

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



جامعة بجاية
Tasdawit n Bgayet
Université de Béjaïa

Université A. MIRA-BEJAIA

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Microbiologie

Laboratoire de Biotechnologie Végétale et Ethnobotanie

THÈSE

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE

DOCTORAT 3^{ème} CYCLE

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biotechnologie

Spécialité : Biotechnologie et santé

Présentée par

Mme TACHOUR Rechda Amel

Thème

Etude de l'effet de la thymoquinone, de la quercétine et de la curcumine PEGylées (PEG4000) sur la sécrétion d'insuline et la protection des cellules β pancréatiques.

Soutenue le : 22/05/2025

Devant le Jury composé de :

Nom et Prénom	Grade	Structure de Rattachement	Qualité
Adel AMIROUCHE	MCA	Univ. de Bejaia	Président
Widad SOBHI	Professeur/D. Rech.	CRBT Constantine	Rapporteur
Mustapha TACHERFIOUT	MCA	Univ. de Bejaia	Co rapporteur
Ammar AZIOUNE	Directeur de Recherche	CRBT Constantine	Examineur
Farid BOUKHALFA	MCA	Univ. de Bejaia	Examineur
Bachra KHETTAL	Professeur	Univ. de Bejaia	Invitée
Abdelmalek REZGUI	MRA	CRBT Constantine	Invité

Année Universitaire : 2024/2025

Remerciements

Au terme de ce long et passionnant voyage qui est celui de la réalisation de cette thèse, il m'est particulièrement cher d'exprimer ma gratitude envers toutes les personnes qui m'ont accompagné, soutenu et inspiré.

*Tout d'abord, je tiens à remercier chaleureusement ma directrice de thèse, Professeur **Widad Sobhi**, professeur au sein du centre de recherche en biotechnologie pour son encadrement précieux, sa disponibilité et ses conseils éclairés. Votre rigueur scientifique et votre bienveillance ont été des piliers essentiels dans l'aboutissement de ce travail. Sans oublier vos différentes orientations qui tout au long des années passées m'ont été d'une très grande utilité et m'ont permis de surmonter plusieurs difficultés. Je tiens à vous présenter mes remerciements les plus sincères.*

*Je ne saurais oublier le Docteur **Tacherfiout Mustapha**, co-directeur pour son soutien tout au long de la réalisation de la thèse, ses orientations pertinentes m'ont éclairé et ses précieux conseils m'ont permis d'approfondir mes réflexions et d'affiner mes travaux.*

*Je souhaite également adresser mes remerciements aux membres du jury, pour l'honneur que vous m'avez fait en acceptant d'évaluer mon travail. Vos remarques constructives et vos suggestions me permettront d'affiner et d'approfondir ma réflexion. Je tiens à remercier : **Dr. Adel Amirouche**; Président, **Dr. Azioune Ammar**; Examineur, **Dr. Farid Boukhalfa**; Examineur, **Pr. Bachra Khettal**; invitée et **Dr. Abdelmalek Rezgui**; invité.*

*Je ne saurai oublier Monsieur **Azioune Ammar**, Directeur du centre de recherche en biotechnologie, où j'ai eu la chance de réaliser mes expérimentations. Il m'a offert une opportunité précieuse, celle d'avoir accès à des équipements et des ressources rares, une chance que l'on ne retrouve pas dans d'autres institutions de recherche.*

*J'adresse également un remerciement particulier au professeur **Bachra Khettal** Directrice du laboratoire LBVE, Université de Bejaia.*

Merci à tous mes collègues et amis au sein de ce Centre de recherche pour les échanges fructueux, le soutien et les moments de convivialité qui ont jalonné durant ces années.

*Je tiens à remercier particulièrement ; **Abdelmalek Rezgui, Cherif Djaouida, Agred Rym, Hacini Sara et Gaci Kamel.***

*Un grand merci à mon équipe de doctorants ; **Ayoub Atoui, Fatma Zahra Hab ; Anfel Benmenceur, Leila Bouneb et Rania Derguine.***

Cette thèse est le fruit de nombreux partages et collaborations, et je suis profondément reconnaissante envers toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à sa réalisation. À chacune et chacun d'entre vous, merci.

Dédicace

Louange à Dieu tout puissant, qui m'a permis de voir ce jour tant attendu

À mes parents,

Pour les valeurs inestimables que vous m'avez inculquées, qui ont façonné mon caractère et guidé chacun de mes pas. Pour les innombrables sacrifices, souvent silencieux mais toujours immenses, que vous avez consentis afin de m'offrir la possibilité de poursuivre mes rêves. Pour votre amour inconditionnel, votre soutien indéfectible et votre foi en mes capacités, même dans les moments de doute. Cette thèse est le reflet de vos efforts et de votre dévouement, et je vous en suis éternellement reconnaissante.

*À mon mari, **Yasser SAIFI***

Pour ton amour indéfectible, qui a été ma source de force et d'inspiration à chaque étape de ce voyage. Pour ta grande patience et ta capacité à m'épauler, même dans les moments les plus exigeants, où les défis semblaient insurmontables. Je te remercie du fond du cœur pour ton soutien moral constant, qui m'a permis de garder le cap, et pour tes précieux conseils, toujours empreints de sagesse, qui ont enrichi mon travail tout au long de cette thèse. Tu as été mon pilier, et cette réalisation porte aussi ton empreinte.

À mes frères et sœurs,

Mehdi Aylane, Taki, Sana Hazar, Hiba Batoul, Meroua Ines

Pour vos encouragements sincères et vos mots empreints de réconfort, qui m'ont donné la force de surmonter les épreuves et d'aller de l'avant. Vous avez été une source inestimable de soutien et d'amour, et je vous en suis profondément reconnaissante.

À ma belle-famille,

Pour votre gentillesse, vos encouragements et votre compréhension. Merci de m'avoir accueillie et soutenue comme l'un des vôtres.

À toutes ma famille,

Pour votre amour inconditionnel, votre soutien indéfectible et votre foi en moi, même dans les moments les plus difficiles.

*A mes amies,
Teniou Ahlem et Attia Amel. Je ne peux trouver les mots justes et sincères pour vous exprimer mon affection et mes pensées. Vous êtes pour moi des sœurs et des amies sur qui je peux compter. En témoignage de l'amitié qui nous unit et des souvenirs de tous les moments que nous avons passés ensemble, je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.*

A tous ceux qui, d'une manière ou d'une autre, ont marqué mon parcours et contribué à la réalisation de cette thèse. Avec toute ma gratitude et mon affection.

Liste des abréviations

- **Å** : Angström (unité de longueur)
- **A.U.** : Unité arbitraire
- **AGEs** : Advanced Glycation End Products
- **CO₂** : Dioxyde de carbone
- **Cur** : Curcumine
- **DFT** : Density Functional theory
- **DMEM** : Dulbecco's Modified Eagle Medium
- **DT1** : Diabète de type 1
- **DT2** : Diabète de type 2
- **DMSO** : Diméthylsulfoxyde
- **EDAX** : Energy Dispersive X-ray Analysis
- **EDS** : Energy Dispersive spectroscopy
- **ELISA** : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
- **FBS** : Fetal Bovine Serum
- **Foxo1** : Facteur de transcription Forkhead O1
- **FTIR** : Fourier Transform Infrared Spectroscopy
- **GADA** : Glutamic Acid Decarboxylase Autoantibodie
- **GSH** : Glutathion réduit
- **HBSS** : Hanks' Balanced Salt Solution
- **HIF1- α** : Hypoxia-Inducible Factor 1-Alpha
- **IAA** : Insulin Autoantibodies
- **ICA** : Islet Cell Antibodies
- **IDH2** : Isocitrate Dehydrogenase 2
- **IL-1 β** : Interleukine 1 bêta
- **Ins1** : Insuline 1
- **kcal/mol** : Kilocalories par mole
- **MDA** : Malondialdéhyde
- **MEB** : Microscope Electronique à Balayage
- **mV** : Millivolts
- **N/A** : Non applicable
- **NADPH** : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate

- **NFκB**: Nuclear Factor kappa B
- **NOD** : Non-Obese Diabetic
- **NP** : Nanoparticules
- **P123** : Pluronic P123
- **PEG4000** : Polyéthylène Glycol 4000
- **PEGn** : Polyéthylène Glycol de n unités
- **PGC-1α** : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1-Alpha
- **pH** : Potentiel hydrogène
- **PLGA** : Poly(lactic-co-glycolic acid)
- **PVP** : Polyvinylpyrrolidone
- **Quer** : Quercétine
- **Quer-PEG4000** : Complexe Quercétine-PEG4000
- **ROS** : Reactive Oxygen Species
- **RPMI1640** : Roswell Park Memorial Institute Medium 1640
- **SIRT1** : Sirtuin 1
- **SIRT2** : Sirtuin 2
- **SIRT3** : Sirtuin 3
- **SOD** : Superoxyde dismutase
- **STZ** : Streptozotocine
- **TQ** : Thymoquinone
- **TQ-PEG4000-NP** : Complexe Thymoquinone-PEG4000-Nanoparticules
- **UPR** : Unfolded Protein Response
- **UV** : Ultraviolet
- **XTT** : Essai de prolifération cellulaire XTT
- **ΔE** : Variation d'énergie

Liste des figures

Figure 1 : Physiopathologie du diabète de Type 1 : phase pré-diabète à symptomatique [47]. ...	7
Figure 2 : Mesure continue de la glycémie chez les individus atteints de DT1 comparée à celle des individus non diabétiques. [54].	9
Figure 3 : Transplantation des ilots, d'après l'Institut de Recherche sur le Diabète, Université de Miami, Robert Margulies.....	11
Figure 4 : A) Modèle STZ/NIT1 du diabète type 1[101] modifié. B) Mode d'action de la STZ [102] modifié.....	15
Figure 5 A) La fleur de la <i>Nigella sativa</i> . B) Ses graines. C) Structure chimique de la TQ ...	17
Figure 6 A) Sources de la Quer, B) structure chimique de la Quer.	20
Figure 7 : A) le cumin et la Cur, B) structure chimique de la Cur.....	23
Figure 8 : Rôle des sirtuines dans le stress oxydatif et la signalisation cellulaire [257] modifié.....	31
Figure 9 : Mode d'action de NFκB (cellule beta) [267] modifié.	33
Figure 10. Profil de libération	53
Figure 11 : Spectre FTIR : (A) complexe TQ-PEG4000-NP ; (B) TQ ; (C) PEG4000 et (D) P123.....	55
Figure 12 : Spectre FTIR : (A) complexe Quer-PEG4000 ; (B) Quer ; (C) PEG4000 ; (D) P123.....	56
Figure 13 : Spectre FTIR : (A) complexe Cur-PEG4000 ; (B) Cur ; (C) PEG4000 ; (D) P123.	57
Figure 14 : A) Image MEB B) Spectre EDS des Nanoparticules TQ-PEG4000-NP.	59
Figure 15 : A) Image MEB B) Spectre EDS du complexe Quer-PEG4000.....	60
Figure 16 : A) Image MEB B) Spectre EDS du complexe Cur-PEG4000.....	61
Figure 17 : (A) Potentiel Zeta et (B) mobilité électrophorétique des microcristaux Quer-PEG4000.	62
Figure 18 : (A) Potentiel Zeta et (B) mobilité électrophorétique des microcristaux Cur-PEG4000.	63
Figure 19 : Présentation des configurations finales des différents systèmes d'encapsulation TQ-PEG dans la phase gazeuse avec une longueur de chaîne variable (n = 10 à 90).....	65
Figure 20 : Configuration possible d'adsorption du complexe TQ-PEG4000-NP pour le rapport molaire expérimental 1:4	66

Figure 21 : (A) : Cytotoxicité de la TQ, PEG4000, TQ-PEG4000-NP, Doxo en référence ; (B) image microscope inversé témoin- après 72 h d'incubation ; (C) image microscope inversé des EMT6 traité avec 30 µg/ml de TQ-PEG4000-NP.	67
Figure 22 : (A) : Cytotoxicité de la Quer, PEG4000, Quer-PEG4000, Doxo en référence ; (B) image microscope inversé témoin- après 72h d'incubation ; (C) image microscope inversé des EMT6 traité avec 30µg/ml de Quer-PEG4000.	68
Figure 23 : (A) : Cytotoxicité de la Cur, PEG4000, Curr-PEG4000, Doxo en référence ; (B) image microscope inversé témoin- après 72h d'incubation ; (C) image microscope inversé des EMT6 traité avec 30µg/ml de Cur-PEG4000.....	69
Figure 24 : (A) : Cytotoxicité de la TQ, PEG4000, TQ-PEG4000-NP sur les NIT-1 ; (B) image microscope inversé témoin- après 72h d'incubation ; (C) Image microscope inversé des NIT traité avec 60µg/ml de TQ ; (D) Image microscope inversé des NIT traitées avec 60µg/ml de TQ-PEG4000-NP.....	70
Figure 25 : (A) : Cytotoxicité de la Quer, PEG4000, Quer-PEG4000 sur les NIT-1 ; (B) image microscope inversé témoin- après 72h d'incubation ; (C) Image microscope inversé des NIT traité avec 60µg/ml de Quer ; (D) Image microscope inversé des NIT traitées avec 60µg/ml de Quer-PEG4000.	71
Figure 26 : (A) Cytotoxicité de la Cur, PEG4000, Cur-PEG4000 sur les NIT-1 ; (B) image microscope inversé témoin- après 72h d'incubation ; (C) Image microscope inversé des NIT traité avec 60µg/mL de Cur ; (D) Image microscope inversé des NIT traitées avec 60µg/mL de Cur-PEG4000	72
Figure 27 : (A) Viabilité des cellules des îlots traitées avec TQ (30 µg/mL) et TQ-PEG4000-NP (30 µg/mL) ;	73
Figure 28 : Insuline sécrétée par les îlots traités avec le PEG4000, la TQ (30 µg/mL) et la TQ-PEG4000-NP (30 µg/mL).....	74
Figure 29 : Insuline sécrétée par les îlots traités avec le PEG4000, la Quer (60 µg/mL) et la Quer-PEG4000 (60 µg/mL).....	75
Figure 30 : Insuline sécrétée par les îlots traités avec le PEG4000, la Cur (60 µg/mL) et la Cur-PEG4000 (60 µg/mL).....	76
Figure 31 : Effet protecteur de la TQ et des nanoparticules TQ-PEG4000-NP sur les cellules NIT-1 endommagées par la STZ.	77
Figure 32 : Effet protecteur de la Quer et des microcristaux Que-PEG4000 sur les cellules NIT-1 endommagées par la STZ.	79

Figure 33 : Effet protecteur de la Cur et les microcristaux Cur-PEG4000 sur les cellules NIT-1 endommagées par la STZ.....	81
Figure 34 : Effet de la TQ et TQ-PEG4000-NP sur la SOD à 30 et 60 µg/mL.....	82
Figure 35 : Effet de la TQ et TQ-PEG4000-NP sur la GSH à 30 et 60 µg/mL.....	83
Figure 36 : Effet de la TQ et TQ-PEG4000-NP sur la MDA à 30 et 60µg/mL.....	83
Figure 37 :(A) Effet de la Quer et Quer-PEG4000 sur la SOD à 30 µg/mL ; (B) Effet de la Quer et Quer-PEG4000 sur la SOD à 60 µg/mL.....	84
Figure 38 : (A) Effet de la Quer et Quer-PEG4000 sur la GSH à 30µg/mL ; (B) Effet de la Quer et Quer-PEG4000 sur la GSH à 60 µg/mL.....	85
Figure 39 : (A) Effet de la Quer et Quer-PEG4000 sur la MDA à 30 µg/mL ; (B) Effet de la Quer et Quer-PEG4000 sur la MDA à 60 µg/mL.....	85
Figure 40 : Effet de la Cur et Cur-PEG4000 sur la SOD à 30 et 60 µg/mL.....	86
Figure 41 : Effet de la Cur et Cur-PEG4000 sur la GSH à 30 et 60 µg/mL.....	87
Figure 42 : Effet de la Cur et Cur-PEG4000 sur les MDA à 30 et 60 µg/mL.....	87
Figure 43 : Taux d'amélioration de la viabilité cellulaire NIT-1 (%).....	89
Figure 44 : Détection du marqueur du NFκB-P65 et NFκB-P65-P stimulé par la Quer à 60µg/mL.....	90
Figure 45 : Effet de la Quer sur l'activité relative de la SIRT2 in-vitro.....	91
Figure 46 : Effet de la Quer sur l'activité relative la SIRT2 dans les cellules NIT-1,.....	91

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification étiologique du diabète sucré selon la déclaration de position de l' Association Américaine de Diabète (ADA)[3]	6
Tableau 2 : Propriétés chimiques de la TQ (PubChem).....	17
Tableau 3 : Propriétés chimiques de la Quer (PubChem).....	20
Tableau 4 : formule structurale et masse moléculaire des différents grades du PEG [208]....	26
Tableau 5 : Formulation et synthèse des nanoparticules PEG4000 encapsulant la TQ, la Quer et la Cur	38
Tableau 6 : Comparaison des taux d'encapsulation de la TQ, Quer et Cur avec PEG4000 ...	51
Tableau 7 : Énergies d'interaction (ΔE en kcal/mol) entre la TQ et différentes chaînes de PEG (n = 10 à 90) dans les phases gazeuse et aqueuse avec la distance mesurée (Å).	64

Introduction.....	1
Partie bibliographique	5
1 Diabète.....	5
1.1 Définition et classification.....	5
1.2 Physiopathologie du diabète type 1.....	6
1.3 Traitement actuel du diabète type 1.....	8
1.4 Modèle du diabète experimental STZ/NIT-1.....	11
1.4.1 Les étapes pré-diabète.....	11
1.4.2 Mécanismes physiopathologiques sous-jacents.....	12
1.4.3 Biomarqueurs et diagnostics pré-diabétiques.....	13
1.4.4 Les cellules β et leurs fonctionnements.....	13
1.4.5 Les différents modèles du diabète type 1.....	14
1.4.6 Le modèle de diabète utilisant la STZ et la lignée de cellules NIT-1	15
2 Composés naturels et leur rôle dans le diabète type1.....	16
2.1 Thymoquinone (TQ).....	16
2.1.1 Structures et propriétés.....	16
2.1.2 Potentiel thérapeutique et toxicité.....	18
2.2 Quercétine (Querc).....	19
2.2.1 Structures et propriétés.....	19
2.2.2 Propriétés pharmacologiques et toxicité.....	21
2.3 Curcumine (Cur).....	22
2.3.1 Structures et propriétés.....	22
2.3.2 Propriétés pharmacologiques et toxicité.....	23
3 Encapsulation et systèmes de libération des principes actifs	24
3.1 PEG et technologie de la PEGylation.....	26
3.1.1 Avantages du PEG.....	27
3.1.2 Les limites du PEG et la technologie de PEGylation.....	29
4 Apoptose et marqueurs du stress oxydatif dans la cellule β.....	29
4.1 Apoptose (généralités).....	29
4.2 Apoptose des cellules β	30
4.2.1 Sirtuines.....	31
4.2.2 Facteur de transcription nucléaire (NFkB).....	31
4.3 Le stress oxydatif.....	33
4.4 Marqueurs du stress oxydant.....	34
4.4.1 Superoxyde Dismutase (SOD).....	34
4.4.2 Glutathion réduit (GSH).....	34
4.4.3 Malondialdéhyde (MDA).....	35
4.4.4 ROS totaux	35
Matériel et méthodes	37

Réactifs et produits chimiques	37
Animaux et matériel biologique	37
1 Synthèse des complexes moléculaires.	37
2 CARACTERISATION MORPHOLOGIQUE, SPECTRALE ET PHYSICO CHIMIQUE	39
2.1. Test d'efficacité d'encapsulation.....	39
2.2. Test de libération des capsules	39
2.3. Analyse Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR)	40
2.4. Caractérisation morphologique par le Microscope Electronique à Balayage (MEB/EDS)	40
2.5. Potentiel Zeta.....	41
3 Evaluation de la PEGylation sur les effets biologiques.....	41
3.1. Test de cytotoxicité sur les deux lignées EMT6 et les NIT-1.....	41
3.1.1. Conditions de la culture cellulaire.....	41
3.1.2. Etude de la cytotoxicité par le kit XTT.	41
3.2. Viabilité et sécrétion d'insuline des ilots de Langerhans.	42
3.2.1. Technique de l'isolement des ilots de Langerhans.....	42
3.2.2. Test de viabilité des ilots de Langerhans isolés et traités.	43
3.2.3. Dosage de la sécrétion de l'insuline par un kit Elisa.....	43
3.3. Etude de l'effet protecteur des molécules libres et encapsulées sur la lignée NIT-1 traiter par la STZ.....	44
3.3.1 Test de viabilité.....	44
3.3.2 Analyse des marqueurs du stress oxydatif.	45
3.4. Etude de l'effet régénérateur des molécules libres et encapsulées sur la lignée NIT-1	45
3.5. Etude de la signalisation des marqueurs <i>NF-κB</i> p65 et SIRT2	46
3.5.1 Détection et quantification du marqueur <i>NF-κB</i> p65 par ELISA après traitement à la quercétine	46
3.5.2 Détection du marqueur SIRT2.....	46
4 Etude in-silico de l'interaction moléculaire.	47
4.1. Investigation théorique de l'interaction molécule/Polymère (TQ/PEG ₄₀₀₀).....	47
4.2. Détails de calcul	47
Résultats et discussions	49
1 Test d'efficacité d'encapsulation de la TQ, Quer et Curc par PEG4000.....	50
2 Test de libération de la TQ, la Quer et la Cur à différents pH in vitro	51
3 Analyse Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR) : Étude Comparative des Systèmes Encapsulés	54
3.1. Interactions Physiques et Chimiques Détectées via FTIR.....	54
3.2. Comparaison des Effets des Interactions sur les Propriétés Spectrales et Fonctionnelles	57
4 Morphologie et structure des particules encapsulées (MEB) et analyse chimique (EDS).....	58
5 Potentiel Zeta	62

6	Etude <i>in-silico</i> de l'interaction moléculaire.	63
6.1	Investigation théorique de l'interaction des nanoparticules TQ-PEG ₄₀₀₀ -NP..	63
Chapitre 2 : Expériences biologiques.		66
1	Effet cytotoxique des molécules libres et leurs complexes sur les deux lignées cellulaires EMT6 et les NIT-1.	66
1.1.	Effet cytotoxique sur les EMT6	66
1.2.	Effet cytotoxique sur les NIT-1	69
2	Effet des molécules libres et leurs complexes sur la viabilité et la sécrétion d'insuline des ilots de Langerhans.	72
2.1.	Effet cytotoxique de la TQ sur les ilots de Langerhans.	72
2.2.	Sécrétion d'insuline des ilots de Langerhans	73
3	Effet protecteur des molécules sur les NIT-1 endommagées par la STZ.	76
3.1.	Viabilité des cellules NIT-1	76
3.2.	Effet antioxydant des molécules libres et leurs complexes sur les cellules NIT-1.	82
4	Effet régénérateur des molécules sur les cellules β NIT-1 endommagées par la STZ.	88
5	Effet de la Quercétine sur la signalisation cellulaire des NIT-1	89
5.1	Détection et quantification du marqueur NF κ B par ELISA.	89
5.2	Détection du marqueur SIRT2.	90
5.2.1	Effet de la quercétine sur l'activité relative de la SIRT2.	90
5.2.2	Détection de la SIRT2 inhibée par la Quercétine dans le lysat des NIT-85.	91
Conclusion		93
Références bibliographiques		96

Introduction

Introduction

Le diabète sucré, une maladie métabolique chronique [1], est défini par une élévation des niveaux de glucose dans le sang résultant de modifications de la production ou de l'activité de l'insuline [2]. C'est l'une des dix premières causes de décès dans le monde [3]. Selon la Fédération Internationale du Diabète (FID), le diabète touchait environ 537 millions d'adultes dans le monde en 2021, avec des projections de 643 millions d'ici 2030 et 783 millions d'ici 2045 [4]. Cette prévalence croissante impose un fardeau économique considérable sur les systèmes de santé [5], comme l'ont noté Yuen et al. [6].

La thymoquinone (TQ) (2-méthyl-5-isopropyl-1,4-benzoquinone ($C_{10}H_{12}O_2$)) est le principal composé actif de la graine *Nigella sativa* avec un poids moléculaire de (164,2 g/mol), et est largement utilisée comme ingrédient culinaire et remède à base de plantes pour diverses affections de santé [7]. La TQ est responsable de nombreux effets biologiques de *Nigella sativa* [1], notamment des propriétés anti-néoplasiques significatives [8, 9] et diverses propriétés pharmacologiques telles que des effets anti-inflammatoires [10], antidiabétiques [11, 12], antioxydants [13, 14] et immunomodulateurs [15]. Elle réduit les niveaux de glucose dans le sang chez les personnes atteintes de diabète en augmentant l'absorption périphérique du glucose, en diminuant la production hépatique de cet ose et en inhibant la glycogénolyse [1].

La quercétine (Quer) est un flavonoïde naturel présent dans divers fruits et légumes, notamment le thé, le chou, les baies de sureau [16]. Elle possède une puissante capacité antioxydante [17] et présente des propriétés anti-inflammatoires remarquables, qui contribuent de manière significative à son potentiel thérapeutique dans la prévention et le traitement de maladies chroniques telles que les maladies cardiovasculaires, le syndrome métabolique, les troubles neurodégénératifs et les affections respiratoires. La Quer exerce plusieurs effets biologiques bénéfiques, notamment des effets antidiabétiques et anti-inflammatoires significatifs [18]. Ses propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires lui permettent également de prévenir et de traiter les cancers gynécologiques tels que le cancer du sein, des ovaires et du col de l'utérus [19]. Elle a démontré des effets cardioprotecteurs en améliorant la fonction cardiaque dans le cadre d'études menées sur des humains et des animaux [20]. La Quer module les activités cellulaires en réduisant le stress oxydatif, en inhibant la production de cytokines inflammatoires et en régulant la réponse immunitaire [21]. De plus, la Quer abaisse la glycémie en augmentant la production d'insuline, en améliorant le fonctionnement des cellules β du

pancréas et en augmentant la tolérance au glucose. De ce fait, il s'avère ainsi prometteur pour la prise en charge du diabète au même titre que d'autres médicaments antidiabétiques [22].

La curcumine (Cur), un composé phénolique bioactif du curcuma, présente des propriétés anti-inflammatoires, antioxydantes et antithrombotiques importantes [23]. Elle présente un large éventail de bénéfices thérapeutiques pour diverses maladies chroniques, incluant des effets antidiabétiques, des rôles neuroprotecteurs et des avantages potentiels dans les maladies cardiovasculaires [24]. La Cur régule la glycémie et améliore la sensibilité à l'insuline. Elle réduit également l'inflammation systémique en inhibant les médiateurs inflammatoires démontrant ainsi des effets protecteurs contre le diabète sucré et ses complications [22]. La Cur réduit le stress oxydatif en inhibant les cytokines pro-inflammatoires et en modulant les voies de signalisation critiques. Cette action contribue à ses effets anti-hyperglycémiques et anti-hyperlipidémiques, favorisant ainsi la régulation du métabolisme du glucose et des lipides dans le diabète de type 2 (DT2) [25]. En outre, la Cur a démontré sa capacité à améliorer la fonction des cellules β du pancréas et à réduire l'apoptose cellulaire dans des modèles de DT2, augmentant ainsi la sécrétion d'insuline et suggérant son potentiel en tant que candidat thérapeutique pour la prévention et le traitement du diabète et des maladies métaboliques associées [26].

Le potentiel de la TQ, de la Quer et de la Cur en tant qu'agents antidiabétiques est souvent limité par leur faible solubilité dans l'eau, entraînant des défis de biodisponibilité. Par conséquent, le développement de nanoparticules pour améliorer la solubilité et la biodisponibilité cellulaire de ces composés est un domaine de recherche actif et prometteur [27, 28]. L'encapsulation nanométrique des médicaments insolubles dans l'eau attire l'attention en raison de ses propriétés protectrices contre les facteurs environnementaux et de sa capacité à ralentir le métabolisme des médicaments. La nature lipophile de la TQ, Quer, Cur, leur faible solubilité dans les liquides gastro-intestinaux, leur absorption retardée, leur dégradation enzymatique extensive dans le tractus gastro-intestinal, leur stabilité physico-chimique limitée ainsi que leur excrétion rapide nécessitent des dosages oraux élevés pour obtenir des effets thérapeutiques [28-30].

Le PEG hydrosoluble, un polymère disponible dans le commerce, approuvé par la Food and Drug Administration (FDA), sûre et non immunogène, est largement utilisé dans les applications médicales en raison de sa biocompatibilité et de sa nature amphiphile. La conjugaison avec le PEG permet d'empêcher la traversée de la barrière hémato-endocrine, de

réduire la neurotoxicité associée aux médicaments libres et de prolonger la demi-vie des médicaments [31]. Le PEG-4000 est un polymère d'un poids moléculaire d'environ 4000 g/mol et composé de neuf sous-unités de glycol d'éthylène, est utilisé en médecine comme laxatif et lubrifiant, facilitant la fusion des membranes cellulaires et la libération prolongée des molécules actives PEGylées [32, 33].

Cette étude visait à surmonter les limites associées à l'utilisation de composés bioactifs tels que la thymoquinone (TQ), la quercétine (Quer) et la curcumine (Cur) dans le traitement du diabète de type 1. Ces composés, bien que prometteurs pour leurs propriétés antidiabétiques, présentent des inconvénients majeurs tels qu'une faible solubilité, une biodisponibilité limitée, et une stabilité réduite, ce qui entrave leur efficacité thérapeutique. Pour répondre à cette problématique, nous avons élaboré des formulations innovantes à base de nanoparticules, notamment TQ-PEG4000-NP, Quer-PEG4000 et Cur-PEG4000. L'objectif principal était d'encapsuler ces molécules dans une matrice de polyéthylène glycol (PEG4000) afin d'améliorer leurs caractéristiques pharmacocinétiques, de renforcer leur stabilité, et d'optimiser leur délivrance au niveau cellulaire.

Parallèlement, nous avons mené une investigation approfondie pour évaluer les effets biologiques de ces formulations sur divers aspects des propriétés antidiabétiques de la TQ, de la Quer et de la Cur. Cela comprenait l'étude de leur capacité à protéger et régénérer les cellules β pancréatiques endommagées, à réduire le stress oxydatif, et à moduler des marqueurs clés de la signalisation cellulaire tels que NF κ B et SIRT2. Ce travail s'inscrivait dans une démarche visant à offrir une approche thérapeutique plus ciblée, moins invasive, et potentiellement transposable pour la gestion du diabète de type 1. En intégrant des techniques d'encapsulation et d'études *in silico*, cette recherche a également permis d'explorer les mécanismes moléculaires sous-jacents à l'interaction entre ces composés naturels et les polymères utilisés, tout en ouvrant la voie à des perspectives d'application clinique élargies.

Partie bibliographique

Partie bibliographique

1 Diabète

1.1 Définition et classification

Le diabète est un groupe de troubles métaboliques multifactoriels complexes principalement caractérisés par l'hyperglycémie résultant de défauts dans l'action de l'insuline et/ou dans la sécrétion de l'insuline [3]. Le développement du diabète implique généralement de nombreux processus pathogènes qui peuvent aller de la destruction auto-immune spécifique des cellules β pancréatiques, responsables de la sécrétion de l'insuline, caractérisée histologiquement par l'inflammation des cellules des îlots [34], et par conséquent des anomalies entraînant une résistance à l'insuline. L'élévation de la glycémie plasmatique est associée à des complications chroniques telles que les maladies cardiovasculaires, les maladies rénales, la neuropathie périphérique avec un risque d'ulcères du pied et de cécité [3]. De plus, le diabète sucré représente actuellement un fardeau de santé publique croissant pour l'individu, la famille et la société, et ses taux dans le monde ont atteint des proportions alarmantes [35].

Actuellement, le diabète est classé en plusieurs sous-types en fonction de l'étiologie de la maladie (**Tableau 1**). Ces sous-types incluent le diabète de type 1 (DT1), dû à la destruction auto-immune des cellules β du pancréas, ce qui conduit généralement à une carence absolue en insuline. Le DT2 résulte d'une perte progressive de la sécrétion d'insuline par les cellules β , souvent dû à une résistance à l'insuline. Le diabète gestationnel est diagnostiqué au cours du deuxième ou troisième trimestre de la grossesse alors qu'il n'était pas clairement présent avant la gestation [3]. Il existe également des types spécifiques de diabète liés à d'autres causes, tels que les syndromes de diabète monogénique (comme le diabète néonatal et le diabète de la maturité du jeune), les maladies du pancréas exocrine (comme la fibrose kystique et la pancréatite), et le diabète induit par des médicaments ou des produits chimiques (comme avec l'utilisation de glucocorticoïdes, dans le traitement du VIH/SIDA, ou après une transplantation d'organe). Cette classification permet de subdiviser l'hyperglycémie en différentes catégories : celle qui nécessitent de l'insuline pour survivre, celle nécessitant de l'insuline pour le contrôle métabolique (et non pour la survie), et celle ne nécessitant pas d'insuline et utilisant plutôt des méthodes de traitement non pharmacologiques ou des médicaments autres que l'insuline [3, 36].

Tableau 1 : Classification étiologique du diabète sucré selon la déclaration de position de l'Association Américaine de Diabète (ADA)[3]

Types du diabète	Explications
Diabète de type 1	Destruction des cellules β , généralement associée à une carence absolue en insuline. <ul style="list-style-type: none"> • Diabète à médiation immunitaire (Type 1A) • Diabète idiopathique (Type 1B)
Diabète de type 2	Résistance à l'insuline avec une carence relative en insuline et/ou un défaut de sécrétion d'insuline associé à une résistance à l'insuline
Diabète gestationnel	Se développe pendant la grossesse, généralement en raison de l'insulinorésistance induite par les hormones produites par le placenta. Disparaît généralement après l'accouchement, avec un risque accru de développer un diabète de type 2 plus tard.
Autres types spécifiques	<ul style="list-style-type: none"> • Maladies du pancréas exocrine (Pancréatite) • Endocrinopathies (Syndrome de Cushing, hyperthyroïdie) • Anomalies génétiques affectant la fonction des cellules β • Anomalies génétiques dans l'action de l'insuline • Diabète induit par des médicaments ou des produits chimiques (Glucocorticoïdes, hormone thyroïdienne) • Infections (Rubéole congénitale) • Formes rares de diabète à médiation immunitaire (anticorps contre les récepteurs de l'insuline) • Autres syndromes génétiques associés au diabète (par exemple, syndrome de Turner)

1.2 Physiopathologie du diabète type 1

La carence en insuline dans le DT1 peut être attribuée à des dommages des cellules β au sein du pancréas, entraînant une auto-immunité chez les individus génétiquement prédisposés [34]. Les cellules β agissent comme des régulateurs automatiques de la glycémie, contrôlant la libération d'insuline pour maintenir des niveaux physiologiques de glucose [37].

La production d'anticorps dirigés contre les cellules des îlots pancréatiques est un marqueur de l'apparition d'une maladie auto-immune, activée par des lymphocytes T auto-réactifs. Ces lymphocytes T, capables de détruire les cellules β , entraînent progressivement une perte de leur fonction de sécrétion d'insuline [38].

Le développement du DT1 est un processus multifactoriel, impliquant une interaction complexe entre la génétique et des facteurs environnementaux [39, 40]. Les gènes du système HLA (antigène leucocytaire humain) sont fortement associés à la maladie, mais le DT1 ne suit pas un schéma simple d'hérédité, ce qui le classe comme une maladie multigénétique [41]. En plus de cette prédisposition génétique, des facteurs environnementaux comme la carence en vitamine D, une alimentation infantile sans allaitement maternel, ou l'exposition précoce aux protéines du lait de vache et au gluten, augmentent le risque de développer le DT1 [42, 43].

L'apparition du diabète clinique survient généralement après la destruction de 80 à 90 % des cellules β (**Figure 1**), créant un écart important entre le début de l'auto-immunité et l'apparition des symptômes visibles du diabète [44]. Environ 40 à 50 % des cellules β restent viables au début de l'hyperglycémie, expliquant pourquoi la sécrétion d'insuline peut demeurer stable pendant un certain temps malgré la présence d'autoanticorps [45]. Ces autoanticorps incluent les IAA (anticorps dirigés contre l'insuline), les ICA (anticorps cytoplasmiques des îlots), ainsi que les GADA (anticorps contre la décarboxylase de l'acide glutamique) [46].

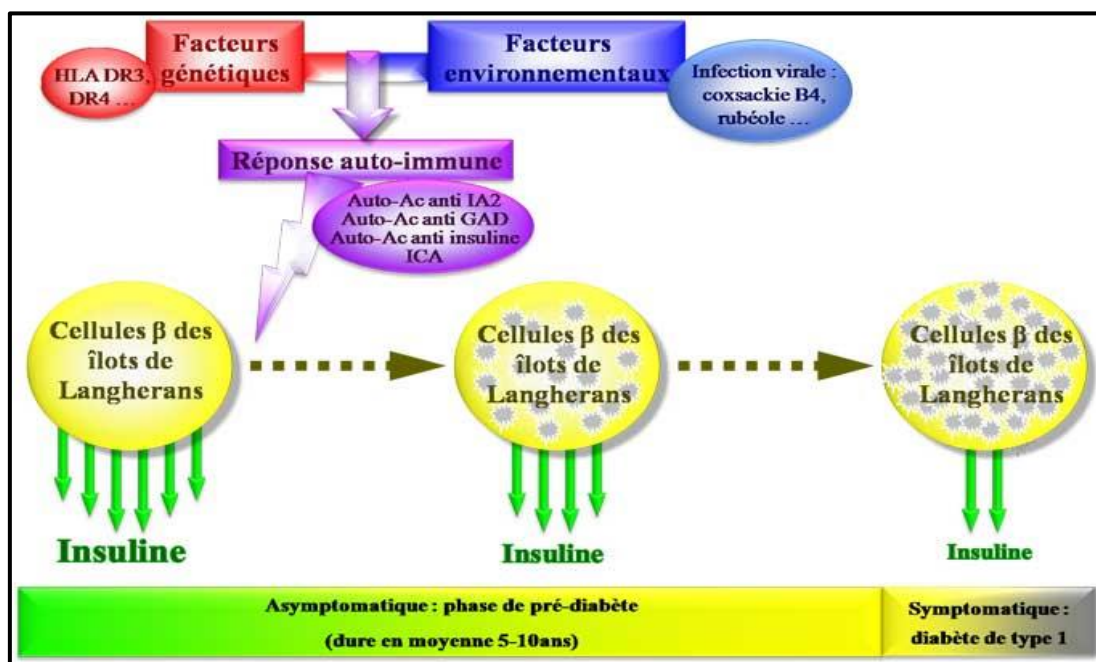


Figure 1 : Physiopathologie du diabète de Type 1 : phase pré-diabète à symptomatique [47].

Le processus auto-immun qui détruit les cellules β commence par l'activation des lymphocytes T CD4 et CD8, entraînant une inflammation appelée insulite, qui active les cellules β et la production d'autoanticorps. Ces autoanticorps incluent l'IA-2 (anticorps contre la tyrosine phosphatase 2) [48] et le transporteur de zinc ZnT8 [49]. Les cellules β endommagées activent également les cellules T, qui produisent des autoanticorps spécifiques des îlots, détectables dans le sérum et utiles pour le diagnostic en combinaison avec d'autres symptômes [39]. Les symptômes classiques incluent la polyurie, la polydipsie et la polyphagie, bien que cette dernière puisse être absente en raison de la cétose qui provoque une anorexie.

Parmi les facteurs environnementaux déclencheurs, les infections virales comme l'entérovirus ou le rotavirus, ainsi que les perturbations du microbiote intestinal, sont également associées à l'augmentation de l'incidence du DT1 [40, 50]. L'hypothèse de l'hygiène suggère même que l'exposition à des infections dans la petite enfance pourrait protéger contre le développement du DT1 plus tard dans la vie [51].

Après le diagnostic et l'initiation du traitement par insuline, certains patients traversent une période de rémission partielle appelée « lune de miel », durant laquelle les besoins en insuline diminuent temporairement. Cette phase, qui survient souvent dans la première année suivant le diagnostic, a été observée chez 18 à 62 % des patients [42, 50]. Elle est plus fréquente chez les personnes plus âgées ou ayant présenté des symptômes initiaux moins sévères, mais elle reste temporaire, se terminant par une augmentation progressive des besoins en insuline injectée [52].

1.3 Traitement actuel du diabète type 1

Insuline exogène : Lors du diagnostic initial du DT1, les patients ne présentent généralement pas de perte de sensibilité à l'insuline et répondent bien à l'insuline exogène. Les traitements standards du DT1 reposent aujourd'hui sur un équilibre précis entre différentes injections d'insuline qui varient en fonction de leur durée d'action, de leur pic d'efficacité et de leur délai d'apparition [53]. Par exemple, les niveaux de glucose sanguin basaux peuvent être contrôlés par une insuline à action intermédiaire ou lente, tandis que les fluctuations rapides (comme après un repas) nécessitent une insuline à action rapide. Réguler correctement la glycémie est essentiel mais peut s'avérer difficile. L'une des principales difficultés dans le contrôle glycémique des patients diabétiques réside dans la nature hautement dynamique des niveaux de glucose sanguin, influencée par divers facteurs tels que la composition des aliments,

l'exercice physique, le sommeil, le stress, les maladies, l'heure de la journée, la consommation de caféine et les hormones [54].

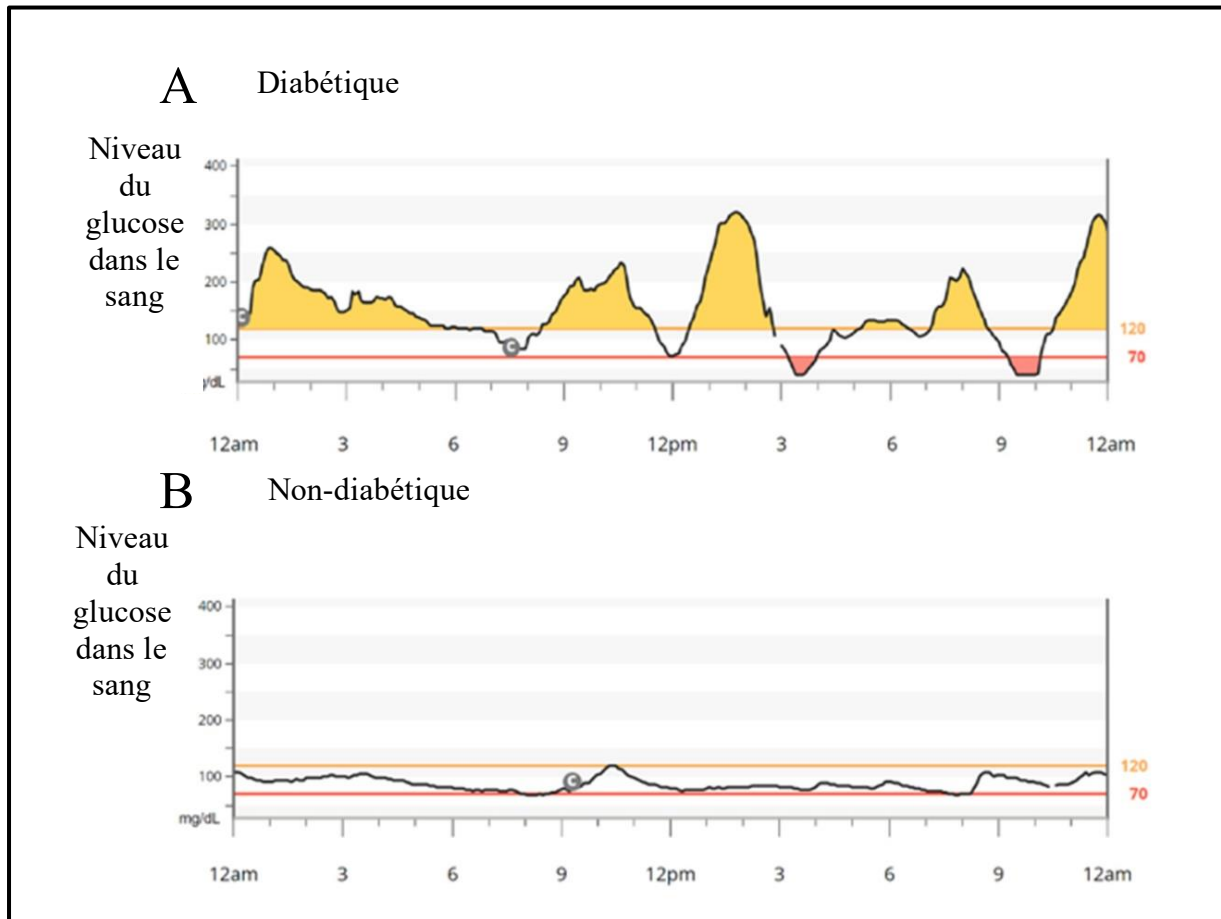


Figure 2 : Mesure continue de la glycémie chez les individus atteints de DT1 comparée à celle des individus non diabétiques. (A) Courbe représentative des niveaux glycémiques pendant 24h chez un patient avec DT1 ; (B) Niveaux glycémiques durant 24 heures chez un individu non diabétique [54].

La **Figure 2-A** illustre des mesures continues durant 24h de la glycémie d'un patient diabétique avec un contrôle glycémique relativement bon. Ces mesures diffèrent nettement de celles enregistrées chez un patient non diabétique (**Figure 2-B**). Même si le patient diabétique présentait une glycémie moyenne proche de la normale (1,52 mg/dL), il existait des fluctuations importantes. La glycémie n'était dans la plage normale que moins de 50 % du temps malgré les injections d'insuline [54]. Il a été rapporté que les niveaux moyens de glucose dans le sang des patients atteints de DT1 sont deux fois plus élevés que ceux des individus non diabétiques [55-58]. L'hyperglycémie chronique et les fluctuations rapides de la glycémie contribuent à la fois aux complications à long terme chez les individus atteints de diabète [59].

D'autre part, une quantité excessive d'insuline peut entraîner une hypoglycémie, ce qui peut provoquer une perte de conscience et même entraîner la mort en quelques minutes. Les patients atteints de DT1 développent souvent une peur accrue des épisodes d'hypoglycémie et cette crainte est considérée comme l'un des principaux obstacles à l'obtention d'un contrôle glycémique optimal chez les patients sous injections d'insuline [60, 61].

Transplantation du pancréas/îlots : Malgré les nombreuses avancées récentes dans les traitements médicaux, aucun dispositif n'a pu reproduire parfaitement les actions d'un pancréas sain. Les cellules β pancréatiques restent largement supérieures en termes de régulation des niveaux de glucose sanguin grâce à la production et à la sécrétion d'insuline. En conséquence, l'idée de la thérapie cellulaire est devenue une option de traitement de plus en plus favorable. La thérapie cellulaire consiste à utiliser des cellules vivantes comme source à long terme d'un produit thérapeutique régulé. La forme la plus élémentaire de thérapie cellulaire disponible aujourd'hui pour le traitement du diabète est la transplantation d'îlots pancréatiques. L'implantation de cellules β fonctionnelles fournit une source précise de sécrétion d'insuline. Bien que les transplantations de pancréas entier et d'îlots soient pratiquées en clinique, chaque méthode présente différents degrés de succès. Les transplantations de pancréas entier sont presque toujours effectuées en conjonction avec des transplantations rénales, car ces procédures sont chirurgicalement lourdes, comportent un risque élevé de complications et nécessitent une immunosuppression à vie [62-64].

Des avancées significatives dans la transplantation d'îlots ont été réalisées lorsque Ricordi et ses collaborateurs (**Figure 3**) ont inventé une méthode permettant d'isoler efficacement les îlots pancréatiques du reste du pancréas [65], ainsi qu'avec le développement du protocole d'Edmonton (une méthode d'implantation d'îlots), qui a permis à 100 % des patients de devenir indépendants de l'insuline un an après la transplantation [66]. Cependant, un suivi durant cinq années après la transplantation a montré que seulement 10 % des patients restaient indépendants de l'insuline [67]. En outre, il y a une perte considérable de masse d'îlots lors de la transplantation. Pour compenser cette perte, le protocole d'Edmonton nécessitait la transplantation d'îlots provenant d'au moins deux donneurs de pancréas par patient [68].

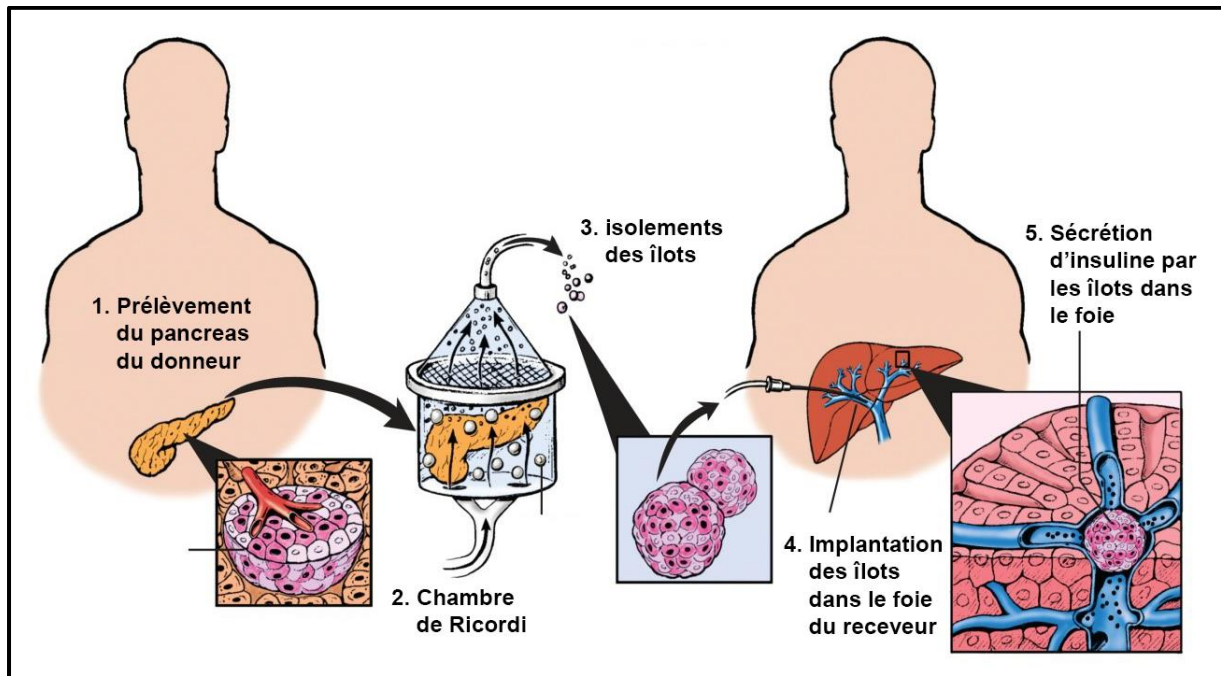


Figure 3 : Transplantation des îlots, d'après l'Institut de Recherche sur le Diabète, Université de Miami, Robert Margulies.

Un autre obstacle majeur à l'utilisation généralisée de la transplantation tissulaire pour le traitement du DT1 est la nécessité d'une immunosuppression pour prévenir le rejet du tissu transplanté par le système immunitaire du patient. Chez les patients pédiatriques en particulier, les risques liés à une immunosuppression à vie sont trop importants pour que ce traitement soit recommandé sur le plan médical, sauf dans des cas extrêmes [69]. Malgré certains succès initiaux, la transplantation d'îlots demeure largement expérimentale, et davantage de recherches sont nécessaires avant qu'elle puisse être considérée comme un remède efficace pour les patients atteints de DT1.

1.4 Modèle du diabète expérimental STZ/NIT-1

1.4.1 Les étapes prédiabète

Les étapes prédiabète correspondent à la période précédant l'entrée du système immunitaire dans la pathogenèse du DT1. Pendant cette phase, des événements auto-immuns se produisent, tels que l'infiltration des îlots de Langerhans par les cellules immunitaires et la libération d'auto-antigènes [70]. Ces événements contribuent à la destruction des cellules β et à une diminution de la sécrétion d'insuline, marquant ainsi le début du diabète [71]. Au cours de cette période cruciale, les cellules immunitaires, en réaction à des facteurs environnementaux et génétiques, pénètrent avidement dans les îlots de Langerhans [72]. Une véritable armée de cellules immunitaires s'infiltré dans ces îlots, libérant des substances qui modulent l'expression

génétique des cellules β [73]. Cela entraîne une cascade de réactions inflammatoires, précipitant la détérioration rapide des cellules β [74]. Outre l'infiltration des îlots de Langerhans par les cellules immunitaires, la production accrue d'auto-antigènes joue également un rôle clé dans la pathogenèse du DT1 [75]. Les cellules β sont bombardées par des auto-antigènes produits par le propre organisme, entraînant une réponse auto-immune vigoureuse [76]. Cela active encore davantage le processus de destruction des cellules β , conduisant à une diminution progressive de la sécrétion d'insuline [77]. Tout au long de cette phase pré-diabétique, les signes précurseurs du DT1 commencent à apparaître. Les personnes peuvent ressentir une fatigue constante, une soif excessive, une augmentation de la miction et une perte de poids inexplicée [78]. Ces symptômes sont des indicateurs clairs de la détérioration de la fonction des cellules β et du dysfonctionnement du système de régulation de la glycémie [79]. En résumé, les étapes prédiabète jouent un rôle crucial dans la cascade de destruction des cellules β et dans le développement ultérieur du DT1. La phase pré-diabétique est caractérisée par l'infiltration immunitaire des îlots de Langerhans [80], la libération d'auto-antigènes et la diminution de la sécrétion d'insuline [81]. Il est essentiel de reconnaître et de surveiller ces étapes pour permettre un dépistage précoce et une intervention préventive afin de ralentir la progression de la maladie et d'améliorer la qualité de vie des patients atteints de DT1 [82].

1.4.2 Mécanismes physiopathologiques sous-jacents

Les mécanismes physiopathologiques sous-jacents aux étapes prédiabète impliquent une interaction complexe et multifactorielle entre des facteurs génétiques héréditaires, environnementaux et immunologiques [83]. Ces mécanismes, essentiels pour comprendre le développement de cette maladie chronique, comprennent la perte progressive de la tolérance immunitaire [84], l'activation aberrante des lymphocytes T [84] et la production déséquilibrée d'auto-anticorps dirigés spécifiquement contre les cellules β du pancréas, responsables de la production d'insuline [85]. De plus, l'inflammation chronique persistante ainsi que le stress oxydatif, résultant d'un déséquilibre entre la production de radicaux libres et le système antioxydant du corps, jouent un rôle déterminant dans le processus pathologique de destruction graduelle et irréversible des cellules β [86], conduisant inexorablement au DT1 [87]. Comprendre ces mécanismes en profondeur est crucial pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à ralentir, voire prévenir, l'apparition du DT1 et à améliorer ainsi la qualité de vie des personnes prédisposées à cette maladie.

1.4.3 Biomarqueurs et diagnostics pré-diabétiques

Les biomarqueurs et diagnostics pré-diabétiques sont d'une importance capitale car ils permettent de repérer les individus ayant un risque élevé de développer un DT1 [88]. Les auto-anticorps ciblant des antigènes spécifiques des cellules β , tels que la glutamate décarboxylase et l'anticorps anti-tyrosine phosphatase (IA-2), jouent un rôle clé en tant que biomarqueurs permettant de prédire l'apparition du diabète. En outre, il est possible d'évaluer la fonction des cellules β en mesurant la glycémie à jeun et en effectuant une stimulation au glucose, ce qui permet un diagnostic précoce du DT1 [89]. Ce sont des méthodes particulièrement efficaces pour identifier les personnes à risque et mettre en place des mesures préventives et de traitement approprié afin de réduire les complications liées à cette maladie chronique [90]. Il est donc primordial de promouvoir la recherche et le développement de nouveaux biomarqueurs et diagnostics pré-diabétiques afin de lutter efficacement contre le DT1 et d'améliorer la prise en charge des patients dans le futur [91].

1.4.4 Les cellules β et leurs fonctionnements

Les cellules β du pancréas endocrine sont responsables de la production et de la libération d'insuline. Leur fonctionnement normal implique la détection des variations de glucose dans le sang et la sécrétion d'insuline en conséquence [92]. Lorsque le glucose augmente après un repas, les cellules β libèrent de l'insuline pour aider les cellules à absorber le glucose, maintenant ainsi l'équilibre glycémique [93].

Le rôle majeur et extrêmement important des cellules β dans le diabète ne peut être sous-estimé, car c'est précisément le dysfonctionnement de ces cellules qui mène inexorablement au développement du DT1 [87]. Dans cette redoutable affection, le système immunitaire se retourne contre lui-même, attaquant impitoyablement les cellules β qui sont alors condamnées à une destruction systématique. En conséquence, la sécrétion d'insuline, cette précieuse hormone vitale, se trouve irrémédiablement diminuée [77]. Privés de l'apport nécessaire en insuline, les niveaux de glucose sanguin atteignent des sommets alarmants, provoquant ainsi une hyperglycémie caractéristique et dévastatrice du diabète. Cette condition exige une vigilance constante et une prise en charge méticuleuse pour maintenir un équilibre glycémique stable et préserver la santé à long terme [94].

Le dysfonctionnement des cellules β dans le DT1 peut résulter de divers facteurs, notamment la susceptibilité génétique, des facteurs environnementaux et des interactions

complexes [87]. Les cellules β endommagées ou détruites ne peuvent pas remplir leur rôle fondamental dans la régulation de la glycémie, ce qui entraîne une dérégulation du métabolisme du glucose et la survenue de symptômes de diabète. Cela signifie que le corps n'est plus en mesure de maintenir un niveau normal de sucre dans le sang, ce qui peut entraîner une hyperglycémie chronique [95]. Cette condition peut avoir un impact majeur sur la santé globale et le bien-être du patient, entraînant des complications associées telles que la neuropathie diabétique, les maladies cardiovasculaires et rénales, ainsi que des problèmes de vue [96]. Il est donc essentiel de comprendre et de traiter le dysfonctionnement des cellules β de manière efficace pour garantir une gestion appropriée du DT1.

1.4.5 Les différents modèles du diabète type 1

Les modèles expérimentaux du diabète ont une grande importance dans la compréhension de la maladie et dans le développement de nouveaux traitements. Grâce à ces modèles, il est possible d'étudier les mécanismes physiopathologiques sous-jacents, de tester l'efficacité de nouveaux médicaments et d'explorer des approches thérapeutiques novatrices. Les informations obtenues à partir de ces modèles expérimentaux contribuent de manière significative à la recherche et à la compréhension du diabète [97].

Le modèle NOD (Non-Obese Diabetic), développé pour l'étude du DT1 en raison de sa similarité frappante avec la maladie chez l'homme, est un outil hautement apprécié dans la recherche médicale. Doté de caractéristiques spécifiques de l'auto-immunité et d'une destruction des cellules β du pancréas, ce modèle est d'une importance capitale pour une compréhension approfondie de la pathogenèse de la maladie [98]. Cependant, il est essentiel de souligner que la manipulation et l'entretien de ce modèle nécessitent une expertise et des conditions spécifiques pour garantir des résultats fiables et reproductibles. La précision des résultats obtenus dépend de la rigueur avec laquelle le modèle est maintenu et manipulé, ainsi que de la prise en compte de facteurs tels que l'alimentation, les soins et l'environnement. Pour ce faire, il est nécessaire de respecter des protocoles stricts, de mettre en place des installations spécialisées et de veiller à ce que les procédures soient effectuées par du personnel qualifié. Ces précautions sont essentielles pour minimiser les sources d'erreurs et d'incohérences expérimentales, et pour garantir la validité et la fiabilité des résultats obtenus [99].

Les lignées cellulaires offrent des modèles alternatifs précieux pour l'étude du diabète, permettant la manipulation expérimentale et la reproduction des conditions *in vitro*. Elles sont facilement accessibles et permettent des études à haut débit, offrant une flexibilité et une

reproductibilité des expériences [99]. De plus, ces modèles cellulaires évitent les problèmes éthiques liés à l'utilisation d'animaux. Cependant, ils présentent des limitations telles que le manque de contexte tissulaire, la difficulté à reproduire fidèlement l'environnement *in vivo* et la complexité des interactions cellulaires dans un organisme complet [100].

1.4.6 Le modèle de diabète utilisant la STZ et la lignée de cellules NIT-1

Le modèle de diabète utilisant la STZ et la lignée de cellules NIT-1 démontré dans la **Figure 4** est largement reconnu et utilisé dans le domaine de la recherche sur le diabète, en raison de leur capacité à induire une hyperglycémie et à imiter les caractéristiques physiopathologiques du DT1. Ces modèles facilitent la recherche sur les mécanismes sous-jacents du diabète et permettent d'évaluer les thérapies potentielles, ce qui les rend inestimables dans ce domaine de la recherche biomédicale.

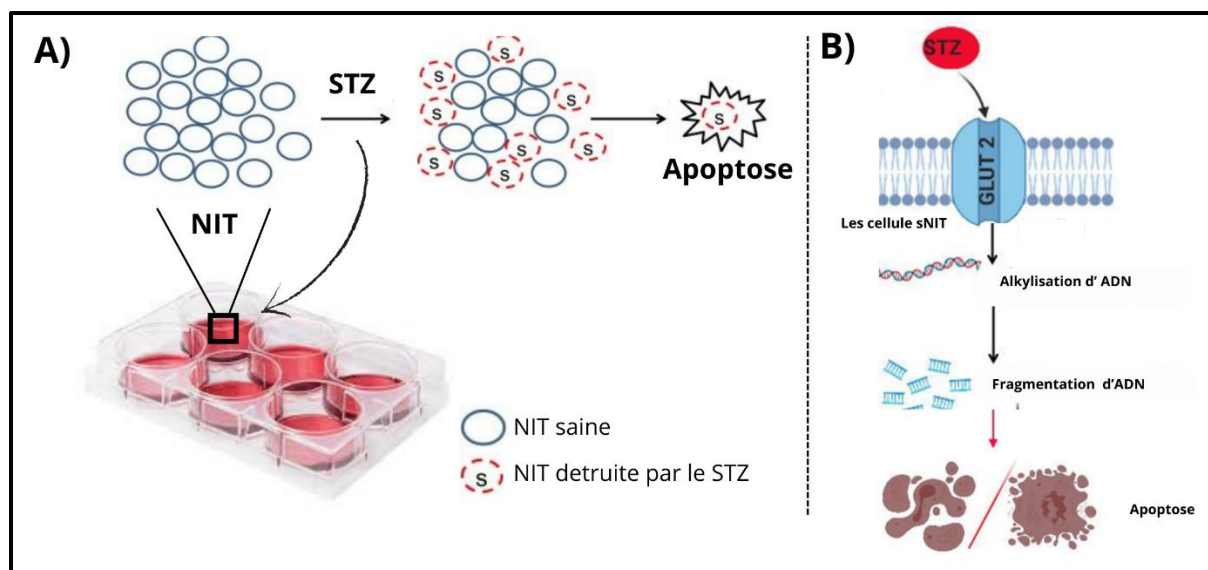


Figure 4 : A) Modèle STZ/NIT1 du diabète type 1 [101] modifié. B) Mode d'action de la STZ [102] modifié.

Le mécanisme principal de la STZ réside dans sa capacité à détruire sélectivement les cellules β du pancréas. Cette destruction entraîne un déficit en insuline, ce qui provoque une hyperglycémie, ressemblant fortement à celle observée dans le DT1 humain [103]. En outre, l'hyperglycémie chronique induite par la STZ persiste même après l'élimination de la substance du corps, ce qui permet d'étudier la glucotoxicité et ses effets à long terme sur l'organisme [104].

L'un des avantages majeurs des modèles à base de STZ est leur taux d'induction élevé. Des protocoles modifiés pour l'administration de STZ ont montré un taux de réussite atteignant

jusqu'à 94,28 % dans l'induction du diabète chez la souris, ce qui améliore considérablement la fiabilité des expériences [105]. De plus, la STZ est polyvalente et peut être utilisée sur diverses souches de rongeurs, avec des protocoles spécifiques permettant de minimiser la mortalité et le stress des animaux [106].

Les modèles induits par la STZ sont essentiels pour le dépistage de nouveaux traitements contre le diabète et pour une meilleure compréhension des mécanismes de la maladie [103]. Cependant, des modifications récentes visent à réduire la souffrance des animaux lors de l'induction du diabète, conformément aux normes éthiques en vigueur dans la recherche scientifique [106].

Bien que les modèles STZ et NIT-1 soient très efficaces, certains chercheurs soulignent qu'ils ne reproduisent peut-être pas entièrement la complexité du diabète humain, notamment en ce qui concerne les facteurs métaboliques et environnementaux qui influencent la progression de la maladie. Cela met en lumière la nécessité de disposer de modèles complémentaires, plus fidèles à la diversité biologique humaine, pour enrichir la recherche sur le diabète et améliorer les approches thérapeutiques.

2 Composés naturels et leur rôle dans le diabète type 1

2.1 Thymoquinone (TQ)

2.1.1 Structures et propriétés

La composition chimique des graines de *Nigella sativa* est riche et divers composants chimiques actifs en ont été isolés. Les graines contiennent une huile fixe (>30% en poids) et une huile volatile (0,40–0,45%) dont les principes actifs incluent la TQ, la thymohydroquinone, la dithymoquinone (nigellone), le thymol, le carvacrol, la nigellicine, la nigellidine et l'-hedrine. Néanmoins, la plupart des actions connues ont été attribuées à la TQ [107].

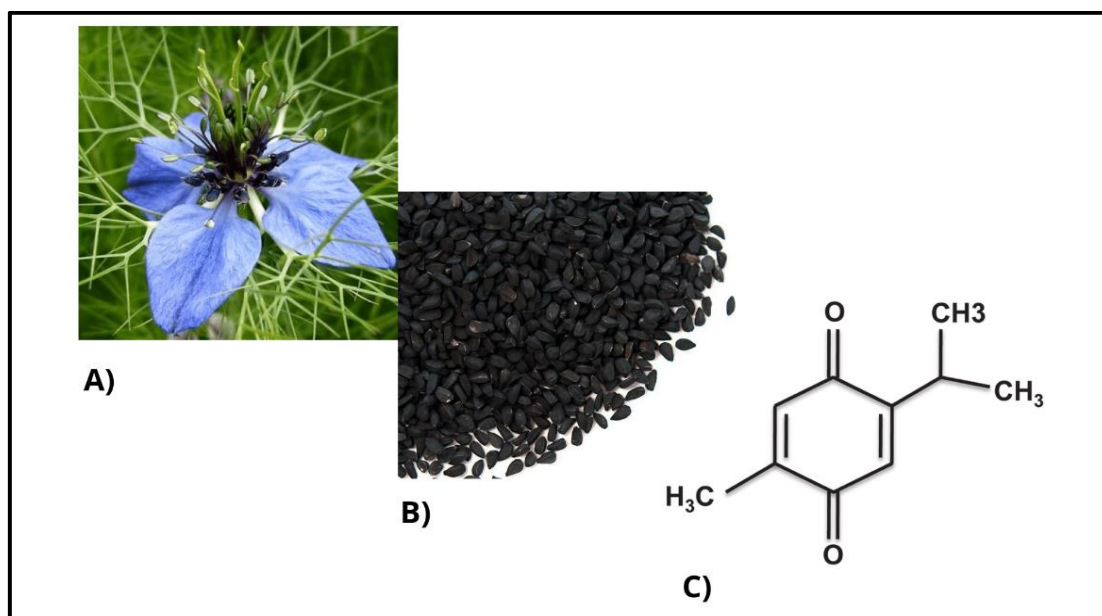


Figure 5 A) La fleur de la *Nigella sativa*. B) Ses graines. C) Structure chimique de la TQ

La TQ est le composant le plus bioactif des graines et de l'huile volatile (18,4–24%) [108]. Elle a été extraite pour la première fois par El-Dakhakhny [109]. L'illustration de la fleur NS, des graines et de la structure chimique de la TQ sont présentées dans la **Figure 5**, et les propriétés chimiques les plus importantes de la TQ sont résumées dans le **Tableau 2**.

Tableau 2 : Propriétés chimiques de la TQ (PubChem)

Nom systématique/IUPAC	2-Isopropyl-5-méthylbenzo-1,4-quinone
Formule moléculaire	C ₁₀ H ₁₂ O ₂
Masse molaire	164,20 g/mol
Apparence	Cristallin et jaune foncé
Numéro CAS	490-91-5
CID PubChem	10281

La TQ existe sous différentes formes tautomères, incluant la forme énol, la forme céto et des mélanges. La forme céto représente la fraction majeure (~90%) et est responsable des propriétés pharmacologiques de ce composé [110]. La TQ est une molécule hydrophobe, ce qui rend sa solubilité difficile, pouvant affecter sa biodisponibilité et entraîner des limitations dans la formulation des médicaments. C'est pourquoi des tentatives récentes ont visé à synthétiser des analogues de la TQ avec une biodisponibilité et une activité améliorée. [111].

2.1.2 Potentiel thérapeutique et toxicité

La TQ est reconnue pour ses multiples effets bénéfiques, notamment ses activités antioxydantes, anti-inflammatoires et immunomodulatrices. En tant que puissant antioxydant, elle neutralise les espèces réactives de l'oxygène (ROS), protégeant ainsi les biomolécules contre les dommages oxydatifs [112, 113]. La TQ améliore également l'expression d'enzymes antioxydantes comme la glutathion-S-transférase (GST), la superoxyde dismutase (SOD) et la catalase (CAT), renforçant les défenses cellulaires contre le stress oxydatif [114]. Ses effets anti-inflammatoires se manifestent par l'inhibition de la production de prostaglandines et de leucotriènes, ainsi que la réduction de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1, l'IL-6 et le TNF- α [115, 116]. En modulant l'activité de NF- κ B et en inhibant l'expression de la COX-2 et de l'iNOS, la TQ atténue les réponses inflammatoires et auto-immunes [117, 118]. De plus, la TQ présente des propriétés protectrices contre la toxicité induite par des agents tels que le cisplatine et l'acétaminophène [119-121] et elle a montré une efficacité dans des modèles de maladies telles que l'asthme allergique et la polyarthrite rhumatoïde [10, 122].

La TQ joue également un rôle crucial dans la modulation de la réponse inflammatoire en régulant la production de cytokines et ses effets anticancéreux sont particulièrement remarquables [123]. Elle exerce une activité anti-proliférative et induit l'apoptose via plusieurs mécanismes, tout en augmentant l'efficacité des traitements chimiothérapeutiques comme la doxorubicine [124-126]. En ce qui concerne ses activités antimicrobiennes, la TQ a démontré une efficacité significative contre diverses souches bactériennes y compris *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* en inhibant la formation de biofilm [127, 128]. De plus, elle a des propriétés protectrices contre des infections parasitaires et antifongiques contre des champignons pathogènes tels que *Candida albicans* [129-131].

Sur le plan hépatoprotecteur, la TQ neutralise les effets néfastes de divers agents toxiques sur le foie, comme le tétrachlorure de carbone (CCl₄) [132, 133]. Elle a également montré une efficacité contre des hépatotoxines comme la cyperméthrine en améliorant les paramètres hépatiques [134, 135]. Par ailleurs, la TQ présente des effets hypoglycémiques et anti-diabétiques significatifs en améliorant les niveaux de glucose chez des modèles de diabète induit par la STZ [136]. Elle a également démontré des effets bénéfiques sur les complications liées au diabète, notamment l'amélioration de la fonction rénale et la protection des cellules β des dommages oxydatifs [137, 138].

Ces propriétés confèrent à la TQ un potentiel thérapeutique prometteur dans la protection contre les dommages oxydatifs, les complications inflammatoires, les maladies auto-immunes et les troubles métaboliques, tout en nécessitant des recherches supplémentaires pour mieux comprendre ses mécanismes d'action [139, 140]. Le manque de biodisponibilité, les paramètres pharmacocinétiques et les problèmes de formulation ont retardé l'utilisation de la TQ en phase clinique. Par conséquent, des recherches supplémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre les propriétés pharmacologiques de la TQ en vue d'un développement clinique futur [1].

Des études *in vitro* et *in vivo* sur la toxicité de la TQ ont montré divers effets indésirables, soulignant la nécessité de recherches approfondies pour établir un profil toxicologique complet avant d'envisager son usage thérapeutique. Les tests de toxicité aiguë, qui évaluent les effets néfastes après une exposition unique ou de courte durée, indiquent que la TQ administrée par voie orale et intrapéritonéale présente des doses létales variables en fonction de l'espèce et de la méthode d'administration, tandis qu'une dose plus faible a été considérée comme sans effet nocif dans les études de toxicité subaiguë. De plus, une certaine concentration de TQ dans l'eau potable n'a montré aucune toxicité, mais des doses plus élevées peuvent perturber le développement embryonnaire chez le rat [141]. En termes de génotoxicité, la TQ à forte dose augmente les aberrations chromosomiques et les dommages à l'ADN dans le foie et les reins. Bien que la plupart des études soient concordantes, celles de Badary et al. (1999) diffèrent quant à la toxicité aiguë et chronique de la TQ sans explication [142]. Les chercheurs concluent que la TQ peut induire des effets oxydatifs, diminuer le GSH cellulaire, augmenter les niveaux de MDA et l'activité de la CAT, activer p53, et réduire les niveaux de Bcl-2, de manière dépendante de la dose et de la durée [143, 144].

2.2 Quercétine (Quer)

2.2.1 Structures et propriétés

La structure moléculaire de la Quer est composée de deux noyaux aromatiques, associés à un groupe carbonyle en position 4 cétonique et à un groupe hydroxyle en positions 3, 5, 7 et 3'. Ces noyaux aromatiques sont reliés par un radical éthane. La présence de plusieurs groupes hydroxyles confère à la molécule de Quer des propriétés antioxydantes. La structure spatiale de la molécule est également importante pour ses interactions avec d'autres molécules dans les réactions chimiques et biologiques [145].

La formule chimique de la Quer est $C_{15}H_{10}O_7$ et son poids moléculaire est d'environ 302,24 g/mol. Cette formule montre la composition élémentaire de la molécule, indiquant la présence de 15 atomes de carbone, 10 atomes d'hydrogène et 7 atomes d'oxygène (**Figure 6**). Le poids moléculaire est utile pour calculer les concentrations de solutions de Quer et pour comprendre son comportement lors de réactions chimiques. Ces caractéristiques sont essentielles pour une compréhension approfondie de la Quer en tant que composé chimique [146].

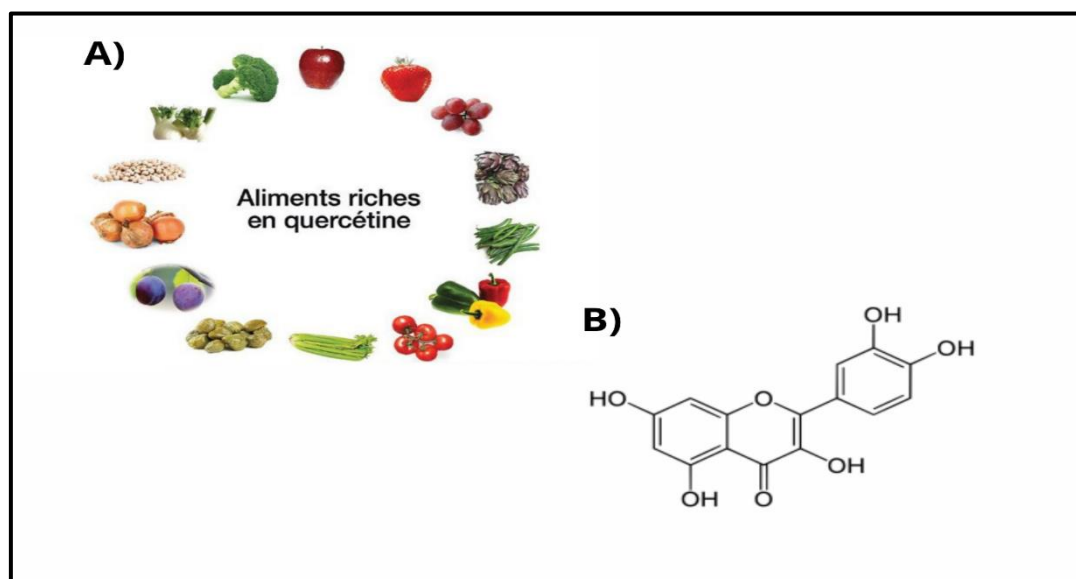


Figure 6 A) Sources de la Quer, B) structure chimique de la Quer.

Tableau 3 : Propriétés chimiques de la Quer (**PubChem**)

Nom systématique/IUPAC	3,3',4',5,7-Pentahydroxyflavone
Formule moléculaire	$C_{15}H_{10}O_7$
Masse molaire	302,24 g/mol
Apparence	Cristallin et jaune pâle à jaune foncé
Numéro CAS	117-39-5
CID PubChem	5280343

La Quer montre une réactivité chimique intéressante en raison de ses multiples groupements fonctionnels. Elle subit des réactions d'oxydation et de réduction qui modifient sa structure moléculaire. De plus, elle peut subir des réactions d'estérification [147] et de glycosylation, conduisant à la formation de dérivés estérifiés et glycosylés de la Quer, qui peuvent présenter des propriétés physiques et chimiques différentes de la molécule d'origine

[148]. Elle peut subir des réactions d'oxydation, telles que l'addition d'oxygène ou la perte d'hydrogène, menant à la formation de différents produits oxydés. Inversement, elle peut également être réduite par gain d'hydrogène ou perte d'oxygène. Ces réactions d'oxydation et de réduction peuvent avoir des implications importantes sur les activités biologiques de la Quer, ainsi que sur sa stabilité et son potentiel d'utilisation dans divers domaines [149].

2.2.2 Propriétés pharmacologiques et toxicité

La Quer est un puissant antioxydant naturel présent dans de nombreuses plantes. Ses propriétés antioxydantes neutralisent les radicaux libres et protègent les cellules contre les dommages oxydatifs, contribuant ainsi à la prévention de maladies comme les maladies cardiovasculaires et le diabète [150-152]. En effet, la Quer montre un potentiel thérapeutique pour le DT2, en améliorant l'utilisation du glucose dans les tissus périphériques et en augmentant la sensibilité à l'insuline, ce qui aide à réguler les niveaux de glucose sanguin. Elle agit également en inhibant l'absorption intestinale du glucose, contribuant ainsi au contrôle glycémique chez les personnes atteintes de diabète [153, 154].

En plus de ses effets antioxydants, la Quer possède des propriétés antimicrobiennes. Elle montre une activité antibactérienne en inhibant la croissance de pathogènes tels que *E. coli* et *Staphylococcus aureus*. Elle réduit également la formation de biofilms bactériens, une caractéristique clé pour lutter contre les infections résistantes [155-157].

Sur le plan antitumoral, la Quer favorise l'apoptose dans diverses cellules cancéreuses, bloquant ainsi leur prolifération. Ce mécanisme repose sur l'inhibition de voies de signalisation critiques, comme PI3K/AKT/mTOR impliquées dans la survie des cellules cancéreuses [158-160]. Elle démontre également une forte activité anti-inflammatoire et immunomodulatrice en régulant la production de cytokines pro-inflammatoires et en inhibant des enzymes comme les cyclooxygénases (COX) et les lipoxygénases (LOX), ce qui en fait un agent prometteur dans le traitement des allergies et des maladies inflammatoires [161-163].

La Quer est également bénéfique pour la santé cardiovasculaire. Elle réduit la pression artérielle, diminue l'oxydation des LDL et renforce la fonction endothéliale, contribuant ainsi à la prévention de l'athérosclérose et d'autres maladies cardiovasculaires [164, 165]. En outre, ses propriétés antioxydantes la rendent efficace pour atténuer la toxicité des mycotoxines, comme l'aflatoxine B1, en protégeant les cellules du stress oxydatif et de l'apoptose [166, 167].

La Quer possède une action préventive contre l'obésité et le système nerveux. Elle présente également des effets positifs sur la mémoire et protège contre les dommages causés par des métaux lourds tels que le plomb et le mercure [153, 154, 168]. En raison de ses multiples propriétés, la Quer est donc considérée comme un composé aux vastes applications thérapeutiques, avec un potentiel croissant pour des applications cliniques et préventives.

Bien que la Quer présente de nombreux bienfaits thérapeutiques, elle peut également induire des effets toxiques à des concentrations élevées ou en cas d'exposition prolongée. En particulier, des études *in vitro* ont révélé que la Quer peut exercer des effets génotoxiques en perturbant les voies de signalisation cellulaire et en augmentant la production de radicaux libres lorsque son métabolisme n'est pas optimal [169, 170]. Elle peut aussi causer des dommages cellulaires et potentiellement affecter l'ADN, ce qui souligne la nécessité de poursuivre les recherches sur ses mécanismes d'action et ses effets secondaires potentiels avant de la recommander en usage clinique à fortes doses [171].

2.3 Curcumine (Cur)

2.3.1 Structures et propriétés

La Cur est une molécule organique de la famille des curcuminoïdes composée de deux groupes méthoxyphénol reliés à un résidu beta-dicétonique (**Figure 7**). Sa formule moléculaire est $C_{21}H_{20}O_6$, avec une masse molaire de 368,38 g/mol. La structure de la Cur est basée sur un cycle de résorcinol fusionné à un cycle de méthoxyphénol ce qui lui confère des propriétés uniques et intéressantes [172].

La Cur est un pigment jaune vif qui présente une faible solubilité dans l'eau mais soluble dans les solvants organiques tels que l'éthanol et l'acétone. La Cur a une structure cristalline, elle a un point de fusion d'environ 183°C et une température de décomposition d'environ 220°C. De plus, la Cur présente une absorption forte dans le spectre visible, ce qui lui confère sa couleur distinctive [173].

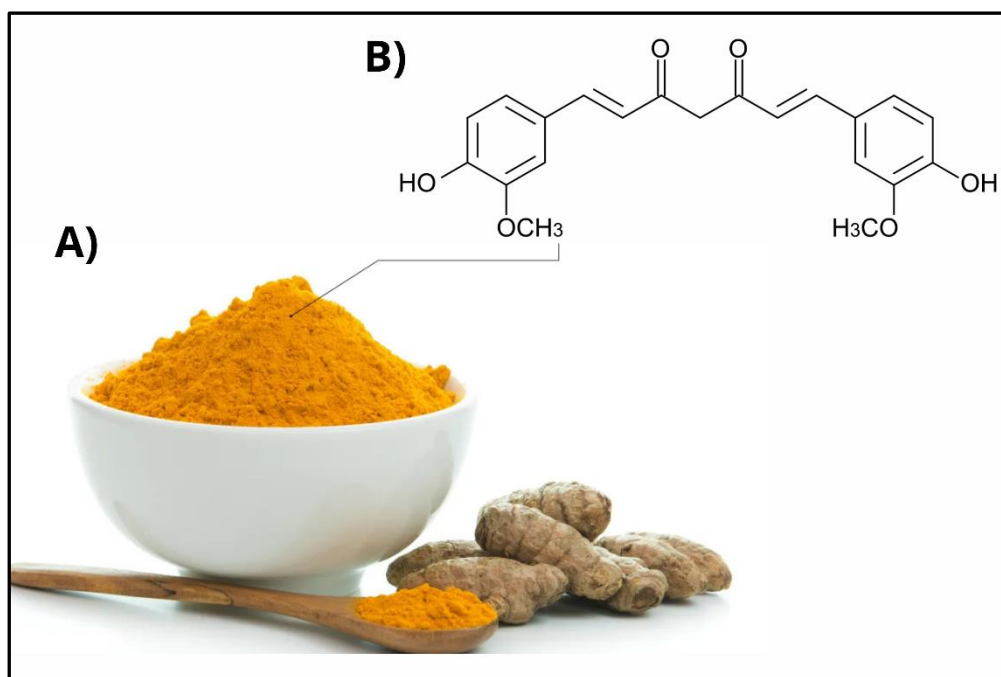


Figure 7 : A) le curcuma et la Cur, B) structure chimique de la Cur.

La Curcuma réagit avec les acides pour former des sels et avec les bases pour donner des composés alcalins. Cette réactivité est principalement due aux groupes fonctionnels présents dans sa structure moléculaire, qui lui permettent de réagir avec différentes substances chimiques. Elle présente aussi une réactivité avec les agents réducteurs et oxydants, ce qui lui confère des propriétés antioxydantes. Elle agit comme un piègeur de radicaux libres et peut réduire les composés oxydants. Cette réactivité est importante pour ses effets bénéfiques sur la santé humaine [174].

2.3.2 Propriétés pharmacologiques et toxicité

La Curcuma, un composé liposoluble extrait de *Curcuma longa L.*, est reconnue pour ses effets antioxydants, anti-inflammatoires, antitumoraux et antiviraux. Son potentiel est exploré pour traiter plusieurs maladies chroniques telles que les maladies cardiovasculaires, pulmonaires, neurologiques et auto-immunes [175]. Bien que prometteuse, la Curcuma a une faible biodisponibilité due à son absorption rapide et à son métabolisme élevé. Des stratégies telles que l'utilisation de nanoparticules ou d'adjuvants comme la pipérine et la Quercétine, sont donc étudiées pour en améliorer l'efficacité thérapeutique [176-178].

La Curcuma possède des propriétés antimicrobiennes documentées et peut agir contre des bactéries gram-positives et gram-négatives telles que *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* et *Escherichia coli*. Elle montre aussi une activité antivirale contre plusieurs virus,

notamment le virus de l'hépatite, le virus respiratoire syncytial, le VIH et récemment contre les coronavirus (SARS-CoV et COVID-19) [179-182].

En matière d'effets anti-inflammatoires, la Cur inhibe des cytokines pro-inflammatoires, comme l'interleukine-6 (IL-6) et le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α), ce qui réduit les symptômes inflammatoires dans des maladies telles que l'arthrite et les inflammations du système respiratoire [183-185].

Elle présente également des effets cardioprotecteurs en réduisant la formation de thrombus, notamment via l'inhibition de la synthèse de la thromboxane A2 (TXA2) et la régulation des signaux calciques. Ces mécanismes contribuent à prévenir les risques d'athérosclérose et à maintenir une pression artérielle saine, rendant ainsi la Cur prometteuse pour les traitements cardiovasculaires [186, 187].

Dans le traitement des maladies métaboliques comme le DT2, la Cur montre des effets hypoglycémisants. Elle abaisse la glycémie, réduit la résistance à l'insuline et inhibe les enzymes digestives impliquées dans l'absorption des glucides [188-190]. De plus, son effet antioxydant est puissant, avec une capacité de piégeage des radicaux libres supérieure à celle de la vitamine C et de la vitamine E. Elle stimule également la production de glutathion, un antioxydant endogène, ce qui aide à réduire les dommages oxydatifs, notamment dans des situations comme les accidents vasculaires cérébraux et les infarctus [191-193].

Enfin, la Cur démontre des effets bénéfiques contre les maladies neurodégénératives, comme la maladie d'Alzheimer, en inhibant l'accumulation des plaques bêta-amyloïdes et la phosphorylation anormale de la protéine tau, des marqueurs clés de cette pathologie. Ces effets neuroprotecteurs sont essentiels pour ralentir la dégénérescence neuronale et prévenir la progression de la démence [194, 195].

3 Encapsulation et systèmes de libération des principes actifs

Le développement des systèmes d'encapsulation repose sur des principes fondamentaux visant à protéger les substances actives et à contrôler leur libération. L'encapsulation consiste à enfermer les substances dans des matériaux de revêtement pour créer des microcapsules. Ces microcapsules peuvent être utilisées dans divers domaines tels que l'industrie pharmaceutique [196], l'agroalimentaire [197] ou encore les cosmétiques, offrant une protection contre les influences externes. Les principes de l'encapsulation s'articulent autour de la sélection des

matériaux de revêtement, des procédés de fabrication et du contrôle de la libération des substances actives [198].

Les mécanismes d'encapsulation comprennent plusieurs méthodes telles que la coacervation, l'émulsification [199], la précipitation [200] et la polymérisation [201]. Chaque méthode offre des avantages spécifiques en termes de contrôle de la libération, de stabilité et de compatibilité avec les substances encapsulées.

Les polymères sont des macromolécules composées de nombreuses unités structurales répétées. Ils jouent un rôle essentiel dans le développement des systèmes d'encapsulation en raison de leur capacité à former des matrices solides et stables. De plus, les propriétés spécifiques des polymères telles que leur perméabilité, leur biodégradabilité et leur compatibilité avec différents matériaux en font des composants clés dans la conception de systèmes d'encapsulation plus avancés [202].

La structure des polymères est essentiellement déterminée par la nature des monomères qui les composent et par les processus de polymérisation. Les polymères sont classés en fonction de leur origine (naturelle ou synthétique), de leur architecture (linéaire, ramifiée, réticulée) et de leur comportement vis-à-vis de la température (thermoplastiques, thermodurcissables). Comprendre la structure et la classification des polymères est crucial pour la conception de systèmes d'encapsulation adaptés à des applications spécifiques [203].

Les propriétés physiques et chimiques des polymères, telles que la masse moléculaire, la densité, la résistance mécanique, la température de transition vitreuse, la tension superficielle, l'indice de réfraction, la perméabilité aux gaz, l'absorption d'eau et la stabilité chimique jouent un rôle déterminant dans le comportement des systèmes d'encapsulation. Comprendre ces propriétés est essentiel pour sélectionner les polymères les plus adaptés aux exigences spécifiques de chaque application [204].

Les polymères jouent un rôle clé dans les systèmes d'encapsulation en fournissant une barrière protectrice contre les agents extérieurs tels que l'humidité, les gaz, la lumière et les contaminants. Leur capacité à modifier la libération, la stabilité, la solubilité et la biodisponibilité des composés encapsulés en fait des outils précieux dans une large gamme d'industries, notamment pharmaceutique, alimentaire, cosmétique et agricole. Leur flexibilité et leur adaptabilité permettent de répondre à des besoins spécifiques en matière d'encapsulation [203].

3.1 PEG et technologie de la PEGylation

Le polyéthylène glycol (PEG) est un polymère hydrosoluble linéaire ou ramifié, constitué de groupes hydroxyles terminaux et produit par polymérisation anionique de l'oxyde d'éthylène ($H - (O-CH_2-CH_2)_n -OH$). Le nombre des unités n est déterminé selon le poids moléculaire moyen du polymère (**Tableau 4**). Utilisé dans l'industrie biopharmaceutique, le PEG optimise les propriétés pharmacocinétiques des molécules biologiques grâce à sa capacité de liaison aux protéines et à d'autres biomolécules. Il améliore ainsi la stabilité et prolonge la demi-vie des protéines thérapeutiques, les rendant plus résistantes aux processus de dégradation dans le corps humain [205, 206]. En raison de sa non-toxicité, de sa biocompatibilité, de son absence d'immunogénicité et de son excellente solubilité dans l'eau, le PEG est souvent intégré dans les traitements pour maximiser la durabilité des effets thérapeutiques et assurer une diffusion plus efficace dans les tissus cibles. Reconnu comme un polymère sûr par la FDA, il est largement utilisé pour diverses applications thérapeutiques et industrielles [207].

Tableau 4 : formule structurale et masse moléculaire des différents grades du PEG [208].

Grade	n	Poids moléculaire moyen
PEG 200	4,2	190 – 210
PEG 400	8,7	380 - 420
PEG 600	13,2	500 - 600
PEG 1000	22,3	900 - 1000
PEG 3000	60 - 75	2700 - 3300
PEG 4000	69 – 84	3000 - 4800
PEG 8000	181,2	7000 - 9000

Le principe de la PEGylation repose sur la conjugaison de molécules de PEG aux biomolécules via des liaisons stables ou dégradables. Les réactifs de PEGylation incluent des structures linéaires et ramifiées, permettant respectivement une modification ciblée ou une augmentation de la densité de PEG au site de modification, ce qui accroît le volume hydrodynamique et prolonge la demi-vie circulante de la molécule [209, 210]. La technologie de PEGylation utilise plusieurs réactifs, notamment le N-Hydroxysuccinimide (NHS esters) qui ciblent principalement les groupes amines des lysines pour former des liaisons amides stables et les hydrazides pour la formation de liaisons hydrazones ou oxime avec les groupes carboxyles [211-213]. Des techniques avancées telles que la PEGylation, sont également employées pour

permettre la libération contrôlée de la biomolécule native, ce qui est bénéfique pour les prodrogues. Cette technologie utilise des systèmes de liaisons dégradables, comme ceux basés sur le disulfure, pour relâcher la protéine native sous sa forme active [214, 215].

3.1.1 Avantages du PEG

3.1.1.1 Toxicité

Des études toxicologiques non cliniques montrent que l'utilisation de PEG peut entraîner une vacuolisation cellulaire, surtout dans les cellules phagocytaires en raison de leur fonction d'absorption et d'élimination des macromolécules dans les tissus et le sang. Bien que la vacuolisation indique un impact sur les cellules, les effets secondaires observés dans les médicaments contenant du PEG sont généralement dus aux substances actives et non au PEG lui-même [216, 217]. Cependant, des chaînes de PEG de grande taille ou de haute masse moléculaire peuvent s'accumuler dans l'organisme, principalement dans le foie, en raison de leur clairance plus lente. Ce phénomène, souvent appelé "syndrome macromoléculaire" complique l'élimination des produits PEGylés, car leur hydrophilie et leur volume hydrodynamique élevé rendent leur excrétion difficile par voie rénale. Cette distinction est cruciale dans les essais cliniques pour évaluer la sécurité des produits PEGylés et s'assurer que les effets indésirables sont minimales lorsque le PEG est utilisé comme support thérapeutique [218, 219].

3.1.1.2 Immunogénicité

La PEGylation, ou attachement covalent du PEG aux protéines est utilisée pour diminuer l'immunogénicité et prolonger la durée de circulation des molécules dans le sang, en formant une barrière hydrophile autour des protéines et en masquant les épitopes antigéniques, réduisant ainsi les réponses immunitaires et la production d'anticorps neutralisants contre la protéine modifiée [220-222]. Bien que cette technique améliore la tolérance et la stabilité des protéines en diminuant les réponses immunitaires via une exclusion stérique et une hydratation préférentielle [223], elle n'élimine pas totalement l'immunogénicité, comme le montre le cas de certains médicaments, tels que le Krystexxa® (médicament utilisé pour traiter la goutte chronique) [220, 221]. Des impuretés spécifiques dans les réactifs de PEGylation peuvent aussi influencer cette immunogénicité et leur minimisation est nécessaire pour éviter des réponses immunitaires non désirées [224, 225]. Cependant, un phénomène appelé "dilemme PEG" a été observé dans les thérapies géniques et les traitements oncologiques, où, bien que la PEGylation

prolonge la circulation des médicaments, elle peut limiter l'absorption cellulaire en créant une barrière hydrophile [226]. Enfin, la PEGylation réduit souvent la tendance des protéines à l'agrégation, diminuant ainsi le risque de réactions immunitaires contre les agrégats de protéines [227, 228], ce qui contribue à prolonger la demi-vie des médicaments et à augmenter leur efficacité thérapeutique dans divers traitements [229].

3.1.1.3 Effet sur la stabilité des molécules

La PEGylation des biomolécules, en particulier des protéines, est reconnue pour ses effets stabilisants sans altérer significativement leur structure, comme confirmé par des techniques de dichroïsme circulaire (CD) et de spectroscopie RMN, bien que des variations dans la stabilité thermique aient été notées selon la chimie de couplage et le degré de PEGylation [230-232]. Par exemple, l'uréase PEGylée montre une résistance accrue à la dénaturation thermique, avec un "effet de protection" contre la dissociation des sous-unités [233, 234]. De plus, le caractère hydrophile du PEG peut modifier les interactions de surface des protéines, impactant ainsi la stabilité du point isoélectrique et la stabilité globale des protéines dans des conditions spécifiques [228, 235]. La PEGylation offre également des avantages en réduisant l'immunogénicité et en protégeant les protéines de la protéolyse, prolongeant leur demi-vie dans le système circulatoire, ce qui est essentiel pour les applications biopharmaceutiques [236, 237]. En ce qui concerne les protéines spécifiques comme les hormones de croissance et l'insuline, bien que la PEGylation ne produise pas de distorsion structurelle significative, elle peut parfois réduire l'activité biologique, probablement en raison de la gêne stérique induite par le PEG [238, 239].

3.1.1.4 Solubilité et la biodisponibilité

La PEGylation influence positivement la solubilité et la biodisponibilité des biomolécules, notamment en augmentant leur hydrophilie et en prolongeant leur temps de circulation dans le système. En effet, le PEG améliore la solubilité des substances médicamenteuses en milieu aqueux grâce à sa capacité de lier plusieurs molécules d'eau par unité d'oxyde d'éthylène, augmentant ainsi le volume hydrodynamique de la molécule et réduisant son taux d'élimination rénale [209, 240, 241]. De plus, la PEGylation protège les protéines de l'inactivation biologique par la protéolyse et réduit leur immunogénicité, contribuant ainsi à une biodisponibilité accrue et à une demi-vie prolongée en circulation pour les applications de médicaments injectables [236, 237].

3.1.2 Limites du PEG et de la technologie de PEGylation

Le PEG est un polymère synthétique présentant une propriété de polydispersité, ce qui signifie qu'il est composé de différentes unités monomères [242]. Lorsqu'il est utilisé avec un médicament de faible poids moléculaire, le PEG présente des difficultés liées à la polydispersité, ce qui complique le processus de liaison. Il est bien connu que le PEG est excrété par l'urine, mais l'excrétion d'un médicament lié au PEG de poids moléculaire élevé est retardée en raison de son temps de résidence prolongé [243], entraînant une accumulation du médicament dans le foie et provoquant le syndrome macromoléculaire. Dans ce cas, les reins n'assurent pas facilement l'excrétion en raison de la propriété hydrodynamique du PEG, qui augmente le volume hydrodynamique du PEG au contact de l'eau, entraînant ainsi une diminution de la clairance du PEG. La clairance rénale dépend du poids moléculaire du médicament [244].

La longueur de la chaîne peut également être réduite progressivement *in vivo* grâce à des enzymes, comme le cytochrome P450 [218] ou l'alcool déshydrogénase [245]. Jusqu'à présent, les poids moléculaires élevés de PEG utilisés pour la conjugaison aux protéines sont sous forme ramifiée de 40 kDa [219]. La chaîne de PEG peut entourer la protéine pour la protéger de l'environnement, ce qui entraîne une altération de la communication et de l'activité biologique de la protéine. La PEGylation entraîne une augmentation de la taille des particules par rapport à la formulation non PEGylée, et cette augmentation interfère avec l'activité pharmacocinétique du médicament [246].

4 Apoptose et marqueurs du stress oxydatif dans la cellule β

4.1 Apoptose (généralités)

L'apoptose, une forme de mort cellulaire programmée, est caractérisée par des changements morphologiques tels que le rétrécissement cellulaire, la condensation nucléaire, la fragmentation nucléosomique et le bourgeonnement membranaire. Elle joue un rôle crucial dans le développement des tissus et le maintien de l'homéostasie organique [247, 248]. Les processus de mort cellulaire, bien qu'étant programmés et régulés génétiquement, dépendent d'un équilibre entre survie et stress cellulaire. Ce phénomène participe à la fois à la physiologie normale et aux pathologies, y compris le développement et la progression du diabète [247]. Parmi les facteurs déclencheurs de l'apoptose, on trouve les cytokines pro-inflammatoires (telles que IL-1 β , TNF α , et IFN γ) qui jouent un rôle clé dans des conditions inflammatoires

chroniques et induisent le stress cellulaire, particulièrement dans les cellules β du pancréas [249]. L'apoptose est induite par le stress du réticulum endoplasmique causé par l'accumulation de protéines mal repliées, ce qui peut activer diverses réponses cellulaires [250]. Elle implique la voie intrinsèque mitochondriale, caractérisée par la libération de cytochrome c par les mitochondries, qui initie une cascade apoptotique via la formation de l'apoptosome et l'activation des caspases effectrices [251].

Les voies de signalisation impliquées dans l'apoptose comprennent notamment la réponse UPR (Unfolded Protein Response) ainsi que les kinases MAPK (Mitogen-activated protein kinases) et JNK (c-Jun N-terminal kinases). La réponse UPR, activée par un stress prolongé au niveau du réticulum endoplasmique, joue un rôle central dans l'induction de l'apoptose en mobilisant des médiateurs tels qu'ATF3 (Activating transcription factor 3) et CHOP (C/EBP homologous protein). Par ailleurs, les kinases MAPK, et en particulier JNK, sont activées en réponse au stress oxydatif. Cette activation entraîne une inhibition de la signalisation de l'insuline et favorise l'exclusion nucléaire de PDX-1 (Pancreatic duodenal homeobox -1), une protéine essentielle à la survie des cellules β . Ces mécanismes soulignent l'interconnexion entre le stress cellulaire et les voies apoptotiques [252].

4.2 Apoptose des cellules β

Le stress oxydatif et l'inflammation jouent un rôle crucial dans l'induction de l'apoptose des cellules β . Cette apoptose résulte principalement d'une dysfonction mitochondriale caractérisée par la libération du cytochrome c dans le cytoplasme. Cette libération entraîne l'activation de la caspase-9, suivie de l'activation des caspases effectrices (3, 6 et 7), responsables du démantèlement cellulaire. Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) produites par les mitochondries jouent un rôle central dans ce processus, en déclenchant la libération de cytochrome c. Ce mécanisme a été bien documenté dans les cellules β de souris et dans des lignées cellulaires INS-1 [253, 254]. Par ailleurs, l'inflammation exacerbe ces effets apoptotiques par le biais des cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-1 β , qui activent l'inflammasome NLRP3 et augmentent les niveaux d'IL-6. Ce phénomène est amplifié par l'activation du facteur de transcription NF- κ B, une voie qui est directement associée à une augmentation de l'apoptose induite par le stress oxydatif. Des études menées sur des cellules β humaines exposées à du H₂O₂ et à des cytokines confirment ce lien étroit entre inflammation et apoptose [255].

4.2.1 Sirtuines

Les sirtuines, notamment SIRT1, SIRT2 et SIRT3, jouent un rôle essentiel dans la survie des cellules β face au stress métabolique et oxydatif. La SIRT3, par exemple, aide à protéger ces cellules en activant une enzyme antioxydante clé, la superoxyde dismutase (SOD). Cette activation neutralise les espèces réactives de l'oxygène (ROS), des molécules qui endommagent les cellules lorsqu'elles s'accumulent [256]. De son côté, la SIRT1 soutient les défenses antioxydantes en régulant FOXO1 (Forkhead box protein O1), un facteur de transcription qui aide les cellules β à résister au stress et à maintenir leur nombre et leur fonction. Quant à la SIRT2, même si son rôle dans les cellules β est moins documenté, elle participe aussi à la régulation du stress oxydatif et de la stabilité cellulaire, notamment en modifiant certaines protéines clés comme FOXO1 et p53. Ensemble, ces mécanismes permettent de limiter l'apoptose, aidant les cellules β à mieux résister aux agressions et à rester fonctionnelles.

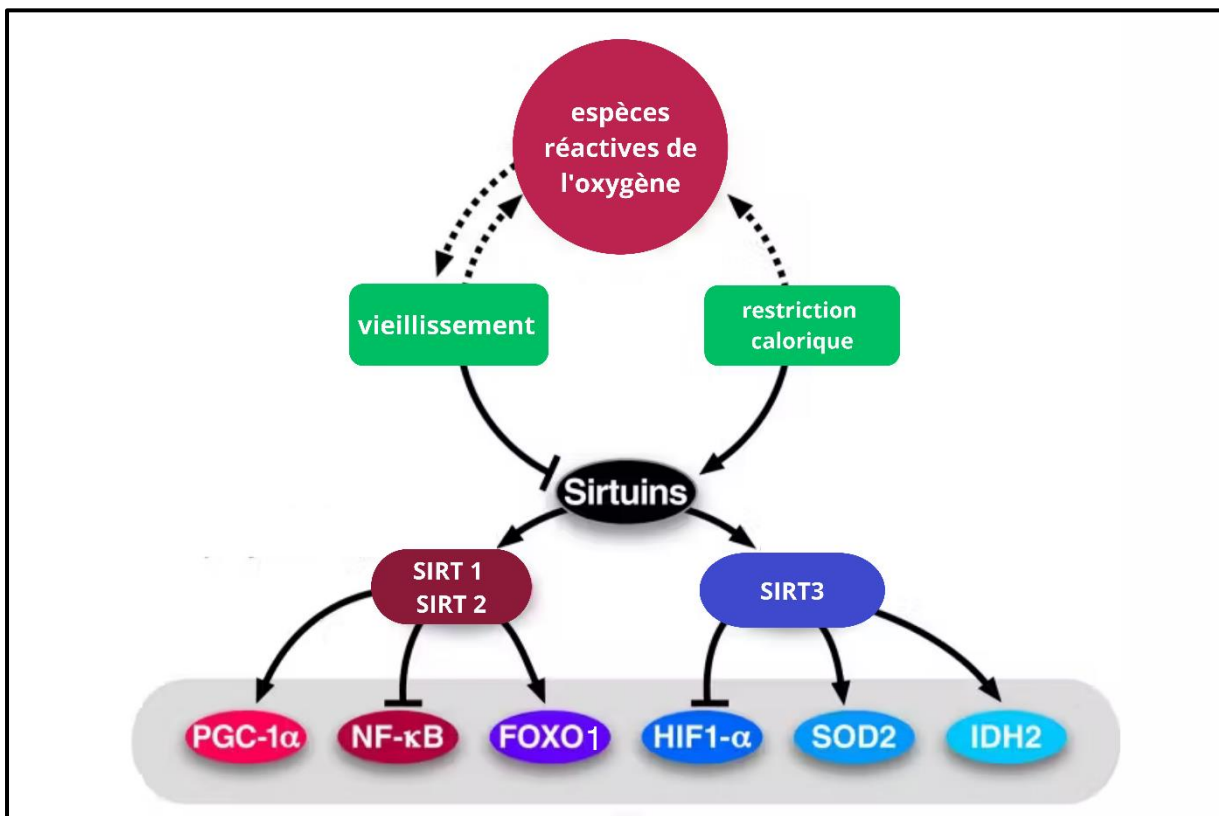


Figure 8 : Rôle des sirtuines dans le stress oxydatif et la signalisation cellulaire [257] modifié. **Flèche pleine** : Activation ou stimulation directe. **Flèche pointillée** : Effet indirect. **Trait en T (ligne terminée par un bloc)** : Inhibition ou blocage.

4.2.2 Facteur de transcription nucléaire (NF κ B)

Le facteur de transcription NFκB (nuclear factor-kappa B) est une protéine qui joue un rôle crucial dans la régulation de la réponse immunitaire, de l'inflammation et de la survie cellulaire. Le NFκB est activé en réponse à des stimuli stressants tels que les cytokines pro-inflammatoires, via la phosphorylation, suivie de l'ubiquitination et de la dégradation de sa protéine séquestrante IκB. NFκB est un facteur de transcription majeur qui régule divers gènes impliqués dans des processus comme les réponses inflammatoires, les réponses au stress, l'apoptose, la prolifération et la survie cellulaire. Dans les cellules β *in vitro*, l'effet prédominant de NFκB est pro-apoptotique [258-260].

En plus de preuves mettent en évidence une interaction entre la réponse UPR et l'inflammation médiée par NFκB [261], une expression accrue des gènes cibles de NFκB et des marqueurs de stress du réticulum endoplasmique est observée chez les souris NOD prédiabétiques, suggérant une communication entre ces voies qui aboutit à la perte de cellules β dans ces souris [262]. Par ailleurs, une faible dose d'IL-1β peut déclencher et accélérer un stress modéré du réticulum endoplasmique, augmentant l'inflammation locale des îlots via l'expression de gènes pro-inflammatoires dépendants de NFκB [263].

Cependant, l'effet du blocage de la signalisation de NFκB sur les dommages inflammatoires des cellules β *in vitro* reste débattu [264]. Fait notable, le blocage de NFκB a aggravé la destruction des cellules β médiée par le système immunitaire *in vivo* [265], et la modification de l'activité de NFκB a eu des effets limités sur la survie des greffons d'îlots [266]. Les recherches futures devraient se concentrer davantage sur le rôle de NFκB dans la destruction des cellules β induite par le système immunitaire, en particulier dans les îlots humains.

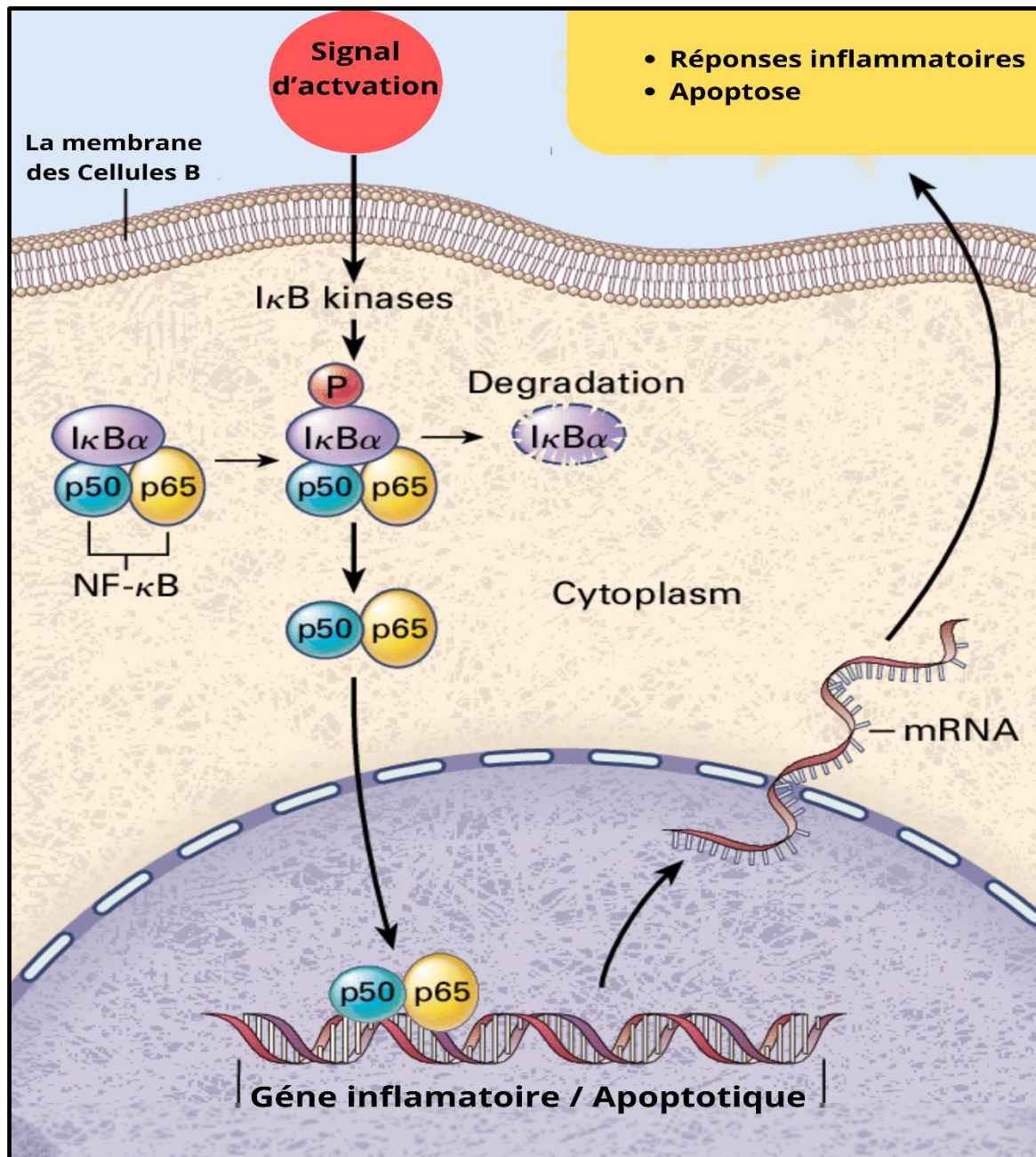


Figure 9 : Mode d'action de NFκB (cellule beta) [267] modifié.

4.3 Le stress oxydatif

Dans le DT1, le stress oxydatif est principalement provoqué par une surproduction de ROS (espèces réactives de l'oxygène) et une réduction des mécanismes antioxydants, résultant d'une hyperglycémie chronique qui active des voies métaboliques génératrices de stress oxydatif, telles que la voie des polyols, la glycation avancée des protéines (AGEs) et l'activation de l'enzyme NADPH oxydase [268]. Ce déséquilibre entre la production de ROS et la capacité du système antioxydant à les neutraliser conduit à une peroxydation lipidique accrue, processus au cours duquel les ROS endommagent les lipides des membranes cellulaires, affectant leur

intégrité et leur fonction [269]. Les niveaux élevés de malondialdéhyde (MDA) et de monoxyde d'azote (NO) observés chez les patients diabétiques reflètent cette peroxydation lipidique accrue [270]. En l'absence d'une neutralisation efficace, les ROS provoquent des dommages aux membranes cellulaires, protéines et ADN, aggravant ainsi l'inflammation et les dysfonctionnements cellulaires et contribuant à la progression des dommages tissulaires associés au DT1 [271].

4.4 Marqueurs du stress oxydant

Les marqueurs du stress oxydatif jouent un rôle clé dans l'évaluation de l'impact du stress oxydatif sur l'organisme, l'efficacité des systèmes antioxydants et l'intensité de cette oxydation excessive. Dans le cas du diabète de type 1 (DT1), divers biomarqueurs sont employés à cette fin, notamment :

4.4.1 Superoxyde Dismutase (SOD)

La SOD est une enzyme antioxydante clé du système de défense de l'organisme. Elle catalyse la dismutation de l'ion superoxyde (O_2^-), un radical libre très réactif en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Ce dernier est ensuite transformé en eau par d'autres enzymes comme la catalase et la glutathion peroxydase. Dans le contexte du DT1, l'activité de la SOD est souvent réduite, ce qui limite la capacité de l'organisme à neutraliser les ions superoxydes, augmentant ainsi les risques de dommages oxydatifs aux cellules, notamment aux cellules endothéliales et pancréatiques [272]. Cette réduction de l'activité de la SOD est, entre autres, attribuable à la glycation des protéines enzymatiques, une réaction entre des sucres et les protéines sous forme non enzymatique, qui affecte leur fonction. Par conséquent, une moindre activité de la SOD laisse plus de superoxyde disponible pour générer d'autres espèces réactives, aggravant ainsi le stress oxydatif et les dommages cellulaires [269].

4.4.2 Glutathion réduit (GSH)

Le GSH est un puissant antioxydant intracellulaire qui protège les cellules contre les dommages oxydatifs en neutralisant les radicaux libres et en participant à la régénération d'autres antioxydants comme les vitamines C et E. Cette petite molécule antioxydante non enzymatique, abondante dans les cellules, joue un rôle clé dans la réduction des dommages oxydatifs. Dans le contexte du DT1, les niveaux de GSH sont souvent diminués en raison de l'épuisement causé par l'excès de ROS, affaiblissant ainsi les défenses antioxydantes de l'organisme et rendant les cellules plus vulnérables aux lésions oxydatives, contribuant aux

complications, notamment au niveau des reins et du système cardiovasculaire [273]. Toutefois, certaines études suggèrent que chez les patients atteints de DT1, les niveaux de GSH ne présentent pas de différence significative par rapport aux individus en bonne santé, ce qui pourrait indiquer que d'autres facteurs antioxydants ou le taux élevé de production de ROS dominant l'équilibre oxydatif, et que le GSH seul ne suffit pas pour compenser le stress oxydatif accru [270].

4.4.3 Malondialdéhyde (MDA)

Le MDA est un sous-produit de la peroxydation lipidique, un processus par lequel les ROS attaquent les lipides des membranes cellulaires, entraînant une dégradation des phospholipides membranaires. En raison de sa production accrue lors de dommages cellulaires induits par les ROS, le MDA est souvent utilisé comme marqueur du stress oxydatif. Dans le DT1, des niveaux élevés de MDA sont généralement observés, indiquant un stress oxydatif important et un risque accru de dégradation cellulaire, particulièrement dans les tissus sensibles comme les reins et les yeux [274]. Cette augmentation des niveaux de MDA reflète un taux accru de dommages aux lipides membranaires, ce qui peut altérer la structure et la fonction des membranes cellulaires, nuisant aux échanges cellulaires et augmentant le risque de complications liées au diabète, notamment les maladies cardiovasculaires [270, 271].

4.4.4 ROS totaux

Les ROS totaux représentent la quantité globale d'espèces réactives de l'oxygène dans l'organisme, incluant l'ion superoxyde (O_2^-), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle (HO^*). Dans le DT1, cette production de ROS est amplifiée, entraînant des dommages aux lipides, protéines et ADN des cellules. Cette accumulation excessive de ROS, non compensée par les mécanismes antioxydants, conduit à un stress oxydatif sévère, créant un état de stress oxydatif chronique qui contribue à l'inflammation et à la progression des complications associées au diabète. Le suivi des niveaux totaux de ROS permet ainsi d'évaluer le niveau global de stress oxydatif et de surveiller la progression des dommages associés au diabète [269, 275].

Matériel et méthodes

Matériel et méthodes

Réactifs et produits chimiques

Les principaux réactifs utilisés dans cette étude incluent principalement la TQ, Quer, Cur et le Pluronic P123, fournis par Sigma-Aldrich (USA), ainsi que le PEG4000 (Polyethylene Glycol) en poudre avec un poids moléculaire de 3500-4500 obtenu de Merck (Allemagne). L'acétonitrile, le DMSO (diméthylsulfoxyde) et l'éthanol sont également fournis par Merck. Les milieux de culture comprennent le DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) et le RPMI1640, enrichis en L-glutamine, streptomycine et pénicilline, tous issus de Sigma-Aldrich (USA), avec du sérum de veau fœtal (FBS) fourni par Invitrogen (USA). Les expériences d'isolation des îlots de Langerhans nécessitaient l'usage de collagénase et de la solution saline équilibrée de Hank (HBSS) de Sigma-Aldrich (USA). Les tests biochimiques et de viabilité cellulaire ont employé le kit ELISA pour l'insuline de souris (Thermo Fisher Scientific, USA), le kit XTT de prolifération cellulaire (Roche, Suisse), le kit de détection de la SIRT2 Sigma-Aldrich (USA), ainsi que la trypsine pour la dissociation des cellules. Ces réactifs ont été essentiels pour la formulation des nanoparticules, les tests de cytotoxicité, la culture cellulaire et l'évaluation des propriétés antioxydantes et antidiabétiques.

Lignée cellulaire

Deux lignées cellulaires ont été utilisées dans la présente étude. La lignée cellulaire EMT6 (cancer mammaire murin, CRL-2755) et lignée cellulaire NIT-1 (insulinome murin, CRL-2055). Toute les deux proviennent de l'American Type Culture Collection (ATCC).

Des îlots de Langerhans isolés à partir d'une souris BALB/c ont été également utilisés dans la présente étude pour étudier l'effet des molécules libres et encapsulées sur la sécrétion d'insuline.

1 Synthèse des complexes moléculaires

Les nanoparticules TQ-PEG4000-NP, les complexes Quer-PEG4000 et Cur-PEG4000 ont été synthétisés en suivant la méthode décrite par Bhattacharya et al. [276]. Ce processus impliquait la préparation de deux solutions distinctes pour la pégylation de la TQ, Quer et Cur. Tout d'abord, 200 mg de TQ, 190 mg de Quer ou 180 mg de Cur ont été dissous dans 20 ml d'acétonitrile avec 25 mg de P123, suivis d'une sonication pendant 15 minutes. Parallèlement, 1 g de PEG4000 a été dispersé dans 5 ml d'eau distillée à l'aide d'un bain ultrasonique pendant 30 minutes. Ensuite, la solution organique a été mélangée progressivement avec la solution aqueuse sur une période de 30 minutes. Le mélange final a été soumis à une sonication

supplémentaire et à une évaporation à température ambiante pendant toute la nuit, avant d'être conservé à 4 °C.

Le protocole expérimental est présenté dans le **Tableau 5**.

Tableau 5 : Formulation et synthèse des nanoparticules PEG4000 encapsulant la TQ, la Quer et la Cur

Complexe	Ingrédients	Quantité utilisée	Processus de préparation
1. TQ-PEG4000-NP	TQ	200 mg	Dissoudre TQ dans 20 ml d'acétonitrile, ajouter 25 mg de P123, puis sonication pendant 15 minutes. (Solution 1)
	Acétonitrile	20 ml	
	P123	25 mg	
	PEG4000	1 g	Disperser PEG4000 dans 5 ml d'eau distillée à l'aide d'un bain ultrasonique pendant 30 minutes. (Solution 2)
	Eau distillée	5 ml	
	Mélanger progressivement la solution 1 dans la solution 2 sur une période de 30 minutes. Sonication et évaporation à température ambiante pendant toute la nuit, puis conservation à 4°C.		
2. Quer-PEG4000	(Quer)	190 mg	Dissoudre la Quer dans 20 ml d'acétonitrile, ajouter 25 mg de P123, puis sonication pendant 15 minutes.
	Acétonitrile	20 ml	
	P123	25 mg	
	PEG4000	1 g	Disperser PEG4000 dans 5 ml d'eau distillée à l'aide d'un bain ultrasonique pendant 30 minutes.
	Eau distillée	5 ml	
	Mélanger progressivement la solution 1 dans la solution 2 sur une période de 30 minutes. Sonication et évaporation à température ambiante pendant toute la nuit, puis conservation à 4°C.		
3. Cur-PEG4000	(Cur)	180 mg	Dissoudre la Cur dans 20 ml d'acétonitrile, ajouter 25 mg de P123, puis sonication pendant 15 minutes.
	Acétonitrile	20 ml	
	P123	25 mg	
	PEG4000	1 g	Disperser PEG4000 dans 5 ml d'eau distillée à l'aide d'un bain ultrasonique pendant 30 minutes.
	Eau distillée	5 ml	
	Mélanger progressivement la solution 1 dans la solution 2 sur une période de 30 minutes. Sonication et évaporation à température ambiante pendant toute la nuit, puis conservation à 4°C.		

2 Caractérisation morphologique, spectrale et physico-chimique

2.1. Test d'efficacité d'encapsulation

L'efficacité d'encapsulation (EE) du complexe TQ-PEG4000 a été évaluée en mesurant la concentration de la TQ non encapsulé dans la solution. Cette évaluation a été réalisée en préparant le complexe TQ-PEG4000 à différentes concentrations allant de 10 µM à 0,625 µM. Pour faciliter cette analyse, une courbe d'étalonnage du TQ libre a été construite (**Annexe1**), basée sur la mesure de l'absorbance à des concentrations connues de TQ libre, servant de référence pour les comparaisons. L'efficacité d'encapsulation a été calculée en utilisant l'équation suivante [277] :

$$EE\% = \frac{(\text{Complexe total} - \text{Particule libre})}{\text{Complexe total}} \times 100 \dots \dots \dots (\text{Eq1})$$

Toutes les mesures ont été effectuées en triplicata. Cette méthode a permis une quantification précise de la fraction de TQ encapsulée avec succès dans le PEG4000.

Le même protocole a été appliqué pour les complexes Quer-PEG4000 et Cur-PEG4000, où la concentration de Quer ou de Cur non encapsulée a été mesurée, suivie de la construction d'une courbe d'étalonnage spécifique (**Annexe1**). L'efficacité d'encapsulation a été déterminée selon les mêmes étapes pour assurer une analyse précise.

2.2. Test de libération des capsules

La libération des substances actives encapsulées dans les complexes TQ-PEG4000-NP, Quer-PEG4000 et Cur-PEG4000 a été évaluée par spectrophomètre UV-Vis. Afin de simuler différents environnements physiologiques, trois milieux distincts ont été préparés, chacun représentant une condition de pH spécifique : acide (gastrique, pH 1,2), neutre (intestinal, pH 6,9) et basique (sanguin, pH 7,4).

Pour chaque complexe :

TQ-PEG4000-NP : La libération de la TQ a été mesurée en déterminant la concentration de TQ libre dans la solution, à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible mesurant l'absorbance à une longueur d'onde de 253 nm. La concentration de l'échantillon était de 2 mg/ml.

Quer-PEG4000 : La libération de la Quer a été mesurée en déterminant la concentration de Quer libre, avec une mesure d'absorbance à 256 nm. La concentration de l'échantillon était de 140 µg/ml.

Cur-PEG4000 : La libération de la Cur a été évaluée par l'absorbance de la Cur libre à 414 nm. La concentration de l'échantillon était de 25 µg/ml.

Pour cette évaluation, un échantillon de 1 ml de chaque solution a été prélevé à intervalles réguliers : toutes les 10 minutes durant la première heure, puis toutes les 30 minutes au cours des 2 heures suivantes. Les concentrations des substances libres ont été calculées à partir de courbes d'étalonnage préalablement établies pour chaque substance active.

Tous les essais ont été réalisés en triplicata afin d'assurer la fiabilité et la reproductibilité des résultats. Cette approche systématique a permis une compréhension détaillée des profils de libération de la TQ, de la Quer et de la Cur sous différentes conditions de pH, imitant de près l'environnement physiologique auquel sont soumis les médicaments administrés par voie orale.

2.3. Analyse Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR)

Les caractéristiques chimiques de la TQ, de la Quer, de la Cur, du copolymère P123, du polymère PEG4000, ainsi que des complexes TQ-PEG4000-NP, Quer-PEG4000 et Cur-PEG4000 ont été analysées à l'aide de la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR), réalisée avec un appareil Shimadzu (Noisiel, France). Les données spectrales infrarouges ont été recueillies dans une plage de longueurs d'onde comprises entre 4000 et 500 cm^{-1} , avec une résolution de 4 cm^{-1} .

Chaque échantillon a été analysé en effectuant en moyenne cinq scans pour garantir une collecte de données exhaustive. L'analyse de ces données a été réalisée à l'aide du logiciel LabSolutions IR, permettant un examen détaillé des propriétés chimiques de ces composés et complexes.

2.4. Caractérisation morphologique par le Microscope Electronique à Balayage (MEB/EDS)

La morphologie des nanoparticules TQ-PEG4000-NP, ainsi que des formulations Quer-PEG4000 et Cur-PEG4000 a été examinée méticuleusement à l'aide d'un microscope électronique à balayage (MEB) Quattro S de Thermo Fisher Scientific (USA). L'examen a été réalisé avec une tension d'accélération de 5,00 kV. De plus, le microscope était équipé d'un système EDAX Octane Elect, permettant une analyse quantitative complémentaire des éléments chimiques présents dans les échantillons. Cette combinaison d'imagerie haute résolution et d'analyse élémentaire a fourni une compréhension complète de la structure physique et de la composition chimique

2.5. Potentiel Zeta

Le potentiel zêta est un paramètre physico-chimique clé qui mesure la charge électrique à la surface des particules en suspension dans un milieu liquide. Il reflète la stabilité colloïdale, car une charge de surface élevée (positive ou négative) induit une répulsion électrostatique entre les particules, limitant leur agrégation. En nanotechnologie et en formulation de systèmes encapsulés, le potentiel zêta est souvent utilisé pour évaluer la dispersion, la stabilité et les interactions des particules avec leur environnement, notamment dans des applications pharmaceutiques et biomédicales.

Le potentiel Zêta a été mesuré sur les formulations Quer-PEG4000 et Cur-PEG4000 dans des conditions expérimentales contrôlées. La température a été maintenue à 24,9 °C, avec une viscosité du milieu de dispersion de 0,897 mPa·s et une conductivité de 0,084 mS/cm. Un voltage de 3,8 V a été appliqué à l'électrode pour les mesures.

3 Evaluation de la PEGylation sur les effets biologiques

3.1. Test de cytotoxicité sur les deux lignées : EMT6 et NIT-1.

3.1.1. Conditions de la culture cellulaire.

La lignée cellulaire de cancer mammaire EMT6 (CRL-2755) et la lignée cellulaire d'insulinome de souris NIT-1 (CRL-2055) ont été obtenues auprès de l'American Type Culture Collection (ATCC) à Washington, DC, États-Unis. Les lignées cellulaires ont été cultivées dans des milieux DMEM/F12 et RPMI-1640, enrichis chacun avec 10 % de sérum foetal bovin (FBS) et 1 % de pénicilline/streptomycine. Le processus de culture a été réalisé dans un incubateur maintenu à une atmosphère contenant 5 % de CO₂ et une température constante de 37 °C. Une méthode classique de coloration au bleu de trypan a été utilisée, combinée avec une chambre de comptage de Neubauer, pour permettre une évaluation précise de la viabilité cellulaire et du comptage des cellules.

3.1.2. Etude de la cytotoxicité par le kit XTT.

Les effets cytotoxiques de la TQ, de la Quer, de la Cur, du PEG4000, du Quer-PEG4000, du Cur-PEG4000 et du TQ-PEG4000-NP ont été évalués sur deux lignées cellulaires : une lignée de cancer mammaire de souris (EMT6) et une lignée d'insulinome de souris (NIT-1). Cette évaluation a été réalisée en utilisant le test de prolifération cellulaire XTT [278] avec un kit XTT provenant de Roche (Bâle, Suisse).

Pour cette expérience, les cellules EMT6 et NIT-1 ont été cultivées dans incubateur humidifié à 5% de CO₂ à 37 °C. Elles ont ensuite étéensemencés dans une microplaque à 96 puits et incubées pendant 24 heures pour permettre leur attachement et leur croissance.

La TQ, la Quer et la Cur ont été solubilisées dans du DMSO et des dilutions en série ont été préparées dans les milieux de culture à des concentrations finales allant de 1 à 60 µg/ml. Le Quer-PEG4000, le Cur-PEG4000 et le TQ-PEG4000-NP ont été également dilué dans les milieux de de cultures aux même concentrations finale. La doxorubicine a été utilisée comme témoin positif (Concentrations de 0 à 30µg/ml).

Après 24 h d'incubation, les cellules ont été traitées avec des concentration variables (1-60 µg/mL) de TQ, Quer, Cur, Quer-PEG4000, le Cur-PEG4000 et TQ-PEG4000-NP. Après 72 h d'incubation dans les mêmes conditions. Les cellules ont été traitées avec le réactif XTT. L'absorbance, reflétant la viabilité cellulaire a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre. Les mesures ont été réalisées à une longueur d'onde principale de 490 nm, avec une longueur d'onde de 660 nm. Le pourcentage de viabilité des cellules traitées a été calculé par rapport aux cellules non traitées (témoin). Toutes les expériences ont été réalisées en triplicata. Cette méthode a permis de quantifier les effets cytotoxiques des différentes substances sur les lignées cellulaires EMT6 et NIT-1.

3.2. Viabilité et sécrétion d'insuline des îlots de Langerhans.

3.2.1. Isolement des îlots de Langerhans.

Les îlots de Langerhans ont été isolés à partir d'une souris albinos femelle BALB/c en bonne santé pesant environ 27 g fourni par l'animalerie du Centre de Recherche en Biotechnologie (C.R.Bt). La souris a été maintenues dans un environnement contrôlé avec un cycle lumière/obscurité de 12 heures et une température maintenue à 28 ± 2 °C. Toutes ces procédures impliquant les animaux ont été réalisées conformément aux directives éthiques établies par la Commission d'Éthique du C.R.Bt.

L'isolement des îlots s'est déroulé en trois étapes principales : chirurgie, isolement et purification. Tout d'abord, la souris a été euthanasiées à l'aide d'éther anesthésique. Toutes les procédures suivantes ont été réalisées dans des conditions de stérilisation. Lors de la dissection, une petite incision a été pratiquée dans la région abdominale, suivie de l'injection d'une solution de collagénase dans le canal cholédoque (pour dégrader le collagène présent dans la matrice extracellulaire, facilitant ainsi la dissociation des îlots de Langerhans du tissu pancréatique environnant). Le pancréas a ensuite été extrait, placé dans une solution de Hanks/collagénase

glacée, découpé et digéré à 37 °C [279]. Une agitation manuelle a été effectuée pendant 5 minutes pour améliorer la digestion. La réaction enzymatique a été arrêtée en ajoutant du HBSS glacé, et les îlots ont été purifiés par centrifugation à 185 g pendant 5 minutes [280]. La dernière étape consiste à sélectionner et collecter méticuleusement les îlots de Langerhans purs dans une boîte de Petri pour une culture primaire.

Les îlots isolés ont été cultivés dans une plaque à 12 puits contenant du milieu RPMI enrichi avec 10 % de FBS et 1 % de pénicilline/streptomycine et incubés à 37 °C dans une atmosphère contenant 5 % de CO₂.

3.2.2. Test de viabilité des îlots de Langerhans isolés et traités.

Après une incubation de 48 heures sous les conditions suivantes **Condition 1** : îlots non traités servant de témoin négatif ; **Condition 2** : îlots traités avec 30 µg de PEG4000 comme témoin positif ; **Condition 3** : îlots traités avec 30 µg/ml de TQ ; **Condition 4** : îlots traités avec 30 µg/ml de TQ-PEG4000-NP. Chaque condition a été répliquée trois fois pour garantir la fiabilité des résultats.

Les cultures d'îlots ont été soumises à une dissociation cellulaire. Cette étape a été réalisée en ajoutant de la trypsine au milieu de culture. Les îlots traités ont ensuite été incubés avec agitation continue dans une solution de trypsine pendant 10 minutes à 37 °C. Cette procédure a permis une dispersion mécanique des cellules qui a été poursuivie jusqu'à ce qu'environ 80 % des cellules soient dissociées.

La viabilité cellulaire, comprenant les cellules vivantes et mortes a été évaluée après traitement à la trypsine. Cette évaluation a été réalisée à l'aide d'un microscope inversé, associé à une coloration au bleu trypan pour distinguer les cellules viables des cellules mortes. Le comptage des cellules a été effectué à l'aide d'une chambre de comptage de Neubauer, un dispositif couramment utilisé en culture cellulaire pour quantifier la densité cellulaire [281].

3.2.3. Dosage de la sécrétion de l'insuline par un kit Elisa.

La méthodologie suivante a été utilisée pour évaluer la sécrétion d'insuline. Après une incubation de 24 heures dans les conditions suivantes **Condition 1** : îlots non traités servant de témoin négatif ; **Condition 2** : îlots traités avec 30 µg de PEG4000 comme témoin positif ; **Condition 3** : îlots traités avec 30 µg/ml de TQ ou 60µg/ml de Quer ou 60µg/ml de Cur ; **Condition 4** : îlots traités avec 30 µg/ml de TQ-PEG4000-NP ou 60µg/ml de Quer-PEG4000 ou 60µg/ml de Cur-PEG4000. Chaque condition a été répliquée trois fois pour garantir la fiabilité des résultats.

Les îlots de Langerhans ont d'abord été soumis à un changement de milieu. Le milieu de culture existant a été remplacé par un volume similaire de DMEM à faible teneur en glucose. Cette configuration a ensuite été incubée pendant 1 heure 30 minutes à 37 °C dans une atmosphère contenant 95 % d'oxygène et 5 % de dioxyde de carbone. Après incubation, le milieu à faible teneur en glucose a été remplacé par du DMEM à haute teneur en glucose. Ce changement est crucial pour stimuler la sécrétion d'insuline par les îlots. La plaque de culture cellulaire a de nouveau été incubée pendant 1 heure 30 minutes tout en maintenant la même température et la même composition gazeuse.

Après la deuxième incubation, le surnageant contenant l'insuline sécrétée a été soigneusement collecté. Ce surnageant a été immédiatement stocké à -80 °C pour assurer la préservation de l'insuline. Enfin, la concentration d'insuline dans le surnageant a été mesurée de manière quantitative à l'aide d'un kit ELISA Sandwich. Ce kit a été conçu pour détecter et quantifier avec précision les niveaux d'insuline, ce qui en fait un choix idéal pour ce type d'analyse biochimique.

3.3. Etude de l'effet protecteur des molécules libres et encapsulées sur la lignée NIT-1 traitées par la STZ

3.3.1 Test de viabilité

Les cellules NIT-1 ont étéensemencé dans une plaque à 96 puits dans un milieu RPMI-1640 supplémenté des nutriments nécessaires et incubées pendant 24 heures à 37 °C dans une atmosphère contenant 5 % de CO₂. Les cellules ont été ensuite traitées avec deux concentrations de la TQ et des nanoparticules TQ-PEG4000-NP (10 et 30 mg/mL) et avec deux concentrations de la Quer, de la Cur, ainsi que des formulations Quer-PEG4000 et Cur-PEG4000 (30 et 60 µg/mL). Toutes les conditions expérimentales ont été répliquées trois fois afin d'assurer la précision et la reproductibilité des résultats.

Après 24 h d'incubation dans les mêmes conditions, le milieu de culture a été éliminé et les cellules ont été traitées avec 6 mM de la streptozotocine (STZ) solubilisé dans un milieu frais. Les cellules ont été incubé encore pendant 24 h ensuite le milieu a été éliminer un lavage par PBS a été réalisé pendant 30 secondes, 200µL de milieu et 50 µL du réactifs XTT ont été ensuite ajouté dans chaque puit dans l'obscurité pour analyser la viabilité cellulaire. L'absorbance a été mesurée (après incubation de 4h à 37°C, 5% CO₂) à l'aide d'un spectrophotomètre dans deux longueurs d'onde de 450 et 690 nm. Cette mesure fournie des données quantitatives sur les effets cytotoxiques de la TQ, de la Quer, de la Cur et des nanoparticules TQ-PEG4000, Quer-PEG4000 et Cur-PEG4000 sur la lignée cellulaire NIT-1.

3.3.2 Analyse des marqueurs du stress oxydatif.

Pour évaluer l'impact de la TQ, de la Quer et de la Cur sur le stress oxydatif dans les cellules β de la lignée NIT-1, un essai a été réalisé pour mesurer trois marqueurs spécifiques du stress oxydatif : le MDA, GSH et la SOD dans le surnageant des cellules β traitées par ces composés.

Les niveaux de MDA ont été déterminés selon les directives du protocole décrit par Ohkawa et al. [282]. Dans ce processus, la concentration de MDA a été calculée en utilisant son coefficient d'extinction molaire, ($\zeta = 1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Les résultats ont été exprimés en μmol de MDA par mL, fournissant une mesure quantitative de la peroxydation lipidique dans les cellules. Un protocole spécifique a été suivi pour la mesure du GSH [283], permettant la quantification du glutathion, un antioxydant clé dans la défense cellulaire contre le stress oxydatif. La concentration de SOD a été déterminée en utilisant la méthode établie par Subhangkar et al. [284]. Cette méthode permet de quantifier l'activité de la SOD, une enzyme qui catalyse la dismutation du superoxyde en oxygène et en peroxyde d'hydrogène, protégeant ainsi contre la toxicité du superoxyde. L'activité de la SOD a été calculée en unités standardisées à l'aide d'une formule spécifique, permettant d'évaluer le mécanisme de défense antioxydant au sein des cellules β .

$$\text{SOD (U)} = [(\text{Vp} - \text{Vs}) / (\text{Vp} \times 0,5)] \dots \dots \dots (\text{Eq2})$$

Vp = taux d'auto-oxydation du pyrogallol en l'absence de l'enzyme ; Vs = taux d'auto-oxydation du pyrogallol en présence de l'enzyme ; 0,5 = inhibition de 50 %.

3.4. Etude de l'effet régénérateur de la thymoquinone libre et encapsulé sur la lignée NIT-1

Les cellules NIT-1 ont étéensemencé dans une plaque de 96 puits et incubée pendant 24 heures à 37 °C dans une atmosphère contenant 5 % de CO₂. Les cellules ont été ensuite traité avec 6 mM de streptozotocine à l'exception des puits désignés comme témoins négatifs. Les cellules ont ensuite subi une seconde phase d'incubation de 24 heures. Deux concentrations de la TQ et des TQ-PEG4000-NP (10 et 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ont été utilisés pour traiter les cellules. Ces dernières ont ensuite subi une troisième incubation pendant 48 h. les tests ont été réalisés en triplicata.

À l'issue de cette troisième incubation, les cellules ont été traitées avec le réactif XTT. Les lectures d'absorbance ont été effectuées dans deux longueurs d'onde de 450 et 690 nm. Ce traitement est essentiel pour évaluer le taux de la viabilité cellulaire et permet donc de mesurer

la capacité de la TQ et de la TQ-PEG4000-NP à régénérer les cellules NIT-1 traitées par l'action de la streptozotocine

3.5. Etude de la signalisation des marqueurs *NFκBp65* et SIRT2

3.5.1 Détection et quantification du marqueur *NFκBp65* par ELISA après traitement à la Quer

La lignée cellulaires NIT-1 a été cultivée pendant 24 h dans une plaque de 12 puits contenant du milieu RPMI à 37 °C dans une atmosphère contenant 5 % de CO₂. Ensuite, une solution de Quer à une concentration de 60 µg/ml et une solution de STZ à une concentration de 6 mM ont été ajoutée aux puits en triplicata. Les puits contrôles négatifs sont constitués de cellules sans aucun traitement. Les cellules ont été incubées une seconde fois pendant 24 heures.

Après cette incubation, une lyse cellulaire a été réalisée, et la détection du facteur NFκB total (NFκB -P65) et phosphorylé (NFκB-P65-P) a été effectuée conformément au protocole du kit ELISA (85-86083-11®, Thermofisher, Waltham, MA, USA). Les lectures ont été effectuées à une longueur d'onde de 450 nm, avec une correction à 650 nm, permettant une analyse précise des niveaux de NFκB dans les échantillons.

3.5.2 Détection du marqueur SIRT2

3.5.2.1 Effet de la Quer, de la Cur et de la TQ sur l'activité relative de la SIRT2

Pour mesurer l'activité d'inhibition de la SIRT2 par la Quer, la Cur, et la TQ. Ces composés ont été dissous dans du DMSO et dilués dans du tampon de test (fournis dans le kit) à des concentrations allant de 2 à 200 µM. 45µl de ces 3 composés et de l'inhibiteur contrôle ont été ajoutés dans les puits contenant l'enzyme Sirt2 les solutions ont été bien mélangées et incubées à 37°C durant 5 min.

. Après incubation de 5 minutes à 37°C, 40µl de la solution substrat ont été préparé pour chaque puit (36µl assay buffer + 2µl de substrat + 2µl de cofacteur : fournit dans le kit), la solution substrat a été mélangée et ajoutée dans chaque puit, et incubé à 37°C pendant 60 minutes. Ensuite, la fluorescence initiale (R0) a été mesurée à des longueurs d'ondes d'Excitation/Emission = 395/541 nm. Après l'ajout du développeur, les solutions ont été incubées à 37°C pendant 10 minutes et une seconde lecture de fluorescence (R1) a été réalisée aux mêmes longueurs d'onde. Les échantillons et standards ont été réalisés en duplicata et chaque puits a reçu 5 µL de l'enzyme Sirt2. Cette procédure a permis d'évaluer spécifiquement

l'impact de chaque molécule sur la réponse enzymatique. Sirtuin 2 (SIRT2) Inhibitor Screening Assay Kit, Sigma-Aldrich (USA)

3.5.2.2 Détection de la SIRT2 inhibée Par la Quer dans le lysat des NIT-1

Pour mesurer l'effet relatif de la Quer sur l'activité de la SIRT2 dans les cellules NIT-1, un ensemencement des lignées cellulaires a été effectué dans une plaque de 12 puits contenant du RPMI. Après 24 heures d'incubation à 37 °C et 5 % de CO₂, 60 µg/ml de Quer a été ajouté dans les puits, suivie d'une incubation supplémentaire de 24 heures. Ensuite, le milieu a été changé et 6 mM de streptozotocine ont été ajoutés dans chaque puits à l'exception des puits de contrôle négatif. Enfin, après 24 heures d'incubation avec la STZ, une lyse cellulaire a été réalisée avec le tampon de lyse fournis dans le kit du NFκB suivie de la détection de la SIRT2 selon le protocole décrit précédemment.

4 Etude *in-silico* de l'interaction moléculaire.

4.1. Investigation théorique de l'interaction molécule/Polymère (TQ/PEG4000)

Cette étude a porté sur PEG4000, un polymère dérivé de l'oxyde d'éthylène, dont la structure chimique est $[\text{HOCH}_2(\text{CH}_2\text{OCH}_2)_n\text{CH}_2\text{OH}]$, où n représente le nombre d'unités répétitives. La Théorie de la Fonctionnelle de la Densité (DFT) a été employée pour approfondir la compréhension des interactions entre les atomes de la TQ et le PEG4000. Ce type de simulation est essentiel pour élucider les mécanismes d'adsorption et évaluer la stabilité du système excipient-médicament. En étudiant ces interactions à l'échelle moléculaire, la méthode DFT fournit des informations précieuses sur la manière dont les molécules de TQ interagissent avec et sont stabilisées par les chaînes de PEG4000. Une telle compréhension est fondamentale pour optimiser la formulation et améliorer les performances des systèmes de libération de médicaments.

4.2. Détails de calcul

Une analyse computationnelle de l'interaction entre la TQ et le PEG4000 a été réalisée à l'aide du logiciel Materials Studio. Les données structurales de la TQ ont été obtenues à partir de la base de données PubChem. L'optimisation géométrique de ces structures a été effectuée à l'aide du module Dmol3, en utilisant le champ de forces B3LYP [285] et l'ensemble de bases DNP. La tolérance du champ électronique auto-consistant (SCF) a été fixée à 10^{-6} Hartree (Ha). Le modèle de polymère PEG a été construit dans Materials Studio à l'aide de la fonction de polymérisation. Différentes longueurs de chaînes ont été modélisées et désignées par des multiples d'unités répétitives (n). Le module Forcite a été utilisé pour les calculs d'énergie et les

minimisations en appliquant le champ de forces DREIDING [286]. Un module de cellule amorphe a été utilisé pour simuler l'adsorption de la TQ sur l'excipient PEG4000. Ce module permet de construire des structures périodiques tridimensionnelles de systèmes polymériques, facilitant un emballage réaliste des polymères et des petites molécules dans ces structures. Cela peut inclure des applications telles que le dépôt d'un revêtement polymère sur une molécule de médicament ou la création de matériaux nanocomposites complexes. La simulation a utilisé un rapport molaire de PEG4000 à TQ (1:4), conforme aux données expérimentales. Dix configurations présentant les énergies les plus négatives ont été prédites, indiquant que la TQ est le site de liaison le plus stable sur la chaîne polymère. L'étude s'est également concentrée sur la détermination de l'énergie d'adsorption et de la distance entre la TQ et la chaîne PEG4000. De plus, le comportement du système TQ-PEG4000-NP en milieu aqueux a été prédit à l'aide d'un modèle de criblage similaire à un conducteur (COSMO). Cet aspect de l'étude a examiné l'effet de la solvation sur la stabilité des complexes de TQ adsorbés, avec la constante diélectrique de l'eau fixée à 78,54, reflétant son environnement solvants.

Résultats et discussions

Résultats et discussions

1. Test d'efficacité d'encapsulation de la TQ, Quer et Curc par PEG4000

L'étude de l'efficacité d'encapsulation des molécules actives, à savoir la TQ, la Quer et la Cur, par le polymère PEG4000 a révélé des taux d'encapsulation très intéressants résumés dans le **Tableau 6**.

Le taux d'encapsulation de la TQ a atteint environ $99.91\% \pm 0.06$, ce qui indique que la majeure partie de la molécule a été efficacement piégée dans la structure tridimensionnelle du polymère PEG lors du processus d'encapsulation. Ce taux exceptionnel surpasse de manière significative celui d'autres systèmes d'encapsulation comme chitosan-TQ (75.7 %) [287] et PVP-TQ (83.2 %) comme rapporté dans des études antérieures [276].

En ce qui concerne la Quer, le taux d'encapsulation atteint $93.93\% \pm 1.8$, un excellent résultat qui reste compétitif bien que les études sur des systèmes similaires, comme les liposomes, montrent des taux légèrement inférieurs dans certains cas. Comparativement, l'efficacité d'encapsulation de PEG4000 reste supérieure à celle observée pour d'autres systèmes, comme les liposomes non recouverts (79.26%) ou ceux recouverts de chitosan (71.14%) [288], renforçant ainsi le potentiel de PEG4000 pour encapsuler la Quer de manière plus efficace.

Quant à la Cur, bien que le taux d'encapsulation soit légèrement inférieur, atteignant $84.75\% \pm 0.3$, il demeure intéressant en comparaison avec d'autres systèmes comme les nanoémulsions, qui ont atteint 90.56% [289]. Toutefois, le PEG4000 présente des avantages notables, notamment en termes de stabilité et de libération contrôlée. Les résultats montrent que, même si le taux d'encapsulation de la Cur est plus bas que celui des autres molécules, PEG4000 reste compétitif et pourrait offrir des avantages en matière de solubilité et de libération prolongée. Cela indique que la formulation de Cur avec PEG4000 peut encore être optimisée pour obtenir de meilleurs résultats, notamment en ajustant le processus de synthèse ou en explorant l'utilisation de co-polymères.

Enfin, la comparaison de ces résultats met en évidence l'efficacité du PEG4000 pour l'encapsulation de la TQ et de la Quer, où il devance largement d'autres systèmes comme les liposomes et le chitosan. Bien que l'efficacité d'encapsulation de la Cur soit inférieure à celle

observée pour les autres molécules, le PEG4000 reste une option valable, avec un potentiel d'amélioration par le biais d'ajustements dans la formulation.

Tableau 6 : Comparaison des taux d'encapsulation de la TQ, Quer et Cur avec PEG4000

Molécule	Taux d'encapsulation (%)	SM (±)	Observations
TQ	99.91	± 0.06	Taux exceptionnel, surpassant les formulations avec d'autres polymères (ex. chitosan, PLGA).
Quer	93.93	± 1.8	Taux très élevé, comparativement plus efficace avec d'autres systèmes de nano-encapsulation (ex. liposomes, chitosan).
Cur	84.75	± 0.3	Moins efficace que les autres, mais reste compétitive par rapport à d'autres systèmes d'encapsulation rapportés.

2. Test de libération de la TQ, la Quer et la Cur à différents pH *in vitro*

Les profils de libération des substances actives encapsulées dans les complexes TQ-PEG4000-NP, Quer-PEG4000, et Cur-PEG4000 ont été évalués sous différentes conditions de pH afin de simuler des environnements physiologiques. Pour la TQ, la libération dans un milieu acide (pH 1,2) a montré une libération modérée, atteignant 17,63 µg/ml après 180 minutes. À pH 6,9 (neutre), la libération a atteint 17,46 µg/ml, et à pH 7,4 (basique), une libération similaire que les autres pH a été observée, atteignant 17,26 µg/ml à la fin de l'expérience ces résultats sont mentionnés dans la **Figure 10** (A). Il est à noter que la libération dans des solvants organiques comme l'acétonitrile a été beaucoup plus rapide, culminant à 19,93 µg/ml après 180 minutes **Figure 10** (B), suggérant une meilleure solubilité de la TQ dans ces solvants. Ces résultats sont soutenus par les travaux de Greenwald et al. (2003) qui montrent que des formulations PEGylées permettent une libération plus lente et contrôlée des médicaments, notamment des molécules hydrophobes comme la TQ, dans des environnements aqueux et organiques [290].

Concernant la Quer, la libération a été plus faible dans un milieu acide, atteignant seulement 0,57 µg/ml après 180 minutes à pH 1,2. À pH 6,9, la concentration a augmenté à 4,47 µg/ml, et à pH 7,4, la libération était encore plus marquée, avec une concentration finale de 8,72 µg/ml, ce qui indique une libération optimale dans des conditions basiques proches du pH physiologique **Figure 10 (C)**. En comparaison avec l'eau, les solvants organiques tels que l'acétonitrile ont conduit à une libération beaucoup plus rapide, atteignant 267 µg/ml après 180 minutes **Figure 10 (D)**. Ce phénomène de libération plus rapide de la Quer dans des solvants organiques est également observé dans les études de Zamani et al. (2019) qui indiquent que les formulations à base de PEG favorisent la libération accélérée de la Quer en milieu organique [291].

Enfin, la libération de la Cur dans un milieu acide (pH 1,2) a été modérée, atteignant 7,97 µg/ml après 180 minutes et culminant à 8,68 µg/ml après 1440 minutes, indiquant une vitesse de libération relativement lente. À pH 6,9, une libération légèrement plus faible a été observée atteignant 5,39 µg/ml à 180 minutes et 5,74 µg/ml après 24 heures. À pH 7,4, les concentrations finales étaient similaires à celles observées à pH 6,9, culminant à 5,21 µg/ml après 1440 minutes, suggérant que la libération est plus freinée dans des conditions basiques **Figure 10 (E)**. Dans l'eau, la libération était plus importante que dans les milieux physiologiques, atteignant 8,76 µg/ml après 180 minutes et stabilisant autour de 10,01 µg/ml après 24 heures. Enfin, dans l'acétonitrile, une libération significativement plus rapide et efficace a été observée, atteignant des concentrations élevées de 243,58 µg/ml après 180 minutes et 242,78 µg/ml après 1440 minutes **Figure 10 (F)**, démontrant une meilleure solubilité de la Cur dans ce solvant organique. Ces résultats sont en accord avec les conclusions d'Ayubi et al. (2019) qui ont observé que la Cur PEGylée présente une libération plus rapide dans des milieux acides ou organiques, confirmant l'impact crucial du solvant et du pH sur la libération des molécules hydrophobes comme la Cur [292].

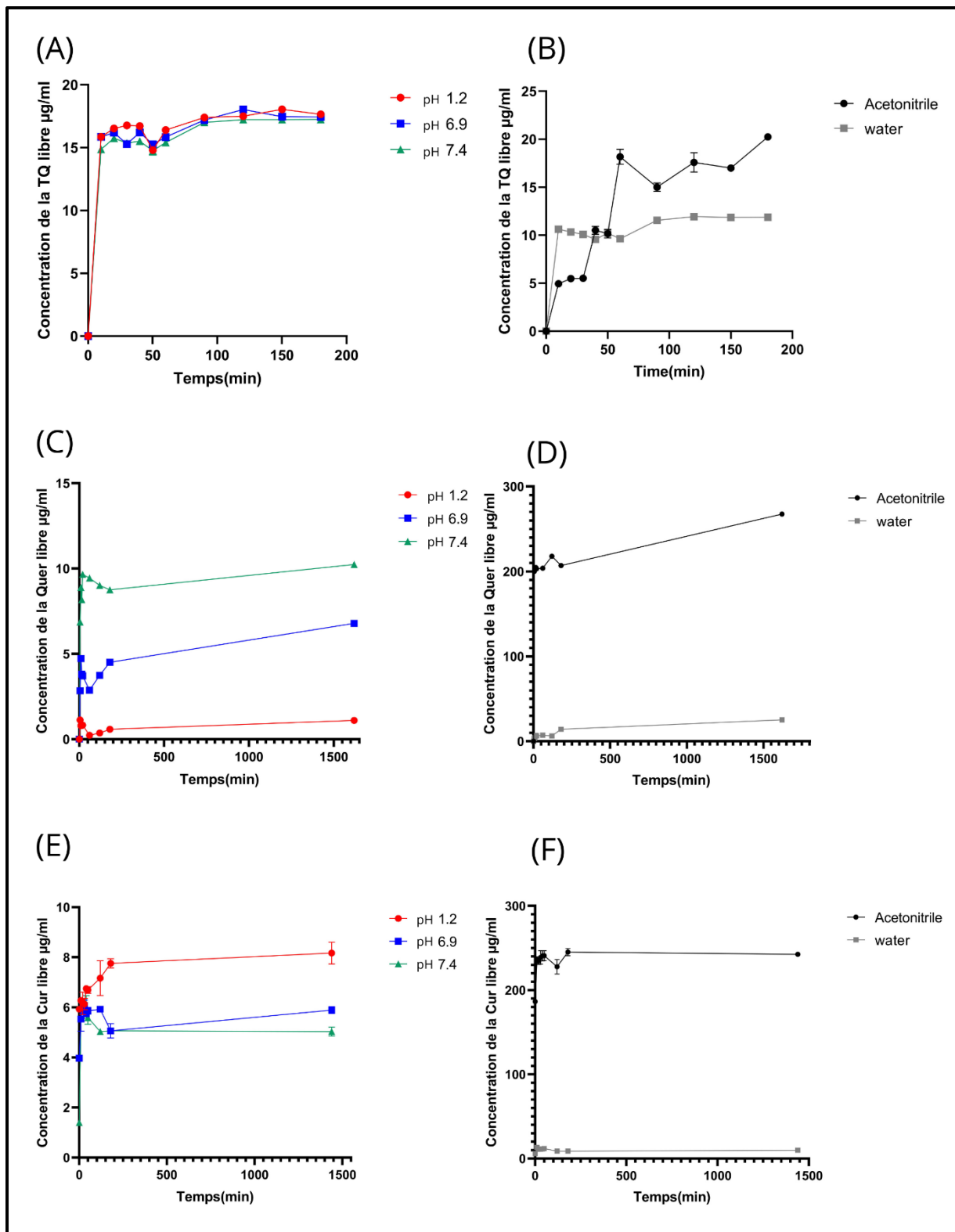


Figure 10. Profil de libération : (A) TQ-PEG4000-NP dans Différents pH; (B) TQ-PEG4000-NP dans des solvants; (C) Quer-PEG4000 dans Différents pH; (D) Quer-PEG4000 dans des solvants; (E) Cur-PEG4000 dans Différents pH; (F) Cur-PEG4000 dans des solvants.

Comparativement, les profils de libération des trois substances encapsulées (TQ, Quer et Cur) varient en fonction du pH et du type de solvant. La TQ et la Quer ont une libération plus

lente en milieu acide et plus rapide dans des conditions neutres ou basiques, atteignant des concentrations maximales à pH 7,4, mais la libération de la Quer reste inférieure à celle de la TQ dans les mêmes conditions. La Cur, en revanche, est libéré davantage en milieu acide et moins en milieu neutre ou basique, ce qui la rend moins influencée par des conditions basiques. Dans les solvants organiques comme l'acétonitrile, la libération de toutes les molécules est accélérée, mais la Cur se distingue par une concentration bien plus élevée, illustrant sa forte hydrophobicité et sa meilleure solubilité dans ces milieux. Cette tendance est également observée dans les travaux de Khatoon et al. (2020), où la Cur PEGylée a montré une libération significativement plus rapide dans les solvants organiques, confirmant sa forte solubilité dans ces milieux et son efficacité accrue en tant qu'agent thérapeutique dans des environnements non aqueux [293].

Ces résultats montrent que pour une libération optimale, la TQ et la Quer requièrent des conditions de pH légèrement basique, tandis que la Cur nécessite des solvants organiques pour une meilleure solubilité.

3. Analyse Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR) : Étude Comparative des Systèmes Encapsulés

3.1. Interactions Physiques et Chimiques Détectées via FTIR

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier a révélé des changements spécifiques dans les spectres de chaque molécule active encapsulée, permettant de différencier les interactions physiques des interactions chimiques.

La **Figure 11** montre que l'encapsulation de la TQ présente des changements au niveau du spectre. Une nouvelle bande d'étirement à 3441 cm^{-1} attribuée au groupement (O-H) est apparue dans le spectre de TQ-PEG4000-NP. Le pic observé à 1637 cm^{-1} , attribué au groupement C=O (**Figure 11 .B**) a été atténué après encapsulation [294, 295]. De même, le pic de la TQ observé à 2966 cm^{-1} et qui est attribué au groupement (C-H) (**Figure 11.B**) a été presque disparu après encapsulation (**Figure 11.A**) [296]. L'absence de nouvelles bandes spécifiques et l'atténuation des pics caractéristiques (1637 cm^{-1} pour le C=O et 2966 cm^{-1} pour le C-H) confirment que l'encapsulation n'altère pas les groupes fonctionnels principaux. En outre cette encapsulation implique des interactions physiques probable et un enveloppement par le PEG sans liaisons spécifiques ce qui a été confirmé par la (DFT) par la suite. Ces

interactions physiques favorisent une libération rapide dans l'eau tout en maintenant la compatibilité avec divers pH [276].

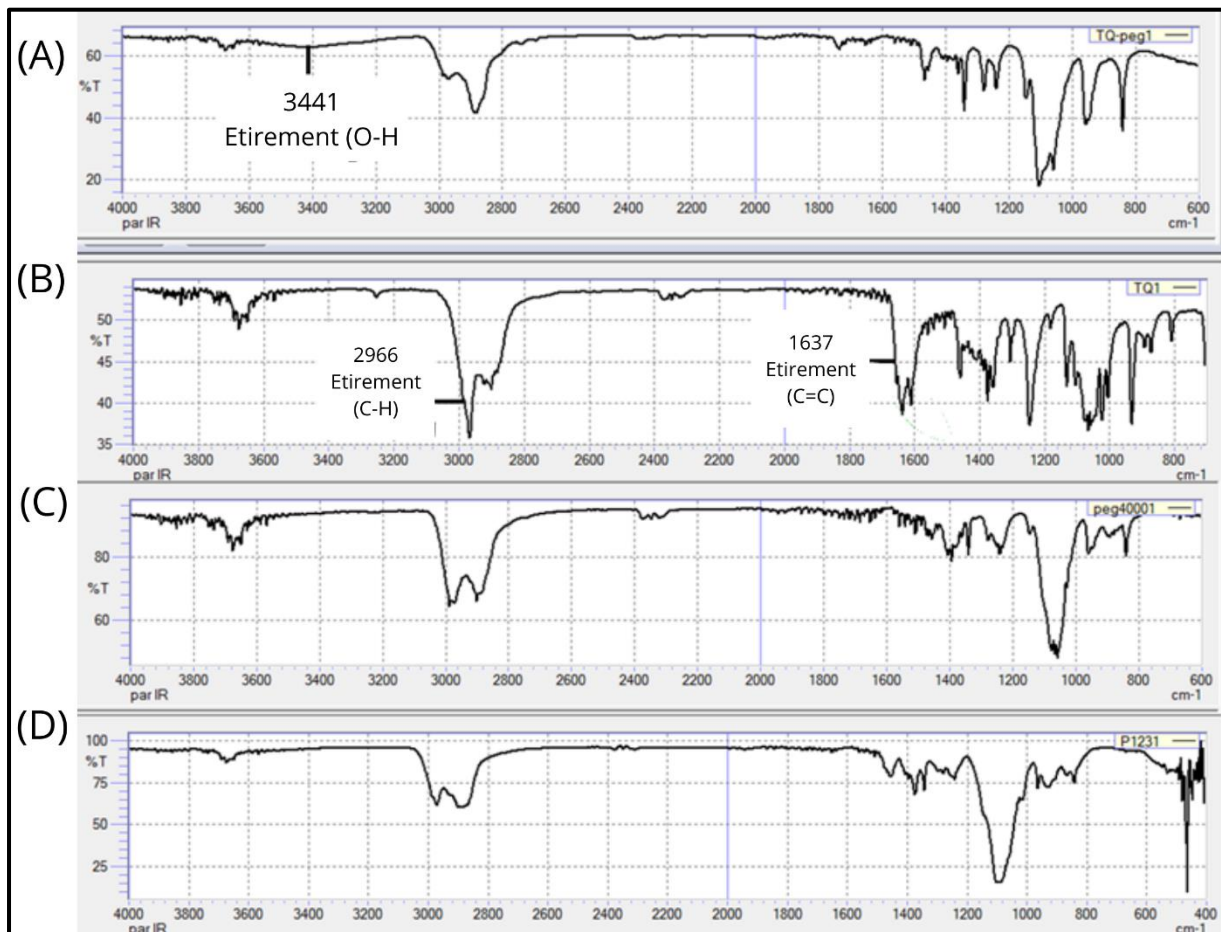


Figure 11 : Spectre FTIR : (A) complexe TQ-PEG4000-NP ; (B) TQ ; (C) PEG4000 et (D) P123.

La **Figure 12** montre le spectre FTIR de la Quer, du PEG4000 et du complexe Quer-PEG4000). Le pic observé à 3441 cm^{-1} (**Figure 12.B**) attribué au groupement hydroxyle O-H a été atténué après encapsulation. En parallèle, une légère modification a été observé au niveau de la bande 2966 cm^{-1} et qui est attribué au groupement C-H (**Figure 12.A**) [297] [298]. Ces résultats peuvent être expliqués par la formation de microcristaux ainsi que des interactions (O-H) ce qui apporte une meilleure stabilisation. Cette stabilisation dans une matrice cristalline pourrait améliorer la biodisponibilité et favoriser une libération progressive, ce qui est particulièrement intéressant pour des applications pharmacologiques nécessitant une diffusion contrôlée [299].

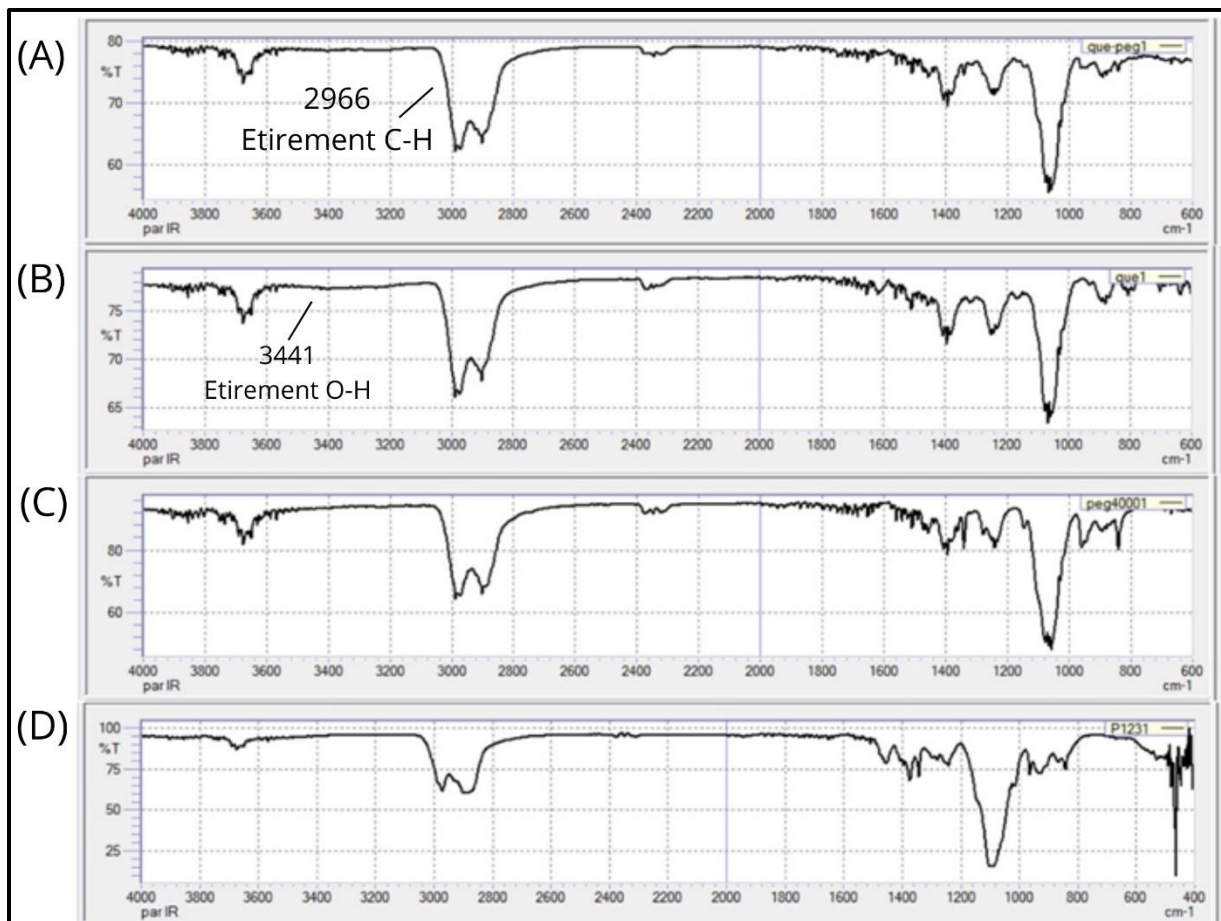


Figure 12 : Spectre FTIR : (A) complexe Quer-PEG4000 ; (B) Quer ; (C) PEG4000 ; (D) P123.

Le spectre FTIR du complexe Cur-PEG4000 indique l'apparition d'un pic à 1635 cm^{-1} attribué au groupement (C=C), avec un élargissement de la bande $3300\text{-}3400\text{ cm}^{-1}$ qui correspond au groupement (O-H) (**Figure 13.A**) [294, 295, 300, 301]. En outre, les pics à 3000 cm^{-1} attribué au étirement des groupements (C-H), et à 3700 cm^{-1} attribué au vibration d'étirement (O-H) (**Figure 13.B**) ont disparu [302, 303]. Ces interactions, notamment les liaisons hydrogène, traduisent une encapsulation stable, idéale pour une libération contrôlée et une amélioration de la stabilité et de la biodisponibilité [304].

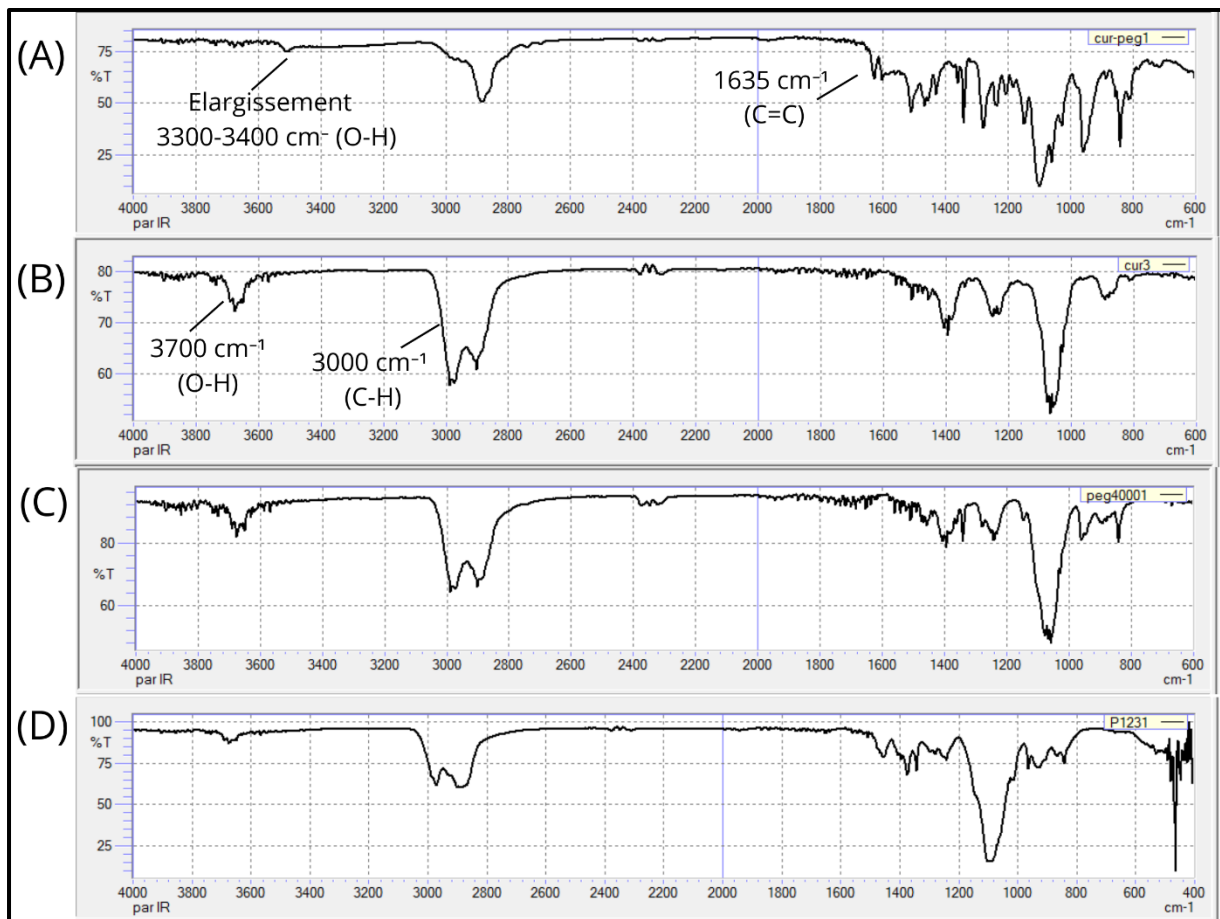


Figure 13 : Spectre FTIR : (A) complexe Cur-PEG4000 ; (B) Cur ; (C) PEG4000 ; (D) P123.

3.2. Comparaison des Effets des Interactions sur les Propriétés Spectrales et Fonctionnelles

Les analyses FTIR mettent en évidence des effets distincts des interactions entre les molécules actives (TQ, Quer, Cur) et le PEG4000 sur leurs propriétés spectrales, leur stabilité et leurs profils de libération. Ces résultats soulignent que les mécanismes d'encapsulation diffèrent selon la structure chimique de la molécule active. Alors que la TQ semble majoritairement interagir de manière physique, la Quer et la Cur montrent des interactions hydrogène, suggérant une interaction chimique plus marquée. Ceci impacte et explique le profil de libération des principes actifs discutés plus haut.

4. Morphologie et structure des particules encapsulées (MEB) et analyse chimique (EDS)

Les observations par le microscope électronique à balayage (MEB) mettent en évidence les différences notables de morphologie et de structure des particules encapsulées pour la TQ, la Quer et la Cur. Les particules encapsulées de TQ présentent une structure sphérique et homogène, avec une texture relativement lisse. Leur taille est extrêmement petite, avec une moyenne de $46,31 \pm 14,09$ nm (**Figure 14, A**), ce qui constitue un avantage significatif pour des applications pharmacologiques nécessitant une absorption rapide. La nature amorphe des particules, confirmée par l'absence d'indices de cristallinité [305, 306], favorise une dissolution immédiate après administration ce qui est cohérent avec la libération rapide observée dans les solvants organiques et la libération plus modérée dans les environnements physiologiques à différents pH.

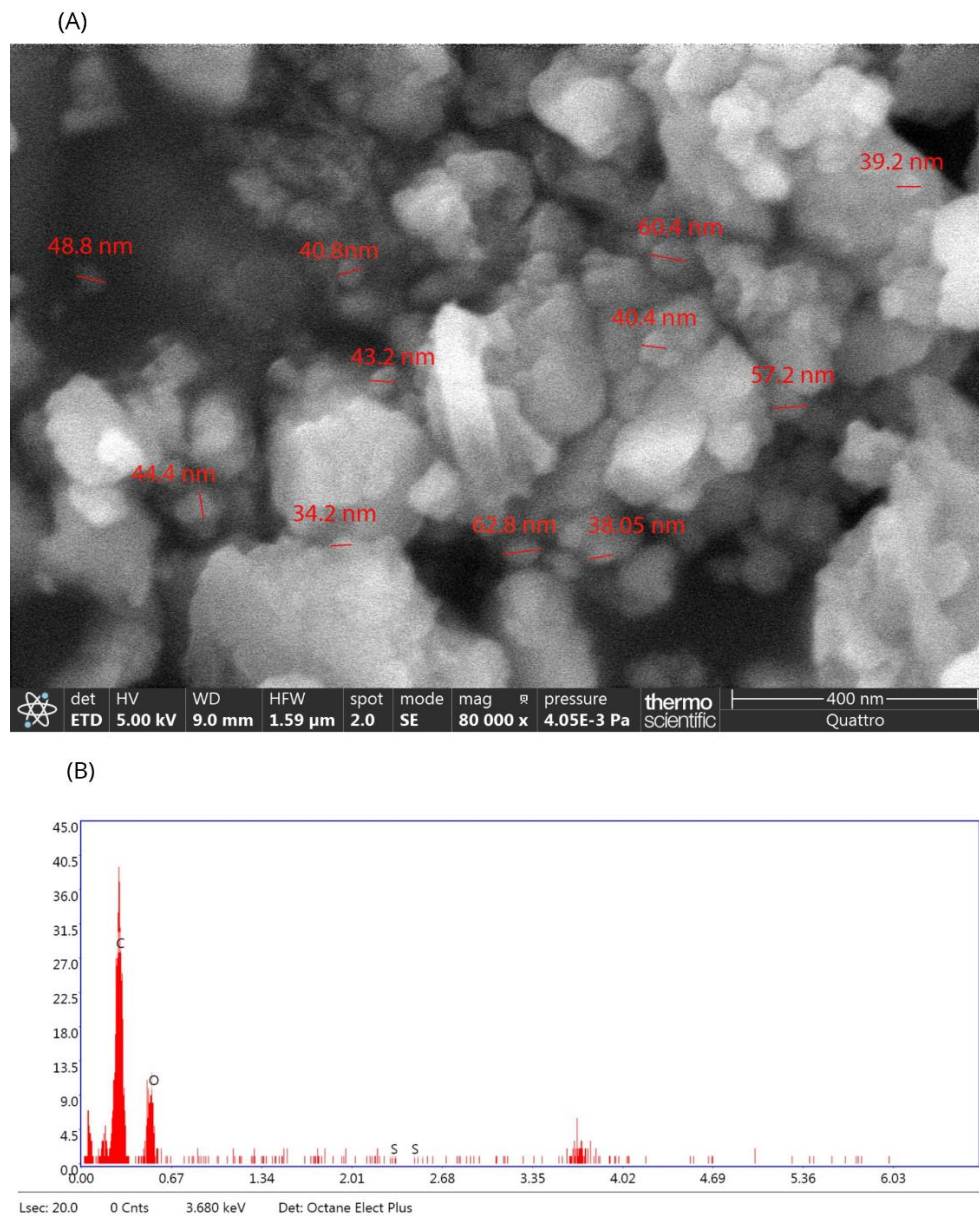
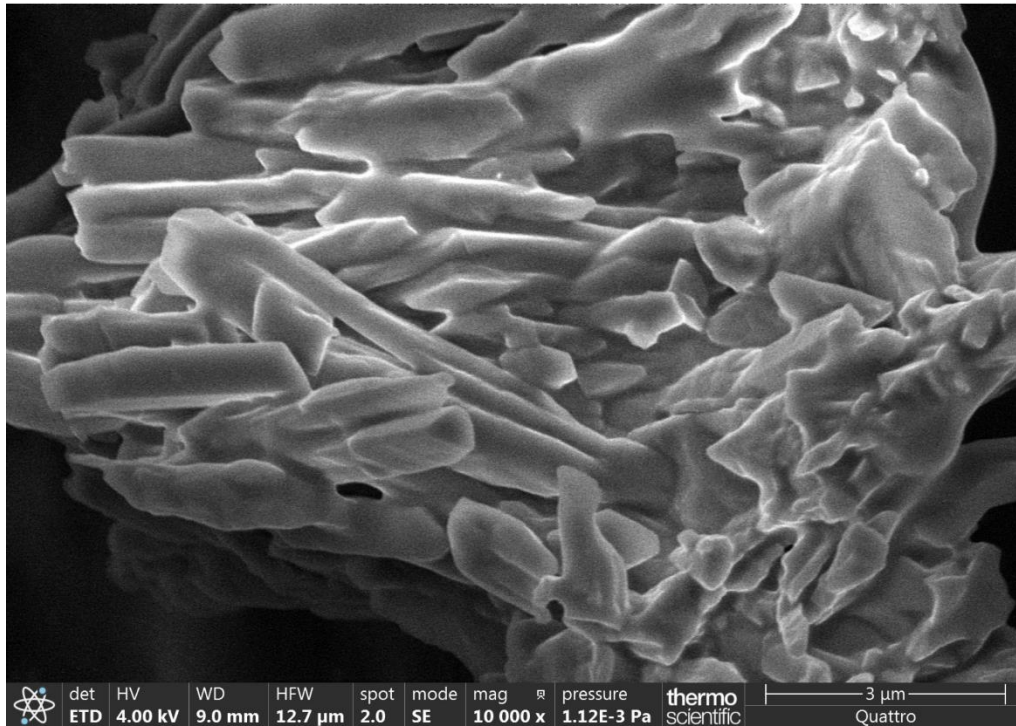


Figure 14 : A) Image MEB B) Spectre EDS des Nanoparticules TQ-PEG4000-NP.

Les particules encapsulées de Quer révèlent une structure lamellaire, typique des microcristaux organisés. Leur taille moyenne est de $2 \pm 0,5 \mu\text{m}$ (**Figure 15, A**), avec une distribution homogène et une texture lisse. Ces caractéristiques suggèrent que la Quer encapsulée pourrait exister sous forme de microcristaux. Cette cristallinité confère à la molécule une meilleure stabilité chimique et des propriétés pharmacocinétiques optimisées [307]. En effet, les microcristaux favorisent une dissolution contrôlée et une libération prolongée, réduisant les pics plasmatiques rapides et augmentant l'absorption intestinale [308], ce qui est en accord avec la libération plus lente dans des environnements acides et la libération optimisée à des pH physiologiques remarqué lors du test de libération des molécules. Ces attributs en font

une candidate idéale pour des formulations destinées au traitement de pathologies inflammatoires chroniques y compris le diabète.

(A)



(B)

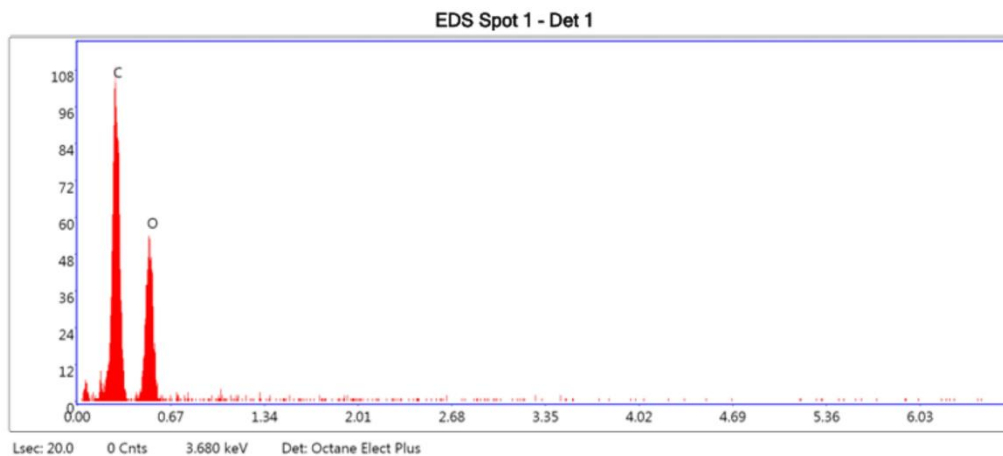


Figure 15 : A) Image MEB B) Spectre EDS du complexe Quer-PEG4000.

En comparaison, les particules encapsulées de Cur présentent une texture granuleuse et une structure irrégulière avec des zones d'agglomération visibles. Les particules encapsulées sont plus grandes et hétérogènes (5 à 10 μm) (**Figure 16, A**). Cette morphologie pourrait

indiquer une moindre cristallinité, bien que la présence de microcristaux ne puisse être totalement exclue. Ces caractéristiques pourraient influencer négativement la solubilité et la biodisponibilité de la Cur encapsulée [309]. Toutefois, les avantages liés à sa structure chimique intrinsèque, notamment ses propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes, restent significatifs.

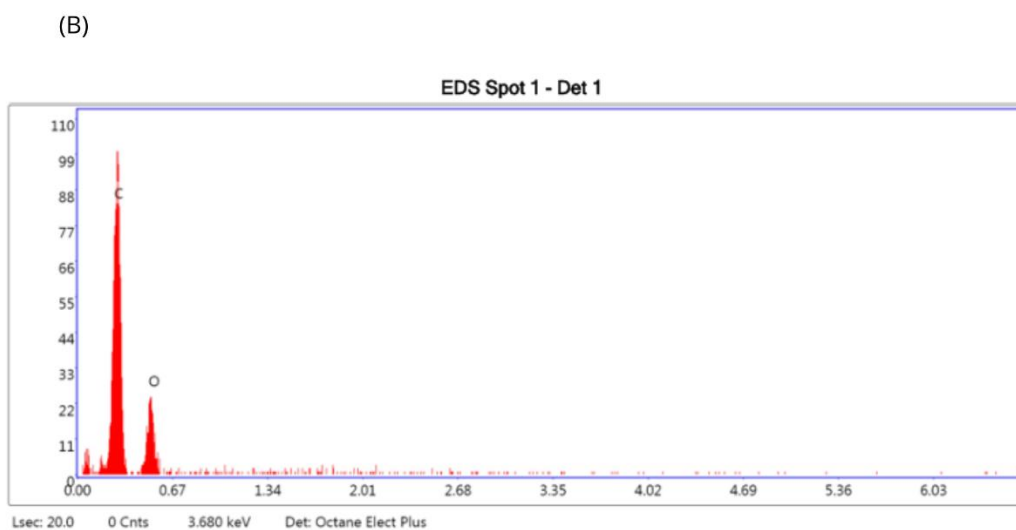
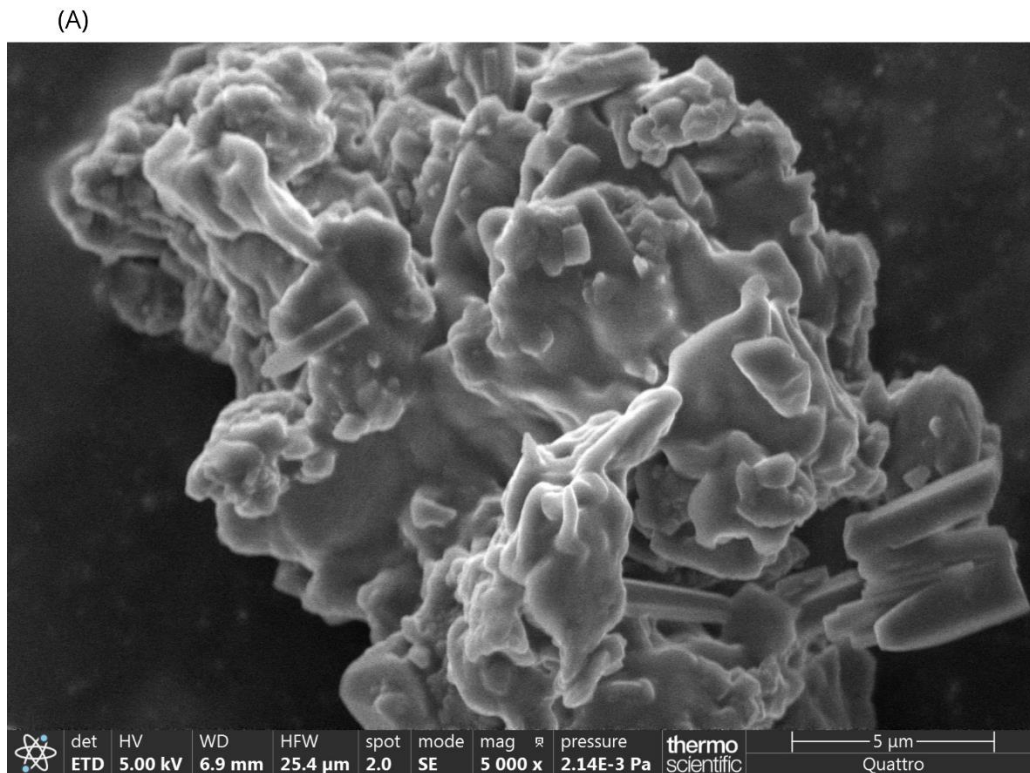


Figure 16 : A) Image MEB B) Spectre EDS du complexe Cur-PEG4000.

L'analyse par spectroscopie de dispersion d'énergie (EDS) met en évidence une forte proportion de carbone (C) et d'oxygène (O) pour les trois molécules étudiées (**Figure 14(B)**, **Figure 15(B)**, **Figure 16(B)**). Cette composition élémentaire, limitée à ces deux éléments, indique l'absence d'impuretés dans les particules encapsulées, renforçant ainsi leur pureté chimique.

5. Potentiel Zeta

Le potentiel zêta, associé à la mobilité électrophorétique des particules est une mesure essentielle pour évaluer la charge de surface et la stabilité colloïdale des systèmes encapsulés. Une forte valeur absolue du potentiel zêta, combinée à une mobilité électrophorétique cohérente, traduit une bonne dispersion et une stabilité accrue. Pour les microcristaux Quer-PEG4000, le potentiel zêta atteint un pic significatif de $-57,3$ mV (22,25 a.u.) (**Figure 17, A**), avec une mobilité électrophorétique correspondante de $-0,00044$ $\text{cm}^2/\text{V}\cdot\text{s}$ (**Figure 17, B**), confirmant une stabilité colloïdale élevée [310]. Ces résultats concordent avec les observations obtenues par MEB et FTIR. L'analyse MEB montre une structure lamellaire homogène avec des particules de taille moyenne de $2 \pm 0,5$ μm , tandis que le FTIR révèle une atténuation des bandes O-H (3441 cm^{-1}), indiquant une cristallinité renforcée et une libération progressive. Ces caractéristiques, soutenues par les données de potentiel zêta, suggèrent que la Quer encapsulée existe sous forme de microcristaux stabilisés.

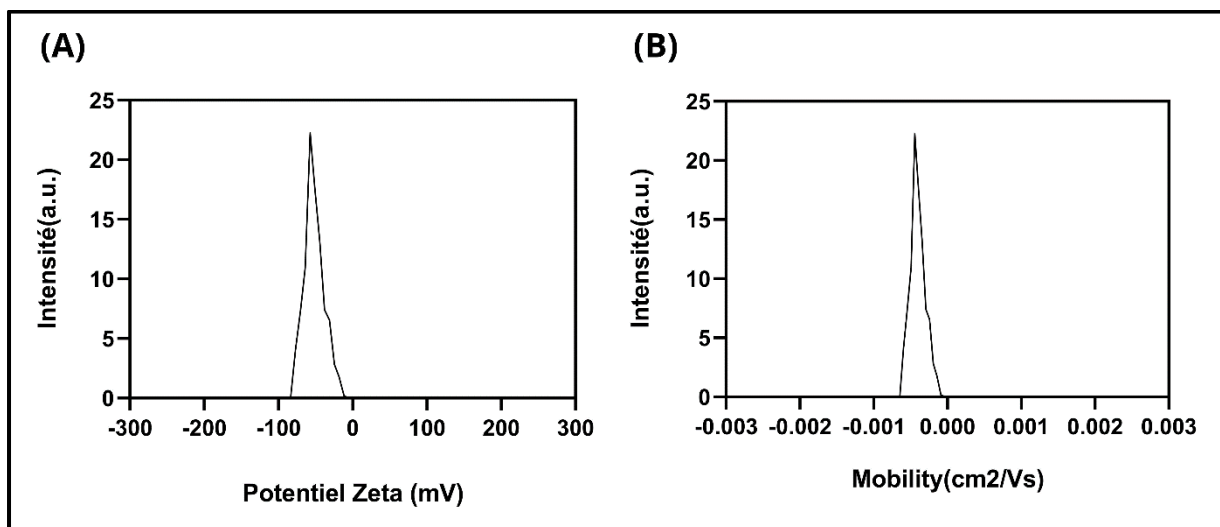


Figure 17 : (A) Potentiel Zeta et (B) mobilité électrophorétique des microcristaux Quer-PEG4000.

Pour les microcristaux Cur-PEG4000, le potentiel zêta atteint un pic de -45,5 mV (49,36 a.u.) (**Figure 18, A**), avec une mobilité électrophorétique associée de -0,00035 cm²/V·s (**Figure 18, B**). Bien que ces valeurs indiquent une certaine stabilité colloïdale, elles reflètent également une propension accrue à l'agglomération [311], confirmée par les images MEB qui révèlent une texture granuleuse et hétérogène ainsi que les analyses FTIR qui montrent un décalage des bandes (C=C) et l'apparition de nouveaux pics faibles (1700-1750 cm⁻¹), témoins d'interactions chimiques significatives mais d'une cristallinité réduite.

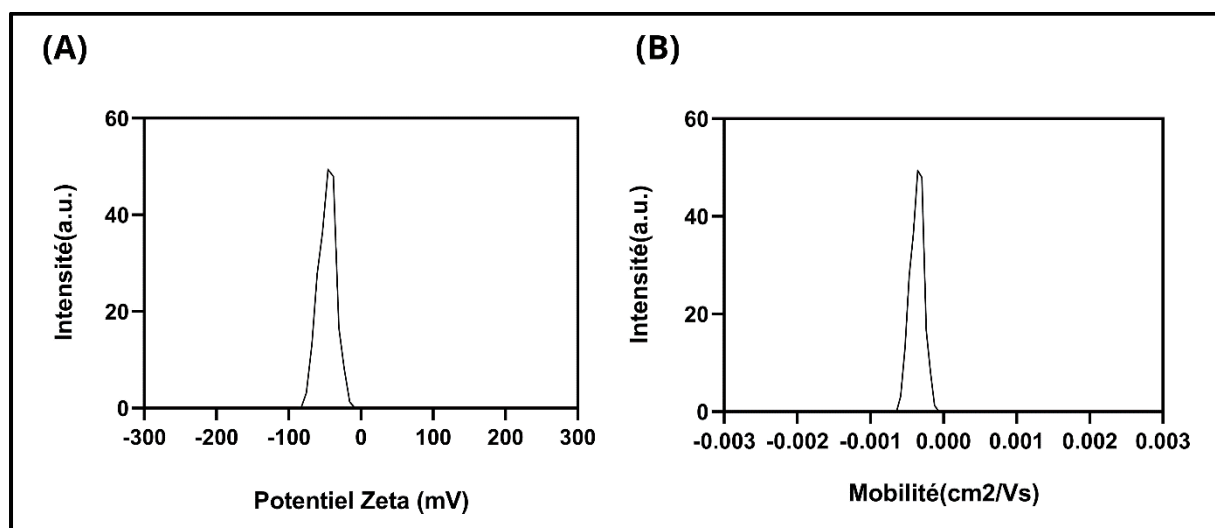


Figure 18 : (A) Potentiel Zeta et (B) mobilité électrophorétique des microcristaux Cur-PEG4000.

6. Etude *in-silico* de l'interaction moléculaire.

6.1 Investigation théorique de l'interaction des nanoparticules TQ-PEG₄₀₀₀-NP

Des calculs DFT ont été réalisés afin d'examiner les énergies d'adsorption, les distances d'interaction et les configurations de liaison entre la TQ et le PEG4000. Reposant sur des principes premiers, cette approche a identifié le site d'adsorption optimal et clarifié les mécanismes d'interaction au niveau moléculaire. Dix chaînes polymériques de PEG, de longueurs variant de dix à 90 unités ont été employées pour atteindre cet objectif. La méthode appliquée a généré avec succès dix configurations distinctes du système TQ-PEG4000-NP. La configuration thermodynamiquement la plus stable a été déterminée sur la base de l'énergie d'adsorption la plus négative. Les énergies d'adsorption (ΔE) des composants interagissant au sein du complexe étudié ont été estimées à l'aide de l'équation suivante :

$$\Delta E = E(\text{complexe}) - E(\text{TQ}) - E(\text{PEG}) \dots \dots \dots (\text{Eq3})$$

où $E(\text{TQ})$, $E(\text{PEG})$, et $E(\text{complexe})$ sont les énergies de la thymoquinone, du porteur et du complexe, respectivement.

Une comparaison des résultats présentés dans le **Tableau 7** met en évidence l'influence de la longueur des chaînes polymériques sur l'énergie d'interaction. En phase gazeuse, les valeurs variaient avec l'énergie la plus élevée observée pour $n=10$ ($\Delta E_{\text{TQ-PEG}} = -30,222$ kcal/mol) et la valeur la plus basse pour $\text{PEG}_n = 90$ ($\Delta E_{\text{TQ-PEG}} = -420,120$ kcal/mol).

Tableau 7 : Énergies d'interaction (ΔE en kcal/mol) entre la TQ et différentes chaînes de PEG ($n = 10$ à 90) dans les phases gazeuse et aqueuse avec la distance mesurée (Å).

Le degré de polymérisation (n) du PEG	Phase gazeuse $\Delta E_{\text{TQ-PEG}}$ (kcal/mol)	Eau $\Delta E_{\text{TQ-PEG}}$ (kcal/mol)	Distance phase gazeuse (Å)	Distance eau (Å)
n=10	-30.222	-21.129	2.45	2.50
n=20	-51.129	-41.197	2.40	2.50
n=30	-189.899	-169.699	2.20	2.50
n=40	-171.717	-158.917	2.35	2.45
n=50	-182.126	-179.295	2.15	2.15
n=60	-295.777	-270.897	2.00	2.50
n=70	-300.101	-264.521	1.95	2.00
n=80	-350.124	-319.221	1.95	2.00
n=90	-420.120	-400.111	1.85	1.95

La distance la plus courte mesurée entre la TQ et la chaîne $\text{PEG}_n = 90$ était de 1,85 Å. L'énergie impliquée dans l'adsorption provient principalement des interactions de Van der Waals. L'examen des résultats de simulation **Figure 19** révèle que le composé actif (la TQ) se positionne systématiquement avec les groupes isopropyle et méthyles orientés vers les atomes de la chaîne polymérique. En même temps, le cycle contenant deux doubles liaisons semble légèrement distant de la chaîne polymérique. Cette disposition spatiale est principalement due à des interactions attractives de Van der Waals, tandis que l'interaction avec le cycle apparaît quelque peu répulsive [312].

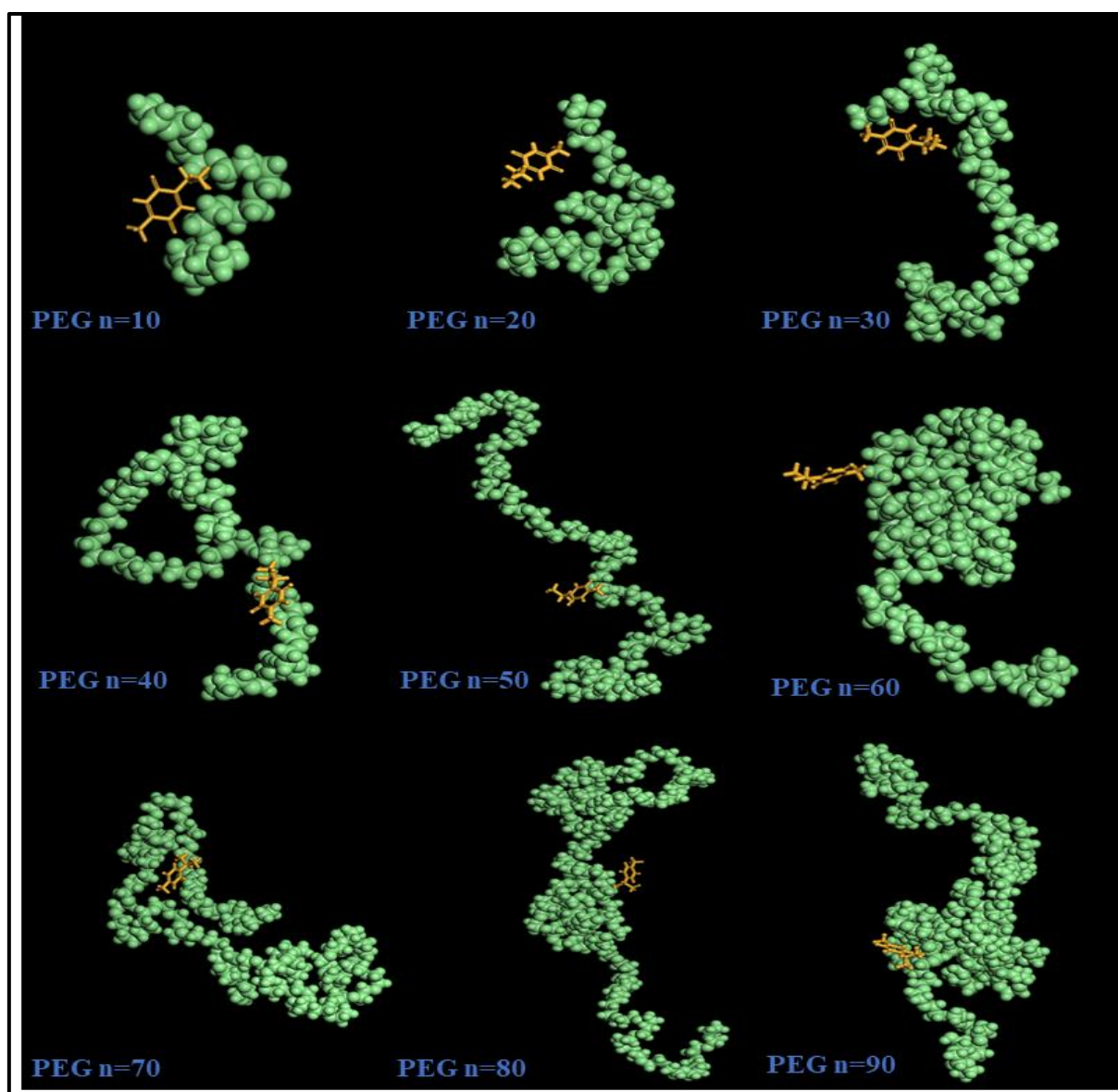


Figure 19 : Présentation des configurations finales des différents systèmes d'encapsulation TQ-PEG dans la phase gazeuse avec une longueur de chaîne variable ($n = 10$ à 90) : la TQ est colorée en orange, le polymère est coloré en vert selon le modèle CPK.

En outre, la TQ a été trouvée dans trois positions : premièrement, entourée par la chaîne polymérique, enveloppée dedans ; deuxièmement, positionnée à l'extérieur de la chaîne le long de sa longueur ; et enfin, localisée à l'extrémité de la chaîne de PEG. Ces observations ont fourni des informations précieuses sur la dynamique spatiale de l'interaction TQ-PEG4000, éclairant les forces intermoléculaires en jeu lors de l'adsorption.

Dans la **Figure 20**, la configuration optimisée du complexe TQ-PEG4000-NP à un rapport molaire de 1:4 est illustrée, ce qui est cohérent avec la préparation expérimentale. Trois

modes de liaison ont été discernés lors de l'examen des poses potentielles de dépôt de la TQ sur la chaîne polymérique PEG $n = 90$. Tout d'abord, la TQ a été déposée sur la surface du PEG4000, établissant des forces robustes d'interactions de Van der Waals. De plus, le PEG4000 encapsule la TQ dans la cavité, comme illustré dans la **Figure 20**. Enfin, à un autre site de liaison, la TQ adhère efficacement au polymère PEG4000 grâce à une liaison hydrogène robuste formée entre l'atome d'hydrogène du groupe hydroxyle (OH) de la chaîne PEG et l'atome d'oxygène du groupe quinone sur la molécule de TQ [313]. La distance de cette interaction a été mesurée à 1,8 Å. Dans une étude *in silico* antérieure, des PEG de différentes tailles ont été évalués pour leur interaction avec les molécules d'eau et la dihydrothymoquinone. Le PEG composé de 90 monomères offre une bonne efficacité d'encapsulation [314]. Ces modes de liaison diversifiés fournissent une vue complète des interactions complexes entre la TQ et le PEG4000, offrant des informations précieuses sur la dynamique structurale du complexe PEG-TQ.

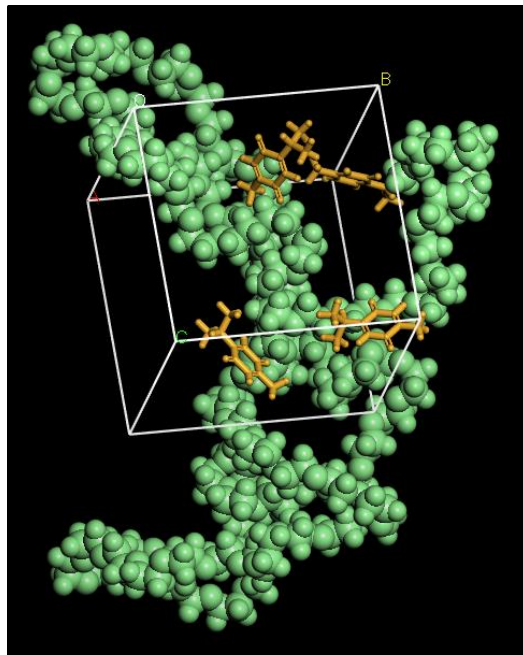


Figure 20 : Configuration possible d'adsorption du complexe TQ-PEG4000-NP pour le rapport molaire expérimental 1:4 (paramètres de la maille : $a = b = c = 19,72$)

Expériences biologiques.

1 Effet cytotoxique des molécules libres et leurs complexes sur les deux lignées cellulaires EMT6 et les NIT-1.

1.1. Effet cytotoxique sur les EMT6

L'évaluation cytotoxique de la TQ, le PEG4000 et les nanoparticules TQ-PEG4000-NP démontrent qu'aucun effet cytotoxique n'a été observé sur les cellules tumorales EMT6 (**Figure 21**). Bien que la TQ libre ait montré un léger effet toxique à faible dose, cet effet disparaît à des concentrations plus élevées, avec une viabilité cellulaire restant supérieure à 92 %. L'enrobage de la TQ avec le PEG4000 a complètement annulé cet effet toxique léger, probablement en réduisant le contact direct de la TQ avec les cellules, ou en raison de la faible concentration de TQ dans le complexe (170 µg de TQ pour 1 mg de complexe). Une étude sur les cellules de carcinome mammaire murin a révélé que la TQ inhibe la prolifération des cellules EMT6 de manière concentration-dépendante, mais sans induire une cytotoxicité excessive aux doses plus élevées [315]. De plus, des recherches similaires ont observé que l'enrobage de la TQ dans des nanoparticules ou des complexes comme le PEG, peut réduire les effets toxiques observés avec la TQ libre et augmenter l'efficacité anticancéreuse tout en protégeant les cellules saines [316].

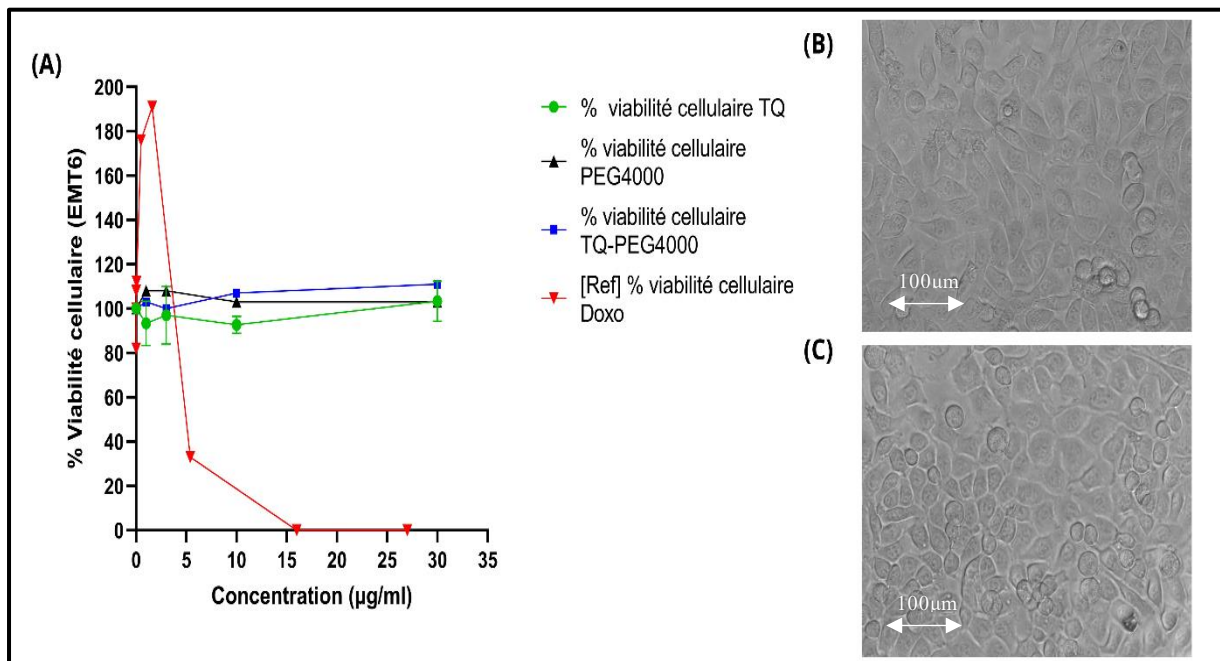


Figure 21 : (A) : Cytotoxicité de la TQ, PEG4000, TQ-PEG4000-NP, Doxo en référence ; (B) image microscope inversé témoin- après 72 h d'incubation ; (C) image microscope inversé des EMT6 traité avec 30 µg/ml de TQ-PEG4000-NP.

Concernant la Quer et les microcristaux Quer-PEG4000, les résultats (**Figure 22**) montrent que les deux produits n'ont eu aucun impact significatif sur la viabilité des cellules tumorales EMT6, suggérant une absence de toxicité substantielle. Toutefois, la Quer encapsulée a montré un effet toxique modéré à la dose de 30 µg/ml, avec une viabilité de 56 %. Cette toxicité modérée de la Quer encapsulée est comparable aux effets observés dans une étude similaire où les micelles Pluronic® F-127/Tween 80 chargées de Quer présentaient une valeur

IC50 inférieure contre les cellules cancéreuses du sein à celle de la Quer libre, ce qui indique une cytotoxicité accrue [317].

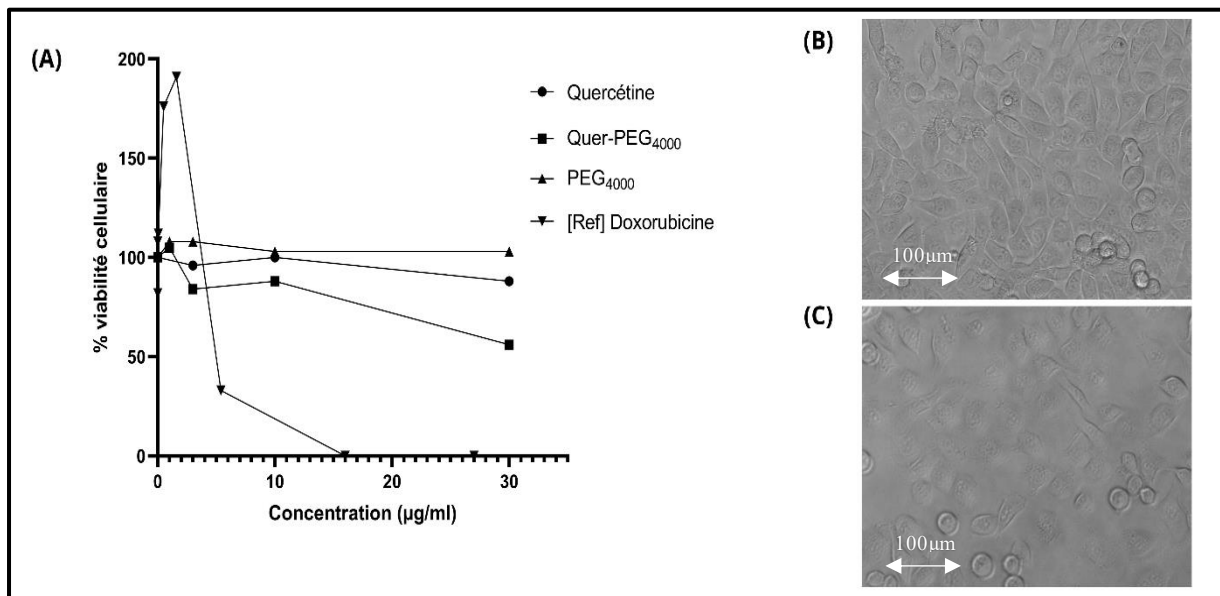


Figure 22 : (A) : Cytotoxicité de la Quer, PEG4000, Quer-PEG4000, Doxo en référence ; (B) image microscope inversé témoin- après 72h d'incubation ; (C) image microscope inversé des EMT6 traité avec 30µg/ml de Quer-PEG4000.

Concernant la Cur libre, elle présente des effets cytotoxiques marqués dès la concentration de 3 µg/ml, avec une viabilité de 71 %. Cet effet s'améliore légèrement à 10 µg/ml (75 %) et reste relativement stable autour de 74 % à 30 µg/ml (**Figure 23**). Ces résultats montrent que la Cur libre réduit la viabilité des cellules tumorales à des concentrations plus faibles, mais l'impact reste modéré, sans effet de cytotoxicité extrême. Lorsque les microcristaux Cur-PEG4000 sont appliqués, les effets cytotoxiques sont plus faibles, avec des viabilités cellulaires de 79 % à 3 µg/ml, 86 % à 10 µg/ml et 81 % à 30 µg/ml. Cela suggère que l'encapsulation de la Cur dans PEG4000 protège partiellement les cellules tumorales des effets toxiques de la Cur. Dans des études antérieures sur la Cur encapsulée, il a été démontré que la Cur encapsulée dans ces nanocapsules a une efficacité d'encapsulation élevée de 70 % et une cytotoxicité significative contre les cellules cancéreuses du sein MDA-MB-231 et MCF-7, surpassant la Cur non encapsulée [318].

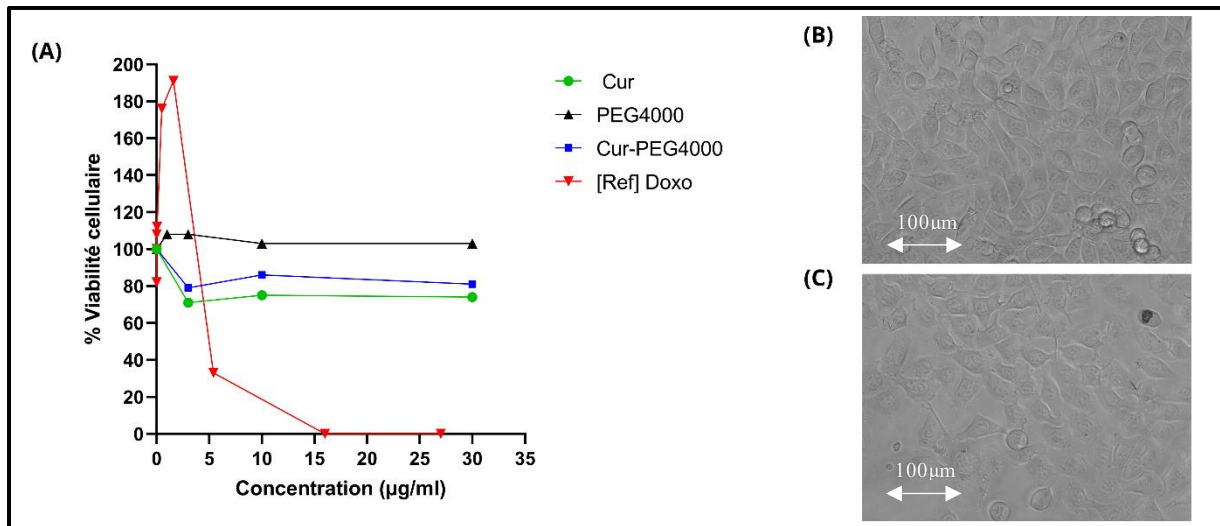


Figure 23 : (A) : Cytotoxicité de la Cur, PEG4000, Curr-PEG4000, Doxo en référence ; (B) image microscope inversé témoin- après 72h d'incubation ; (C) image microscope inversé des EMT6 traité avec 30µg/ml de Cur-PEG4000.

1.2.Effet cytotoxique sur les NIT-1

Les résultats obtenus pour la TQ libre, le PEG4000 et les nanoparticules TQ-PEG4000-NP (**Figure 24**) ont montré des effets variés selon les concentrations. La TQ libre a présenté une cytotoxicité modérée avec une diminution de la viabilité cellulaire observée à 60 µg/ml, où la viabilité a été réduite à environ 68 %. Le PEG4000 seul n'a montré aucun effet cytotoxique sur les cellules β NIT-1. En revanche, les nanoparticules TQ-PEG4000-NP ont stimulé la prolifération des cellules β, entraînant une augmentation de la viabilité cellulaire d'environ 120 %, suggérant ainsi un effet bénéfique ou une amélioration de la prolifération cellulaire β. En comparaison, la TQ liposomale a entraîné une diminution dose-dépendante de l'activité métabolique des cellules MCF7 et MCF10, réduisant leur viabilité d'environ 50 % à une concentration de 50 µM [319]. En conclusion, la TQ libre présente des effets cytotoxiques modérés à des concentrations relativement élevées sur les cellules β-pancréatiques, mais n'affecte pas de manière significative les cellules tumorales EMT6. L'encapsulation de la TQ dans PEG4000 réduit la toxicité tout en maintenant les effets bénéfiques des nanoparticules, notamment la stimulation de la prolifération des cellules β.

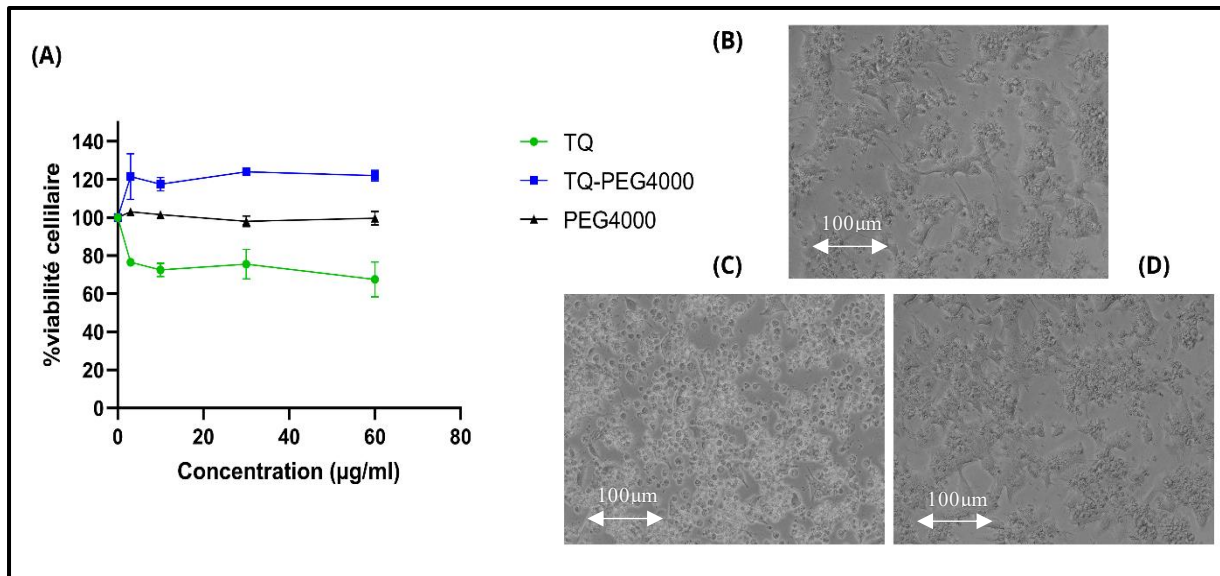


Figure 24 : (A) : Cytotoxicité de la TQ, PEG4000, TQ-PEG4000-NP sur les NIT-1 ; (B) image microscope inversé témoin- après 72h d'incubation ; (C) Image microscope inversé des NIT traité avec 60µg/ml de TQ ; (D) Image microscope inversé des NIT traitées avec 60µg/ml de TQ-PEG4000-NP

De manière similaire, la cytotoxicité de la Quer, du PEG4000 et des microcristaux Quer-PEG4000 a été évaluée sur la lignée cellulaire NIT-1 (**Figure 25**). La Quer libre a montré une légère cytotoxicité à la concentration de 60 µg/ml, réduisant la viabilité cellulaire à 77 %. Le PEG4000 n'a montré aucune toxicité, tandis que les microcristaux Quer-PEG4000 ont stimulé la prolifération des cellules β entraînant une viabilité d'environ 115 % pour la moyenne des concentrations testées. Il a été démontré dans une autre étude que la Quer libre réduit la viabilité des cellules β de l'INS-1 de manière dose-dépendante, avec une IC50 d'environ 25 µM [320]. Une autre étude a montré que les nanosphères polymères conçues pour l'administration de Quer n'influencent pas la viabilité cellulaire, ce qui indique une faible cytotoxicité [321].

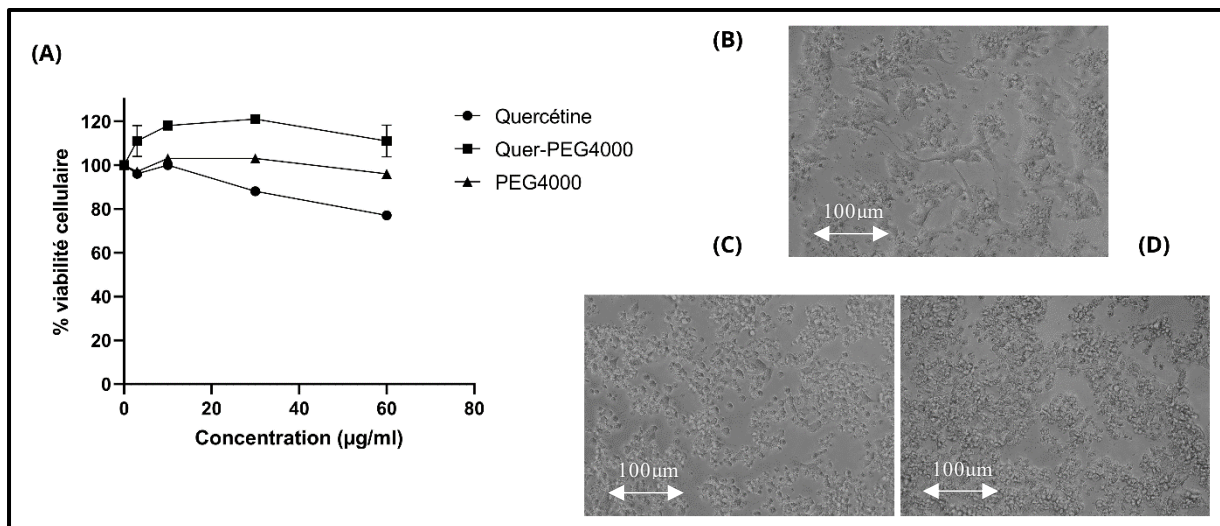


Figure 25 : (A) : Cytotoxicité de la Quer, PEG4000, Quer-PEG4000 sur les NIT-1 ; (B) image microscope inversé témoin- après 72h d’incubation ; (C) Image microscope inversé des NIT traité avec 60µg/ml de Quer ; (D) Image microscope inversé des NIT traitées avec 60µg/ml de Quer-PEG4000.

Concernant la Cur libre, elle a montré un effet cytotoxique significatif à 3 µg/ml, réduisant la viabilité à 71 %, mais cet effet semble diminuer à mesure que la concentration augmente, atteignant 83 % à 60 µg/ml (**Figure 26**). La Cur exerce donc une pression cytotoxique sur les cellules β à faible concentration, mais cette toxicité diminue à des concentrations plus élevées, ce qui pourrait indiquer une réponse adaptative des cellules β. En revanche, les microcristaux Cur-PEG4000 ont amélioré la viabilité cellulaire, avec des résultats allant de 79 % à 3 µg/ml à 87 % à 60 µg/ml. Cela suggère que l'enrobage de la Cur dans PEG4000 protège les cellules β de la toxicité de la Cur, mais n’induit pas la stimulation de la prolifération. Dans une étude récente, il a été rapporté que la Cur encapsulée dans l’alginate n’a pas affecté la viabilité cellulaire des cellules β [322].

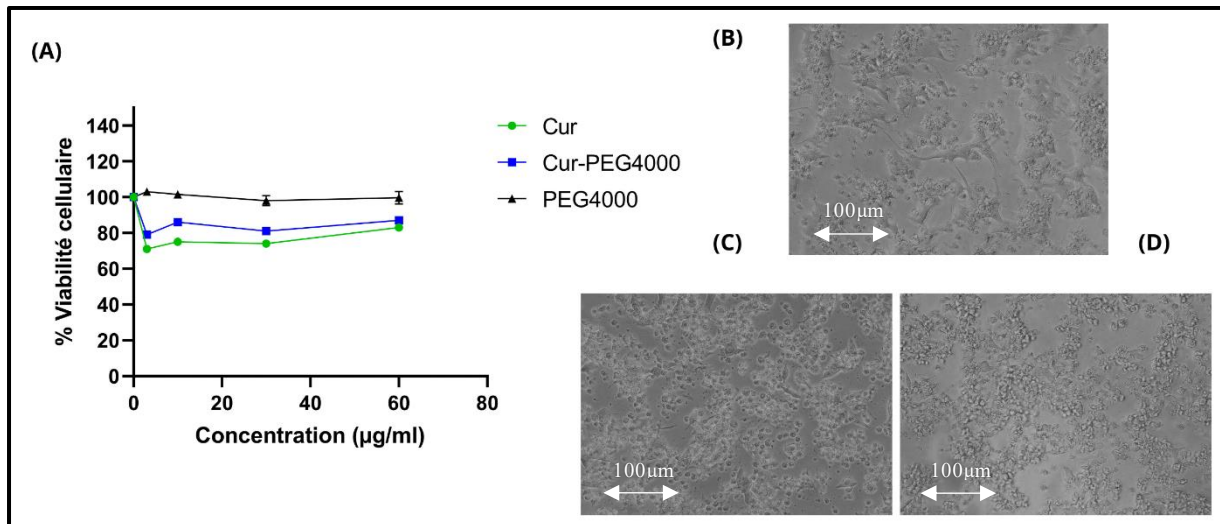


Figure 26 : (A) Cytotoxicité de la Cur, PEG4000, Cur-PEG4000 sur les NIT-1 ; (B) image microscope inversé témoin- après 72h d'incubation ; (C) Image microscope inversé des NIT traité avec 60µg/mL de Cur ; (D) Image microscope inversé des NIT traitées avec 60µg/mL de Cur-PEG4000

2 Effet des molécules libres et leurs complexes sur la viabilité et la sécrétion d'insuline des îlots de Langerhans.

2.1. Effet cytotoxique de la TQ sur les îlots de Langerhans

Les résultats (**Figure 27**) montrent les effets cytotoxiques de la TQ libre et encapsulée TQ-PEG4000-NP sur la viabilité des cellules des îlots pancréatiques, exprimée en nombre de cellules viables ($\times 10^4$ cellules/mL). Une exposition à 30 µg/mL de TQ libre a entraîné une perte d'environ 40 % de la viabilité des cellules des îlots. En revanche, les îlots traités avec les nanoparticules TQ-PEG4000-NP à la même concentration ont maintenu une viabilité stable et ont même montré une légère amélioration par rapport au contrôle négatif où les cellules β n'ont reçu aucun traitement.

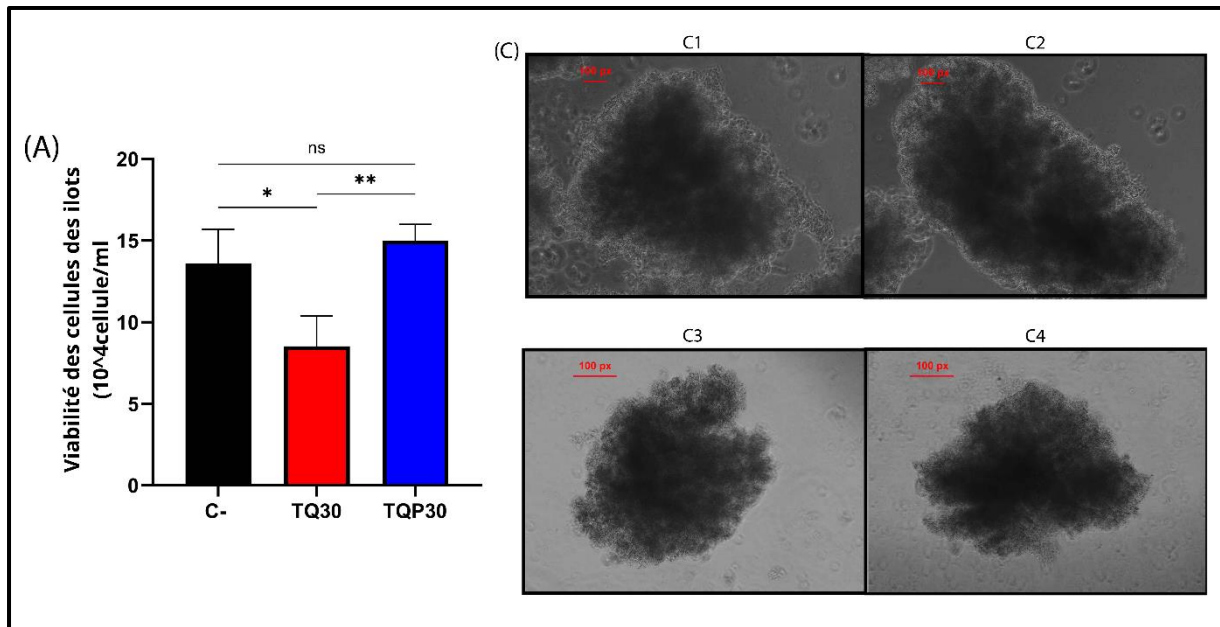


Figure 27 : (A) Viabilité des cellules des îlots traitées avec TQ (30 µg/mL) et TQ-PEG4000-NP (30 µg/mL); (C1) Îlot traité avec TQ-PEG4000-NP (30 µg/mL) après 24 heures ; (C2) Îlot traité avec TQ-PEG4000-NP (30 µg/mL) après 48 heures; (C3) Îlot traité avec TQ (30 µg/mL) après 24 heures. C4) Îlot traité avec TQ (30 µg/mL) après 48 heures. Pour chaque ensemble (n = 3), les données sont exprimées en moyenne ± SEM. Ns : non significatif, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, significatif par rapport au contrôle (test ANOVA unidirectionnel suivi du test post hoc de Tukey). Les îlots ont été observés à un grossissement de 10x

2.2. Sécrétion d'insuline des îlots de Langerhans

Les résultats des essais de sécrétion d'insuline, illustrés dans les **Figure 28**, **Figure 29** et **Figure 30**, permettent d'évaluer l'effet de différentes molécules et formulations sur les îlots pancréatiques. La **Figure 28** montre qu'il n'y a aucune différence significative entre le groupe contrôle et celui traité avec le polymère PEG4000, indiquant que ce dernier n'a pas d'effet sur la stimulation de l'insuline. En revanche, les cellules traitées avec TQ libre ou les nanoparticules TQ-PEG4000-NP présentent une augmentation hautement significative de la sécrétion d'insuline, mettant en évidence un effet stimulant notable de la molécule. Fait intéressant, bien que la quantité réelle de TQ encapsulée dans les nanoparticules soit de 5,1 µg/mL, aucune différence significative n'a été observée entre les deux formulations, suggérant que l'encapsulation a amélioré la solubilité de la TQ.

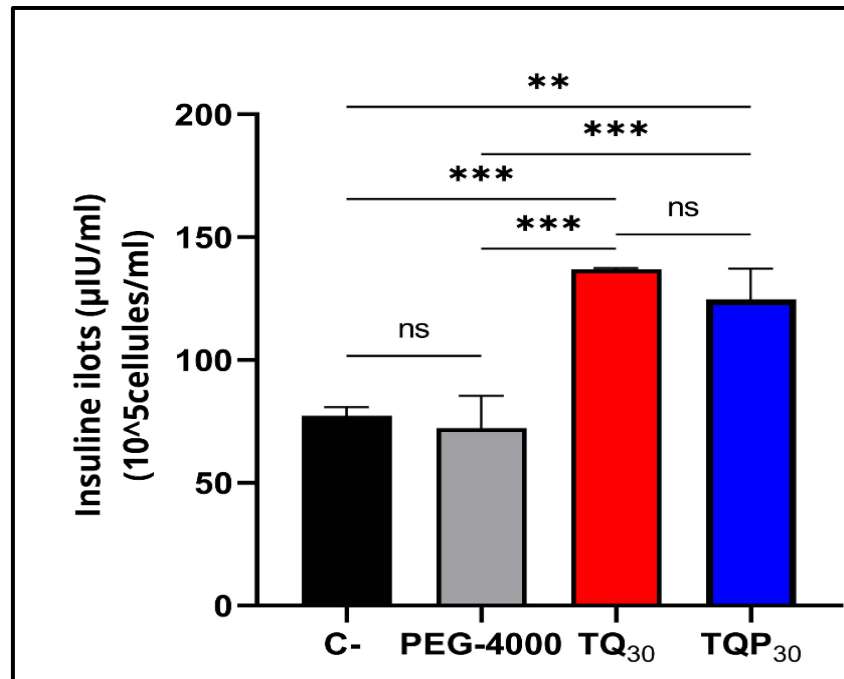


Figure 28 : Insuline sécrétée par les îlots traités avec le PEG4000, la TQ (30 µg/mL) et la TQ-PEG4000-NP (30 µg/mL). Pour chaque test (n = 3), les données sont exprimées en moyenne ± SEM. Ns : non significatif, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, significatif par rapport au contrôle (test ANOVA unidirectionnel suivi du test post hoc de Tukey).

Les données de la **Figure 29** confirment l'absence d'effet du PEG4000 seul, car aucune différence significative n'est observée entre les groupes contrôle (C⁻) et PEG4000. Cependant, une augmentation notable de la sécrétion d'insuline est détectée dans les groupes traités avec la Quer et les microcristaux Quer-PEG4000. Bien que la quantité de Quer encapsulée dans QuerP60 soit inférieure à celle de la Quer libre dans Quer60, les deux groupes montrent des résultats similaires en termes de stimulation de l'insuline. Cela suggère que l'encapsulation a significativement amélioré les propriétés physico-chimiques de la Quer, notamment sa solubilité et sa biodisponibilité, permettant à la formulation encapsulée de produire un effet comparable à celui de la molécule libre.

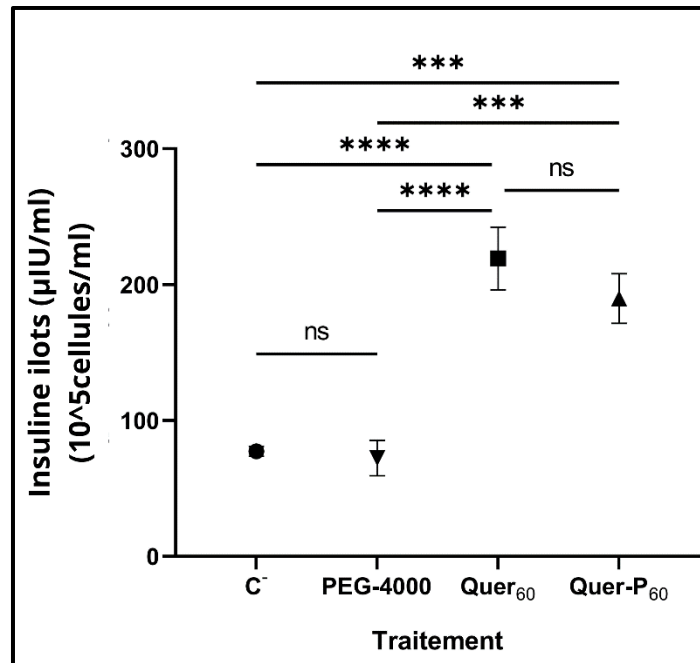


Figure 29 : Insuline sécrétée par les îlots traités avec le PEG4000, la Quer (60 µg/mL) et la Quer-PEG4000 (60 µg/mL) Pour chaque test (n = 3), les données sont exprimées en moyenne ± SEM. Ns : non significatif, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, significatif par rapport au contrôle (test ANOVA unidirectionnel suivi du test post hoc de Tukey).

En revanche, la **Figure 30** met en lumière un comportement distinct pour la Cur. Une diminution hautement significative de la sécrétion d'insuline est observée dans les groupes traités avec la Cur libre et son complexe encapsulé Cur-PEG4000 à 60µg/mL, par rapport au groupe contrôle et au PEG4000 seul. Cette diminution est similaire dans les deux groupes contenant de la Cur, bien que la quantité de Cur encapsulée dans Cur-PEG4000 à 60 µg/mL soit significativement inférieure à celle de la Cur libre. Ces résultats indiquent que, contrairement à la TQ et à la Quer, la Cur, qu'elle soit libre ou encapsulée, réduit significativement la sécrétion d'insuline et que l'encapsulation avec PEG4000 n'induit ni effet synergique ni bénéfice supplémentaire dans ce contexte.

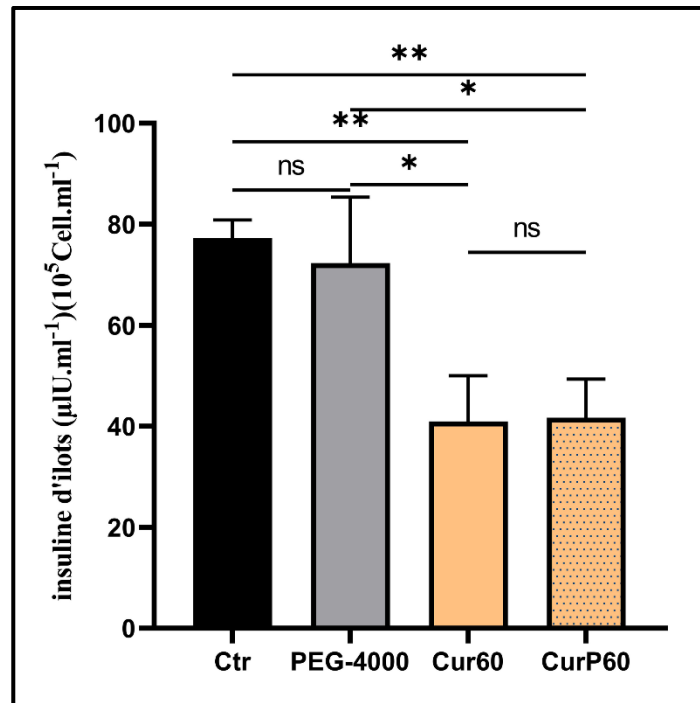


Figure 30 : Insuline sécrétée par les îlots traités avec le PEG4000, la Cur (60 µg/mL) et la Cur-PEG4000 (60 µg/mL) Pour chaque test (n = 3), les données sont exprimées en moyenne ± SEM. Ns : non significatif, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, significatif par rapport au contrôle (test ANOVA unidirectionnel suivi du test post hoc de Tukey).

3 Effet protecteur des molécules sur les NIT-1 endommagées par la STZ

3.1. Viabilité des cellules NIT-1

Dans la présente étude, les cellules β NIT-1 ont été incubées avec de la STZ (6 mM) et la viabilité cellulaire a été mesurée à deux concentrations, 10 µg/mL et 30 µg/mL (**Figure 31**), en utilisant de la TQ libre, du PEG4000 et des nanoparticules TQ-PEG4000-NP. Les résultats ont révélé qu'une exposition à la STZ (6 mM) entraînait environ 55 % de mortalité cellulaire dans les cellules β NIT-1 non traitées. De manière intéressante, les cellules traitées avec 10 µg/mL de TQ, puis exposées à 6 mM de STZ, ont montré une protection contre la cytotoxicité, avec seulement environ 15 % de mortalité cellulaire observée. De même, les cellules traitées avec des nanoparticules TQ-PEG4000-NP à 10 µg/mL ont présenté un taux de mortalité cellulaire de 16,5 % en présence de STZ.

À une concentration de 30 µg/mL, une légère amélioration des effets protecteurs de la TQ libre et des nanoparticules TQ-PEG4000-NP a été notée. Plus précisément, la STZ a causé seulement 13 % de mortalité cellulaire chez les cellules traitées avec la TQ libre et 15 % chez celles traitées avec les nanoparticules TQ-PEG4000-NP. Ces résultats suggèrent un effet protecteur partiel de la TQ et indiquent que l'encapsulation améliore davantage cette protection.

D'autres études ont mentionnés l'effet protecteur de plusieurs molécules sur l'effet de la STZ sur les cellules bêta comme la berbérine [323], la mélatonine [324] et la caféine [325].

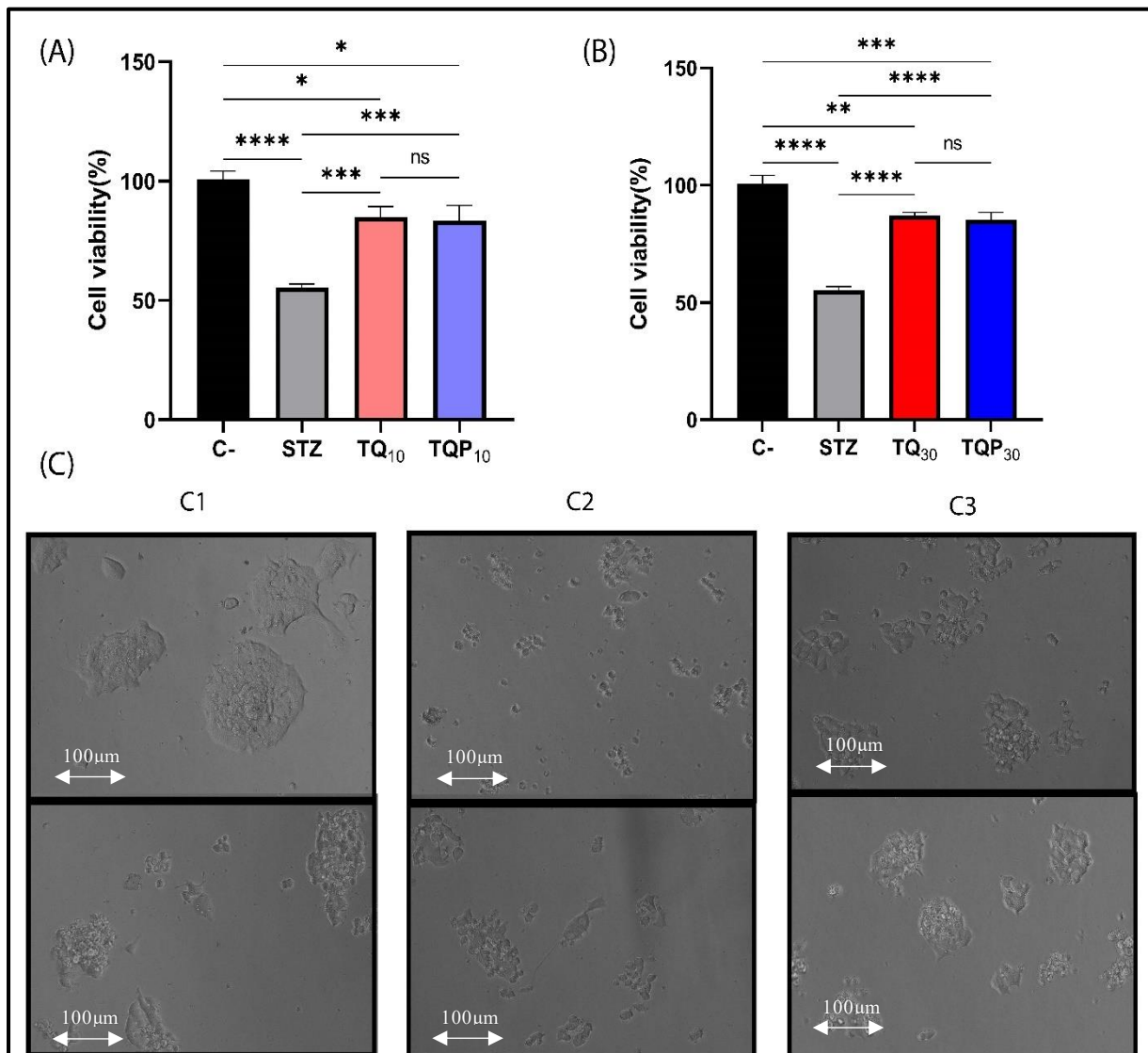


Figure 31 : Effet protecteur de la TQ et des nanoparticules TQ-PEG4000-NP sur les cellules NIT-1 endommagées par la STZ. (A) Viabilité cellulaire des cellules NIT-1 après un traitement avec 10 µg/mL de TQ et TQ-PEG4000-NP + 6 mM de STZ ; (B) Viabilité cellulaire des cellules NIT-1 après un traitement avec 30 µg/mL de TQ et TQ-PEG4000-NP + 6 mM de STZ. La STZ à 6 mM a été utilisé comme contrôle positif dans les deux expériences. (C) Observation microscopique (Nikon, Eclipse Ts2) des cellules NIT-1: (C1) Cellules NIT-1 non traitées après 72 heures de culture (contrôle négatif) ; (C2) Cellules NIT-1 après 24 heures de traitement avec la STZ (contrôle positif) ; (C3) Cellules NIT-1 traitées avec 10 µg/mL de TQ + 6 mM de STZ ; (C4) Cellules NIT-1 traitées avec 10 µg/mL de TQ-PEG4000-NP + 6 mM de STZ ; (C5) Cellules NIT-1 traitées avec 30 µg/mL de TQ + 6 mM de STZ ; (C6) Cellules NIT-1 traitées avec 30 µg/mL de TQ-PEG4000-NP + 6 mM de STZ. Pour chaque ensemble (n = 3), les données sont exprimées sous forme de moyenne ± SEM. Ns : non significatif; *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001, significatif par rapport au contrôle (test ANOVA à un facteur suivi du test post hoc de Tukey). Les cellules ont été observées à un grossissement de 20x.

Les résultats obtenus (**Figure 32**) ont fourni des données quantitatives détaillées sur l'effet protecteur induit par les microcristaux Quer-PEG4000 dans les conditions expérimentales spécifiques de cette étude. Ces constatations mettent en évidence le potentiel protecteur de ces microcristaux dans le contexte de la lignée cellulaire NIT-1 soumise au stress de la STZ. Les résultats montrent que les cellules non traitées ont une viabilité de 100%, tandis que celles traitées avec la STZ ont une viabilité d'environ 55%. Cependant, l'ajout de Quer à 30 μ g/mL avant le traitement à la STZ a augmenté la viabilité à 80%. De plus, l'encapsulation de la Quer avec du PEG à 30 μ g/mL a entraîné une viabilité de 92%. À une concentration de Quer de 60 μ g/mL, la viabilité est à 79%, mais avec encapsulation avec du PEG, elle est montée à 97%. Ces résultats suggèrent que la Quer, en particulier lorsqu'elle est encapsulée avec du PEG, offre une protection significative contre les effets néfastes de la STZ sur la viabilité cellulaire. Dans une étude antérieure il a été constaté que la Quer présente des effets protecteurs contre le stress oxydatif et les dommages aux cellules β du pancréas dans des modèles expérimentaux de diabète, en particulier dans le diabète induit par la STZ chez le rat [326].

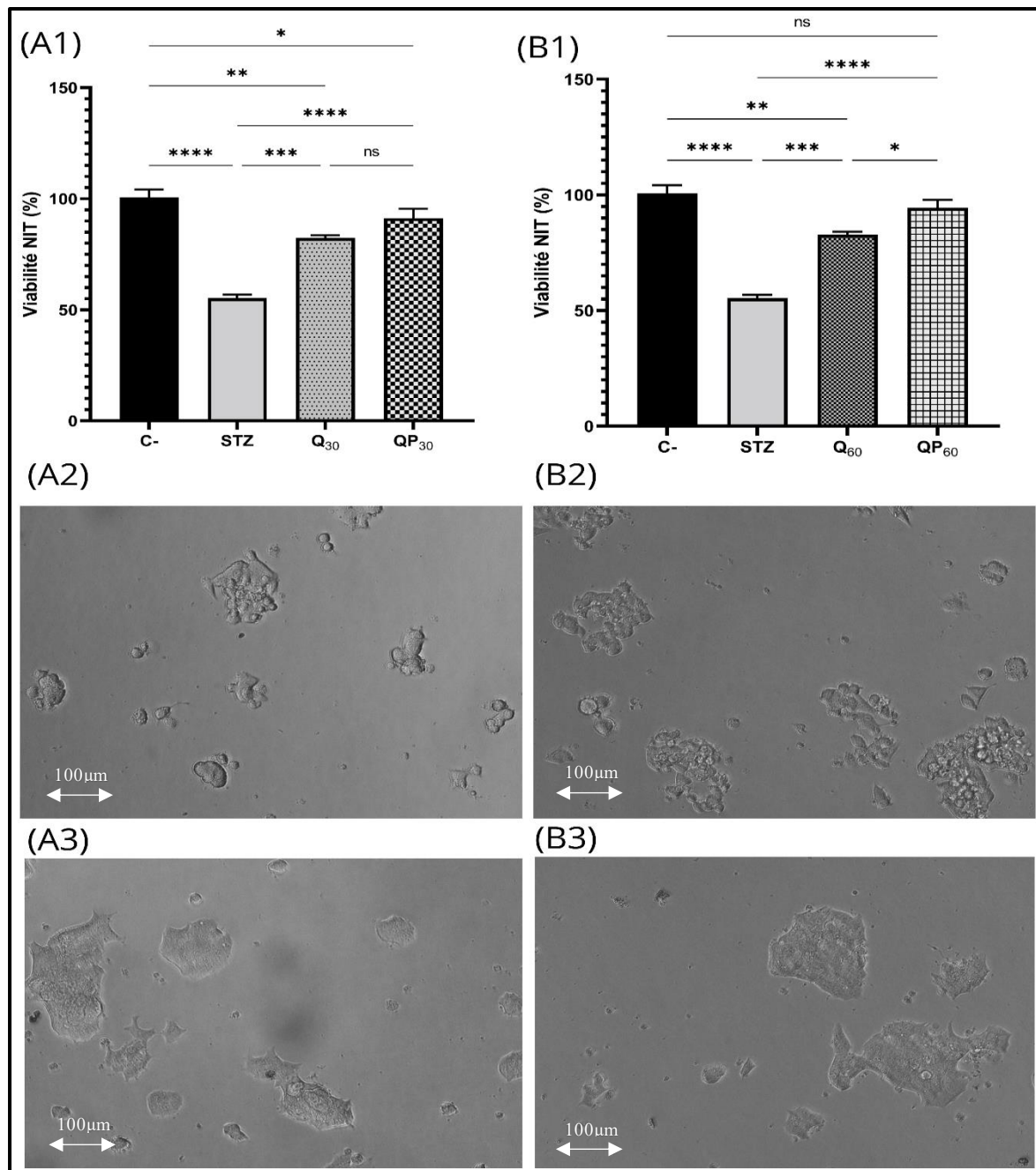


Figure 32 : Effet protecteur de la Quer et des microcristaux Que-PEG4000 sur les cellules NIT-1 endommagées par la STZ. (A1) Viabilité cellulaire des cellules NIT-1 après un traitement avec 30 µg/mL de Quer et de Quer-PEG4000 ainsi que 6 mM de STZ ; (B1) Viabilité cellulaire des cellules NIT-1 après un traitement avec 30 µg/mL de Quer et de Quer-PEG4000 ainsi que 6 mM de STZ. La STZ 6 mM a été utilisé comme contrôle positif dans les deux expériences ; (A2) Observation microscopique (Nikon, Eclipse Ts2) des cellules NIT-1 traitées avec Quer à 30µg/mL ; (A3) cellules NIT-1 traitées avec Quer-PEG4000 à 30µg/mL ; (B2) cellules NIT-1 traitées avec Quer à 60µg/mL ; (B3) cellules NIT-1 traitées avec Quer-PEG4000 à 60µg/mL. Pour chaque test (n = 3), les données sont exprimées sous forme de moyenne ± SEM. Ns : non significatif ; *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001, significatif par rapport au contrôle (test ANOVA à un facteur suivi du test post hoc de Tukey). Les cellules ont été observées à un grossissement de 20x.

Les résultats de la **Figure 33** montrent que la STZ induit une réduction significative de la viabilité cellulaire des cellules β , avec une moyenne de 55 % de viabilité, ce qui confirme son effet cytotoxique par rapport au contrôle négatif (C-). La Cur pure à 30 $\mu\text{g/mL}$ présente un effet protecteur modéré avec une moyenne de viabilité de 69,5 %, soit une amélioration par rapport au test de la STZ. L'augmentation de la concentration de Cur à 60 $\mu\text{g/mL}$ améliore encore cette protection avec une moyenne de 73,3 %. En revanche, les formulations Cur-PEG4000 montrent une protection plus marquée. Cur-PEG4000 à 30 $\mu\text{g/mL}$ atteint une moyenne de 91,5 %, indiquant que l'encapsulation dans améliore l'efficacité de la Cur. Les microcristaux Cur-PEG4000 à 60 $\mu\text{g/mL}$ présentent également de bons résultats, avec une moyenne de 86,5 %, mais légèrement inférieure à celle de CurP30. Ces résultats suggèrent que les formulations Cur-PEG sont plus efficace pour protéger les cellules β contre les effets de la STZ que la Cur pure, probablement en raison d'une meilleure solubilité de la Cur lorsqu'elle est associée au PEG. Dans une étude récente La Cur a démontré un effet protecteur sur les cellules β du pancréas chez des rats traités par la STZ en réduisant le stress oxydatif et l'apoptose cellulaire [327]. Une autre étude a confirmé les effets protecteurs de la nano-Cur (nCUR) contre les dommages induits par la STZ dans les cellules β pancréatiques [328].

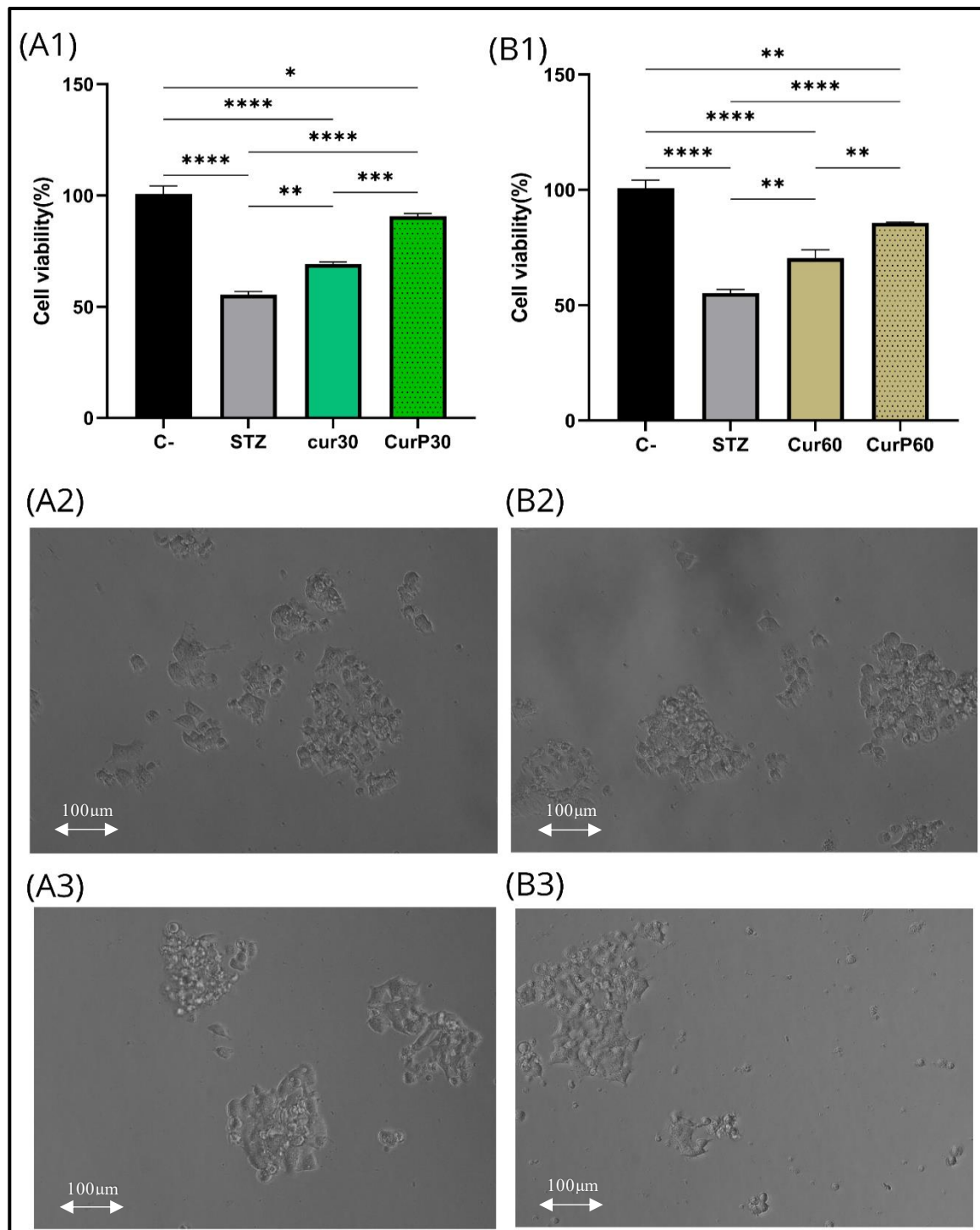


Figure 33 : Effet protecteur de la Cur et les microcristaux Cur-PEG4000 sur les cellules NIT-1 endommagées par la STZ. (A1) Viabilité cellulaire des cellules NIT-1 après un traitement avec 30 µg/mL de Cur et CurP plus 6 mM de STZ ; (B1) Viabilité cellulaire des cellules NIT-1 après un traitement avec 60 µg/mL de Cur et CurP plus 6 mM de STZ, Dans les deux expérience, STZ 6 mM a été utilisé comme contrôle positif. (A2) Observation microscopique (Nikon, Eclipse Ts2) des cellules NIT-1 traitées avec Cur à 30µg/mL. (A3) Cur-PEG4000 à 30µg/mL ; (B2) Cur à 60µg/mL ; (B3) Cur-PEG4000 à 60µg/mL. Pour chaque ensemble (n = 3), les données sont exprimées sous forme de moyenne ± SEM. Ns : non significatif; *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001, significatif par rapport au contrôle (test ANOVA à un facteur suivi du test post hoc de Tukey). Les cellules ont été observées à un grossissement de 20x.

3.2. Effet antioxydant des molécules libres et leurs complexes sur les cellules NIT-1

L'étude des marqueurs du stress oxydant révèle que la TQ libre augmente significativement les niveaux de SOD et de GSH (**Figure 34 et 35**, respectivement), deux enzymes antioxydantes clés. Par contre, les niveaux de MDA, un indicateur de la peroxydation lipidique, ont été réduits par la TQ encapsulé (TQP) (**Figure 36**). Cependant, cette amélioration est accompagnée d'une toxicité dose-dépendante observée dans les cellules non stressées.

En revanche, l'encapsulation TQ-PEG4000-NP offre une meilleure régulation des effets antioxydants : bien que l'encapsulation n'ait eu aucun effet sur les niveaux de SOD et GSH, elle réduit plus efficacement les niveaux de MDA, soulignant une protection accrue contre les dommages lipidiques. Ces effets antioxydants sont directement corrélés à l'amélioration de la viabilité cellulaire et à la restauration de la fonction des cellules exposées à la STZ. Ainsi, l'encapsulation de la TQ permet non seulement de limiter la toxicité observée avec la forme libre, mais aussi d'optimiser son effet protecteur via une modulation stable et prolongée du stress oxydant.

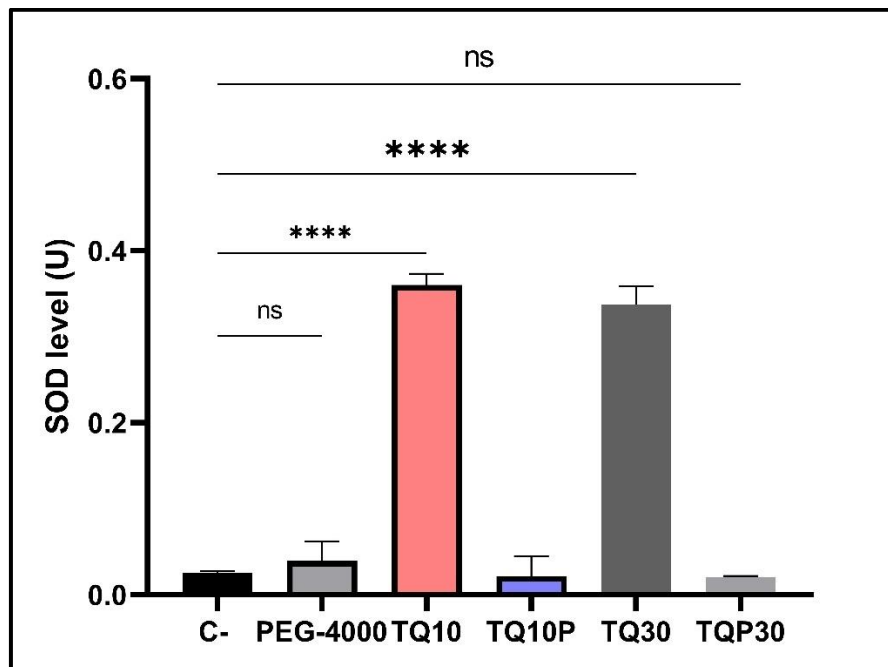


Figure 34 : Effet de la TQ et TQ-PEG4000-NP sur la SOD à 30 et 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Pour chaque test ($n = 3$), les données sont exprimées sous forme de moyenne \pm SEM. Ns : non significatif; * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$, significatif par rapport au contrôle (test ANOVA à un facteur suivi du test post hoc de Tukey).

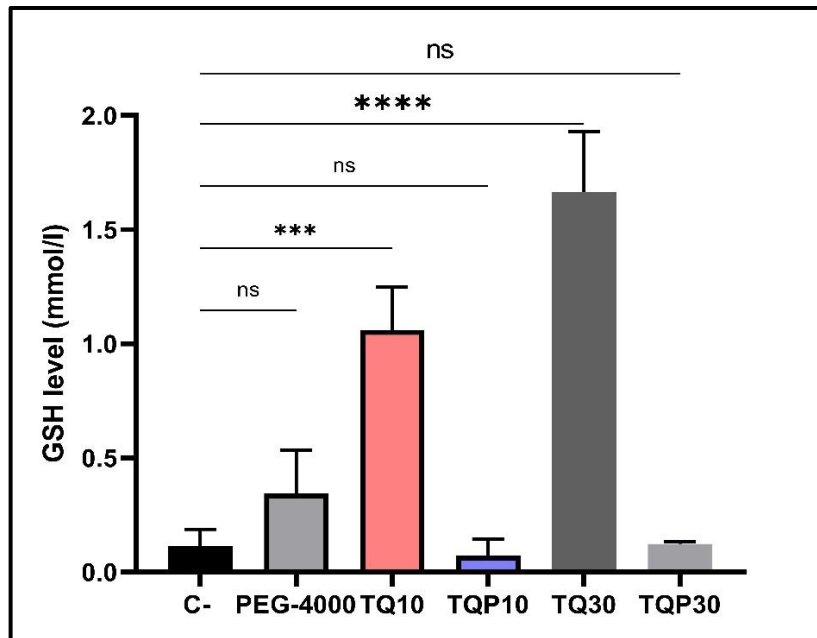


Figure 35 : Effet de la TQ et TQ-PEG4000-NP sur la GSH à 30 et 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Pour chaque test ($n = 3$), les données sont exprimées sous forme de moyenne \pm SEM. Ns : non significatif; * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$, significatif par rapport au contrôle (test ANOVA à un facteur suivi du test post hoc de Tukey).

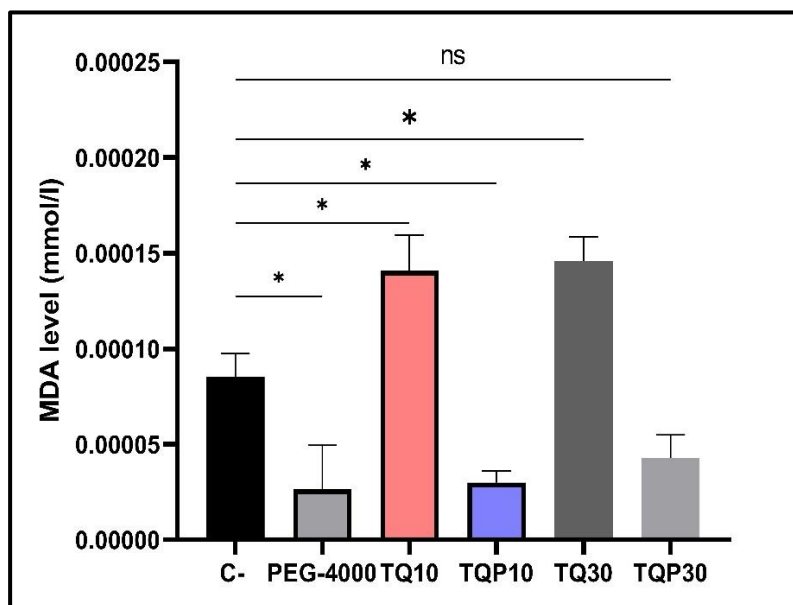


Figure 36 : Effet de la TQ et TQ-PEG4000-NP sur la MDA à 30 et 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Pour chaque test ($n = 3$), les données sont exprimées sous forme de moyenne \pm SEM. Ns : non significatif; * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$, significatif par rapport au contrôle (test ANOVA à un facteur suivi du test post hoc de Tukey).

Les résultats des analyses du stress oxydant montrent que la Quer-PEG4000 offre une protection antioxydante significativement supérieure par rapport à la Quer libre. Cette supériorité est mise en évidence par une augmentation marquée de l'activité de la SOD (**Figure**

37), particulièrement à la concentration de 60 $\mu\text{g/mL}$, indiquant une capacité accrue à neutraliser les radicaux superoxydes. Parallèlement, la réduction des niveaux de MDA (**Figure 39**), un biomarqueur des dommages oxydatifs, confirme l'efficacité de QuerP dans la prévention de la peroxydation lipidique. Absence d'effet de la Quer et Quer-PEG4000 sur les niveaux du GSH (**Figure 38**). Ces observations sont cohérentes avec les données de cytotoxicité qui indiquent que la Quer encapsulée est moins toxique et préserve mieux la viabilité cellulaire et avec les effets protecteurs contre la STZ, où Quer-PEG4000 démontre une meilleure protection des cellules β . L'encapsulation améliore donc la biodisponibilité et l'efficacité antioxydante de la Quer, ce qui pourrait s'expliquer par une libération contrôlée et une meilleure interaction avec les systèmes cellulaires. Ces résultats confirment que la Quer encapsulée est une approche prometteuse pour limiter les effets délétères du stress oxydant, en particulier dans les conditions impliquant des agents oxydatifs tels que la STZ

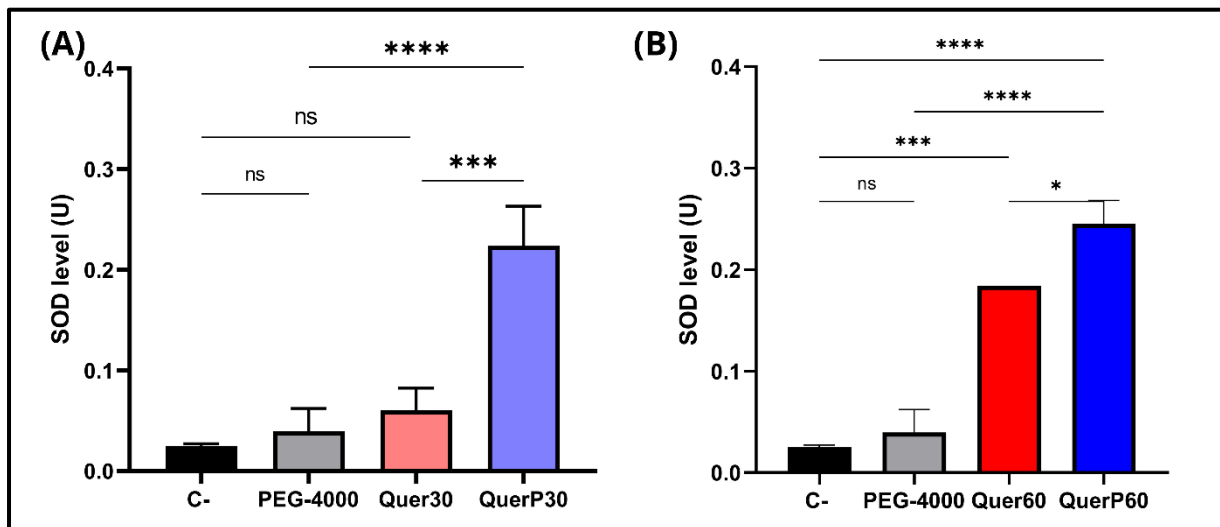


Figure 37 :(A) Effet de la Quer et Quer-PEG4000 sur la SOD à 30 $\mu\text{g/mL}$; (B) Effet de la Quer et Quer-PEG4000 sur la SOD à 60 $\mu\text{g/mL}$. Pour chaque test ($n = 3$), les données sont exprimées sous forme de moyenne \pm SEM. Ns : non significatif ; * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$, significatif par rapport au contrôle (test ANOVA à un facteur suivi du test post hoc de Tukey).

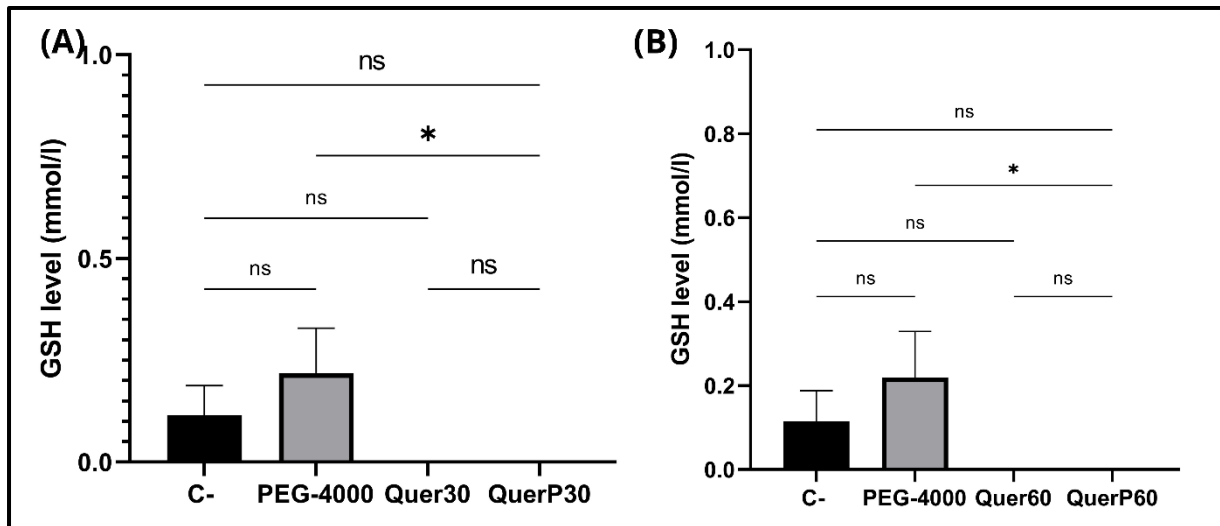


Figure 38 : (A) Effet de la Quer et Quer-PEG4000 sur la GSH à 30 µg/mL ; (B) Effet de la Quer et Quer-PEG4000 sur la GSH à 60 µg/mL. Pour chaque test (n = 3), les données sont exprimées sous forme de moyenne ± SEM. Ns : non significatif ; *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001, significatif par rapport au contrôle (test ANOVA à un facteur suivi du test post hoc de Tukey).

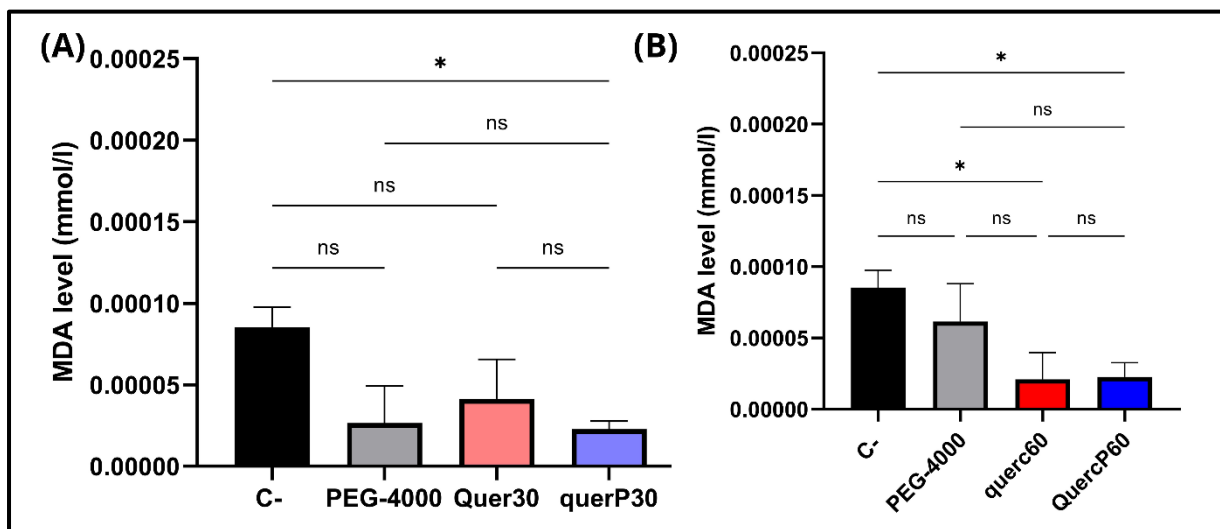


Figure 39 : (A) Effet de la Quer et Quer-PEG4000 sur la MDA à 30 µg/mL ; (B) Effet de la Quer et Quer-PEG4000 sur la MDA à 60 µg/mL. Pour chaque test (n = 3), les données sont exprimées sous forme de moyenne ± SEM. Ns : non significatif ; *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001, significatif par rapport au contrôle (test ANOVA à un facteur suivi du test post hoc de Tukey).

Les résultats obtenus montrent que la Cur, sous ses formes libre et encapsulée, agit efficacement contre le stress oxydant, avec des variations notables entre les deux formulations. La diminution significative des niveaux de MDA (**Figure 42**) dans les groupes traités avec la Cur libre ou encapsulé indique une réduction des dommages oxydatifs. Par ailleurs, l'augmentation de l'activité de la SOD (**Figure 40**) avec la Cur libre (30 µg/mL et 60 µg/mL) traduit une activation des défenses antioxydantes enzymatiques, tandis que la Cur-PEG4000 montre un effet modéré mais cohérent aux deux concentrations, suggérant une libération

contrôlée et prolongée de la molécule active. Cependant, la consommation accrue de GSH (**Figure 41**), observée dans les deux formulations, indique une mobilisation intense des mécanismes antioxydants, particulièrement sous l'effet de la Cur libre. En lien avec la cytotoxicité et l'effet protecteur, la Cur encapsulée montre une viabilité cellulaire supérieure et une meilleure préservation de la morphologie cellulaire, ce qui reflète une diminution des dommages oxydatifs et un effet protecteur accru contre la STZ. L'encapsulation améliore donc la biodisponibilité et la tolérance cellulaire, faisant de Cur-PEG4000 une approche prometteuse pour atténuer le stress oxydant tout en minimisant la toxicité.

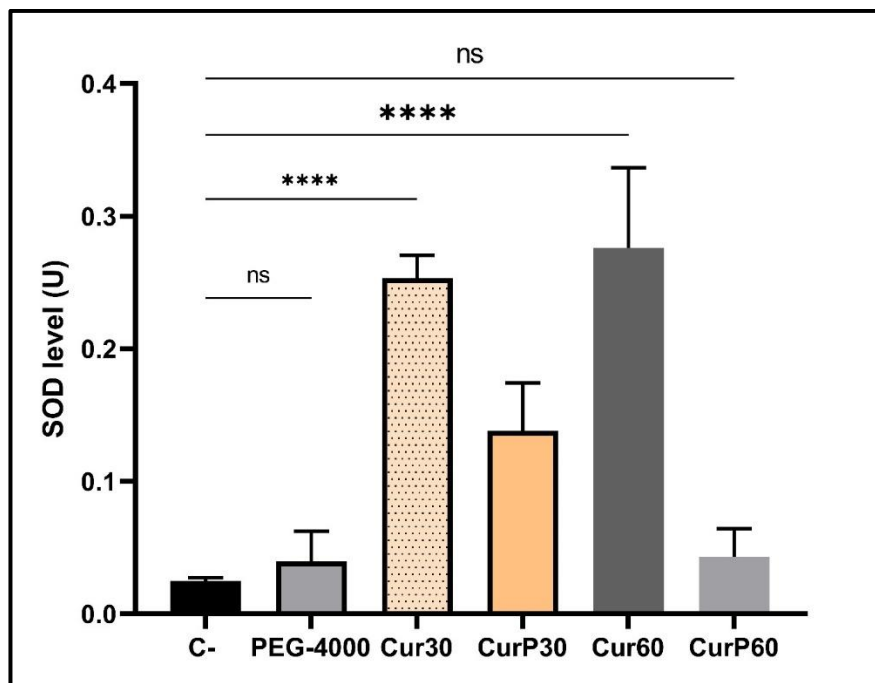


Figure 40 : Effet de la Cur et Cur-PEG4000 sur la SOD à 30 et 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Pour chaque test ($n = 3$), les données sont exprimées sous forme de moyenne \pm SEM. Ns : non significatif ; * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$, significatif par rapport au contrôle (test ANOVA à un facteur suivi du test post hoc de Tukey).

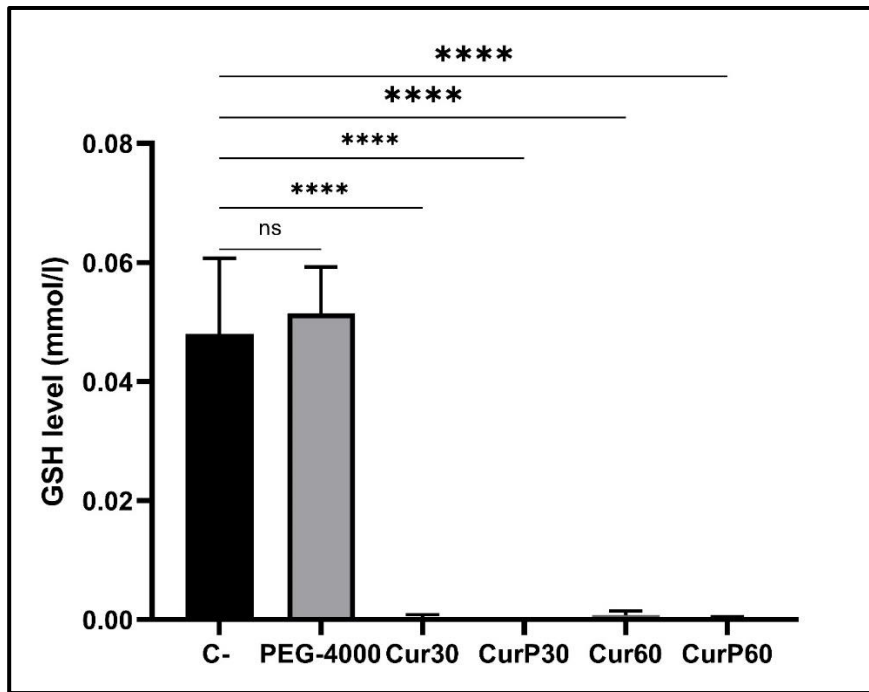


Figure 41 : Effet de la Cur et Cur-PEG4000 sur la GSH à 30 et 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Pour chaque test ($n = 3$), les données sont exprimées sous forme de moyenne \pm SEM. Ns : non significatif ; * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$, significatif par rapport au contrôle (test ANOVA à un facteur suivi du test post hoc de Tukey).

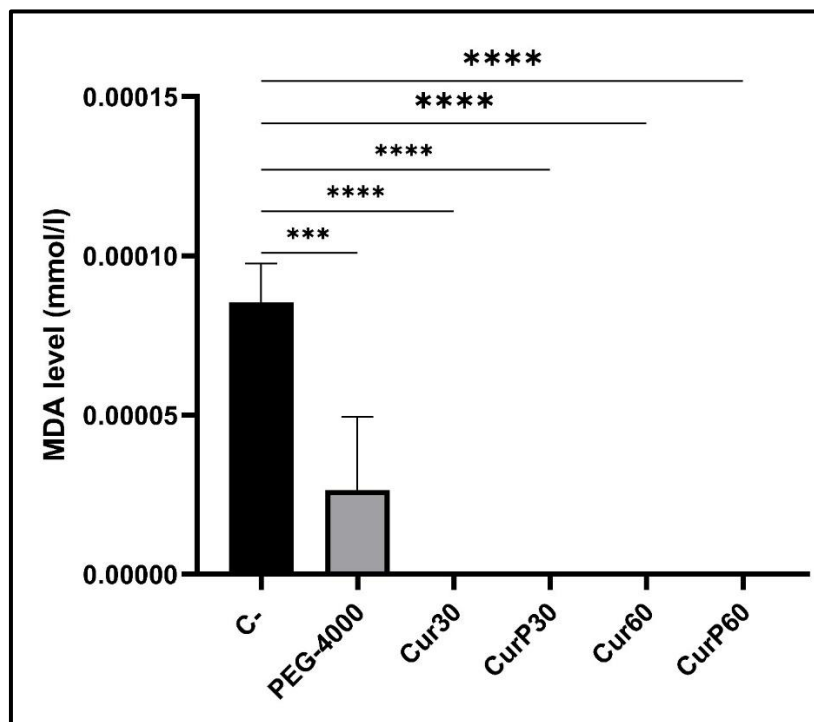


Figure 42 : Effet de la Cur et Cur-PEG4000 sur les MDA à 30 et 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Pour chaque test ($n = 3$), les données sont exprimées sous forme de moyenne \pm SEM. Ns : non significatif ; * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$, significatif par rapport au contrôle (test ANOVA à un facteur suivi du test post hoc de Tukey).

4 Effet régénérateur de la TQ sur les cellules β NIT-1 endommagées par la STZ

Pour étudier l'impact de la TQ et de la PEGylation sur la régénération des cellules NIT-1, un traitement avec le TQ et le TQ-PEG4000-NP à des concentrations de 10 et 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a été réalisé après leur destruction par la STZ. L'objectif de cette étude était d'évaluer la capacité de la TQ et de sa forme encapsulée TQ-PEG4000-NP à réparer les dommages induit par la STZ sur les cellules β , en se concentrant sur la viabilité cellulaire. Les résultats (**Figure 43, A**) montrent une amélioration de 8 à 10% de la viabilité à une concentration de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pour la TQ et ces nanoparticules TQ-PEG4000-NP, respectivement par rapport aux cellules traitées uniquement avec la STZ. Un effet plus marqué a été observé à 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$, avec une augmentation de 12 à 14 % de la régénération cellulaire. Les effets de la molécule libre et des formes encapsulées étaient presque identiques sur la morphologie des cellules (**Figure 43, B**).

Ce résultat est prometteur, étant donné que la capsule contient seulement 1/6 de la quantité de molécule par rapport à son état libre. Ainsi, la capsule TQ-PEG4000-NP a démontré une meilleure solubilité, entraînant un effet plus favorable sur les cellules β sans induire de cytotoxicité. Bien que cette étude ne porte pas spécifiquement sur les cellules β , une étude précédente a mis en évidence son potentiel à favoriser la guérison et la régénération des tissus parodontaux, grâce à ses propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes qui contribuent à limiter les lésions tissulaires [329]. La TQ a démontré dans une autre étude des effets régénératifs prometteurs sur la cicatrisation osseuse, en particulier dans le contexte de malformations osseuses expérimentales [330].

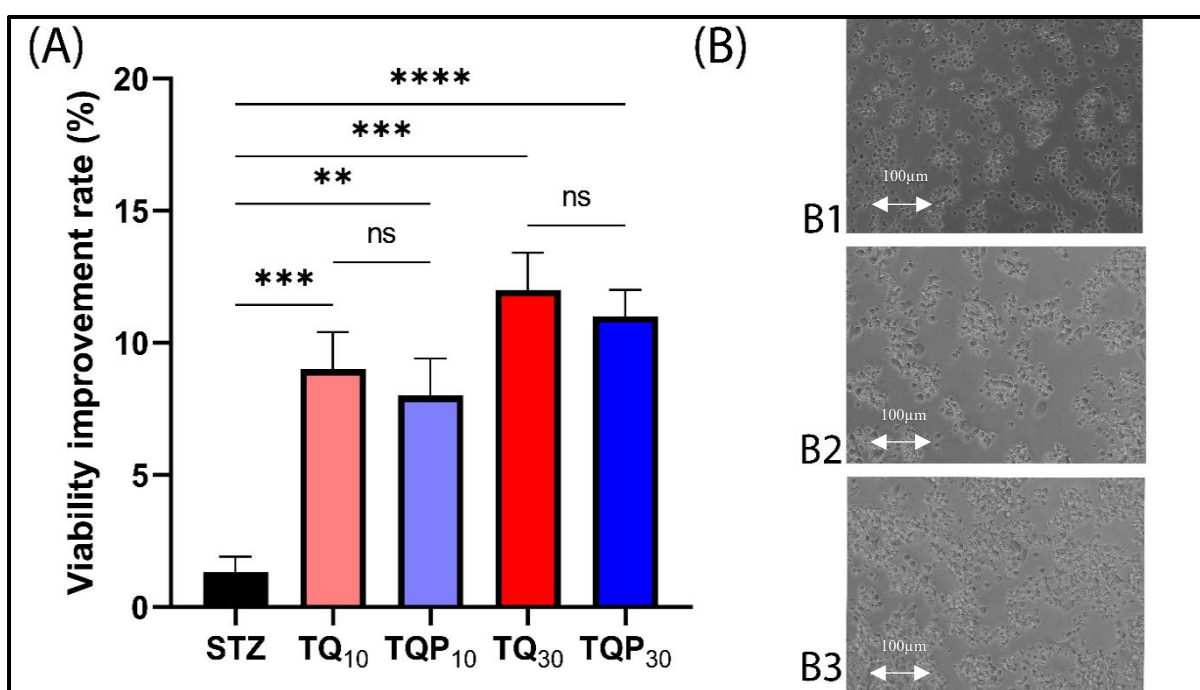


Figure 43 : Taux d'amélioration de la viabilité cellulaire NIT-1 (%). B) NIT-1 lors de l'évaluation de l'effet régénératif de la TQ au microscope (Nikon, Eclipse Ts2) : B1) NIT-1 traité uniquement avec STZ. B2) NIT-1 traité avec STZ + TQ-PEG 4000-NP à 10 µg/ml. B3) NIT-1 traité avec STZ + TQ-PEG 4000-NP à 30 µg/ml. Pour chaque test (n = 3), les données sont exprimées sous forme de moyenne ± SEM. Ns : non significatif ; *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001, significatif par rapport au contrôle (test ANOVA à un facteur suivi du test post hoc de Tukey).

5 Effet de la Quer sur la signalisation cellulaire des NIT-1

5.1 Détection et quantification du marqueur NFκB par ELISA

Les résultats de la détection du NFκB-P65 et NFκB-P65-P sont illustrés sur la **Figure 44**. Ils montrent que les niveaux de NFκB -P65 sont les plus élevés dans le témoin positif du kit (C+, 0,113 ± 0,007) confirmant une activation importante, tandis que les niveaux dans les cellules sans traitement (cells-, 0,077 ± 0,006) sont légèrement inférieurs. Le traitement par STZ maintient des niveaux similaires à ceux des cellules non traitées (STZ, 0,081 ± 0,005), tandis que la Quer semble légèrement réduire le NFκB total par rapport à cells- (Quer, 0,072 ± 0,006). Concernant le NFκB phosphorylé, le témoin positif (C+, 0,081 ± 0,003) montre des niveaux légèrement supérieurs à ceux des cellules sans traitement (cells-, 0,089 ± 0,008). Cependant, le traitement par STZ diminue significativement le NFκB phosphorylé (STZ, 0,060 ± 0,004), reflétant une inhibition de son activation. En revanche, la Quer n'a pas d'effet significatif sur le NFκB phosphorylé par rapport aux cellules non traitées (Quer, 0,090 ± 0,007).

Le traitement par la STZ seule réduit fortement l'activation de NFκB phosphorylé par rapport aux cellules non traitées, suggérant une inhibition significative de cette voie de survie. Ce résultat est cohérent avec le mode d'action de la STZ qui induit du stress oxydatif et des dommages cellulaires, rendant les cellules β plus vulnérables à l'apoptose [331].

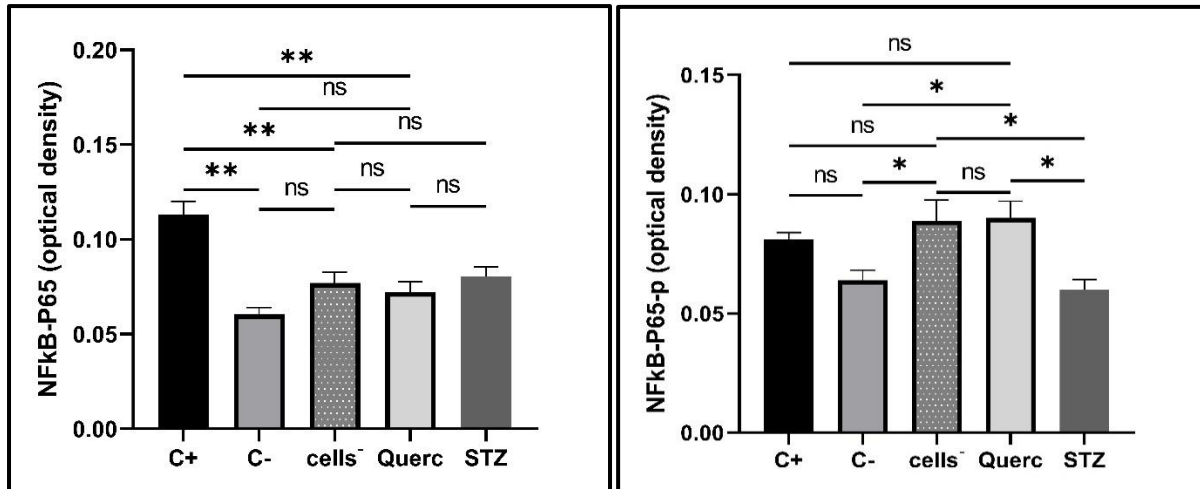


Figure 44 : Détection du marqueur du NFκB-P65 et NFκB-P65-P stimulé par la Quer à 60µg/mL. C+ : contrôle positif du kit, C- : milieu seul, Cells- : cellules sans traitement, Querc : cellules traitées avec 60µg/ml de Quercétine, STZ : Cellules traitées avec 6mM de STZ. Pour chaque test (n = 3), les données sont exprimées sous forme de moyenne ± SEM. Ns : non significatif ; *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001, significatif par rapport au contrôle (test ANOVA à un facteur suivi du test post hoc de Tukey).

5.2 Détection du marqueur SIRT2

5.2.1 Effet de la Quer sur l'activité relative de la SIRT2

Les résultats de la mesure l'activité d'inhibition de la SIRT2 par la Quer sont mentionnés sur la **Figure 45**. Les données montrent une inhibition dose-dépendante de l'activité de la SIRT2 par la Quer. *In vitro*, l'activité relative de la SIRT2 diminue à mesure que la concentration de Quer augmente, avec des valeurs de 78,24 % à 200 µM, 81,18 % à 100 µM, et 90,59 % à 50 µM, se rapprochant de 97,65 % à 25 µM et 100 % dans le contrôle. Cette réduction est marquée à des concentrations plus élevées (78 % à 200 µM), mais l'activité se rapproche de celle du contrôle à des concentrations plus faibles.

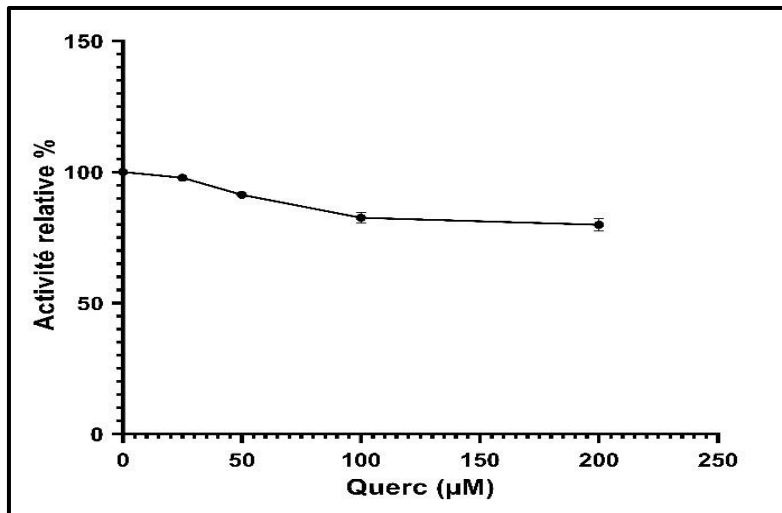


Figure 45 : Effet de la Querc sur l'activité relative de la SIRT2 in-vitro.

5.2.2 Détection de la SIRT2 inhibée par la Querc dans le lysat des NIT-1

Les résultats de la mesure de l'effet de la Querc sur l'activité relative de la SIRT 2 dans les cellules NIT-1 sont affichés sur la **Figure 46**. Ces résultats montrent une inhibition beaucoup plus prononcée, avec seulement 23,70 % à 36,42 % de l'activité normale après traitement des cellules, ce qui indique une inhibition significativement plus forte dans le contexte cellulaire par rapport aux observations *in vitro*.

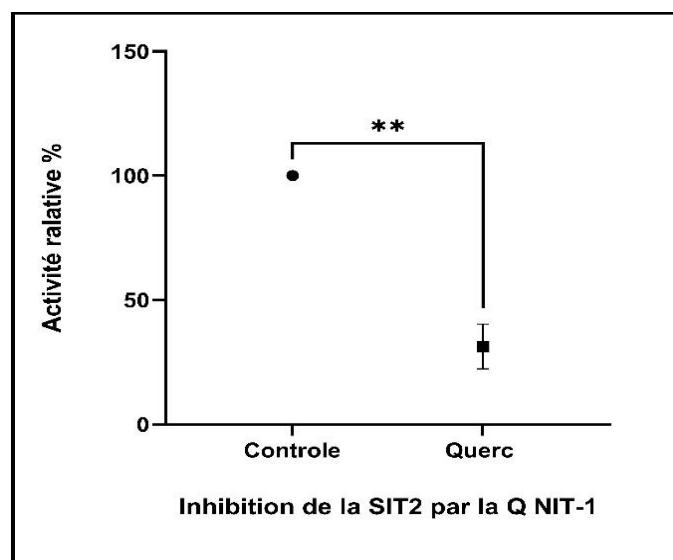


Figure 46 : Effet de la Querc sur l'activité relative la SIRT2 dans les cellules NIT-1, Contrôle : cellules sans traitement, Querc : les cellules traitées avec 60µg/ml de la Querc.

L'étude a évalué les effets de la Quer et de la STZ sur les voies inflammatoires et la survie des cellules β pancréatiques, en se concentrant sur l'activation de NF κ B et la régulation de la SIRT2. Les résultats montrent que, bien que la Quer à 60 μ g/mL n'ait pas réduit significativement la quantité totale de NF κ B ni sa forme phosphorylée, elle a diminué la concentration cytoplasmique de SIRT2, une protéine qui interagit avec NF κ B pour moduler son activité transcriptionnelle et la production de cytokines pro-inflammatoires telles que TNF- α et IL-1 β [332]. Cette réduction de la SIRT2 pourrait influencer la réponse inflammatoire, bien que d'autres mécanismes impliquant la SIRT1 et d'autres voies restent à explorer. Par ailleurs, la STZ a activé NF κ B conformément à son rôle dans l'induction de stress oxydatif et inflammatoire [333], tandis que la combinaison de Quer et STZ a atténué cette activation sans modifier significativement la phosphorylation de NF κ B, suggérant une modulation indirecte via des mécanismes liés à SIRT2. En termes de viabilité cellulaire, les cellules traitées avec la Quer ont conservé 78 % de viabilité, indiquant légère cytotoxicité), alors que la STZ a réduit cette viabilité à 50%, reflétant ses effets cytotoxiques. En résumé, bien que la Quer ne modifie pas directement la phosphorylation de NF κ B, elle semble atténuer les effets inflammatoires et cytotoxiques de la STZ en régulant la SIRT2, mettant en lumière une interaction complexe nécessitant des investigations supplémentaires pour mieux comprendre son rôle dans la signalisation cellulaire et l'inflammation [334, 335].

Conclusion et perspective

Conclusion et perspectives

Le DT1 est une maladie immunitaire chronique due à la destruction auto-immune des cellules β pancréatiques, entraînant une absence complète de production d'insuline. Cette affection pose des défis considérables en matière de traitement. Les thérapies actuelles comme l'insulinothérapie n'étant pas toujours suffisantes pour prévenir les complications associées. Dans ce contexte, cette thèse a exploré une approche innovante consistant à améliorer l'effet antidiabétique de molécules naturelles grâce à l'encapsulation sous forme de nanoparticules et de microcristaux en utilisant le PEG4000. Les recherches menées ont permis de mettre en lumière plusieurs résultats clés :

Efficacité de l'encapsulation : Les nanoparticules PEG4000 se sont révélées très efficaces pour encapsuler les composés naturels — la TQ, la Quer et Cur. Ces systèmes ont montré une capacité de libération prolongée et adaptée des principes actifs tout en améliorant leur solubilité et leur stabilité par rapport à leurs formes libres. Cela a permis une meilleure absorption et un potentiel thérapeutique accru.

Effets cytoprotecteurs : Les systèmes encapsulés ont significativement augmenté la viabilité des cellules β NIT-1 exposées à la STZ, un agent cytotoxique. Ils ont réduit les niveaux de stress oxydatif et d'apoptose, confirmant leur rôle protecteur. En particulier, la combinaison de ces composés avec le PEG4000 a permis de préserver la fonctionnalité cellulaire et d'optimiser la réponse à des agressions chimiques.

Amélioration de la fonctionnalité pancréatique : Les îlots de Langerhans traitées avec les complexes nanoparticulaires ont présenté une viabilité accrue et une amélioration notable de la sécrétion d'insuline. Ce résultat suggère que les systèmes encapsulés pourraient potentiellement contribuer à ralentir ou à inverser les dégâts induits par le DT1.

Modulation des voies de signalisation cellulaires : L'étude a révélé que la Quer encapsulée affecte positivement les voies impliquant NF- κ B et SIRT2, réduisant les réponses inflammatoires et apoptotiques. Ces mécanismes pourraient être étendus à d'autres modèles d'inflammation et de stress oxydatif.

Caractéristiques physico-chimiques optimales : L'utilisation de techniques d'analyse telles que le FTIR et la microscopie électronique à balayage (MEB) a permis de confirmer l'intégrité des systèmes encapsulés, leurs interactions avec le PEG4000 et leur morphologie adaptée pour une administration ciblée.

En somme, les travaux réalisés dans cette thèse démontrent l'intérêt de l'encapsulation des composés naturels dans des nanoparticules polymériques pour améliorer leurs effets biologiques et thérapeutiques. Ces systèmes offrent une voie prometteuse pour le traitement du DT1 en ciblant à la fois la protection des cellules β et l'amélioration de leur régénération. Toutefois, des recherches supplémentaires s'avèrent nécessaires pour valider ces résultats dans des modèles *in vivo* et cliniques :

- Explorer davantage l'impact des nanoparticules encapsulant d'autres composés bioactifs sur différents modèles expérimentaux de diabète.
- Mener des études *in vivo* pour évaluer la biodisponibilité, la pharmacocinétique et l'efficacité des systèmes encapsulés dans des organismes vivants.
- Développer des formulations optimisées pour une administration ciblée et un contrôle prolongé de la libération des principes actifs.
- Étudier l'impact potentiel des nanoparticules sur la réponse immunitaire pour minimiser les risques d'effets secondaires.
- Collaborer avec des équipes multidisciplinaires pour accélérer la transition vers des essais cliniques et valider l'application thérapeutique à plus grande échelle

Références bibliographiques

1. Darakhshan, S., A. Bidmeshki Pour, A. Hosseinzadeh Colagar, and S. Sisakhtnezhad, *Thymoquinone and its therapeutic potentials*. Pharmacological Research, 2015. **95-96**: p. 138-158.
2. Petersmann, A., D. Müller-Wieland, U.A. Müller, R. Landgraf, M. Nauck, G. Freckmann, L. Heinemann, and E. Schleicher, *Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus*. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2019. **127**(S 01): p. S1-S7.
3. Association, A.D., *2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2021*. Diabetes Care, 2020. **44**(Supplement_1): p. S15-S33.
4. IDF, D.f.f.
5. Committee, A.D.A.P.P., *2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2022*. Diabetes Care, 2021. **45**(Supplement_1): p. S17-S38.
6. Yuen, L., P. Saeedi, M. Riaz, S. Karuranga, H. Divakar, N. Levitt, X. Yang, and D. Simmons, *Projections of the prevalence of hyperglycaemia in pregnancy in 2019 and beyond: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition*. Diabetes Research and Clinical Practice, 2019. **157**.
7. Ahmad, A., A. Husain, M. Mujeeb, S.A. Khan, A.K. Najmi, N.A. Siddique, Z.A. Damanhour, and F. Anwar, *A review on therapeutic potential of Nigella sativa: A miracle herb*. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2013. **3**(5): p. 337-352.
8. Gali-Muhtasib, H., A. Roessner, and R. Schneider-Stock, *Thymoquinone: A promising anti-cancer drug from natural sources*. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2006. **38**(8): p. 1249-1253.
9. Woo, C.C., A.P. Kumar, G. Sethi, and K.H.B. Tan, *Thymoquinone: Potential cure for inflammatory disorders and cancer*. Biochemical Pharmacology, 2012. **83**(4): p. 443-451.
10. Umar, S., J. Zargan, K. Umar, S. Ahmad, C.K. Katiyar, and H.A. Khan, *Modulation of the oxidative stress and inflammatory cytokine response by thymoquinone in the collagen induced arthritis in Wistar rats*. Chemico-Biological Interactions, 2012. **197**(1): p. 40-46.
11. Pari, L. and C. Sankaranarayanan, *Beneficial effects of thymoquinone on hepatic key enzymes in streptozotocin–nicotinamide induced diabetic rats*. Life Sciences, 2009. **85**(23): p. 830-834.
12. Sobhi, W., N. Boutrid, A. Rezgui, H. Rahmoune, and Y. Benguerba, *Anti-hyperglycemic and hepato-protective effects of thymoquinone (Nigella sativa oil) in diabetes*. Metabolism - Clinical and Experimental, 2022. **128**.
13. Mansour, M.A., M.N. Nagi, A.S. El-Khatib, and A.M. Al-Bekairi, *Effects of thymoquinone on antioxidant enzyme activities, lipid peroxidation and DT-diaphorase in different tissues of mice: a possible mechanism of action*. 2002. **20**(2): p. 143-151.
14. Khither, H., W. Sobhi, A. Khenchouche, A. Mosbah, and M. Benboubetra, *In-vitro Antioxidant Effect of Thymoquinone*. Annual Research & Review in Biology, 2018. **25**(5): p. 1-9.
15. El-Mahmoudy, A., H. Matsuyama, M.A. Borgan, Y. Shimizu, M.G. El-Sayed, N. Minamoto, and T. Takewaki, *Thymoquinone suppresses expression of inducible nitric oxide synthase in rat macrophages*. International Immunopharmacology, 2002. **2**(11): p. 1603-1611.

16. Baqer, S.H., S.G. Al-Shawi, and Z.K. Al-Younis, *Quercetin, the Potential Powerful Flavonoid for Human and Food: A Review*. Front Biosci (Elite Ed), 2024. **16**(3): p. 30.
17. Carrillo-Martinez, E.J., F.Y. Flores-Hernández, A.M. Salazar-Montes, H.F. Nario-Chaidez, and L.D.J.M. Hernández-Ortega, *Quercetin, a flavonoid with great pharmacological capacity*. 2024. **29**(5): p. 1000.
18. Xu, J., Y. Li, X. Yang, H. Li, X. Xiao, J. You, H. Li, L. Zheng, C. Yi, and Z.J.S.R. Li, *Quercetin inhibited LPS-induced cytokine storm by interacting with the AKT1-FoxO1 and Keap1-Nrf2 signaling pathway in macrophages*. 2024. **14**(1): p. 20913.
19. Biyabani, A., A. Mazidimoradi, F. Ghorbani, L. Allahqoli, H.J.C. Salehiniya, E. Obstetrics, and Gynecology, *The Effect of Quercetin on the Prevention and Treatment of Gynecologic Cancer*. 2024. **51**(9): p. 205.
20. Xu, K., L. Qu, H. Li, X. Ren, N. Yan, and X.J.F.F. Fu, *Functional properties of dietary quercetin in cardiovascular health and disease*. 2024.
21. Kerna, N.A., D.C. Ngwu, O.M. Akuma, H.M. Holets, S. Chawla, J.V. Flores, K.D. Pruitt, N.D.V. Carsrud, D. McKee, N.C. Okpo, B.M. Jomsky, and C.I. Azi, *Quercetin: Exploring Its Unique Flavonol Properties, Bioavailability, Safety Profile, and Therapeutic Potential in High-Impact Medical Conditions*. European Journal of Medical and Health Research, 2024. **2**(3): p. 178-198.
22. Kuppusamy, S., J.S. Ayyadurai, and S. Radha, *Exploring the mechanistic pathways of promising bioflavonoid Quercetin in diabetes management*. 2024. **4**(4): p. 379-386.
23. Rapti, E., T. Adamantidi, P. Efthymiopoulos, G.Z. Kyzas, and A.J.N. Tsoupras, *Potential Applications of the Anti-Inflammatory, Antithrombotic and Antioxidant Health-Promoting Properties of Curcumin: A Critical Review*. 2024. **4**(4): p. 562-595.
24. Ayub, H., M. Islam, M. Saeed, H. Ahmad, F. Al-Asmari, M.F. Ramadan, M. Alissa, M.A. Arif, M.U.J. Rana, M.J.F.S. Subtain, and Nutrition, *On the health effects of curcumin and its derivatives*. 2024.
25. Bozkurt, O., B. Kocaadam-Bozkurt, and H. Yildiran, *Effects of curcumin, a bioactive component of turmeric, on type 2 diabetes mellitus and its complications: an updated review*. Food & Function, 2022. **13**(23): p. 11999-12010.
26. Duan, J., M. Yang, Y. Liu, S. Xiao, and X. Zhang, *Curcumin protects islet beta cells from streptozotocin-induced type 2 diabetes mellitus injury via its antioxidative effects*. Endokrynol Pol, 2022. **73**(6): p. 942-946.
27. Alizadeh, S.R., N. Savadkouhi, and M.A.J.E.O.o.D.D. Ebrahimzadeh, *Drug design strategies that aim to improve the low solubility and poor bioavailability conundrum in quercetin derivatives*. 2023. **18**(10): p. 1117-1132.
28. Chen, C., Z. Wang, H. Fu, G. Yu, X. Luo, and K.J.I.J.o.B.M. Zhu, *Enhanced bioavailability of curcumin amorphous nanocomposite prepared by a green process using modified starch*. 2024. **270**: p. 132210.
29. Chakraborty, S., D. Shukla, B. Mishra, and S. Singh, *Lipid – An emerging platform for oral delivery of drugs with poor bioavailability*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2009. **73**(1): p. 1-15.
30. Dewanjee, S., P. Chakraborty, B. Mukherjee, and V. De Feo, *Plant-Based Antidiabetic Nanoformulations: The Emerging Paradigm for Effective Therapy*. 2020. **21**(6): p. 2217.
31. Greenwald, R.B., H. Zhao, and J. Xia, *Tripartate poly(ethylene glycol) prodrugs of the open lactone form of camptothecin*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2003. **11**(12): p. 2635-2639.
32. Lentz, B.R. and J. Lee, *Poly(ethylene glycol) (PEG)-mediated fusion between pure lipid bilayers: a mechanism in common with viral fusion and secretory vesicle release? (Review)*. Molecular Membrane Biology, 1999. **16**(4): p. 279-296.

33. Dutheil, D., A. Underhaug Gjerde, I. Petit-Paris, G. Mauco, and H. Holmsen, *Polyethylene glycols interact with membrane glycerophospholipids: is this part of their mechanism for hypothermic graft protection?* Journal of Chemical Biology, 2009. **2**(1): p. 39-49.
34. Anderson, M.S. and J.A. Bluestone, *The NOD mouse: a model of immune dysregulation*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 447-85.
35. Hall, V., R.W. Thomsen, O. Henriksen, and N. Lohse, *Diabetes in Sub Saharan Africa 1999-2011: Epidemiology and public health implications. a systematic review*. BMC Public Health, 2011. **11**(1): p. 564.
36. Diagnosis, T.E.C.o.t. and C.o.D. Mellitus, *Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus*. Diabetes Care, 2003. **26**(suppl_1): p. s5-s20.
37. Bluestone, J.A., K. Herold, and G. Eisenbarth, *Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes*. Nature, 2010. **464**(7293): p. 1293-300.
38. Atkinson, M.A., *The pathogenesis and natural history of type 1 diabetes*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. **2**(11).
39. Atkinson, M.A., G.S. Eisenbarth, and A.W.J.T.I. Michels, *Type 1 diabetes*. 2014. **383**(9911): p. 69-82.
40. Butalia, S., G.G. Kaplan, B. Khokhar, and D.M.J.C.j.o.d. Rabi, *Environmental risk factors and type 1 diabetes: past, present, and future*. 2016. **40**(6): p. 586-593.
41. Noble, J.A. and H.A.J.C.S.H.p.i.m. Erlich, *Genetics of type 1 diabetes*. 2012. **2**(1): p. a007732.
42. Daneman, D.J.T.L., *Type 1 diabetes*. 2006. **367**(9513): p. 847-858.
43. Ferrannini, E. and R.A.J.I.t.o.d.m. DeFronzo, *Insulin actions in vivo: glucose metabolism*. 2015: p. 211-233.
44. Sosenko, J.M., J.S. Skyler, J.P. Krischer, C.J. Greenbaum, J. Mahon, L.E. Rafkin, D. Cuthbertson, C. Cowie, K. Herold, and G.J.D. Eisenbarth, *Glucose excursions between states of glycemia with progression to type 1 diabetes in the Diabetes Prevention Trial–Type 1 (DPT-1)*. 2010. **59**(10): p. 2386-2389.
45. Atkinson, M.A.J.C.S.H.p.i.m., *The pathogenesis and natural history of type 1 diabetes*. 2012. **2**(11): p. a007641.
46. Baekkeskov, S., H.-J. Aanstoot, S. Christgai, A. Reetz, M. Solimena, M. Cascalho, F. Folli, H. Richter-Olesen, and P.-D.J.N. Camilli, *Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase*. 1990. **347**(6289): p. 151-156.
47. .
48. Lan, M.S., C. Wasserfall, N.K. Maclaren, and A.L.J.P.o.t.N.A.o.S. Notkins, *IA-2, a transmembrane protein of the protein tyrosine phosphatase family, is a major autoantigen in insulin-dependent diabetes mellitus*. 1996. **93**(13): p. 6367-6370.
49. Wenzlau, J.M., K. Juhl, L. Yu, O. Moua, S.A. Sarkar, P. Gottlieb, M. Rewers, G.S. Eisenbarth, J. Jensen, and H.W.J.P.o.t.N.A.o.S. Davidson, *The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes*. 2007. **104**(43): p. 17040-17045.
50. Van Belle, T.L., K.T. Coppieters, and M.G.J.P.r. Von Herrath, *Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies*. 2011. **91**(1): p. 79-118.
51. Egro, F.M.J.J.M.E., *Why is type 1 diabetes increasing*. 2013. **51**(1): p. R1-13.
52. Neu, A., L. Feldhahn, S. Eehalt, R. Hub, M.B. Ranke, and D.g.B.W.J.P. Diabetes, *Type 2 diabetes mellitus in children and adolescents is still a rare disease in Germany: a population-based assessment of the prevalence of type 2 diabetes and MODY in patients aged 0–20 years*. 2009. **10**(7): p. 468-473.

53. Katsarou, A., S. Gudbjörnsdóttir, A. Rawshani, D. Dabelea, E. Bonifacio, B.J. Anderson, L.M. Jacobsen, D.A. Schatz, and Å.J.N.r.D.p. Lernmark, *Type 1 diabetes mellitus*. 2017. **3**(1): p. 1-17.
54. KOUTNIK, A.P., *Part 1: What is Type-1 Diabetes?* .
55. Sherr, J.L., C.T. Boyle, K.M. Miller, R.W. Beck, and W.V. Tamborlane, *No Summer Vacation From Diabetes: Glycemic Control in Pediatric Participants in the T1D Exchange Registry Based on Time of Year*. *Diabetes Care*, 2016. **39**(12): p. e214-e215.
56. Nathan, D.M. and D.E.R.G.J.D. care, *The diabetes control and complications trial/epidemiology of diabetes interventions and complications study at 30 years: overview*. 2014. **37**(1): p. 9-16.
57. Karges, B., A. Schwandt, B. Heidtmann, O. Kordonouri, E. Binder, U. Schierloh, C. Boettcher, T. Kapellen, J. Rosenbauer, and R.W.J.J. Holl, *Association of insulin pump therapy vs insulin injection therapy with severe hypoglycemia, ketoacidosis, and glycemic control among children, adolescents, and young adults with type 1 diabetes*. 2017. **318**(14): p. 1358-1366.
58. Rawshani, A., N. Sattar, S. Franzén, A. Rawshani, A.T. Hattersley, A.-M. Svensson, B. Eliasson, and S.J.T.L. Gudbjörnsdóttir, *Excess mortality and cardiovascular disease in young adults with type 1 diabetes in relation to age at onset: a nationwide, register-based cohort study*. 2018. **392**(10146): p. 477-486.
59. Chiang, J.L., M.S. Kirkman, L.M. Laffel, and A.L.J.D.c. Peters, *Type 1 diabetes through the life span: a position statement of the American Diabetes Association*. 2014. **37**(7): p. 2034.
60. Pickup, J.C.J.N.E.J.o.M., *Insulin-pump therapy for type 1 diabetes mellitus*. 2012. **366**(17): p. 1616-1624.
61. Frier, B.M.J.D.m.r. and reviews, *How hypoglycaemia can affect the life of a person with diabetes*. 2008. **24**(2): p. 87-92.
62. Aghazadeh, Y. and M.C.J.C.d.r. Nostro, *Cell therapy for type 1 diabetes: current and future strategies*. 2017. **17**: p. 1-9.
63. Kochar, I.S., R.J.A.o.P.E. Jain, and Metabolism, *Pancreas transplant in type 1 diabetes mellitus: the emerging role of islet cell transplant*. 2021. **26**(2): p. 86-91.
64. Robertson, R.P.J.N.E.J.o.M., *Islet transplantation as a treatment for diabetes—a work in progress*. 2004. **350**(7): p. 694-705.
65. Ricordi, C., P.E. Lacy, and D.W.J.D. Scharp, *Automated islet isolation from human pancreas*. 1989. **38**(Supplement_1): p. 140-142.
66. Shapiro, A.J., C. Ricordi, B.J. Hering, H. Auchincloss, R. Lindblad, R.P. Robertson, A. Secchi, M.D. Brendel, T. Berney, and D.C.J.N.E.J.o.M. Brennan, *International trial of the Edmonton protocol for islet transplantation*. 2006. **355**(13): p. 1318-1330.
67. Langer, R. *Islet transplantation: lessons learned since the Edmonton breakthrough*. in *Transplantation proceedings*. 2010. Elsevier.
68. McCall, M. and A.M. Shapiro, *Update on islet transplantation*. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2012. **2**(7): p. a007823.
69. Robertson, R.P., C. Davis, J. Larsen, R. Stratta, and D.E.J.D.C. Sutherland, *Pancreas and islet transplantation in type 1 diabetes*. 2006. **29**(4): p. 935.
70. Li, M., L.-J. Song, and X.-Y. Qin, *Advances in the cellular immunological pathogenesis of type 1 diabetes*. 2014. **18**(5): p. 749-758.
71. Martino, M., A. Galderisi, C. Evans-Molina, and C. Dayan, *Revisiting the Pattern of Loss of β -Cell Function in Preclinical Type 1 Diabetes*. *Diabetes*, 2024. **73**(11): p. 1769-1779.
72. Leslie, R.D. and R.B. Elliott, *Early Environmental Events as a Cause of IDDM: Evidence and Implications*. *Diabetes*, 1994. **43**(7): p. 843-850.

73. Eizirik, D.L., M. Sammeth, T. Bouckenooghe, G. Bottu, G. Sisino, M. Igoillo-Esteve, F. Ortis, I. Santin, M.L. Colli, and J.J.P.g. Barthson, *The human pancreatic islet transcriptome: expression of candidate genes for type 1 diabetes and the impact of pro-inflammatory cytokines*. 2012. **8**(3): p. e1002552.
74. Christen, U. and R. Kimmel, *Chemokines as Drivers of the Autoimmune Destruction in Type 1 Diabetes: Opportunity for Therapeutic Intervention in Consideration of an Optimal Treatment Schedule*. 2020. **11**.
75. Peters, L., A. Posgai, and T.M. Brusko, *Islet-immune interactions in type 1 diabetes: the nexus of beta cell destruction*. *Clinical and Experimental Immunology*, 2019. **198**(3): p. 326-340.
76. Wan, X., B.H. Zinselmeyer, P.N. Zakharov, A.N. Vomund, R. Taniguchi, L. Santambrogio, M.S. Anderson, C.F. Lichti, and E.R. Unanue, *Pancreatic islets communicate with lymphoid tissues via exocytosis of insulin peptides*. *Nature*, 2018. **560**(7716): p. 107-111.
77. James, E.A., M. Pietropaolo, and M.J. Mamula, *Immune Recognition of β -Cells: Neopeptides as Key Players in the Loss of Tolerance*. *Diabetes*, 2018. **67**(6): p. 1035-1042.
78. Moore, D.J., N.I. Leibel, W. Polonsky, and H. Rodriguez, *Recommendations for Screening and Monitoring the Stages of Type 1 Diabetes in the Immune Therapy Era*. *Int J Gen Med*, 2024. **17**: p. 3003-3014.
79. Ferrannini, E., A. Gastaldelli, and P. Iozzo, *Pathophysiology of Prediabetes*. *Medical Clinics of North America*, 2011. **95**(2): p. 327-339.
80. Crèvecoeur, I., V. Gudmundsdottir, S. Vig, F. Marques Câmara Sodré, W. D' Hertog, A.C. Fierro, L. Van Lommel, C. Gysemans, K. Marchal, E. Waelkens, F. Schuit, S. Brunak, L. Overbergh, and C. Mathieu, *Early differences in islets from prediabetic NOD mice: combined microarray and proteomic analysis*. *Diabetologia*, 2017. **60**(3): p. 475-489.
81. Unanue, E.R. and X. Wan, *The Immunoreactive Platform of the Pancreatic Islets Influences the Development of Autoreactivity*. *Diabetes*, 2019. **68**(8): p. 1544-1551.
82. Raju, T.K. and A.V. Senthil Kumar, *Diabetes Detection Based on Health Conditions Using Advanced Learning Algorithm*. 2024. Cham: Springer Nature Switzerland.
83. Yau, C. and J.S. Danska, *Cracking the type 1 diabetes code: Genes, microbes, immunity, and the early life environment*. 2024. **325**(1): p. 23-45.
84. Rodriguez-Calvo, T., J.D. Johnson, L. Overbergh, and J.L. Dunne, *Neopeptides in Type 1 Diabetes: Etiological Insights, Biomarkers and Therapeutic Targets*. 2021. **12**.
85. Fyvie, M.J. and K.M. Gillespie, *The importance of biomarker development for monitoring type 1 diabetes progression rate and therapeutic responsiveness*. 2023. **14**.
86. Ramkumar, K.M., T.V. Sekar, E. Bhakkiyalakshmi, K. Foygel, P. Rajaguru, F. Berger, and R. Paulmurugan, *The impact of oxidative stress on islet transplantation and monitoring the graft survival by non-invasive imaging*. *Curr Med Chem*, 2013. **20**(9): p. 1127-46.
87. Cheng, H., Z. Zhao, D. Liu, Y. Wang, and M. Zhang, *Early senescence of pancreatic β cells induced by unfolded protein response deficiency prevents type 1 diabetes*. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*, 2024. **25**(9): p. 796-799.
88. Tiffanie, L., P.R. Katherine, M.H.T. Paul, and P. Sharad, *Type 1 Diabetes: Current Advances in High-Throughput Technologies and Computational Biology for Biomarker Studies*, in *Type 1 Diabetes in 2023*, C. Rudolf, Editor. 2022, IntechOpen: Rijeka. p. Ch. 4.

89. Galderisi, A., A.L.J. Carr, M. Martino, P. Taylor, P. Senior, and C. Dayan, *Quantifying beta cell function in the preclinical stages of type 1 diabetes*. *Diabetologia*, 2023. **66**(12): p. 2189-2199.
90. Ali Mughal, A., S. Taha Abbas, H. Asad, M. Zubair, N. Ali Khan, S. Naseem, and M. Zaman Shaikh, *Prediabetes; Prevention and Management: Prediabetes; Prevention and Management*. *Pakistan BioMedical Journal*, 2022. **5**(6): p. 03-09.
91. Sarkar, S., X. Zheng, G.C. Clair, Y.M. Kwon, Y. You, A.C. Swensen, B.-J.M. Webb-Robertson, E.S. Nakayasu, W.-J. Qian, and T.O. Metz, *Exploring new frontiers in type 1 diabetes through advanced mass-spectrometry-based molecular measurements*. *Trends in Molecular Medicine*, 2024. **30**(12): p. 1137-1151.
92. Ferreira, R., R. Nogueira-Ferreira, A. Leite-Moreira, H. Fonseca, and J.S. Neves, *Chapter 10 - Pancreatic β cells: the metabolic network underlying body's glucostat*, in *Glycolysis*, R. Ferreira, P.F. Oliveira, and R. Nogueira-Ferreira, Editors. 2024, Academic Press. p. 181-197.
93. Deepa Maheshvare, M., S. Raha, M. König, and D. Pal, *A pathway model of glucose-stimulated insulin secretion in the pancreatic β -cell*. 2023. **14**.
94. Broadley, L., K. Clark, and G. Ritchie, *Prevention and management of hyperglycaemic crisis*. *Nurs Stand*, 2019. **34**(7): p. 75-82.
95. Abdalla, M.M.I., *Advancing diabetes management: Exploring pancreatic beta-cell restoration's potential and challenges*. *World J Gastroenterol*, 2024. **30**(40): p. 4339-4353.
96. Pradeepa, R. and V. Mohan, *Chapter 2 - Epidemiology of chronic complications of diabetes: A global perspective*, in *Chronic Complications of Diabetes Mellitus*, D. Mauricio and N. Alonso, Editors. 2024, Academic Press. p. 11-23.
97. Janapati, Y.K. and S. Junapudi, *Progress in experimental models to investigate the in vivo and in vitro antidiabetic activity of drugs*. 2024. **7**(3): p. 297-309.
98. Coutinho, K.V., I.M. Deeba, H. Shinde, J. Feduska, K. Burnette, S.O. Poole, H.M. Tse, and C.S. Hunter, *12527 Determining The Impact Of Dampened Oxidative Stress On Islet Function And Gene Expression During Diabetes Onset In NOD Mice*. *Journal of the Endocrine Society*, 2024. **8**(Supplement_1).
99. Batdorf, H.M., L.d.L. Lawes, J.T. Richardson, D.H. Burk, S.D. Dupuy, M.D. Karlstad, R.C. Noland, S.J. Burke, and J.J. Collier, *NOD mice have distinct metabolic and immunologic profiles when compared with genetically similar MHC-matched ICR mice*. 2023. **325**(4): p. E336-E345.
100. Antony, J., S. Debroy, C. Manisha, P. Thomas, V. Jeyarani, T.J.R.J.o.P. Choephel, and Technology, *In-vitro cell line Models and Assay methods to study the Anti-diabetic Activity*. 2019. **12**(5): p. 2200-2206.
101. Wu, J. and L.-J. Yan, *Streptozotocin-induced type 1 diabetes in rodents as a model for studying mitochondrial mechanisms of diabetic β cell glucotoxicity*. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity*, 2015. **8**(null): p. 181-188.
102. Wszola, M., M. Klak, A. Kosowska, G. Tymicki, A. Berman, A. Adamiok-Ostrowska, J. Olkowska-Truchanowicz, I. Uhrynowska-Tyszkiewicz, and A. Kaminski, *Streptozotocin-Induced Diabetes in a Mouse Model (BALB/c) Is Not an Effective Model for Research on Transplantation Procedures in the Treatment of Type 1 Diabetes*. 2021. **9**(12): p. 1790.
103. Furman, B.L., *Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats*. 2021. **1**(4): p. e78.
104. Wu, J. and L.J. Yan, *Streptozotocin-induced type 1 diabetes in rodents as a model for studying mitochondrial mechanisms of diabetic β cell glucotoxicity*. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2015. **8**: p. 181-8.

105. Lennikov, A., F. ElZaridi, and M. Yang, *Modified streptozotocin-induced diabetic model in rodents*. 2024. **7**(5): p. 777-780.
106. Talbot, S.R., M. Heider, M. Wirth, A. Jörns, and O. Naujok, *Exploring dose–response variability and relative severity assessment in STZ-induced diabetes male NSG mice*. Scientific Reports, 2024. **14**(1): p. 16559.
107. Randhawa, M.A. and M.S.J.P.J.M.R. Al-Ghamdi, *A review of the pharmacotherapeutic effects of Nigella sativa*. 2002. **41**(2): p. 77-83.
108. Ali, B.H. and G. Blunden, *Pharmacological and toxicological properties of Nigella sativa*. Phytother Res, 2003. **17**(4): p. 299-305.
109. El-Dakhakhny, M., *STUDIES ON THE CHEMICAL CONSTITUTION OF EGYPTIAN NIGELLA SATIVA L. SEEDS. III) THE ESSENTIAL OIL*. Planta Med, 1963. **11**(04): p. 465-470.
110. Salem, M.L., *Immunomodulatory and therapeutic properties of the Nigella sativa L. seed*. International Immunopharmacology, 2005. **5**(13): p. 1749-1770.
111. Rathore, C., C. Hemrajani, A.K. Sharma, P.K. Gupta, N.K. Jha, A.A.A. Aljabali, G. Gupta, S.K. Singh, J.-C. Yang, R.P. Dwivedi, K. Dua, D.K. Chellappan, P. Negi, and M.M. Tambuwala, *Self-nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) mediated improved oral bioavailability of thymoquinone: optimization, characterization, pharmacokinetic, and hepatotoxicity studies*. Drug Delivery and Translational Research, 2023. **13**(1): p. 292-307.
112. Mansour, M.A., M.N. Nagi, A.S. El-Khatib, and A.M. Al-Bekairi, *Effects of thymoquinone on antioxidant enzyme activities, lipid peroxidation and DT-diaphorase in different tissues of mice: a possible mechanism of action*. Cell Biochem Funct, 2002. **20**(2): p. 143-51.
113. Nagi, M.N. and M.A. Mansour, *PROTECTIVE EFFECT OF THYMOQUINONE AGAINST DOXORUBICIN-INDUCED CARDIOTOXICITY IN RATS: A POSSIBLE MECHANISM OF PROTECTION*. Pharmacological Research, 2000. **41**(3): p. 283-289.
114. Harzallah, H.J., A. Neffati, I. Skandrani, E. Maaloul, L. Chekir-Ghedira, and T.J.J.M.P.R. Mahjoub, *Antioxidant and antigenotoxic activities of Globularia alypum leaves extracts*. 2010. **4**(19): p. 2048-2053.
115. El Gazzar, M., R. El Mezayen, M.R. Nicolls, J.C. Marecki, and S.C. Dreskin, *Downregulation of leukotriene biosynthesis by thymoquinone attenuates airway inflammation in a mouse model of allergic asthma*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 2006. **1760**(7): p. 1088-1095.
116. Tekeoglu, I., A. Dogan, and L. Demiralp, *Retracted: Effects of thymoquinone (volatile oil of black cumin) on rheumatoid arthritis in rat models*. 2006. **20**(10): p. 869-871.
117. Sayed, A.A.R. and M. Morcos, *Thymoquinone decreases AGE-induced NF- κ B activation in proximal tubular epithelial cells*. 2007. **21**(9): p. 898-899.
118. Chehl, N., G. Chipitsyna, Q. Gong, C.J. Yeo, and H.A. Arafat, *Anti-inflammatory effects of the Nigella sativa seed extract, thymoquinone, in pancreatic cancer cells*. HPB, 2009. **11**(5): p. 373-381.
119. Badary, O.A., M.N. Nagi, O.A. Al-Shabanah, H.A. Al-Sawaf, M.O. Al-Sohaibani, A.M.J.C.j.o.p. Al-Bekairi, and pharmacology, *Thymoquinone ameliorates the nephrotoxicity induced by cisplatin in rodents and potentiates its antitumor activity*. 1997. **75**(12): p. 1356-1361.
120. Badary, O.A., A.B. Abdel-Naim, M.H. Abdel-Wahab, and F.M.A. Hamada, *The influence of thymoquinone on doxorubicin-induced hyperlipidemic nephropathy in rats*. Toxicology, 2000. **143**(3): p. 219-226.

121. Nagi, M.N., H.A. Almakki, M.M. Sayed-Ahmed, and A.M. Al-Bekairi, *Thymoquinone supplementation reverses acetaminophen-induced oxidative stress, nitric oxide production and energy decline in mice liver*. Food and Chemical Toxicology, 2010. **48**(8): p. 2361-2365.
122. Mohamed, A., A. Shoker, F. Bendjelloul, A. Mare, M. Alzrigh, H. Benghuzzi, and T.J.B.s.i. Desin, *Improvement of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) by thymoquinone; an oxidative stress inhibitor*. 2003. **39**: p. 440-445.
123. Reddy, L., B. Odhav, and K.D. Bhoola, *Natural products for cancer prevention: a global perspective*. Pharmacology & Therapeutics, 2003. **99**(1): p. 1-13.
124. Woo, C.C., S.Y. Loo, V. Gee, C.W. Yap, G. Sethi, A.P. Kumar, and K.H. Benny Tan, *Anticancer activity of thymoquinone in breast cancer cells: Possible involvement of PPAR- γ pathway*. Biochemical Pharmacology, 2011. **82**(5): p. 464-475.
125. Rajput, S., B.N.P. Kumar, K.K. Dey, I. Pal, A. Parekh, and M. Mandal, *Molecular targeting of Akt by thymoquinone promotes G1 arrest through translation inhibition of cyclin D1 and induces apoptosis in breast cancer cells*. Life Sciences, 2013. **93**(21): p. 783-790.
126. Arafa, E.-S.A., Q. Zhu, Z.I. Shah, G. Wani, B.M. Barakat, I. Racoma, M.A. El-Mahdy, and A.A. Wani, *Thymoquinone up-regulates PTEN expression and induces apoptosis in doxorubicin-resistant human breast cancer cells*. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 2011. **706**(1): p. 28-35.
127. Chaieb, K., B. Kouidhi, H. Jrah, K. Mahdouani, A.J.B.c. Bakhrouf, and a. medicine, *Antibacterial activity of Thymoquinone, an active principle of Nigella sativa and its potency to prevent bacterial biofilm formation*. 2011. **11**: p. 1-6.
128. Kokoska, L., J. Havlik, I. Valterova, H. Sovova, M. Sajrtova, and I. Jankovska, *Comparison of Chemical Composition and Antibacterial Activity of Nigella sativa Seed Essential Oils Obtained by Different Extraction Methods*. Journal of Food Protection, 2008. **71**(12): p. 2475-2480.
129. Randhawa, M.A.J.J.o.A.M.C.A., *In vitro antituberculous activity of thymoquinone, an active principle of Nigella sativa*. 2011. **23**(2): p. 78-81.
130. Piras, A., A. Rosa, B. Marongiu, S. Porcedda, D. Falconieri, M.A. Dessì, B. Ozcelik, and U. Koca, *Chemical composition and in vitro bioactivity of the volatile and fixed oils of Nigella sativa L. extracted by supercritical carbon dioxide*. Industrial Crops and Products, 2013. **46**: p. 317-323.
131. Aboul-Ela, E.I., *Cytogenetic studies on Nigella sativa seeds extract and thymoquinone on mouse cells infected with schistosomiasis using karyotyping*. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 2002. **516**(1): p. 11-17.
132. Nagi, M.N., K. Alam, O.A. Badary, O.A. Al-Shabanah, H.A. Al-Sawaf, and A.M. Al-Bekairi, *Thymoquinone protects against carbon tetrachloride hepatotoxicity in mice via an antioxidant mechanism*. 1999. **47**(1): p. 153-159.
133. Suddek, G.M., *Protective role of thymoquinone against liver damage induced by tamoxifen in female rats*. 2014. **92**(8): p. 640-644.
134. Nili-Ahmadabadi, A., F. Tavakoli, G. Hasanzadeh, H. Rahimi, and O.J.D.j.o.F.o.P. Sabzevari, Tehran University of Medical Sciences, *Protective effect of pretreatment with thymoquinone against Aflatoxin B1 induced liver toxicity in mice*. 2011. **19**(4): p. 282.
135. Jaswal, A., N. Sinha, M. Bhadauria, S. Shrivastava, and S. Shukla, *Therapeutic potential of thymoquinone against anti-tuberculosis drugs induced liver damage*. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2013. **36**(3): p. 779-786.

136. Fararh, K.M., Y. Shimizu, T. Shiina, H. Nikami, M.M. Ghanem, and T. Takewaki, *Thymoquinone reduces hepatic glucose production in diabetic hamsters*. *Research in Veterinary Science*, 2005. **79**(3): p. 219-223.
137. Kanter, M., *Protective effects of thymoquinone on streptozotocin-induced diabetic nephropathy*. *Journal of Molecular Histology*, 2009. **40**(2): p. 107-115.
138. El-Mahmoudy, A., Y. Shimizu, T. Shiina, H. Matsuyama, M. El-Sayed, and T. Takewaki, *Successful abrogation by thymoquinone against induction of diabetes mellitus with streptozotocin via nitric oxide inhibitory mechanism*. *International Immunopharmacology*, 2005. **5**(1): p. 195-207.
139. Khader, M., N. Bresgen, and P.M. Eckl, *In vitro toxicological properties of thymoquinone*. *Food and Chemical Toxicology*, 2009. **47**(1): p. 129-133.
140. Al-Hader, A., M. Aqel, and Z. Hasan, *Hypoglycemic Effects of the Volatile Oil of Nigella sativa Seeds*. *International Journal of Pharmacognosy*, 1993. **31**(2): p. 96-100.
141. Mashayekhi-Sardoo, H., R. Rezaee, and G. Karimi, *An overview of in vivo toxicological profile of thymoquinone*. *Toxin Reviews*, 2020. **39**(2): p. 115-122.
142. Badary, O.A., O.A. Al-Shabanah, M.N. Nagi, A.M. Al-Bekairi, and M.J.D.D.R. Elmazar, *Acute and subchronic toxicity of thymoquinone in mice*. 1998. **44**(2-3): p. 56-61.
143. Khader, M., N. Bresgen, P.J.F. Eckl, and C. Toxicology, *In vitro toxicological properties of thymoquinone*. 2009. **47**(1): p. 129-133.
144. Harzallah, H.J., K. Rjiba, A. Maaloul, S. Abid-Essafi, and T. Mahjoub, *Oxidative and genotoxic effects of Thymoquinone, Nigella sativa active compound, in Balb/c mice*. 2012.
145. Carrillo-Martinez, E.J., F.Y. Flores-Hernández, A.M. Salazar-Montes, H.F. Nario-Chaidez, and L.D. Hernández-Ortega, *Quercetin, a Flavonoid with Great Pharmacological Capacity*. 2024. **29**(5): p. 1000.
146. *Sources, Structures, and Properties of Quercetin, in Natural Polymers for Biomedical Applications*. 2024. p. 161-165.
147. Li, J.-W., W.-C. Zhang, Z.-Y. Wu, H. Liu, Y.-C. Wang, Q.-S. Liu, S.-N. Li, Y.-T. Lin, and A.-L. Hui, *Synthesis of Quercetin-Acid Esters and Its Reduction of H₂O₂-Triggered PC12 Cells Damage by Down-Regulating ROS*. 2023. **20**(2): p. e202200897.
148. da Silva, S.V.S., O.M. Barboza, J.T. Souza, É.N. Soares, C.C. dos Santos, L.V. Pacheco, I.P. Santos, T.B.d.S. Magalhães, M.B.P. Soares, E.T. Guimarães, C.S. Meira, S.L. Costa, V.D.A. da Silva, L.L.B. de Santana, and A. de Freitas Santos Júnior, *Structural Design, Synthesis and Antioxidant, Antileishmania, Anti-Inflammatory and Anticancer Activities of a Novel Quercetin Acetylated Derivative*. 2021. **26**(22): p. 6923.
149. Tian, R., L. Zhou, and N. Lu, *Binding of Quercetin to Hemoglobin Reduced Hemin Release and Lipid Oxidation*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2022. **70**(40): p. 12925-12934.
150. Ullah, F., N. Iqbal, M. Ayaz, A. Sadiq, I. Ullah, S. Ahmad, and M.J.P.J.P.S. Imran, *DPPH, ABTS free radical scavenging, antibacterial and phytochemical evaluation of crude methanolic extract and subsequent fractions of Chenopodium botrys aerial parts*. 2017. **30**(3): p. 761-766.
151. Ghosh, N., T. Chakraborty, S. Mallick, S. Mana, D. Singha, B. Ghosh, S.J.S.A.P.A.M. Roy, and B. Spectroscopy, *Synthesis, characterization and study of antioxidant activity of quercetin–magnesium complex*. 2015. **151**: p. 807-813.

152. Hanasaki, Y., S. Ogawa, S.J.F.R.B. Fukui, and Medicine, *The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids*. 1994. **16**(6): p. 845-850.
153. D'Andrea, G.J.F., *Quercetin: A flavonol with multifaceted therapeutic applications?* 2015. **106**: p. 256-271.
154. Ying, L., M.T. Chaudhry, F. Xiao, Y. Mao, M. Wang, B. Wang, S. Wang, Y.J.O.m. Li, and c. longevity, *The Effects and Mechanism of Quercetin Dietary Supplementation in Streptozotocin-Induced Hyperglycemic Arbor Acre Broilers*. 2020. **2020**(1): p. 9585047.
155. Qin, X., M. Zhang, X. Gao, Y. Lin, M. Li, H.J.C. Si-Yi, and Bioengineering, *Study on the antibacterial activity of quercetin*. 2009. **26**(4): p. 55-57.
156. Wang, S., J. Yao, B. Zhou, J. Yang, M.T. Chaudry, M. Wang, F. Xiao, Y. Li, and W.J.J.o.F.P. Yin, *Bacteriostatic effect of quercetin as an antibiotic alternative in vivo and its antibacterial mechanism in vitro*. 2018. **81**(1): p. 68-78.
157. Zhao, Y., M. Chen, Z. Zhao, and S.J.F.c. Yu, *The antibiotic activity and mechanisms of sugarcane (Saccharum officinarum L.) bagasse extract against food-borne pathogens*. 2015. **185**: p. 112-118.
158. Lee, T.-J., O.H. Kim, Y.H. Kim, J.H. Lim, S. Kim, J.-W. Park, and T.K.J.C.l. Kwon, *Quercetin arrests G2/M phase and induces caspase-dependent cell death in U937 cells*. 2006. **240**(2): p. 234-242.
159. Suh, D.K., E.J. Lee, H.C. Kim, and J.H.J.A.o.p.r. Kim, *Induction of G 1/S phase arrest and apoptosis by quercetin in human osteosarcoma cells*. 2010. **33**: p. 781-785.
160. Chou, C.-C., J.-S. Yang, H.-F. Lu, S.-W. Ip, C. Lo, C.-C. Wu, J.-P. Lin, N.-Y. Tang, J.-G. Chung, and M.-J.J.A.o.p.r. Chou, *Quercetin-mediated cell cycle arrest and apoptosis involving activation of a caspase cascade through the mitochondrial pathway in human breast cancer MCF-7 cells*. 2010. **33**: p. 1181-1191.
161. Geraets, L., H.J. Moonen, K. Brauers, E.F. Wouters, A. Bast, and G.J.J.T.J.o.n. Hageman, *Dietary flavones and flavonoles are inhibitors of poly (ADP-ribose) polymerase-1 in pulmonary epithelial cells*. 2007. **137**(10): p. 2190-2195.
162. Mlcek, J., T. Jurikova, S. Skrovankova, and J.J.M. Sochor, *Quercetin and its anti-allergic immune response*. 2016. **21**(5): p. 623.
163. Boesch-Saadatmandi, C., A. Loboda, A.E. Wagner, A. Stachurska, A. Jozkowicz, J. Dulak, F. Döring, S. Wolfram, and G.J.T.J.o.n.b. Rimbach, *Effect of quercetin and its metabolites isorhamnetin and quercetin-3-glucuronide on inflammatory gene expression: role of miR-155*. 2011. **22**(3): p. 293-299.
164. Terao, J.J.B.p., *Factors modulating bioavailability of quercetin-related flavonoids and the consequences of their vascular function*. 2017. **139**: p. 15-23.
165. Guillermo Gormaz, J., S. Quintremil, and R.J.C.t.i.m.c. Rodrigo, *Cardiovascular disease: a target for the pharmacological effects of quercetin*. 2015. **15**(17): p. 1735-1742.
166. Salem, I.B., A. Prola, M. Boussabbeh, A. Guilbert, H. Bacha, S. Abid-Essefi, C.J.C.S. Lemaire, and Chaperones, *Crocin and Quercetin protect HCT116 and HEK293 cells from Zearalenone-induced apoptosis by reducing endoplasmic reticulum stress*. 2015. **20**(6): p. 927-938.
167. Salem, I.B., A. Prola, M. Boussabbeh, A. Guilbert, H. Bacha, C. Lemaire, and S.J.N. Abid-Essefi, *Activation of ER stress and apoptosis by α - and β -zearalenol in HCT116 cells, protective role of Quercetin*. 2016. **53**: p. 334-342.
168. Jakaria, M., S. Azam, S.-H. Jo, I.-S. Kim, R. Dash, and D.-K.J.J.o.c.m. Choi, *Potential therapeutic targets of quercetin and its derivatives: its role in the therapy of cognitive impairment*. 2019. **8**(11): p. 1789.

169. Gitika, B., M. Sai Ram, S. Sharma, G. Ilavazhagan, and P.J.F.r.r. Banerjee, *Quercetin protects C6 glial cells from oxidative stress induced by tertiary-butylhydroperoxide*. 2006. **40**(1): p. 95-102.
170. Sakanashi, Y., K. Oyama, H. Matsui, T.B. Oyama, T.M. Oyama, Y. Nishimura, H. Sakai, and Y.J.L.s. Oyama, *Possible use of quercetin, an antioxidant, for protection of cells suffering from overload of intracellular Ca²⁺: a model experiment*. 2008. **83**(5-6): p. 164-169.
171. Sriraksa, N., J. Wattanathorn, S. Muchimapura, S. Tiamkao, K. Brown, K.J.E.B.C. Chaisiwamongkol, and A. Medicine, *Cognitive-Enhancing Effect of Quercetin in a Rat Model of Parkinson's Disease Induced by 6-Hydroxydopamine*. 2012. **2012**(1): p. 823206.
172. Indira Priyadarsini, K., *Chemical and Structural Features Influencing the Biological Activity of Curcumin*. Current Pharmaceutical Design, 2013. **19**(11): p. 2093-2100.
173. Tristiyanti, D., Sriwidodo, A. Budiman, and D.P. Wibowo, *Characterisation of Physical Properties of Curcumin Isolated from Curcuma domestica Val:* <http://www.doi.org/10.26538/tjnpr/v7i12.13>. Tropical Journal of Natural Product Research (TJNPR), 2023. **7**(12): p. 5448-5452.
174. Hani, P., K. Fathima, N. Mounika, and U. Nagapatla, *A Review on Phytochemical Analysis and In-vitro Antioxidant Activity of Curcumin from Curcuma longa L. Rhizomes*. International Journal of Drug Delivery Technology, 2024. **14**: p. 1106-1109.
175. Zielińska, A., H. Alves, V. Marques, A. Durazzo, M. Lucarini, T.F. Alves, M. Morsink, N. Willemen, P. Eder, and M.V.J.M. Chaud, *Properties, extraction methods, and delivery systems for curcumin as a natural source of beneficial health effects*. 2020. **56**(7): p. 336.
176. Kaur, G., M. Invally, and M. Chintamaneni, *Influence of piperine and quercetin on antidiabetic potential of curcumin*. 2016. **13**(3): p. 247-255.
177. Kanubaddi, K.R., S.-H. Yang, L.-W. Wu, C.-H. Lee, and C.-F.J.I.J.o.N. Weng, *Nanoparticle-conjugated nutraceuticals exert prospectively palliative of amyloid aggregation*. 2018: p. 8473-8485.
178. Roxo, D.F., C.A. Arcaro, V.O. Gutierrez, M.C. Costa, J.O. Oliveira, T.F.O. Lima, R.P. Assis, I.L. Brunetti, A.M.J.D. Baviera, and m. syndrome, *Curcumin combined with metformin decreases glycemia and dyslipidemia, and increases paraoxonase activity in diabetic rats*. 2019. **11**: p. 1-8.
179. Chen, L., Y. Ma, Y. Shi, and Y. Zhao, *On the [1,2]-domination number of generalized Petersen graphs*. Applied Mathematics and Computation, 2018. **327**: p. 1-7.
180. Wen, C.-C., Y.-H. Kuo, J.-T. Jan, P.-H. Liang, S.-Y. Wang, H.-G. Liu, C.-K. Lee, S.-T. Chang, C.-J. Kuo, S.-S. Lee, C.-C. Hou, P.-W. Hsiao, S.-C. Chien, L.-F. Shyur, and N.-S. Yang, *Specific Plant Terpenoids and Lignoids Possess Potent Antiviral Activities against Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus*. Journal of Medicinal Chemistry, 2007. **50**(17): p. 4087-4095.
181. Gupta, H., M. Gupta, and S. Bhargava, *Potential use of turmeric in COVID-19*. Clinical and Experimental Dermatology, 2020. **45**(7): p. 902-903.
182. Thimmulappa, R.K., K.K. Mudnakudu-Nagaraju, C. Shivamallu, K.T. Subramaniam, A. Radhakrishnan, S. Bhojraj, and G.J.H. Kuppusamy, *Antiviral and immunomodulatory activity of curcumin: A case for prophylactic therapy for COVID-19*. 2021. **7**(2).
183. Baj, T., R.J.R.p.o.i. Seth, and a.d. discovery, *Role of curcumin in regulation of TNF- α mediated brain inflammatory responses*. 2018. **12**(1): p. 69-77.
184. Derosa, G., P. Maffioli, L.E. Simental-Mendía, S. Bo, and A. Sahebkar, *Effect of curcumin on circulating interleukin-6 concentrations: A systematic review and meta-*

- analysis of randomized controlled trials*. Pharmacological Research, 2016. **111**: p. 394-404.
185. Sun, Y., W. Liu, H. Zhang, H. Li, J. Liu, F. Zhang, T. Jiang, and S. Jiang, *Curcumin Prevents Osteoarthritis by Inhibiting the Activation of Inflammatory NLRP3*. Journal of Interferon & Cytokine Research, 2017. **37**(10): p. 449-455.
186. Hadi, A., M. Pourmasoumi, E. Ghaedi, and A. Sahebkar, *The effect of Curcumin/Turmeric on blood pressure modulation: A systematic review and meta-analysis*. Pharmacological Research, 2019. **150**: p. 104505.
187. Tabeshpour, J., M. Hashemzaei, and A. Sahebkar, *The regulatory role of curcumin on platelet functions*. 2018. **119**(11): p. 8713-8722.
188. Den Hartogh, D.J., A. Gabriel, and E. Tsiani, *Antidiabetic Properties of Curcumin I: Evidence from In Vitro Studies*. 2020. **12**(1): p. 118.
189. Den Hartogh, D.J., A. Gabriel, and E. Tsiani, *Antidiabetic Properties of Curcumin II: Evidence from In Vivo Studies*. 2020. **12**(1): p. 58.
190. Song, Z., H. Wang, L. Zhu, M. Han, Y. Gao, Y. Du, Y.J.F. Wen, and function, *Curcumin improves high glucose-induced INS-1 cell insulin resistance via activation of insulin signaling*. 2015. **6**(2): p. 461-469.
191. Abrahams, S., W.L. Haylett, G. Johnson, J.A. Carr, and S. Bardien, *Antioxidant effects of curcumin in models of neurodegeneration, aging, oxidative and nitrosative stress: A review*. Neuroscience, 2019. **406**: p. 1-21.
192. Ułamek-Kozioł, M., S.J. Czuczwar, S. Januszewski, and R. Pluta, *Substantiation for the Use of Curcumin during the Development of Neurodegeneration after Brain Ischemia*. 2020. **21**(2): p. 517.
193. Mokhtari-Zaer, A., N. Marefati, S.L. Atkin, A.E. Butler, and A.J.J.o.c.p. Sahebkar, *The protective role of curcumin in myocardial ischemia–reperfusion injury*. 2019. **234**(1): p. 214-222.
194. Tang, M. and C.J.J.o.A.s.d. Taghibiglou, *The mechanisms of action of curcumin in Alzheimer's disease*. 2017. **58**(4): p. 1003-1016.
195. Wang, C., X. Zhang, Z. Teng, T. Zhang, and Y. Li, *Downregulation of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in curcumin-induced autophagy in APP/PS1 double transgenic mice*. European Journal of Pharmacology, 2014. **740**: p. 312-320.
196. Yogaraj, R., S.K. Gururaj, K. Krishnagiri, and M.P. Padma, *Microspheres in Pharmaceutical Science*. Journal of Multidisciplinary Cases, 2023. **3**(02): p. 1-9.
197. Cui, F., H. Zhang, D. Wang, X. Tan, X. Li, Y. Li, J. Li, and T. Li, *Advances in the preparation and application of microencapsulation to protect food functional ingredients*. Food & Function, 2023. **14**(15): p. 6766-6783.
198. Nandy, A., R. Saremi, E. Lee, and S. Sharma, *Stability and Applicability of Retinyl Palmitate Loaded Beeswax Microcapsules for Cosmetic Use*. 2022. **66**(3): p. 316-325.
199. Miramontes Subillaga, D., S. Heinert, J. Weissbrodt, and M. Dragosavac, *Manufacturing nearly monodispersed complex coacervate microcapsules by membrane emulsification and spray drying*. Food Hydrocolloids, 2024. **153**: p. 109953.
200. Comert, F., A.J. Malanowski, F. Azarikia, and P.L. Dubin, *Coacervation and precipitation in polysaccharide–protein systems*. Soft Matter, 2016. **12**(18): p. 4154-4161.
201. Xu, W., A. Rudov, A. Oppermann, S. Wypysek, M. Kather, R. Schroeder, W. Richtering, I.I. Potemkin, D. Wöll, and A. Pich, *Synthesis of Polyampholyte Janus-like Microgels by Coacervation of Reactive Precursors in Precipitation Polymerization*. 2020. **59**(3): p. 1248-1255.

202. Safwan Ul, I., S. Rahman, M.Z. Rahman, B. Saha, and Z. Salsabil, *13.07 - Recent development trends on polymeric materials—Investigation of properties and applications*, in *Comprehensive Materials Processing (Second Edition)*, S. Hashmi, Editor. 2024, Elsevier: Oxford. p. 125-152.
203. Desidery, L. and M. Lanotte, *1 - Polymers and plastics: Types, properties, and manufacturing*, in *Plastic Waste for Sustainable Asphalt Roads*, F. Giustozzi and S. Nizamuddin, Editors. 2022, Woodhead Publishing. p. 3-28.
204. Islam, M.S. and M.M. Islam, *2 - Physical and chemical properties of sustainable polymers and their blends*, in *Advances in Sustainable Polymer Composites*, M.R. Rahman, Editor. 2021, Woodhead Publishing. p. 37-57.
205. Veronese, F., E. Boccu, O. Schiavon, G. Velo, A. Conforti, L. Franco, and R.J.J.P.P. Milanino, *Anti-inflammatory and pharmacokinetic properties of superoxide dismutase derivatized with polyethylene glycol via active esters*. 1983. **35**(11): p. 757-758.
206. Francis, G.E., C. Delgado, D. Fisher, F. Malik, and A.K. Agrawal, *Polyethylene Glycol Modification: Relevance of Improved Methodology to Tumour Targeting*. *Journal of Drug Targeting*, 1996. **3**(5): p. 321-340.
207. Zhang, X., H. Wang, Z. Ma, B.J.E.o.o.d.m. Wu, and toxicology, *Effects of pharmaceutical PEGylation on drug metabolism and its clinical concerns*. 2014. **10**(12): p. 1691-1702.
208. Pasquali, I., *Sistemi particellari farmaco/eccipiente a base di polimeri idrofili ottenuti con CO₂ in fase supercritica*.
209. Roberts, M., M. Bentley, and J.J.A.d.d.r. Harris, *Chemistry for peptide and protein PEGylation*. 2002. **54**(4): p. 459-476.
210. Zalipsky, S.J.B.c., *Functionalized poly (ethylene glycols) for preparation of biologically relevant conjugates*. 1995. **6**(2): p. 150-165.
211. Zalipsky, S., R. Seltzer, S.J.B. Menon-Rudolph, and a. biochemistry, *Evaluation of a new reagent for covalent attachment of polyethylene glycol to proteins*. “. 1992. **15**(1): p. 100-114.
212. Bobbitt, J., *Periodate oxidation of carbohydrates*, in *Advances in carbohydrate chemistry*. 1956, Elsevier. p. 1-41.
213. Rodriguez, E.C., L.A. Marcaurelle, and C.R.J.T.J.o.o.c. Bertozzi, *Aminoxy-, hydrazide-, and thiosemicarbazide-functionalized saccharides: versatile reagents for glycoconjugate synthesis*. 1998. **63**(21): p. 7134-7135.
214. Greenwald, R.B., A. Pendri, C.D. Conover, H. Zhao, Y.H. Choe, A. Martinez, K. Shum, and S.J.J.o.M.C. Guan, *Drug delivery systems employing 1, 4-or 1, 6-elimination: poly (ethylene glycol) prodrugs of amine-containing compounds*. 1999. **42**(18): p. 3657-3667.
215. Tsubery, H., M. Mironchik, M. Fridkin, and Y.J.J.o.B.C. Shechter, *Prolonging the action of protein and peptide drugs by a novel approach of reversible polyethylene glycol modification*. 2004. **279**(37): p. 38118-38124.
216. Webster, R., E. Didier, P. Harris, N. Siegel, J. Stadler, L. Tilbury, D.J.D.M. Smith, and Disposition, *PEGylated proteins: evaluation of their safety in the absence of definitive metabolism studies*. 2007. **35**(1): p. 9-16.
217. Baker, E.N., T.L. Blundell, J.F. Cutfield, E.J. Dodson, G.G. Dodson, D.M.C. Hodgkin, R.E. Hubbard, N.W. Isaacs, C.D. Reynolds, and K.J.P.T.o.t.R.S.o.L.B. Sakabe, Biological Sciences, *The structure of 2Zn pig insulin crystals at 1.5 Å resolution*. 1988. **319**(1195): p. 369-456.
218. Friman, S., B. Egestad, J. Sjövall, and J.J.J.o.h. Svanvik, *Hepatic excretion and metabolism of polyethylene glycols and mannitol in the cat*. 1993. **17**(1): p. 48-55.

219. Bailon, P., A. Palleroni, C.A. Schaffer, C.L. Spence, W.-J. Fung, J.E. Porter, G.K. Ehrlich, W. Pan, Z.-X. Xu, and M.W.J.B.c. Modi, *Rational design of a potent, long-lasting form of interferon: a 40 kDa branched polyethylene glycol-conjugated interferon α -2a for the treatment of hepatitis C*. 2001. **12**(2): p. 195-202.
220. Sherman, M.R., M.G. Saifer, and F.J.A.d.r. Perez-Ruiz, *PEG-uricase in the management of treatment-resistant gout and hyperuricemia*. 2008. **60**(1): p. 59-68.
221. Hershfield, M.S., J.S. Sundry, N.J. Ganson, S.J.J.P.P.D.B.S. Kelly, and C. Applications, *Development of PEGylated mammalian urate oxidase as a therapy for patients with refractory gout*. 2009: p. 217-227.
222. Ginn, C., H. Khalili, R. Lever, and S.J.F.M.C. Brocchini, *PEGylation and its impact on the design of new protein-based medicines*. 2014. **6**(16): p. 1829-1846.
223. Bhat, R. and S.N.J.P.S. Timasheff, *Steric exclusion is the principal source of the preferential hydration of proteins in the presence of polyethylene glycols*. 1992. **1**(9): p. 1133-1143.
224. Turecek, P.L., M.J. Bossard, F. Schoetens, and I.A.J.J.o.p.s. Ivens, *PEGylation of biopharmaceuticals: a review of chemistry and nonclinical safety information of approved drugs*. 2016. **105**(2): p. 460-475.
225. Harris, J.M. and A. Kozlowski, *Poly (ethylene glycol) and related polymers monosubstituted with propionic or butanoic acids and functional derivatives thereof for biotechnical applications*. 1997, Google Patents.
226. Hatakeyama, H., H. Akita, H.J.B. Harashima, and p. bulletin, *The polyethyleneglycol dilemma: advantage and disadvantage of PEGylation of liposomes for systemic genes and nucleic acids delivery to tumors*. 2013. **36**(6): p. 892-899.
227. Dhalluin, C., A. Ross, L.-A. Leuthold, S. Foser, B. Gsell, F. Müller, and H.J.B.c. Senn, *Structural and biophysical characterization of the 40 kDa PEG- interferon- α 2a and its individual positional isomers*. 2005. **16**(3): p. 504-517.
228. Plesner, B., C.J. Fee, P. Westh, A.D.J.E.J.o.P. Nielsen, and Biopharmaceutics, *Effects of PEG size on structure, function and stability of PEGylated BSA*. 2011. **79**(2): p. 399-405.
229. Hoang Thi, T.T., E.H. Pilkington, D.H. Nguyen, J.S. Lee, K.D. Park, and N.P.J.P. Truong, *The importance of poly (ethylene glycol) alternatives for overcoming PEG immunogenicity in drug delivery and bioconjugation*. 2020. **12**(2): p. 298.
230. Pasut, G. and F.M.J.J.o.c.r. Veronese, *State of the art in PEGylation: the great versatility achieved after forty years of research*. 2012. **161**(2): p. 461-472.
231. Banci, L., I. Bertini, L. Monsu'Scolaro, P. Caliceti, O. Schiavon, and F.J.J.o.i.b. Veronese, *Spectroscopic characterization of polyethyleneglycol modified superoxide dismutase: 1H NMR studies on its Cu₂Co₂ derivative*. 1990. **39**(2): p. 149-159.
232. Veronese, F.M., A. Mero, F. Caboi, M. Sergi, C. Marongiu, and G.J.B.c. Pasut, *Site-specific pegylation of G-CSF by reversible denaturation*. 2007. **18**(6): p. 1824-1830.
233. Girard, E., S. Marchal, J. Perez, S. Finet, R. Kahn, R. Fourme, G. Marassio, A.-C. Dhaussy, T. Prangé, and M.J.B.j. Giffard, *Structure-function perturbation and dissociation of tetrameric urate oxidase by high hydrostatic pressure*. 2010. **98**(10): p. 2365-2373.
234. da Silva Freitas, D., P.J. Spencer, R.C. Vassão, and J.J.I.j.o.p. Abrahão-Neto, *Biochemical and biopharmaceutical properties of PEGylated uricase*. 2010. **387**(1-2): p. 215-222.
235. Holm, L.S., P.W. Thulstrup, M.R. Kasimova, and M.J.P.O. Van De Weert, *Preferential interactions and the effect of protein PEGylation*. 2015. **10**(7): p. e0133584.
236. Ivens, I.A., W. Achanzar, A. Baumann, A. Brändli-Baiocco, J. Cavagnaro, M. Dempster, B.O. Depelchin, A.R. Irizarry Rovira, L. Dill-Morton, and J.H.J.T.p. Lane,

- PEGylated biopharmaceuticals: current experience and considerations for nonclinical development*. 2015. **43**(7): p. 959-983.
237. Ivens, I., A. Baumann, T. McDonald, T. Humphries, L. Michaels, and P.J.H. Mathew, *PEG ylated therapeutic proteins for haemophilia treatment: a review for haemophilia caregivers*. 2013. **19**(1): p. 11-20.
238. Digilio, G., L. Barbero, C. Bracco, D. Corpillo, P. Esposito, G. Piquet, S. Traversa, and S.J.J.o.t.A.C.S. Aime, *NMR Structure of Two Novel Polyethylene Glycol Conjugates of the Human Growth Hormone-Releasing Factor, hGRF (1– 29)– NH₂*. 2003. **125**(12): p. 3458-3470.
239. Hinds, K.D. and S.W.J.A.d.d.r. Kim, *Effects of PEG conjugation on insulin properties*. 2002. **54**(4): p. 505-530.
240. Gokarn, Y.R., M. McLean, and T.M. Laue, *Effect of PEGylation on Protein Hydrodynamics*. *Molecular Pharmaceutics*, 2012. **9**(4): p. 762-773.
241. Fee, C.J. and J.M.J.B.c. Van Alstine, *Prediction of the viscosity radius and the size exclusion chromatography behavior of PEGylated proteins*. 2004. **15**(6): p. 1304-1313.
242. Gaube, J., R. Hoechemer, B. Keil, and A. Pfennig, *Polydispersity effects in the system poly(ethylene glycol) + dextran + water*. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 1993. **38**(2): p. 207-210.
243. Fang, J.-L., M.M. Vanlandingham, F.A. Beland, R.P. Felton, M.P. Maisha, G.R. Olson, R.E. Patton, A.S. Rosenberg, and G. Gamboa da Costa, *Toxicity of high-molecular-weight polyethylene glycols in Sprague Dawley rats*. *Toxicology Letters*, 2022. **359**: p. 22-30.
244. Xin, Y., Y. Hou, X. Cong, H. Tan, J. Wang, K. Mao, X. Wang, F. Liu, Y.-G. Yang, and T. Sun, *Kidney functional stages influence the role of PEG end-group on the renal accumulation and distribution of PEGylated nanoparticles*. *Nanoscale*, 2022. **14**(26): p. 9379-9391.
245. Kawai, F.J.A.m. and biotechnology, *Microbial degradation of polyethers*. 2002. **58**: p. 30-38.
246. Ikeda, Y. and Y. Nagasaki, *PEGylation Technology in Nanomedicine*, in *Polymers in Nanomedicine*, S. Kunugi and T. Yamaoka, Editors. 2012, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 115-140.
247. Lockshin, R.A. and C.M. Williams, *Programmed cell death—II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms*. *Journal of Insect Physiology*, 1964. **10**(4): p. 643-649.
248. Kerr, J.F.R., A.H. Wyllie, and A.R. Currie, *Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wideranging Implications in Tissue Kinetics*. *British Journal of Cancer*, 1972. **26**(4): p. 239-257.
249. Yang, Y.H.C. and J.D.J.J.o.C.S. Johnson, *Multi-parameter single-cell kinetic analysis reveals multiple modes of cell death in primary pancreatic β -cells*. 2013. **126**(18): p. 4286-4295.
250. Pirot, P., A.K. Cardozo, D.L.J.A.B.d.E. Eizirik, and Metabologia, *Mediators and mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 diabetes*. 2008. **52**: p. 156-165.
251. Tait, M., T. Tsai, N. Sakata, M. Billingham, and E. Vartiainen. *A projected augmented reality system for remote collaboration*. in *2013 IEEE International Symposium on Mixed and Augmented Reality (ISMAR)*. 2013.
252. Cnop, M., S. Toivonen, M. Igoillo-Esteve, and P.J.M.m. Salpea, *Endoplasmic reticulum stress and eIF2 α phosphorylation: The Achilles heel of pancreatic β cells*. 2017. **6**(9): p. 1024-1039.

253. Seleznev, K., C. Zhao, X.H. Zhang, K. Song, and Z.A. Ma, *Calcium-independent Phospholipase A₂ Localizes in and Protects Mitochondria during Apoptotic Induction by Staurosporine* *. Journal of Biological Chemistry, 2006. **281**(31): p. 22275-22288.
254. Zhao, Z., X. Zhang, C. Zhao, J. Choi, J. Shi, K. Song, J. Turk, and Z.A. Ma, *Protection of Pancreatic β -Cells by Group VIA Phospholipase A₂-Mediated Repair of Mitochondrial Membrane Peroxidation*. Endocrinology, 2010. **151**(7): p. 3038-3048.
255. Sokolova, M., A. Sahraoui, M. Høyem, J. Øgaard, E. Lien, P. Aukrust, A. Yndestad, T. Ranheim, and H. Scholz, *NLRP3 inflammasome mediates oxidative stress-induced pancreatic islet dysfunction*. 2018. **315**(5): p. E912-E923.
256. Chen, Y., J. Zhang, Y. Lin, Q. Lei, K.L. Guan, S. Zhao, and Y. Xiong, *Tumour suppressor SIRT3 deacetylates and activates manganese superoxide dismutase to scavenge ROS*. 2011. **12**(6): p. 534-541.
257. Merksamer, P.I., Y. Liu, W. He, M.D. Hirschey, D. Chen, and E. Verdin, *The sirtuins, oxidative stress and aging: an emerging link*. Aging (Albany NY), 2013. **5**(3): p. 144-50.
258. Cardozo, A.K., M. Kruhøffer, R. Leeman, T. Ørntoft, and D.c.L. Eizirik, *Identification of Novel Cytokine-Induced Genes in Pancreatic β -Cells by High-Density Oligonucleotide Arrays*. Diabetes, 2001. **50**(5): p. 909-920.
259. Giannoukakis, N., W.A. Rudert, M. Trucco, and P.D. Robbins, *Protection of Human Islets from the Effects of Interleukin-1 β by Adenoviral Gene Transfer of an I κ B Repressor* *. Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(47): p. 36509-36513.
260. Chang, I., S. Kim, J.Y. Kim, N. Cho, Y.-H. Kim, H.S. Kim, M.-K. Lee, K.-W. Kim, and M.-S. Lee, *Nuclear Factor κ B Protects Pancreatic β -Cells From Tumor Necrosis Factor- α -Mediated Apoptosis*. Diabetes, 2003. **52**(5): p. 1169-1175.
261. Eizirik, D.L., M. Miani, and A.K. Cardozo, *Signalling danger: endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in pancreatic islet inflammation*. Diabetologia, 2013. **56**(2): p. 234-241.
262. Tersey, S.A., Y. Nishiki, A.T. Templin, S.M. Cabrera, N.D. Stull, S.C. Colvin, C. Evans-Molina, J.L. Rickus, B. Maier, and R.G. Mirmira, *Islet β -Cell Endoplasmic Reticulum Stress Precedes the Onset of Type 1 Diabetes in the Nonobese Diabetic Mouse Model*. Diabetes, 2012. **61**(4): p. 818-827.
263. Miani, M., J. Barthson, M.L. Colli, F. Brozzi, M. Cnop, and D.L. Eizirik, *Endoplasmic reticulum stress sensitizes pancreatic beta cells to interleukin-1 β -induced apoptosis via Bim/A1 imbalance*. Cell Death & Disease, 2013. **4**(7): p. e701-e701.
264. Liuwantara, D., M. Elliot, M.W. Smith, A.O. Yam, S.N. Walters, E. Marino, A. McShea, and S.T. Grey, *Nuclear Factor- κ B Regulates β -Cell Death: A Critical Role for A20 in β -Cell Protection*. Diabetes, 2006. **55**(9): p. 2491-2501.
265. Kim, S., I. Millet, H.S. Kim, J.Y. Kim, M.S. Han, M.-K. Lee, K.-W. Kim, R.S. Sherwin, M. Karin, and M.-S. Lee, *NF- κ B prevents β cell death and autoimmune diabetes in NOD mice*. 2007. **104**(6): p. 1913-1918.
266. King, A.J.F., Y. Guo, D. Cai, J. Hollister-Lock, B. Morris, A. Salvatori, J.A. Corbett, S. Bonner-Weir, S.E. Shoelson, and G.C. Weir, *Sustained NF- κ B Activation and Inhibition in β -Cells Have Minimal Effects on Function and Islet Transplant Outcomes*. PLOS ONE, 2013. **8**(10): p. e77452.
267. Barnes, P. and M. Karin, *Nuclear Factor- κ B — A Pivotal Transcription Factor in Chronic Inflammatory Diseases*. The New England journal of medicine, 1997. **336**: p. 1066-71.
268. Rotariu, D., E.E. Babes, D.M. Tit, M. Moisi, C. Bustea, M. Stoicescu, A.-F. Radu, C.M. Vesa, T. Behl, A.F.J.B. Bungau, and Pharmacotherapy, *Oxidative stress—*

- Complex pathological issues concerning the hallmark of cardiovascular and metabolic disorders*. 2022. **152**: p. 113238.
269. Alghazeer, R., N. Alghazir, N. Awayn, O. Ahtiweh, and S. Elgahmasi, *Biomarkers of oxidative stress and antioxidant defense in patients with type 1 diabetes mellitus*. *Ibnosina Journal of Medicine and Biomedical Sciences*, 2018. **10**(06): p. 198-204.
270. Codoñer-Franch, P., S. Pons-Morales, L. Boix-García, and V. Valls-Bellés, *Oxidant/antioxidant status in obese children compared to pediatric patients with type 1 diabetes mellitus*. 2010. **11**(4): p. 251-257.
271. Salmonowicz, B., M. Krzystek-Korpacka, A.J.A.i.c. Noczyńska, and e. medicine, *Trace elements, magnesium, and the efficacy of antioxidant systems in children with type 1 diabetes mellitus and in their siblings*. 2014. **23**(2): p. 259-268.
272. Pisoschi, A.M. and A.J.E.j.o.m.c. Pop, *The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review*. 2015. **97**: p. 55-74.
273. Ma, L., F. Wu, Q. Shao, G. Chen, L. Xu, F.J.D.d. Lu, development, and therapy, *Baicalin alleviates oxidative stress and inflammation in diabetic nephropathy via Nrf2 and MAPK signaling pathway*. 2021: p. 3207-3221.
274. Chen, Y.-H., Z.-W. Chen, H.-M. Li, X.-F. Yan, and B.J.J.o.d.r. Feng, *AGE/RAGE-induced EMP release via the NOX-derived ROS pathway*. 2018. **2018**(1): p. 6823058.
275. Xu, X., Q. Chu, J. Chu, Z. Cai, Y. Xuan, B. Luo, S. Li, J. Chen, S. Luo, and Y.J.N.F.y.k.d.x.x.b.J.o.S.M.U. Wang, *Effect of dissipating phlegm and blood stasis simultaneously on ages/rage axis and oxidative stress in rats with diabetic myocardial microangiopathy*. 2021. **41**(10): p. 1527-1533.
276. Bhattacharya, S., M. Ahir, P. Patra, S. Mukherjee, S. Ghosh, M. Mazumdar, S. Chattopadhyay, T. Das, D. Chattopadhyay, and A. Adhikary, *PEGylated-thymoquinone-nanoparticle mediated retardation of breast cancer cell migration by deregulation of cytoskeletal actin polymerization through miR-34a*. *Biomaterials*, 2015. **51**: p. 91-107.
277. Alam, S., Z.I. Khan, G. Mustafa, M. Kumar, F. Islam, A. Bhatnagar, and F.J.J.I.j.o.n. Ahmad, *Development and evaluation of thymoquinone-encapsulated chitosan nanoparticles for nose-to-brain targeting: a pharmacoscintigraphic study*. 2012: p. 5705-5718.
278. Jost, L.M., J.M. Kirkwood, and T.L. Whiteside, *Improved short- and long-term XTT-based colorimetric cellular cytotoxicity assay for melanoma and other tumor cells*. *Journal of Immunological Methods*, 1992. **147**(2): p. 153-165.
279. Marzorati, S. and M.J.I.L. Ramirez-Dominguez, *Mouse islet isolation*. 2015: p. 83-107.
280. Stull, N.D., A. Breite, R. McCarthy, S.A. Tersey, and R.G. Mirmira, *Mouse Islet of Langerhans Isolation using a Combination of Purified Collagenase and Neutral Protease*. *JoVE*, 2012(67): p. e4137.
281. Velasco, M., C. Larqué, C.M. Díaz-García, C. Sanchez-Soto, and M. Hiriart, *Rat Pancreatic Beta-Cell Culture*, in *Neurotrophic Factors: Methods and Protocols*, S.D. Skaper, Editor. 2018, Springer New York: New York, NY. p. 261-273.
282. Ohkawa, H., N. Ohishi, and K. Yagi, *Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction*. *Analytical Biochemistry*, 1979. **95**(2): p. 351-358.
283. Ellman, G.L., *Tissue sulfhydryl groups*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1959. **82**(1): p. 70-77.
284. Nandy, S., H.S.J.A.J.o.P.S. Paul, and Research, *In vitro evaluation of antioxidant activity of Leucas plukenetii (Roth) Spreng*. 2011.

285. Nakata, A., Y. Imamura, and H. Nakai, *Extension of the Core-Valence-Rydberg B3LYP Functional to Core-Excited-State Calculations of Third-Row Atoms*. Journal of Chemical Theory and Computation, 2007. **3**(4): p. 1295-1305.
286. Mayo, S.L., B.D. Olafson, and W.A. Goddard, *DREIDING: a generic force field for molecular simulations*. The Journal of Physical Chemistry, 1990. **94**(26): p. 8897-8909.
287. Hosni, A., A. Abdel-Moneim, M. Hussien, M.I. Zanaty, Z.E. Eldin, and A.A.G. El-Shahawy, *Therapeutic significance of thymoquinone-loaded chitosan nanoparticles on streptozotocin/nicotinamide-induced diabetic rats: In vitro and in vivo functional analysis*. International Journal of Biological Macromolecules, 2022. **221**: p. 1415-1427.
288. Hao, J., B. Guo, S. Yu, W. Zhang, D. Zhang, J. Wang, and Y. Wang, *Encapsulation of the flavonoid quercetin with chitosan-coated nano-liposomes*. LWT - Food Science and Technology, 2017. **85**: p. 37-44.
289. Sari, T.P., B. Mann, R. Kumar, R.R.B. Singh, R. Sharma, M. Bhardwaj, and S. Athira, *Preparation and characterization of nanoemulsion encapsulating curcumin*. Food Hydrocolloids, 2015. **43**: p. 540-546.
290. Greenwald, R.B., Y.H. Choe, J. McGuire, and C.D. Conover, *Effective drug delivery by PEGylated drug conjugates*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2003. **55**(2): p. 217-250.
291. Zamani, M., M. Aghajanzadeh, K. Rostamizadeh, H. Kheiri Manjili, M. Fridoni, and H. Danafar, *In vivo study of poly (ethylene glycol)-poly (caprolactone)-modified folic acid nanocarriers as a pH responsive system for tumor-targeted co-delivery of tamoxifen and quercetin*. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 2019. **54**: p. 101283.
292. Ayubi, M., M. Karimi, S. Abdpour, K. Rostamizadeh, M. Parsa, M. Zamani, and A. Saedi, *Magnetic nanoparticles decorated with PEGylated curcumin as dual targeted drug delivery: Synthesis, toxicity and biocompatibility study*. Materials Science and Engineering: C, 2019. **104**: p. 109810.
293. Khatoon, K., A. Ali, F.J. Ahmad, Z. Hafeez, M.M.A. Rizvi, S. Akhter, and S. Beg, *Novel nanoemulsion gel containing triple natural bio-actives combination of curcumin, thymoquinone, and resveratrol improves psoriasis therapy: in vitro and in vivo studies*. Drug Delivery and Translational Research, 2021. **11**(3): p. 1245-1260.
294. Firmansyah, A., O. Suprijana, and Y. Riesmawati, *FTIR DERIVATIVE SPECTRA ANALYSIS OF BEEF AND PORK PROTEIN*. Indonesian Journal of Pharmaceutical Science Technology, 2015. **4**(1).
295. Raschi, A., E. Romano, A. Benavente, A.B. Altabef, and M. Tuttolomondo, *Structural and vibrational analysis of thymoquinone*. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2010. **77**(2): p. 497-505.
296. Abdul Shahed, M.S. and A.H. Mageed, *Synthesis and Biological Activity of Barbituric acid-linked Isatin Derivatives*. Egyptian Academic Journal of Biological Sciences. C, Physiology and Molecular Biology, 2023. **15**(2): p. 11-23.
297. Fan, Y., J. Yao, M. Huang, C. Linghu, J. Guo, and Y. Li, *Non-conjugated polymer dots for fluorometric and colorimetric dual-mode detection of quercetin*. Food Chemistry, 2021. **359**: p. 129962.
298. Chahardoli, A., P. Hajmomeni, M. Ghowsi, F. Qalekhani, Y. Shokoohinia, and A. Fattahi, *Optimization of Quercetin-Assisted Silver Nanoparticles Synthesis and Evaluation of Their Hemocompatibility, Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Antibacterial effects*. Global Challenges, 2021. **5**(12): p. 2100075.

299. Tran, P.H.-L., T.T.-D. Tran, J.B. Park, and B.-J. Lee, *Controlled release systems containing solid dispersions: strategies and mechanisms*. Pharmaceutical research, 2011. **28**: p. 2353-2378.
300. Mohan, P.K., G. Sreelakshmi, C. Muraleedharan, and R. Joseph, *Water soluble complexes of curcumin with cyclodextrins: Characterization by FT-Raman spectroscopy*. Vibrational Spectroscopy, 2012. **62**: p. 77-84.
301. Yaylayan, V.A. and A.A. Ismail, *Investigation of the enolization and carbonyl group migration in reducing sugars by FTIR spectroscopy*. Carbohydrate Research, 1995. **276**(2): p. 253-265.
302. Amir, R.M., F.M. Anjum, M.I. Khan, M.R. Khan, I. Pasha, and M. Nadeem, *Application of Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy for the identification of wheat varieties*. Journal of food science and technology, 2013. **50**: p. 1018-1023.
303. Mashhor, N., S. Fuzi, N. Abdullah, and S. Asman, *The development of a pectin-based food ink from locally sourced durian rind waste for possible use as a 3d printable food material*. Borneo Journal of Resource Science and Technology, 2022. **12**: p. 1-95.
304. Davidov-Pardo, G. and D.J. McClements, *Resveratrol encapsulation: Designing delivery systems to overcome solubility, stability and bioavailability issues*. Trends in food science and technology, 2014. **38**(2): p. 88-103.
305. McDermott, M., A. Eustace, S. Busschots, L. Breen, M. Clynes, N. O'Donovan, and B. Stordal, *In vitro Development of Chemotherapy and Targeted Therapy Drug-Resistant Cancer Cell Lines: A Practical Guide with Case Studies*. 2014. **4**.
306. Acharya, S., F. Dilnawaz, and S.K. Sahoo, *Targeted epidermal growth factor receptor nanoparticle bioconjugates for breast cancer therapy*. Biomaterials, 2009. **30**(29): p. 5737-5750.
307. Chettri, A., A. Subba, G.P. Singh, and P.P. Bag, *Pharmaceutical co-crystals: A green way to enhance drug stability and solubility for improved therapeutic efficacy*. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2024. **76**(1): p. 1-12.
308. Macedo, L.d.O., J.F. Masiero, and N.A. Bou-Chacra, *Drug Nanocrystals in Oral Absorption: Factors That Influence Pharmacokinetics*. 2024. **16**(9): p. 1141.
309. Yun, G., Z. Yun, Y. Kim, and K. Han, *Factors Affecting the Morphology of Granular Sludge in Phosphorus-Accumulating Organism (PAO) and Denitrifying PAO (DPAO) Sequencing Batch Reactors*. 2023. **15**(23): p. 4108.
310. Saha, C., A. Kaushik, A. Das, S. Pal, and D. Majumder, *Anthracycline Drugs on Modified Surface of Quercetin-Loaded Polymer Nanoparticles: A Dual Drug Delivery Model for Cancer Treatment*. PLOS ONE, 2016. **11**(5): p. e0155710.
311. Chen, Y., D. Wu, W. Zhong, S. Kuang, Q. Luo, L. Song, L. He, X. Feng, and X. Tao, *Evaluation of the PEG Density in the PEGylated Chitosan Nanoparticles as a Drug Carrier for Curcumin and Mitoxantrone*. 2018. **8**(7): p. 486.
312. Gaber, N.N., Y. Darwis, K.K. Peh, and Y.T. Tan, *Characterization of polymeric micelles for pulmonary delivery of beclomethasone dipropionate*. J Nanosci Nanotechnol, 2006. **6**(9-10): p. 3095-101.
313. Demirbolat, G.M., Ö. Erdoğan, G.P. Coşkun, and Ö. Çevik, *PEG4000 modified liposomes enhance the solubility of quercetin and improve the liposome functionality: in vitro characterization and the cellular efficacy*. Turk J Chem, 2022. **46**(4): p. 1011-1023.
314. Abdoune, Y., Y. Benguerba, S. Benabid, H. Khither, W. Sobhi, and D. Benachour, *Numerical investigation of polyethylene glycol polymer (PEG) and dithymoquinone (DTQ) interaction using molecular modeling*. Journal of Molecular Liquids, 2019. **276**: p. 134-140.

315. Mostofa, A.G.M., M.K. Hossain, D. Basak, and M.S. Bin Sayeed, *Thymoquinone as a Potential Adjuvant Therapy for Cancer Treatment: Evidence from Preclinical Studies*. 2017. **8**.
316. Almajali, B., H.A.N. Al-Jamal, W.R.W. Taib, I. Ismail, M.F. Johan, A.A. Doolaanea, and W.N. Ibrahim, *Thymoquinone, as a Novel Therapeutic Candidate of Cancers*. 2021. **14**(4): p. 369.
317. Davarnejad, R., K. Layeghy, M. Soleymani, A.J.C.E. Ayazi, and Technology, *Encapsulation of quercetin in a mixed Nanomicellar system to enhance its cytotoxicity against breast cancer cells*. 2022. **45**(6): p. 1100-1105.
318. San, H.H.M., K.P. Alcantara, B.P.I. Bulatao, W. Chaichompoo, N. Nalinratana, A. Suksamrarn, O. Vajragupta, P. Rojsitthisak, and P. Rojsitthisak, *Development of Turmeric Oil—Loaded Chitosan/Alginate Nanocapsules for Cytotoxicity Enhancement against Breast Cancer*. 2022. **14**(9): p. 1835.
319. Sohrabi, B., M. Qadbeigi, F. Sabouni, and A.J.I.J.o.B. Hamta, *Thymoquinone Nanoparticle Induces Apoptosis and Cell Migration Retardation through Modulating of SUMOylation Process Genes in Breast Cancer Cell Line*. 2024. **22**(1): p. e3676.
320. Kittl, M., M. Beyreis, M. Tumurkhuu, J. Fürst, K. Helm, A. Pitschmann, M. Gaisberger, S. Glasl, M. Ritter, and M. Jakab, *Quercetin Stimulates Insulin Secretion and Reduces the Viability of Rat INS-1 Beta-Cells*. *Cell Physiol Biochem*, 2016. **39**(1): p. 278-93.
321. Curcio, M., G. Cirillo, O.I. Parisi, F. Iemma, N. Picci, and F. Puoci, *Quercetin-Imprinted Nanospheres as Novel Drug Delivery Devices*. 2012. **3**(2): p. 269-282.
322. Hosseinzadeh, Z., I. Alemzadeh, and M. Vossoughi, *Investigation of encapsulation of pancreatic beta cells and curcumin within alginate microcapsules*. 2024. **102**(2): p. 561-573.
323. Zhou, J., S. Zhou, J. Tang, K. Zhang, L. Guang, Y. Huang, Y. Xu, Y. Ying, L. Zhang, and D. Li, *Protective effect of berberine on beta cells in streptozotocin- and high-carbohydrate/high-fat diet-induced diabetic rats*. *European Journal of Pharmacology*, 2009. **606**(1): p. 262-268.
324. Yavuz, O., M. Cam, N. Bukan, A. Guven, and F. Silan, *Protective effect of melatonin on β -cell damage in streptozotocin-induced diabetes in rats*. *Acta Histochemica*, 2003. **105**(3): p. 261-266.
325. Kagami, K., H. Morita, K. Onda, T. Hirano, and K. Oka, *Protective effect of caffeine on streptozotocin-induced beta-cell damage in rats*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2008. **60**(9): p. 1161-1165.
326. Coskun, O., M. Kanter, A. Korkmaz, and S. Oter, *Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and β -cell damage in rat pancreas*. *Pharmacological Research*, 2005. **51**(2): p. 117-123.
327. Duan, J., M. Yang, Y. Liu, S. Xiao, and X.J.E.P. Zhang, *Curcumin protects islet beta cells from streptozotocin-induced type 2 diabetes mellitus injury via its antioxidative effects*. 2022. **73**(6): p. 942-946.
328. Ganugula, R., M. Arora, P. Jaisamut, R. Wiwattanapatapee, H.G. Jørgensen, V.P. Venkatpurwar, B. Zhou, A. Rodrigues Hoffmann, R. Basu, S. Guo, and N. Majeti, *Nano-curcumin safely prevents streptozotocin-induced inflammation and apoptosis in pancreatic beta cells for effective management of Type 1 diabetes mellitus*. *Br J Pharmacol*, 2017. **174**(13): p. 2074-2084.
329. Mekhemar, M., Y. Hassan, and C.J.A. Dörfer, *Nigella sativa and thymoquinone: A natural blessing for periodontal therapy*. 2020. **9**(12): p. 1260.
330. Baştuğ, A.Y., C. Tomruk, E. Güzel, İ. Özdemir, G. Duygu, E. Kütan, G.M.Y. Ülker, and F. Arıcı, *The effect of local application of thymoquinone, Nigella sativa's bioactive*

-
- component, on bone healing in experimental bone defects infected with Porphyromonas gingivalis*. J Periodontal Implant Sci, 2022. **52**(3): p. 206-219.
331. Khosravi, F., F. Kharazmi, M. Kamran, K. Malekzadeh, A. Talebi, N.J.I.j.o.p. Soltani, pathophysiology, and pharmacology, *The role of PPAR- γ and NF κ B genes expression in muscle to improve hyperglycemia in STZ-induced diabetic rat following magnesium sulfate administration*. 2018. **10**(3): p. 124.
332. Wang, X., N.L. Buechler, A. Martin, J. Wells, B. Yoza, C.E. McCall, and V.J.P.o. Vachharajani, *Correction: Sirtuin-2 Regulates Sepsis Inflammation in ob/ob Mice*. 2016. **11**(9): p. e0162560.
333. Khosravi, F., F. Kharazmi, M. Kamran, K. Malekzadeh, A. Talebi, and N. Soltani, *The role of PPAR- γ and NF κ B genes expression in muscle to improve hyperglycemia in STZ-induced diabetic rat following magnesium sulfate administration*. Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol, 2018. **10**(3): p. 124-131.
334. Das, D., A. Banerjee, S. Mukherjee, and B.K. Maji, *Quercetin inhibits NF- κ B and JAK/STAT signaling via modulating TLR in thymocytes and splenocytes during MSG-induced immunotoxicity: an in vitro approach*. Molecular Biology Reports, 2024. **51**(1): p. 277.
335. Lu, Z., H. Wang, M. Ishfaq, Y. Han, X. Zhang, X. Li, B. Wang, X. Lu, and B. Gao, *Quercetin and AMPK: A Dynamic Duo in Alleviating MG-Induced Inflammation via the AMPK/SIRT1/NF- κ B Pathway*. Molecules, 2023. **28**(21).

Publications scientifiques

Rechda Amel Tachour, Abdelmalek Rezgui, Ayoub Attoui, Mustapha Tacherfiout, Fatma Zahra Hab, Rania Derguine, Djaouida Charif, Kamel Gaci, Rym Agred, Anfel Benmansour, Bachra Khettal, Yacine Benguerba, Widad Sobhi, Enhancing anti-diabetic properties of thymoquinone: The role of PEG4000-Encapsulated nanoparticles in insulin secretion and β cell protection, Journal of Drug Delivery Science and Technology, Volume 98, 2024, 105926, ISSN 1773-2247, <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2024.105926>.

Rechda Amel Tachour, Widad Sobhi, Abdelmalek Rezgui, Rania Derguine, Yacine Benguerba, Hakim Rahmoune, Mounira Amrane, Dhiaa Errahmane Abdelmelek, Nada Boutrid, Thymoquinone: A Promising Anti-diabetic Molecule!, Metabolism, Volume 142, Supplement, 2023, 155472, ISSN 0026-0495, <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2023.155472>.

Abdelmalek Rezgui, **Rechda Amel Tachour**, Rania Derguine, Anfel Benmansour, Fatma Zahra Hab, Rym Agred, Hakim Rahmoune, Nada Boutrid, N. Baiben, A. Baiben, Widad SOBHI, Diabetes, β cell apoptosis and the Role of SIRT2 and Rel/A NF κ B subunit, Metabolism, Volume 153, Supplement, 2024, 155894, ISSN 0026-0495, <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2024.155894>.

Widad Sobhi, **Rachda Amel Tachour**, Nada Boutrid, Hakim Rahmoune, Mounira Amrane, Pierre Duez, Nigella sativa for the management of hyperglycaemia and dyslipidemia, American Heart Journal, Volume 242, 2021, Page 174, ISSN 0002-8703, <https://doi.org/10.1016/j.ahj.2021.10.071>.

Rania Derguine, Abdelmalek Rezgui, **Rechda Amel Tachour**, Abdelhalim Khenchouche, Nada Boutrid, Hakim Rahmoune, Oussama Kadded, Djaouida Cherif, Hicham Meziti, Yacine Benguerba, Widad Sobhi, Insulin Resistance and Diabetes Modulation with Curcumin: Anti inflammatory Effects, Metabolism, Volume 142, Supplement, 2023, 155507, ISSN 0026-0495, <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2023.155507>.

Communications internationales

Rechda Amel Tachour, Abdelmalek Rezgui, Djaouida Charif, Mustapha Tacherfiout, Fatma Zahra Hab, Rania Derguine, Kamel Gaci, Rym Agred, Anfel Benmansour, Bachra Khettal, Widad Sobhi. Stimulated of insulin secretion, protective and restorative effect of thymoquinone on β -cell line. Séminaire international intitulé: The valorization of biotechnological research

results by bioindustries. À l'Université des Frères Mentouri Constantine, Algérie. 4,5 octobre 2023.

Abdemalek Rezgui, **Rechda Amel Tachour**, Rania Derguine, Anfel Benmesseur, Fatma Zahra Hab, Rym Agred, Hakim Rahmoune, Nada Boutrid, N. Baiben, A. Baiben, Widad Sobhi. Diabetes, β Cell Apoptosis and the Role of SIRT2 and Rel/A NF κ B Subunit. Séminaire international intitulé: 21st word Congress Insulin Resistance Diabetes & Cardiovascular Disease. Los Angeles, CA, 7-9 décembre 2023

Sabrina Boucetta, Rania Derguine, **Rechda Amel Tachour**, Widad Sobhi. Evaluation of the toxic effects of the antibiotic erythro-mycin on farmed fish Tilapia (*Oreochromis* sp.) using a multi-biomarker approach. Séminaire international intitulé: The International Conference and Exhibition for Science. Riyadh, Saudi Arabia, 06-08 Février 2023

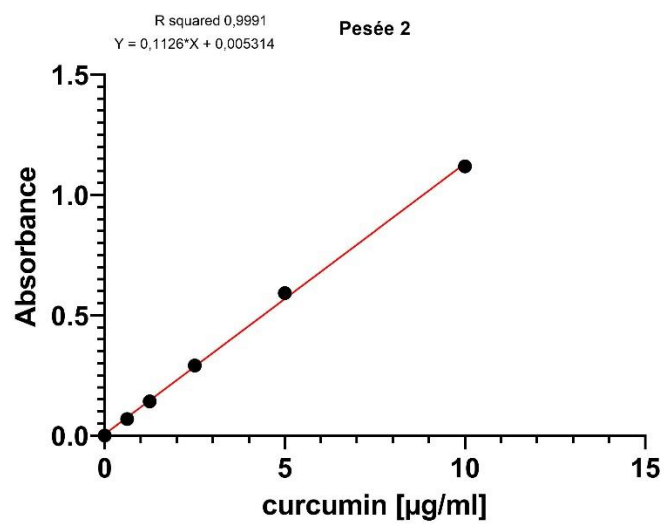
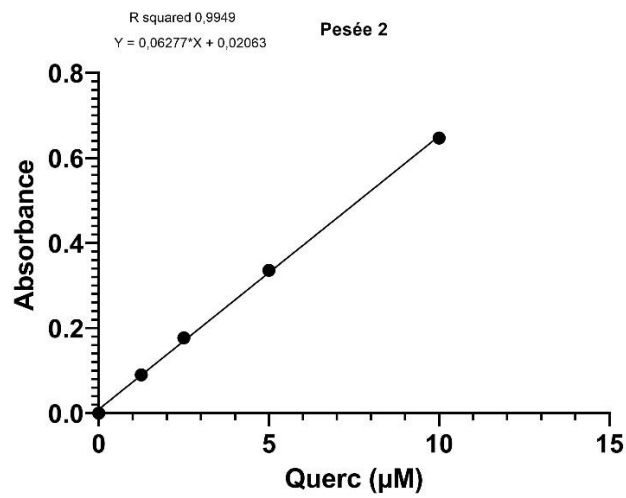
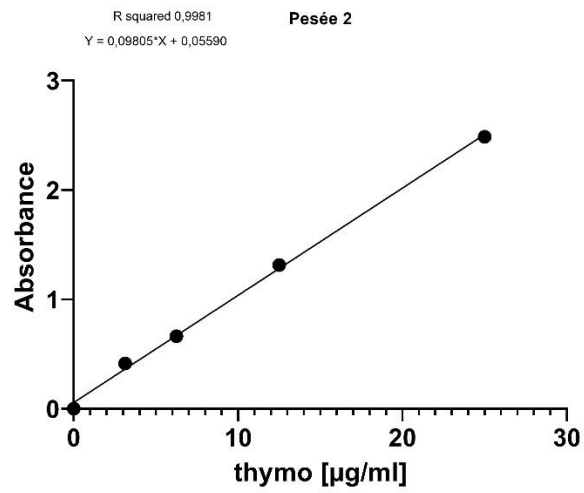
Benmanseur Anfel, **Tachour Rechda**, Hab Fatma, Tacherfiout Mustapha, Rezgui Abdelmalek, Khettal Bachra, Sobhi Widad. The rome of Enhanced Phenolic Compounds from *Erica multiflora* in Stimulating Insulin secretion. Séminaire international intitulé : Applied Research in Food Sciences, Health and Environement. Université de Annaba, 17-18 décembre 2023.

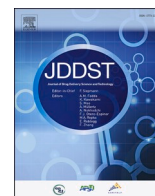
Communications Nationales

Rechda Amel Tachour, Abdelmalek Rezgui, Fatma Zahra Hab, Rania Derguine, Anfel Benmanseur, Djaouida Charif, Kamel Gaci, Rym Agred, Mustapha Tacherfiout, Bachra Khettal, Widad Sobhi. Effect of Thymoquinone on the Viability and Insulin Secretion of Pancreatic Islets Isolated from Mice. Journées Nationales intitulées : Sixièmes journées SNV. 28-29 et 30 novembre 2023.

Annexe

Annexe 1 : Courbe d'étalonnage des composés libre TQ, Quer, Cur.





Enhancing anti-diabetic properties of thymoquinone: The role of PEG4000-Encapsulated nanoparticles in insulin secretion and β -cell protection

Rechda Amel Tachour^{a,b}, Abdelmalek Rezgui^b, Ayoub Attoui^c, Mustapha Tacherfiout^a, Fatma Zahra Hab^{a,b}, Rania Derguine^{c,b}, Djaouida Charif^b, Kamel Gaci^b, Rym Agred^b, Anfel Benmansour^{a,b}, Bachra Khettal^a, Yacine Benguerba^d, Widad Sobhi^{b,*}

^a Laboratory of Plant Biotechnology and Ethnobotany, Faculty of Nature and Life Sciences, University of Bejaia, Bejaia, 06000, Algeria

^b Biotechnology Research Center (CRBT), Nouvelle ville Ali Mendjli, Constantine, 25000, Algeria

^c Laboratory of Applied Biochemistry, Faculty of Life and Nature Sciences, Ferhat Abbas Setif 1 University (UFAS1), Setif, 19000, Algeria

^d Laboratoire de Biopharmacie et PharmacoTechnie (LBPT), Department of Process Engineering, Faculty of Technology, Ferhat ABBAS Setif-1 University, Setif, 19000, Algeria

ARTICLE INFO

Keywords:

Thymoquinone
Encapsulation
TQ-PEG₄₀₀₀-NanoParticles
NIT-1 line
Langerhans islets
Insulin secretion

ABSTRACT

Numerous studies have identified Thymoquinone (TQ) as a potential antidiabetic agent. However, its low solubility in water hampers bioavailability. This study focuses on the impact of PEGylation on the antidiabetic properties of TQ. We found that encapsulating TQ with PEG₄₀₀₀ was highly effective, achieving an encapsulation efficiency of over 99 %. The stability of this formulation, TQ-PEG₄₀₀₀-NP, was assessed by monitoring the TQ release at different pH levels. We evaluated cytotoxicity in two cell lines, EMT6 and NIT-1 (β -cells). Free TQ showed moderate cytotoxicity towards NIT-1 cells but was non-toxic to EMT6 cells. Remarkably, TQ-PEG₄₀₀₀-NP significantly enhanced the viability of the NIT-1 cells. Further studies assessed insulin secretion in isolated Langerhans islets and NIT-1 cells. Both free and PEGylated TQ markedly improved insulin secretion (75 μ l U.ml⁻¹ in control and 140 μ l U.ml⁻¹ in islets treated with TQ and TQ-PEG₄₀₀₀-NP). In addition, PEGylation substantially increased the viability of STZ-treated β -cells. The beneficial effects of both TQ and TQ-PEG₄₀₀₀-NP are linked to their influence on oxidative stress markers, such as GSH, MDA, and SOD. This study highlights the effectiveness of thymoquinone as an anti-diabetic agent, emphasizing its protective and regenerative effects on β -cells and Langerhans islets, and its ability to enhance insulin secretion. Encapsulation with PEG₄₀₀₀ mitigates TQ's cytotoxicity of TQ to β -cells, bolsters its cytoprotective and regenerative properties, and maintains its insulin-stimulating capability.

1. Introduction

Diabetes mellitus, a chronic metabolic disease [1], is defined as increased blood sugar levels resulting from changes in insulin production or activity [2]. It is one of the top ten causes of death worldwide [3]. 2021, diabetes affected approximately 537 million adults globally, with projections of 643 million by 2030 and 783 million by 2045, as reported by the International Diabetes Federation (IDF) [4]. This growing

prevalence places a substantial economic burden on healthcare systems [5], as noted by Yuen et al. [6].

Thymoquinone (TQ) is the primary compound of *Nigella sativa* (2-methyl-5-isopropyl-1,4-benzoquinone (C₁₀H₁₂O₂) with a molecular weight of 164.2 g/mol), and is extensively used as a culinary ingredient and herbal remedy for various health conditions [7]. TQ is responsible for many of the biological effects of *Nigella sativa* [1], including significant antineoplastic [8,9] and various pharmacological properties such

Abbreviations: EMT-6, Experimental Mammary Tumor-6; NIT-1, Non-Obese Diabetic (NOD) Insulinoma Transgenic 1; GSH, Reduced Glutathione; MDA, Malondialdehyde; XO, xanthin oxidase; SOD, superoxide dismutase; PEG, Polyethylene glycol; STZ, Streptozocin; XTT, sodium 3'-bis (4-methoxy-6-nitro) benzene sulfonic acid hydrate; DMSO, Dimethyl sulfoxide; TCA, Trichloroacetic acid; TBA, Thiobarbituric acid; TQ-PEG₄₀₀₀-NP, Thymoquinone-PEG₄₀₀₀-nanoparticles.

* Corresponding author. Centre de Recherche en Biotechnologie (CRBT), Ali Mendjli Nouvelle Ville, UV 03, BP E73, Constantine, Algeria.

E-mail address: w.sobhi@crbt.dz (W. Sobhi).

<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2024.105926>

Received 4 February 2024; Received in revised form 10 June 2024; Accepted 28 June 2024

Available online 28 June 2024

1773-2247/© 2024 Elsevier B.V. All rights reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.

as anti-inflammatory [10], antidiabetic [11,12], antioxidant [13,14], and immunomodulatory effects [15]. It reduces blood sugar levels in people with diabetes by increasing peripheral glucose uptake, decreasing hepatic glucose production, and inhibiting glycogenolysis [1].

Thymoquinone (TQ) has several intrinsic characteristics that make it a promising antidiabetic agent. TQ is recognized for its ability to reduce blood glucose levels by increasing peripheral glucose uptake, decreasing hepatic glucose production, and inhibiting glycogenolysis [16]. In addition, it possesses anti-inflammatory, antioxidant, and immunomodulatory properties, which may help improve pancreatic function and insulin sensitivity [17]. Previous studies have also suggested that TQ may protect pancreatic beta cells against oxidative stress and cell death, thereby helping to preserve beta cell function and regulate insulin secretion [18].

The potential of TQ as an antidiabetic agent is often limited by its low solubility in water, leading to bioavailability challenges. Consequently, the development of nanoparticles to enhance TQ's solubility and cellular bioavailability of TQ is an active research area. Nano-encapsulation of water-insoluble drugs is gaining attention because of its protective properties against environmental factors and its ability to slow down drug metabolism. TQ's lipophilic nature of TQ, poor gastrointestinal liquid solubility, delayed absorption, extensive enzymatic degradation in the gastrointestinal tract, limited physicochemical stability, and rapid excretion necessitate high oral dosages to treat various conditions [19, 20].

PEG hydrosoluble, a commercially available, FDA-approved, safe, and non-immunogenic polymer, is widely used in medical applications owing to its biocompatibility and amphiphilic nature. Conjugation with PEG helps prevent crossing the hemato-endocrine barrier, reduces neurotoxicity associated with free drugs, and extends the half-life of the drugs [21]. PEG-4000, with a molecular weight of approximately 4000 g/mol and consisting of nine ethylene glycol subunits, is utilized in medicine as a laxative and lubricant, aiding in cell membrane fusion and sustained release of PEGylated active molecules [22,23].

This study aimed to develop a nanoformulation, TQ-PEG 4000-NP, to enhance its efficacy as a potential therapeutic agent and to comprehensively investigate the effects of this formulation on the antidiabetic properties of thymoquinone (TQ).

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Thymoquinone and Pluronic P123 were purchased from Sigma-Aldrich (USA). [PEG₄₀₀₀ (powder; MW 3500–4500)] was obtained from Merck (Germany). Acetonitrile, DMSO, and Ethanol were acquired from Merck (Darmstadt, Germany). Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM), L-glutamine, streptomycin, and penicillin were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) as culture media and supplements. Fetal bovine serum (FBS) was procured from Invitrogen (USA), while Culture media RPMI1640 was sourced from Sigma Aldrich (USA). Insulin Mouse ELISA Kit was obtained from Thermo Fisher Scientific (USA).

2.2. PEG₄₀₀₀-TQ synthesis

TQ-PEG₄₀₀₀-NP nanoparticles were synthesized following the method outlined by Bhattacharya et al. [24]. This process involved the preparation of two distinct solutions for TQ PEGylation. The experimental protocol for the formulation of PEG-4000-TQ nanoparticles is presented in Table 1.

2.3. Encapsulation efficiency test

To evaluate the encapsulation efficiency of the TQ-PEG₄₀₀₀

Table 1

The formulation of TQ-PEG₄₀₀₀-NP.

Ingredients	Quantity Used	Preparation Process
Solution 1:		
TQ	200 mg	TQ 200 mg dissolved in 20 ml of acetonitrile, addition of 25 mg of P123, sonication for 15 min
Acetonitrile	20 ml	
P123	25 mg	
Solution 2:		
PEG-4000	1g	PEG-4000 1 g dispersed in 5 ml of distilled water using an ultrasonic bath for 30 min
Distilled water	5 ml	
Gradually mixing Solution 1 (TQ + P123) into Solution 2 (PEG-4000) over 30 min. Sonication and overnight evaporation at room temperature. Storage at 4 °C.		

nanoparticle complex, the concentration of the unencapsulated (free) TQ in the solution was measured. This was achieved by preparing the TQ-PEG₄₀₀₀ complex at various concentrations ranging from 10 μM to 0.625 μM. To facilitate this analysis, a calibration curve for free TQ was constructed. This involved measuring the absorbance at known concentrations of free TQ to establish a reference for comparison. The encapsulation efficiency was calculated using the following equation [25], and all measurements were conducted in triplicate. This approach allowed for precise quantification of the fraction of TQ successfully encapsulated within the PEG₄₀₀₀ nanoparticles.

$$EE\% = \frac{(Total\ drug - Free\ drug)}{Total\ drug} \times 100 \quad (1)$$

2.4. Drug release test

The release of encapsulated TQ from the TQ-PEG₄₀₀₀-NP complex was assessed spectrophotometrically. To simulate various physiological environments, three different media were prepared, each representing a distinct pH condition: acidic (gastric, pH 1.2), neutral (intestinal, pH 6.9), and basic (blood, pH 7.4). TQ release was evaluated by measuring the free TQ concentration in the TQ-PEG₄₀₀₀-NP solution. For this assessment, a 1 ml sample of the TQ-PEG₄₀₀₀-NP solution, at a concentration of [2 mg/ml], was collected at regular intervals: every 10 min during the first hour and 30 min for the following 2 h. The concentration of free TQ in these samples was determined using a UV-visible spectrophotometer, which measures the absorbance at a wavelength of 253 nm. The concentration of TQ was calculated based on a previously established standard curve (etalon curve). All experiments were conducted in triplicate to ensure reliability and reproducibility of the results. This systematic approach allowed for a comprehensive understanding of the TQ release profile under different pH conditions, closely mimicking the physiological environment encountered by orally administered drugs.

2.5. Characterization of TQ and TQ-PEG₄₀₀₀-NP by FTIR

The chemical characteristics of thymoquinone (TQ), P123 copolymer, PEG₄₀₀₀ polymer, and TQ-PEG₄₀₀₀-NP nanoparticles were analyzed using Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) provided by Shimadzu (Noisiel, France). Infrared spectral data were collected within a wavenumber spectrum ranging from 4000 to 500 cm⁻¹ at a resolution of 4 cm⁻¹. An average of five scans was performed for each sample to ensure thorough data collection. The analysis of these data was conducted using LabSolutions IR Software, facilitating a detailed examination of the chemical properties of these compounds.

2.6. Characterization of TQ-PEG₄₀₀₀-NP morphology by SEM/EDS

The morphology of the TQ-PEG₄₀₀₀-NP nanoparticles was meticulously examined using a Quattro S Scanning Electron Microscope (SEM) from Thermo Fisher Scientific (USA). The examination was conducted at

an accelerating voltage of 5.00 kV. Additionally, the microscope was equipped with an EDAX Octane Elect system, which enabled complementary quantitative analysis of the chemical elements present in the sample. This combination of high-resolution imaging and elemental analysis provided a comprehensive understanding of the physical structure and chemical composition of TQ-PEG₄₀₀₀-NP nanoparticles.

2.7. Cytotoxicity test of TQ and TQ-PEG₄₀₀₀-NP using XTT bioassay

2.7.1. Cell culture condition

The EMT6 mammary cancer cell line (CRL-2755) and NIT-1 mouse insulinoma cell line (CRL-2055) were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) in Washington, DC, USA. The cell lines were cultured in DMEM F12 and RPMI-1640 media, each enriched with 10 % fetal bovine serum (FBS) and 1 % penicillin/streptomycin. The culturing process was performed in an incubator set to a 5 % CO₂ atmosphere at a constant temperature of 37 °C. A traditional trypan blue staining method was employed along with the Neubauer counting chamber for cell quantification, allowing for accurate cell viability assessment and counting.

2.7.2. Cytotoxicity assay

The cytotoxic effects of thymoquinone (TQ), PEG₄₀₀₀, and TQ-PEG₄₀₀₀-NP were assessed in a mouse mammary cancer cell line (EMT6) and a mouse insulinoma cell line (NIT-1). This evaluation was conducted using the XTT cell proliferation assay [26], with the XTT cell proliferation kit sourced from Roche (Basel, Switzerland).

EMT6 and NIT-1 cell lines were seeded into a 96-well microplate and incubated at 37 °C in a 5 % CO₂ atmosphere for 24 h for cell attachment and growth. TQ was solubilized in DMSO and a series of dilutions were prepared with concentrations ranging from 1 to 30 µg/ml. Doxorubicin was used as a positive control for this experiment. After the initial 24-h incubation period, the three test substances were added to the cells in triplicate at each concentration. The cells were then incubated for an additional 72 h.

After post-incubation, the XTT reagent were treated with XTT reagent. Absorbance, indicative of cell viability, was measured using a spectrophotometer. Absorbance readings were taken at a wavelength range of 450–500 nm, specifically at 490 nm, with a reference wavelength of 630–690 nm, ideally at 660 nm. This method provides a quantitative evaluation of the cytotoxic effects of these substances on cancer and insulinoma cell lines.

2.8. Effect of TQ, PEG₄₀₀₀, and TQ-PEG₄₀₀₀-NP on Langerhans islets viability and insulin secretion

2.8.1. Isolation of Langerhans islets

A healthy female albino BALB/c mouse weighing approximately 27 g was used to isolate Langerhans islets. The mice were maintained in a controlled environment with a 12-h light/dark cycle and a temperature maintained at 28 ± 2 °C. All procedures involving animals were conducted following the ethical guidelines set forth by the Ethical Commission of the Biotechnology Research Center (C.R.Bt).

The isolation of islets encompassed three main stages: surgery, isolation, and purification. Initially, the mice were euthanized using anesthetic ether, and all subsequent procedures were conducted under sterile conditions. During dissection, a small incision was made in the abdominal area, followed by injection of collagenase solution into the common bile duct. The pancreas was then extracted and placed in iced Hanks/collagenase solution, minced, and digested at 37 °C [27]. Manual agitation was performed for 5 min to enhance the digestion. The enzymatic reaction was halted by adding ice-cold HBSS, and the islets were purified by centrifugation at 185g for 5 min [28]. The final step involved meticulously selecting and collecting pure Langerhans Islets in a Petri dish for primary culture.

The isolated islets were cultured in a 12-well dish in RPMI media

supplemented with 10 % FBS and 1 % penicillin/streptomycin and incubated at 37 °C in a 5 % CO₂ atmosphere. The experimental conditions were as follows: condition 1 involved untreated islets serving as a negative control; condition 2 included islets treated with 30 µg of PEG₄₀₀₀ as a positive control; condition 3 comprised islets treated with 30 µg/ml of TQ; and Condition 4 consisted of islets treated with 30 µg/ml of TQ-PEG₄₀₀₀-NP. Each condition was replicated three times to ensure the reliability of the results.

2.8.2. Viability test of the islets of Langerhans

Following a 48-h incubation period, islet cultures underwent a process to dissociate the cells from the islets. This was achieved by adding trypsin to the culture medium. The treated islets were then incubated with continuous stirring in a trypsin solution for 10 min at 37 °C. This step facilitated mechanical dispersal of the cells, which continued until approximately 80 % of the cells were dissociated.

The viability counts of both live and dead cells were determined to assess the viability of the cells after trypsin treatment. This was performed using a reversed-phase microscope, employing trypan blue staining to differentiate between viable and non-viable cells. Cell counting was performed using a Neubauer counting chamber, a widely used tool in cell culture for quantifying cell density [29].

2.8.3. Insulin secretion assay

The following methodology was used to assess insulin secretion. After incubation for 24 h, the Langerhans islets were first subjected to medium change. The existing culture medium was replaced with a similar volume of low-glucose DMEM. This setup was then incubated for 1 h 30 min at 37 °C in an atmosphere of 95 % oxygen and 5 % carbon dioxide. After incubation, the low-glucose medium was replaced with high-glucose DMEM. This change is crucial for stimulating insulin secretion by islets. The plate was again incubated for 1 h and 30 min while maintaining the same temperature and gas composition. Following the second incubation, the supernatant containing the secreted insulin was carefully collected. This supernatant was immediately stored at –80 °C to ensure the preservation of insulin for later analysis. Finally, insulin concentration in the supernatant was quantitatively measured using a Sandwich ELISA kit. This kit was designed to accurately detect and quantify insulin levels, making it an ideal choice for such biochemical assays.

2.8.4. Protective effect of free-TQ and TQ-PEG₄₀₀₀-NP of β-cells against STZ toxicity

NIT-1 cells were cultured in a 96-well plate in RPMI-1640 medium supplemented with the necessary nutrients. The cells were then incubated for 24 h at 37 °C in a 5 % CO₂ atmosphere. For the experimental setup, thymoquinone (TQ) and TQ-PEG₄₀₀₀-NP nanoparticles were prepared at two different concentrations, 10 µg/ml and 30 µg/ml. The preparations were then added to the cells.

To ensure the accuracy and reproducibility of the results, all the experimental conditions were replicated three times. Cultures were incubated for 24 h under the same conditions. Following this incubation period, the existing medium was discarded, and the cells were exposed to streptozotocin, which was added to fresh medium at a concentration of 6 mM. This step was aimed at inducing a specific cellular response relevant to this study. After another 24-h incubation period, the reagents from the XTT kit were introduced to the cultures. The purpose of these reagents was to facilitate colorimetric analysis of cell viability. Finally, the absorbance of the plates was measured using a spectrophotometer at a wavelength range of 450–690 nm. This measurement provided quantitative data on the cytotoxic effects of TQ and TQ-PEG₄₀₀₀-NP under induced conditions in the NIT-1 cell line.

2.8.5. Oxidative stress markers measurement

To evaluate the impact of thymoquinone (TQ) on oxidative stress in beta cells, an assay was conducted to measure three specific oxidative

stress markers, malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH), and Superoxide Dismutase (SOD), in the supernatant of beta cells treated with TQ.

MDA levels were determined according to protocol guidelines [30]. In this process, the concentration of MDA was calculated using its molar extinction coefficient, $\zeta 1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. The results were expressed as nmol of MDA per mL, providing a quantitative measure of lipid peroxidation in the cells. A protocol was followed for the measurement of GSH, a protocol [31] was followed. This assay allowed for the quantification of glutathione, a critical antioxidant that plays a significant role in cellular defense against oxidative stress. The SOD concentration was determined using the method established by Subhangkar et al. [32]. This method quantifies the activity of SOD, an enzyme that catalyzes the dismutation of superoxide into oxygen and hydrogen peroxide, thereby protecting against superoxide toxicity. SOD activity was calculated in standard units based on a specific formula, enabling the assessment of the antioxidant defense mechanism within β -cells.

$$\text{SOD (U)} = [(\text{Vp}-\text{Vs}) / (\text{Vp} \times 0.5)], \quad (2)$$

Vp = rate of pyrogallol auto-oxidation in the absence of the enzyme; Vs = rate of pyrogallol auto-oxidation in the presence of the enzyme; 0.5 = 50 % inhibition.

2.8.6. Effect of TQ and TQ-PEG₄₀₀₀-NP on insulin secretion

NIT-1 cells were cultured in a 96-well plate for an incubation period of 24 h. This step allows the cells to adhere and grow under controlled conditions. Following this initial incubation, treatments with thymoquinone (TQ), TQ-PEG₄₀₀₀-NP, and PEG₄₀₀₀ were prepared at two distinct concentrations: 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$. These treatments were then administered to the cell cultures. After a subsequent 24-h incubation period, the next phase involved the assessment of insulin secretion. This was achieved by stimulating the NIT-1 cells first with low-and then with high-glucose media, as per the established protocol. Changes in glucose concentration are a standard method to induce insulin secretion from beta cells, mimicking physiological responses to varying blood glucose levels. Finally, the concentration of insulin secreted by the cells was measured using a Mouse Ins1/Insulin-1 ELISA kit. This kit was designed to quantitatively determine the insulin levels in biological samples, providing accurate and reliable data. This assay was essential to evaluate the effects of TQ, TQ-PEG₄₀₀₀-NP, and PEG₄₀₀₀ on the insulin secretion capabilities of the NIT-1 cell line under different glucose conditions.

2.8.7. The regenerative effect of free-TQ and TQ-PEG₄₀₀₀-NP on NIT-1 β -cell line

The NIT-1 cell line was cultured in a 96-well plate and incubated for 24 h at 37 °C in a 5 % CO₂ atmosphere. Post incubation, Streptozotocin (STZ) at a concentration of 6 mM was added to each well, except for those designated as the negative control. This was followed by another incubation phase that lasted for 24 h.

Thymoquinone (TQ) was solubilized in 0.1 % DMSO, and TQ-PEG₄₀₀₀-NP nanoparticles were dissolved in PBS. These were prepared at two different concentrations, 10 and 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Each experimental setup was replicated three times to ensure consistency and accuracy of the results. The cells were incubated for an additional 48 h at 37 °C.

After the second incubation period, cells were treated with reagents from the XTT kit. This treatment is crucial for assessing the cell viability. Absorbance readings, indicating the extent of cellular metabolic activity, were measured in the wavelength range of 450–690 nm. This procedure provided insights into the cytotoxic effects of TQ and TQ-PEG₄₀₀₀-NP in the NIT-1 cell line under induction conditions.

2.8.8. Statistical analysis

GraphPad Prism 9 software was employed for the creation of plots

and the execution of statistical analyses. The data are presented as mean values \pm the standard error of the mean (SEM). The Analysis of Variance (ANOVA) test was utilized to compare three or more groups. This was followed by Tukey's post hoc test for detailed pairwise comparisons.

Statistical significance was determined based on the p-value, with a threshold of less than 0.05 ($p < 0.05$). Results that met this criterion were considered statistically significant, indicating a significant difference between the groups. This approach ensured rigorous and reliable data assessment, providing a clear understanding of the statistical relevance of the findings.

2.8.9. Theoretical investigation of the interaction TQ-PEG₄₀₀₀-NP

This study examined Polyethylene Glycol 4000, a polymer of ethylene oxide, which can be represented by the formula $[\text{HOCH}_2(\text{CH}_2\text{OCH}_2)_n\text{CH}_2\text{OH}]$, where n' denotes the number of repeating units. Density functional theory (DFT) was utilized to better understand the interactions between the atoms of thymoquinone (TQ) and the PEG₄₀₀₀. This type of simulation is crucial for understanding the adsorption mechanism and stability of the excipient–drug system. By analyzing these interactions at the molecular level, the DFT method provides valuable insights into how TQ molecules interact with and are stabilized by PEG₄₀₀₀ chains. Such an understanding is key to optimizing the formulation and enhancing the performance of drug delivery systems.

2.8.10. Computational details

Computational analysis of the interaction between thymoquinone (TQ) and Polyethylene Glycol 4000 (PEG₄₀₀₀) was conducted using Materials Studio software. Structural data for TQ were sourced from the PubChem database. Geometric optimization of these structures was carried out using the Dmol3 module, employing the B3LYP force field [33] and the DNP basis set. The electronic Self-Consistent Field (SCF) tolerance was set to 10^{-6} Hartree (Ha). The PEG polymer model was constructed in Materials Studio using the polymerization function. Various chain lengths were modeled and denoted by multiples of repeat units (n). The Forcite module was used for energy calculations and minimizations by applying the DREIDING force field [34]. An amorphous cell module was used to simulate the adsorption of TQ onto the PEG₄₀₀₀ excipient. This module is adept at constructing three-dimensional periodic structures of polymeric systems, allowing for realistic packing of polymers and small molecules into these structures. This could include applications, such as depositing a polymer coating on a drug molecule or creating complex nanocomposite materials. This simulation used a molar ratio of PEG₄₀₀₀ to TQ (1:4), which is consistent with the experimental data. Ten configurations were predicted, exhibiting the most negative energies, indicating that TQ is the most stable binding site on the polymer chain.

The study also focused on determining the adsorption energy and distance between TQ and the PEG₄₀₀₀ chain. Additionally, the behavior of the TQ-PEG₄₀₀₀-NP system in aqueous medium was predicted using a conductor-like screening model (COSMO). This aspect of the study investigated the effect of solvation on the stability of adsorbed TQ complexes, with the dielectric constant of water set at 78.54, reflecting its solvating environment.

3. Results

3.1. Encapsulation efficiency, FTIR spectra analysis, and release profile test

The synthesis of PEGylated thymoquinone using PEG₄₀₀₀ demonstrated a remarkable efficiency, achieving an encapsulation rate of approximately 99 % (99.906 ± 0.06 %). This high rate suggests that most TQ was successfully entrapped within the three-dimensional conformation of the PEG polymer during the synthesis process, highlighting PEG₄₀₀₀ as an excellent medium for encapsulating TQ. TQ's release profile of TQ was investigated in two solvents with differing

polarities: water and acetonitrile. TQ is more soluble in organic solvents, such as ethanol, methanol, and acetonitrile, than in distilled water. When examining the release kinetics of TQ from TQ-PEG₄₀₀₀-NP nanoparticles, it was observed that TQ was released more rapidly in water than in acetonitrile, as shown in Fig. 1(a). While distilled water facilitated the rapid release of TQ, acetonitrile appeared to slow down and prolong the release process.

Additionally, this study revealed the influence of pH on the release profile of TQ, as depicted in Fig. 1(b). The presence of ions in the solution increased TQ's release rate of TQ compared to that in distilled water, with a consistent difference of approximately 5 μM observed from the initial minutes and throughout the measurement duration. Fourier

Transform Infrared (FTIR) spectroscopy was used to analyze the interactions between TQ and PEG₄₀₀₀ which lead to nanoparticle formation. The FTIR spectra of TQ, TQ-PEG₄₀₀₀-NP, PEG₄₀₀₀, and P123 are displayed in Fig. 1(c). Notably, the characteristic TQ peak at 1637 cm⁻¹, associated with C=C bond stretching, was attenuated in the TQ-PEG₄₀₀₀-NP nanoparticles. The C-H bond stretching at 2966 cm⁻¹ was also absent in the nanoparticle spectrum. A new stretching band at 3441 cm⁻¹ emerged in the TQ-PEG₄₀₀₀-NP spectrum, indicating the formation of new interactions within the nanoparticle structure.

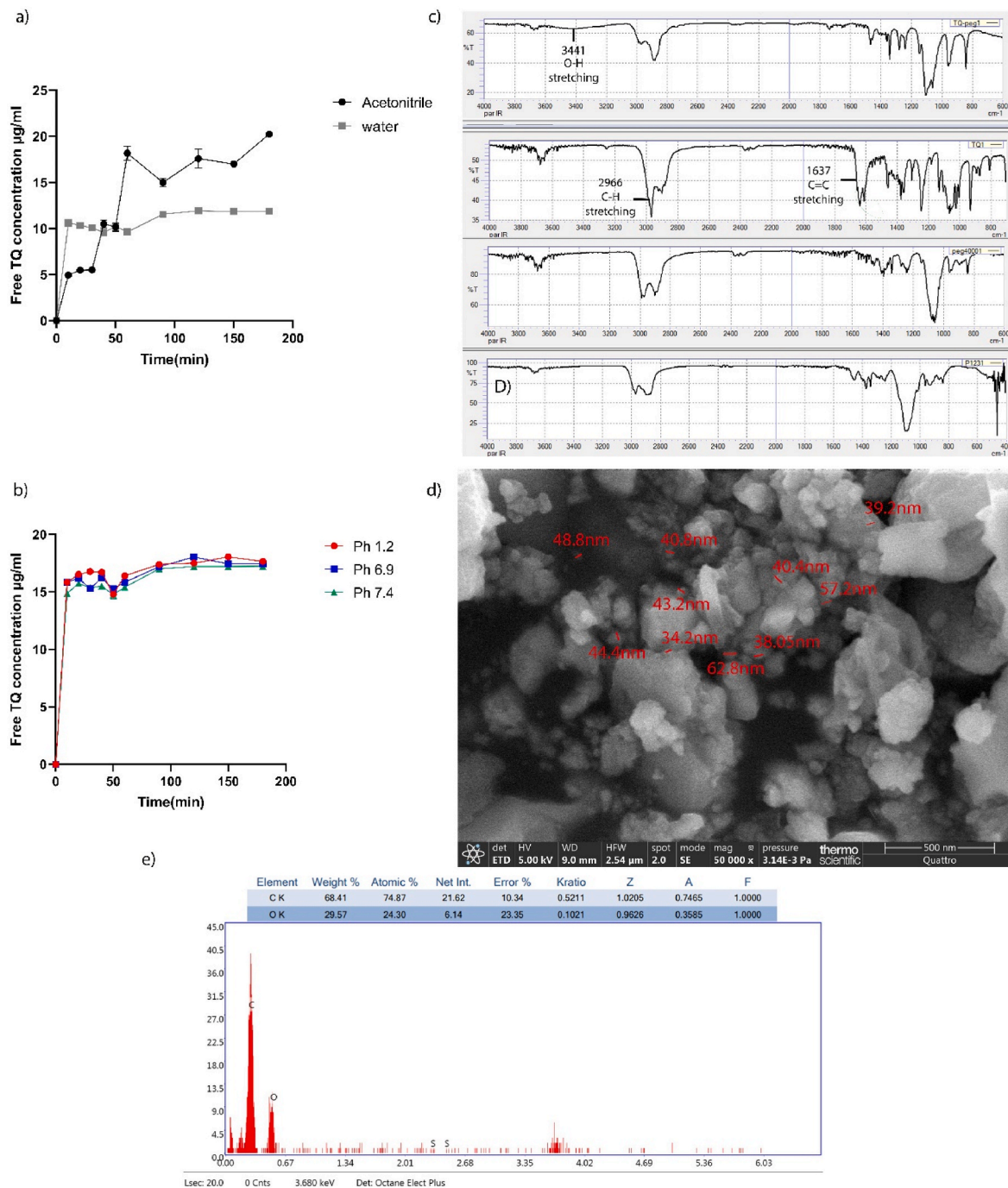


Fig. 1. a) In vitro release profile of TQ from TQ-PEG₄₀₀₀-NP at acetonitrile and water. b) In vitro release profile of TQ from TQ-PEG₄₀₀₀-NP at pH 1.2, 6.9, 7.4. c) FTIR spectra of TQ, TQ-PEG₄₀₀₀-NP, PEG₄₀₀₀, and copolymer P₁₂₃. d) SEM image of TQ-PEG₄₀₀₀-NP. e) EDS Spectra of TQ-PEG₄₀₀₀-NP composition.

3.2. Morphological study of TQ-PEG₄₀₀₀-NP by SEM/EDS

Fig. 1(d) depicts the morphology of TQ-PEG₄₀₀₀-NP nanoparticles. These nanoparticles, observed at 80,000 × magnification, display a nanoscale spherical structure with an average size of 46.31 ± 14.09 nm. Although Fig. 1(d) illustrates smooth surfaces, there is a tendency for nanoparticles to aggregate. The scanning electron microscopy (SEM) used for this morphological study was complemented by Energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS) to analyze the chemical composition of the sample. In Fig. 1(e), The predominant presence of carbon (C) and oxygen (e). This observation suggests the absence of significant contamination by other chemical elements in the sample, thus ensuring the purity and quality of the TQ-PEG₄₀₀₀-NP nanoparticles.

3.3. Cytotoxicity evaluation of TQ and TQ-PEG₄₀₀₀-NP

The XTT assay was employed to assess the cytotoxicity of free TQ, PEG₄₀₀₀, and TQ-PEG₄₀₀₀-NP nanoparticles on two cell lines, EMT6 and the β-cell line NIT-1, as illustrated in Fig. 2(a and b). The primary objective of this study was to explore the potential cytotoxic effects of TQ on tumor cells and its potential antidiabetic effects on the NIT-1 cell line. The results depicted in Fig. 2(a and b) reveal that the three products had no significant impact on the viability of EMT6 tumor cells, suggesting a lack of substantial toxicity. It is noteworthy, however, that TQ exhibited a mild toxic effect at low doses, which diminished as the concentration of thymoquinone increased, leading to a viability exceeding 92 %. The slight toxic effect of TQ disappeared completely when coated with PEG₄₀₀₀, indicating a reduction in the contact

between the molecule and its cellular targets. Another explanation is the very low content of TQ in the TQ-PEG₄₀₀₀-NP complex, estimated at 170 μg of TQ in 1 mg TQ-PEG₄₀₀₀-NP complex.

The cytotoxicity of TQ, PEG₄₀₀₀, and their TQ-PEG₄₀₀₀-NP complex was evaluated in the NIT-1 cell line for the same purpose. Free TQ demonstrated moderate cytotoxicity to the NIT-1 line at concentrations of (3 μg/ml, 10 μg/ml, 30 μg/ml), with a decrease in viability to 68 % observed at 60 μg/ml. PEG₄₀₀₀ exhibited no cytotoxicity, whereas the TQ-PEG₄₀₀₀-NP nanoparticles stimulated the proliferation of β-cells, resulting in a viability rate of approximately 120 % for all tested concentrations.

3.4. Effect of TQ, PEG₄₀₀₀, and TQ-PEG₄₀₀₀-NP on Langerhans islets viability and insulin secretion study

The toxicity of the three examined products was also assessed in isolated Langerhans islets, with the results outlined in Fig. 3(a). Notably, exposure to 30 μg/ml free TQ resulted in an approximately 40 % loss of viability in islet cells. In contrast, islets treated with TQ-PEG₄₀₀₀-NP at the same concentration exhibited stable viability and slightly improved viability compared to the negative control.

Fig. 3(b) presents the results of the insulin secretion assay using the Mouse Ins1/Insulin-1 ELISA kit. There was no significant difference between the control and the PEG₄₀₀₀ polymer, indicating the absence of an effect on insulin stimulation by the PEG₄₀₀₀ polymer. However, a highly significant difference was observed between the control and cells treated with TQ as well as TQ-PEG₄₀₀₀-NP nanoparticles, suggesting a notable effect of the molecule on insulin stimulation. Interestingly, the

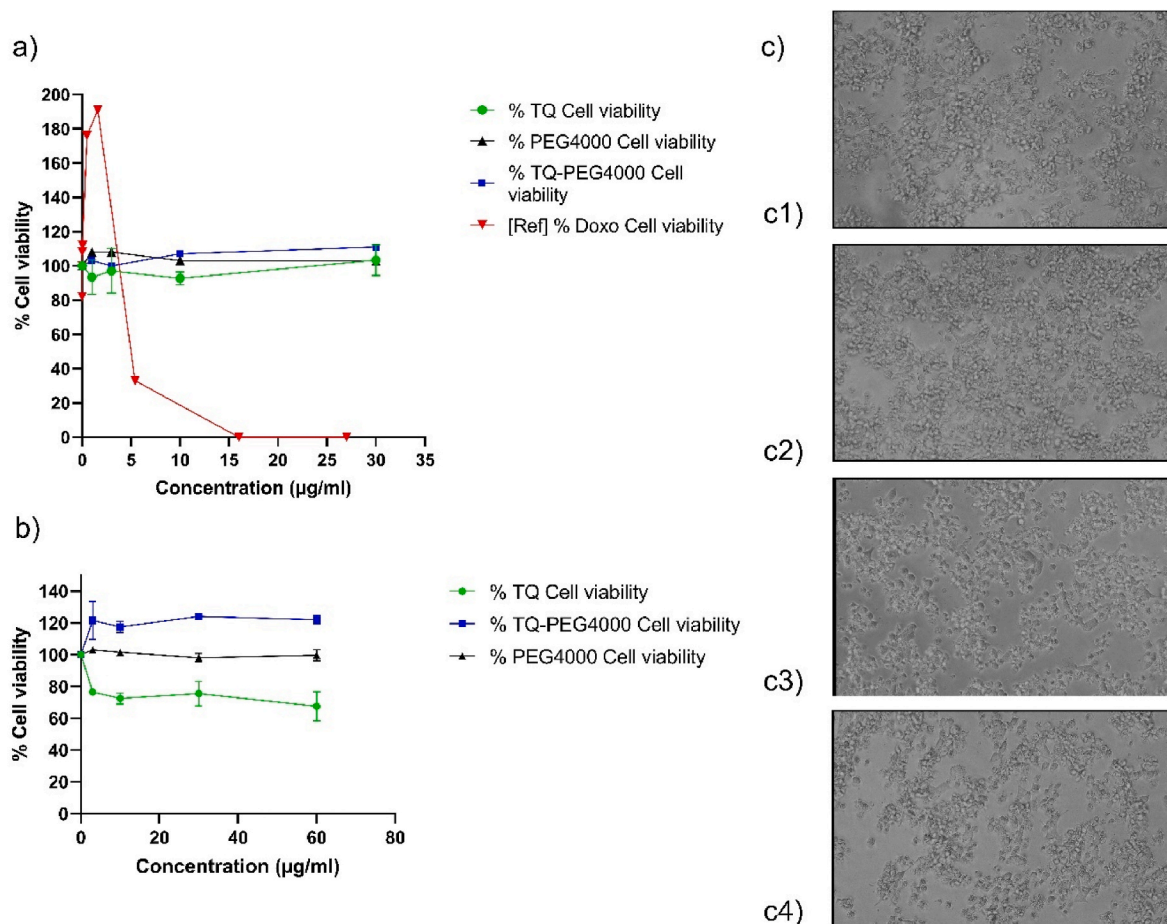


Fig. 2. a) Cytotoxicity of TQ and TQ-PEG₄₀₀₀-NP on EMT6 line. b) Cytotoxicity of TQ and TQ-PEG₄₀₀₀-NP on NIT-1 line. c) Photos taken during cytotoxicity tests of TQ-PEG₄₀₀₀-NP on Nit. c1) 72 h from TQ-PEG₄₀₀₀-NP (3 μg/ml) deposit. c2) 72 h from TQ-PEG₄₀₀₀-NP (10 μg/ml) deposit. c3) 72 h from TQ-PEG₄₀₀₀-NP (30 μg/ml) deposit. c4) 72 h from TQ-PEG₄₀₀₀-NP (60 μg/ml) deposit under the light microscope (Nikon, EclipseTs2). Cells were observed at 20x magnification.

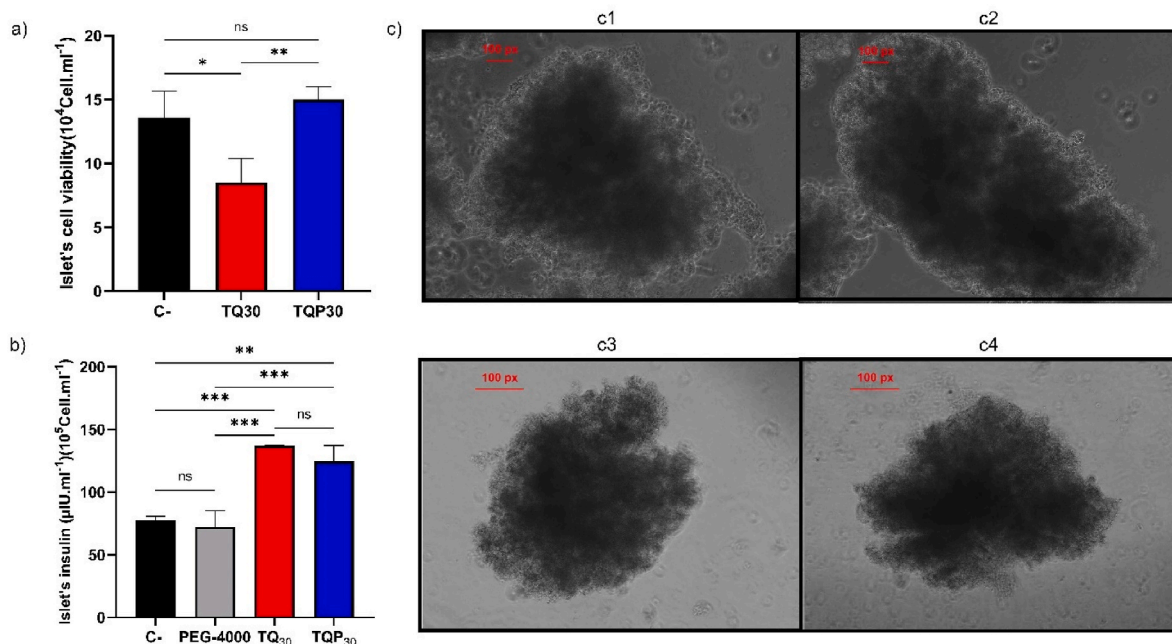


Fig. 3. a) Islet's cell viability treated with TQ (30 $\mu\text{g/ml}$) and TQ-PEG₄₀₀₀-NP(30 $\mu\text{g/ml}$) after 48h. b) Insulin secreted by islets treated with TQ (30 $\mu\text{g/ml}$) and TQ-PEG₄₀₀₀-NP(30 $\mu\text{g/ml}$). c1) Islet treated with TQ-PEG₄₀₀₀-NP (30 $\mu\text{g/ml}$) after 24h. c2) Islet treated with TQ-PEG₄₀₀₀-NP (30 $\mu\text{g/ml}$) after 48h. c3) Islet treated with TQ (30 $\mu\text{g/ml}$) after 24h. c4) Islet treated with TQ (30 $\mu\text{g/ml}$) after 48h. For each set (n = 3), data were displayed as mean \pm SEM. Ns: not significant, *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, significant compared to the control (one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test). Islets were observed at 10x magnification.

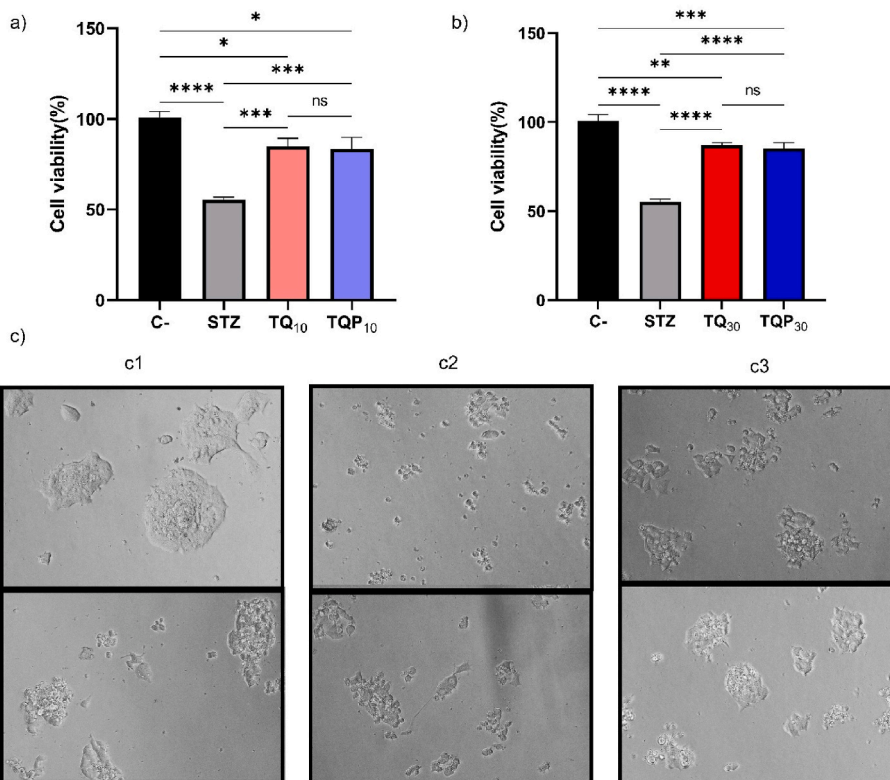


Fig. 4. Protective effect of TQ and TQ-PEG₄₀₀₀-NP on STZ-damaged NIT-1 a) Cell viability of NIT-1 after treatment with TQ 10 $\mu\text{g/ml}$ + STZ 6 mM and TQ-PEG₄₀₀₀-NP 10 $\mu\text{g/ml}$ + STZ 6 mM and STZ 6 mM as positive control. b) cell viability of NIT-1 after treatment with TQ 30 $\mu\text{g/ml}$ + STZ 6 mM and TQ-PEG₄₀₀₀-NP 30 $\mu\text{g/ml}$ + STZ 6 mM and STZ 6 mM as positive control. c) NIT-1 when testing the protective effect of TQ under the microscope (Nikon, EclipseTs2). c1) Untreated NIT-1 after 72h of culture (negative control). c2) NIT-1 after 24h of treatment with STZ (positive control). c3) NIT-1 treated with 10 $\mu\text{g/ml}$ TQ + 6 mM STZ. c4) NIT-1 treated with 10 $\mu\text{g/ml}$ TQ-PEG₄₀₀₀-NP + 6 mM STZ. c5) NIT-1 treated with 30 $\mu\text{g/ml}$ TQ + 6 mM STZ. (C6) NIT-1 treated with 30 $\mu\text{g/ml}$ TQ-PEG₄₀₀₀-NP + 6 mM STZ. For each set (n = 3), data were displayed as mean \pm SEM. Ns: not significant, *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001, significant compared to the control (one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test). Cells were observed at 20x magnification.

amount of insulin secreted by islets treated with free TQ and TQ-PEG₄₀₀₀-NP at a concentration of 30 µg/ml was nearly identical. Although the actual amount of TQ in the capsules at this concentration was 5.1 µg/ml, there was no significant difference between TQ and TQ-PEG₄₀₀₀-NP. This implies that the capsule enhanced the solubility and bioavailability of TQ, demonstrating that free TQ (30 µg/ml) and encapsulated TQ (5.1 µg/ml) have similar effects on islet insulin stimulation.

3.5. Protective effect of free-TQ and TQ-PEG₄₀₀₀-NP of β-cells against STZ toxicity

In the present study, NIT-1 β-cells were incubated with STZ (6 mM), and subsequent measurement of cell viability was conducted at two concentrations, 10 µg/ml (Fig. 4(a)) and 30 µg/ml (Fig. 4(b)), using free TQ, PEG₄₀₀₀, and TQ-PEG₄₀₀₀-NP.

The findings revealed that exposure to STZ (6 mM) resulted in approximately 45 % cell death in untreated β NIT-1 cells. Interestingly, cells treated with 10 µg/ml TQ and then exposed to 6 µg/ml STZ exhibited protection against cytotoxicity, with only approximately 15 % cell death observed. Similarly, cells treated with TQ-PEG₄₀₀₀-NP nanoparticles at 10 µg/ml showed a 16.5 % cell death rate in the presence of STZ. At a concentration of 30 µg/ml, a slight improvement in the protective effects of both TQ and TQ-PEG₄₀₀₀-NP was noted. Specifically, STZ caused only 13 % cell death in cells treated with free TQ and 15 % in those treated with TQ-PEG₄₀₀₀-NP. These results suggest a partially protective effect of TQ, and indicate that encapsulation further enhances this protection.

3.6. TQ and TQ-PEG₄₀₀₀-NP stimulated insulin secretion

The findings presented in Fig. 5 indicate that thymoquinone, in addition to its non-toxic impact on β-cells and Langerhans islets and its protective effect against the apoptotic action of STZ, significantly stimulates insulin production. This insulin-stimulating capability was evident even at very low doses of 10 µg/ml (Fig. 5(a)) and was sustained at a concentration of 30 µg/ml (Fig. 5(b)).

Encapsulation with PEG₄₀₀₀ did not seem to affect this stimulation; instead, it appeared to enhance it. However, it is important to note that the observed effect remained relatively modest, likely because of the low concentration of TQ present in the TQ-PEG₄₀₀₀-NP nanoparticles.

3.7. Oxidative stress markers measurement

In this study, the antioxidant effects of TQ and TQ-PEG₄₀₀₀-NP were investigated by assaying biochemical markers such as MDA, SOD, and

GSH. As illustrated in Fig. 6, a distinct increase in the levels of oxidative stress markers, specifically MDA and SOD, was observed when free TQ was administered at concentrations of 10 µg/ml and 30 µg/ml. In contrast, these markers were reduced or absent when the encapsulated molecules (TQ-PEG₄₀₀₀-NP at 10 and 30 µg/ml) were used. This observation may be associated with the cytotoxicity of TQ, as evidenced by the results shown in Fig. 2(b), where viability was approximately 80 % for cells treated with free TQ and 120 % for cells treated with encapsulated TQ. This suggested that cell death may be attributed to TQ-induced oxidative stress.

Additionally, it is noteworthy that there was a substantial increase in the quantity of GSH in cells that exhibited oxidative stress. This result partially supports the antioxidant effects of TQ and underscores the need for further investigation to understand the mechanism of action of TQ in β-cells.

3.8. Regenerative effect of free and encapsulated TQ on NIT-1

To investigate the impact of TQ and PEGylation on NIT-1 cell regeneration, treatment with TQ and TQ-PEG₄₀₀₀-NP at concentrations of 10 and 30 µg/ml was conducted following destruction by STZ. The aim of this study was to assess the ability of TQ and its encapsulated form, TQ-PEG₄₀₀₀-NP, to repair the damage inflicted by STZ on β-cells with a focus on cell viability. The results in Fig. 7 demonstrate an 8–10 % improvement in viability at 10 µg/ml concentration of TQ and TQ-PEG₄₀₀₀-NP compared to cells treated solely with STZ. A more pronounced effect was observed at 30 µg/ml, with a 12–14 % increase in cell regeneration. Notably, the effects of the free molecule and the encapsulated forms were nearly identical. This result is promising, considering that the capsule contains only 1/6 of the molecule compared to its free state. Hence, the TQ-PEG₄₀₀₀-NP capsule exhibited enhanced solubility and bioavailability, leading to a more favorable effect on beta cells without inducing cytotoxicity.

3.9. Theoretical investigation of the interaction TQ-PEG₄₀₀₀-NP

One approach to gaining insights into the interaction of drug molecules with polymer-based excipients involves calculating the binding energy from first principles. In this study, we aimed to explore the interaction of TQ with PEG₄₀₀₀ by identifying the most favorable adsorption site for the optimized TQ structure on the polymer PEG₄₀₀₀ through adsorption calculations. Ten PEG polymer chains of varying lengths ranging from ten to 90 units were employed to achieve this. The applied method successfully generated ten distinct configurations of the TQ-PEG₄₀₀₀-NP system. The most thermodynamically stable configuration was determined on the basis of the most negative adsorption

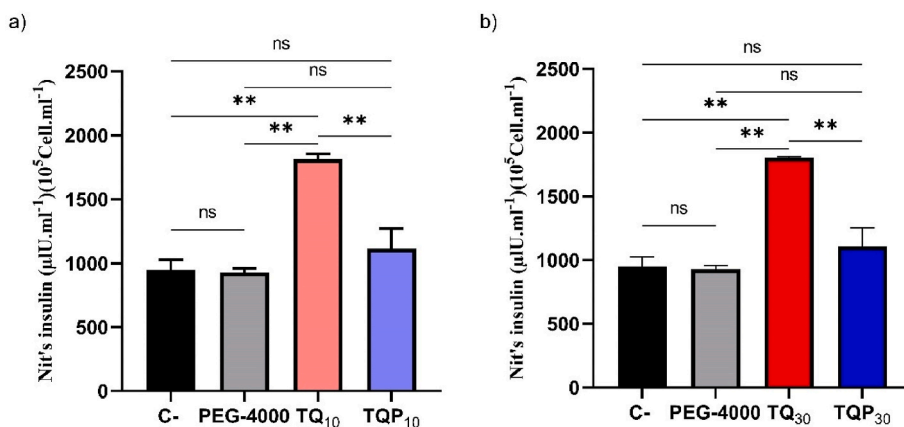


Fig. 5. Effect of TQ and TQ-PEG₄₀₀₀-NP on insulin secretion in NIT-1 line cells. a) the amount of insulin secreted by NIT-1 cells treated with 10 µg/ml TQ, 10 µg/ml TQ-PEG₄₀₀₀-NP, and PEG₄₀₀₀. b) the amount of insulin secreted by NIT-1 cells treated with 30 µg/ml TQ, 30 µg/ml TQ-PEG₄₀₀₀-NP, and PEG₄₀₀₀. For each set (n = 3), data were displayed as mean ± SEM. Ns: not significant, **P < 0.01, significant compared to the control (one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test).

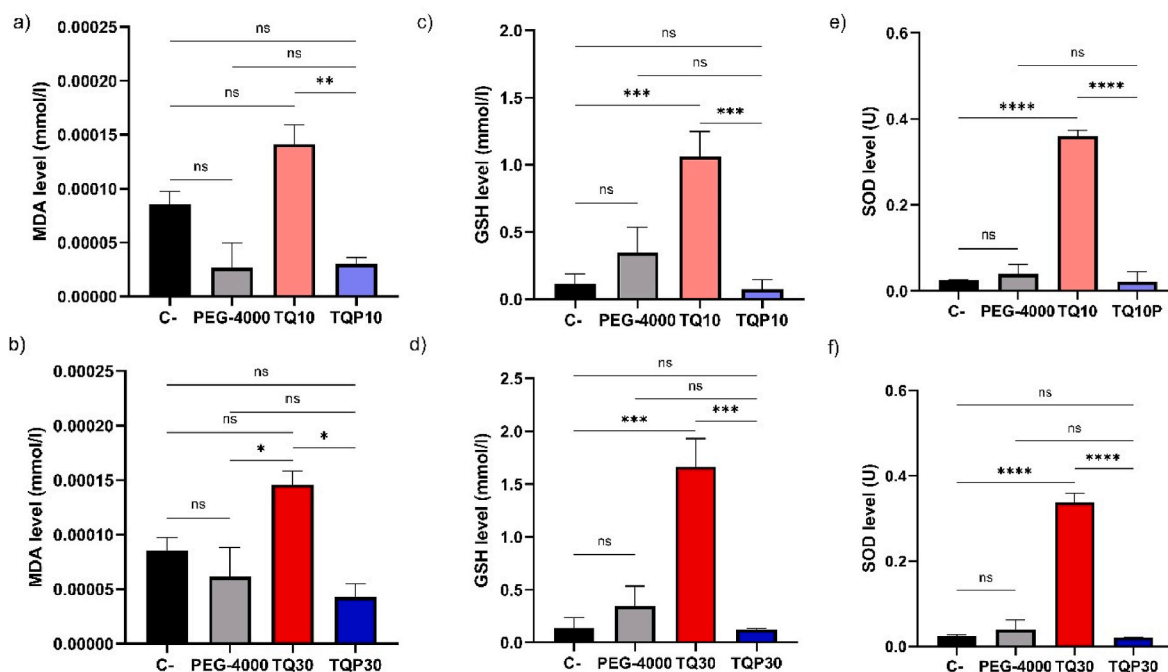


Fig. 6. Effect of TQ and TQ-PEG₄₀₀₀-NP on MDA, GSH, and SOD. a) The level of MDA detected in the supernatant of untreated NIT-1 and NIT-1 treated with 10 µg/ml of TQ, 10 µg/ml of TQ-PEG₄₀₀₀-NP, and 10 µg/ml of PEG₄₀₀₀. b) MDA level at TQ30 (TQ: 30 µg/ml), TQP30 (TQ-PEG₄₀₀₀-NP: 30 µg/ml). c) GSH level at TQ10 (TQ: 10 µg/ml), TQP10 (TQ-PEG₄₀₀₀-NP: 10 µg/ml). d) GSH level at TQ30 (TQ: 30 µg/ml), TQP30 (TQ-PEG₄₀₀₀-NP: 30 µg/ml). e) SOD level at TQ10 (TQ: 10 µg/ml), TQP10 (TQ-PEG₄₀₀₀-NP: 10 µg/ml). f) SOD level at TQ30 (TQ: 30 µg/ml), TQP30 (TQ-PEG₄₀₀₀-NP: 30 µg/ml). For each set (n = 3), data were displayed as mean ± SEM. Ns: not significant, *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001, significant compared to the control (one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test).

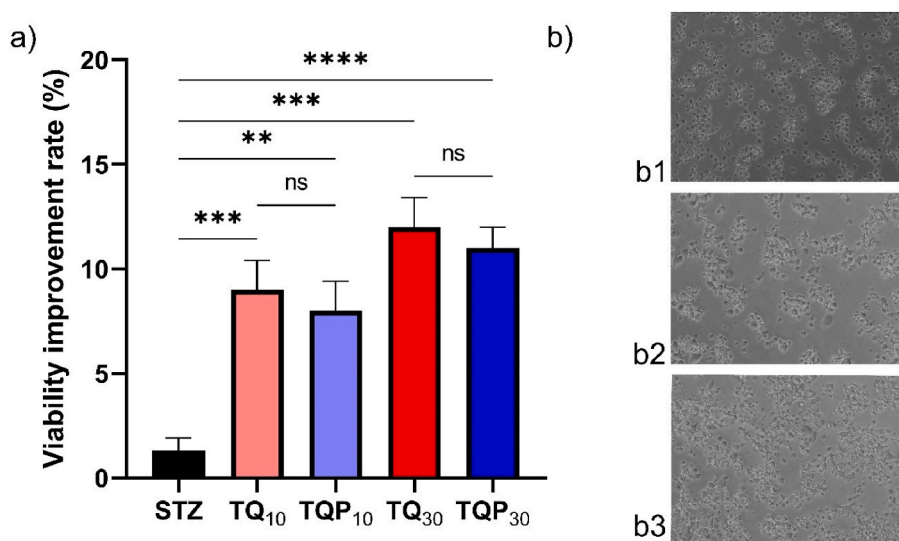


Fig. 7. Regenerative effect of TQ and TQ-PEG₄₀₀₀-NP on STZ-damaged NIT-1 cells. a) Viability improvement rate of NIT-1 cells treated with STZ + TQ (10 µg/ml and 30 µg/ml) and TQ-PEG₄₀₀₀-NP (10 µg/ml and 30 µg/ml) for 48h. b) NIT-1 when testing the regenerative effect of TQ under the microscope (Nikon, EclipseTs2). b1) NIT-1 treated with STZ only. b2) NIT-1 treated with STZ + TQ-PEG₄₀₀₀-NP 10 µg/ml b3) NIT-1 treated with STZ + TQ-PEG₄₀₀₀-NP 30 µg/ml. For each set (n = 3), data were displayed as mean ± SEM. Ns: not significant, **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001, significant compared to the control (one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test). Cells were observed at 20x magnification.

energy. The adsorption energies (ΔE) of the interacting components within the investigated complex were estimated using the following equation:

$$\Delta E = E(\text{complex}) - E(\text{TQ}) - E(\text{PEG})$$

Where E (TQ), E (PEG), and E (complex) are the energies of the drug, carrier, and complex, respectively.

A comparison of the results presented in Table 2 highlights the influence of polymer chain length on the interaction energy. In the gas phase, the values varied, with the highest energy observed for n = 10 (ΔE TQ-PEG = -30.222 kcal/mol) and the lowest value for PEGn = 90 (ΔE TQ-PEG = -420.120 kcal/mol).

The shortest distance measured between TQ and the PEGn = 90 chain was 1.85 Å. The energy involved in adsorption predominantly

Table 2

Energies of interaction (ΔE in kcal/mol) between TQ and different chains of PEG ($n = 10$ to 90) in gaseous and aqueous phases with measured distance (\AA).

level of polymerization (n) of PEG	$\Delta E_{\text{TQ-PEG}}$ gas phase (kcal/mol)	$\Delta E_{\text{TQ-PEG}}$ water (kcal/mol)	Distance gas phase (\AA)	Distance water (\AA)
n=10	-30.222	-21.129	2.45	2.50
n=20	-51.129	-41.197	2.40	2.50
n=30	-189.899	-169.699	2.20	2.50
n=40	-171.717	-158.917	2.35	2.45
n=50	-182.126	-179.295	2.15	2.15
n=60	-295.777	-270.897	2.00	2.50
n=70	-300.101	-264.521	1.95	2.00
n=80	-350.124	-319.221	1.95	2.00
n=90	-420.120	-400.111	1.85	1.95

stems from Van der Waals interactions. Examination of the simulation results in Fig. 8 reveals that the active compound, thymoquinone, consistently positioned itself with the isopropyl and methyl groups facing the atoms of the polymer chain. At the same time, the ring containing two double bonds appeared somewhat distant from the polymer chain. This spatial arrangement is primarily due to attractive Van der Waals interactions, with the interaction with the ring appearing somewhat repulsive.

Additionally, thymoquinone was found in three positions: first,

surrounded by the polymeric chain, enveloped within it; second, positioned outside the chain along its length; and finally, located at the far end of the PEG chain. These observations provided valuable insights into the spatial dynamics of the TQ-PEG₄₀₀₀ interaction, shedding light on the intermolecular forces at play during adsorption.

In Fig. 9, The optimized configuration of the PEG-TQ complex at a molar ratio of (1:4) is depicted, which is consistent with the experimental preparation. Three binding modes were discernible when examining the potential deposition poses of TQ on the PEG_n = 90 polymer chain. First, TQ was deposited on the surface of PEG₄₀₀₀, establishing robust Van der Waals interaction forces. Additionally, PEG₄₀₀₀ encapsulates TQ in the cavity, as illustrated in Fig. 9. At another binding site, TQ effectively adheres to the PEG₄₀₀₀ polymer through a robust hydrogen bond formed between the hydrogen atom of the hydroxyl (OH) functional group on the PEG chain and the oxygen atom of the quinone group on the TQ molecule. The distance of this interaction was measured at 1.8 \AA . These diverse binding modes provide a comprehensive view of the intricate interactions between TQ and PEG₄₀₀₀, offering valuable insights into the structural dynamics of the PEG-TQ complex.

4. Discussion

In this study, we investigated the potential of PEG₄₀₀₀ encapsulation

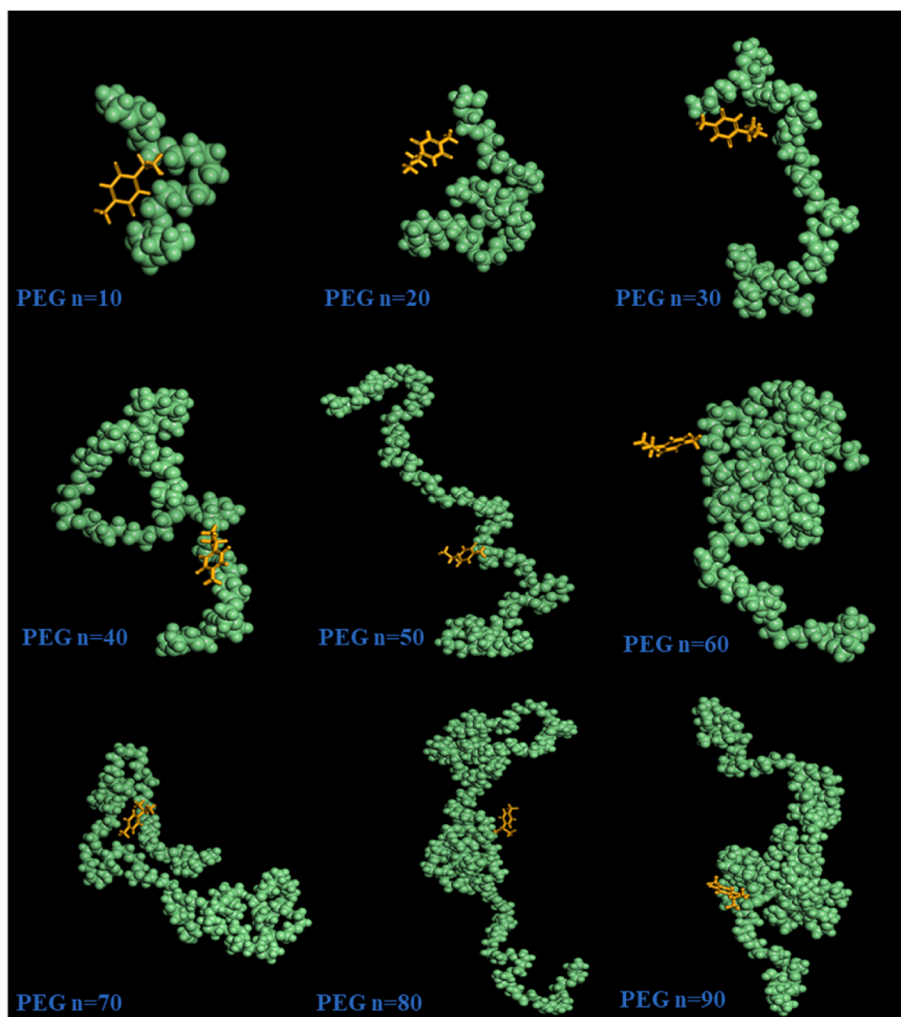


Fig. 8. Presentation of final configurations of different encapsulation systems PEG/Thymoquinone in gas phase with varied chain length ($n = 10$ to 90): Thymoquinone is colored in orange, a polymer as CPK colored in green. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

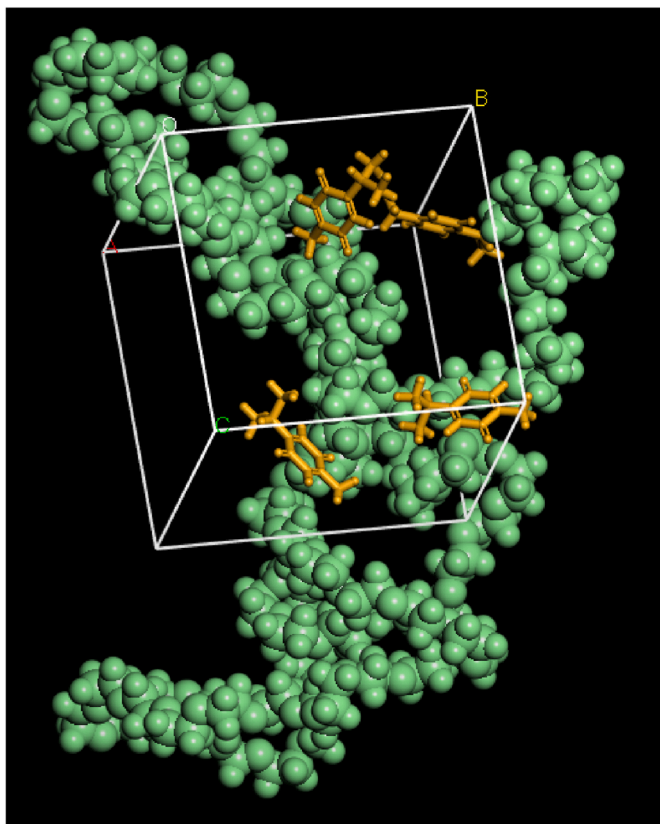


Fig. 9. Possible adsorption configuration of the complex PEG-TQ for the experimental molar ratio (1:4) (lattice parameters: $a = b = c = 19.72$).

to enhance the antidiabetic activity of thymoquinone (TQ), a primary monoterpene derived from *Nigella sativa* seeds [35]. Studies have shown that TQ exhibits diverse pharmacological effects, prominently recognized for its antidiabetic [11] and antitumor [36,37] properties. Despite its therapeutic potential, challenges associated with TQ's limited solubility in biological media hinder its widespread application in pharmacology. The pursuit of enhancing the solubility and bioavailability of pharmaceuticals has led to growing emphasis on the encapsulation of active compounds [33–40]. This approach has been explored using various polymers and encapsulation systems and has yielded positive results and improved solubility. However, the drawback of the elevated toxicity associated with many of these systems has curtailed their practical utility in pharmacies. Polyethylene glycols (PEGs) have emerged as promising polymers owing to their remarkable encapsulation efficiency, bioavailability enhancement, and favorable safety profiles [41,42].

In this study, we opted for PEG4000 as the encapsulation agent for TQ, a decision grounded in compelling findings from our ongoing yet-to-be-published investigations that systematically assessed PEG 1000, 2000, 3000, 4000, and 6000. Notably, PEG4000 consistently outperformed other PEG variants in terms of solubilizing the active ingredients, facilitating product release, and enhancing encapsulation efficiency, surpassing the results reported in previous studies. Specifically, TQ-chitosan and PVP-TQ nanoparticles exhibit lower encapsulation efficiencies of 75.7 % [43] and 83.2 %, respectively [24]. In contrast, our study demonstrated an exceptional encapsulation efficiency of approximately 99 % for TQ with PEG4000. In addition, The TQ-PEG4000-NP formulation in our study offers significant improvements over TQ encapsulated in PLGA and Chitosan [44] in terms of particle size, purity, and potential stability. These enhancements make the TQ-PEG4000-NP formulation a superior candidate for therapeutic applications, potentially offering better bioavailability and efficacy than

existing nanoformulations. Cytotoxicity profiles. The XTT assay showed no significant impact on the viability of EMT6 tumor cells, with viability exceeding 92 %, unlike TQ-CsNPs, which exhibited CC50 values of $191.3 \pm 3.9 \mu\text{g/ml}$ and $148.2 \pm 1.9 \mu\text{g/ml}$ for free TQ and TQ-CsNPs, respectively [43]. Furthermore, free TQ demonstrated moderate cytotoxicity to NIT-1 β -cells, reducing viability to 68 % at $60 \mu\text{g/ml}$, whereas TQ-PEG 4000-NP not only eliminated this toxicity, but also stimulated β -cell proliferation, achieving approximately 120 % viability. In contrast, liposomal-TQ caused a dose-dependent reduction in metabolic activity in MCF7 and MCF10 cells, with approximately 50 % viability at $50 \mu\text{M}$ [45]. These results highlight the balanced approach of PEG-4000 encapsulation, ensuring minimal toxicity and promoting cell viability, thus underscoring TQ-PEG 4000-NP as a superior and safer nanoformulation for therapeutic applications.

In an *in silico* study, PEGs of various sizes were evaluated for their interaction with water molecules and dihydrothymoquinone. PEG with 90 monomers, that is, PEG4000, provides good encapsulation efficiency [46].

The FTIR study findings did not reveal any chemical interactions between the functional groups of thymoquinone (TQ) and PEG₄₀₀₀ polymer. This absence of chemical interaction suggests the possibility of a physical interaction, a proposition supported by a theoretical Density Functional Theory (DFT) study. This interaction may be attributed to PEG's affinity for water molecules, as discussed earlier. Interestingly, the polymer chain envelops the TQ molecules without establishing specific interactions, consistent with previous observations [47, 48]. Importantly, this mode of interaction did not hinder the release of TQ into aqueous medium. Notably, TQ exhibits a faster release in water than in acetonitrile and demonstrates effectiveness across various pH levels.

Scanning electron microscopy (SEM) was employed to observe and analyze the size, shape, and surface characteristics of TQ-PEG₄₀₀₀-NP nanoparticles. These attributes are pivotal in determining nanoparticle adhesion, interaction, and absorption by the cells of the body. SEM examination revealed that TQ-PEG₄₀₀₀-NP exhibited dimensions of less than 60 nm and featured a notably smooth surface, as depicted in Fig. 1 (d). The nanoparticles displayed a roughly spherical morphology, with an average diameter of $46.31 \pm 14.09 \text{ nm}$. Notably, biodistribution studies have consistently indicated that spherical nanoparticles possess enhanced absorption capabilities, rendering them well-suited for applications in drug delivery [49,50]. This characteristic is promising for improving drug delivery efficiency and advancing therapeutic applications. The toxicity assessment demonstrated that PEG₄₀₀₀ did not harm the EMT6 and NIT-1 cell lines, confirming the safety profile of this polymer. However, TQ exhibited moderate cytotoxicity in the NIT-1 cells. To understand the effect of TQ on β -cell viability, we quantified oxidative stress markers, including GSH, MDA, and SOD. These results suggest that TQ may exert a pro-oxidant effect, as evidenced by an elevated concentration of total SOD and MDA, potentially accounting for the observed toxicity in the NIT-1 cell line. SODs play a crucial role in protecting the body against oxidative stress, participating in various diseases, such as ischemia and reperfusion, neurodegenerative disorders, diabetes, and cancer. They are critical in pathological or pre-pathological conditions, including inflammation, cell signaling, and immune response [51–53]. SOD functions via O_2^- (superoxide) into H_2O_2 (hydrogen peroxide). Superoxides are generated by enzymes such as xanthine oxidase (XO) [54] and NADH/NADPH oxidases [55]. Elevation in reactive oxygen species (ROS) levels, particularly O_2^- can induce cell damage, specifically lipid oxidation in the cell membrane, leading to the production of malondialdehyde (MDA) [56]. The protective role of superoxide dismutase (SOD) is pivotal, as it converts O_2^- (superoxide) into H_2O_2 (hydrogen peroxide), which is subsequently transformed into O_2 and H_2O by catalase. Our study revealed elevated levels of SOD and malondialdehyde (MDA). The surge in MDA levels may be attributed to the pro-oxidant effect of TQ, leading to an increase in reactive oxygen species (ROS), including O_2^- . Responsible for lipid

oxidation.

Conversely, an increase in SOD levels can be interpreted as a mechanism that alleviates the stress induced by O₂·-. Prior research has suggested that TQ may enhance xanthine oxidase (XO) activity under specific concentration conditions [57]. Simultaneously, our investigation revealed the antioxidant role of TQ, contributing to a substantial increase in glutathione (GSH) content. GSH, an essential tripeptide and antioxidant, protects the cells against free radicals. It is a co-factor for detoxifying enzymes, such as glutathione peroxidases, glutathione S-transferases, and glyoxalases [58]. Among its multifaceted functions, GSH detoxifies products resulting from reactive oxygen species (ROS)-mediated lipid oxidation, such as MDA and 4-hydroxy-2-nonenal, and potentially numerous other ROS intermediates [59].

This study effectively demonstrated the antidiabetic effects of TQ. TQ enhances viability and insulin secretion in Langerhans islets and β -cells. Furthermore, it protects against the toxic effects of streptozotocin (STZ). Regeneration of β -cell viability, even after extensive destruction by STZ, emerged as a pivotal outcome of this study. These findings underscore the antidiabetic potential of TQ in regenerating pancreatic tissue adversely affected by STZ, a phenomenon previously observed in an animal model [35]. The robust efficacy of TQ in stimulating insulin secretion was corroborated by the islets of Langerhans and the NIT-1 cell model, collectively confirming the anti-diabetic effect of free TQ through enhanced insulin secretion.

This study highlights two pivotal findings. First, free thymoquinone (TQ) exhibits toxicity in β -cells, primarily owing to its pro-oxidant effect, leading to the generation of reactive oxygen species (ROS). However, encapsulating TQ with PEG₄₀₀₀ to form TQ-PEG₄₀₀₀-NP significantly mitigates this toxicity, especially in β -cells (NIT-1). Second, TQ demonstrates a potent antidiabetic effect characterized by its capacity to stimulate insulin secretion, safeguard β -cells against streptozotocin (STZ) toxicity, and facilitate the regeneration of cells even after their extensive destruction by STZ. Notably, these therapeutic effects of TQ persisted even after encapsulation within PEG₄₀₀₀.

To gain deeper insights into the interaction between TQ and PEG₄₀₀₀, an in-silico study was conducted utilizing Density Functional Theory (DFT) methods. DFT, known for its cost-effectiveness, was employed to simulate the interaction between PEG₄₀₀₀ chains and TQ, revealing fundamental material properties, such as geometric structure, energy, and electrical and optical characteristics. An increase in the number of polymer repeat units (n) was found to enhance the adsorption energy, facilitated by the increased flexibility of the polymer, allowing the carrier to encapsulate thymoquinone efficiently. The PEG (n = 90) chain emerged as the optimal polymer length for encapsulating TQ, resulting in an estimated adsorption energy of -420.120 kcal/mol.

In the solvent medium, it was observed that the adsorption distance of TQ from the polymer increased, suggesting that the presence of water enhances the release of TQ from the PEG nanocarrier. This phenomenon is consistent with the results obtained from the drug release test. This was attributed to the hydrophilic nature of PEG₄₀₀₀, which exhibited a greater tendency to interact with water, facilitating the liberation of TQ. Additionally, hydrogen bonding and dominant Van der Waals (VdW) forces were identified as crucial factors responsible for the binding of TQ to the polymer carrier at three distinct binding sites. Consequently, the study concluded that TQ exhibits a favorable and significant interaction with PEG₄₀₀₀, as evidenced by the substantial negative value of the adsorption energy. Further investigations are recommended to elucidate the underlying mechanisms of PEGs in mediating these effects.

5. Conclusion

In conclusion, this study validates the significant anti-diabetic properties of thymoquinone (TQ) on the Islets of Langerhans and β -cells. TQ has protective and regenerative effects against the toxic effects of streptozotocin (STZ). Furthermore, TQ has emerged as a potent stimulator of insulin secretion, demonstrating its potential therapeutic

role in the management of diabetes. The moderate toxicity of TQ, especially at elevated concentrations, is partly attributed to its pro-oxidant action. Despite this, the encapsulation of TQ with PEG₄₀₀₀, as evidenced by the TQ-PEG₄₀₀₀-NP formulation, appeared to enhance its antidiabetic activity and decrease its toxicity. Encapsulation augments the protective effect of TQ on β -cells and improves its solubility, potentially expanding its pharmaceutical applications. However, in vivo investigations are needed to validate the antidiabetic effects of TQ-PEG 4000 nanoparticles and improve the bioavailability of TQ.

Funding information

This study was funded by the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research (MESRS) and the General Directorate of Scientific Research and Technological Development (DGRSDT), Algeria.

CRediT authorship contribution statement

Rechda Amel Tachour: Methodology, Investigation. **Abdelmalek Rezgui:** Validation, Methodology, Investigation. **Ayoub Attoui:** Methodology, Investigation. **Mustapha Tacherfiout:** Validation, Formal analysis. **Fatma Zahra Hab:** Methodology, Investigation. **Rania Derguine:** Methodology, Investigation. **Djaouida Charif:** Methodology. **Kamel Gaci:** Methodology. **Rym Agred:** Methodology, Investigation. **Anfel Benmansour:** Methodology, Investigation. **Bachra Khettal:** Validation. **Yacine Benguerba:** Writing – review & editing, Validation. **Widad Sobhi:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Visualization, Validation, Supervision, Methodology, Investigation, Conceptualization.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

No data was used for the research described in the article.

Acknowledgments

The authors are grateful and acknowledge the generous support of the DGRSDT (Direction Générale de la Recherche Scientifique et du Développement Technologique) and the Algerian Ministry of High Education and Scientific Research.

References

- [1] S. Darakhshan, A. Bidmeshki Pour, A. Hosseinzadeh Colagar, S. Sisakhtnezhad, Thymoquinone and its therapeutic potentials, *Pharmacol. Res.* 95–96 (2015), <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2015.03.011>.
- [2] A. Petersmann, D. Müller-Wieland, U.A. Müller, R. Landgraf, M. Nauck, G. Freckmann, L. Heinemann, E. Schleicher, Definition, classification and diagnosis of diabetes mellitus, *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 127 (S 01) (2019) S1–s7, <https://doi.org/10.1055/a-1018-9078>.
- [3] ADA, Professional practice committee: standards of medical care in diabetes—2022, *Diabetes Care* 45 (Supplement 1) (2021). S3-S3.
- [4] IDF, Diabetes facts & figures, Available from: <https://idf.org/about-diabetes/facts-figures/>, 2021.
- [5] A.A. Diabetes, 2. Classification and diagnosis of diabetes: standards of medical Care in Diabetes-2022, *Diabetes Care* 45 (Supplement 1) (2022) S17–S38, <https://doi.org/10.2337/dc22-S002>, 2022.
- [6] L. Yuen, P. Saeedi, M. Riaz, S. Karuranga, H. Divakar, N. Levitt, X. Yang, D. Simmons, Projections of the prevalence of hyperglycaemia in pregnancy in 2019 and beyond: results from the international diabetes federation diabetes atlas, *Diabetes Res. Clin. Pract.* 157 (2019) 107841, <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2019.107841>, 9th edition.
- [7] A. Ahmad, A. Husain, M. Mujeeb, S.A. Khan, A.K. Najmi, N.A. Siddique, Z. A. Damanhour, F. Anwar, A review on therapeutic potential of *Nigella sativa*: a

- miracle herb, *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* (2013) 337–352, [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(13\)60075-1](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(13)60075-1).
- [8] H. Gali-Muhtasib, A. Roessner, R. Schneider-Stock, Thymoquinone: a promising anti-cancer drug from natural sources, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38 (8) (2006) 1249–1253, <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2005.10.009>.
- [9] C.C. Woo, A.P. Kumar, G. Sethi, K.H.B. Tan, Thymoquinone: potential cure for inflammatory disorders and cancer, *Biochem. Pharmacol.* 83 (4) (2012) 443–451, <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.09.029>.
- [10] S. Umar, J. Zargan, K. Umar, S. Ahmad, C.K. Katiyar, H.A. Khan, Modulation of the oxidative stress and inflammatory cytokine response by thymoquinone in the collagen induced arthritis in Wistar rats, *Chem. Biol. Interact.* 197 (1) (2012) 40–46, <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2012.03.003>.
- [11] L. Pari, Sankaranarayanan, Chandrasekaran, Beneficial effects of thymoquinone on hepatic key enzymes in streptozotocin–nicotinamide induced diabetic rats, *Life Sci.* 85 (23) (2009) 830–834, <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2009.10.021>.
- [12] W. Sobhi, N. Boutrid, A. Rezgui, H. Rahmoune, Y. Benguerba, Anti-hyperglycemic and hepato-protective effects of thymoquinone (Nigella sativa oil) in diabetes, *Metab., Clin. Exp.* (2022) 128, <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2021.155108>.
- [13] M. Mansour, M. Nagi, A. El-Khatib, A. Al-Bekairi, Effects of thymoquinone on antioxidant enzyme activities, lipid peroxidation and DT-diaphorase in different tissues of mice: a possible mechanism of action, *Cell Biochem. Funct.* 20 (2) (2002) 143–151, <https://doi.org/10.1002/cbf.968>.
- [14] H. Khithir, W. Sobhi, A. Khenchouche, A. Mosbah, M. Benboubetra, In-vitro antioxidant effect of thymoquinone, *Annual Research Review in Biology* (2018) 1–9, <https://doi.org/10.9734/ARRB/2018/40165>.
- [15] A. El-Mahmoudy, H. Matsuyama, M. Borgan, Y. Shimizu, M. El-Sayed, N. Minamoto, T. Takewaki, Thymoquinone suppresses expression of inducible nitric oxide synthase in rat macrophages, *Int. Immunopharm.* 2 (11) (2002) 1603–1611, [https://doi.org/10.1016/S1567-5769\(02\)00139-X](https://doi.org/10.1016/S1567-5769(02)00139-X).
- [16] M. Bule, S. Nikfar, M. Amini, M. Abdollahi, The antidiabetic effect of thymoquinone: a systematic review and meta-analysis of animal studies, *Food Res. Int.* 127 (2020) 108736.
- [17] A. Shaukat, A. Zaidi, H. Anwar, N.J.F.I.N. Kizilbash, Mechanism of the Antidiabetic Action of Nigella Sativa and Thymoquinone: a Review, vol. 10, 2023.
- [18] B. El-Aarag, W. Hussein, W. Ibrahim, M.J.J.D.M. Zahran, Thymoquinone improves anti-diabetic activity of metformin in streptozotocin-induced diabetic male rats 8 (12) (2017) 2–8.
- [19] S. Chakraborty, D. Shukla, B. Mishra, S. Singh, Lipid—an emerging platform for oral delivery of drugs with poor bioavailability, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 73 (1) (2009) 1–15, <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2009.06.001>.
- [20] S. Dewanjee, P. Chakraborty, B. Mukherjee, V. De Feo, Plant-based antidiabetic nanoformulations: the emerging paradigm for effective therapy, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (6) (2020), <https://doi.org/10.3390/ijms21062217>.
- [21] R.B. Greenwald, H. Zhao, J. Xia, Tripartite poly(ethylene glycol) prodrugs of the open lactone form of camptothecin, *Biorg. Med. Chem.* 11 (12) (2003) 2635–2639, [https://doi.org/10.1016/S0968-0896\(03\)00152-4](https://doi.org/10.1016/S0968-0896(03)00152-4).
- [22] B. Lentz, J. Lee, Poly(ethylene glycol) (PEG)-mediated fusion between pure lipid bilayers: a mechanism in common with viral fusion and secretory vesicle release? *Mol. Membr. Biol.* 16 (4) (1999) 279–296, <https://doi.org/10.1080/096876899294508>.
- [23] D. Duthel, A. Underhaug Gjerde, I. Petit-Paris, G. Mauco, H. Holmsen, Polyethylene glycols interact with membrane glycerophospholipids: is this part of their mechanism for hypothermic graft protection? *J Chem Biol* 2 (1) (2009) 39–49, <https://doi.org/10.1007/s12154-009-0014-x>.
- [24] S. Bhattacharya, M. Ahir, P. Patra, S. Mukherjee, S. Ghosh, M. Mazumdar, S. Chattopadhyay, T. Das, D. Chattopadhyay, A. Adhikary, PEGylated-thymoquinone-nanoparticle mediated retardation of breast cancer cell migration by deregulation of cytoskeletal actin polymerization through miR-34a, *Biomaterials* 51 (2015) 91–107, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.01.007>.
- [25] S. Alam, Z. Khan, G. Mustafa, M. Kumar, F. Islam, A. Bhatnagar, F.J. Ahmad, Development and evaluation of thymoquinone-encapsulated chitosan nanoparticles for nose-to-brain targeting: a pharmacoscintigraphic study, *Int. J. Nanomed.* 18 (7) (2012) 5705, <https://doi.org/10.2147/IJN.S35329>.
- [26] L. Jost, J. Kikwood, T. Whiteside, Improved short- and long-term XTT-based colorimetric cellular cytotoxicity assay for melanoma and other tumor cells, *J. Immunol. Methods* 147 (1992) 153–165, [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(12\)80003-2](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(12)80003-2).
- [27] S. Marzorati, M. Ramirez-Dominguez, Mouse islet isolation, in: S. Islam (Ed.), *Islets of Langerhans*, second ed., Springer, Dordrecht, 2015.
- [28] N. Stull, A. Breite, R. McCarthy, S. Tersey, R. Mirmira, Mouse islet of Langerhans isolation using a combination of purified collagenase and neutral protease, *J. Vis. Exp.* 67 (2012), <https://doi.org/10.3791/4137>.
- [29] M. Velasco, C. Larqué, C.M. Díaz-García, C. Sanchez-Soto, M. Hiriart, Rat pancreatic beta-cell culture, *Methods Mol. Biol.* 1727 (2018) 261–273, https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7571-6_20.
- [30] H. Ohkawa, N. Ohishi, K. Yagi, Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Anal. Biochem.* 95 (2) (1979) 351–358, [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3).
- [31] G.L. Ellman, Tissue sulfhydryl groups, *Arch. Biochem. Biophys.* 82 (1) (1959) 70–77, [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(59\)90090-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90090-6).
- [32] N. Subhangkar, H.S. Paul, N.R. Barman, B. Chakraborty, In vitro evaluation of antioxidant activity of Leucas plukenetii (Roth) Spreng, *Asian J. Plant Sci. Res.* 2 (2012).
- [33] A. Nakata, Y. Imamura, H. Nakai, Extension of the core-valence-rydberg B3LYP functional to core-excited-state calculations of third-row atoms, *J. Chem. Theor. Comput.* 3 (4) (2007) 1295–1305.
- [34] S.L. Mayo, B.D. Olafson, W.A. Goddard, DREIDING: a generic force field for molecular simulations, *J. Phys. Chem.* 94 (26) (1990) 8897–8909.
- [35] W. Sobhi, B. Khetta, M. Belmouhoub, D. Atmani, P. Duez, M. Benboubetra, Hepatotoxicity and Langerhans islets regenerative effects of polar and neutral lipids of Nigella sativa L. in nicotinamide/streptozotocin-induced diabetic rats, *Pteridines* 22 (1) (2011) 97–104, <https://doi.org/10.1515/pteridines.2011.22.1.97>.
- [36] H. Omar Alobaedi, H. Wamidh Talib, Basheti, A. Iman, Antitumor effect of thymoquinone combined with resveratrol on mice transplanted with breast cancer, *Asian Pac. J. Tropical Med.* 10 (4) (2017) 400–408, <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2017.03.026>.
- [37] K.M. Ibiyeye, N. Nordin, M. Ajat, A.B.Z. Zuki, Ultrastructural changes and antitumor effects of doxorubicin/thymoquinone-loaded CaCO₃ nanoparticles on breast cancer cell line, *Front. Oncol.* 9 (2019) 599, <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00599>.
- [38] C. Arpagaus, A. Collenberg, D. Rütli, E. Assadpour, S.M. Jafari, Nano spray drying for encapsulation of pharmaceuticals, *Int. J. Pharm.* 546 (1–2) (2018) 194–214, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.05.037>.
- [39] J. Rodríguez, M.J. Martín, M.A. Ruiz, B. Clares, Current encapsulation strategies for bioactive oils: from alimentary to pharmaceutical perspectives, *Food Res. Int.* 83 (2016) 41–59, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.01.032>.
- [40] H. Abdellkader, S. Hussain, N. Abdullah, S. Kmaruddin, Review on micro-encapsulation with Chitosan for pharmaceutical applications, *MOJ Current Research Reviews* 1 (2) (2018) 77–84, <https://doi.org/10.15406/mojcrr.2018.01.00013>.
- [41] H.-J. Jang, C.-Y. Shin, K.-B. Kim, Safety evaluation of polyethylene glycol (PEG) compounds for cosmetic use, *Toxicol. Res.* 31 (2015) 105–136, <https://doi.org/10.5487/TR.2015.31.2.105>.
- [42] R.S. Lanigan, T.A. Yamarik, Final report on the safety assessment of PEG-6,-8, and-20 sorbitan beeswax, *Int. J. Toxicol.* 20 (2001) 27–38, <https://doi.org/10.1080/10915810152902565>.
- [43] A. Hosni, A. Abdel-Moneim, M. Hussien, M.I. Zanaty, Z.E. Eldin, A.A.G. El-Shahawy, Therapeutic significance of thymoquinone-loaded chitosan nanoparticles on streptozotocin/nicotinamide-induced diabetic rats: in vitro and in vivo functional analysis, *Int. J. Biol. Macromol.* 221 (2022) 1415–1427, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.09.048>.
- [44] J. Gao, A. Kumari, X.-A. Zeng, S. Chan, M.A. Farooq, M. Alee, S.H. Khan, A. Rahaman, S. He, X.J.F.I.C. Xin, Coating of chitosan on poly D, L-lactic-co-glycolic acid thymoquinone nanoparticles enhances the anti-tumor activity in triple-negative breast cancer 11 (2023) 1044953.
- [45] F. Sabouni, A. Hamta, B. Sohrabi, M. Qadbeigi, Thymoquinone nanoparticle induces apoptosis and cell migration retardation through modulating of SUMOylation process genes in breast cancer cell line 22 (1) (2024) 86–95.
- [46] Y. Abdoune, Y. Benguerba, S. Benabid, H. Khithir, W. Sobhi, D. Benachour, Numerical investigation of polyethylene glycol polymer (PEG) and dithymoquinone (DTQ) interaction using molecular modeling, *J. Mol. Liq.* 276 (2019) 134–140, <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.11.105>.
- [47] N. Gaber, Y. Darwis, K. Peh, Y. Tan, Characterization of polymeric micelles for pulmonary delivery of beclomethasone dipropionate, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 6 (2006) 3095–3101, <https://doi.org/10.1166/jnn.2006.426>.
- [48] G.M. Demirbolat, Ö. Erdoğan, G.P. Coşkun, Ö. Çevik, PEG4000 modified liposomes enhance the solubility of quercetin and improve the liposome functionality: in vitro characterization and the cellular efficacy, *Turk. J. Chem.* (2022), <https://doi.org/10.55730/1300-0527.3411>.
- [49] M. McDermott, A. Eustace, S. Busschots, L. Breen, M. Clynes, N. O'Donovan, B. Stordal, In Vitro Development of Chemotherapy and Targeted Therapy Drug-Resistant Cancer Cell Lines: A Practical Guide with Case Studies, vol. 4, 2014, <https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00040>.
- [50] S. Acharya, F. Dilnawaz, S.K. Sahoo, Targeted epidermal growth factor receptor nanoparticle bioconjugates for breast cancer therapy, *Biomaterials* 30 (29) (2009) 5737–5750, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.07.008>.
- [51] R. Nciri, M.S. Allagui, F. Croute, C. Vincent, A. Elfeki, Effets chroniques de faibles doses de carbonate de lithium chez la souris. Relations entre statut oxydant et modifications fonctionnelles et structurales des reins et du cerveau, *Comptes Rendus Biol.* 331 (1) (2008) 23–31, <https://doi.org/10.1016/j.crv.2007.11.004>.
- [52] H. Younus, Therapeutic potentials of superoxide dismutase, *Int. J. Health Sci.* 12 (3) (2018) 88.
- [53] G. Bresciani, I.B.M. da Cruz, J. González-Gallego, Manganese superoxide dismutase and oxidative stress modulation, *Adv. Clin. Chem.* 68 (2015) 87–130, <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2014.11.001>.
- [54] M.-C.-i. Lee, M. Velayutham, T. Komatsu, R. Hille, J.L. Zweier, Measurement and characterization of superoxide generation from xanthine dehydrogenase: a redox-regulated pathway of radical generation in ischemic tissues, *Biochemistry* 53 (41) (2014) 6615–6623, <https://doi.org/10.1021/bi500582r>.
- [55] D. Iverson, L.R. DeChatelet, J. Spitznagel, P. Wang, Comparison of NADH and NADPH oxidase activities in granules isolated from human polymorphonuclear leukocytes with a fluorometric assay, *J. Clin. Invest.* 59 (2) (1977) 282–290, <https://doi.org/10.1172/JCI108639>.
- [56] O. Stanger, W. Renner, G. Khoschsorur, B. Rigler, T. Wascher, NADH/NADPH oxidase p22 phox C242T polymorphism and lipid peroxidation in coronary artery disease, *Clin. Physiol.* 21 (6) (2001) 718–722, <https://doi.org/10.1046/j.1365-2281.2001.00381.x>.

- [57] H. Khither, A. Mosbah, S. Madoui, K. Mokhnache, W. Sobhi, Effect of thymoquinone as prophylactic treatment against CCl₄-induced hepatotoxicity on antioxidants status, *J. Drug Deliv. Therapeut.* 10 (5) (2020) 208–212, <https://doi.org/10.22270/jddt.v10i5.4401>.
- [58] Averill-Bates, A. Diana, The antioxidant glutathione, *Vitam. Horm.* 121 (2023) 109–141, <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2022.09.002>.
- [59] K. Aquilano, S. Baldelli, M.R. Ciriolo, Glutathione: new roles in redox signaling for an old antioxidant, *Front. Pharmacol.* 5 (2014) 196, <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00196>.

Résumé :

L'étude présentée dans ce manuscrit explore l'effet de l'encapsulation de composés naturels, tels que la quercétine, la thymoquinone et la curcumine, sur leurs propriétés anti-apoptotiques et antioxydantes dans les cellules β des îlots de Langerhans, dans le contexte du stress oxydatif et de l'apoptose induits par la streptozotocine, un modèle de diabète de type 1. Les résultats montrent que l'encapsulation basée sur le PEG4000 améliore significativement la solubilité et la libération contrôlée des composés. Par exemple, l'efficacité d'encapsulation a atteint 85 % pour la quercétine, et sa libération a été prolongée jusqu'à 24 heures dans des conditions physiologiques simulées. Sur le plan biologique, la quercétine encapsulée a permis une augmentation de la viabilité cellulaire de 78 % à 91 % chez les cellules NIT-1 endommagées, tout en réduisant de manière significative les niveaux de malondialdéhyde (MDA) et en augmentant l'activité de la superoxyde dismutase (SOD). Les analyses *in silico* ont confirmé des interactions moléculaires favorables entre les composés encapsulés et les polymères, renforçant leurs propriétés thérapeutiques.

Ces résultats indiquent que l'encapsulation des composés naturels est une stratégie efficace pour améliorer leurs performances biologiques, notamment en termes de protection des cellules β . Pour l'avenir, il serait pertinent d'étendre ces travaux à des modèles animaux afin de valider l'efficacité *in vivo*, d'explorer l'encapsulation d'autres composés antidiabétiques et d'optimiser les systèmes de libération pour une application clinique durable. En complément, l'intégration de la thérapie cellulaire pourrait constituer une avancée prometteuse dans le traitement du diabète de type 1.

Mots clés : Quercétine ; Thymoquinone; Curcumine ; Cellules β (NIT-1) ; Streptozotocine; Stress oxydatif ; Apoptose ; Diabète de type 1 ; PEG4000.

Abstract :

The work presented in this study investigates the effects of encapsulating natural compounds, such as quercetin, thymoquinone, and curcumin, on their anti-apoptotic and antioxidant properties in β -cells of the islets of Langerhans after inducing the oxidative stress and the apoptosis by streptozotocin, a model for type 1 diabetes. The results indicate that PEG4000-based encapsulation has significantly enhanced the solubility and the controlled release of these compounds. For instance, the encapsulation efficiency of quercetin reached 85%, and its release was extended for up to 24 hours under simulated physiological conditions. In addition, the encapsulated quercetin has enhanced the cell viability from 78% to 91% in damaged NIT-1 cells, and significantly reduced the malondialdehyde (MDA) levels and increased superoxide dismutase (SOD) activity. The *in-silico* analyses have confirmed favorable molecular interactions between the encapsulated compounds and the polymers, thus enhancing their therapeutic potential.

The obtained results confirm that the encapsulation of natural compounds is an effective strategy to enhance their biological performance, particularly in protecting β -cells. Future research should validate the *in vivo* efficiency of these compounds using animal models, explore the encapsulation of other antidiabetic compounds, and optimize delivery systems for sustainable clinical applications. Also, the use of cell therapy could represent a promising advancement in the treatment of type 1 diabetes.

Mots clés : Quercetin, Thymoquinone, Curcumin; β -cells (NIT-1) ; Oxydative Stress; Apoptosis ; Streptozotocin; Type 1 Diabetes; PEG4000

ملخص:

يتناول العمل المقدم في هذه الدراسة تأثير تغليف المركبات الطبيعية، مثل الكيرسيتين والثيموكينون والكرمين، على خصائصها المضادة للموت الخلوي والمضادة للأكسدة في خلايا بيتا في جزر لانجرهانز بعد إحداث الإجهاد التأكسدي والموت الخلوي المبرمج بواسطة الستربتوزوتوسين، وهو نموذج لمرض السكري من النوع الأول. تشير النتائج إلى أن التغليف القائم على ال بييج 4000 قد عزز بشكل كبير قابلية الذوبان والتحرير المتحكم فيه لهذه المركبات. على سبيل المثال، وصلت كفاءة تغليف الكيرسيتين إلى 85٪، وتم تمديد إطلاقه (أو تحريره) لمدة تصل إلى 24 ساعة في ظل محاكاة الظروف الفسيولوجية. بالإضافة إلى ذلك، عزز الكيرسيتين المغلف قابلية الخلايا للبقاء من 78٪ إلى 91٪ في الخلايا NIT-1 التالفة، وخفض بشكل كبير مستويات المالونديالدهيد (MDA) وزاد من نشاط إنزيم أكسيد الفائق (SOD). وقد أكدت التحليلات الحاسوبية تفاعلات جزيئية إيجابية بين المركبات المغلفة والبوليمرات، وبالتالي تعزيز إمكاناتها العلاجية.

وتؤكد النتائج التي تم الحصول عليها أن تغليف المركبات الطبيعية هو استراتيجية فعالة لتعزيز أدائها البيولوجي، وخاصة في حماية الخلايا بيتا. وينبغي للبحوث المستقبلية أن تثبت كفاءة هذه المركبات في الجسم الحي باستخدام نماذج حيوانية، بالإضافة إلى استكشاف تغليف المركبات الأخرى المضادة لمرض السكري، وتحسين أنظمة التوصيل للتطبيقات السريرية المستدامة. كما أن استخدام العلاج الخلوي يمكن أن يمثل تقدمًا واعدًا في علاج مرض السكري من النوع الأول..

الكلمات المفتاحية: كيرسيتين، ثيموكينون، الكركمين؛ خلايا بيتا (NIT-1)؛ الإجهاد التأكسدي. للموت الخلوي (المبرمج) الستربتوزوتوسين؛ مرض السكري من النوع الأول . بييج 4000