., Tierney, S., Nofziger, T.H., Currens, M.J., Seniff, D. and Boyd, M.R. (1988) 'Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines', *Cancer Research*, 48(17), pp. 4827-4833.
79. Simon, S. (2016) 'Factors Contributing to the Development of Diabetes', *Journal of Endocrinology*, 34(2), pp. 123-130.
80. Singh, A., Singh, V.K. and Jha, S. (2022) 'Role of sodium benzoate in the suppression of pyroptosis in diabetic cardiomyopathy', *Journal of Diabetes Research*, 2022, p. 7599995.
81. Song, L., Xia, W., Zhou, Z., Li, Y., Lin, Y., Wei, J. and Xu, B. (2014) 'Low-level phenolic estrogen pollutants impair islet morphology and β -cell function in isolated rat islets', *Journal of Endocrinology*, 220(1), pp. 53-63.
82. Spinass, G.A. and Lehmann, R. (2001) 'Diabète sucré : Diagnostic, classification et pathogénèse', *Forum Med Suisse*, 20, pp. 519-525.
83. Stein, S.A., Lamos, E.M. and Davis, S.N. (2013) 'A review of the efficacy and safety of oral antidiabetic drugs', *Expert Opinion on Drug Safety*, 12(2), pp. 153-175.

Références bibliographiques

84. Strober, W. (1997) 'Trypan blue exclusion test of cell viability', *Current protocols in immunology*, 21(1), pp. A-3B.
85. Stull, N.D., Breite, A., McCarthy, R., Tersey, S.A. and Mirmira, R.G. (2012) 'Mouse islet of Langerhans isolation using a combination of purified collagenase and neutral protease', *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (67), p. e4137.
86. Stumvoll, M., Goldstein, B.J. and Van Haeften, T.W. (2005) 'Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy', *The Lancet*, 365(9467), pp. 1333-1346.
87. Sun, J., Aoki, K., Wang, W., Guo, A. and Misumi, J. (2006) 'Sodium nitrite-induced cytotoxicity in cultured human gastric epithelial cells', *Toxicology in Vitro*, 20(7), pp. 1133-1138.
88. Szkudelski, T. (2001) 'The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas', *Physiological Research*, 50(6), pp. 537-546.
89. Tirosh, A., Calay, E.S., Tuncman, G., Claiborn, K.C., Inouye, K.E., Eguchi, K., Alcala, M., Rathaus, M., Hollander, K.S., Ron, I., Livne, R., Heianza, Y. and Shai, I. (2019) 'The Metabolic Effects of Propionate in Humans: A Double-Blind, Placebo-Controlled Crossover Study', *Science Translational Medicine*, 11(488), eaav9709.
90. Tricker, A.R. and Preussmann, R. (1991) 'Carcinogenic N-nitrosamines in the diet: Occurrence, formation, mechanisms and carcinogenic potential', *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 259(3-4), pp. 277-289.
91. Tyrberg, B., Andersson, A. and Borg, L.A. (2001) 'Species differences in susceptibility of transplanted and cultured pancreatic islets to the beta-cell toxin alloxan', *General and Comparative Endocrinology*, 122(3), pp. 238-251.
92. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M. and Telser, J. (2006) 'Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease', *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1), pp. 44-84.
93. Verdecchia, P., Murdolo, G., Coiro, S., Santucci, A., Notaristefano, F., Angeli, F. and Cavallini, C. (2023) 'Therapy of Type 2 diabetes: more gliflozines and less metformin?', *European Heart Journal Supplements*, 25(Supplement_B), pp. B171-B176.
94. World Health Organization (2024) *Global Report on Food Additives and Their Impact on Health*. Geneva: WHO Press.
95. Ximenes, H.M., Hirata, A.E., Rocha, M.S., Curi, R. and Carpinelli, A.R. (2007) 'Propionate inhibits glucose-induced insulin secretion in isolated rat pancreatic islets', *Cell Biochemistry and Function*, 25(2), pp. 173-178.
96. Zerifi, R., Bahlous, A., Marakchi, O., Daudon, M., Bartagi, Z. and Abdelmoula, J. (2008) 'Syndrome métabolique: physiopathologie et impact sur la lithogénèse', *Annales de Biologie Clinique*, 66(1), pp. 9-17.

Résumé

L'objectif de ce travail pratique vise à examiner l'impact de deux additifs alimentaires, le propionate de sodium et le nitrite de sodium, sur l'induction du diabète. Pour étudier l'effet de ces deux additifs alimentaires sur l'intégrité et la fonction de la cellule β pancréatique, nous avons utilisé le modèle cellulaire NIT-1. Les résultats obtenus ont révélé que le propionate et le nitrite causent la destruction des cellules à de faibles concentrations avec une $EC_{50} \approx 50 \mu\text{g/ml}$. De plus, il a été démontré que ces deux substances induisent la production de ERO, ce qui pourrait être la cause de la mort des cellules.

Mots clés : Additifs alimentaires , Propionate de sodium , Nitrite de sodium , Pancréas , Cellules β , Cellules NIT-1 , Diabète , Espèces réactives de l'oxygène

Abstract

The aim of this practical work is to examine the impact of two food additives, sodium propionate and sodium nitrite, on diabetes induction. To study the effect of these additives on the integrity and function of pancreatic β cells, we used the NIT-1 cell model. The results revealed that both propionate and nitrite cause cell destruction at low concentrations, with an $EC_{50} \approx 50 \mu\text{g/ml}$. Furthermore, it was demonstrated that these substances induce the production of ROS, which could potentially lead to cell death.

Keywords : Food additives, Sodium propionate , Sodium nitrite, Pancreas, β cells , NIT-1, Reactive oxygen speaces , Diabetes

ملخص

الهدف من هذا العمل العلمي هو دراسة تأثير مضافان غذائيان وهما بروبيونات الصوديوم و نيتريت الصوديوم، على إستحداث السكري . لدراسة تأثير هاتين المادتين على سلامة وظيفة الخلايا بيتا في البنكرياس إستخدمنا نموذج NIT-1. أظهرت النتائج المتحصل عليها أن البروبيونات والنيتريت يتسببان في تدمير الخلايا عند تركيزات منخفضة $EC_{50} \approx 50 \mu\text{g/ml}$.

علاوة على ذلك تم إثبات أن هاتين المادتين تحفران على إنتاج الجذور الحرة، مما قد يكون سبب في موت الخلايا

كلمات مفتاحية : مضافات غذائية ، بروبيونات الصوديوم ، نيتريت الصوديوم، السكري، البنكرياس، خلايا بيتا، الجذور الحرة، NIT-1