

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITÉ de TLEMCEM

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de
l'Univers

Département de biologie

Spécialité : Biologie moléculaire et génétique

Thèse

Présentée et soutenue publiquement le .././2021 par

Monsieur HAMZA NADJIB MERAD BOUDIA

Né le 07/10/1981 à Sidi bel abbès, Algérie

En vue de l'obtention du

Diplôme de doctorat

Thème

***Épidémiologie moléculaire et aspect thérapeutique
au cours de l'hypertension artérielle et COVID-19***

Jury

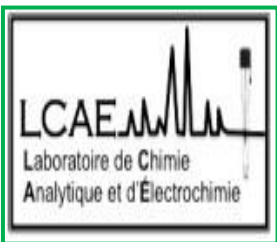
Présidente : Mme MEDJATI-DENNOUNI Nouria. Professeur, Université de Tlemcen

Examinatrice : Mme ZAHZAH Touria. Professeur, Université de Sidi Bel Abbès

Examinatrice : Mme Belkessam Nafissa. MCA, Université de Sidi Bel Abbès

Examineur : MR CHERRAK SABRI. MCA, Université de Tlemcen

Directrice de thèse : Mme DALI YUCEF-SAHI Majda. Professeur, Université de Tlemcen



Dédicaces

A mes très chers parents.

A mes chers enfants...

A mes chères frères et sœurs...

A mes chère (es) amis (es)...

Aux personnes que j'aime...

A toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de ce travail.

Remerciements

“Soyons reconnaissants aux personnes qui nous donnent du bonheur ; elles sont les charmants jardiniers par qui nos âmes sont fleuries”.

Marcel Proust

Je voudrai tout d’abord remercier Dieu, le tout puissant, qui a travers sa puissance et sa sagesse a destiné pour moi ce parcours

L’achèvement de ce travail mené sur plusieurs années procure une grande satisfaction. Il est l’occasion de se remémorer les différentes embûches qu’il a fallu surmonter mais surtout les personnes qui m’ont permis d’en arriver là.

Je tiens tout d’abord à adresser mes remerciements les plus sincères à Professeur DALI-SAHI MAJDA pour avoir dirigé cette thèse et m’avoir permis de la réaliser dans les meilleures conditions. Je tiens particulièrement à la remercier de la liberté d’action qu’elle m’a donné à chaque étape de cette aventure. Je n’oublierai jamais ce que vous avez fait pour moi . Je n’oublierai jamais ce que vous m’aviez appris .Je ne saurais choisir les mots pour vous. J’espère avoir été digne de la confiance que vous m’aviez accordée et que ce travail soit finalement à la hauteur de vos espérances.

Dr DENNOUNI-MEDJATI.N Vous me faites l’honneur de présider le jury, Je tiens à vous témoigner mon respect et toute ma reconnaissance.

Pr ZAHZAH .T, Dr. BELKESSEM.N et Dr SABRI. Je vous remercie d’avoir accepté de participer à ce jury de thèse. Soyez assuré de toute ma gratitude.

Je remercie l’ensemble des enseignants et personnels du département de biologie (faculté des sciences biologiques , université Abou bekr belkaid , Tlemcen) qui m’ont donné la chance de suivre ce parcours inédit !

Je n’oublierai pas de remercier Mr Youcef Kachekouche , pour son humilité et sa générosité scientifique sans retour. Merci pour toute l’aide que tu m’as apportée surtout sur le plan statistique

Merci à l’ensemble de ma famille, qui contribue à mon équilibre, et qui me permet de se rappeler ce qu’est l’essentiel dans la vie.

Je remercie mes parents qui, de part leur éducation et leur amour, m’ont donné la possibilité de s’engager dans ce parcours, et qui m’ont toujours soutenue et encouragé dans les moments les plus durs

Mes remerciements à : Maman pour m’avoir transmis, avec tant d’enthousiasme, la volonté et le sentiment de ne jamais baisser les bras pour continuer encore mes études ;

A mon père, pour ses qualités d’écoute, son humanisme, pour m’avoir fait découvrir et donné envie d’explorer des horizons divers ;

A mon bonheur , mon fils RAFIK WAIL. Je suis déjà chanceux de t'avoir, je prends mon énergie et ma volonté en toi, je te souhaite le meilleur...

A ma fille Rym , ta venue au monde m'a permis de connaître l'amour d'une fille et le sacrifice d'un papa.

Je suis sûr que Dieu vous réservera le meilleur pour le futur

A mes frères et sœurs :

Fazila , Zoubida et HINDA, continues dans ta thèses, soit patiente et persévérante .Je suis sûr que tu y arriveras.

A Mohamed et Sofiane pour votre soutien, parce que c'est avant tout la réussite d'une famille.

Je souhaite beaucoup de réussite a vos enfants, car je sais, c'est le souhait de chacune et chacun de vous.

A mes grands parents. Vous êtes toujours présents dans nos cœurs.

Je n'oublie pas toutes les personnes qui comptent beaucoup pour moi et qui ont contribué à leur manière à la réussite de cette thèse de doctorat.

Ces derniers remerciements et non les moindres s'adressent a :DARCHERIF AMEL et TAIEB BRAHIM MUSTAPHA pour tout ce que vous avez fait pour moi. Merci pour votre énergie , votre disponibilité , votre compréhension et vos encouragements inlassables...

Une thèse a beau être une aventure en solitaire, il existe tout un troupeau de doctorants qui sont dans la même galère, et qui font qu'on se sent moins seul... Travailler à leurs cotés fut une expérience enrichissante et les nombreux échanges scientifiques que nous avons eu m'ont permis d'approfondir mes connaissances dans de nombreux domaines. Merci a tous.

Résumé

L'étude ainsi entreprise a abouti à de véritables conclusions pour les patients hypertendus et ou diabétiques avec facteurs de risque cardiovasculaires associés.

Des effets cardiovasculaires ont été rapportés chez des patients hypertendus avec COVID-19 lorsqu'ils étaient traités par l'hydroxychloroquine. Nos résultats ont révélé pour la première fois, en détail atomique, comment l'un des médicaments les plus controversés, "l'hydroxychloroquine" se liait à une autre cible enzymatique (COX2) (score d'amarrage, Affinité: -7,6 (kcal / mol).

Comparée aux AINS, l'hydroxychloroquine s'est révélée un inhibiteur d'enzymes (bio activité= 0.15) probablement la COX, comme les autres AINS dont la bio activité inhibitrice enzymatique était située entre 0.12 et 0.17. L'hydroxychloroquine était la seule à montrer une activité élevée contre plus d'un récepteur cible : Récepteurs couplés à la protéine G (bio activité = 0,35), modulateurs des canaux ioniques (bio activité = 0,30), inhibiteurs de kinases (bio activité = 0,44).

Dans le suivi de ces patients, notre modèle logistique avait retenu les taux de VCM ($p = 0,000$), CCMH ($p = 0,0001$), plaquettes ($P = 0,021$) et la VS ($P = 0,001$) comme facteurs hématologiques associés à l'hypertension artérielle.

Chez les hypertendus DT2, l'activité enzymatique de l'IDO était un facteur étroitement lié à la progression du diabète de type 2 indépendamment des autres facteurs potentiels.

L'ANOVA a révélé que le ratio K/T était associé positivement à l'âge ($r = 0,453$, $p = 0,004$) et à l'ancienneté du diabète ($r = 0,415$, $p = 0,009$). Le ratio K/T était aussi négativement associé à la glycémie ($r = -0,291$, $p = 0,013$).

L'impact de la dénutrition chez les hypertendus était important. Les résultats de la régression linéaire ont montré que le sexe ($p=0.001$), l'IMC ($p=0.0001$), les ARA 2 ($p=0,009$), les IEC ($p=0,026$), et l'association ARA2/D (0.013) étaient des facteurs de risque de la dénutrition.

Mots clés : Hypertension, Docking moléculaire, Profil hématologique, Tryptophane, Thérapeutique, Dénutrition

Abstract

The study thus undertaken has led to real conclusions for hypertensive and / or diabetic patients with associated cardiovascular risk factors.

Cardiovascular effects have been reported in hypertensive patients with covid 19 when treated with hydroxychloroquine. Our results reveal for the first time in atomic detail how one of the most controversial drugs: Hydroxychloroquine binds to another enzymatic target (COX2) (Docking score, Affinity: -7.6 (kcal / mol) .

Compared to NSAIDs, hydroxychloroquine has been shown to be an enzyme inhibitor (bioactivity = 0.15) probably COX, like other NSAIDs whose enzyme inhibitory bioactivity is between 0.12 and 0.17. Hydroxychloroquine was the only one to show high activity against more than one target receptor (GPCR (bioactivity = 0.35), (ion channel modulators (bioactivity = 0.30). Kinase inhibitor receptors, bioactivity = 0.44).

In the follow-up of these patients, our logistic model retained the MCV rates ($p = 0.000$). , MCHC ($p = 0.0001$), platelets ($P = 0.021$). and ESR ($P = 0.001$) as hematologic factors associated with arterial hypertension.

In T2DM hypertensive patients, the enzymatic activity of IDO was a factor closely related to the progression of type 2 diabetes independent of other potential factors

ANOVA found that the K / T ratio was positively associated with age ($r = 0.453$, $p = 0.004$) and duration of diabetes ($r = 0.415$, $p = 0.009$). The K / T ratio was also negatively associated with blood sugar ($r = -0.291$, $p = 0.013$).

The impact of undernutrition in hypertensive people is significant. The results of the linear regression show that sex ($p = 0.001$), BMI ($p = 0.0001$), ARB 2 ($p = 0.009$), ACE inhibitor ($p = 0.026$), and the ARA2 / D association (0.013) are risk factors for undernutrition.

Keywords: Hypertension, Molecular docking, Haematological profile, Tryptophan, Therapeutics, Undernutrition

الملخص

أدت الدراسة التي أجريت على هذا النحو إلى استنتاجات حقيقية لمرضى ارتفاع ضغط الدم و / أو السكري مع عوامل الخطر المرتبطة بأمراض القلب والأوعية الدموية.

تم الإبلاغ عن تأثيرات على القلب والأوعية الدموية لدى مرضى ارتفاع ضغط الدم المصابين بفيروس كوفيد 19 عند علاجهم بهيدروكسي كلوروكوين. تكشف نتائجنا لأول مرة بالتفصيل الذي كيف أن أحد الأدوية الأكثر إثارة للجدل: هيدروكسي كلوروكوين يرتبط بهدف إنزيمي آخر (COX2) (درجة الإرساء ، التقارب: -7.6 (كيلو كالوري / مول).

بالمقارنة مع مضادات الالتهاب غير الستيروئيدية ، فقد ثبت أن هيدروكسي كلوروكوين هو مثبط إنزيم (النشاط الحيوي = 0.15) على الأرجح كوكس ، مثل مضادات الالتهاب غير الستيروئيدية الأخرى التي يتراوح نشاط تثبيط الإنزيم فيها بين 0.12 و 0.17. كان Hydroxychloroquine الوحيد الذي أظهر فعالية عالية ضد أكثر من مستقبل مستهدف واحد (GPCR) (النشاط الحيوي = 0.35) ، (معدلات القنوات الأيونية) (النشاط الحيوي = 0.30). مستقبلات مثبطات كيناز ، النشاط الحيوي = 0.44).

في متابعة هؤلاء المرضى ، احتفظ نموذجنا اللوجستي بمعدلات الأمراض القلبية الوعائية (ع = 0.000). MCHC (ع = 0.0001) ، الصفائح الدموية (P = 0.021). و (P = 0.001) ESR) كعوامل دموية مرتبطة بارتفاع ضغط الدم الشرياني.

في مرضى ارتفاع ضغط الدم T2DM ، كان النشاط الأنزيمي لـ IDO عاملاً وثيق الصلة بتطور مرض السكري من النوع 2 بغض النظر عن العوامل المحتملة الأخرى

وجد ANOVA أن نسبة K / T كانت مرتبطة بشكل إيجابي بالعمر (r = 0.453 ، p = 0.004) ومدة مرض السكري (r = 0.415 ، p = 0.009). ارتبطت نسبة K / T سلبًا أيضًا بسكر الدم (r = -0.291 ، p = 0.013).

إن تأثير نقص التغذية لدى المصابين بارتفاع ضغط الدم كبير. تظهر نتائج الانحدار الخطي أن الجنس (ع = 0.001) ، مؤشر كتلة الجسم (ع = 0.0001) ، ARB 2 (ع = 0.009) ، مثبط الإنزيم المحول للأنجيوتنسين (ع = 0.026) ، ورابطة (ARA2 / D) (0.013) هي عوامل خطر لنقص التغذية.

الكلمات الرئيسية: ارتفاع ضغط الدم ، الالتحام الجزيئي ، خصائص الدم ، الترتيبات ، العلاج ، نقص التغذية

Production scientifique

Les publications et les communications suivantes sont le résultat du travail de thèse:

Publications

Articles

Merad Boudia H.N, Dali-Sahi M, Kachekouche Y, Medjati-Dennouni N. Hematologic disorders during essential hypertension. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews* 2019;13:1575-1579.

Hamza Nadjib Merad-boudia , Majda Dali-Sahi , Youcef Kachekouche , Nouria Dennoun-Medjati, Hennart Benjamin , Lenski Marie , Allorge Delphine . Blood determination of kynurenin, tryptophan metabolite and perspectives in the biological monitoring of type 2 diabetics. *International medical journal* , November 2020 ; Volume - 25, (11) : 3589-3600.

Hamza Nadjib Merad-Boudia , Majda Dali-Sahi, Baya Guermouche and Nouria Dennouni-Medjati. Dynamics of the epidemiological and nutritional transition in developing countries and appearance of covid 19: Overview. *World Journal of Advanced Research and Reviews*, 2020, 08(02), 010–018

Hamza Nadjib Merad-Boudia , Majda Dali-Sahi, Nouria Medjati-Dennouni and Youcef Kachekouche. The magnitude of high blood pressure and its risk factors in the western region of Algeria. *World Journal of Biology Pharmacy and Health Sciences*, 2020, 04(01), 059–066.

Merad-boudia HN, Dali-Sahi M, Kachekouche Y, Dennoun-Medjati N, Salmi T, Meziane PA, Treatment of high blood pressure in diabetic patients and risk of undernutrition in a population in extreme Western Algeria, *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*.2021; 11(1):8-12

Hamza Nadjib Merad-boudia, Majda Dali-Sahi, Nouria Dennouni-Medjati , Stereochemistry and validation of the structure of cyclooxygenase, preferred target of controversial non-steroidal anti-inflammatory drugs during the COVID 19 pandemic , *Journal of Drug Discovery and Therapeutics* . January: 2021 , Volume 9, Issue 01 : 01-09

Hamza Nadjib Merad-Boudia, Majda Dali-Sahi, Baya Guermouche, Nouria Dennoun-Medjati . In silico study: Assessment of the inhibition of cyclo-oxygenase 2 by ibuprofen by validating molecular docking and cardiovascular effects reported during the COVID 19 pandemic. International Journal of Pharma Sciences and Research. October 2020 .Volume 11 ; (10) : 232-239

Hamza Nadjib Merad-Boudia , Majda Dali-Sahi, Baya Guermouche and Nouria Dennoun-Medjati . in-silico study: cox2 (cyclo-oxygenase 2), an unknown target of hydroxychloroquine repositioned for the treatment of covid 19 infection and cardiovascular effects, International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research , February 2021 , Vol. 12(2): 1000-09

Hamza Nadjib Merad-Boudia, Majda Dali-Sahi, Nouria Dennouni-Medjati , Exhaustive Review of Studies in Silico Conducted in the Fight against COVID-19 that involved Hydroxychloroquine and/or Chloroquine alone, in Combination or Compared to other Therapeutic Agents , International Journal for Research in Applied Science & Engineering Technology , Dec 2020 . Volume 8 Issue XII : 1078-1087.

Dali-Sahi M, Medjati-Dennouni N, Kachekouche Y, **Merad Boudia H**, Benslama Y, Meziane FZ, Abderahim M. Effet du furosémide et de l'indapamide sur l'équilibre ionique et métabolique des hypertendus diabétiques de type 2. Médecine Thérapeutique 2018;24:441-448.

Dali-Sahi M, Medjati-Dennouni N, Kachekouche Y, **Merad Boudia H**, Boulenouar H. Association of insulin secretion level on lipid fractions and risk of arterial hypertension. The Open Hypertension Journal 2019;11:6-10.2018;24:441-448.

Communications (proceeding)

Merad Boudia H, Kachekouche Y, Dali-Sahi M, Medjati-Dennouni N, Abderahim M. Influence de la polymédication sur l'état nutritionnel des hypertendus. Nutrition clinique et métabolisme 2019;33:45.

Dali-Sahi M, Medjati-Dennouni N, Kachekouche Y, **Merad Boudia H**. Évaluation du risque de survenue de la dénutrition chez des sujets diabétiques hypertendus. Nutrition clinique et métabolisme 2019;33:54.

Communications internationales

Implication de la voie des kynurénines dans le développement de l'HTA essentielle chez le sujet diabétique N. Dennouni Medjati, M. Dali-Sahi, **H. Merad-Boudia**, Y. Kachekouche
Congrès de la Société Francophone du Diabète à Marseille du 26 au 29 Mars 2019.

Liste des abréviations

ACC: American College of Cardiology

ADA : American Diabetes Association

ADO: Anti-Diabétiques Oraux

AINS : Anti-Inflammatoires Non Stéroïdiens

AIT: Accidents Ischemiques Transitoires

ARA : Antagonistes des Récepteurs de l'Angiotensine

ASCVD: Atherosclerotic Cardiovascular Disease

ASH: American Society of Hypertension

ATC : Anatomical Therapeutic Chemical- (Classification System)

AVC : Accidents Vasculaires Cérébraux

BB : BêtaBloquants

CCMH: Concentration Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine

CECMV : Collège des Enseignants de Cardiologie et Maladies Vasculaires

CEI : Comité d'Experts International

CIM : Classification Internationale des Maladies

COVID: Coronavirus Disease

COX: Cyclo-Oxygénase

CYS: Cystéine

DBP: Diastolic Blood Pressure

DT2 : Diabète de Type 2

ECR: Essais Contrôlés Randomisés

ESC: European Society of Cardiology

ESH: European Society of Hypertension

ESPEN: European Society of Parenteral and Enteral Nutrition

GLY: Glycine

GPCR: G Protein-Coupled Receptor

HbA1c : Hémoglobine Glyquée

HMOD: Hypertension-Mediated Organ Damage

HOPE: Heart Outcomes Prevention Evaluation

HTA: Hypertension Artérielle

HYVET: HYpertension in the Very Elderly Trial

IC : Inhibiteurs Calciques

IDM : Infarctus du Myocarde

IDO : Indolamine

IEC : Inhibiteurs de l'Enzyme de Conversion de l'angiotensine

IMC : Indice de Masse Corporelle

IRC : Insuffisance Rénale Chronique

JNC : Joint National Committee

MAPA : Mesure Ambulatoire de la Pression Artérielle

MCV: Maladies Cardio-Vasculaires

MNA : Mini Nutritional Assessment

MNT : Maladies non transmissibles

MRC : Maladie Rénale Chronique

NCD-RISC: Non-communicable Disease and Risk Factor

OMS : Organisation mondiale de la santé

OR: Odds Ratio

PA : Pression Artérielle

PMSI : Programme de Médicalisation des Systèmes d'Information

PRO: Proline

RAAS: Renin-angiotensin-aldostérone system

Ratio K/T: Ratio Kynurenine Tryptophane

SBP: Systolic Blood Pressure

SHEP: Systolic Hypertension in the Elderly Program

SPRINT: Systolic Blood Pressure Intervention Trial

SPRINT: Systolic Blood Pressure Intervention Trial

SRAS-Cov-2: Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2

SYST-EUR: Systolic Hypertension in Europe

VCM: Volume Corpusculaire Moyen

WHO: World Health Organisation

Table des matières

Dédicaces.....	2
Remerciements	3
Résumé.....	1
Abstract	2
الملخص	3
Production scientifique	4
Liste des abréviations.....	7
Table des matières	10
Introduction générale.....	0
Chapitre 1: The magnitude of high blood pressure and its risk factors in the western region of Algeria	8
Introduction.....	9
Patients et méthodes	9
Résultats	9
Discussion	10
Conclusion	11
Chapitre 2: Hematologic disorders during essential hypertension.....	20
Introduction.....	21
Méthodes	21
Résultats.....	22
Discussion	22
Conclusion	24
Chapitre 3 : Blood determination of kynurenin, tryptophan metabolite and perspectives in the biological monitoring of type 2 diabetics	30
Introduction.....	31
Matériel et Méthodes	31
Résultats.....	32

Discussion	32
Conclusions.....	35
Chapitre 4: Treatment of high blood pressure in diabetic patients and risk of undernutrition in a population in extreme Western Algeria	48
Introduction.....	49
Méthodes	49
Résultats	50
Discussion	50
Conclusion	51
Chapitre 5 : Stereochemistry and validation of the structure of cyclooxygenase, preferred target of controversial non-steroidal anti-inflammatory drugs during the COVID 19 pandemic	58
Introduction.....	59
Méthodes	60
Résultats	61
Discussion	61
Conclusion	63
Chapitre 6 : In silico study: Assessment of the inhibition of cyclo-oxygenase 2 by ibuprofen by validating molecular docking and cardiovascular effects reported during the COVID 19 pandemic ...	74
Introduction.....	75
Matériels et méthodes	75
Résultat.....	76
Discussion	77
Conclusion	78
Chapitre 7 : in-silico study: cox2 (cyclo-oxygenase 2), an unknown target of hydroxychloroquine repositioned for the treatment of covid 19 infection and cardiovascular effects	87
Introduction.....	88
Matériels et méthodes	88
Résultats et discussion	90
Conclusion	94

Chapitre 8 : Exhaustive Review of Studies in Silico Conducted in the Fight against COVID-19 that involved Hydroxychloroquine and/or Chloroquine alone, in Combination or Compared to other Therapeutic Agents	104
Introduction.....	105
Méthodes	105
Résultats.....	106
Discussion	108
Conclusion	114
Discussion Générale	125
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	132
Conclusion	133
Perspectives	135
Références bibliographiques.....	137
Annexes	143

Introduction générale

Introduction générale :

L'hypertension artérielle essentielle résulte d'anomalies des systèmes de contrôle vasculaires, cardiogéniques, rénaux, neurogènes et endocriniens qui interagissent de manière complexe.

Les preuves suggèrent que les anomalies de ces mécanismes de régulation résultant d'interactions génétiques et environnementales modifiées jouant un rôle important dans la pathogenèse de l'hypertension primaire. (Forrester et al., 2018) , mais aussi dans la réponse variable aux antihypertenseurs . (Marx et al., 2020) , (Hill et Bordoni, 2020).

Les changements structurels entraînés amplifient et perpétuent l'hypertension en augmentant la résistance vasculaire systémique, en améliorant le débit cardiaque et en altérant l'excrétion rénale de sodium et d'eau.

En 2018 , les guidelines de l'ACC-AHA publiées ont endossé les conclusions de l'étude SPRINT et proposé une nouvelle définition de l'hypertension artérielle ($> 130/80$ mmHg et non plus $> 140/90$ mmHg) (Williams et al., 2018) .

Ces recommandations viennent renforcer la prise en charge de cette pathologie , le plus souvent associée à des facteurs de risque modifiables tels le rapport taille / hanches, le tour de taille, le tabagisme et l'alimentation (Akalu et Belsti, 2020) , et de facteurs de risque non modifiables tels le sexe, l'âge et la durée du diabète. (Kemche et al., 2020) .

En effet , l'hypertension avec diabète augmente le risque de mortalité de 7,2 fois avec un risque de décès plus élevé dans les pays en développement. (Bian et Li, 2021). L'hypertension contribue au développement et à la progression des complications microvasculaires (rétinopathie, néphropathie et neuropathie) et macrovasculaires (athérosclérotiques) du diabète.(Zhou et al., 2020).

Vice versa , la résistance à l'insuline est associée à une activation inappropriée du système rénine-angiotensine-aldostérone (RAAS). Une fois RAAS activé, plusieurs mécanismes qui augmentent la pression artérielle seront activés. Par exemple, l'angiotensine II, le produit de l'activation du RAAS, stimule la vasoconstriction et la production d'aldostérone, une hormone responsable de la rétention de sel et d'eau dans le rein pour provoquer une hypertension. (Grillo et al., 2019).

Le diagnostic du diabète repose généralement sur une histoire caractéristique appuyée par une glycémie élevée (glycémie à jeun supérieure à 126 mg / dL, glucose aléatoire supérieure à 200 mg / dL ou hémoglobine A1C (HbA1c supérieure à 6,5%) et insuline.

Les taux de glucose à jeun et les tests d'HbA1c sont utiles pour l'identification précoce du DT2. S'il est à la limite, un test de tolérance au glucose est une option pour évaluer à la fois la glycémie à jeun et la réponse sérique à un test oral de tolérance au glucose. Le prédiabète, qui précède souvent le DT2, présente une glycémie à jeun de 100 à 125 mg / dL ou une glycémie post-orale de 2 heures de 140 à 200 mg / dL. (Sapra et Bhandari, 2020)

L'hypertension et la dyslipidémie sont aussi des facteurs de risque majeurs de développement de maladies cardiovasculaires telles que la maladie coronarienne. (Whelton et al., 2018), (Kopin et Lowenstein, 2017) Ces deux maladies coexistent fréquemment. Plus de 60% des patients souffrant d'hypertension ont une dyslipidémie et, inversement, environ 50% des patients atteints de dyslipidémie souffrent d'hypertension. (Kopin et Lowenstein, 2017)

Des taux élevés de lipoprotéine-cholestérol de basse densité (LDL-C) et de faibles taux de cholestérol à lipoprotéines de haute densité (HDL-C) sont des facteurs de risque de maladie coronarienne (Gregg et al., 2005).

La détermination du «profil lipidique» est une étape incontournable dans l'évaluation du risque cardiovasculaire. Les directives diffèrent quant à l'âge auquel les prestataires de soins primaires devraient commencer le dépistage et à la fréquence à laquelle ils devraient dépister les patients pour l'hyperlipidémie. En général, il est conseillé de procéder à un dépistage lipidique systématique lorsqu'un homme atteint l'âge de 35 ans (s'il n'y a pas d'autres facteurs de risque cardiovasculaire) ou de 25 ans (si le patient présente d'autres facteurs de risque cardiovasculaire). Il est également suggéré que le dépistage systématique des lipides soit instauré chez les femmes à 45 ans (si aucun autre facteur de risque cardiovasculaire n'est présent) ou à 30 à 35 ans (si le patient présente d'autres facteurs de risque cardiovasculaire). Pour les patients à faible risque, un dépistage lipidique tous les cinq ans est raisonnable et un dépistage plus fréquent est recommandé à mesure que le risque cardiovasculaire du patient augmente. (Hill et Bordonni, 2020)

Comme indiqué ci-dessus, le test de laboratoire le plus précieux à collecter est la vérification du profil lipidique à jeun, qui comprend systématiquement le LDL, le HDL, les triglycérides et le cholestérol total. Un rapport C-LDL, cholestérol total: HDL et LDL pour un test plus complet.

Outre ces facteurs traditionnels, il existe un certain nombre de différents dans diverses études concernant la variabilité des paramètres hématologiques chez les patients hypertendus

et les sujets normotendus. Des paramètres hématologiques altérés peuvent fortement indiquer des lésions hypertensives des organes terminaux (Babu et al., 2015). Une augmentation du taux de Hgb peut provoquer une hypertrophie ventriculaire gauche tandis que de faibles taux de Hgb peuvent provoquer une anémie et une insuffisance cardiaque (Smebye et al., 2007).

La situation pronostique de l'hypertension est étroitement liée à la modification des paramètres hématologiques. À notre connaissance, peu de données sont disponibles dans la littérature. À cet égard, la prédiction et l'identification de l'hypertension occupent une part importante dans la pratique clinique.

Le diabète, les niveaux de cholestérol, et les modifications des paramètres hématologiques (Kachekouche et al., 2018) ne sont pas les seules situations associées à la physiopathologie du diabète

Un dysfonctionnement profond du métabolisme des acides aminés est défavorablement associé à l'évolution du diabète. En effet, la dégradation du tryptophane est étroitement liée à l'activité de l'IFN- γ , une cytokine pro-inflammatoire. Ce dernier induit l'enzyme indoleamine-2,3-dioxygénase, qui catalyse la première étape du catabolisme du tryptophane par la voie de la kynurénine (KP) (Kahn et al., 2014)

Les niveaux circulants de kynurénine sont influencés par l'apport alimentaire en tryptophane. Par conséquent, le rapport kynurénine / tryptophane (K / T) est une mesure plus appropriée du catabolisme du tryptophane que la concentration absolue de kynurénine. En plus de refléter l'activité de l'enzyme IDO1, le rapport K / T est un indicateur fiable de l'activation immunitaire médiée par l'IFN- γ (Kahn et al., 2014). Ce dernier a été impliqué dans la pathogenèse de la résistance à l'insuline (Oxenkrug, 2013).

Les voies métaboliques du tryptophane sont modifiées dans l'obésité, l'inflammation systémique (Cussotto et al., 2020) et le trouble dépressif (Marx et al., 2020) mais l'implication de la voie de dégradation des acides aminés dans le suivi du diabète de type 2 et de ses complications n'a pas été étudiée.

Chez les hypertendus âgés cette piste est très importante. Toute augmentation du besoin métabolique en acides aminés se traduit par le catabolisme de protéines de l'organisme, notamment de protéines musculaires.

La dénutrition est l'un des aspects souvent sous-estimée chez ces malades car ses manifestations cliniques ne sont pas spécifiques. Le Mini Evaluation Nutritionnelle (MNA)

est un outil de dépistage de la dénutrition qui peut être utilisé au moment du diagnostic du diabète chez les patients hypertendus et dans le suivi du traitement.

C' est une méthode d'évaluation de l'état nutritionnel des personnes âgées à risque de malnutrition, qui est moins coûteuse ; rapide , simple non invasive et validée de façon internationale , permettant, si nécessaire, une intervention nutritionnelle et/ou une correction du régime alimentaire (Guigoz et al., 1994)

Le MNA se compose de 18 items et peut être réalisé en 10 minutes ou moins.

Il comprend : Une évaluation globale ; une enquête alimentaire ; des mesures anthropométriques, renseigne sur la consommation des médicaments et évalue aussi subjectivement l'état de santé.

Dans plusieurs études, le MNA a été corrélé aux données anthropométriques (Saletti et al., 2000) en particulier à l'IMC, à la perte de poids (Salva et al., 1999) et à la circonférence brachiale (Griep et al., 1999), chez des sujets âgés non hospitalisés vivant en institution, en maison de retraite ou à domicile (Griep et al., 1999) , (Saletti et al., 2000) ou chez des patients âgés hospitalisés (Gazzotti et al., 2000).

Des associations entre MNA et taux d'albumine et de pré albumine ont également été décrites (Fanello et al., 2000) , (Salva et al., 1999) . En comparaison avec les autres outils d'évaluation nutritionnelle, le MNA s'est avéré le plus performant. Le MNA est :

-Plus sensible que l'albuminémie dans la détection des personnes à risque de dénutrition ;
- Prédicatif de la mortalité à 3 mois. Par ailleurs, en utilisant l'examen clinique comme référence, la sensibilité et la spécificité du MNA étaient respectivement de 96 % et de 98 % . (Lauque et al., 2000).
Il est important de noter que le but du traitement de l'hypertension artérielle n'étant pas seulement de rétablir les chiffres de la pression artérielle à la normale mais il faut aussi éviter une détérioration de l'état nutritionnel. Dans la revue d'Alibhai et al , ces traitements apparaissent comme l'une des causes les plus fréquentes de perte de poids involontaire .(Alibhai et al., 2005).

Les médicaments agissant sur le système rénine angiotensine peuvent être spécifiquement incriminés. En particulier les inhibiteurs de l'enzyme de conversion et les antagonistes des récepteurs de l'angiotensine 2.

Par ailleurs , l'enzyme de conversion de l'angiotensine 2 (ACE2) a été rapidement identifiée comme le récepteur fonctionnel critique du SRAS-CoV-2.

L'ACE2 est une carboxypeptidase et un régulateur négatif du système rénine-angiotensine en équilibrant son homologue de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE). L'ACE intervient dans la production d'angiotensine (Ang) II pour activer le système rénine-angiotensine qui joue un rôle clé dans les maladies cardiovasculaires, en particulier l'hypertension. (Forrester et al., 2018)

Étant donné que ACE2 fonctionne à la fois comme un récepteur du SRAS-CoV-2 et un modulateur RAS, le traitement du COVID-19 présente un dilemme sur la façon de limiter l'entrée du virus mais de protéger les fonctions physiologiques de l'ACE2. (Bian et Li, 2021)

Ainsi, l'inhibiteur de l'ACE est largement utilisé pour le traitement de l'hypertension, ce qui réduit les niveaux d'Ang II. Étant donné qu'ACE2 est un homologue de l'ACE, des différends sont survenus sur la question de savoir si l'inhibiteur de l'ACE peut réguler à la hausse l'ACE2 et donc le risque et la gravité de l'infection à coronavirus augmente. Cela remet en question la poursuite de l'utilisation des inhibiteurs de l'ACE chez les patients atteints d'hypertension infectés par le virus. À l'heure actuelle, certains experts suggèrent que les patients souffrant d'hypertension COVID-19 devraient cesser d'utiliser les inhibiteurs de l'ACE (Fang et al., 2020) , (Diaz, 2020) . D'un autre côté, d'autres experts estiment que non seulement l'ACEI n'augmente pas le risque d'infection par le SRAS-CoV-2, mais que l'inhibiteur de l'ACE pourrait réduire les lésions pulmonaires et les dommages cardiovasculaires chez les patients COVID-19 (Guo et al., 2020)

Des études préliminaires ont suggéré que d'autres médicaments comme l'hydroxychloroquine pourrait être repositionnés et avoir une efficacité contre l'infection au COVID-19. (Ferner et Aronson, 2020), (Zhai et al., 2020)

L'Hydroxychloroquine est une 4-amino-quinoléine largement utilisée pour traiter certaines maladies auto-immunes et les affections inflammatoires et dermatologiques associées. Il s'agit d'une version hydroxylée de la chloroquine: un antipaludique utilisé depuis des décennies, avec un mécanisme d'action similaire. . L'hydroxychloroquine est considérée comme plus sûre que la chloroquine d'après les études cliniques. (Liu et al., 2020) , (Colson et al., 2020)

Il a été observé que l'Hydroxychloroquine inhibe l'entrée médiée par le récepteur ACE2 du virus SARS-CoV2 par diverses actions telles que l'augmentation du pH intravésiculaire, l'inhibition de l'activité lysosomale, la modification du traitement antigénique, etc... (Yao et al., 2020) , (Devaux et al., 2020)

De plus, il a des actions anti-inflammatoires et immunomodulatrices qui peuvent être pertinentes dans la crise générée par la tempête de cytokines lors de l'infection au COVID-19. (Gautret et al., 2020) , (Touret et de Lamballerie, 2020) , (Guastalegname et Vallone, 2020).

Par ailleurs , Le traitement des patients atteints de COVID-19 avec Hydroxychloroquine était associé à un risque significatif d'allongement de l'intervalle QT d'origine médicamenteuse et à une incidence plus élevée de complications cardiaques.(Tleyjeh et al., 2020).

Ces constatations nous ont conduit a repenser le mécanisme d'action et réévaluer le rapport bénéfice / risque de l'Hydroxychloroquine.

Nous avons émis l'hypothèse que les effets cardiovasculaires qui lui sont associés pourraient être en relation avec ces propriétés anti inflammatoires.

L'inhibition de la cyclo-oxygenase , enzyme clé du processus inflammatoire constituait en fait une cible intéressante de notre recherche. Une piste qui n'a jamais été explorée.

Les structures cristallines des isoformes COX sont assez structurellement homologues et cohérentes avec une identité de séquence élevée (environ 60%).(Garavito et al., 2002)

Chaque isoforme COX est un homodimère structurel qui fonctionne comme un hétérodimère. Une sous-unité, contenant le groupe prothétique hème requis, agit comme site catalytique, tandis que l'autre sert de site allostérique . (Mitchener et al., 2015)

De nombreuses revues ont mis en évidence le rôle des prostaglandines dérivées de l'acide arachidonique . La cyclooxygénase (COX, également connue sous le nom de prostaglandine G / H synthase (PTGS) et la lipoxygénase catalysent ces réactions . (Dennis et Norris, 2015)

L'acide arachidonique est un acide gras polyinsaturé ω -6 en C20. Parmi les eicosanoïdes dérivés de l'acide arachidonique, la prostaglandine G2 (PGG2) et ensuite H2 (PGH2) sont d'abord générées par les actions de COX, et peuvent ensuite être métabolisées en PGE2, PGD2, PGI2 et TXA2 par une prostaglandine synthase correspondante .(Straus et Glass, 2001).

La première preuve que l'inhibition de la COX affecte le risque de maladie cardiovasculaire a été découverte par des études à grande échelle examinant les résultats gastro-intestinaux comme critère principal. (Bombardier et al., 2000)

C'est pourquoi on ne peut plus sous-estimer les risques des inhibiteurs de la cyclo-oxygénase, qu'il s'agisse d'AINS traditionnels ou de coxibs. De plus, les risques ne se limitent pas à une utilisation à long terme; des épisodes cardiovasculaires indésirables cliniquement graves ont été rapportés au cours des premiers jours de traitement. (Karsh, 2006)

Notre travail de recherche s'articule autour deux axes principaux :

- 1- l'épidémiologie moléculaire et les aspects thérapeutiques au cours de l'hypertension artérielle dans les populations de l'extrême ouest Algérien.
 - Evaluer l'ampleur de l'hypertension artérielle et ses facteurs de risque dans la région de l'extrême ouest Algérien.
 - Prédire l'hypertension essentielle avec des paramètres hématologiques de routine.
 - Explorer le rôle de la voie des kynurénines dans la surveillance biologique des diabétiques de type 2 hypertendus .

Estimer le risque de dénutrition associé aux traitements de l'hypertension artérielle chez les patients diabétiques
- 2- La réévaluation du rapport bénéfice / risque de l'Hydroxychloroquine chez les hypertendus sous anti-hypertenseurs.
 - Etudier la stéréochimie et la validation de la structure de la cyclo-oxygénase, cible privilégiée des anti-inflammatoires non stéroïdiens controversés pendant la pandémie COVID 19.
 - Evaluer l'inhibition de la cyclo-oxygénase 2 par l'ibuprofène (anti-inflammatoire non stéroïdien) par ancrage moléculaire
 - Identifier la Cox2 (cyclo-oxygénase 2) comme cible méconnue de l'Hydroxychloroquine repositionnée pour le traitement de l'infection à COVID 19.
 - Conclure avec une revue exhaustive des études en silico menées dans la lutte contre le COVID-19 impliquant l'Hydroxychloroquine et / ou de la chloroquine seules, en association ou par rapport à d'autres agents thérapeutiques.

Chapitre 1: The magnitude of high blood pressure and its risk factors in the western region of Algeria

Chapitre 1 : L'ampleur de l'hypertension artérielle et ses facteurs de risque dans la région de l'ouest Algérien

Introduction

L'hypertension artérielle apparait comme étant le facteur de risque ayant le plus d'impact sur la mortalité et l'invalidité dans le monde (Lim, Vos et al. 2012) . En Algérie, à l'instar des autres pays du Maghreb, 35 % de la population âgées plus de 18 ans souffre d'HTA et plus de 50 % des malades ignorent qu'ils sont hypertendus (Ouadahi, Berrah et al. 2009). Dans un contexte de transition épidémiologique marqué par l'accroissement des maladies chroniques et l'allongement de l'espérance de vie. Le vieillissement de la population et l'urbanisation rapide sont les deux leviers qui accélèrent cette pandémie surtout dans les zones urbaines (Popkin 2002). L'objectif principal de ce travail est d'évaluer le suivi de l'hypertension et ses facteurs de risques cardiovasculaire associés, chez les patients âgés de 40 ans et plus au sein de la population des patients vus en consultation à l'hôpital .

Patients et méthodes

Il s'agit d'une étude transversale descriptive qui a été réalisée dans les communes de Mascara et de Saida (ouest Algérien) du 15 Novembre 2017 au 15 Février 2018.

Le recrutement des patients a été fait conformément aux critères d'inclusion.

Un questionnaire contenant les principales informations a été administré a chaque malade.

L'hémogramme a été effectué sur l'automate d'hématologie « MINDRAY BC-30s ». Les examens biochimiques ont été effectués sur l'automate de biochimie « MINDRAY BS-330 ». Les pressions artérielles systolique (PAS) et diastolique (PAD) ont été mesurées à l'aide d'un «Sphingmomanomètre Aneroide Pic ». Le protocole de l'étude a été validé par le comité d'éthique local. Le consentement des patients a été obtenu préalablement à l'inclusion. L'analyse statistique a été réalisée sur le logiciel épi info version 7. Le seuil de significativité étant fixé à $P= 0.05$.

Résultats

Parmi les 200 sujets hypertendus enregistrés 60 % étaient des femmes et 40 % des hommes. Les participants étaient hypertendus depuis en moyenne 10 ans. Les hommes étaient plus nombreux avec un diabète par rapport aux femmes : 71.25 % vs 65 % pour les femmes. Environ un tiers d'entre eux étaient de type 1.(30 % chez les hommes et 12.5% chez les femmes , $p=0.228$) .

Les deux sexes étaient représentés presque à parts égales, concernant la dyslipidémie : 57.5 % pour les femmes vs 60 % pour les hommes.

Discussion

L'étude transversale prospective et observationnelle de patients souffrant d'hypertension fait apparaître des indices épidémiologiques et cliniques intéressants :

La moyenne d'âge dans notre échantillon était de 66,215 ans. Selon l'enquête TAHINA en Algérie, la fréquence de l'HTA augmente significativement avec l'âge, passant de 2.81 % chez les sujets de 35 à 39 ans à 33.56 % chez les sujets de 65 à 70 ans (Atek, Ouchfoun et al. 2007).

Le risque de développer l'HTA plutôt dans la vie était plus élevé chez les femmes par rapport aux hommes RP : 0.833, IC95% = [0.559, 1.241]. La PAS moyenne était de 138.69 ±19.97 mm Hg pour les hommes et 134.86±20.62 mm Hg pour les femmes. La PAD moyenne était de 77.64±12.71 mm Hg pour les hommes et 75.77±13.25 mm Hg pour les femmes, avec une répartition homogène au sein de l'échantillon (CV.PAS = 0.14, CV.PAD = 0.17) et aucune différence significative (p=0.194 pour la PAS, p=0.321 pour la PAD).

Depuis 2018, l'ACC / AHA (Whelton, Carey et al. 2018) recommandaient des valeurs inférieures à 130/80 mmHg comme cible thérapeutique pour tous les patients hypertendus. L'IMC moyen était de 26,09 ± 2.96 chez les hommes et 29.42± 4.44 chez les femmes.

KAZADI a trouvé qu'un sujet obèse a une probabilité de développer 4,2 fois l'HTA qu'un sujet non obèse (KAZADI 2002).

Une association significative a également été observée pour l'IMC même après ajustement pour d'autres covariables, suggérant que le surpoids et l'obésité en soi peuvent conduire au développement de l'hypertension et jouer un rôle central dans sa pathogenèse (Sullivan, Kahn et al. 2015).

Dans notre série, 67,5 % des patients hypertendus étaient aussi diabétiques, soulignant l'importance du dépistage de l'hypertension une fois le diabète diagnostiqué et vice-versa. Versa.

Ce résultat était proche de celui de l'étude PROCAM qui a estimé la prévalence de l'HTA (PAS > 160mmhg) chez les diabétiques à plus de 50% (Assmann et Schulte 1988). Dans l'étude UKPDS, 39 % des diabétiques de type 2 avaient une HTA (> 160/90mmHg) (King, Peacock et al. 1999). Récemment, de nombreuses études ont aussi indiqué que le

diabète est apparu comme un corrélat étonnamment commun à l'hypertension (Cheung 2010) , (Cheung et Li 2012)

Il a aussi été constaté que 58,5 % des malades présentent une dyslipidémie. 20,83 % de femmes et 27,5 % hommes présentent un taux de cholestérol totale supérieur à 2g /L, ainsi 43,33 % des femmes et 30 % des hommes ont un taux de HDL-cholestérol inférieur à 0,4 g/L. Des taux sanguins élevés en cholestérol total et faibles en HDL cholestérol seraient associés à une augmentation significative du risque d'hypertension artérielle (Scheen, Paquot et al. 2000). La dyslipidémie associée à l'hypertension augmente les risques de maladie coronarienne (Ariyanti et Besral 2019).

Enfin, environ 27,5% des patients étaient sous bithérapie fixe et (25 %) sous bithérapie libre.

Dans la version actuelle des lignes directrices américaines et européennes, la polythérapie est devenue l'option privilégiée pour l'initiation du traitement pour la majorité des patients. (Whelton, Carey et al. 2018),

Conclusion

Les sujets hypertendus ne constituent pas un groupe homogène de patients. Dans la population de cette région. Les facteurs de risque associés à l'hypertension sont : L'âge, l'IMC, le diabète, la dyslipidémie.

L'enquête montre bien que le risque cardiovasculaire est bien plus grand chez les patients hypertendus ; ce dernier est vraisemblablement parfois sous estimés. La reconnaissance de la trajectoire de l'hypertension, notamment par un suivi continu est capitale pour choisir aux mieux les objectifs thérapeutiques.



(RESEARCH ARTICLE)



The magnitude of high blood pressure and its risk factors in the western region of Algeria

Hamza Nadjib Merad-Boudia *, Majda Dali-Sahi, Nouria Medjati-Dennouni and Youcef Kachekouche

Chemistry and Electrochemistry Laboratory Faculty of Biology. University of Tlemcen, Algeria.

Publication history: Received on 04 October 2020; revised on 14 October 2020; accepted on 18 October 2020

Article DOI: <https://doi.org/10.30574/wjbphs.2020.4.1.0077>

Abstract

Objectives: The objective of this study was to evaluate the follow-up of hypertensive patients with or without associated cardiovascular risk factors in western Algeria. And to establish a biological and epidemiological profile.

Methods: This is a descriptive cross-sectional study. Two hundred patients aged 40 years and over followed up for the HBP were collected among the population of patients seen in consultation at the hospital of Mascara and Saida (two cities in western Algeria) from November 15, 2017 to February 15. The questionnaire, anthropometric parameters, biological assessments and treatments were noted.

Results: Among the 200 hypertensive subjects recorded, 60% were women and 40% men. The participants had been hypertensive for an average of 10 years. There were more men with diabetes than women: 71.25% vs. 65% for women. About a third of them were type 1 (30% of men and 12.5% of women, $p=0.228$). Both sexes were almost equally represented, with regard to dyslipidemia: 57.5% of women vs. 60% of men.

Conclusion: High blood pressure is a disease that is progressing rapidly in Algeria. The risk factors associated with hypertension are: Age, BMI, diabetes and dyslipidemia... These data confirm the importance of this pathology in terms of public health.

Keywords: Monitoring; Hypertension; Diabetes; Risk factors

1. Introduction

High blood pressure has been identified as the risk factor with the greatest impact on mortality and disability worldwide [1] The incidence of hypertension is increasing due to the current nutritional transition, sedentary lifestyles, excessive body weight and other modifiable risk factors [2]. According to the American College of Cardiology report, the prevalence of hypertension worldwide has increased from 600 million people in 1980 to 1 billion in 2008 [3]. In Africa, the prevalence of hypertension is highest, reaching 46% of adults [4]. In Morocco, the overall prevalence of hypertension is 33.6% among the population over 20 years of age [5]. In Algeria, like the other Maghreb countries, 35% of the population aged over 18 suffer from hypertension and more than 50% of the patients are unaware that they are hypertensive [6]. Risk factors for increasing the prevalence of hypertension include population growth, ageing and easily modifiable risk behaviors such as poor diet, harmful use of alcohol, smoking, lack of physical activity, overweight/obesity and stress [7], [8]. In the context of an epidemiological transition marked by the increase in chronic diseases and longer life expectancy. The ageing of the population and rapid urbanization are the two levers that are accelerating this pandemic, especially in urban areas [4]. The main objective of this work is to evaluate the monitoring

* Corresponding author: Hamza najib merad-boudia

Chemistry and electrochemistry laboratory Faculty of Biology Abu bekr belkaid University Tlemcen, Algeria.

of hypertension and its associated cardiovascular risk factors in patients aged 40 years and over in the population of patients seen in hospital consultations.

2. Patients and methods

This descriptive cross-sectional study was carried out in the municipalities of Mascara and Saida (western Algeria) from 15 November 2017 to 15 February 2018.

The recruitment of patients was done at the hospitals of both cities (SAIDA and MASCARA), in accordance with the inclusion criteria.

2.1. Inclusion criteria

Patients aged 40 years and over for both sexes, known hypertensive and treated with the same therapy for at least three months, presence or not of one or more associated cardiovascular risk factors (diabetes or dyslipidemia treated...).

2.2. Non-inclusion criteria

Patients with edemas (regardless of their origin, e.g. in case of oncotic pressure lowering: during cirrhosis, in case of malnutrition in the context of kwashiorkor, in the course of nephritic syndrome due to renal protein loss, dialysis patients), patients with ascites, patients who have undergone surgery within the last 12 months.

A questionnaire containing the main information about the patient (surname, first name, age, sex, weight, height, history, treatment) was administered to each patient.

The weight was measured using an electronic scale (NEC France). The scale was sufficiently large, stable and appropriate for the person to stand on. Regular calibration of the balance was necessary, and the accuracy was ± 50 g. The balance was calibrated regularly. The height was measured in a vertical position, without shoes and heels with a height gauge. The BMI was calculated as the weight (kg) divided by the square of the waist.

The haemogram was performed on the automatic hematology machine "MINDRAY BC-30s". The biochemical examinations were carried out on the automatic biochemistry machine "MINDRAY BS-330". The systolic (PAS) and diastolic (PAD) arterial pressures were measured during the tenth minute in a sitting position using a cuff adapted to the size of the arm "Aneroid Pic Sphygmomanometer". The blood pressure and heart rate values used in this study are based on the average of the three measurements. The study protocol was validated by the local ethics committee. Patient consent was obtained prior to inclusion.

2.3 Statistical analysis

The statistical analysis was carried out on the Epi info version 7 software. The results are presented in absolute values and in percentages for the qualitative variables and by a measure of central tendency and a measure of dispersion for the quantitative variables (the mean when the distributions were normal and the median when the distributions did not follow a normal law). Comparisons between the qualitative variables were made using the chi-square and comparisons between quantitative variables were made using the test of Student. In order to standardize the interpretations of the association measures, we used the prevalence ratio. In cross-sectional studies, the prevalence ratio should be encouraged as it is easier to interpret and more appropriate than the Odds Ratio [9]. The significance threshold is set at $P = 0.05$.

3. Results

The survey enrolled 200 participants in the communes of Mascara and Saida (western Algeria). With no significant difference between men and women ($p = 0.238$) the median age of the sample is very close to the average age, (66 ± 9.74), and is 66 years old. The M/F sex ratio is 0.66 in favor of a female majority. The results are presented in Table 1:

Table 1 Characteristics of the study population

	Men (n= 80)	Women (n= 120)	IC 95 %	P-Value
Age (years, mean \pm standard deviation)	67.21 \pm 9.51	65.55 \pm 9.87	[1.11-4.43]	0.238
BMI (Kg / m ²)	26.09 \pm 2.96	29.42 \pm 4.44	[4.44-2.21]	0.0001
Waist/Hip circumference	0.94 \pm 0.09	0.96 \pm 0.03	[0.003-0.007]	0.223
Brachial circumference (cm)	38.40 \pm 3.78	36.73 \pm 4.02	[0.549-2.785]	0.004
Calf circumference (cm)	36.97 \pm 4.87	39.05 \pm 6.86	[3.83-0.333]	0.02
SBP (mm Hg)	138.69 \pm 19.97	134.86 \pm 20.62	[1.97-9.63]	0.194
DBP (mm Hg)	77.64 \pm 12.71	75.77 \pm 13.25	[1.84-5.58]	0.321
No Diabetics	23 (28.75%)	42 (35%)	[0.007-0.187]	0.062
Diabetics	57 (71.25%)	78 (65%)	[0.223-0.48]	0.362
N	80	120		
Type 2 diabetes	33 (41.25%)	63 (52.5%)	[0.101-0.2]	0.0053
Type 1 diabetes	24 (30%)	15 (12.5%)	[0.007-0.376]	0.228
N	57	78		

About one-quarter of our sample (25.5%) is below the first quartile (58 years), one-quarter is above the third quartile (73 years). Half of the subjects have an age between 58 and 73, corresponding to the interquartile range.

3.1. Anthropometric parameters

The average BMI for men is 26.09 \pm 2.96. A BMI higher than 32.92 01 was found in 25% of men. However, only 3.75 % (03 with a BMI = 24.09 below the median BMI (which is equal to the average BMI). The BMI extends over about 14 points between BMI Min = 18.99 and BMI Max = 32.92. The average BMI of women is 29.42 \pm 4.44 higher than that of men. A BMI greater than 32.88 was found in 25% of women. However, only 1.66% of women had a BMI = 29.37 lower than the average BMI. The BMI of women is about 20 points between BMI Min = 19.81 and BMI Max = 39.84. There are four times as many hypertensive women with a BMI greater than 25 compared to hypertensive men. PR = 4.2174, 95% CI = [2.243, 7.929] with a significant difference (p=0.0001). Another anthropometric parameter is used to evaluate the accumulation of fat on the body, and in particular on the abdomen, which can favor cardiovascular diseases. This is the ratio: Waist / Hip circumference. The average Waist / Hip circumference ratio in men is 0.94 \pm 0.09, it varies very little (CV= 0.01) but is very sensitive. The Waist / Hip circumference min ratio is 0.10 whereas the Waist / Hip circumference max ratio is 0.98. The average Waist / Hip circumference ratio for women is not significantly different from that of men (p=0.223), it is 0.96 \pm 0.03, varying only slightly (CV= 0.03). The Waist / Hip circumference min ratio is 0.91 while the Waist / Hip circumference max ratio is 1.25. Other simple and low-cost anthropometric measures, such as arm or calf circumference, which allow the assessment of muscle mass, could allow easier monitoring of patients. The average BC average and CC average for men are 38.40 and 36.97 cm respectively. A significant difference was noted between the two sexes, concerning these two parameters (BC: p=0.004, CC: p=0.02).

3.2. High blood pressure

The patients in our sample had been hypertensive for an average of 10 years, some had been hypertensive for at least 1 year, while others had been hypertensive for almost 15 years (13 years at Max). Almost half (45%) of them had had high blood pressure for 5 to 10 years. More women had been hypertensive for more than 10 years than men (37.5% of women and 31.25% of men). The risk of developing hypertension earlier in life was higher among women than men: 0.833, 95% CI = [0.559, 1.241]. The mean SBP was 138.69 \pm 19.97 mm Hg for men and 134.86 \pm 20.62 mm Hg for women. The mean DBP was 77.64 \pm 12.71 mm Hg for men and 75.77 \pm 13.25 mm Hg for women, with a homogeneous distribution

within the sample (CV.SBP = 0.14, CV.DBP = 0.17) and no significant difference ($p=0.194$ for SBP, $p=0.321$ for DBP). Furthermore, it seems that the changes in SBP were significantly related to DBP ($p=0.0001$) and that neither of the two values seems to change positively or negatively in isolation.

3.3. Diabetes

67.5% of hypertensive patients were also diabetic, only a third of them were hypertensive without diabetes. The prevalence of diabetes was almost the same for both sexes PR = 1.33, 95% CI = [0.7233, 2.4620], 71.25 for men % vs. 65% for women ($p=0.362$) Among the hypertensive diabetic patients in our sample, about one third were type 1 (30% in men and 12.5% in women, $p=0.228$).

Table 2 Patients' biological assessment

Variables	Men M ± SD	Women M ± SD	IC à 95 %	P-Value
Blood glucose (g/l)	1.47 ± 0.71	1.46 ± 0.70	[0.197-0.206]	0.967
Urea (g/l)	0.43 ± 0.20	0.39 ± 0.23	[0.022-0.101]	0.211
Creatinemia (mg/l)	12.47 ± 7.91	11.24 ± 4.73	[0.723-3.178]	0.215
Total cholesterol (g/l)	1.75 ± 0.50	1.71 ± 0.50	[0.104-0.182]	0.589
LDL cholesterol (g/l)	1.07 ± 0.41	1.05 ± 0.38	[0.088-0.141]	0.645
HDL cholesterol (g/l)	0.47 ± 0.16	0.45 ± 0.17	[0.027-0.068]	0.391
TG (g/l)	1.17 ± 0.67	1.22 ± 0.52	[0.134-0.219]	0.633

3.4. Lipid Balance

The mean total cholesterol value was 1.75 ± 0.50 for men and 1.71 ± 0.50 for women, with no significant difference $p=0.589$. A close analysis of the different cholesterol fractions shows that the percentage of men with HDL - Low Cholesterol (below 0.40) is much lower than that of women, the values being 30% and 43.33% respectively. While the average values are 0.47 ± 0.16 g/l for men and 0.45 ± 0.17 g/l for women without any significant difference ($p=0.391$). As far as LDL cholesterol is concerned, a level above 1.60 g/l also represents a cardiovascular risk factor, men and women were found to have similar percentages (15% and 14%). The mean values were 1.07 ± 0.41 g/l and 1.05 ± 0.38 g/l for men and women respectively, showing no significant difference ($p=0.645$). Finally, about 68.5 % have a TG rate of less than 1.50 g/l. This trend is confirmed by the average TG rate value of our sample which is 1.2470 ± 0.5876 and a very high variability of the distribution (C.V = 47.12 %). Of the remaining 31.5 %, 20.5 % have TG rates between 1.5 g/l and 2 g/l, and only 11 % have a rate higher than 2 g/l. These percentages, which refer to the entire sample, show that men and women are equally high in terms of triglyceride elevation. The average values are 1.17 ± 0.67 g/l for men and 1.22 ± 0.52 g/l for women, with no significant difference ($p=0.633$). Both sexes were almost equally represented in terms of dyslipidemia: The prevalence of dyslipidemia was the same for both sexes (57.5% for women vs. 60% for men). PR = 1.108, IC95% = [0.6236, 1.9711].

3.5. Renal assessment

The average value of urea in our sample is: 0.40 ± 0.22 , it varies between a minimum of: 0.22 g/l and a maximum of : 1.41 g/l. It varies little between the different profiles of hypertensive patients ($p=0.211$). For men, the average value is 0.43 ± 0.20 g/l, for women it is 0.39 ± 0.23 g/l. The value of 0.25 g/l was the most common (in 15% of hypertensive patients). The average creatinemia of our population is : $11,735 \pm 6,2$. It varies between a minimum of 3.8 mg/l and a maximum of 62.5 mg/l, which represents an extreme value, with little significance on the distribution of our sample ($p=0.215$). 12.47 ± 7.91 mg/l for men and 11.24 ± 4.73 for women. The modal value is 12 mg/l present in 11% of hypertensive patients. Among the patients, 5%) are known as renal insufficiency.

3.6. Treatment of high blood pressure

Although 27.5% of men were treated with antihypertensive monotherapy and 30.83% of women were on fixed combination therapy, there were no significant differences between the different therapies used (Table 3). All classes and combinations of antihypertensive drugs were represented.

Table 3 Treatment of hypertension

Variables	Men	Women	IC 95	P-value
Monotherapy	22 (27.5%)	26 (21.67%)	[11.98-13.31]	0.909
Fixed Bitherapy	20 (25 %)	37 (30.83%)	[12.79-18.45]	0.695
Free Bitherapy	12 (15%)	16 (13.33%)	[6.76-8.09]	0.845
Tri therapy	21 (26 %)	31 (25.83%)	[12.24-15.57]	0.795
Quadri therapy	5 (6.5%)	9 (7.50%)	[3.16-4.49]	0.706
Penta therapy	0	1 (0.83%)		
N	80	120		

4. Discussion

As part of the epidemiological transition in North Africa, an international, multicenter and cross-sectional study carried out in Algeria, Tunisia and Morocco, showed a total prevalence of hypertension was 45.4% [10]

The prospective and observational cross-sectional study of patients with hypertension reveals interesting epidemiological and clinical clues:

The risk factors determined in this study were consistent with those reported in the literature. Compared to many studies, hypertension was associated with: Blood pressure figures (SBP, DBP), age, BMI, diabetes, dyslipidemia.

The average age in our sample was 66.215 years. Recent data on hypertension indicate that 70% of older people have hypertension, compared to only 32% of adults aged 40 to 59 [11]. Another study (FLASH) confirms that the frequency increases with age, from 40% for those under 55 to 70% for subjects over 75 years [12]. Also, according to the TAHINA survey in Algeria, the frequency of hypertension increases significantly with age, going from 2.81% in subjects aged 35 to 39 to 33.56% in subjects aged 65 to 70 [13].

In our study, women are predominant with a percentage of 60%. Studies have suggested that the prevalence of hypertension is higher in women [14]. This difference was also reported in the cross-sectional survey of the SFMG [15] and the TAHINA study [13]. Women are more inclined to have hypertension than men [16, 17]. According to a study by the French Committee for the Fight against Arterial Hypertension, 22% of women, or 6 million of them, are treated for high blood pressure [18]

In our study, the risk of developing hypertension rather later in life was higher in women than in men PR: 0.833, 95% CI = [0.559, 1.241]. The mean SBP was 138.69 ± 19.97 mm Hg for men and 134.86 ± 20.62 mm Hg for women. The mean DBP was 77.64 ± 12.71 mm Hg for men and 75.77 ± 13.25 mm Hg for women, with a homogeneous distribution within the sample (CV.SBP = 0.14, CV.DBP = 0.17) and no significant difference ($p = 0.194$ for SBP, $p = 0.321$ for DBP). Since 2018, the ACC / AHA [19] has recommended values below 130/80 mmHg as a therapeutic target for all hypertensive patients. This recommendation is classified in class I and therefore mandatory, for patients at high cardiovascular risk (proven cardiovascular disease or risk of a predicted cardiovascular event greater than 10% at 10 years) and reasonable (class II b recommendation) for those at low risk. The results of the SPRINT trial [20], demonstrating a net benefit in patients randomized to a lower BP target, were of great influence.

In this study, the mean BMI was noted to be 26.09 ± 2.96 in men and 29.42 ± 4.44 in women. KAZADI has found that an obese subject has a 4.2 times probability of developing hypertension than a non-obese subject [21]. A significant association was also observed for BMI even after adjusting for other covariates, suggesting that overweight and obesity per se may lead to the development of hypertension and play a central role in its pathogenesis [22]. The Longevity Check-Up 7+ study reported that body mass index is strongly associated with hypertension [23]

In our series, 67.5% of hypertensive patients were also diabetic, emphasizing the importance of screening for hypertension once diabetes was diagnosed and vice versa. This result was close to that of the PROCAM study which estimated the prevalence of hypertension (SBP > 160mmHg) in diabetics at more than 50% [24]. In the UKPDS study, 39% of type 2 diabetics had hypertension (SBP > 160 / 90mmHg) [25]. Recently, numerous studies have also

indicated that diabetes has emerged as a surprisingly common correlate with hypertension [26], [27]. On the other hand, epidemiological studies have shown a strong correlation between serum lipid levels and the risk of atherosclerotic cardiovascular disease. Dyslipidemias are common in patients with hypertension [28]. It was also noted that 58.5% of patients present with dyslipidemia. 20.83% of women and 27.5% of men have a total cholesterol level greater than 2g / L, thus 43.33% of women and 30% of men have an HDL-cholesterol level below 0.4g / L. High blood levels of total cholesterol and low of HDL cholesterol are thought to be associated with a significant increase in the risk of arterial hypertension [29]. Dyslipidemia associated with hypertension increases the risk of coronary heart disease [30]. Finally, around 27.5% of patients were on fixed dual therapy and (25%) on open dual therapy.

In the current version of the US and European guidelines, combination therapy has become the preferred option for initiating treatment for the majority of patients. In the ACC / AHA guidelines [19], this is the recommended option for patients with stage 2 hypertension (values greater than 140/90 mmHg). In the ESC / ESH recommendations [31], this is the preferred option for most patients, excluding frail and elderly patients, or those with grade 1 hypertension and low cardiovascular risk.

5. Recommendations

To improve the monitoring of arterial hypertension, one of the avenues would be to set up regular consultations apart from those dedicated to screening, to increase awareness campaigns on the topic of cardiovascular risk and to insist on the training of the various actors working with of the hypertensive person in order to develop a "hypertension monitoring network". A network that involves doctors, pharmacists, and patients.

6. Abbreviations

ARA II: Angiotensin II receptor antagonist; CVA: Cerebrovascular accident; BB: Beta-blocker C.V: Coefficient of variation; BC: Brachial circumference; CC: Calf circumference; HBP : High Blood Pressure; HDL: High Density lipoprotein; LDL: Low Density lipoprotein; DBP: Diastolic blood pressure; SBP: Systolic blood pressure; PR: Prevalence ratio; TG: Triglycerides; HC: Hip circumference; WC: Waist circumference; WHO-ISH: World Health organization-international society of hypertension

7. Conclusion

Hypertensive subjects do not constitute a homogeneous group of patients. In the population of this region, the risk factors associated with hypertension are: Age, BMI, diabetes, dyslipidemia. The survey shows that the cardiovascular risk is much greater in hypertensive patients; the latter is probably sometimes underestimated. Recognizing the trajectory of hypertension, in particular through continuous monitoring, is essential in order to choose the best therapeutic objectives.

Compliance with ethical standards

Acknowledgments

We would like to thank the General Directorate of Scientific Research and Technological Development (GDSRTD) who made the necessary budget available to PhD students to carry out this research.

Disclosure of conflict of interest

No direct or indirect interest (of a financial or other nature) with a private, industrial or commercial organization relationship with the subject presented.

Statement of informed consent

The study was approved by the local medical and health research ethics committee. All participants provided written informed consent, in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki.

References

- [1] Lim SS, et al. A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*, 2012; 380(9859): 2224-60.
- [2] Zekewos A, T Egeno, E Loha. The magnitude of hypertension and its risk factors in southern Ethiopia: A community based study. *PloS one*. 2019; 14(8): e0221726-e0221726.
- [3] Laslett LJ, et al. The worldwide environment of cardiovascular disease: prevalence, diagnosis, therapy, and policy issues: a report from the American College of Cardiology. *J Am CollCardiol*. 2012; 60(25 Suppl): S1-49.
- [4] Popkin BM. An overview on the nutrition transition and its health implications: the Bellagio meeting. *Public Health Nutr*. 2002; 5(1a): 93-103.
- [5] Abir-Khali, et al. Facteurs de risque de l'hypertension artérielle chez la population marocaine adulte. *Revue d'Epidémiologie et de Santé Publique*. 2009; 57, n° S1: 4.
- [6] Ouadahi M, N Berrah, M Kouar. Prevalence of hypertension in Algeria. *International Journal of Cardiology*. 2009; 137: S1: 25.
- [7] Abdissa SG, Y Feleke, M Awol. Prevalence of hypertension and pre-hypertension in Addis Ababa, Ethiopia: A survey done in recognition of World Hypertension Day, 2014. *Ethiop J Health Dev*. 2015; 29(1): 22-30.
- [8] Muller-Feuga A. The role of microalgae in aquaculture: situation and trends. *Journal of applied phycology*. 2000. 12(3-5): 527-534.
- [9] Martinez BAF, et al. Odds Ratio or Prevalence Ratio? An Overview of Reported Statistical Methods and Appropriateness of Interpretations in Cross-sectional Studies with Dichotomous Outcomes in Veterinary Medicine. *Frontiers in veterinary science*, 2017; 4: 193-193.
- [10] Nejjari C, et al. Epidemiological Trial of Hypertension in North Africa (ETHNA): an international multicentre study in Algeria, Morocco and Tunisia. *Journal of hypertension*. 2013; 31(1): 49-62.
- [11] Mozaffarian D, et al. Heart disease and stroke statistics--2015 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2015; 131(4): e29-322.
- [12] Girerd X, M Murino. Etudes FLASHS: un tableau de bord de l'épidémiologie de l'HTA en France. *Le Cardiologue*. 2007; 306: 6-9.
- [13] Atek M, et al. La transition épidémiologique et le système de santé en Algérie: Enquête Nationale Santé. 2005.
- [14] Adeloye D, C Basquill. Estimating the prevalence and awareness rates of hypertension in Africa: a systematic analysis. *PLoS One*. 2014; 9(8): e104300.
- [15] Didier D, et al. Prévalence de l'hypertension artérielle en médecine générale. *Rev Prat Med Gen*. 2002; 16(562): 177-80.
- [16] Milon H, P Lantelme, M Rial. Hypertension artérielle de l'adulte. *La revue du praticien*. 2005; 55: 423-32.
- [17] KALONJI M. Quelle est la fréquence de l'HTA de vos urgences médicales et consultation. *Congo Médical*. 1998; 2(8): 98.
- [18] Girerd X, et al. [Hypertension in the elderly in France: Characteristics of treatments and frequency of cognitive complaint according to the 2014 French League against Hypertension Survey]. *Ann Cardiol Angeiol (Paris)*. 2015; 64(3): 145-9.
- [19] Whelton PK, et al. ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA 2017 Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults: Executive Summary: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Hypertension*. 2018; 71(6): 1269-1324.
- [20] Wright JT, Jr. et al. A Randomized Trial of Intensive versus Standard Blood-Pressure Control. *N Engl J Med*. 2015; 373(22): 2103-16.
- [21] KAZADI ME. évaluation de quelques facteurs de risque chez les employés TFC, UM. 2002.
- [22] Sullivan CA, et al. Change in Intra-Abdominal Fat Predicts the Risk of Hypertension in Japanese Americans. *Hypertension*. 2015; 66(1): 134-40.

- [23] Landi F, et al. Body Mass Index is Strongly Associated with Hypertension: Results from the Longevity Check-up 7+ Study. *Nutrients*. 2018; 10(12):76.
- [24] Assmann G, H Schulte. The Prospective Cardiovascular Münster (PROCAM) study: prevalence of hyperlipidemia in persons with hypertension and/or diabetes mellitus and the relationship to coronary heart disease. *Am Heart J*. 1988; 116(6 Pt 2): 1713-24.
- [25] King P, I Peacock, R Donnelly. The UK prospective diabetes study (UKPDS): clinical and therapeutic implications for type 2 diabetes. *British journal of clinical pharmacology*. 1999; 48(5): 643-648.
- [26] Cheung BM. The hypertension-diabetes continuum. *J CardiovascPharmacol*. 2010; 55(4): 333-9.
- [27] Cheung BM, C Li. Diabetes and hypertension: is there a common metabolic pathway? *CurrAtheroscler Rep*. 2012; 14(2): 160-6.
- [28] Srikanth S, P Deedwania. Management of Dyslipidemia in Patients with Hypertension, Diabetes, and Metabolic Syndrome. *CurrHypertens Rep*. 2016; 18(10): 76.
- [29] Scheen AJ, et al.Effets du traitement de l'hypertensionartérielleet des dyslipidémiessur le pronostic. *Rev Med Suisse*. 2000; 4: 207-16.
- [30] Ariyanti R, B Besral. Dyslipidemia Associated with Hypertension Increases the Risks for Coronary Heart Disease: A Case-Control Study in Harapan Kita Hospital, National Cardiovascular Center, Jakarta. *Journal of lipids*. 2019; 2517013-2517013.
- [31] Williams B, et al. ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension. *Eur Heart J*. 2018; 39(33): 3021-3104.

Chapitre 2: Hematologic disorders during essential hypertension

Chapitre 2 : Troubles hématologiques au cours de l'hypertension essentielle hypertension

Introduction

L'hypertension artérielle est un problème majeur de santé publique. Outre les facteurs traditionnels, il existe un certain nombre de différends dans diverses études concernant la variabilité des paramètres hématologiques chez les patients souffrant d'hypertension et les sujets normotendus (Babu, Solepure et al. 2015) , (AL-Hamdani 2010) , (Jadeja, Jadeja et al. 2011) . La situation pronostique de l'hypertension est étroitement liée à la modification des paramètres hématologiques. A notre connaissance, peu de données sont disponibles dans la littérature. À cet égard, la prédiction et l'identification de l'hypertension prennent une part importante dans la pratique clinique. Conformément à cette idée, une analyse de régression logistique a été utilisée pour étudier les relations entre les paramètres hématologiques et l'hypertension.

Méthodes

Une étude épidémiologique, multicentrique et cas-témoins de la pathogenèse de l'hypertension essentielle a été réalisée dans l'ouest de l'Algérie, entre le 1er septembre 2017 et le 31 janvier 2018. Les patients hypertendus (215) ont été invités à participer à cette étude. 330 témoins normotendus ont été sélectionnés au hasard, appariés par âge et sexe. Des échantillons biologiques avec les données suivantes sont également collectés auprès des patients: nombre de globules rouges, taux d'hémoglobine, hémocrite, MCV, et MCHC. Les paramètres sanguins ont été analysés à l'aide de l'analyseur d'hématologie automatisé Beckman Coulter 750. L'analyse des données a été effectuée à l'aide de Minitab 16 pour Windows (pour les analyses de modèle multivariée.).

Une étude de régression logistique binaire a été réalisée pour comparer les patients et les témoins et déterminer un modèle prédictif d'hypertension essentielle en utilisant les facteurs mesurés (la variable de réponse est ici notée Y, qui compte les sujets hypertendus (D) et les témoins (T), (D) étant la valeur de référence). La courbe ROC a été tracé pour estimer la capacité prédictive de notre modèle logistique. Une valeur de p inférieure à 0,05 a été considérée comme statistiquement significative.

Les associations ont été quantifiées avec des rapports de cotes (OR) et leurs intervalles de confiance (IC) à 95%. Plusieurs tests, dont Hosmer et Lemeshow, ont été utilisés pour

évaluer la qualité de l'ajustement des modèles. Un niveau de signification supérieur à 0,05 indique que le modèle ajuste bien les données et que le modèle peut être conservé.

Résultats

Les patients ayant un nombre de globules rouges plus bas ont un risque trois fois et demi supérieur de développer une hypertension par rapport à ceux qui ont un nombre normal de globules rouges (OR = 3,64, IC à 95% = 1,37 à 9,65, $p < 0,05$)

De même, ceux ayant un volume corpusculaire moyen inférieurs à 80 fl sont plus exposés à l'hypertension (OR = 13,58, IC à 95% = 4,68-39,41, $p = 0,000$).

La concentration corpusculaire moyenne d'hémoglobine révèle que les sujets qui ont un taux inférieur à la normale ($< 27\text{pg}$) sont une fois moins exposés à l'hypertension (OR = 0,04, IC 95% = 0,01-0,13, $p = 0,000$). Aussi les sujets dont le nombre de plaquettes est inférieur à la normale sont douze fois plus exposés à l'hypertension (OR = 12,13, IC à 95% = 1,45-101,18, $P = 0,021$).

Enfin, l'augmentation de la vitesse de sédimentation à une heure augmente le risque de l'hypertension de 56,63 fois par rapport aux sujets ayant un taux de sédimentation normal (OR = 56,63, IC à 95% = 3,37-597,33, $P = 0,001$).

Discussion

Notre étude montre une association statistiquement significative entre le risque de développer une pression artérielle élevée pour les deux sexes et certains paramètres hématologiques, quel que soit l'âge, notamment: Le nombre des globules rouges, VCM, CCMH, taux des plaquettes et vitesse de sédimentation.

Il existe une relation causale entre la fonction vasculaire et différents troubles hématologiques (Jadeja, Jadeja et al. 2011) , (Mathew, Huang et al. 2016) .

La plupart des patients hypertendus présentent une viscosité sanguine accrue par rapport aux témoins sains (Sandhagen 1998) . Il y a une diminution de la déformabilité des globules rouges qui pourrait entraîner une résistance accrue à l'écoulement microvasculaires, ce qui peut entraîner une hémolyse et des dommages aux organes (Karabulut et Karadag 2015) .

Cette hémolyse induit la libération de Hgb dans le plasma qui récupère l'oxyde nitrique et provoque un dysfonctionnement endothélial (Brittain, Janz et al. 2014).

Ces modifications sont également retrouvées chez les personnes hypertendues atteintes de diabète, de lipoïdoprotéinose, etc.

Cela pourrait être une nouvelle façon de réaliser un meilleur traitement des hypertendus et une prévention des complications cardiovasculaires (ie: infarctus du myocarde,..., etc.) (Cicco et Pirrelli 1999).

Notre modèle logistique a également retenu le taux de VCM comme facteur hématologique associé à l'hypertension. Les anciens rapports suggèrent que les personnes souffrant d'hypertension ont des VCM inférieurs à ceux des sujets ayant une pression artérielle normale. (Bruschi, Minari et al. 1986) , (Postnov, Kravtsov et al. 1988).

Rakotovao-Ravahatra ZD et al ont étudié l'hémogramme chez les patients hypertendus. Parmi 151 patients hypertendus, 41% d'entre eux souffraient d'anémies microcytaires avec VCM inférieur à la normale (Rakotovao-Ravahatra, Randriatsarafara et al. 2016).

Notre étude aussi montre que les sujets dont le CCMH est inférieur à la normale (<27pg) sont moins exposés à l'hypertension (OR = 0,04; IC à 95% = 0,01-0,13, p = 0,000). Une étude menée par Babu KR et al.(Babu, Solepure et al. 2015) a montré un VCM significativement plus faible et une CCMH significativement plus élevée. À São Paulo, au Brésil, le VCM était similaire (Reis, Benseñor et al. 1999). Pour les plaquettes, les sujets avec des niveaux inférieurs à la normale sont 12 fois plus exposés à l'hypertension que les sujets avec une numération plaquettaire normale (OR = 12,13, IC à 95% = 1), 45-101,18, niveau de signification P = 0,021). Une corrélation (p = 0,010) entre la numération plaquettaire et la gravité de une maladie coronarienne a été observée dans l'étude de Hilal Bektas Uysal et al (Uysal, Dağlı et al. 2016) .

Selon Rakotovao-Ravahatra ZD et al, les mécanismes possibles pourraient être liés à une complication vasculaire dans les groupes hypertendus. L'hypertension artérielle provoque des dommages endothéliaux par contrainte de cisaillement, ce qui entraîne une augmentation de l'activation plaquettaire (Rakotovao-Ravahatra, Randriatsarafara et al. 2016). Nous notons également que l'augmentation du taux de sédimentation à une heure augmente le risque d'hypertension de 56,63 fois par rapport aux sujets ayant un taux de sédimentation normal (OR = 56,63, IC 95% = 3,37 -597,33, niveau de signification P = 0,001). Margret B. et al ont tenté de vérifier si le taux de sédimentation érythrocytaire est un prédicteur indépendant des maladies coronariennes et de l'hypertension (Margret Andresdottir, Sigfusson et al. 2003) .

Danesh et al. ont combiné les résultats des études disponibles et ont constaté qu'une comparaison de personnes dont les valeurs de sédimentation érythrocytaire se situaient dans le tiers supérieur par rapport au tiers inférieur donnait un rapport de risque de 1,33 (IC à 95%: 1,15, 1,54) (Danesh, Collins et al. 2000).

Conclusion

Le profil des sujets à haut risque d'hypertension artérielle a été établi à l'aide d'un modèle logistique pour la détection des cas inconnus. Les paramètres hématologiques significativement liés à l'hypertension artérielle chez les deux sexes sont: les globules rouges, le MCV, le MCHC, le rapport sanguin plaquettaire et le taux de sédimentation à une heure. La courbe ROC justifie que le modèle logistique a une très forte capacité de prévision.



Contents lists available at ScienceDirect

Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews

journal homepage: www.elsevier.com/locate/dsx

Original Article

Hematologic disorders during essential hypertension

Hamza Nadjib Merad-boudia*, Majda Dali-Sahi, Youcef Kachekouche, Nouria Dennouni-Medjati

Departement of Biology, Analytical Chemistry and Electrochemistry Laboratory, Abou bekr Blekaid University of Tlemcen, 13000, Algeria



ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 February 2019

Accepted 5 March 2019

Keywords:

Hematological profile

Prediction

Essential hypertension

Logistic model

ABSTRACT

Background: Besides the traditional risk factors, hematological changes may be involved in the development of arterial hypertension and in its pathogenesis.

Methods: The study, conducted on a sample of 545 subjects, 215 with hypertension and 330 witnesses, were evaluated for peripheral blood parameters in western Algeria; Logistic regression analysis was used to predict hypertension with hematological parameters.

Results: The characters studied related significantly; lower red blood cell levels have a three-and-a-half-fold risk of developing hypertension compared to those who have normal red blood cell counts (OR = 3.64, 95% CI = 1.37–9.65, $p < 0.05$). Subjects who have mean corpuscular volume rate below 80 fl are more exposed to hypertension (OR = 13.58, 95% CI = 4.68–39.41, $p = 0.000$). The mean corpuscular hemoglobin concentration reveals that subjects who have a lower than normal (<27 pg) are once less exposed to hypertension (OR = 0.04, 95% CI = 0.01–0.13, $p = 0.000$). Subjects who have lower platelet count than normal are twelve times more exposed to hypertension (OR = 12.13, 95% CI = 1.45–101.18, $P = 0.021$). Finally, the increase in sedimentation rate at one hour increases the risk of hypertension by 56.63 times compared to subjects with normal sedimentation rate (OR = 56.63, 95% CI = 3.37–597.33, $P = 0.001$).

Conclusions: Hematological profile associated with essential hypertension retained Red blood cells ratio, mean corpuscular volume, mean corpuscular hemoglobin concentration, platelet ratio, and sedimentation rate at one hour.

© 2019 Diabetes India. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Hypertension, also known as high blood pressure, is a global public health issue. It contributes to the burden of heart disease, stroke and kidney failure and premature mortality and disability [1]. The adverse health consequences of hypertension are compounded because many affected people also have other health risk factors who include tobacco use, obesity, high cholesterol and diabetes mellitus [2].

Besides these traditional factors, there is a number of disputes in various studies with respect to variability of hematological parameters in patients with hypertension and normotensive subjects. Impaired hematological parameters may strongly indicate hypertensive end-organ damage, specifically kidney failure [3–5]. Specifically increased Hgb level may cause left ventricular hypertrophy

while low Hgb levels causes anemia and heart failure [6].

The prognostic situation of the hypertension is closely related to the modification of hematological parameters. To our knowledge, few data are available in the literature. In this regard, the prediction and identification of hypertension takes up a large share in the clinical practice.

In accordance with this idea, Logistic regression analysis was used to investigate the relationships between hematological parameters and hypertension.

2. Methods

Epidemiologic, multicentric, case-control study of the pathogenesis of Primary or essential hypertension was conducted in western Algeria, between September 1st, 2017 and January 31st, 2018.

Hypertensive patients (215) were invited to participate in this study when they met the following criteria: previously diagnosed with hypertension (at least three measures of systolic blood

* Corresponding author.

E-mail address: mbhnaguib@yahoo.fr (H.N. Merad-boudia).

pressure ≥ 140 mm Hg and diastolic blood pressure ≥ 90 mm Hg), known and treated for hypertension for at least 1 year, and aged ≥ 50 years. 330 normotensive controls were randomly selected, matched by age and gender. The controls had to meet the following criteria: never diagnosed with hypertension, not receiving antihypertensive treatment and systolic blood pressure < 140 mm Hg and diastolic blood pressure < 90 mm Hg when measured at two consultations the time of health examination.

Baseline characteristics of the study population were assessed by means of interviews with structured questionnaires. Biological samples with following data also are collected from the patients: Red blood cell count, Hemoglobin level, Hematocrit, MCV, MCH, and MCHC.

The blood parameters were analyzed using by Automated Hematology Analyzer Beckman Coulter 750 using impedance method.

The clinical part of this study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and Guidelines for Good Clinical Practice.

The study was approved by the Ethical Committee of Mascara public Hospital, Saida public Hospital and Ethical Committee of Tlemcen University Central Hospital. All subjects gave signed informed consent before any study related activities.

3. Statistical analysis

Analysis of data was performed using Minitab 16 for Windows (for multivariate pattern analyses.). A binary logistic regression study was performed to compare patients and controls and determine a predictive model of essential hypertension using the measured factors (the response variable is here denoted Y, which counts hypertensive subjects (D) and the controls (T), (D) being the reference value).

ROC curve was plotted to estimate the predictive capacity of our logistic model. P-value less than 0.05 was considered statistically significant.

Associations were quantified with odds-ratios (OR) and their 95% confidence intervals (CI). Several tests including Hosmer and Lemeshow were used to evaluate the adjustment's quality of the models. A significance level greater than 0.05 indicates that the model adjusts well the data and the model can be retained.

4. Results

In Table 1, Level 0 indicating a normal level of red blood cells (4–5.2 * 10¹²/l). Taking this factor into account in the logistic model, it appears in level 1 (below 4 * 10¹²/l) that these subjects have a three-and-a-half-fold risk to developing hypertension compared to those who have a normal rate of red blood cells. (OR = 3.64, 95% CI = 1.37–9.65, p < 0.05).

Table 1
Logistic regression results.

Prédicteurs	Coefficients	Z (Wald)	P-value	OR	IC Min (95%)	IC Max (95%)
Constants	-4,39270	-3,63	0,000			
RBC Ratio *10 ¹² /l						
1	1,29068	2,59	0,010	3,64	1,37	9,65
2	-2,72181	-3,62	0,000	0,07	0,02	0,29
MCV (fl)	2,60884	4,80	0,000	13,58	4,68	39,41
MCHC (pg)	-3,23787	-5,46	0,000	0,04	0,01	0,13
Platelets Ratio *10 ⁹ /l						
1	2,49573	2,31	0,021	12,13	1,45	101,18
2	-1,81620	-2,26	0,024	0,16	0,03	0,78
Sedimentation Rate (1 h/mm)	4,03651	3,36	0,001	56,63	5,37	597,33

Key: OR: Odds Ratio. CI: Confidence Interval. fm: Femtolitre. pg: Pico Gram. 1 h/mm: Milimeter at one hour. Min: Minimum. Max: Maximum. RBC: Red Blood Cells. MCV: Mean Cell Volume. MCHC: Mean Cell Hemoglobin concentration.

The risk of exposure to hypertension is reduced by one order in subjects with high level (level 2) of red blood cells compared to subjects with normal red blood cell count (OR = 0.07, 95% CI = 0.02–0.29, p = 0.000).

Our logistic model has retained the rate of MCV as a hematological factor associated with hypertension. we found that subjects who have MCV rate below 80 fl are more exposed to hypertension than subjects who have a normal rate (80–100 fl). with a risk that is thirteen and a half times greater (OR = 13.58, 95% CI = 4.68–39.41, p = 0.000).

The Mean Cell Hemoglobin concentration (MCHC), reveals that subjects who have a lower than normal rate of MCHC (<27 pg) are once less exposed to hypertension (OR = 0.04, 95% CI = 0.01–0.13, p = 0.000) compared to those who have a normal MCHC (27–34 pg).

For platelets, level 0 indicates a normal platelet count (140–400 * 10⁹/l) while level 1 represents a lower platelet count than normal. Subjects at this level are twelve times more exposed to hypertension compared to subjects with normal platelet count (OR = 12.13, 95% CI = 1.45–101.18, significance level P = 0.021). However, for level 2 which represents a high platelet count (OR = 0.16, 95% CI = 0.03–0.78, significance level P = 0.024).

The risk of exposure to hypertension in these subjects is reduced by one compared to those who have a normal platelet count.

Finally, the increase in sedimentation rate at one hour increases the risk of hypertension by 56.63 times compared to subjects with normal sedimentation rate (OR = 56.63, 95% CI = 3.37–597.33, significance level P = 0.001).

Table 2 given an abstract of factors with more than two modalities effectively revealed from the logistic model. The Df indicates the number of modalities of the factor minus one. The nullity tests of the coefficients associated individually with each factor are very significant (p < 0.05), while the nullity tests of the coefficients associated simultaneously are also very significant (p < 0.05).

Table 3 justifies the choice of the model, including all tests of adequacy of the adjustment.- Pearson, hosmer-lemeshow, brown general alternative and brown symmetric alternative accept the logistic model (p >> 0.05).

Table 4 shows the predictive capabilities of this model. we found a very high percentage (91.4%) of concordant pairs.

The summary of the table of concordant and discordant pairs::

Table 2
Tests for terms with several degrees of freedom.

Terms	K-squire	Df	P
GRnx10 ¹² /l	23,3950	2	0,000
PLn*10 ⁹ /l	11,0649	2	0,004

Key: Df: Degree of freedom.

Table 3
Tests of adequacy of the adjustment.

Methods	K-squire	Df	P
Pearson	40,5257	34	0,205
Sum of deviation squares	31,4982	34	0,591
Hosmer-Lemeshow	4,6685	6	0,587
Brown:			
general alternative	1,0187	2	0,601
symmetric alternative	0,2729	1	0,601

Key: Df: Degree of freedom.

Table 4
Measures of association: (between the response variable and the probability previsions).

Pairs	Number	Percentage	Recapitulative measures	
Concordant	12365	91,4	D of Somers	0,87
Discordant	648	4,8	Gamma of Goodman-Kruskal	0,9
Ex aequo	517	3,8	Tau a of Kendall	0,39
Total	13530	100,0		

The D of Somers, the Gamma of Goodman-Kruskal and Tau a of Kendall are measures generally between 0 and 1. The highest values show that the logistics model has strong prevision capabilities. In our case, the two first values of 0.87 and 0.9 implicate a very strong predictive capacity. The third (Tau a of Kendall) measure shows a relatively good predictive capacity.

5. ROC curve

The Receiving Operating Characteristics (ROC) group the true positive ratio TPR ($TPR = \text{sensitivity} = \text{True positives/positives}$) and the false positive ratio FPR ($FPR = 1 - \text{specificity} = \text{False Positives/negatives}$) in Fig. 1.

Usually, we compare a $p(w)$ at a level $S = 0.5$ to predict $y(w)$, thus we can build the confusion matrix and exctrat the two predicted indicators TPR and FPR.

The ROC curve generalizes this idea by varying the entire continuum of all possible values of level 0 and 1. For each configuration we build the confusion matrix and calculate TPR and FPR. We get: Area under curve (AUC)=0.90, which indicates exceptional discrimination between TPR and FPR.

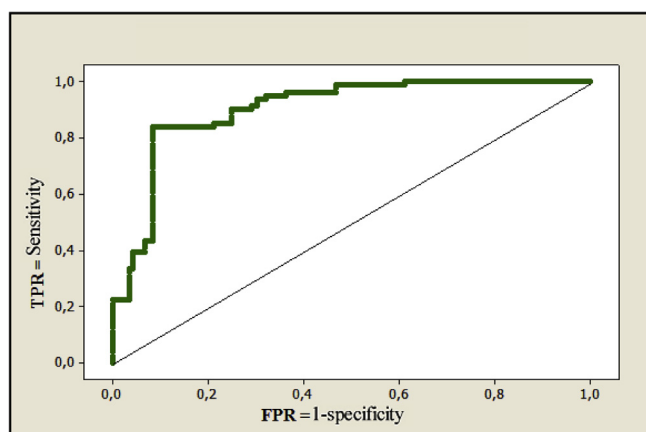


Fig. 1. ROC curve.

6. Discussion

Our study shows a statistically significant association between the risk of developing high blood pressure for both sexes and some hematological parameters, regardless of age, including:

Red blood cells ratio, MCV, MCHC, platelet ratio, and sedimentation ratio.

Our results show that subjects with fewer red blood cells have a three-and-a-half-fold risk of developing hypertension compared to those with normal blood pressure.

Many studies have shown that the anemic patients have a high prevalence of hypertension [7].

The decrease in the number and life expectancy of red blood cells may be due to a deficit in the production of endogenous erythropoietin (EPO) by the kidneys. Indeed, EPO is a hormone that stimulates the production of red blood cells in the bone marrow [8].

Other changes may be involved in the development of arterial hypertension and in its pathogenesis.

There is a causal relationship between vascular function and different hematological disorders [9,10]. Most hypertensive patient's exhibit increased blood viscosity compared with healthy controls [11]. There is a decreased RBC deformability which could cause an increased microvascular flow resistance, which may result in haemolysis and organ damage [12]. This haemolysis induces release of Hgb in to the plasma which scavenges nitric oxide and causes endothelial dysfunction [13].

During hypertension very important alterations in rheological, mechanical and biochemical characteristics of erythrocytes and of blood flow have been shown. It is very relevant the increase in blood viscosity, the decrease in red blood cell (RBC) deformability, the formation of RBC "rouleaux" and RBC aggregates. These hemorheological determinants can favour an increase of peripheral resistances and of arterial blood pressure, causing or worsening hypertension [14].

Cicco G and Pirrelli A. have studied Red blood cell (RBC) deformability, RBC aggregability and tissue oxygenation in hypertension in 320 patients: In hypertensives, the authors found a decrease in erythrocyte deformability (evaluated with EI), in erythrocyte aggregation time, a fibrinogenaemia increase, an increase of shear rate to disaggregate erythrocytes, a decrease in cellular oxygen delivery and tissue oxygenation, an impairment of microcirculation. These changes may be involved in the development of arterial hypertension and in its pathogenesis. These patterns also are more impaired in hypertensives with diabetes, lipidoproteinosis, etc. These patterns are not related with the age of the patients but they are significantly and directly related ($p < 0.01$) with the patient hypertension-age. This could be a new way to realize a better treatment in hypertensives and a prevention of cardiovascular complications (i.e.: myocardial infarction, ..., etc.) [14].

More recently, Philippe Connes and Michel R Boisseau are intersted in the properties of erythrocyte deformability in various pathologies the authors found a decrease in plasma volume and thus a rise in systemic hematocrit and a high level of fibrinogen. The blood and plasma viscosities are high. This condition is observed during hypertension with reduction of microcirculatory peripheral beds. This reflects a loss of erythrocyte deformability which weakens the red blood cells thus causing a state of chronic anemia in these patients [15].

Furthermore, The Kaplan-Meier curves of one-year cardiovascular mortality in patients with hypertension, diabetes mellitus, chronic kidney stage ≥ 3 , or advanced heart failure illustrated better results in the non-anemia group compared to anemia group (There was a significant difference between the non-anemia group and anemia group ($p < 0.001$)) [16].

Our logistic model also retained the rate of MCV as a hematologic factor associated with hypertension. We found that subjects with lower MCV are more exposed to hypertension with a risk that is thirteen and a half times greater than subjects who have a normal MCV (80–100 fl), (OR = 13.58, 95% CI = 4.68–39.41, $p = 0.000$).

Old reports suggest that people with hypertension have lower MCVs than do subjects with normal blood pressure [17,18].

Rakotovoav-Ravahatra ZD and al studied hemogram in hypertensive patients. Among 151 hypertensive patients, 41 per cent of them had microcytic anemias with MCV lower than normal [19]. Our study also shows that subjects who have MCHC lower than normal (<27 pg) are less exposed to hypertension (OR = 0,04; 95% CI = 0,01–0,13, $p = 0,000$).

In 2017, Enawgaw B and al conducted a comparative cross-sectional study of some hematological parameters of hypertensive and normotensive individuals [20].

In this study MCV and MCHC were increased significantly in hypertensive groups. But other studies in these parameters showed contradicted ideas. For example a study conducted by Babu KR et al. [3] showed significantly lower MCV and significantly higher MCHC. In São Paulo, Brazil, MCV were similar [21]. MCV is lower in group who receiving treatment with nondiuretics in elderly men (71–93 years of age) of the Honolulu Heart Program [22] and a study in Saudi Arabia showed no significant differences of MCV and MCHC [23] for platelets, subjects with lower than normal levels are 12 times more exposed to hypertension than subjects with normal platelet count (OR = 12.13, 95% CI = 1, 45–101.18, significance level $P = 0.021$) a correlation ($p = 0.010$) between platelet count and the severity of coronary artery disease was observed in the study of Hilal Bektas Uysal and al [24].

Additionally, in the study of Rakotovoav-Ravahatra ZD and al, the results of the pathological hemograms show that 25.9 per cent of hypertensive patients had a decreased number of platelets [19]. Otherwise, In other studies, PLT count positively correlated with blood pressure indices (diastolic blood pressure, systolic blood pressure and mean arterial pressure) [20] according to the authors, The possible mechanisms might be related to vascular complication in hypertensive groups. High blood pressure causes endothelial damage via shear stress, which results in an increase in platelet activation [25].

We note also that, the increase in sedimentation rate at one hour increases the risk of hypertension by 56.63 times compared to subjects with normal sedimentation rate (OR = 56.63, 95% CI = 3.37–597.33, significance level $P = 0.001$).

Margret B. and al have tried to verify If erythrocyte Sedimentation Rate, is an Independent Predictor of Coronary Heart Disease and high blood pressure [26].

In this prospective population study, the authors have shown that ESR can independently predict the risk of developing Coronary Heart Disease. An increase in $\ln(\text{ESR} + 1)$ of one standard deviation predicted independently a 17 percent increase for men and an 18 percent increase for women in the risk of developing Coronary Heart Disease. For comparison, an increase in cholesterol of one standard deviation predicted independently a 34 percent increase in risk for men and a 27 percent increase in risk for women. ESR is therefore associated with approximately half of the increase in risk compared with cholesterol. Furthermore, the authors found that an increase of one standard deviation in $\ln(\text{ESR} + 1)$ increased the risk of death due to stroke by 23 percent ($p = 0.002$) for men and by 21 percent ($p < 0.001$) for women when adjusted for age and stage but that it decreased to 15 percent ($p = 0.06$) and 16 percent ($p = 0.08$), respectively, when adjusted for all risk factors [26].

The authors controlled for factors considered to influence ESR per se such as smoking, adiposity, socioeconomic indicators (as reflected by educational level), diabetes, and hemoglobin level as

well as for other conventional Coronary Heart Disease risk factors to minimize the effect of confounding [26].

The Stockholm Prospective Study found erythrocyte sedimentation to be an independent risk factor for myocardial infarction [27].

This study comprised 3486 men followed up for 14 years and 171 incident cases of myocardial infarction.

Danesh and al. combined the results of available studies and found that a comparison of persons whose erythrocyte sedimentation values were in the top third compared with the bottom third yielded a risk ratio of 1.33 (95 percent CI: 1.15, 1.54) [28].

7. Conclusion

The profile of subjects at high risk for high blood pressure was established, using a logistic model for the detection of unknown cases. The hematological parameters significantly related to high blood pressure in both sexes are: red blood cells, MCV, MCHC, platelets blood ratio and sedimentation rate at one hour. The ROC curve justifies that the logistic model has a very strong forecasting capacity.

Competing interests

The author(s) declare no financial and non-financial interests.

Author contribution

Hamza Nadjib Merad-boudia (1): Writing of the main text, preparation of the tables and figure.

Majda Dali-Sahi (1): Supervise the work and write the summary.

Youcef Kachekouche (1): Calculations of the statistical part.

Nouria Dennouni-Medjati (1): Proofreading and correction of the manuscript.

Acknowledgments

We wish to thank the staff of the biochemistry laboratory and hemobiology laboratory, public hospital establishments of Mascara and Saida in Algeria for their assistance in data collection.

References

- [1] World Health Organization. Geneva. Causes of death 2008: data sources and methods, 28. Department of Health Statistics and Informatics World Health Organization; April 2011.
- [2] World Health Organization. Geneva. A global brief on Hypertension. Silent killer, global public health crisis, 40; 2013.
- [3] Babu KR, Solepure A, Shaikh R. Comparison of hematological parameters in primary hypertensives and normotensives of sangareddy. *Int J Biomed Res* 2015;6(5):309–15.
- [4] AL-Hamdani IH. Estimation of serum uric acid, urea and creatinine in essential hypertensive patients. *Tikrit Med J* 2010;16(1):152–8.
- [5] Jadeja U, Jadeja J, Naik S. Comparative study of haemoglobin concentration in hypertensive and normotensive subjects. *Indian J Appl Basic Med Sci* 2011;13(17):7.
- [6] Smebye ML, Iversen EK, Høieggren A, Flaa A, Os I, Kjeldsen SE, et al. Effect of hemoglobin levels on cardiovascular outcomes in patients with isolated systolic hypertension and left ventricular hypertrophy (from the LIFE study). *Am J Cardiol* 2007 Sep 1;100(5):855–9.
- [7] Gandhi SJ, Hagans I, Nathan K, Hunter K, Roy S. Prevalence, comorbidity and investigation of anemia in the primary care office. *J Clin Med Res* 2017 Dec;9(12):970–80.
- [8] Nunez J, Nunez E, Sanchis J, Bodi V, Liacer A. Prognostic value of leukocytosis in acute coronary syndromes: the cinderella of the inflammatory markers. *Curr Med Chem* 2006;13(18):2113–8.
- [9] Biadgo B, Melku M, Abebe SM, Abebe M. Hematological indices and their correlation with fasting blood glucose level and anthropometric measurements in type 2 diabetes mellitus patients in Gondar, Northwest Ethiopia. *Diabetes Metab Syndr Obes* 2016;9:91–9.

- [10] Mathew R, Huang J, JM W, Fallon JT, Gewitz MH. Hematological disorders and pulmonary hypertension. *World J Cardiol* 2016;8(12):703–18.
- [11] Sandhagen B. Red cell fluidity in hypertension. *Clin Hemorheol Microcirc* 1998;21(3–4):179–81.
- [12] Karabulut A, Karadag A. Clinical implication of hematological indices in the essential hypertension. *World J Hypertens* 2015;5(2):93–7.
- [13] Brittain EL, Janz DR, Austin ED, Bastarache JA, Wheeler LA, Ware LB, et al. Elevation of plasma cell-free hemoglobin in pulmonary arterial hypertension. *Chest* 2014 Dec;146(6):1478–85.
- [14] Cicco G, Pirrelli A. Red blood cell (RBC) deformability, RBC aggregability and tissue oxygenation in hypertension. *Clin Hemorheol Microcirc* 1999;21:169–77.
- [15] Connes Philippe, Boisseau Michel R. Basics aspects of hemorheology. *Blood Thrombosis Vessels* 2010;22(3):126–36.
- [16] Lee WC, Fang HY, Chen HC, Chen CJ, Yang CH, Hang CL, et al. Anemia: a significant cardiovascular mortality risk after ST-segment elevation myocardial infarction complicated by the comorbidities of hypertension and kidney disease. *PLoS One* 2017;12(7).
- [17] Bruschi G, Minari M, Bruschi ME, Tacinelli L, Milani B, Cavatorta A, et al. Similarities of essential and spontaneous hypertension: volume and number of blood cells. *Hypertension* 1986;8:983–9.
- [18] Postnov YV, Kravtsov GM, Orlov SN, Pokudin NI, Postnov IY, Kotelevtsev YV. Effect of protein kinase C activation on cytoskeleton and cation transport in human erythrocytes: reproduction of some membrane abnormalities revealed in essential hypertension. *Hypertension* 1988;12:267–73.
- [19] Rakotovoao-Ravahatra ZD, Randriatsarafara FM, Razafimanantsoa F, Rabetokotany FR, Rakotovoao AL. Blood count results from hypertensive patients seen in laboratory of CHU-HJRB Antananarivo in 2013. *Pan Afr Med J* 2016;23:49.
- [20] Enawgaw B, Adane N, Terefe B, Asrie F, Melku M. A comparative cross-sectional study of some hematological parameters of hypertensive and normotensive individuals at the university of Gondar hospital, Northwest Ethiopia. *BMC Hematol* 2017;17:21.
- [21] Reis RS, Benseñor IJ, Lotufo PA. Laboratory assessment of the hypertensive individual. Value of the main guidelines for high blood pressure. *Arq Bras Cardiol* 1999;73(2):201–10.
- [22] Sharp DS, Curb JD, Schatz IJ, Meiselman HJ, Fisher TC, Burchfiel CM, Rodriguez BL, Yano K. Mean red cell volume as a correlate of blood pressure. *Circulation* 1996 May 1;93(9):1677–84.
- [23] Al-Muhana FA, Larbi EB, Al-Ali AK, Al-Sultan A, Al-Ateeq S, Soweilem L, et al. Haematological, lipid profile and other biochemical parameters in normal and hypertensive subjects among the population of the eastern province of Saudi Arabia. *East Afr Med J* 2006 Jan;83(1):44–8.
- [24] Uysal Hilal Bektas, Dağlı Bekir, Akgüllü Çağdaş, Avcil Mücahit, Zencir Cemil, Ayhan Mediha, et al. Blood count parameters can predict the severity of coronary artery disease. *Korean J Intern Med* 2016 Nov;31(6):1093–100.
- [25] Ates I, Bulut M, Ozkayar N, Dede F. Association between high platelet indices and proteinuria in patients with hypertension. *Ann Lab Med* 2015;35(6):630–4.
- [26] Andresdottir Margret B, Sigfusson Nikulas, Sigvaldason Helgi, Gudnason Vilmundur. Erythrocyte sedimentation rate, an independent predictor of coronary heart disease in men and women: the Reykjavik study. *Am J Epidemiol* 1 November 2003;158(Issue 9):844–51.
- [27] Carlson LA, Böttiger LE, Ahfeldt PE. Risk factors for myocardial infarction in the Stockholm prospective study. A 14-year follow-up focussing on the role of plasma triglycerides and cholesterol. *Acta Med Scand* 1979;206:351–60.
- [28] Danesh J, Collins R, Peto R, Lowe GD. Haematocrit, viscosity, erythrocyte sedimentation rate: meta-analyses of prospective studies of coronary heart disease. *Eur Heart J* 2000 Apr;21(7):515–20.

Abréviation list:

BP: Blood pressure
CAD: Coronary artery disease
CBC: Complete blood cell count
CKD: chronic kidney disease
DBP: Diastolic blood pressure
EI: Elongation Index
EDTA: Ethylene diamine tetra-acetate
ESR: erythrocyte sedimentation rate
HCT: Hematocrit
Hgb: Hemoglobin
HTN: Hypertension
MAP: Mean arterial pressure
MCH: Mean cell hemoglobin
MCHC: Mean cell hemoglobin concentration
MCV: Mean cell volume
MI: Myocardial infarction
MmHg: Millimeters mercury
MPV: Mean platelet volume
NO: Nitric oxide
PLT: Platelets
RBC: Red blood cells
RDW: Red blood cell distribution width
SBP: Systolic blood pressure
SCF: Stem cell factor
WBC: White blood cells

Chapitre 3 : Blood determination of kynurenin, tryptophan metabolite and perspectives in the biological monitoring of type 2 diabetics

Chapitre 3 : Dosage sanguin de la kynurénine, du métabolite du tryptophane et perspectives dans la surveillance biologique des diabétiques de type 2

Introduction

Outre le déséquilibre de la glycorégulation, sur le plan physiopathologique, le diabète de type 2 est aussi associé à un dysfonctionnement profond du métabolisme des acides aminés (Kahn et al., 2014) . En effet, la dégradation du tryptophane, un acide aminé essentiel, est étroitement liée à l'activité de l' IFN- γ , une cytokine pro-inflammatoire. Cette dernière induit l'enzyme indoleamine-2,3-dioxygénase (IDO1 : EC 1.13.11.52) qui catalyse la première étape du catabolisme du tryptophane par la voie des kynurénines (KP) (Oxenkrug 2010). Les niveaux circulants de la kynurénine sont influencés par l'apport alimentaire en tryptophane (Schröcksnadel et al., 2006). Par conséquent, le rapport kynurénine/tryptophane (K/T) représente une mesure du catabolisme du tryptophane plus appropriée que la concentration absolue de kynurénine. En plus de refléter l'activité de l'enzyme IDO1, le ratio K/T est un indicateur fiable de l'activation immunitaire médiée par l'IFN- γ (Schröcksnadel, 2006, Oxenkrug 2010).

Les récentes enquêtes de prévalence montrent que le diabète de type 2 n'est pas détecté dans au moins 30 % des cas et que le développement de complications micro- et macro-vasculaires peut précéder la progression vers le diabète déclaré de type 2 (Rydén et al., 2013) .L'implication de la voie KP dans le suivi du diabète de type2 et de ses complications a été étudiée.

Matériel et Méthodes

Il s'agit d'une étude prospective, transversale et multicentrique qui a été réalisée dans deux régions de l'ouest algérien (Mascara et Saida). Au total, 111 patients, âgés de 40 ans et plus (pour les deux sexes), présentant un diabète de type 2 confirmé ont été recrutés du 15 janvier 2018 au 15 mai 2018. Les patients ont été classés en deux groupes selon la nature de leur traitement antidiabétique : Les diabétiques de type 2 (code PMSI : E1190 : insulino-traités, sans complication) sous insuline et les diabétiques de type 2 (code PMSI : E1198 : non insulino-traités) .

Les concentrations sériques de tryptophane et de kynurénine ont été mesurées par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-

MS/MS) selon une méthode déjà décrite (Yamada et al., 2008, Schefold et al., 2009) . Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du progiciel statistique Minitab Version 16.

Résultats

Au total, 111 patients diabétiques de type 2 ont été recrutés pour cette étude : 11 hommes et 28 femmes (sex ratio = 0,39) non insulino-traités (sous ADO), d'âge moyen $47,82 \pm 9,38$ ans et $49,25 \pm 9,77$ ans, respectivement, et 21 hommes et 51 femmes (sex ratio = 0,41) insulino-traités (insuline + ADO), d'âge moyen $66,5 \pm 7,30$ ans et $64,63 \pm 8,96$ ans, respectivement.

Une différence significative a été constatée entre les deux groupes en terme d'âge ($p < 0,001$). En considérant l'ensemble de la population des patients diabétiques, insulino-traités et non insulino-traités, l'analyse de la variance (ANOVA) sur un facteur contrôlé (ratio K/T*100) fait ressortir plusieurs variables explicatives, indépendantes, qui sont l'âge, l'ancienneté du diabète et les niveaux d'hémoglobine glyquée. Les moyennes des scores par modalités d'âge sont différentes ($P=0,060$). Le ratio K/T est significativement différent chez les diabétiques de moins de 50 ans par rapport à ceux âgés de 50 ans et plus.

Les moyennes des scores par modalités d'ancienneté du diabète sont différentes ($P=0,0445$). Le ratio K/T est significativement différent chez les patients diagnostiqués diabétiques depuis moins de 10 ans par rapport à ceux qui le sont depuis 10 ans et plus. Les moyennes des scores par modalités d'hémoglobine sont différentes ($P=0,0119$). Le ratio K/T est significativement différent chez les patients diabétiques ayant un taux d'HbA1c inférieur à 6.5 % par rapport à ceux qui ont un taux d'HbA1c supérieur ou égal à 6.5 % .

Dans le groupe des diabétiques de type 2 non insulino-traités (sous ADO), le ratio K/T est associé positivement à l'âge ($r = 0,453$, $p = 0,004$) et à l'ancienneté du diabète ($r = 0,415$, $p = 0,009$). Dans le groupe des diabétiques de type 2 insulino-traités, le ratio K/T est aussi significativement associé positivement à l'âge ($p = 0,001$ (Figure 3), négativement à la glycémie ($r = -0,291$, $p = 0,013$), (Figure 4) et négativement à l'HbA1c ($r = -0,315$, $p = 0,007$)

Discussion

Les rares données épidémiologiques concernant la voie des kynurénines en relation avec le diabète de type 2 montrent que des valeurs élevées du ratio plasmatique K/T sont associées à des pronostics cardiovasculaires défavorables (Pedersen et al., 2011). Dans notre cohorte de patients atteints de diabète de type 2, nous avons observé que plus du quart des patients (26 %) étaient aussi hypertendus. Cette association a été largement retrouvée dans la

littérature. Les hommes et les femmes diabétiques de type 2 insulino-traités de notre échantillon avaient un âge moyen de plus de 60 ans, ce résultat est concordant avec ceux de Deo et al ou la prévalence globale de l'hypertension et du diabète était modeste, sauf dans le groupe d'âge des 60 ans et plus, dans lequel 50% étaient aussi hypertendus (Deo et al., 2017).

Dans le groupe des diabétiques de type 2 non insulino-traités, l'âge moyen était de 45 ans à presque 50 ans pour les hommes et les femmes. Dans l'étude de Young et al, l'âge moyen était de 61 ans bien que les patients éligibles à cette étude étaient âgés de 30 ans et plus (Young et al., 2017). Par ailleurs, Nous avons trouvé que l'activité accrue de l'IDO1 était associée significativement et positivement à l'âge dans les deux groupes. Dans l'étude de Debnath et al, le modèle de régression linéaire multiple utilisé a révélé que l'âge expliquait à 77 % la variabilité du rapport KYN / TRP (Debnath et al., 2017). La majorité des diabétiques de type 2 de notre échantillon étaient en surpoids ou obésité et avaient un IMC situé aux alentours de 27 Kg/m², quelque soit leur sexe et leur traitement (insulino-traités et non insulino-traités). Un profil similaire a été rapporté dans l'étude de Shu P.S et al (Shu et al., 2017). Étant donné que l'obésité réduit la sensibilité à l'insuline (Bassuk et al., 2008) et prédispose les individus à des profils métaboliques cardiaques anormaux, tels qu'une augmentation des adipokines inflammatoires, une résistance à l'insuline, une élévation du taux de triglycérides, une diminution du LDL-cholestérol et un risque d'hypertension (Alberti et al., 2005), il y a un besoin urgent d'intervention de gestion du poids. En effet, l'obésité a été associée à des taux plasmatiques de RKT élevés, qui n'ont pas été normalisés même après une perte de poids importante (Oxenkrug 2011). Aussi, dans l'obésité, les niveaux d'expression des gènes d'IDO1, augmentent dans le tissu adipeux et sont plus élevés dans les macrophages anti-inflammatoires. Simultanément, une augmentation des taux sériques de Kyn et de K / T ratio a été observée chez les individus avec un IMC plus élevé (Favenec, 2015).

Dans un autre volet, la compréhension des mécanismes de développement du diabète de type 2 (DT2) à partir du prédiabète demeure importante pour la prévention et le traitement du DT2. Cependant, les mécanismes moléculaires médiateurs de l'effet de l'inflammation sur le développement du DT2 à partir du pré-diabète restent inconnus. L'un de ces mécanismes pourrait impliquer la voie de la kynurénine (KYN) (KP) du métabolisme du tryptophane (TRP) (Oxenkrug 2015). Dans notre panel le lien entre l'ancienneté du diabète de type 2 et l'activité de l'IDO l'illustre bien : Dans le groupe des diabétiques de type 2 non insulino-traités, le ratio Kynurénine tryptophane était associé positivement et significativement à l'ancienneté du diabète. Le diagnostic du diabète de type 2 était établi

depuis (IIQ) 3 à 10 ans pour les non insulinotraités et (IIQ) 5 à 13 ans pour les insulinotraités, avec un RKT plasmatique dépassant 6 ($\mu\text{mol}/\mu\text{mol}$). Bien que le recrutement conformément aux critères d'inclusion (les diabétiques de type 2 connus) ne nous a pas permis de calculer l'incidence, dans l'étude de Rebnord et al., au cours d'une médiane (IIQ) de 7,6 (6,6 à 8,7 ans), un total de 173 (6,9%) nouveaux diagnostics de diabète de type 2 ont été identifiés (Rebnord et al., 2017). De plus, Pedersen et al. ont observé une augmentation du rapport KYN / TRP chez les patients diabétiques par rapport aux patients présentant un métabolisme normal du glucose chez les sujets présentant un angor stable (Pedersen et al., 2015). D'autres faits intéressants, dans le groupe des diabétiques de type 2 insulinotraités, le ratio Kynurénine tryptophane était significativement et négativement associé à la glycémie et à l'HbA1c.

L'association négative du RKT plasmatique avec le diabète de type 2 semble principalement refléter l'excrétion urinaire élevée de kynurénine. En fait, le tryptophane et la kynurénine sont tous deux filtrés librement dans les glomérules. Selon les récentes conclusions de Pedersen et al., le tryptophane est efficacement réabsorbé dans les tubules proximaux et seule une fraction mineure est excrétée dans les urines. La réabsorption de la kynurénine, en revanche, devient saturée, ce qui entraîne une augmentation des fractions excrétées à des concentrations en circulation croissantes (Pedersen et al., 2013). Cela peut suggérer que la clairance de la kynurénine est étroitement régulée afin d'équilibrer les concentrations en circulation. Logiquement, une diminution de la concentration plasmatique de kynurénines avec une concentration relativement peu modifiée du tryptophane plasmatique est en faveur d'une diminution globale du RKT plasmatique (Rebnord, 2017). Contrairement à la plupart des autres biomarqueurs ponctuels d'urine, le RKT ne nécessite pas d'ajustement pour la créatinine dans l'urine afin de prendre en compte la dilution. Cela limite la possibilité de confusion, étant donné que le taux d'excrétion de la créatinine urinaire peut être influencé par des comorbidités communes (Ix et al., 2010). Les données préliminaires stimulantes présentées ici suggèrent que le métabolisme accéléré de l'IDO1 pourrait avoir des contributions significatives dans l'inauguration et la progression du DT2, surtout, si l'on sait que le développement de complications micro et macrovasculaires peut précéder la progression vers le diabète déclaré de type 2 (Rydén, 2013). Alors que plusieurs paramètres tels que l'HbA1C sont établis pour le suivi du diabète de type 2, nos résultats selon lesquels le RKT plasmatique permet de vérifier l'ancienneté et l'évolution du diabète de type 2 concordaient avec ceux retrouvés dans la littérature où des taux élevés de RKT plasmatique ont été associés à de mauvais pronostics (Pedersen, 2011), avec des résultats cohérents chez

les personnes atteintes de coronaropathie (Pedersen, 2011) et chez les personnes âgées (Sulo et al., 2013). Un RKT plasmatique diminué au cours du diabète de type 2, ainsi que la forte probabilité de risques que les individus ne soient pas identifiés par les facteurs de risque classiques, encouragent son évaluation ultérieure, au long terme en ce qui concerne l'application clinique.

Conclusions

Dans cette cohorte portant sur des cas avérés de DT2, l'activité enzymatique de l'IDO (via le RKT plasmatique) est un facteur étroitement lié à la progression du diabète de type 2 indépendamment des autres facteurs potentiels. Les rôles de la voie de dégradation du tryptophane et de l'excrétion rénale de kynurénine dans le développement du diabète de type 2 devraient être davantage élucidés afin de fournir de nouvelles stratégies d'intervention dans la thérapie du diabète sucré.

Blood determination of kynurenin, tryptophan metabolite and perspectives in the biological monitoring of type 2 diabetics

Hamza Nadjib Merad-boudia^{1*}, Majda Dali-Sahi¹, Youcef Kachekouche¹, Nouria Dennouni-Medjati¹, Hennart Benjamin^{2,3}, Lenski Marie^{2,3}, Allorge Delphine^{2,3}

Department of Biology, Laboratory of Analytical Chemistry and Electrochemistry, University of Tlemcen, 13000, Algeria¹

CHU Lille, Functional Unit of Toxicology, F-59000 Lille, France²

Univ. of Lille, EA 4483 - IMPECS -Impact of the Chemical Environment on Human Health,, F-59000 Lille, France³

Corresponding author: 1*



ABSTRACT— Better follow-up can provide an unrealized opportunity to identify diabetic patients potentially at risk of complications. We evaluated the associations between serum kynurenin/tryptophan ratio and type 2 diabetes. Data were collected from a cohort of 111 patients with type 2 diabetes aged 40 years and older, recruited from January 15, 2018 to May 15, 2018. The K/T ratio was used as a marker of indoleamine 2,3-dioxygenase 1 enzyme activity. The determination of serum tryptophan and kynurenin levels was performed according to an analytical protocol based on liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). 11 non-insulin-treated men and 28 women, mean ages 47.82 ± 9.38 and 49.25 ± 9.77 years, respectively, and 21 insulin-treated men and 51 insulin-treated women, mean ages 66.52 ± 7.30 and 64.63 ± 8.96 years, respectively, were recruited. The K/T ratio was significantly associated with age ($r = 0.453$, $p = 0.004$) and duration of diabetes ($r = 0.415$, $p = 0.009$) in the non-insulin-treated group. It was also significantly associated with age ($p < 0.001$), blood glucose ($r = -0.291$, $p = 0.013$), and HbA1c ($r = -0.315$, $p = 0.007$) in insulin-treated patients. The K/T ratio could serve as a novel biomarker for the progression of type 2 diabetes and as a threshold for earlier clinical intervention.

KEYWORDS: kynurenin, tryptophan, biomarker; Diabete

1. INTRODUCTION

Type 2 diabetes is characterized by systemic inflammation affecting several organs [1]. In addition to an imbalance in glycoregulation, on a pathophysiological level, type 2 diabetes is also associated with a profound dysfunction of amino acid metabolism [2]. These two notions have led to the exploration of a new path in the pathogenesis and evolution of diabetes. Indeed, the degradation of tryptophan, an essential amino acid, is closely linked to the activity of IFN- γ , a pro-inflammatory cytokine. The latter induces the enzyme indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO1: EC 1.13.11.52), which catalyses the first stage of tryptophan catabolism by the kynurenin (KP) pathway [3]. Circulating levels of kynurenin are influenced by dietary intake of tryptophan [4]. Therefore, the kynurenin to tryptophan ratio (K/T) is a more appropriate measure of tryptophan catabolism than the absolute concentration of kynurenin. In addition to reflecting the activity of the IDO1 enzyme, the K/T ratio is a reliable indicator of IFN- γ -mediated immune activation (3, 4). While IFN- γ has been implicated in the pathogenesis of insulin resistance [5], [6], several metabolites of the KP pathway also play an important role in the pathogenesis of type 2 diabetes [7], [9]. A cross-sectional study showed that, compared to healthy individuals, the K/T ratio was higher in type 2 diabetics and those with diabetic nephropathy [10]. Paradoxically, recent prevalence surveys show that type 2 diabetes is undetected in at least 30% of cases and that the development of micro- and macro-vascular complications may precede

progression to overt type 2 diabetes [11]. The involvement of the KP pathway in the follow-up of type 2 diabetes and its complications has been studied.

2. Materials and Methods

Patients

This is a prospective, cross-sectional and multicentric study that was carried out in two regions of western Algeria (Mascara and Saida). A total of 111 patients, aged 40 years and older (both sexes), with confirmed type 2 diabetes were recruited from January 15, 2018 to May 15, 2018. The study followed the principles of the Declaration of Helsinki and was approved by the local committee for medical and health research ethics. All participants provided written informed consent. Participants were identified as having uncomplicated type 2 diabetes according to the new International Classification of Diseases ICD-11 for the year 2018 (codes 5A11: www.who.int/classifications/icd/en/) based on their medical records. This classification defines type 2 diabetes as a metabolic disorder characterized by high blood glucose levels associated with insulin resistance and relative insulin deficiency. We confirmed the diabetes treatments by linking them to the CHIFA prescription database version 1.8.8.9. This is a software package containing data on all drugs dispensed in outpatient pharmacies in Algeria. Patients have been classified into two groups according to the nature of their anti-diabetic treatment (anatomical classification code of therapeutic chemicals ATC A10, controlled by the WHO Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology: https://www.whocc.no/atc_ddd_index/?code=A10): - type 2 diabetics (PMSI code: E1190: insulin-treated, uncomplicated) on insulin (Glargine, Detemir, Glulisine, Insulin lispro rapid and Insulin aspart rapid) and oral antidiabetic drugs (OAD). - type 2 diabetics (PMSI code: E1198: non-insulin treated, without complications) under ADO or analogue of incretins exclusively (sulfonylurea, biguanides, glinides, alpha-glucosidase inhibitors and Liraglutide).

Clinical Data

Clinical data were obtained at the inclusion of patients. Medical history, drug treatments and anthropometric data were collected using a questionnaire administered to all participants. The diagnosis of type 2 diabetes was made according to International Expert Committee (IEC 2009) criteria [12], American Diabetes Association (2010) and WHO (2011) criteria [13] (fasting blood glucose ≥ 7 mmol/L in two doses or blood glucose 2h after a load test ≥ 11.1 mmol/L and/or HbA1c $\geq 6.5\%$).

Anthropometric measurements

The height (in metres) was measured in a vertical position, without shoes and heels attached, using a non-elastic tape measure. Accuracy was 0.5 cm. The weight (in kilograms) was measured on a stable, sufficiently large scale that was adapted to the patient's degree of autonomy (Seca, Hamburg, Germany). Regular calibration of the scale was necessary, its accuracy was ± 50 g. The body mass index (BMI) or Quetelet index was calculated as body weight divided by height squared (weight (kg) / [height]² (m²)).

Biochemical Analysis

Blood samples were taken in the morning after 12 hours of fasting on heparinized tubes. The biochemical tests were performed on the MINDRAY BS-330 automatic biochemistry machine. Serum aliquots were stored at -80°C for the determination of tryptophan and metabolites of the KP pathway.

Determination of serum tryptophan and kynurenin levels

Serum concentrations of tryptophan and kynurenin were measured by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) using a method already described [14], [15]. 50 μ L of serum was

mixed and centrifuged (11800 rpm, at +4°C, for 8 min) after the addition of 50 µL of acetonitrile, for protein precipitation, containing tryptophan D5 at 50 µM (CDN isotopes, Pointe-Claire, Canada), as an internal standard. 50 µL of supernatant is taken up and added vialwise to deionized water (600 µL). 10µL of this mixture are finally injected into a UPLC®-MS/MS system (Acquity TQ-XS Detector, Waters, Milford, USA) equipped with a 2.1x100mm-1.7µm CSH Phenyl-Hexyl column (Waters, Milford, USA). The ESI+ (Positive Electrospray Ionization) and MRM (Multiple Reactions Monitoring) modes are used respectively for ionization and detection of each transition of the molecules to be quantified. The Mass Links (Waters) software is used for data acquisition and processing.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the Minitab Version 16 statistical software package. Descriptive statistics for each variable were performed. The normality of the data distribution was assessed using the Kolmogorov-Smirnov test. Results for continuous variables are presented as mean ± standard deviation. Variables were also reported as numbers or percentages (%). Results for continuous variables without normal distribution are presented as median [Inter-quartile range (IQR)]. Statistically significant differences between groups were determined by the Chi-square test for categorical variables. For continuous variables, parametric statistics (t-test) were calculated. An analysis of variance (ANOVA) was used, with a single dependent variable (K/T ratio) and several explanatory variables (age, diabetes duration and HBA1c level). The association between the variables was assessed using Pearson's correlation. A value of $P < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

A total of 111 type 2 diabetic patients were recruited for this study: 11 men and 28 women (sex ratio = 0.39) non-insulin-treated (on ADO), mean ages 47.82 ± 9.38 years and 49.25 ± 9.77 years, respectively, and 21 men and 51 women (sex ratio = 0.41) insulin-treated (insulin + ADO), mean ages 66.5 ± 7.30 years and 64.63 ± 8.96 years, respectively. There was a significant difference between the two groups in terms of age ($p < 0.001$). The comparison of the two patient groups with respect to demographic, clinical, biochemical and hematological data is presented in Table 1.

Table 1: Patient characteristics by diabetes therapy

Variables	Non-insulin-treated		(Insulin-treated) +		P-value
	Men	Women	Men	Women	
	Mean±SD	Mean±SD	Mean±SD	Mean±SD	
Sex ratio M/W	(35.13%) 0.39		(64.86%) 0.41		
Gender	(34.38%) 11	(35.44%) 28	(65.63%) 21	(64.56%) 51	> 0.05
Age (Year)	45-52	42.25-54.75	61-73.50	58-69	< 0.001

	47.82±9.38	49.25±9.77	66.52±7.30	64.63±8.96	
BMI	25.35-29.38	24.11-31.16	25.71-29.30	23.43-29.35	> 0.05
	27.43±2.53	27.66±4.77	27.11±2.50	27.13±4.25	
Normotensive patients	(10.98%) 9	(20.73%) 17	(23.17%) 19	(45.12%) 37	> 0.05
Hypertensive patients	(6.90%) 2	(37.93%) 11	(6.90%) 2	(48.28%) 14	> 0.05
Age of diabetes (Year)	3-9 6.67±5.15	4-10.75 8.36±6.48	5-13.50 9.95±6.50	5-10 9.09±8.18	> 0.05
(HgbA1c) (%)	5.73-9.04 7.37±1.8	6.47-9.62 8.29±1.68	6.37-8.44 7.27±1.38	6.49-8.63 7.84±1.86	> 0.05
(HgbA1c) (mmol/mol)	39.13-75.31 57.15±19.72	47.25-82.11 67.31±18.46	46.12-68.75 55.96±15.19	47.44-70.73 62.20±20.43	> 0.05
Blood Glucose (g/L)	1.10-2.36 1.73±0.8	1.34-2.28 1.85±0.57	1.33-2.04 1.69±0.43	1.32-1.92 1.69±0.55	> 0.05
Urea (g/L)	0.21-1.47 0.84±0.61	0.32-1.47 0.91±0.56	0.38-1.47 0.94±0.55	0.42-1.47 0.93±0.28	> 0.05
Creatinine (g/l)	7.60-10.50 9.41±2.65	5.95-8.22 7.21±1.20	8.22-10.35 9.21±2.02	7.5-8.22 8.11±1.27	> 0.05
Cholestérol Total (g/L)	1.22-1.80 1.60±0.40	1.78-2.05 1.89±0.35	1.37-1.79 1.64±0.32	1.60-1.93 1.81±0.37	> 0.05
HDL- Cholestérol (g/L)	0.37-0.47 0.44±0.10	0.45-0.51 0.48±0.11	0.34-0.45 0.39±0.09	0.42-0.53 0.46±0.09	> 0.05
LDL- Cholestérol (g/L)	0.73-1.07 0.93±0.22	1.05-1.21 1.09±0.29	0.86-1.13 0.97±0.25	0.88-1.24 1.08±0.35	> 0.05
Triglycerides (g/L)	0.79-1.39 1.10±0.27	1.18-1.65 1.45±0.47	1.07-1.82 1.52±0.80	0.99-1.60 1.37±0.50	> 0.05
Tryptophan (µmol/L)	63.4-99.1 83.34±34.96	53.82-98.69 72.96±30.18	39.07-77.65 59.63±28.64	43.15-76.48 61.97±21.61	<0.001

Serum kynurenin (µmol/l)	3.67-5.94	3.12-5.28	2.63-5.33	2.53-4.60	> 0.05
	5.38±2.76	4.23±1.67	3.88±1.84	4.26±2.64	
(K/T)*100	5.34-7.61	4.58-7.42	5.01-7.36	5.01-7.80	> 0.05
(µmol/ µmol)	6.66±2.39	6.11±2.08	6.85±3.53	6.91±2.75	

The results are shown as Mean ± standard deviation. percentage and QI

BMI: Body Mass Index. HgbA1c: Glycosylated Haemoglobin. HDL- Cholestérol: High Density lipoprotein - Cholestérol. LDL- Cholestérol: Low Density Lipoprotein- Cholestérol. K/T: Kynurenines/Tryptophan Ratio. SD: Standard deviation. Considering the entire population of diabetic patients, insulin-treated and non-insulin-treated, the analysis of variance (ANOVA) on a controlled factor (K/T*100 ratio) shows several independent explanatory variables, which are age, length of diabetes and glycated hemoglobin levels (Tables 2, 3 and 4).

Tableau 2: One-way ANOVA: (K / T) x100 depending on age (over or under 50)

Source	Df	Sum of squares	MC	F	P
Age 50 years	1	27.81	27.81	3.88	0.060
Error	110	781.36	7.17		
Total	111	809.18			

S = 2.677 R square = 3.44% R square (adjusted) = 2.55% R square (adjusted) = 2.55

The averages of the scores by age modality are different (P=0.060). The K/T ratio is significantly different in diabetics under 50 years of age compared to those aged 50 years and older.

Table 3: One-way ANOVA: (K / T) x100 depending on the age of diabetes (more or less than 10 years)

Source	DF	Sum of squares	MC	F	P
Age of Diabetes	1	4.33	4.33	0.59	0.0445
Error	110	804.84	7.38		
Total	111	809.18			

S = 2.717 R square = 0.54% R square (adjusted) = 6.25

The averages of the scores by diabetes modality are different (P=0.0445). The K/T ratio is significantly different in patients diagnosed with diabetes less than 10 years ago compared to those diagnosed with diabetes 10 years ago and older.

Table 4: One-way ANOVA: (K / T) x100 based on HgbA1c levels below or above 6.5%.

Source	Df	Sum of squares	MC	F	P
HgbA1c levels	1	17.91	17.91	2.47	0.0119
Error	110	791.26	7.26		
Total	111	809.18			

S = 2.694 R square = 2.21% R square (adjusted) = 1.32% R square (adjusted) = 1.32

The averages of the scores by haemoglobin modalities are different (P=0.0119). The K/T ratio is significantly different in diabetic patients with HbAc1 levels less than 6.5% compared to those with HbA1C levels greater than or equal to 6.5%. In the group of non-insulin-treated type 2 diabetic patients (on ODA), the K/T ratio is positively associated with age (r = 0.453, p = 0.004) and length of diabetes (r = 0.415, p = 0.009) (Figures 1 and 2).

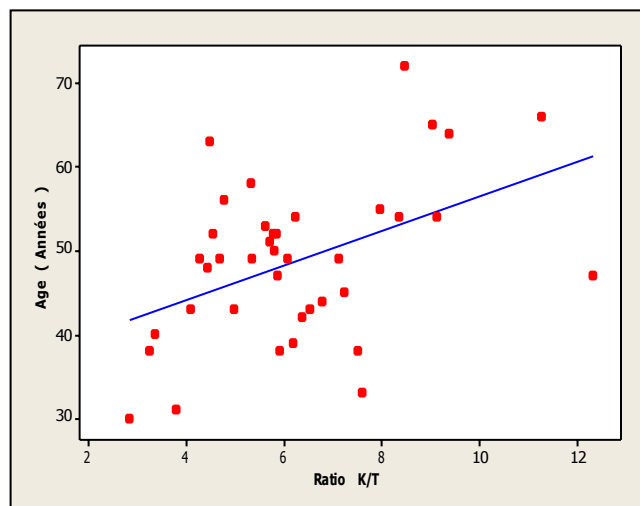


Figure 1: Correlation between K/T ratio and age in non-insulin-treated type 2 diabetics

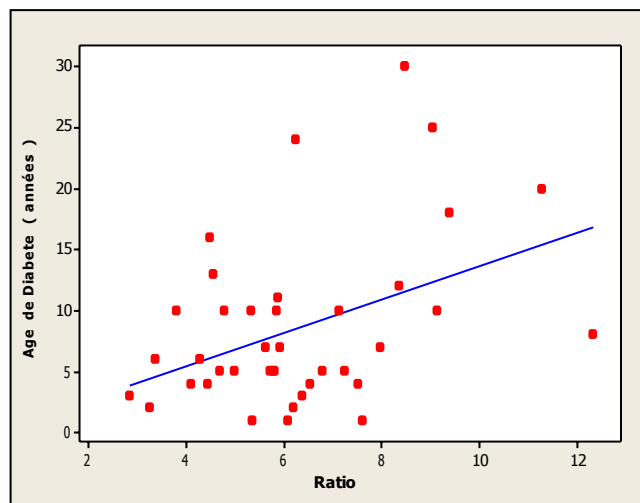


Figure 2: Correlation between K/T ratio and duration of diabetes in non-insulin-treated type 2 diabetics

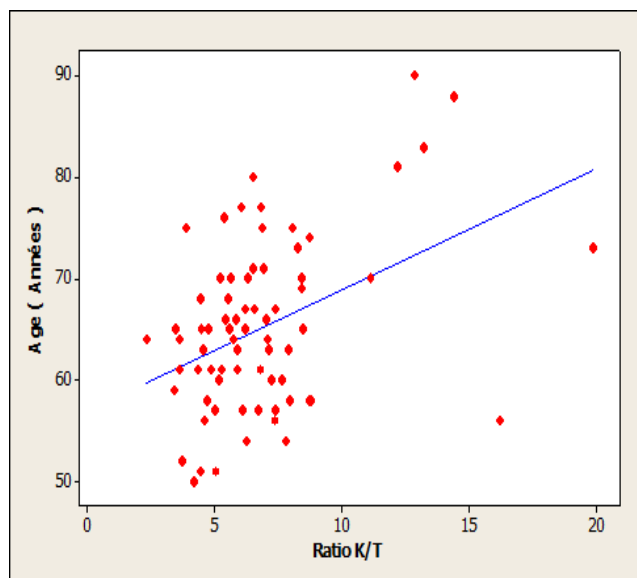


Figure 3: Correlation between K/T ratio and age in insulin-treated type 2 diabetics

In the insulin-treated type 2 diabetic group, the K/T ratio was also significantly associated positively with age ($p = 0.001$ (Figure 3), negatively with blood glucose ($r = -0.291$, $p = 0.013$), (Figure 4) and negatively with HbA1c ($r = -0.315$, $p = 0.007$) (Figure 5).

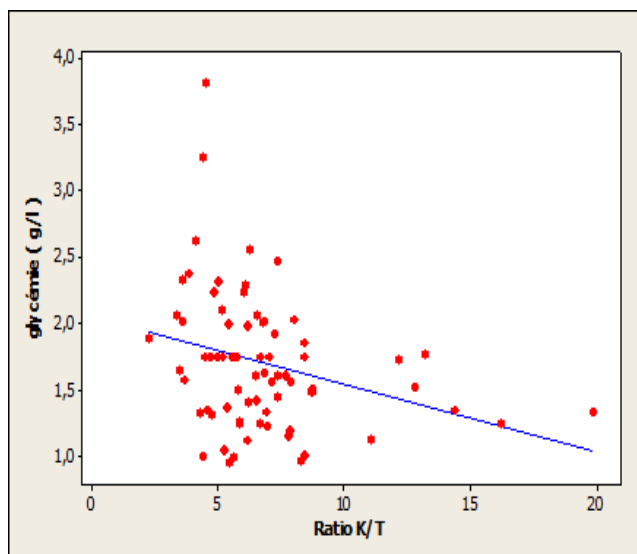


Figure 4: Correlation between blood glucose and K/T ratio in insulin-treated type 2 diabetics

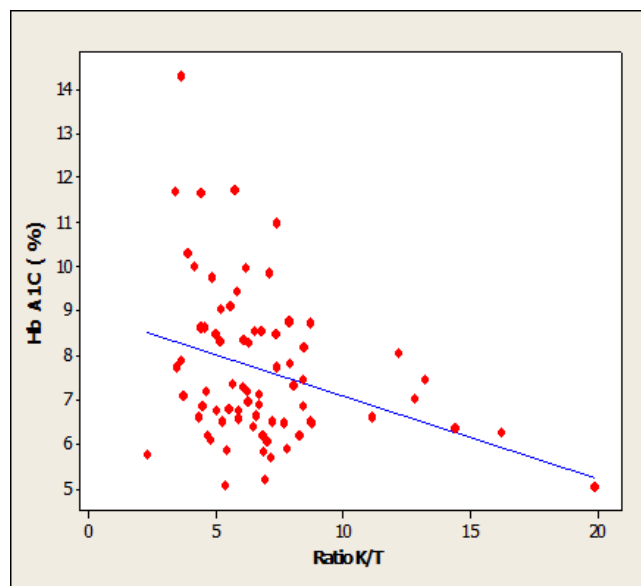


Figure 5: Correlation between HbA1C (%) and K/T ratio in insulin-treated type 2 diabetics

4. Discussion

The sparse epidemiological data on the kynurenin pathway in relation to type 2 diabetes show that high plasma K/T ratio values are associated with poor cardiovascular prognosis [16]. In our cohort of patients with type 2 diabetes, we observed that more than a quarter of patients (26%) were also hypertensive. This association has been widely reported in the literature [17], [18]. Thus, in both groups (insulin-treated and non-insulin-treated), there were more hypertensive type 2 diabetic women than men. In the literature review of on gender disparities in hypertension, higher rates were found among women in most Arab countries (22 Arab countries) [19]. A similar increase in hypertension rates among women compared to men was reported in the Pimenta E study and the study by [20], [21]. The insulin-treated men and women with type 2 diabetes in our sample had a mean age of over 60 years, which is consistent with Deo et al where the overall prevalence of hypertension and diabetes was modest, except in the 60+ age group, in which 50% were also hypertensive [22]. In the non-insulin-treated group of type 2 diabetics, the mean age was 45 to almost 50 years for both men and women. In the study by Young et al, the mean age was 61 years, although the eligible patients in this study were 30 years of age and older [23]. Furthermore, we found that increased IDO1 activity was significantly and positively associated with age in both groups. In the study by the multiple linear regression model used revealed that age accounted for 77% of the variability in the KYN / TRP ratio [24]. The majority of the type 2 diabetics in our sample were overweight or obese and had a BMI around 27 kg/m², regardless of gender and treatment (insulin-treated and non-insulin-treated). A similar profile was reported in the study by [25]. Given that obesity reduces insulin sensitivity [26] and predisposes individuals to abnormal cardiac metabolic profiles, such as increased inflammatory adipokines, insulin resistance, elevated triglycerides, decreased LDL cholesterol and risk of hypertension [27], there is an urgent need for weight management intervention. Obesity has been associated with elevated plasma RKT levels, which have not been normalized even after significant weight loss [28].

Indeed, in obesity, the expression levels of IDO1 genes increase in adipose tissue and are higher in anti-inflammatory macrophages. Simultaneously, an increase in serum Kyn and K / T ratio was observed in individuals with higher BMI (7). In our sample, all groups had elevated urea levels in contrast to normal creatinine levels. Although this remains difficult to interpret, used an ANCOVA instead of these two

parameters to examine the relationship between the KYN / TRP ratio and stages of CKD in a population of patients with CKD secondary to type 2 diabetes. The authors demonstrated that at each progression of CKD stage, despite normal creatinine levels, there was a statistically significant increase in KYN/RPR regardless of age, gender, BMI and CRP [24]. Furthermore, it seems unlikely that dietary intake would affect circulating levels of TRP and/or KYN / TRP ratio (4). These data are consistent with the results of the study, in which IDO activity increased with the severity of chronic renal failure and was negatively correlated with GFR. In addition, ODI activity was significantly increased in type 2 diabetes when the GFR was greater than 60 ml/min per 1.73 m², suggesting that ODI may be closely correlated with the pathogenesis of type 2 diabetes [10]. The lipid balance of our patients (total cholesterol, HDL cholesterol, LDL cholesterol and TG levels) does not seem to be really disturbed. In a recent review of the literature by Liu, G et al on tryptophan degradation by kynurenin in cardiovascular disease, the authors reported that IDO1 activity (via RKT) was positively associated with the early stages of atherosclerosis and an increase in the intima media thickness of the carotid artery in men and women. This finding indicates that IDO1 is a viable indicator of atherosclerosis [29]. In another aspect, understanding the mechanisms of development of type 2 diabetes (T2DM) from prediabetes remains important for the prevention and treatment of T2DM. However, the molecular mechanisms mediating the effect of inflammation on the development of T2DM from pre-diabetes remain unknown. One such mechanism may involve the kynurenin (KYN) (KP) pathway of tryptophan metabolism (TRP) (9). In our panel the link between the age of type 2 diabetes and ODI activity illustrates this well: In the group of non-insulin-treated type 2 diabetics, the Kynurenin tryptophan ratio was positively and significantly associated with the age of diabetes. The diagnosis of type 2 diabetes had been established for (IIQ) 3 to 10 years for non-insulin-treated and (IIQ) 5 to 13 years for insulin-treated patients, with a plasma TKR exceeding 6 (μmol/ μmol). Although recruitment according to the inclusion criteria (known type 2 diabetics) did not allow us to calculate the incidence, in the Rebnord et al study, over a median (IIQ) of 7.6 (6.6 to 8.7 years), a total of 173 (6.9%) new diagnoses of type 2 diabetes were identified [30]. In addition, Pedersen et al. observed an increase in the KYN / TRP ratio in diabetic patients compared to patients with normal glucose metabolism in subjects with stable angina [31].

Other interesting facts, in the insulin-treated type 2 diabetic group, the Kynurenin tryptophan ratio was significantly and negatively associated with blood glucose and HbA1c. The negative association of plasma RKT with type 2 diabetes appears to reflect primarily the elevated urinary excretion of kynurenin. In fact, both tryptophan and kynurenin are freely filtered in the glomeruli. According to the recent findings of tryptophan is efficiently reabsorbed in the proximal tubules and only a minor fraction is excreted in the urine. Reabsorption of kynurenin, on the other hand, becomes saturated, resulting in increased excreted fractions at increasing circulating concentrations [32]. This may suggest that the clearance of kynurenin is tightly regulated in order to balance the circulating concentrations. Logically, a decrease in plasma kynurenin concentration with relatively little change in plasma tryptophan concentration is in favour of an overall decrease in plasma RKT. In a large cohort of individuals with coronary artery disease, plasma and urine RKT were strongly related ($\beta = 0.45$, $p < 0.001$). The latter was predictive of type 2 diabetes mellitus. In this study, the positive association of urinary RKT with incident type 2 diabetes mellitus appears to reflect primarily the elevated urinary excretion of kynurenin [30]. Unlike most other urine point biomarkers, RKT does not require adjustment for creatinine in urine to account for dilution. This limits the possibility of confusion, as the rate of urinary creatinine excretion may be influenced by common comorbidities [33]. The exciting preliminary data presented here suggest that the accelerated metabolism of IDO1 may have significant contributions to the initiation and progression of T2DM, especially given that the development of micro and macrovascular complications may precede progression to overt type 2 diabetes (11). While several parameters such as HbA1C are established for the follow-up of type 2 diabetes, our findings that plasma RKT is useful in verifying the age and progression of type 2 diabetes were consistent with those

found in the literature where high plasma RKT levels have been associated with poor prognosis [16], with consistent results in people with coronary artery disease (16) and in the elderly [34]. Decreased plasma RKT during type 2 diabetes, as well as the high likelihood that individuals may not be identified by conventional risk factors, encourage its further evaluation for clinical application over the long term.

5. Conclusions

In this cohort of established T2DM cases, IDO enzyme activity (via plasma RKT) is a factor closely related to the progression of type 2 diabetes independently of other potential factors. The roles of the tryptophan degradation pathway and renal excretion of kynurenin in the development of T2DM should be further elucidated in order to provide new intervention strategies in the therapy of diabetes mellitus.

6. References

- [1] Donath MY, Shoelson SE. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat Rev Immunol.* 2011; 11: 98-107.
- [2] Kahn SE, Cooper ME, Del Prato S. Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present and future. *Lancet.* 2014; 383: 1068-1083.
- [3] Oxenkrug GF. Metabolic syndrome, age-related neuroendocrine disorders and dysregulation of tryptophan and kynurenin metabolism. *Ann NY Acad Sci.* 2010; 1199: 1-14.
- [4] Schrocksnadel K, Wirleitner B, Winkler C, Fuchs D. Monitoring tryptophan metabolism in chronic immune activation. *Clin Chim Acta.* 2006; 364: 82-90.
- [5] Oxenkrug GF. Cascade of kynurenin / pteridine inflammation induced by gamma interferon: implications for ageing and psychiatric and medical disorders associated with ageing. *J Transm. neuronale* 2011; 118: 75–85.
- [6] Oxenkrug G. Insulin resistance and deregulation of tryptophan-kynurenine and kynurenine-nicotinamide adenine dinucleotide metabolic pathways. *Mol Neurobiol.* 2013; 48: 294–301.
- [7] Favennec M., Hennart B., Caiazza R. A Leloire, L Yengo, M Verbanck. The kynurenin pathway is activated in human obesity and has been switched to the activation of kynurenin monooxygenase. *Obesity.* 2015; 23: 2066-2074.
- [8] Oxenkrug G, J Cornicelli, M van der Hart, J Roeser, Summergrad P. Kynurenic acid, an aryl hydrocarbon receptor ligand, is elevated in the serum of Zucker fat rats. *Integr Mol Med.* 2016; 3: 761-763.
- [9] Oxenkrug GF. Increased plasma levels of xanthurenic and kynurenic acid in type 2 diabetes. *Mol Neurobiol.* 2015; 52: 805-810.
- [10] Zhang Y, Y Ruan, Zhang P, Wang L. Increased indolamine 2,3-dioxygenase activity in type 2 diabetic nephropathy. *J Diabète compliqué.* 2017; 31: 223–227.
- [11] Ryden L, Grant PJ, Anker SD, Bern C, Cosentino F, Danchin N, The ESC guidelines on diabetes, pre-diabetes and cardiovascular disease were developed in collaboration with the EASD. *Eur Heart J.* 2013; 34: 3035-3087.

- [12] Gillett MJ. Report of the International Expert Group on the Role of the A1c Test in Diabetes Diagnosis: *Diabetes Care* 2009; 32 (7): 1327-1334. *Clin Biochem Rev.* 2009; 30: 197-200.
- [13] Kumar R, Nandhini LP, Kamalanathan S, Sahoo J, Vivekanadan M. Evidence for current diagnostic criteria of diabetes mellitus. *World J Diabetes.* 2016;7(17):396-405.
- [14] Schefold JC, Zeden J-P, Fotopoulou C, von Haehling S, Pschowski R, Hasper D, Increased indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) activity and elevated serum levels of tryptophan catabolites in patients with chronic kidney disease: a possible link between chronic inflammation and uremic symptoms. *Nephrol Dial Transplant* 2009; 24:1901-1908.
- [15] Yamada K, Miyazaki T, Shibata T, Hara N, Tsuchiya M. Simultaneous measurement of tryptophan and related compounds by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B* 2008; 867:57-61.
- [16] Pedersen ER, Middtun O, Ueland PM, Schartum-Hansen H, Seifert R, Igland J, Systemic markers of interferon-gamma-mediated immune activation and long-term prognosis in patients with stable coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011; 31:698-704.
- [17] Huang, XB, Tang, WW, Liu, Y., Hu, R., Ouyang, LY, Liu, JX, Li, XJ, Yi, and al. Prevalence of diabetes and unrecognised diabetes in hypertensive patients aged 40-79 years in south-western China. *PLoS one*, 2017. 12 (2).
- [18] Juan GP, Ruilope Luis M., Manuel L, Jaime F, Rafael O, Rafael DR, and al. Metabolism of glucose in patients with essential hypertension. *Am J Med.* 2006; 119: 318-326
- [19] Akl C, Akik C, Ghattas H, Obermeyer CM. Gender disparities in midlife hypertension: a review of the evidence on the Arab region. *The health of women in their forties.* 2017; 3(1): 1-10
- [20] Pimenta E. Hypertension chez la femme. *Hypertension research: journal officiel de la Société japonaise d'hypertension.* 2012;35(2):148-52.
- [21] Doumas M, Papademetriou V, Faselis C, Kokkinos P. Gender differences in hypertension: myths and reality. *Curr Hypertens Rep.* 2013;15(4):321-30.
- [22] Deo, MG, PV, Pawar, Kanetkar, SR and Kakade, SV. Prevalence and risk factors for hypertension and diabetes in the Katkari tribe of coastal Maharashtra. *Journal of postgraduate medicine.* 2017 .63 (2), 106-113.
- [23] Young, LA, Buse, JB, Weaver, MA, Vu, MB, Mitchell, CM, T. Blakeney, K., Grimm, J., and al, Monitor Trial Group. Self-monitoring of blood glucose levels in patients with type 2 diabetes who are not treated with insulin in the primary care phase: A randomized trial, *JAMA Internal Medicine*, 2017, 177 (7), 920-929.
- [24] Debnath, S., C. Velagapudi, L. Redus, F. Thameem, B., B. Kasinath, CE, Lorenzo, C., et al. Metabolism of Tryptophan in Patients with Chronic Kidney Disease secondary to Type 2 Diabetes: Relations to Inflammatory Markers, *International Tryptophan Research Journal: IJTR*, 2017, 10,

[25] Shu P.S., Chan Y.M., Huang S.L. Higher body mass index and lower consumption of dairy products predict poor blood glucose control in patients with type 2 diabetes in Malaysia PLoS ONE, 2017, 12 (2).

[26] Bassuk SS, Manson JE. Lifestyle and risk of cardiovascular disease and type 2 diabetes in women: A review of the epidemiologic evidence. *Am J Lifestyle Med*, 2008,2(3):191-213.

[27] Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. The Metabolic Syndrome: A New Global Definition. *Lancet*. 2005; 366,1059–62.

[28] Oxenkrug G. Inflammation inducible by gamma interferon: contribution to ageing and psychiatric disorders associated with ageing. *Ageing Dis*. 2011; 2:474-486

[29] Liu, G., S. Chen, J. Zhong, K. Teng and Y. Yin 2017. Crossover between tryptophan metabolism and cardiovascular diseases, mechanisms and therapeutic implications. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017, 1602074.

[30] Rebnord, EW, Strand, E., Middtun, Ø., Svingen, G., Christensen, M., Ueland, PM, Mellgren, G., and al. La Kynurenine: The Kynurenine: Tryptophan Ratio as a Predictor of Type 2 Diabetes Mellitus in People with Coronary Artery Disease. *Diabetologia*, 2017, 60 (9), 1712-1721.

[31] Pedersen ER, Tuseth N, Eussen SJ, Ueland PM, Strand E, Svingen GF, Middtun Ø, and al Associations of plasma kynurenines with risk of acute myocardial infarction in patients with stable angina pectoris. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015; 35:455-462

[32] Pedersen ER, Tveitevåg Svingen GF, Schartum-Hansen H, Ueland PM, Ebbing M, Nordrehaug JE, et al; Urinary excretion of kynurenine and tryptophan, cardiovascular events, and mortality after elective coronary angiography, *European Heart Journal*, Volume 34, Issue 34, 7 September 2013, Pages 2689-2696

[33] Ix JH, de Boer IH, Wassel CL, Criqui MH, Shlipak MG, Whooley MA. Urinary creatinine excretion rates and mortality in people with coronary heart disease: the study of the heart and soul. *Circulation*. 2010; 121:1295–1303.

[34] Sulo G, Vollset SE, Nygård O, Middtun Ø, Ueland PM, Eussen SJ. Neopterin and kynurenine-tryptophan ratio as predictors of coronary events in older adults, the Hordaland Health Study. *Int J Cardiol*. 2013; 168:1435–1440



This work is licensed under a Creative Commons Attribution Non-Commercial 4.0 International License.

Chapitre 4: Treatment of high blood pressure in diabetic patients and risk of undernutrition in a population in extreme Western Algeria

Chapitre 4 : Traitement de l'hypertension artérielle du sujet diabétique et risque de dénutrition dans une population de l'extrême Ouest Algérien.

Introduction

La thérapie et les conseils nutritionnels font partie intégrante du traitement et de l'autogestion du diabète .

Cependant la dénutrition est fréquemment sous-estimée chez les sujets diabétiques hypertendus, car ses manifestations cliniques sont non spécifiques.

Le «Mini Nutritionnal Assesment» (MNA) est un outil visant le dépistage de la dénutrition qui peut être utilisé au moment du diagnostic de diabète chez les hypertendus et dans le suivi du traitement.

La pathogénie de l'hypertension chez les diabétiques est complexe et fait intervenir plusieurs facteurs biologiques et environnementaux, ainsi qu'une prédisposition génétique, par conséquent, l'hypertension du diabétique présente un plus grand danger de problèmes et de complications (Campbell et al., 2011).

Bien que l'hypertension soit une pathologie fréquente chez les diabétiques (80% chez le diabète de type 2) (Diyane et al., 2013), nous ne retrouvons pas d'études qui évaluent la prévalence de la dénutrition chez cette catégorie de patients en lien avec les associations médicamenteuses.

L'objectif de la présente étude est d'évaluer les risques liés à la dénutrition chez cette catégorie de patients recrutés au CHU de Tlemcen.

Méthodes

Une étude descriptive a été réalisée sur un échantillon de 692 individus, 366 diabétiques hypertendus, et 326 hypertendus normo glycémique âgés de 50 ans et plus, recrutés au CHU de Tlemcen de janvier à juin de l'année 2018. Le recueil des données a été fait à l'aide d'un questionnaire : Le MNA. Sensible et spécifique, ce dernier est validé de façon internationale. L'exploitation des données a été réalisée à l'aide du logiciel Minitab 16.

Une étude de régression linéaire a été effectuée afin de déterminer un modèle prédictif du risque de dénutrition chez les diabétiques hypertendus. Le test (t) de Student pour la comparaison de deux moyennes et le teste du chi carré pour la comparaison de pourcentages.

Le seuil de signification statistique a été fixé à $p < 0,05$.

Résultats

Dans notre population, aucune différence significative n'a été observé entre la moyenne d'âge des sujets hypertendus diabétiques ($66 \pm 9,75$ ans) et la moyenne d'âge des sujets hypertendus non diabétiques ($65 \pm 10,2$ ans) ($p=1,91$).

L'IMC (ou indice de Quételet calculé par le poids/ taille²) moyen des sujets hypertendus diabétiques ($27 \pm 4,69$ kg/m²) est significativement (0,004) plus élevé que celui des hypertendus non diabétiques ($26 \pm 4,33$ kg/m²). Les coefficients de variation sont de 0.17 et 0.16 pour les sujets hypertendus diabétiques et les hypertendus non diabétiques respectivement, témoignant d'une répartition homogène dans les deux groupes.

Tous les patients hypertendus étaient sous la même thérapie anti hypertensive depuis au moins une année. Les pourcentages des sujets hypertendus diabétiques sous monothérapie anti hypertensive (67%) et bithérapie anti hypertensive (libre ou combinée) (33 %) se rapprochent aux pourcentages des sujets hypertendus non diabétiques avec monothérapie (68,09%) et bithérapie (31,90%) avec $p=0,804$. Les résultats de la régression montrent que le sexe, l'IMC, les ARA 2, les IEC, et l'association ARA2/D ont un effet sur le score (le risque de dénutrition).

Discussion

Un modèle statistique a été réalisé pour évaluer le risque de survenue de la dénutrition chez des sujets diabétiques hypertendus de l'extrême Ouest Algérien :

Les caractères retenus significativement liés à la dénutrition chez les hypertendus diabétiques sont : Le sexe, l'IMC, et le traitement de l'hypertension.

Dans la présente étude, les patients recrutés avaient 50 ans et plus. Cela correspond à l'âge retenu dans plusieurs études rapportées par Ferry et al en 2007 (Ferry et al., 2007) . Ainsi que le montre nos résultats , l'âge n'est pas corrélé au risque de denutrition chez les hypertendus diabétiques ainsi que chez les hypertendus non diabétiques. Les personnes âgées ne sont pas forcément denutries , plusieurs études ont permis d'identifier les situations à risque de dénutrition chez les personnes âgées sans lien avec l'âge (Alibhai et al., 2005, Ferry et al., 2012) . Ainsi l'âge pourrait être un facteur de confusion. Notre analyse retient le sexe comme facteur, indépendant de l'âge, ayant un effet sur le risque de la dénutrition ($p = 0,001$).

Dans une cohorte Chinoise de Hong Kong, parmi les facteurs de risque associés à la perte de poids étaient le sexe (Woo et al., 2001) . Nos resultats montrent aussi que L'IMC est l'une des variables les plus pertinentes pour prédire la survenue d'une dénutrition ($p = 0,000$). L'ANAES et le NICE recommandent pour le dépistage de la dénutrition chez l'adulte et

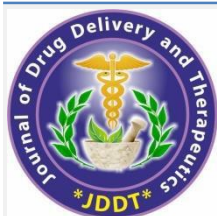
l'utilisation de l'IMC (ANAES 2003, NCCAC 2006). Les études de mortalité en population montrent qu'il existe une association « en U » entre l'IMC et les taux de mortalité pour une valeur comprise entre 20 et 27 kg/m² selon l'âge et le sexe. Une baisse de l'IMC est significativement associée à un accroissement de la mortalité. (HAS 2007) . Il est important de noter la part du traitement dans la dénutrition, le but du traitement de l'hypertension artérielle n'est pas seulement de ramener à la normale les chiffres de la pression artérielle. Mais il faut aussi éviter une dégradation du statut nutritionnel. Dans la revue d'Alibhai et al. (Alibhai, 2005), ces traitements apparaissent comme l'une des causes les plus fréquentes de perte de poids involontaire, en accord avec les recommandations de l'ESPEN (Kondrup et al., 2003).

Les hypertendus diabétiques de notre étude qui étaient traités par un ARA2, un IEC ou une association ARA2/diurétique étaient plus exposés au risque de dénutrition ($p = 0.009$, $p = 0.026$ et $p = 0.013$) . Sur le plan nutritionnel, ces deux classes d'anti hypertensives ne semblent pas dénudées d'effets secondaires et peuvent majorer, en conséquence un risque de dénutrition (Loesche et al., 1995). En bithérapie anti hypertensive, même si l'association ARA 2 et diurétique est significativement plus efficace que chacun des composants pris séparément (Melian et al., 2002), ces derniers ne sont pas sans danger et sont associés a un risque de dénutrition ($p = 0.013$). Crogan et al ont trouvé des résultats similaires. Parmi 266 résidents de plus de 65 ans vivant dans une maison de retraite, l'un des facteurs associés à une dénutrition était la prise de diurétiques ($p = 0,004$) (Crogan et al., 2002). Bien que les recommandations de L'ESC/ESH prônent les associations fixes dans le traitement de l'HTA car elles «simplifient le traitement et favorisent l'observance» (Mancia et al., 2009). Le choix des combinaisons des antihypertenseurs doit aussi tenir compte du risque de dénutrition. Les experts de la HAS mettent en garde contre les traitements médicamenteux au long cours notamment la prise de diurétiques qui expose au risque de dénutrition chez les personnes âgées (HAS 2007). L'étude CRITERE réalisée en France, a conclu que les praticiens associent préférentiellement un inhibiteur calcique plutôt qu'un diurétique, en utilisant l'atteinte rénale comme déterminant de choix chez des patients à risque cardiovasculaire (Vaisse et al., 2009).

Conclusion

La population de patients hypertendus diabétiques est une population qui présente un risque élevé de dénutrition précoce (à partir de 50 ans). Le présent travail retrouve une relation statistiquement significative entre le sexe, l'IMC, le traitement de l'HTA à savoir les ARA2, les IEC et les diurétiques. L'utilisation de ces derniers peut apporter une explication

quant aux mécanismes sous-jacents du risque accru de dénutrition observé chez les sujets hypertendus diabétiques de notre population d'étude.

Available online on 15.01.2021 at <http://jddtonline.info>

Journal of Drug Delivery and Therapeutics

Open Access to Pharmaceutical and Medical Research

© 2011-21, publisher and licensee JDDT, This is an Open Access article which permits unrestricted non-commercial use (CC BY-NC), provided the original work is properly cited



Open  Access Full Text Article



Research Article

Treatment of high blood pressure in diabetic patients and risk of undernutrition in a population in extreme Western Algeria

Hamza Nadjib Merad-boudia ^{1*}, Majda Dali-Sahi ¹, Youcef Kachekouche ¹, Nouria Dennoun-Medjati ¹, Takwa Salmi ¹, Pr Abderahim Meziane ²

(1) Department of Biology, Laboratory of Analytical Chemistry and Electrochemistry, University of Tlemcen, 13000, Algeria

(2) Department of Cardiology, University Hospital Tlemcen, 13000, Algeria

Article Info:

Article History:

Received 19 Oct 2020;
Review Completed 12 Dec 2020
Accepted 21 Dec 2020;
Available online 15 Jan 2021



Keywords:

Treatment; high blood pressure; risk of undernutrition

Cite this article as:

Merad-boudia HN, Dali-Sahi M, Kachekouche Y, Dennoun-Medjati N, Salmi T, Meziane PA, Treatment of high blood pressure in diabetic patients and risk of undernutrition in a population in extreme Western Algeria, *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*. 2021; 11(1):8-12 DOI: <http://dx.doi.org/10.22270/jddt.v11i1.4467>

*Address for Correspondence:

Hamza Nadjib Merad-boudia, Department of Biology, Laboratory of Analytical Chemistry and Electrochemistry, University of Tlemcen, 13000, Algeria

Abstract

Introduction: Assessing the risk of undernutrition in hypertensive diabetics is essential. It makes it possible to detect undernutrition for better care. The objective of our study is to describe the factors influencing this undernutrition.

Methods: A descriptive study was conducted on a sample of 366 diabetics with hypertension and 326 with normo-glycemic hypertension aged 50 years and over. Patients were enrolled at the University Hospital in Tlemcen from January to June 2018. The data collection was carried out using a questionnaire: The MNA (The Mini Nutritional Assessment).

Results: The study made it possible to establish the profile of subjects at high risk of undernutrition. In our sample, age was not correlated with risk of malnutrition in diabetic hypertensives and normo-glycemic hypertensives respectively ($p = 0.304$ and $p = 0.444$). The linear regression model uses gender as an age-independent factor that affects the risk of undernutrition ($p = 0.001$). BMI was one of the most relevant variables for predicting the occurrence of undernutrition ($p = 0.000$). Thus, diabetic hypertensive patients in our study who were treated with an Angiotensin II receptor blockers, an angiotensin converting enzyme inhibition or an ARB/diuretic combination were more at risk of undernutrition ($p = 0.009$, $p = 0.026$ and $p = 0.013$).

Conclusion: Particular attention should be paid to diabetic hypertensive subject. The treatment of hypertension in diabetics aggravates this malnutrition. Thus, a nutritional status assessment should be established in any diabetic hypertensive patient allowing appropriate therapeutic management to avoid all complications associated with undernutrition.

Introduction

Therapy and nutritional counselling are an integral part of diabetes treatment and self-management. However, undernutrition is frequently underestimated in hypertensive diabetics because its clinical manifestations are non-specific. Mini Nutritional Assessment (MNA) is a tool for screening for undernutrition that can be used at the time of diagnosis of diabetes in hypertensive patients and in treatment follow-up. The pathogenesis of hypertension in diabetics is complex and involves several biological and environmental factors, as well as a genetic predisposition, therefore, diabetic hypertension presents a greater risk of problems and complications ¹. Although hypertension is a common pathology in diabetics (80% in type 2 diabetes) ², there are no studies that assess the prevalence of undernutrition in this category of patients in association with drug combinations. The objective of this study is to assess the

risks associated with undernutrition in this category of patients recruited at the University Hospital of Tlemcen.

Methodology

A descriptive study was carried out on a sample of 692 individuals, 366 diabetics with hypertension, and 326 hypertensives with normal blood sugar aged 50 years and over, recruited at the University Hospital of Tlemcen from January to June 2018. The data collection was done using a questionnaire: The MNA. Sensitive and specific, the latter is internationally validated.

Statistical analyses:

Data processing was performed using Minitab 16 software. A linear regression study was conducted to determine a predictive model of the risk of undernutrition in hypertensive diabetics. The Student test (t) for the

comparison of two averages and the Chi-Square test for the comparison of percentages. The statistical significance level was set at $p < 0.05$.

Results

In our population, we note a sex ratio Male to Female of 0.44 for diabetic hypertensive patients, and 0.78 for non-diabetic hypertensive patients, in favour of a more pronounced female prevalence among diabetic hypertensive patients with a significantly higher percentage of diabetic hypertensive women (69%) compared to that of non-diabetic hypertensive women (56%).

The percentage of men with hypertension without diabetes (44%) is significantly higher than the percentage of men with hypertension with diabetes (31%) with a p-value of (0.000).

No significant differences were observed between the mean age of diabetic hypertensive subjects (66 ± 9.75 years) and the mean age of non-diabetic hypertensive subjects (65 ± 10.2 years) ($p=1.91$).

The mean BMI (or Quételet index calculated by weight/height²) of diabetic hypertensive subjects (27 ± 4.69 kg/m²) is significantly higher (0.004) than that of non-diabetic hypertensive subjects (26 ± 4.33 kg/m²).

The coefficients of variation are 0.17 and 0.16 for diabetic hypertensive and non-diabetic hypertensive subjects

respectively, indicating a homogeneous distribution in both groups.

All hypertensive patients had been on the same antihypertensive therapy for at least one year. The percentages of diabetic hypertensive subjects receiving antihypertensive monotherapy (67%) and dual antihypertensive therapy (free or combined) (33%) are similar to the percentages of non-diabetic hypertensive subjects receiving monotherapy (68.09%) and dual therapy (31.90%) with $p=0.804$.

For subjects taking ACE inhibitors, there is a difference close to the significance threshold ($p=0.052$), the percentage of non-diabetic hypertensive subjects treated by ACE inhibitors (15.95%) is higher than that of diabetic hypertensive subjects (10.92%).

For the other treatment classes (A2RA, BB, diuretic, calcium channel blocker, A2RA/diuretic, IEC/diuretic), there is a nearly balanced distribution between the two groups of patients (diabetic and non-diabetic hypertensive). No significant differences were observed.

The assessment of the risk of undernutrition by the MNA score (in its full version, with a total score between (17-23.5) reveals an insignificant increase in the risk of undernutrition ($p=0.274$) in non-diabetic hypertensive patients (42%) compared to diabetic hypertensive patients (38%).

Table 1: Characteristics of the study population

Parameters	Diabetic hypertensives	Non-Diabetic hypertensives	p-value
Gender	M 113 (30,87%) W 253 (69,12%)	M 143 (43,86%) W 183 (56,13%)	0,000
Age (years)	65,73±9,75	64,3±10,54	0,191
BMI (kg/m²)	26,85±4,69	25,85±4,33	0,004
Angiotensin 2 receptor antagonist	A2RA 186 (23,49%) Others 280 (76,50%)	A2RA 170 (21,47%) Others 256 (78,52%)	0,525
Beta blockers (BB)	BB 59 (16,12%) Others 307 (83,87%)	BB 53 (16,25%) Others 273 (83,74%)	0,961
Diuretics	Diuretics 13 (3,55%) Others 353 (69,44%)	Diuretics 7 (2,14%) Others 319 (97,85%)	0,271
Calcium inhibitors	Calcium inhibitors 48 (13,11%) Others 318 (86,88%)	Calcium inhibitors 40 (12,26%) Others 286 (87,73%)	0,739
ACE inhibitors (ACEI)	ACEI 40 (10,92%) Others 326 (89,07%)	ACEI 52 (15,95%) Others 274 (84,04%)	0,052
A2RA/diuretic	A2RA/ Diuretics 98 (26,77%) Others 268 (81,42%)	A2RA/ Diuretics 86 (26,38%) Others 240 (73,61%)	0,906
ACEI/diuretic	ACEI/ Diuretics 22 (6,01%) Others 344 (93,98%)	ACEI/ Diuretics 18 (5,52%) Others 308 (94,47%)	0,783
Type of therapy	Mono 246 (67,21%) Bi 120 (32,78%)	Mono 222 (68,09%) Bi 104 (31,90%)	0,804
Risk of undernutrition	R 140 (38,25%) NR 226 (61,74%)	R 138 (42,33%) NR 188 (57,66%)	0,274

The impact of age on undernutrition in normoglycemic hypertensives and diabetic hypertensives was assessed by a simple linear regression,

There is no correlation between age and undernutrition in the two groups investigated (Figures 1 and 2).

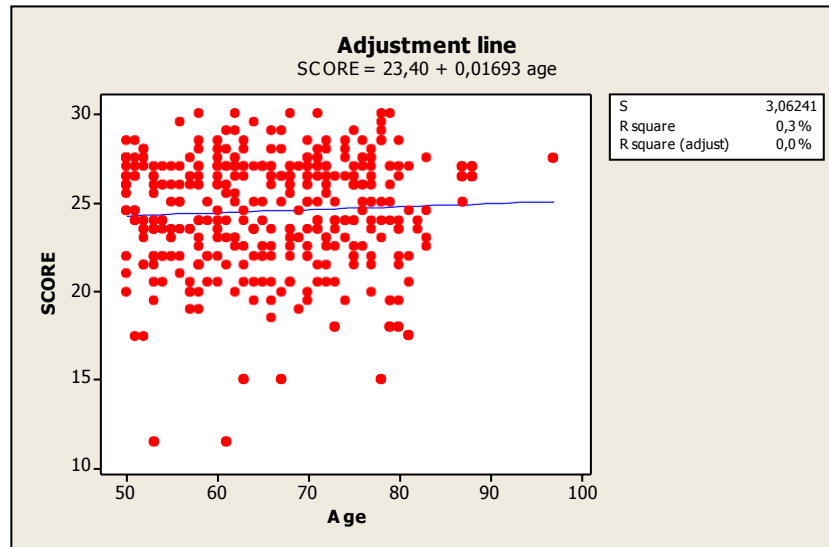


Figure 1: Correlations between undernutrition score and age in hypertensive diabetics

The simple linear regression (Figure 1) and Pearson's correlation show no correlation between undernutrition and age in diabetic hypertensive patients ($r=0.054$; $P=0.304$).

Similarly, the simple linear regression (Figure 2) and Pearson's correlation show that the score is not age correlated in non-diabetic hypertensive patients with a correlation coefficient of -0.043 and a p-value of 0.444 .

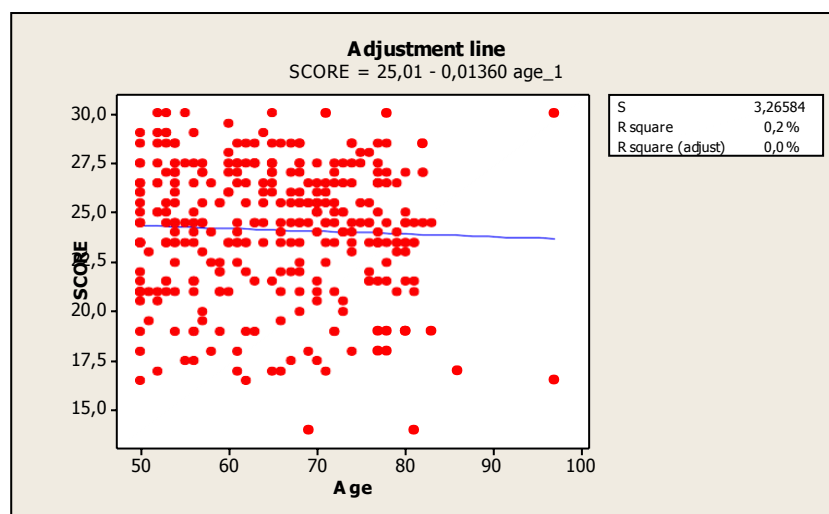


Figure 2: Correlations between score and age in non-diabetic hypertensive patients

There is no difference in most anthropometric and biological parameters between the two groups of hypertensive patients. On the other hand, the regression results (Figures 1 and 2) show that gender, BMI, A2RA, ACEI, and A2RA/D combination have an effect on the score (risk of undernutrition).

Table2: Regression variables

Predictor	Coef	Coef ErT	T	P
Constant	18,380	1,132	16,23	0,000
Sex	0,8294	0,2442	3,40	0,001
BMI	0,15775	0,02579	6,12	0,000
A2RA	1,4147	0,5422	2,61	0,009
ACEI	1,2943	0,5795	2,23	0,026
A2RA/D	1,3263	0,5335	2,49	0,013

$S = 3.05295$ $R\text{square} = 8.2\%$ $R\text{square (adjust)} = 6.8\%$.

Table 3: Analysis of variance

Source	DF	Sum of squares	CM	F	P
Regression	10	563,472	56,347	6,05	0,000
Residual error	681	6347,248	9,320		
Total	691	6910,720			

Discussion

A statistical model was developed to assess the risk of malnutrition in hypertensive diabetic subjects in extreme Western Algeria: Characteristics retained significantly related to undernutrition in hypertensive diabetics are: Sex, BMI, and the treatment of hypertension.

It is recommended, without specificity for the elderly, to screen for undernutrition through medical diagnosis and comorbidity ⁴. In this study, the patients enrolled were 50 years of age or older. This corresponds to the age used in several studies reported by Ferry et al in 2007 ⁵.

As our results show, age is not correlated with the risk of malnutrition in diabetic hypertensive patients as well as in non-diabetic hypertensive patients. Elderly people are not necessarily malnourished, several studies have identified situations at risk of undernutrition in elderly people unrelated to age^{6, 7}. Thus age could be a confounding factor. Our analysis uses sex as a factor, independent of age, that affects the risk of undernutrition ($p = 0.001$). In a Chinese cohort in Hong Kong, among the risk factors associated with weight loss were gender ⁸. Our results also show that BMI is one of the most relevant variables for predicting the occurrence of undernutrition ($p = 0.000$). ANAES and NICE recommend for the screening of adult undernutrition and the use of BMI ^{9, 10}.

Population mortality studies show that there is a "U-shaped" association between BMI and mortality rates between 20 and 27 kg/m² depending on age and sex. A decrease in BMI is significantly associated with an increase in mortality. ¹¹ It is important to note the share of treatment in undernutrition, the purpose of high blood pressure treatment is not only to restore blood pressure figures to normal. But we must also avoid deterioration in nutritional status. In the review by Alibhai et al ¹³, these treatments appear to be one of the most frequent causes of involuntary weight loss, in accordance with the recommendations of the ESPEN ¹⁴.

Diabetic hypertensive patients in our study who were treated with an A2RA, ACE inhibitor or A2RA/diuretic combination were at higher risk of undernutrition ($p = 0.009$, $p = 0.026$ and $p = 0.013$). From a nutritional point of view, these two classes of antihypertensive drugs do not seem to have no side effects and may therefore increase the risk of undernutrition ¹⁹.

In dual antihypertensive therapy, even if the combination of A2RA and diuretics is significantly more effective than each of the individual components ²⁰, the latter are not without risk and are associated with a risk of undernutrition ($p = 0.013$). Crogan et al found similar results. Among 266 residents over 65 years of age living in a retirement home, one of the factors associated with undernutrition was diuretic use ($p = 0.004$) ²¹. Although the ESC/ESH recommendations advocate fixed associations in the treatment of hypertension because they "simplify treatment and promote compliance" ²². The choice of antihypertensive

combinations must also take into account the risk of undernutrition. HAS experts warn against long-term drug treatments, particularly the use of diuretics, which puts the elderly at risk of undernutrition ¹¹. The CRITERE study conducted in France concluded that practitioners preferentially combine a calcium channel blocker rather than a diuretic, using renal impairment as the determinant of choice in patients at cardiovascular risk ²³.

Conclusion

The population of hypertensive diabetic patients is a population at high risk of early undernutrition (from age 50). This work finds a statistically significant relationship between gender, BMI, treatment of hypertension, i.e. A2RA, ACE inhibitors and diuretics. The use of the latter can provide an explanation of the underlying mechanisms of the increased risk of undernutrition observed in hypertensive diabetic subjects in our study population.

Conflict interest: No

References

- (1) Campbell NRC, Gilbert RE, Leiter LA, and al. hypertension in type 2 diabetics: Update on pharmacological treatment. Canadian Family Physician. 2011; 57(9):e347-e353.
- (2) Diyane Kh, Elmghari G, El Ansari N. Characteristics of the association of type 2 diabetes and high blood pressure in the subject aged 65 and over. Pan Afr Med D. 2013; 14:100
- (3) Newman AB, Yanez D, Harris T, Duxbury A, Enright PL, Fried LP, and al. Weight change in old age and its association with mortality. J Am Geriatr Soc ; 2001 ; 49(10):1309- 18
- (4) American Society for Parenteral and Enteral Nutrition. Guidelines for the use of parenteral and enteral nutrition in adult and pediatric patients. J Parenter Enteral Nutr ; 2002; 26(Suppl 1):1SA-138SA.
- (5) Ferry, M., Alix, E. & Brocker, P. 2007. Nutrition of the elderly person. 3rd edition, Masson, Paris.p 303 .
- (6) Alibhai SMH, Greenwood C, Payette H. An approach to the management of unintentional weight loss in elderly people. Can Med Assoc J ; 2005 ; 172(6):773-80.
- (7) Ferry M, Alix E, Brocker P, Constans T, Lesourd B, Mischlich D, and al. 2002 Nutrition of the elderly person. Paris: MASSON.
- (8) . Woo J, Ho SC, Sham A. Longitudinal changes in body mass index and body composition over 3 years and relationship to health outcomes in Hong Kong Chinese age 70 and older. J Am Geriatr Soc ; 2001 ; 49(6):737-46.
- (9) National Agency for Health Accreditation and Evaluation. 2003. Diagnostic evaluation of protein-energy malnutrition in hospitalized adults. Saint-Denis La Plaine: ANAES.
- (10) National Collaborating Centre for Acute Care. 2006. Nutrition support in adults : oral nutrition support, enteral tube feeding and parenteral nutrition. London: Royal College of Surgeons of England.
- (11) HAS. 2007. Management strategy in case of protein-energy malnutrition in the elderly [Online]. Available: http://www.hassante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/synt_hese_denutrition_personnes_agees.pdf [Accessed 15 April 2012].

- (12) Beckett, N. S., Peters, R., Fletcher, A. E., and al. Treatment of hypertension in patients 80 years of age or older. *N Engl J Med*, 2008; 358:1887-98.
- (13) Alibhai, S. M., Greenwood, C. & Payette, H. An approach to the management of unintentional weight loss in elderly people. *CMAJ*, 2005; 172:773-80.
- (14) ESPEN 2003. ESPEN guidelines for nutrition screening *Clin Nutr*, 2002; 22:415-21.
- (15) Dahlof, B., Devereux, R. B., Kjeldsen, S. E and al. Cardiovascular morbidity and mortality in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol. *Lancet*, 2002; 359:995-1003.
- (16) Lithell, H., Hansson, L., Skoug, I., and al. The Study on Cognition and Prognosis in the Elderly (SCOPE): principal results of a randomized double-blind intervention trial. *J Hypertens*, 2003; 21 :875-86.
- (17) Papademetriou, V., Farsang, C., Elmefeldt, D., and al . Stroke prevention with the angiotensin II type 1-receptor blocker candesartan in elderly patients with isolated systolic hypertension: the Study on Cognition and Prognosis in the Elderly (SCOPE). *J Am Coll Cardiol*, 2004; 44:1175-80.
- (18) ALLHAT. The Allhat Officers Coordinators for the Allhat Collaborative Research Group. Major outcomes in high-risk hypertensive patients randomized to angiotensin-converting enzyme inhibitor or calcium channel blocker vs diuretic: The antihypertensive and lipid-lowering treatment to prevent heart attack trial (allhat). *JAMA*, 2002; 288:2981-2997.
- (19) Loesche, W. J., Bromberg, J., Terpenning, M. S., and al . Xerostomia, xerogenic medications and food avoidances in selected geriatric groups. *J Am Geriatr Soc*, 1995; 43:401-7.
- (20) Melian, E. & Jarvis, B. 2002. Candesartan Cilexetil plus Hydrochlorothiazide Combination. *Drugs*, 62, 787-816.
- (21) Crogan, N. L., Corbett, C. F. & Short, R. A. The minimum data set predicting malnutrition in newly admitted nursing home residents. *Clin Nurs Res*, 2002; 11 :341-53.
- (22) Mancia, G., Laurant, S., Agabiti-rosei, E., and al Reappraisal of European guidelines on hypertension management: a European Society of Hypertension Task Force document. *J Hypertens*, 2009; 27:2121-58.
- (23) Vaisse, B., Girerd, X. & Pouchain, D. CRITERE study, Use of fixed combinations of antihypertensive agents containing an inhibitor of the renin-angiotensin system. Analysis of medical practices in France, 2009 ; p 8.

Chapitre 5 : Stereochemistry and validation of the structure of cyclooxygenase, preferred target of controversial non-steroidal anti-inflammatory drugs during the COVID 19 pandemic

Chapitre 5 : Stéréochimie et validation de la structure de la cyclo-oxygénase, cible privilégiée des anti inflammatoires non stéroïdiens controversés au cours de la pandémie au COVID 19

Introduction

La prostaglandine H synthase 2 (COX 2) est une enzyme importante dans le métabolisme de l'acide arachidonique (Patrono et Baigent, 2014). Elle est à la fois exprimée de manière constitutive dans plusieurs tissus humains (par exemple les reins et le cerveau) et induite dans divers types de cellules (y compris les monocytes / macrophages, les cellules endothéliales vasculaires ,etc ...) en réponse aux cytokines inflammatoires, et aux facteurs de croissance (Ricciotti et FitzGerald, 2011).

Les produits de l'activité COX-2 [par exemple PGE₂ et prostacycline (PGI₂)] sont impliqués dans divers processus physiologiques et physiopathologiques, y compris l'hémodynamique rénale et le contrôle de la pression artérielle, la thromborésistance endothéliale, la douleur et l'inflammation (Smyth E et al., 2011) , (Dovizio et al., 2015) .

Par conséquent, il n'est pas surprenant que les inhibiteurs de la COX-2 présentent des effets cliniques multiformes, allant d'une diminution de la douleur et de l'inflammation (Smyth E et al., 2011) à une augmentation de la pression artérielle (Patrono et Baigent, 2014), un risque accru d'événements athérotrombotiques (Bhala et al., 2013) et une diminution du risque de cancer colorectal (Dovizio et al., 2015).

Les enzymes cyclooxygénase sont des cibles pharmacologiquement importantes pour les anti-inflammatoires non stéroïdiens, tels que l'aspirine et les nouveaux inhibiteurs sélectifs de la COX-2. Une approche prudente doit être suivie lors de l'instauration des AINS pour la fièvre ou la toux liée au COVID-19 en raison du risque accru d'effets indésirables bien connus (Micallef et al., 2020) .

L'objectif de cette étude est de valider l'adhésion des modèles de la cyclooxygénase aux principes structuraux nécessaires pour l'exactitude de l'interprétation des données cristallographiques.

Méthodes

Pour étudier les propriétés stéréochimiques des différents modèles de la COX liée à un AINS ou à son substrat naturel (l'acide arachidonique), les paramètres suivants ont été utilisés : Les écarts RMS, le diagramme de Ramachandran, le facteur R libre et le clashscore.

La COX-2 est induite par l'inflammation tandis que la COX-1 est physiologique. Les différentes structures cristallines de COX-1 et COX-2 en complexe avec une myriade d'inhibiteurs et de substrats ont été visualisées sous format NGL (Rose et al., 2018) puis téléchargées à partir de la PDB (<https://www.rcsb.org/>). Les structures de la COX ont été transférées sur logiciel Discovery (Discovery Studio 2.5 (CDOCKER Dock, Dassault Systemes BIOVIA, États-Unis). Discovery Studio facilite l'examen des propriétés des grandes et des petites molécules. Les groupes de ligands co-cristallisés ont été séparés. Les molécules d'eau et les hétéroatomes ont été supprimés. Les cibles (récepteurs) ont été enregistrées sous format PDB pour être utilisées sur Molprobit. (Williams CJ, 2018)

MolProbit (<http://molprobit.biochem.duke.edu/>) s'appuie très largement sur l'analyse des affrontements interatomiques. Pour cela, le programme calcule les positions des atomes d'hydrogène et les ajoute aux fichiers de coordonnées (en remplaçant parfois les atomes H d'équitation qui pourraient déjà y être présents). Ce programme vise à vérifier l'orientation la plus probable des chaînes latérales. Une fois que ces résidus ont été placés dans leurs orientations les plus probables et que les atomes H ont été ajoutés, les contacts de tous les atomes sont analysés en détail. Les distances interatomiques rapprochées et les affrontements sont représentés graphiquement, fournissant des informations utiles pour la reconstruction des zones incriminées, ou au moins lever un drapeau rouge pour les utilisateurs des structures déposées (Williams CJ, 2018).

Le programme fournit des graphiques des angles de Ramachandran, en utilisant une base de données beaucoup plus complète. (Wlodawer, 2017). Le Java SE Java Runtime Environment (JRE) a été téléchargé à partir de www.oracle.com (la dernière version (Java SE 7u40 à partir de septembre 2013). Java est une technologie développée à l'origine par Sun Microsystems et maintenant développée et hébergée par Oracle (www.oracle.com).

Molprobit utilise Java pour afficher les informations 3D. Les rapports de validations des différentes structures cristallines ont été téléchargés à partir de la PDB en citant chaque ligand et son dépositaire. Ces rapports ont servi pour la comparaison et l'interprétation du facteur R libre et du clashscore.

Résultats

Les structures de COX liées au naproxène (3NT1: 1,73 Å) et à l'ibuprofène (4PH9: 1,81 Å) ont une résolution plus élevée. Dans le diagramme de Ramachandran, pour 4PH9 et 3LN1, 100,0% des résidus se trouvaient dans des régions autorisées. Pour le facteur R_{libre} , les valeurs de (19,8%) pour 4PH9, (20,0%) pour 3NT1 et (22,4%) pour 1CVU se situaient dans les plages attendues. Ils étaient plutôt élevés pour 3LN1, 1PXX et 4COX.

Les scores de conflit pour 3NT1 (99e centile) et 4PH9 (98e centile) se situaient au sommet des meilleures fourchettes. 4PH9 (valeurs aberrantes de sidechain: 1,5%) et 3NT1 (valeurs aberrantes de sidechain: 1,8%) ont été modélisées avec leurs rotamères préférés. En comparant toutes les métriques, 4PH9 semble être la structure cristalline la plus fine.

Discussion

Afin de minimiser les risques d'échec, les sociétés pharmaceutiques tentent en permanence d'établir la valeur d'une cible pour affecter une maladie. Ce processus s'appelle validation cible. Il existe de nombreuses méthodes pour déterminer la structure d'une protéine, et la plus courante est probablement cristallographie aux rayons X. (Maveyraud et Mourey, 2020).

La recherche et la validation de la protéine cible est une étape incontournable de la conception des médicaments basée sur la structure (Grant, 2009) . Le tracé de Ramachandran , et les différents métriques (R_{libre} , clashscore , sidechain outliers et RSRZ outliers) permettent de vérifier les propriétés stéréochimique du model (Krieger et al., 2009).

Dans la littérature , différentes autres méthodes de validation du model ont été décrites (Song et al., 2009) , (Bordoli et al., 2009) , (Potapov et al., 2010).

Toutes les entrées sur PDB doivent être rigoureusement vérifiées car elles ne constituent pas forcément une source fiable de stéréochimie (Evans, 2007) . Une fois la protéine validée. Le docking moléculaire se poursuivra en recherchant les sites d'interactions.

Nous avons utilisé molprobit, comme l'une des approches de validation de la structure . (Davis et al., 2004) , (Chen et al., 2010) . En plus de l'analyse des paramètres géométriques, MolProbit détecte les positions des atomes d'hydrogène et les additionne aux paramètres de coordonnées pour l'étude des clashes interatomiques (Wlodawer, 2017) . Il s'agit d'une nouvelle méthode de validation des structures par rapport a PROCHECK , longtemps utilisé auparavant (Laskowski et al., 1993).

L'examen des différentes entrées PDB de la COX révèle les différentes interactions avec les ligands. La plupart des interactions sont des liaisons hydrogène ou des interactions hydrophobes.

La cyclooxygénase convertit son ligand endogène l'acide arachidonique (qui est achiral) en prostaglandine G2 (qui a cinq centres chiraux) (Kiefer et al., 2000). L'inhibition de la synthèse des prostaglandines par l'indométacine est dépendante du temps et de la concentration.

Elle est progressive et fonctionnellement irréversible. La liaison étroite de l'indométacine à la cox1 nécessite le groupe carboxylique (Blobaum et Marnett, 2007). L'ibuprofène établit un total de 21 contacts avec la cyclooxygénase 2 et un 22^{ème} doublement lié à la Valine-349 et Leucine-359 (Orlando et al., 2015).

Nos résultats révèlent que 4PH9 apparaît comme la structure cristalline la plus fine. Notamment avec une valeur de R_{libre} de 19,8 % pour une résolution de 1,81 Å . Ces deux paramètres sont étroitement liés (Wlodawer et al., 2008). Molprobité place 4PH9 (Ibuprofène liée à la cox) au 99th percentile et un pourcentage de valeurs aberrantes de chaînes latérales inférieur ou égal à 2 % lui est attribué (4PH9 : sidechain outliers : 1.5 %).

L'Ibuprofène est un inhibiteur compétitif et rapidement réversible de la COX (Heidarpoor Saremi et al., 2020). Le rofécoxib effectue un total de 42 contacts avec des résidus tapissant le canal de la cyclooxygénase. (Marnett 2009).

La découverte de la structure cristalline du Diclofenac en complexe avec la COX 2 montre une liaison avec son groupe carboxylate à l'hydrogène de la Tyrosine -385 et Serine -530. (Rowlinson et al., 2003).

Diclofenac inhibe la cox de manière lente et irréversible. La modification du groupe acide carboxylique du diclofenac a donné des inhibiteurs puissants et sélectifs de la cox2 , tandis que l'incorporation d'halogènes en position 2 et 6 sur le cycle aniline inférieur influence la puissance de l'inhibition de la cyclooxygénase (Sorbera, 2002).

Comme les autres composés de la famille des acides 2-arylpropioniques des AINS , le groupe carboxylate du naproxène interagit avec Arginine-120 et Tyrosine -355 par des liaisons hydrogènes , à la base du site actif.

Le reste des interactions entre naproxene et COX étaient des contacts de Van Der Wals (Duggan et al., 2010).

Par opposition à l'ibuprofène qui inhibe rapidement et réversiblement la COX, ou à l'indométacine et diclofénac qui inhibent la COX de manière lente et fonctionnellement irréversible, le naproxène inhibe la COX lentement et de manière réversible (Bombardier et al., 2000).

La structure 3NT1 avait la meilleure résolution (1,73 Å) avec aussi 98,0% (1085/1107) de tous les résidus étaient dans des régions favorisées (98%) 100,0% (1107/1107) de tous les résidus étaient dans des régions autorisées (> 99,8%). Il n'y avait pas de valeurs aberrantes au graphique de Ramachandran. Les structures 4COX (82 outliers / 2200: 3,72%), 1CVU (8 outliers / 1107: 0,72%), 1PXX (6 outliers / 2199: 0,27%) sont tout à fait acceptables.

La démarche que nous avons utilisée pour la validation stéréochimique des modèles est très importante. Elle identifie la structure 4PH9 comme ayant la meilleure qualité. Le processus de validation utilisé est crucial pour garantir la qualité du modèle. De tels tests devraient être utilisés avant le raffinement de la structure. (Wlodawer, 2017)

Ainsi la réussite d'un docking moléculaire nécessite en premier lieu la validation de la cible. Des recherches très récentes ont tenté d'établir un lien entre la physiopathologie de l'infection au COVID 19 et les inhibiteurs de la COX-2 (Baghaki et al., 2020).

Le potentiel thérapeutique de ces derniers autant que modulateur immunitaire n'a pas été clairement établi (Ong et al., 2020).

L'utilisation des anti inflammatoires non stéroïdiens pourrait augmenter la régulation de l'enzyme de conversion de l'angiotensine 2 (ACE2), le récepteur d'entrée cellulaire (Zhou et al., 2020), (Fang et al., 2020), et avoir un lien direct avec la réplication du SRAS-Cov 2 à travers la signalisation COX/PGE2 (Raaben et al., 2007).

La cyclooxygénase 2 était effectivement induite par l'infection au COVID 19 mais n'affectait pas l'entrée ou la réplication virale. (Chen et al., 2020).

Conclusion

Compte tenu du rôle de la cyclooxygénase dans la physiopathologie liée à l'infection au COVID 19. D'anciennes et de nouvelles thérapeutiques peuvent être proposées ou contre indiquées. Les études *in silico* permettent de simuler l'interaction de la COX avec ces

dernières. Cependant, les entrées sur PDB doivent être rigoureusement vérifiées car elles ne constituent pas forcément une source fiable de stéréochimie.

Pour une meilleure compréhension de cette cible nous proposons une méthode informatique pratique pour vérifier l'adhésion des modèles aux principes structurels établis pour garantir leur qualité. Il s'agit d'une étape incontournable dans la conception des médicaments basés sur la structure.



Stereochemistry and validation of the structure of cyclooxygenase, preferred target of controversial non-steroidal anti-inflammatory drugs during the COVID 19 pandemic

Hamza Nadjib Merad-boudia¹, Majda Dali-Sahi¹, Nouria Dennouni-Medjati¹

¹Department of Biology, Laboratory of Analytical Chemistry and Electrochemistry, University of Tlemcen, 13000, Algeria

Address for Correspondence: Hamza Nadjib Merad-Boudia, Department of Biology, Laboratory of Analytical Chemistry and Electrochemistry, University of Tlemcen, 13000, Algeria

E-mail: mbhnaguib@yahoo.fr

Disclosure statement: *The authors have no conflicts of interest.*

Abstract:

During COVID-19 infection, the scarce published data on nonsteroidal anti-inflammatory drugs is very controversial. In the literature, several models of cyclooxygenase, their preferred target, have been identified. The aim is to study their stereochemistry and validate the best structure. PDB entries were viewed using Discovery Studio 2.5 software. MolProbit was used for stereochemical analysis. The structures of COX bound to Naproxen (3NT1: 1.73 Å) and Ibuprofen (4PH9: 1.81Å) are of higher resolution. In the Ramachandran diagram, for 4PH9 and 3LN1, 100.0% of the residues were in allowed regions. For the Rlibre factor the values of (19.8%) for 4PH9, (20.0%) for 3NT1 and (22.4%) for 1CVU were within the expected ranges. They were rather high for 3LN1, 1PXX and 4COX. The clashscores for 3NT1 (99th percentile) and 4PH9 (98th percentile) were at the top of the best ranges. 4PH9 (sidechain outliers: 1.5%) and 3NT1 (sidechain outliers: 1.8%) were modeled with their preferred rotamers. By comparing all metrics, 4PH9 appears to be the finest crystal structure. PDB entries do not necessarily constitute a reliable source of stereochemistry. Our study made it possible to verify the adherence of the models to the structural principles established to guarantee their quality. This is an essential step in the design of structure-based drugs.

Keywords: Stereochemistry, validation, cyclooxygenase, non-steroidal anti-inflammatory drugs, COVID 19

INTRODUCTION

Prostaglandin H synthase 2 (COX 2) is an important enzyme in the metabolism of arachidonic acid (1). It is both constitutively expressed in several human tissues (eg kidneys and brain) and induced in various cell types (including monocytes / macrophages, vascular endothelial cells, etc.) in response to cytokines inflammatory, and growth factors (2). The products of COX-2 activity [eg PGE2 and prostacyclin (PGI2)] are involved in various physiological and pathophysiological processes, including renal hemodynamics and blood pressure control, endothelial thromboresistance, pain and inflammation (3), (4). Therefore, it is not surprising that COX-2 inhibitors exhibit multifaceted clinical effects, ranging from decreased pain and inflammation (3) to increased pressure. blood pressure (Patrono and al. 2014), an increased risk of atherothrombotic events (5) and a decreased risk of colorectal cancer (4). The crystal structures of cyclooxygenase (COX) isoforms are quite structurally homologous and consistent with high sequence identity (about 60%). The COX monomer consists of three structural domains: an epidermal growth factor-like N-terminal domain, a membrane binding domain of about 48 amino acids which anchors the protein to a leaflet of the lipid bilayer, and a large C-terminal globular catalytic domain with the COX active site which hosts the substrate or inhibitors and the peroxidase which contains the heme cofactor. These sites are distinct but interconnected functionally and structurally (6). Each COX isoform is a structural homodimer which functions as a

heterodimer. One subunit, containing the required heme prosthetic group, acts as a catalytic site, while the other serves as an allosteric site (7). Previous evidence suggests that inhibitors may act at one or both sites, depending on the structure and concentration of the inhibitor (8). Cyclooxygenase enzymes are pharmacologically important targets for nonsteroidal anti-inflammatory drugs, such as aspirin and new selective COX-2 inhibitors. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs bind tightly to a single COX-2 dimer monomer and allosterically inhibit oxygenation of the substrate in the partner monomer (8), (9). The first evidence that COX inhibition affects the risk of cardiovascular disease was found by large-scale studies examining gastrointestinal outcomes as a primary endpoint. Rofecoxib was withdrawn from the market in 2004 following the results of the Adenomatous Polyp PRevention On Vioxx (APPROVe) study, showing that patients taking rofecoxib were twice as likely to have thromboembolic events compared to a group on placebo (10). In COVID-19 infection, the rare published data on NSAIDs cited in relation to the increased risk of mortality or the need for respiratory assistance are highly controversial (11), (12), (13). These studies taken individually are biased (14). Nevertheless, a cautious approach should be followed when initiating NSAIDs for fever or cough associated with COVID-19 due to the increased risk of well-known adverse reactions of NSAIDs in the specific setting of COVID-19 in addition to the risk of worsening the disease (14). The objective of this study is to validate the adherence of

cyclooxygenase models to structural principles necessary for the accuracy of interpretation of crystallographic data.

Methods

To study the stereochemical properties of the different models of COX bounded to NSAID or to its natural substrate (arachidonic acid), the following parameters were used: RMS deviations, Ramachandran diagram, free R factor and clashscore. COX-2 is induced by inflammation while COX-1 is physiological. The different crystal structures of COX-1 and COX-2 in complex with a myriad of inhibitors and substrates were visualized in NGL format (15) then downloaded from the PDB (<https://www.rcsb.org/>). The COX structures were transferred to Discovery software (Discovery Studio 2.5 (CDOCKER Dock, Dassault Systemes BIOVIA, United States). Discovery Studio makes it easy to examine the properties of large and small molecules. The groups of co-crystallized ligands were separated. Water molecules and heteroatoms have been removed. The targets (receptors) were saved in PDB format for use on Molprobit (16).

MolProbit (<http://molprobit.biochem.duke.edu/>) is largely based on the analysis of interatomic clashes. For this, the program calculates the positions of the hydrogen atoms and adds them to the coordinate files (sometimes replacing the riding H

atoms that might already be present there). This program aims to verify the most probable orientation of the side chains. Once these residues have been placed in their most likely orientations and the H atoms have been added, the contacts of all the atoms are analyzed in detail. Close interatomic distances and clashes are graphically represented, providing useful information for reconstructing offending areas, or at least raising a red flag for users of the deposited structures (16). The program provides graphs of Ramachandran angles, using a much more complete database. (17). The Java SE Java Runtime Environment (JRE) was downloaded from www.oracle.com (the latest version (Java SE 7u40 as of September 2013). Java is a technology originally developed by Sun Microsystems and now developed and hosted by Oracle (www.oracle.com) Molprobit uses Java to display 3D information. The validation reports of the different crystal structures were downloaded from the PDB citing each ligand and its depository. These reports were used for the comparison and interpretation of the free R factor and the clashscore.

Results

In the literature, several crystal structures of COX-1 and COX-2 in complex with a myriad of inhibitors and substrates have been identified: With arachidonic acid (their physiological substrate), classic NSAIDs such as Diclofenac, Naproxen as well as coxibs such as celecoxib. (Table 1).

Table 1: Experimental data of crystal structures of ligands-COX-2

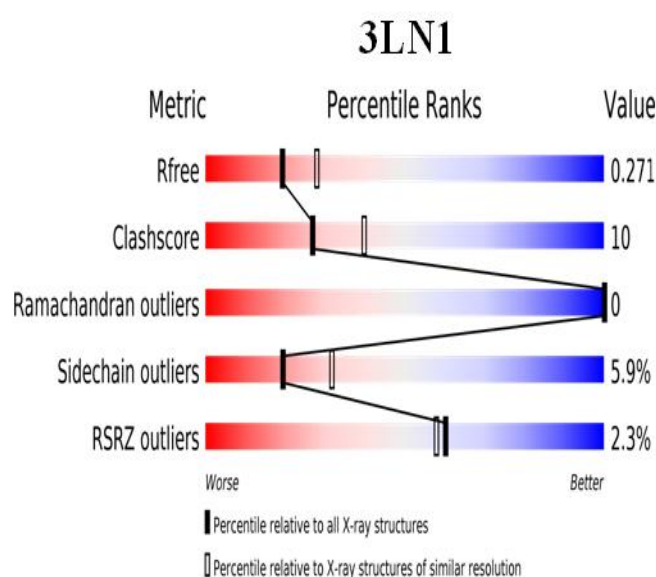
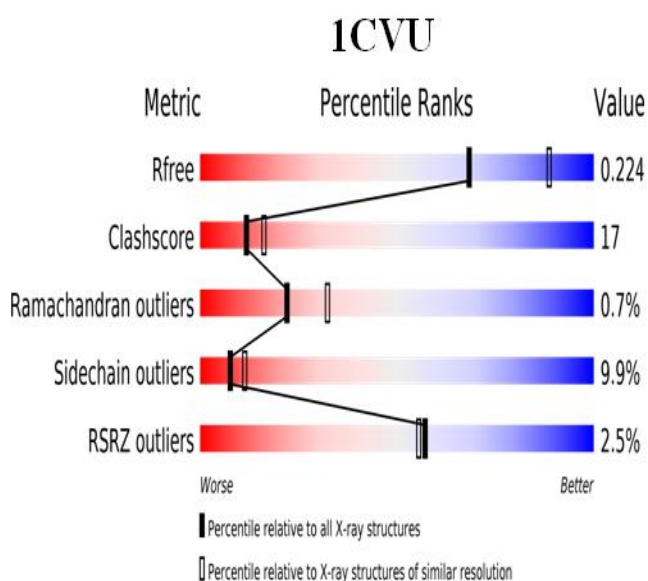
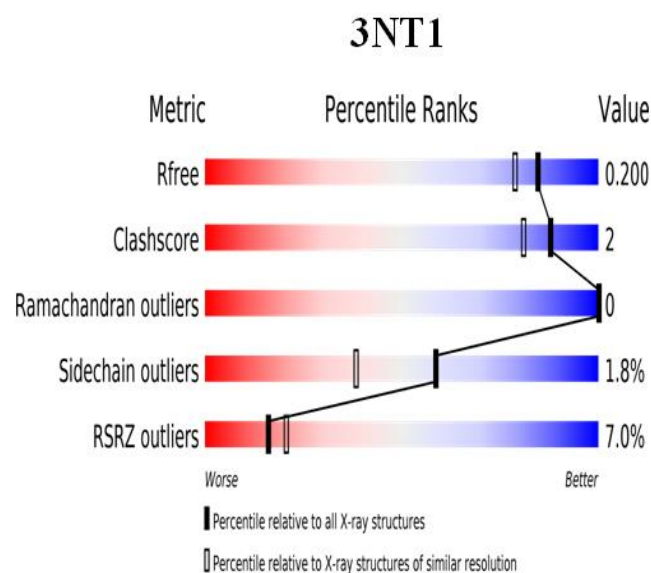
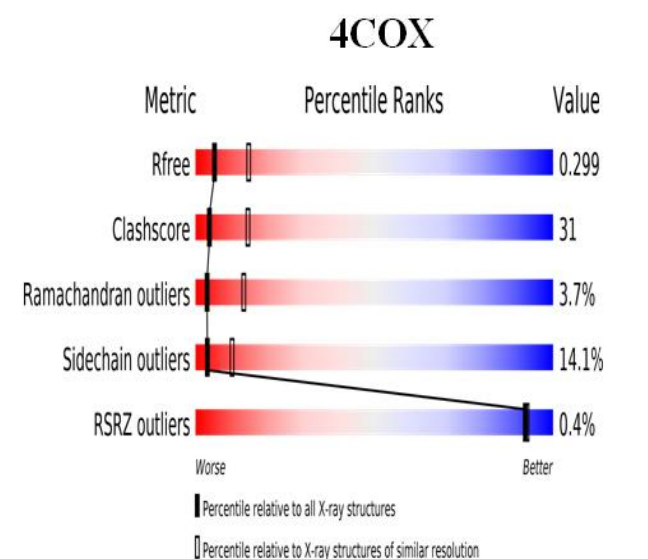
Author/ Reference	ID PDB	Ligand	resolution	R-Value Free	R-Value Work	R-Value Observed
(Kurumbail, 1996) (18)	4COX	indométacin	2,90 Å	0.309	0.219	0.219
(Kiefer et al., 2000) (19)	1CVU	Arachidonic Acid	2,40 Å	0.235	0.204	Not determined
(Rowlinson et al., 2003) (20)	1PXX	Diclofenac	2,90 Å	0.302	0.354	Not determined
(Duggan et al., 2010) (21)	3NT1	Naproxen	1,73 Å	0.186	0.167	0.168
(Wang et al., 2010) (22)	3LN1	Célécoxib	2,40 Å	0.264	0.232	0.235
(Orlando, 2015) (23)	4PH9	Ibuprofen	1,81 Å	0.197	0.160	0.162

In standard stereochemistry, RMSD deviations indicate how far a refined structure deviates from targets. The allowed deviation from the targets depends on the resolution of the diffraction data used in the refinement. According to the LibreTexts Project Living Chemistry Libraries (powered by MindTouch and supported by the UC Davis Library and the California State University and Merlot Learning Program) (<https://chem.libretexts.org/>). 2.05 Å is the median resolution of X-ray crystallographic results in the Protein Database (135762 May 19, 2019). High digital values of resolution, such as 4 Å, mean poor resolution, while low digital values, such as 1.5 Å, mean good resolution. The structures of COX bound to Naproxen (3NT1: 1.73 Å) and Ibuprofen (4PH9: 1.81Å) are of higher resolution and likely resolve finer structural details. The backbone and most sidechains should be clear. The other structures (between 2.40 and 2.90 Å) have a less fine but rather good resolution. (Table 1).

The skeleton and many sidechains should be clear. (PROTOPEDIA resolution values interpretation guide: http://proteopedia.org/wiki/index.php/Main_Page).

The Ramachandran diagram is one of the main methods for validating protein structures offered on the basis of X-ray crystallographic data. The graph compares the dihedral angles selected in each amino acid found in the proposed protein. The key dihedral angles for each amino acid are located along the protein backbone and are labeled ϕ (phi), ψ (psi), and ω (omega). To repeat, each amino acid residue provides three rotating bonds and three distinct dihedral angles to the backbone of a peptide chain. In theory, all dihedral angles can vary in value from -180° to $+180^\circ$. In practice, within a protein, the dihedral angles tend to fall within well-defined and much narrower ranges. A residue is considered an outlier of the Ramachandran plot if the combination of its torsion angles ϕ and ψ is unusual, as evaluated by MolProbity, (24). The Ramachandran outlier score for an entry is calculated as the percentage of Ramachandran outliers out of the total number of

residuals in the entry for which the outlier assessment is available (Figure 1). Although tracking dihedral angles in a protein can seem complex, a Ramachandran plot makes the process very simple. In the process of validating the structure assigned to a protein, amino acids that fall outside the expected shaded regions of a Ramachandran graph are of most concern. If a graph has too many of these outliers, the structure of the protein may be incorrectly assigned. In general, any protein with more than 5% of its amino acids as outliers should be treated with caution. Consequently, the structures 4COX (82 outliers / 2200: 3.72%), 1CVU (8 outliers / 1107: 0.72%), 1PXX (6 outliers / 2199: 0.27%), are quite acceptable. For structures 3NT1 (no outliers / 1107), 4PHP (no outliers / 1122), 3LN1 (no outliers / 2200), 100.0% of all residues were found in allowed regions ($> 99.8\%$). The percentage of residues in the favored regions (98%) was 98.0%, 97.7% and 96.4%, respectively.



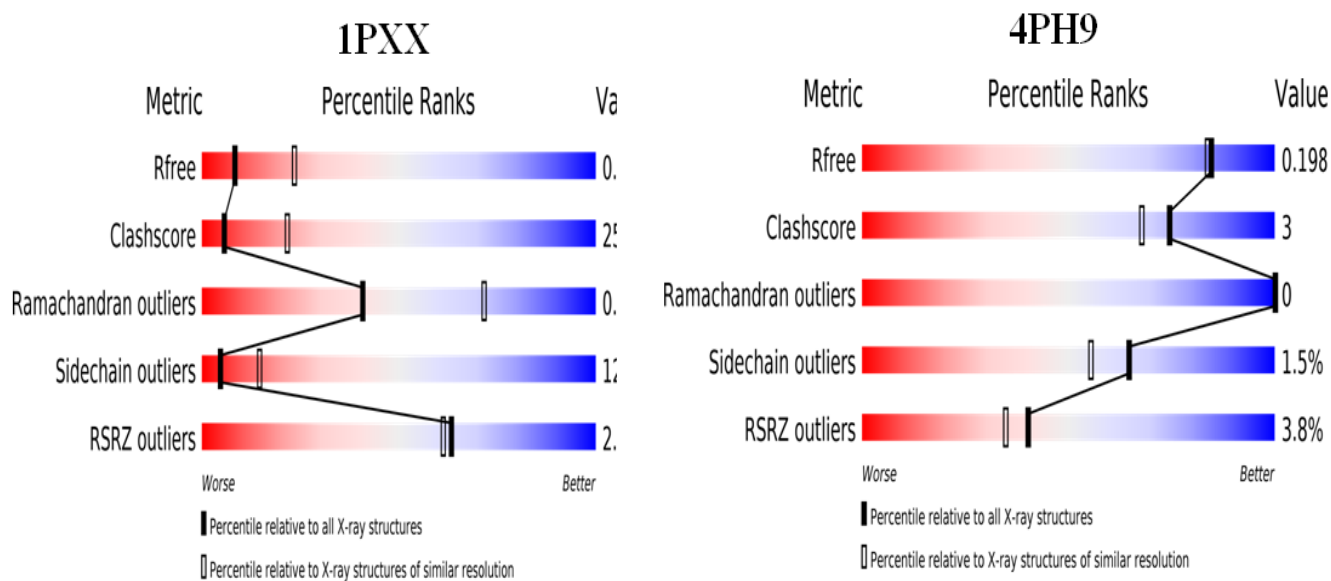


Figure 2: The metrics shown in the “slider” charts (see examples below) compare several important overall quality indicators for these structures with those of previously filed PDB entries. The comparison is carried out by calculating the percentile rank, that is to say the percentage of entries equal to or less than this structure in terms of quality indicator. The overall percentile ranks (black vertical boxes) are calculated relative to all radiographic structures available in the PDB archive until December 28, 2016. The resolution-specific percentile ranks (white vertical boxes) are calculated relative to a sub - set of X - ray entries in the same subset of the PDB archive, but considering only entries with a resolution comparable to this entry (<https://www.wwpdb.org/validation/2016/Xray Validation Report Help>)

The free R factor which appears in the metrics of all structures on PDB represents the relative deviation of the observed and calculated factors of the structures (by analogy with the conventional R factor) (17). The quoted value comes from a recalculation by the DCC program (25). In exceptionally good cases free R can be as low as 10% for the best refined structures using ultra high resolution data; it is generally around 20-25% for medium resolution structures, but should not exceed 30% even for structures refined compared to low resolution data (17). Thus the values of (19.8%) for 4PH9 (1.81 Å), (20.0%) for 3NT1 (1.73 Å) and (22.4%) for 1CVU (2.40 Å), are within the expected ranges. It is rather high (27.1%) for 3LN1 (2.40 Å), (29.4%) for 1PXX (2.90 Å) and (29.9%) for 4COX (2.90 Å). For now, the 3NT1 and 4PHP structures are neck and neck and bring together the best qualities. Another parameter also allows you to compare the different structures: The Clashscore. This score is derived from the number of pairs of atoms in the model that are unusually close to each other. It is calculated by MolProbity, (24) and expressed in number of conflicts of this type per thousand atoms. The clashscore of 2 for 3NT1 (molprobity clashscore: 1.69, 99th percentile) and 3 for 4PH9 (clashscore: 3.44, 98th percentile) are at the top of the best ranges, which appear to be independent of resolution. For 3LN1 and 1CVU, it is 10 and 17 (around the 90th - 93th percentile) respectively. This parameter is certainly less good and the clashscores of 25 for 1PXX and 31 for 4COX are more or less acceptable (between 80 th percentile and 85 th percentile) (good molrobity clashscore: Percentile \geq 66). Molprobity cautions against structures between the 33 th and 66 th percentile. Watch out for structures below the 33 th percentile. Protein side chains

primarily adopt certain (combinations of) preferred twist angle values (called rotamers or rotameric conformers), as do their backbone twist angles (as assessed in Ramachandran's analysis). MolProbity considers the sidechain conformation of a residue to be an outlier if its set of torsion angles are not similar to any preferred combination. The side chain outlier score is calculated as the percentage of residues with unusual side chain conformation out of the total number of residues for which the assessment is available. A percentage of side chain outliers less than or equal to 2% indicates that the residues were modeled with their preferred rotamers and were not distorted during the refinement process (17). This is only the case for 4PH9 (sidechain outliers: 1.5%) and 3NT1 (sidechain outliers: 1.8%). The real-space R-value (RSR) is a measure of how well a part of an atomic model (in this case, a residue) fits with data in real space (26). The RSR Z-score (RSRZ) is a standardization of the RSR specific to a type of residue and a resolution bin (27). RSRZ is calculated only for standard amino acids and nucleotides in protein, DNA and RNA chains. A residue is considered an RSRZ outlier if its RSRZ value is greater than 2. The RSRZ outlier score as shown in the slider graph is calculated as the percentage of RSRZ outliers relative to the total number of residuals for which RSRZ was calculated. This is calculated by the EDS (Electron-Density Server) component of the validation pipeline which is a reimplementations of the software used by the Uppsala EDS Server (27). 4COX, 1CVU, 1PXX, 3LN1 all have an outliers RSRZ percentage of less than 2%. 4PH9: RSRZ = 3.8% and 3NT1: RSRZ = 7%. By comparing the five metric parameters, they are favorable to 4PH9 in 3 metrics: RSRZ outliers, sidechain outliers and R free,

comparable to 2 metrics of 3NT1: Ramachandran outliers and clashscore. 4PH9 therefore appears to be the finest crystal structure.

Discussion

In order to minimize the chances of failure, pharmaceutical companies are constantly trying to establish the value of a target to affect a disease. This process is called target validation - ensuring that binding of the target with a molecule will provide therapeutic benefits in humans. Drugs interfere with proteins (enzymes or receptors) in biological pathways. Proteins, especially the functional parts of a protein, have a well-defined structure. Because a protein has a specific shape, drugs that work on the protein need a specific shape, a form that complements the form of protein. Therefore, if we can determine the shape of a protein (target), we can better understand the ideal shape and structure of a possible drug. This idea is very important for targeted drug discovery. There are many methods for determining the structure of a protein, and the most common is probably X-ray crystallography(28) . Enzymes are proteins that facilitate or catalyze the conversion of one molecule to another. COX 2 (ID: 1.14.99.1) catalyzes the reaction:

Hydrogen donor + arachidonic acid + 2O₂ = hydrogen acceptor + H₂O + PGH₂ (29). It is the target of several inhibitors to different degrees: Diclofenac (ID: 3033, MF: C₁₄H₁₁Cl₂NO₂, IUPAC Name: 2- [2- (2,6-dichloroanilino) phenyl] acetic acid): pIC₅₀ = 7.7 (30) , celecoxib (ID: 2662, MF: C₁₇H₁₄F₃N₃O₂S, IUPAC Name: 4- [5- (4-methylphenyl) -3- (trifluoromethyl) pyrazol-1-yl] benzenesulfonamide): pIC₅₀ = 6.5 - 8.7 (31), (32) , naproxene (ID: 156391, MF: C₁₄H₁₄O₃, IUPAC Name: (2S) -2- (6-methoxynaphthalen-2-yl) propanoic acid): pIC₅₀ = 5.6 (33) , ibuprofen (ID: 3672, MF: C₁₃H₁₈O₂, IUPAC Name: 2-[4- (2-methylpropyl) phenyl] propanoic acid): pIC₅₀ = 5.9 (34) , indometacin (ID: 3715, MF: C₁₉H₁₆ClNO₄, IUPAC Name: 2-[1- (4-chlorobenzoyl) -5-methoxy-2-methylindol-3-yl] acetic acid): pIC₅₀ = 5.6 (32) ... and many others . (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). Cyclooxygenase enzymes are included in GtoImmuPdb because they are involved in the production of inflammatory mediators and are long-standing anti-inflammatory targets. The role of COX-2 in immunology is reviewed by Adams *et al.* (35). Research and validation of the target protein is an essential step in the design of structure-based drugs (36) . The Ramachandran plot, and the different metrics (Rlibre, clashscore, sidechain outliers and RSRZ outliers) make it possible to verify the stereochemical properties of the model (37). In the literature, various other model validation methods have been described (38) , (39), (40) . All entries on PDB must be rigorously verified as it does not necessarily constitute a reliable source of stereochemistry (41) . Once the protein has been validated. Molecular docking will continue by researching the sites of interactions. We used molprobit, as one of the structure validation approaches. (42) , (24). In addition to analyzing geometric parameters, MolProbit detects the positions of hydrogen atoms and adds them to coordinate parameters for the study of interatomic clashes (17). This is a new method of validating structures against

PROCHECK, which has been used for a long time (43) . Examination of the different PDB entries of COX reveals the different interactions with the ligands. Most of the interactions are hydrogen bonds or hydrophobic interactions. Cyclooxygenase converts its endogenous ligand arachidonic acid (which is achiral) to prostaglandin G₂ (which has five chiral centers) (19). Inhibition of prostaglandin synthesis by indomethacin is dependent on time and concentration. It is progressive and functionally irreversible. The tight binding of indometacin to cox1 requires the carboxylic group (30). Ibuprofen established a total of 21 contacts with cyclooxygenase 2 and a 22nd doubly linked to Valine-349 and Leucine-359 (23). Our results reveal that 4PH9 appears to be the finest crystal structure. In particular with R_{free} value of 19.8% for a resolution of 1.81 Å. These two parameters are closely related (44). Molprobit places 4PH9 (Cox-bound Ibuprofen) at the 99th percentile and is assigned a percentage of side chain outliers less than or equal to 2% (4PH9: sidechain outliers: 1.5%). Ibuprofen is a competitive and severely reversible COX inhibitor (45). Rofecoxib makes a total of 42 contacts with residues lining the cyclooxygenase channel. (46) . The discovery of the crystal structure of Diclofenac in complex with COX 2 shows a bond with its carboxylate group to the hydrogen of Tyrosine -385 and Serine -530. (20). Diclofenac inhibits cox slowly and irreversibly. Modification of the carboxylic acid group of diclofenac gave potent and selective inhibitors of cox2, while incorporation of halogens at position 2 and 6 on the lower aniline ring influences the potency of cyclooxygenase inhibition (47) . Like the other compounds of the 2-arylpropionic acid family of NSAIDs, the carboxylate group of naproxene interacts with Arginine-120 and Tyrosine -355 via hydrogen bonds at the base of the active site. The rest of the interactions between naproxene and COX were Van Der Waals contacts (48). As opposed to ibuprofen which rapidly and reversibly inhibits cox, or indometacin and diclofenac which inhibit cox slowly and functionally irreversibly, naproxene inhibits cox slowly and reversibly (49). The 3NT1 structure had the best resolution (1.73 Å) with also 98.0% (1085/1107) of all residues were in favored (98%) regions 100.0% (1107/1107) of all residues were in allowed (> 99.8%) regions. There were no outliers to Ramachandran's plot. The structures 4COX (82 outliers / 2200: 3.72%), 1CVU (8 outliers / 1107: 0.72%), 1PXX (6 outliers / 2199: 0.27%), are entirely acceptable. The approach that we used for the stereochemical validation of the models is very important. It identifies the 4PH9 structure as having the best quality. The validation process used is crucial to guarantee the quality of the model. Such tests should be used before refinement of the structure.(17) . Thus the success of a molecular docking first requires the validation of the target. Very recent research has attempted to establish a link between the pathophysiology of COVID 19 infection and COX-2 inhibitors (50) . The therapeutic potential of these derivatives as much as an immune modulator has not been clearly established (51). The use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs may increase the regulation of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2), the cell entry receptor (52), (53), and have a direct link with the replication of SARS-Cov 2 through COX / PGE₂

signaling (54). Cyclooxygenase 2 was indeed induced by COVID 19 infection but did not affect viral entry or replication. (55).

Conclusion

Given the role of cyclooxygenase in the pathophysiology of COVID 19 infection. Both old and new therapies may be offered or contraindicated. In silico studies can simulate the interaction of COX with these. However, entries on PDB must be rigorously verified because they do not necessarily constitute a reliable source of stereochemistry. For a better understanding of this target we propose a practical computer method to verify the adherence of models to the structural principles established to guarantee their quality. This is an essential step in the design of structure-based drugs.

References

1. Patrono C, Baigent C. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the heart. *Circulation*. 2014 Feb 25;129(8):907-16. PubMed PMID: 24566065. Epub 2014/02/26. eng.
2. Ricciotti E, FitzGerald GA. Prostaglandins and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011 May;31(5):986-1000. PubMed PMID: 21508345. Pubmed Central PMCID: PMC3081099. Epub 2011/04/22. eng.
3. Smyth E, Grosser T, GA. F. Lipid-derived autacoids: eicosanoids and platelet-activating factor In: Goodman & Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. Goodman & Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 12th Edn, eds Brunton L, Chabner B, Knollman B McGraw-Hill New York. 2011:937-57.
4. Dovizio M, Alberti S, Sacco A, Guillem-Llobat P, Schiavone S, Maier TJ, Steinhilber D, Patrignani P. Novel insights into the regulation of cyclooxygenase-2 expression by platelet-cancer cell cross-talk. *Biochem Soc Trans*. 2015 Aug;43(4):707-14. PubMed PMID: 26551717. Pubmed Central PMCID: PMC4613509. Epub 2015/11/10. eng.
5. Bhalra N, Emberson J, Merhi A, Abramson S, Arber N, Baron JA, Bombardier C, Cannon C, Farkouh ME, FitzGerald GA, Goss P, Halls H, Hawk E, Hawkey C, Hennekens C, Hochberg M, Holland LE, Kearney PM, Laine L, Lanasa A, Lance P, Laupacis A, Oates J, Patrono C, Schnitzer TJ, Solomon S, Tugwell P, Wilson K, Wittes J, Baigent C. Vascular and upper gastrointestinal effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs: meta-analyses of individual participant data from randomised trials. *Lancet (London, England)*. 2013 Aug 31;382(9894):769-79. PubMed PMID: 23726390. Pubmed Central PMCID: PMC3778977. Epub 2013/06/04. eng.
6. Garavito RM, Malkowski MG, DeWitt DL. The structures of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2002 Aug;68-69:129-52. PubMed PMID: 12432914. Epub 2002/11/16. eng.
7. Mitchener MM, Hermanson DJ, Shockley EM, Brown HA, Lindsley CW, Reese J, Rouzer CA, Lopez CF, Marnett LJ. Competition and allostery govern substrate selectivity of cyclooxygenase-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2015;112(40):12366-71.
8. Dong L, Sharma NP, Jurban BJ, Smith WL. Pre-existent asymmetry in the human cyclooxygenase-2 sequence homodimer. *Journal of Biological Chemistry*. 2013;288(40):28641-55.
9. Duggan KC, Hermanson DJ, Musee J, Prusakiewicz JJ, Scheib JL, Carter BD, Banerjee S, Oates JA, Marnett LJ. (R)-Profens are substrate-selective inhibitors of endocannabinoid oxygenation by COX-2. *Nat Chem Biol*. 2011 Nov;7(11):803-9. PubMed PMID: 22053353. Pubmed Central PMCID: PMC3298755. Epub 2011/11/05. eng.
10. Fitzgerald GA. Coxibs and cardiovascular disease. *The New England journal of medicine*. 2004 Oct 21;351(17):1709-11. PubMed PMID: 15470192. Epub 2004/10/08. eng.
11. Moore N. No arguments for extra risk from ibuprofen in SARS-COV2 infection. *Therapies*. 2020.
12. Rinott E, Kozler E, Shapira Y, Bar-Haim A, Youngster I. Ibuprofen use and clinical outcomes in COVID-19 patients. *Clinical Microbiology and Infection*. 2020.
13. Castro VM, Ross RA, McBride SM, Perlis RH. Identifying common pharmacotherapies associated with reduced COVID-19 morbidity using electronic health records. *medRxiv*. 2020.
14. Micallef J, Soeiro T, Jonville-Béra A-P. COVID-19 and NSAIDs: Primum non nocere. *Therapie*. 2020 Sep-Oct;75(5):514-5. PubMed PMID: 32839015. Epub 07/22. eng.
15. Rose AS, Bradley AR, Valasatava Y, Duarte JM, Prlić A, Rose PW. NGL viewer: web-based molecular graphics for large complexes. *Bioinformatics*. 2018;34(21):3755-8.
16. Williams CJ HB, Headd JJ, Moriarty NW, Chen VB, Jain S, Prisant MG Lewis SM, Videau LL, Keedy DA, Deis LN, Arendall WB III, V Verma, Snoeyink JS, Adams PD, Lovell SC, Richardson JS, Richardson DC. " MolProbity: More and better reference data for improved all-atom structure validation ". *Protein Science*. 2018;27: 293-315.
17. Wlodawer A. Stereochemistry and Validation of Macromolecular Structures. *Methods Mol Biol*. 2017;1607:595-610. PubMed PMID: 28573590. eng.
18. Kurumbail RG, Stevens AM, Gierse JK, McDonald JJ, Stegeman RA, Pak JY, Gildehaus D, Miyashiro JM, Penning TD, Seibert K, Isakson PC, Stallings WC. Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature*. 1996 Dec 19-26;384(6610):644-8. PubMed PMID: 8967954. Epub 1996/12/19. eng.
19. Kiefer JR, Pawlitz JL, Moreland KT, Stegeman RA, Hood WF, Gierse JK, Stevens AM, Goodwin DC, Rowlinson SW, Marnett LJ, Stallings WC, Kurumbail RG. Structural insights into the stereochemistry of the cyclooxygenase reaction. *Nature*. 2000 May 4;405(6782):97-101. PubMed PMID: 10811226. Epub 2000/05/16. eng.
20. Rowlinson SW, Kiefer JR, Prusakiewicz JJ, Pawlitz JL, Kozak KR, Kalgutkar AS, Stallings WC, Kurumbail RG, Marnett LJ. A novel mechanism of cyclooxygenase-2 inhibition involving interactions with Ser-530 and Tyr-385.

- J Biol Chem. 2003 Nov 14;278(46):45763-9. PubMed PMID: 12925531. Epub 2003/08/20. eng.
21. Duggan KC, Walters MJ, Musee J, Harp JM, Kiefer JR, Oates JA, Marnett LJ. Molecular basis for cyclooxygenase inhibition by the non-steroidal anti-inflammatory drug naproxen. *Journal of biological chemistry*. 2010;285(45):34950-9.
 22. Wang JL, Limburg D, Graneto MJ, Springer J, Hamper JRB, Liao S, Pawlitz JL, Kurumbail RG, Maziasz T, Talley JJ. The novel benzopyran class of selective cyclooxygenase-2 inhibitors. Part 2: the second clinical candidate having a shorter and favorable human half-life. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2010;20(23):7159-63.
 23. Orlando BJ, Lucido MJ, Malkowski MG. The structure of ibuprofen bound to cyclooxygenase-2. *J Struct Biol*. 2015;189(1):62-6. PubMed PMID: 25463020. Epub 11/25. eng.
 24. Chen VB AW, Headd jj , Keedy DA , Immormino RM , Kapral GJ , Murray LW , Richardson JS , Richardson DC. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallographica Section D STRUCTURAL BIOLOGY*. 2010;D66:12-21.
 25. Yang H PE, Westbrook J.D , Young J, Berman H.M , Burley S.K. DCC: a Swiss army knife for structure factor analysis and validation. *J Appl Cryst*. 2016 (49):1081-4.
 26. Jones A.T ZJY, Cowan S.W , Kjeldgaard M. Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Crystallographica Section A*. 1991 (A47):, 110-9.
 27. Kleywegt G.J HMR, Zou .J, Taylor T.C, Wählby.A , Jones.T.A. The Uppsala Electron-Density Server. *Acta Crystallographica Section D STRUCTURAL BIOLOGY*. 2004 (D60,):2240-9.
 28. Maveyraud L, Mourey L. Protein X-ray Crystallography and Drug Discovery. *Molecules*. 2020;25(5):1030. PubMed PMID: 32106588. eng.
 29. Izzo A.A. MJA. Eicosanoid turnover (version 2019.5) in the IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology Database. *IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology CITE*. 2019;(5).
 30. Blobaum AL, Marnett LJ. Structural and functional basis of cyclooxygenase inhibition. *J Med Chem*. 2007 Apr 5;50(7):1425-41. PubMed PMID: 17341061. Epub 2007/03/08. eng.
 31. Black WC, Brideau C, Chan CC, Charleson S, Cromlish W, Gordon R, Grimm EL, Hughes G, Leger S, Li CS, Riendeau D, Thérien M, Wang Z, Xu LJ, Prasit P. 3,4-Diaryl-5-hydroxyfuranones: highly selective inhibitors of cyclooxygenase-2 with aqueous solubility. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2003 Mar 24;13(6):1195-8. PubMed PMID: 12643942. Epub 2003/03/20. eng.
 32. Kassab SE, Khedr MA, Ali HI, Abdalla MM. Discovery of new indomethacin-based analogs with potentially selective cyclooxygenase-2 inhibition and observed diminishing to PGE2 activities. *European journal of medicinal chemistry*. 2017 Dec 1;141:306-21. PubMed PMID: 29031075. Epub 2017/10/17. eng.
 33. Kolasa T, Brooks CD, Rodriques KE, Summers JB, Dellaria JF, Hulkower KI, Bouska J, Bell RL, Carter GW. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as scaffolds for the design of 5-lipoxygenase inhibitors. *J Med Chem*. 1997 Feb 28;40(5):819-24. PubMed PMID: 9057869. Epub 1997/02/28. eng.
 34. Viegas A, Manso J, Corvo MC, Marques MM, Cabrita EJ. Binding of ibuprofen, ketorolac, and diclofenac to COX-1 and COX-2 studied by saturation transfer difference NMR. *J Med Chem*. 2011 Dec 22;54(24):8555-62. PubMed PMID: 22091869. Epub 2011/11/19. eng.
 35. Adams JL SJ, Srinivasan R, Hoos A. . Big opportunities for small molecules in immuno-oncology. *Nat Rev Drug Discov.* 2015;14((9)): 603-22.
 36. Grant MA. Protein structure prediction in structure-based ligand design and virtual screening. *Combinatorial chemistry & high throughput screening*. 2009 Dec;12(10):940-60. PubMed PMID: 20025561. Epub 2009/12/23. eng.
 37. Krieger E, Joo K, Lee J, Lee J, Raman S, Thompson J, Tyka M, Baker D, Karplus K. Improving physical realism, stereochemistry, and side-chain accuracy in homology modeling: Four approaches that performed well in CASP8. *Proteins*. 2009;77 Suppl 9(Suppl 9):114-22. PubMed PMID: 19768677. Pubmed Central PMCID: PMC2922016. Epub 2009/09/22. eng.
 38. Song CM, Lim SJ, Tong JC. Recent advances in computer-aided drug design. *Briefings in bioinformatics*. 2009 Sep;10(5):579-91. PubMed PMID: 19433475. Epub 2009/05/13. eng.
 39. Bordoli L, Kiefer F, Arnold K, Benkert P, Battey J, Schwede T. Protein structure homology modeling using SWISS-MODEL workspace. *Nature protocols*. 2009;4(1):1-13. PubMed PMID: 19131951. Epub 2009/01/10. eng.
 40. Potapov V, Cohen M, Inbar Y, Schreiber G. Protein structure modelling and evaluation based on a 4-distance description of side-chain interactions. *BMC bioinformatics*. 2010 Jul 12;11:374. PubMed PMID: 20624289. Pubmed Central PMCID: PMC2912888. Epub 2010/07/14. eng.
 41. Evans PR. An introduction to stereochemical restraints. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2007;63(Pt 1):58-61. PubMed PMID: 17164527. Epub 12/13. eng.
 42. Davis IW, Murray LW, Richardson JS, Richardson DC. MOLPROBITY: structure validation and all-atom contact analysis for nucleic acids and their complexes. *Nucleic acids research*. 2004 Jul 1;32(Web Server issue):W615-9. PubMed PMID: 15215462. Pubmed Central PMCID: PMC441536. Epub 2004/06/25. eng.
 43. Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS, Thornton JM. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of applied crystallography*. 1993;26(2):283-91.
 44. Wlodawer A, Minor W, Dauter Z, Jaskolski M. Protein crystallography for non-crystallographers, or how to get the best (but not more) from published macromolecular structures. *The FEBS journal*. 2008 Jan;275(1):1-21.

- PubMed PMID: 18034855. Pubmed Central PMCID: PMC4465431. Epub 2007/11/24. eng.
45. Heidarpoor Saremi L, Ebrahimi A, Lagzian M. Identification of new potential cyclooxygenase-2 inhibitors: insight from high throughput virtual screening of 18 million compounds combined with molecular dynamic simulation and quantum mechanics. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 2020:1-18.
 46. Marnett LJ. The COXIB experience: a look in the rearview mirror. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2009;49:265-90. PubMed PMID: 18851701. Epub 2008/10/15. eng.
 47. Sorbera LC, J .; Bayes, M .; Silvestre, JS Lumiracoxib. *Drugs Future*. 2002;27:740-7.
 48. Duggan KC, Walters MJ, Musee J, Harp JM, Kiefer JR, Oates JA, Marnett LJ. Molecular basis for cyclooxygenase inhibition by the non-steroidal anti-inflammatory drug naproxen. *J Biol Chem*. 2010;285(45):34950-9. PubMed PMID: 20810665. Epub 09/01. eng.
 49. Bombardier C, Laine L, Reicin A, Shapiro D, Burgos-Vargas R, Davis B, Day R, Ferraz MB, Hawkey CJ, Hochberg MC, Kvien TK, Schnitzer TJ. Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis. VIGOR Study Group. *The New England journal of medicine*. 2000 Nov 23;343(21):1520-8, 2 p following 8. PubMed PMID: 11087881. Epub 2000/11/23. eng.
 50. Baghaki S, Yalcin CE, Baghaki HS, Aydin SY, Daghan B, Yavuz E. COX2 inhibition in the treatment of COVID-19: Review of literature to propose repositioning of celecoxib for randomized controlled studies. *Int J Infect Dis*. 2020;101:29-32. PubMed PMID: 33007455. eng.
 51. Ong SWX, Tan WYT, Chan Y-H, Fong S-W, Renia L, Ng LF, Leo Y-S, Lye DC, Young BE. Safety and potential efficacy of cyclooxygenase-2 inhibitors in coronavirus disease 2019. *Clin Transl Immunology*. 2020;9(7):e1159-e. PubMed PMID: 32728438. eng.
 52. Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, Si HR, Zhu Y, Li B, Huang CL, Chen HD, Chen J, Luo Y, Guo H, Jiang RD, Liu MQ, Chen Y, Shen XR, Wang X, Zheng XS, Zhao K, Chen QJ, Deng F, Liu LL, Yan B, Zhan FX, Wang YY, Xiao GF, Shi ZL. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 2020 Mar;579(7798):270-3. PubMed PMID: 32015507. Pubmed Central PMCID: PMC7095418. Epub 2020/02/06. eng.
 53. Fang L, Karakiulakis G, Roth M. Are patients with hypertension and diabetes mellitus at increased risk for COVID-19 infection? *The Lancet Respiratory medicine*. 2020 Apr;8(4):e21. PubMed PMID: 32171062. Pubmed Central PMCID: PMC7118626. Epub 2020/03/15. eng.
 54. Raaben M, Einerhand AW, Taminiou LJ, van Houdt M, Bouma J, Raatgeep RH, Büller HA, de Haan CA, Rossen JW. Cyclooxygenase activity is important for efficient replication of mouse hepatitis virus at an early stage of infection. *Virology journal*. 2007 Jun 7;4:55. PubMed PMID: 17555580. Pubmed Central PMCID: PMC1892777. Epub 2007/06/09. eng.
 55. Chen JS, Alfajaro MM, Wei J, Chow RD, Filler RB, Eisenbarth SC, Wilen CB. Cyclooxygenase-2 is induced by SARS-CoV-2 infection but does not affect viral entry or replication. *bioRxiv*. 2020:2020.09.24.312769. PubMed PMID: 32995789. eng.

Chapitre 6 : In silico study: Assessment of the inhibition of cyclo-oxygenase 2 by ibuprofen by validating molecular docking and cardiovascular effects reported during the COVID 19 pandemic

Chapitre 6 : Etude in silico : Evaluation de l'inhibition de la cyclo-oxygénase 2 par l'ibuprofène par un docking moléculaire de validation et effets cardio- vasculaires rapportés au cours de la pandémie COVID 19

Introduction

L'utilisation de l'ibuprofène au cours de l'infection COVID 19 a été prohibée. En cause, des formes sévères rapportées chez de jeunes patients qui n'avaient aucun problème de santé après avoir utilisé des anti-inflammatoires non stéroïdiens (Jour 2020).

Des études antérieures ont montré une évolution compliquée avec une incidence accrue d'emphysème, de complication pulmonaire et de séjour prolongé en unité de soins intensifs lorsque des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) étaient utilisés chez des patients atteints de pneumonie (Voiriot, Philippot et al. 2019).

Les effets secondaires cardiovasculaires liés aux AINS ont déjà été rapportés notamment l'hypertension, l'insuffisance cardiaque et l'insuffisance rénale. (Karsh 2006).

Les coxibs ont été développés en tant que solution alternative à la toxicité gastro-intestinale des AINS. Malheureusement, un risque accru d'épisodes cardiovasculaires a été observé avec tous les coxibs et, lorsque les données étaient disponibles, avec les AINS traditionnels tels que le diclofénac et l'ibuprofène (Gislason et al., 2006).

Ces risques ont donné lieu à une réévaluation de ces thérapies traditionnelles. C'est pourquoi on ne peut plus sous-estimer les risques des inhibiteurs de la cyclo-oxygénase, qu'il s'agisse d'AINS traditionnels ou de coxibs. De plus, les risques ne se limitent pas à une utilisation à long terme; des épisodes cardiovasculaires indésirables cliniquement graves ont été rapportés au cours des premiers jours de traitement. (Karsh 2006).

Au vu des débats scientifiques animés par des chercheurs du monde entier sur le rapport bénéfice /risque l'objectif est d'évaluer l'inhibition de la cyclo-oxygénase 2 par l'ibuprofène par un docking moléculaire de validation

Matériels et méthodes

La structure cristallographique aux rayons X de l'ibuprofène lié à la cyclooxygénase-2 (4PH9) (de *Mus musculus*) a été obtenue auprès de la Protein Data Bank (PDB) (<http://www.rcsb.org>) à une résolution $< 3,00 \text{ \AA}$ (résolution: $1,81 \text{ \AA}$, valeur R libre: 0,197, valeur R travail: 0,160, valeur R observée: 0,162).

Ce fichier n'est pas directement utilisé par les outils Autodock 1.5.6, il a d'abord été visualisé à l'aide de Discovery Studio Visualizer version 2.5.5.. (Discovery Studio 2.5 (CDOCKER Dock, Dassault Systemes BIOVIA, États-Unis). Les molécules d'eau, ligands et autres hétéroatomes ont été éliminés des molécules de protéines.

Ces structures cristallographiques ont été conservées sans aucun traitement pour l'ancrage moléculaire. Les fichiers PDB des protéines ont été efficacement préparés à l'aide de l'AutoDock / Vina (Molecular Graphics Lab, Le plugin Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA) et enregistré en tant que fichiers pdbqt. Les hydrogènes polaires et les charges Kollman ont été ajoutés.

La structure 3D de Ligand (Ibuprofen) a été téléchargée à partir de la base de données Drugbank (<https://www.drugbank.ca/>): Numéro d'accès DB01050. Les liaisons de torsion ont été vérifiées. Ligand a été enregistré dans le même dossier d'ancrage au format pdbqt. Les charges ont ensuite été ajoutées.

Les calculs d'amarrage ont été effectués à l'aide des paramètres standard par défaut d'AutoDock Vina. Le site actif a été placé dans une boîte cubique $40 \times 50 \times 40$ Å au centre géométrique de l'ensemble de résidus flexibles sélectionnés, qui a 0,375 Å comme espacement des points de la grille. Les valeurs de l'écart moyen quadratique (RMSD) entre l'amarrage et les poses initiales ont été calculées.

Les meilleures poses résultantes ont été classées en fonction des scores Vina (kcal / mol). évalué par les énergies libres de liaison (score S, kcal / mol) et les interactions de liaisons entre l'atome de ligand et les résidus du site actif.

Résultat

L'arrimage moléculaire a été choisi comme discrimination de première intention de l'interaction ibuprofen-COX2 en tant que structure procédure de discrimination basée sur la prédiction in silico des concurrents putatifs (Li et al., 2017).

L'ibuprofène a été identifié dans la poche du site de liaison de l'enzyme COX2. Le complexe formé par Ibuprofène (pose1) -COX 2 du modèle expérimental de Orlando et al a la valeur énergétique très faible et donne un score d'amarrage (Affinité: -7,3 (kcal / mol) avec un écart quadratique moyen de (RMSD = 23,884).

Discussion

Les cyclooxygénases sont des homodimères fonctionnels. Dans nos travaux, le site actif a été identifié dans la chaîne A de *cox2* dans la structure *cox2* liée à l'ibuprofène. Nos simulations n'ont impliqué qu'un seul monomère, comme certains travaux (Cukier et al., 2002), ou d'autres qui se sont concentrés sur un fragment encore plus petit de la protéine, comme le domaine de liaison à la membrane (Nina et al., 2000) ou le domaine de liaison à la membrane et les hélices comprenant le site actif de la cyclooxygénase (García-Nieto et al., 2000).

De plus, des études antérieures ont indiqué que de nombreux AINS différents (y compris l'IBP) se lient étroitement à un seul monomère du dimère COX-2 et allostériquement inhibent l'oxygénation du substrat dans le monomère partenaire (Dong et al., 2011), (Duggan et al., 2011).

Les résultats de notre docking confirment ceux retrouvés par Orlando et al sur le plan expérimental. Orlando et al ont identifié l'ibuprofène dans une zone de l'enzyme entre l'ouverture du canal du substrat et le sommet du site actif. (Orlando, 2015).

En examinant les résultats gastro-intestinaux comme critère principal, des preuves préliminaires ont mis en évidence le lien entre l'inhibition de la COX et le risque de maladie cardiovasculaire. L'essai VioXX chez patients atteints de polyarthrite rhumatoïde traités par Rofecoxib étaient cinq fois plus susceptibles de présenter un infarctus du myocarde que les patients sous anti inflammatoires non sélectif inhibiteur Naproxen (Bombardier et al., 2000). A la suite des résultats de l'étude Adenomatous Polyp PRevention On Vioxx (APPROVe), Le rofécoxib a été retiré du marché en 2004 (Baron, Sandler et al. 2008).

Une méta-analyse de 280 essais d'anti inflammatoires non stéroïdiens versus placebo a montré que le naproxène à forte dose était associé à un risque, bien que faible d'événements vasculaires (Bhala, 2013).

Par ailleurs le risque de maladies cardio vasculaires n'était pas égal pour tous les inhibiteurs de la COX-2. Des questions subsistaient également sur la dose et la durée d'utilisation des anti inflammatoires non stéroïdiens associés à un risque élevé de maladies cardiovasculaires.

Conclusion

Notre docking a validé les résultats expérimentaux connus en pratique courante concernant l'inhibition de la cyclo oxygenase par l'ibuprofène.

Le docking moléculaire devient une étape incontournable dans la découverte des médicaments pour que de nouveaux ligands exogènes soient identifiés

In silico study: Assessment of the inhibition of cyclo-oxygenase 2 by ibuprofen by validating molecular docking and cardiovascular effects reported during the COVID 19 pandemic

Hamza Nadjib Merad-Boudia, Majda Dali-Sahi, Baya Guermouche, Nouria Dennoun-Medjati

Department of Biology, Analytical Chemistry and Electrochemistry laboratory,
Abou bekr Belkaid University, Tlemcen, 13000, Algeria
Email: mbhnaguib@yahoo.fr

Abstract – Introduction The Covid 19 pandemic has put the cardiovascular risk incurred when using nonsteroidal anti-inflammatory drugs at the heart of the discussion. Based on the information currently available, WHO does not recommend the use of ibuprofen. The objective is to evaluate the inhibition of cyclo-oxygenase 2 by ibuprofen by validating molecular docking.

Method The crystallographic structure of ibuprofen bound to cyclooxygenase-2 was obtained from the Protein Data Bank (PDB) at a resolution <3.00 Å.

The receiver was visualized using Discovery Studio Visualizer version 2.5.5. It was efficiently prepared using AutoDock / Vina software.

The 3D structure of Ligand (Ibuprofen) was downloaded from the Drugbank database (<https://www.drugbank.ca/>): Accession number DB01050

Results Molecular docking was chosen as the first-line discrimination of the ibuprofen-COX2 interaction for the in silico study of putative competitors. The complex formed by Ibuprofen-COX 2 from the experimental model gives a docking score (Affinity: -7.3 (kcal / mol) with a mean square deviation of (RMSD = 23.884).

Conclusion The evaluation of the inhibition of cyclo-oxygenase 2 by ibuprofen was validated by molecular docking. Cardiovascular effects already reported in patients treated with traditional non-steroidal anti-inflammatory drugs and coxibs have been observed in patients with COVID 19. Molecular docking becomes an essential step in drug discovery to explore other drug targets

Keywords: Cyclooxygenase-2, Ibuprofen, Molecular docking, Covid 19

1. Introduction

The use of ibuprofen during COVID 19 infection has been prohibited. Severe forms reported in young patients who had no health problems after using nonsteroidal anti-inflammatory drugs (Day 2020)

Several previous studies have shown a complicated course with an increased incidence of empyema, lung cavitation, and prolonged intensive care unit stay when nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) were used in patients with pneumonia (Voiriot and al. 2019).

Cardiovascular side effects associated with NSAIDs have been previously reported including hypertension, heart failure and kidney failure (Karsh 2006).

Coxibs were developed as an alternative solution to the gastrointestinal toxicity of NSAIDs. Unfortunately, an increased risk of cardiovascular episodes has been observed with all coxibs and, where data were available, with traditional NSAIDs such as diclofenac and ibuprofen (Gislason and al. 2006). These risks have led to a re-evaluation of these traditional therapies.

This is why we can no longer underestimate the risks of cyclo-oxygenase inhibitors, whether traditional NSAIDs or coxibs. Moreover, the risks are not limited to long-term use; clinically serious adverse cardiovascular episodes have been reported during the first days of treatment (Karsh 2006)

In view of the scientific debates led by researchers around the world on the report, the objective is to evaluate the inhibition of cyclo-oxygenase 2 by ibuprofen through a molecular docking validation.

2. Materials and methods

To locate the sites of interaction, four different categories of COX inhibitors have been documented by Smith et al., (Smith and al. 2011). Several works have determined the crystal structures of COX-1 and COX-2 in complex with inhibitors and substrates (Kurumbail and al. 1996), (Vecchio and al. 2011). Selinsky et al determined the crystal structure of IBP bound to COX-1. (Selinsky and al. 2001).

However, the analgesic and anti-inflammatory effects of ibuprofen (IBP) arise from inhibition of COX-2 rather than COX-1 (Laneuville and al. 1994). In order to compare the mode of binding of IBP to COX-2 versus COX-1, and to reveal a possible mechanism of selective substrate inhibition mediated by IBP, Orlando et al determined the crystal structure murine (mu) COX-2 complexed with Ibuprofen (IBP) (Orlando and al. 2015). The coordinates of the X-ray crystals of COX-2 in complex with ibuprofen (IBP formula: C₁₃ H₁₈ O₂) (PDB ID: 4PH9) in Table 1, 2, 3, were extracted from the RCSB database (<http://www.rcsb.org/pdb>). This is selected for modeling studies.

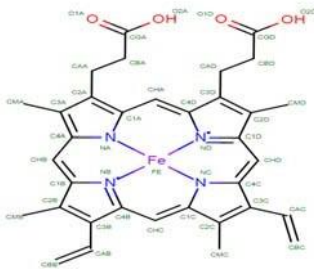
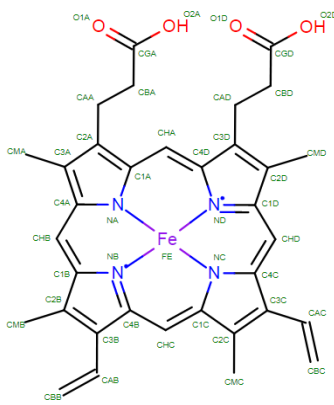
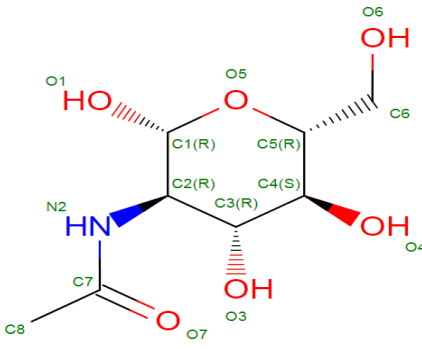
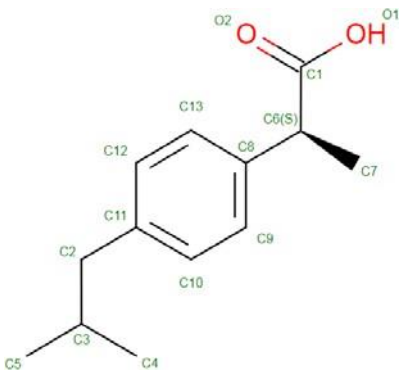
Table 1: Macromolecules in Ibuprofen (IBP) Bound to Cyclooxygenase-2 Complex

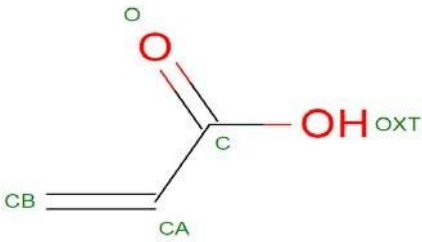
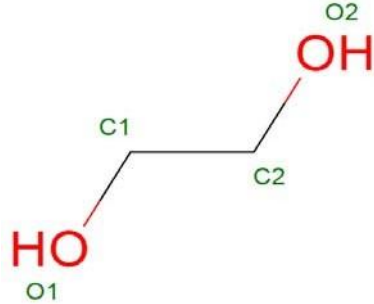
Entity ID : 1				
Molecule	Chains	Sequence Length	Organism	Details
Prostaglandin G / H synthase 2	A, B	551	<u>Mus musculus</u>	Mutation (s): 0 Gene Noms: <u>Ptgs2</u> , <u>Cox-2</u> , <u>Cox2</u> , <u>Pghs-b</u> , <u>Tis10</u> EC: <u>1.14.99.1</u>

Table 2: Oligosaccharides in Ibuprofen in (IBP) bound to cyclooxygenase-2 complex

Entity ID : 2			
Molecule	Chains	Sequence Length	Glycosylation
2-acétamido-2-désoxy-bêta-D-glucopyranose- (1-4) -2-acétamido-2 désoxy-bêta-D-glucopyranose	C, D	2	N-glycosylation
Entity ID : 3			
Molecule	Chains	Sequence Length	glycosylation
alpha-D-mannopyranose- (1-4) -2-acétamido-2- E désoxy-bêta-D-glucopyranose- (1-4) -2-acétamido- 2-désoxy-bêta-D-glucopyranose		3	N-glycosylation

Table 3: Small molecules of ibuprofen (IBP) bound to the cyclooxygenase-2 complex

Ligands			
ID	Chains	Name / Formula / InChI Clé	Diagramme 2D
<u>HEM</u>	A, B	PROTOPORPHYRINE IX CONAIN FE C ₃₄ H ₃₂ Fe N ₄ O ₄ KABFMIBPWCXCRK- RGGAHWMASA-L	
<u>BOG</u>	A, B	octyl bêta-D-glucopyranoside C ₁₄ H ₂₈ O ₆ HEGSGKPQLMEBJL-RKQHYHRCSA-N	
<u>NAG</u>	A, B	2-acétamido-2-déoxy-bêta-D-glucopyranose C ₈ H ₁₅ NO ₆ OVRNDRQMDRJTHS-FMDGEEDCSA-N	
<u>IBP</u>	A, B	IBUPROFEN C ₁₃ H ₁₈ O ₂ HEFNWXXXW ATRW-JTQLQIEISA-N	

<u>AKR</u>	A, B	ACRYLIQUE ACID C ₃ H ₄ O ₂ NIXOWILDQLNWCW-UHFFFAOYSA-N	 The diagram shows the chemical structure of acrylic acid. It consists of a central carbon atom (C) double-bonded to an oxygen atom (O) and single-bonded to a hydroxyl group (OH). The central carbon is also single-bonded to a vinyl group (C=C) and a hydrogen atom (H). The vinyl group is labeled with 'CB' and 'CA'. The hydroxyl group is labeled with 'OXT'. The oxygen atom is labeled 'O'.
<u>EDO</u>	A, B	1,2-ÉTHANEDIOL C ₂ H ₆ O ₂ LYCAIKOWRPUZTN-UHFFFAOYSA-N	 The diagram shows the chemical structure of 1,2-ethandiol. It consists of two carbon atoms (C1 and C2) connected by a single bond. Each carbon atom is also bonded to a hydroxyl group (OH). The hydroxyl group on C1 is labeled with 'O1' and the hydroxyl group on C2 is labeled with 'O2'. The carbon atoms are labeled 'C1' and 'C2'.

2. 1- Protein preparation

The X-ray crystallographic structure of ibuprofen bound to cyclooxygenase-2 (4PH9) (from *Mus musculus*) was obtained from the Protein Data Bank (PDB) (<http://www.rcsb.org>) at resolution <3.00 Å (resolution: 1.81 Å, free R-value: 0.197, working R-value: 0.160, observed R-value: 0.162).

This file is not directly used by Autodock 1.5.6 tools, it was first viewed using Discovery Studio Visualizer version 2.5.5. Discovery Studio is a biological molecular design solutions software package for chemists and computational biologists. (Discovery Studio 2.5 (CDOCKER Dock, Dassault Systemes BIOVIA, USA) Discovery Studio facilitates the examination of the properties of large and small molecules

Water molecules, ligands and other heteroatoms have been removed from protein molecules. These crystallographic structures were preserved without any treatment for molecular anchoring. The protein PDB files were efficiently prepared using AutoDock / Vina (Molecular Graphics Lab, The Scripps Research Institute Plugin, La Jolla, CA, USA) and saved as pdbqt files. Polar hydrogens and Kollman charges have been added.

2-2- Preparation of the ligand

The 3D structure of Ligand (Ibuprofen) was downloaded from the Drugbank database (<https://www.drugbank.ca/>): Accession number DB01050. Torsional connections have been verified. Ligand was saved in the same anchor folder in pdbqt format. The charges were then added.

2 3- Molecular docking protocol

Docking calculations were performed using standard AutoDock Vina defaults. The active site was placed in a 40 × 50 × 40 Å cubic box at the geometric center of the selected flexible residue set, which has 0.375 Å as the grid point spacing

The values of the root mean square deviation (RMSD) between the mooring and the initial poses were calculated. The resulting best poses were ranked based on Vina scores (kcal / mol). assessed by free binding energies (S score, kcal / mol) and binding interactions between the ligand atom and the active site residues.

3. Result

Molecular docking was chosen as the first-line discrimination of the ibuprofen-COX2 interaction as a structural discrimination procedure based on the in silico prediction of putative competitors (Liu and al. 2017).

The structural differences of each molecule also influence its interaction with COX2 (figure 1)

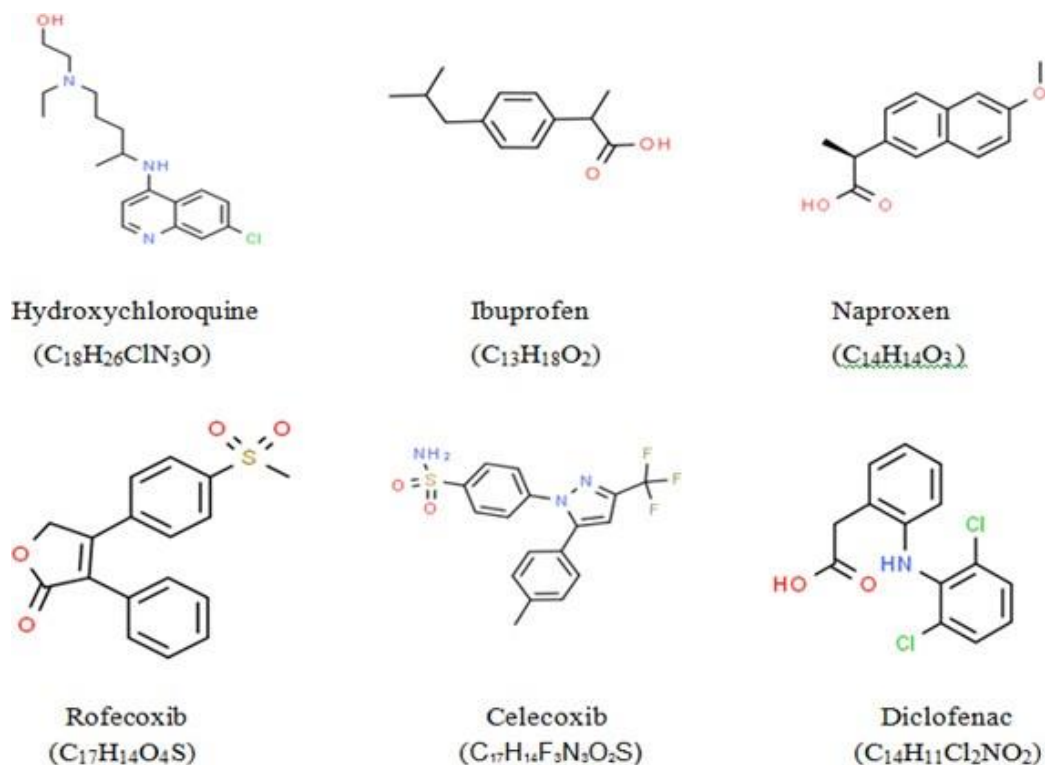


Figure 1: Structure of Ibuprofen and other drugs with anti-inflammatory action (By DrugBank)

Each COX isoform is a structural homodimer which functions as a heterodimer. According to Mitchener et al, one subunit, containing the required heme prosthetic group, acts as a catalytic site, while the other serves as an allosteric site (Mitchener and al. 2015). Previous evidence suggests that inhibitors may act at one or both sites, depending on the structure and concentration of the inhibitor (Dong and al. 2013). Regardless of the site, Picot et al., Identified an open area called a "lobby" through which binding requires that a small molecule must first enter (Picot and al. 1994)

As shown in Figure 2, ibuprofen was identified in the pocket of the COX2 enzyme binding site.

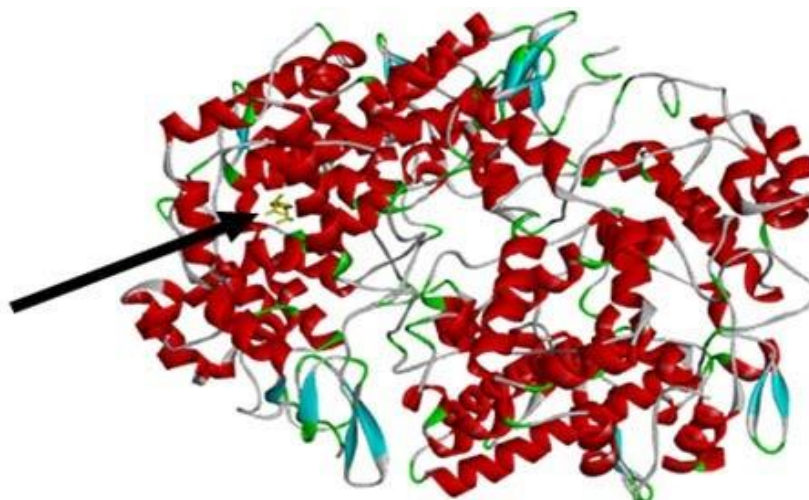


Figure 2: Ibuprofen in the pocket of the COX2 enzyme binding site (with Discovery Studio 2.5 software).

The active site was placed in a cubic box at the geometric center of the selected flexible residue set at 0.375 Å as the grid point spacing

The coordinates of the Grid Box (number of points X, Y, Z dimensions and spacing) for the Ibuprofen-COX2 model (shown in Figure 3) were noted.

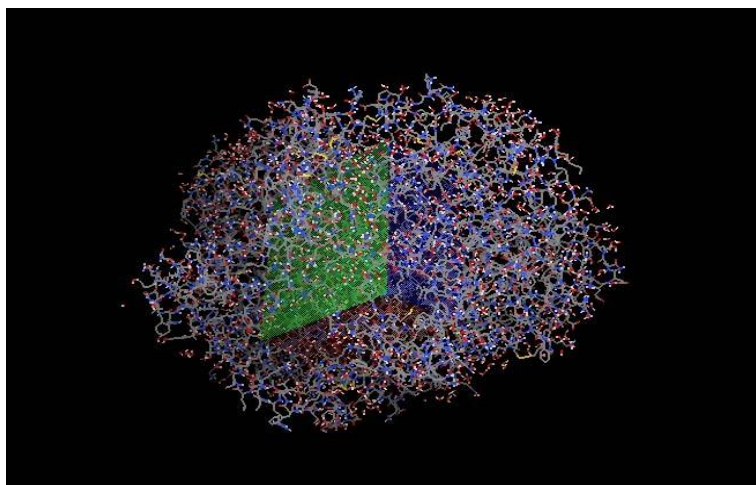


Figure 3: Grid box adjusted to the Ibuprofen-COX2 model

A validation docking of the crystal structure of murine (μ) COX-2 in complex with Ibuprofen (IBP) (Orlando and al. 2015). (PDB ID: 4PH9) (<http://www.rcsb.org/pdb>). Was performed on Autodock vina after visualization in discovery studio and processing of the ligand and receptor.

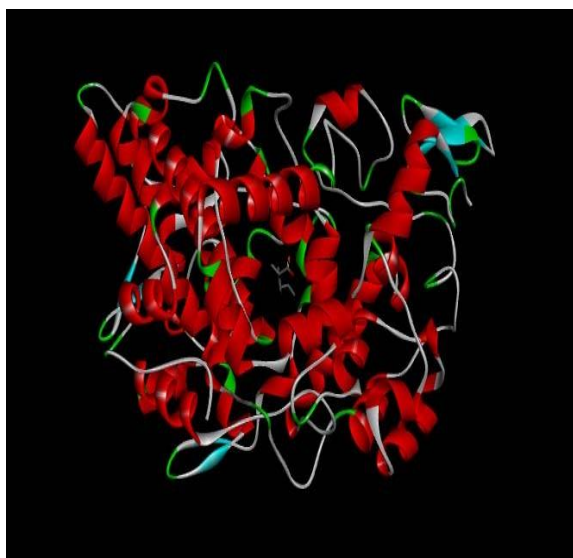


Figure 4a

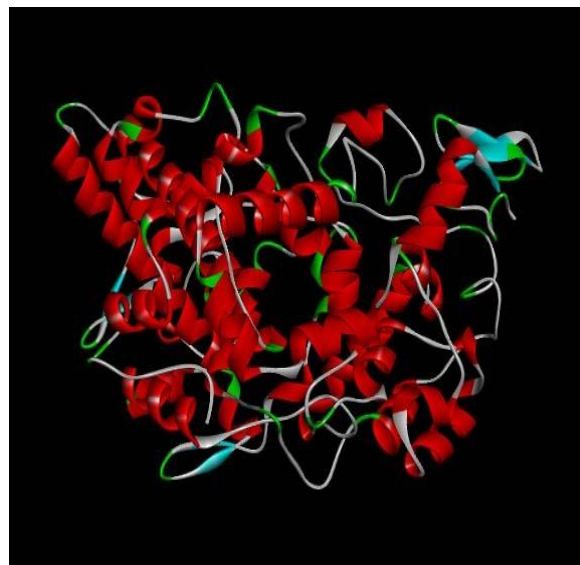


Figure 4b

Figure 4: COX2 pocket (4a: Binding Ibuprofen, 4b Free)

The complex formed by Ibuprofen-COX 2 from the experimental model of Orlando et al has a very low energy value and gives a docking score (Affinity: -7.3 (kcal / mol) with a mean square deviation of (RMSD = 23.884).

The interactions between COX2-Ibuprofen have been illustrated in Figures 5a and 5b.

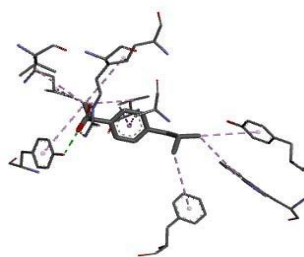


Figure 5a

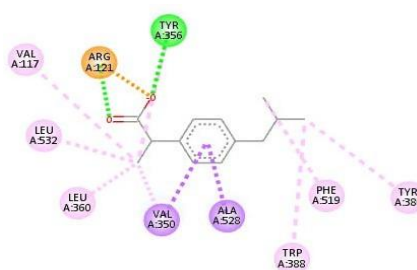


Figure 5b

Figures 5a and 5b: receptor-ligand interactions on a 2D diagram

4. Discussion:

Furse et al studied molecular dynamics simulations of COX-1 and COX-2 enzymes with its human substrate (arachidonic acid). These simulations were compared to reference simulations of arachidonate in solution to explore the effect of the enzyme on the conformation and positioning of the substrate in the active site. The simulations suggest that the substrate has greater conformational freedom in the COX-2 active site compared to COX-1, which is consistent with the greater volume of COX-2 active site observed in crystal structures on x-rays (Furse and al. 2006).

Cyclooxygenases are functional homodimers. In our work, the active site was identified in the A chain of cox2 in the cox2 structure linked to ibuprofen. Our simulations only involved a single monomer, like some work (Cukier and al. 2002), or others that focused on an even smaller fragment of the protein, like the membrane binding domain (Nina and al. 2000) or the membrane and helix binding domain comprising the active site of cyclooxygenase (García-Nieto and al. 2000).

In addition, previous studies have indicated that many different NSAIDs (including IBP) bind tightly to a single monomer of the COX-2 dimer and allosterically inhibit oxygenation of the substrate into the partner monomer (Dong and al. 2011), (Duggan and al. 2011).

The results of our docking confirm those found by Orlando et al on the experimental level. Orlando et al identified ibuprofen in an area of the enzyme between the opening of the substrate channel and the top of the active site (Orlando and al. 2015)

Looking at gastrointestinal outcomes as the primary endpoint, preliminary evidence has shown the link between COX inhibition and the risk of cardiovascular disease. The VioXX trial in patients with rheumatoid arthritis treated with Rofecoxib were five times more likely to have a myocardial infarction than patients on non-selective anti-inflammatory inhibitor Naproxen (Bombardier and al. 2000).

Following the results of the Adenomatous Polyp PRevention On Vioxx (APPROVe) study, rofecoxib was withdrawn from the market in 2004 (Baron and al. 2008)

A meta-analysis of 280 trials of nonsteroidal anti-inflammatory drugs versus placebo showed that high dose naproxen was associated with a risk, albeit a low one, of vascular events (Bhala and al. 2013). Furthermore, the risk of cardiovascular disease was not equal for all COX-2 inhibitors. Questions also remained about the dose and duration of use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs associated with a high risk of cardiovascular disease.

5. Conclusion

Our docking validated the experimental results known in current practice concerning the inhibition of cyclooxygenase by ibuprofen. Molecular docking becomes an essential step in drug discovery so that new exogenous ligands can be identified

References

- [1] Baron, J. A., R. S. Sandler, R. S. Bresalier, A. Lanasa, D. G. Morton, R. Riddell, E. R. Iverson and D. L. Demets (2008). "Cardiovascular events associated with rofecoxib: final analysis of the APPROVe trial." *Lancet* **372**(9651): 1756-1764.
- [2] Bhala, N., J. Emberson, A. Merhi, S. Abramson, N. Arber, J. A. Baron, C. Bombardier, C. Cannon, M. E. Farkouh, G. A. FitzGerald, P. Goss, H. Halls, E. Hawk, C. Hawkey, C. Hennekens, M. Hochberg, L. E. Holland, P. M. Kearney, L. Laine, A. Lanasa, P. Lance, A. Laupacis, J. Oates, C. Patrono, T. J. Schnitzer, S. Solomon, P. Tugwell, K. Wilson, J. Wittes and C. Baigent (2013). "Vascular and upper gastrointestinal effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs: meta-analyses of individual participant data from randomised trials." *Lancet* **382**(9894): 769-779.
- [3] Bombardier, C., L. Laine, A. Reicin, D. Shapiro, R. Burgos-Vargas, B. Davis, R. Day, M. B. Ferraz, C. J. Hawkey, M. C. Hochberg, T. K. Kvien and T. J. Schnitzer (2000). "Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis. VIGOR Study Group." *N Engl J Med* **343**(21): 1520-1528, 1522 p following 1528.
- [4] Cukier, R. I. and S. Seibold (2002). "Molecular dynamics simulations of prostaglandin endoperoxide H synthase-1. Role of water and the mechanism of compound I formation from hydrogen peroxide." *The Journal of Physical Chemistry B* **106**(46): 12031-12044.
- [5] Day, M. (2020). "Covid-19: ibuprofen should not be used for managing symptoms, say doctors and scientists." *Bmj* **368**: m1086.
- [6] Dong, L., N. P. Sharma, B. J. Jurban and W. L. Smith (2013). "Pre-existent asymmetry in the human cyclooxygenase-2 sequence homodimer." *Journal of Biological Chemistry* **288**(40): 28641-28655.
- [7] Dong, L., A. J. Vecchio, N. P. Sharma, B. J. Jurban, M. G. Malkowski and W. L. Smith (2011). "Human cyclooxygenase-2 is a sequence homodimer that functions as a conformational heterodimer." *J Biol Chem* **286**(21): 19035-19046.
- [8] Duggan, K. C., D. J. Hermanson, J. Musee, J. J. Prusakiewicz, J. L. Scheib, B. D. Carter, S. Banerjee, J. A. Oates and L. J. Marnett (2011). "(R)-Profenans are substrate-selective inhibitors of endocannabinoid oxygenation by COX-2." *Nat Chem Biol* **7**(11): 803-809.
- [9] Furse, K. E., D. A. Pratt, N. A. Porter and T. P. Lybrand (2006). "Molecular dynamics simulations of arachidonic acid complexes with COX-1 and COX-2: insights into equilibrium behavior." *Biochemistry* **45**(10): 3189-3205.
- [10] Garcia-Nieto, R., C. Pérez and F. Gago (2000). "Automated docking and molecular dynamics simulations of nimesulide in the cyclooxygenase active site of human prostaglandin-endoperoxide synthase-2 (COX-2)." *J Comput Aided Mol Des* **14**(2): 147-160.
- [11] Gislason, G. H., S. Jacobsen, J. N. Rasmussen, S. Rasmussen, P. Buch, J. Friberg, T. K. Schramm, S. Z. Abildstrom, L. Køber, M. Madsen and C. Torp-Pedersen (2006). "Risk of death or reinfarction associated with the use of selective cyclooxygenase-2 inhibitors and nonselective nonsteroidal antiinflammatory drugs after acute myocardial infarction." *Circulation* **113**(25): 2906-2913.
- [12] Karsh, J. (2006). "Can anti-inflammatories be safe?" *CMAJ : Canadian Medical Association Journal* **175**(5): 451-451.
- [13] Kurumbail, R. G., A. M. Stevens, J. K. Gierse, J. J. McDonald, R. A. Stegeman, J. Y. Pak, D. Gildehaus, T. D. Penning, K. Seibert and P. C. Isakson (1996). "Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents." *Nature* **384**(6610): 644-648.
- [14] Laneuville, O., D. K. Breuer, D. L. Dewitt, T. Hla, C. D. Funk and W. L. Smith (1994). "Differential inhibition of human prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2 by nonsteroidal anti-inflammatory drugs." *J Pharmacol Exp Ther* **271**(2): 927-934.
- [15] Liu, G., S. Chen, J. Zhong, K. Teng and Y. Yin (2017). "Crosstalk between Tryptophan Metabolism and Cardiovascular Disease, Mechanisms, and Therapeutic Implications." *Oxid Med Cell Longev* **2017**: 1602074.
- [16] Mitchener, M. M., D. J. Hermanson, E. M. Shockley, H. A. Brown, C. W. Lindsley, J. Reese, C. A. Rouzer, C. F. Lopez and L. J. Marnett (2015). "Competition and allostery govern substrate selectivity of cyclooxygenase-2." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**(40): 12366-12371.
- [17] Nina, M., S. Bernèche and B. Roux (2000). "Anchoring of a monotopic membrane protein: the binding of prostaglandin H2 synthase-1 to the surface of a phospholipid bilayer." *Eur Biophys J* **29**(6): 439-454.
- [18] Orlando, B. J., M. J. Lucido and M. G. Malkowski (2015). "The structure of ibuprofen bound to cyclooxygenase-2." *Journal of structural biology* **189**(1): 62-66.
- [19] Picot, D., P. J. Loll and R. M. Garavito (1994). "The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H2 synthase-1." *Nature* **367**(6460): 243-249.
- [20] Selinsky, B. S., K. Gupta, C. T. Sharkey and P. J. Loll (2001). "Structural analysis of NSAID binding by prostaglandin H2 synthase: time-dependent and time-independent inhibitors elicit identical enzyme conformations." *Biochemistry* **40**(17): 5172-5180.
- [21] Smith, W. L., Y. Urade and P. J. Jakobsson (2011). "Enzymes of the cyclooxygenase pathways of prostanoid biosynthesis." *Chem Rev* **111**(10): 5821-5865.
- [22] Vecchio, A. J. and M. G. Malkowski (2011). "The structure of NS-398 bound to cyclooxygenase-2." *J Struct Biol* **176**(2): 254-258.
- [23] Voiriot, G., Q. Philippot, A. Elabbadi, C. Elbim, M. Chalumeau and M. Fartoukh (2019). "Risks Related to the Use of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs in Community-Acquired Pneumonia in Adult and Pediatric Patients." *J Clin Med* **8**(6).

Chapitre 7 : in-silico study: cox2 (cyclo-oxygenase 2), an unknown target of hydroxychloroquine repositioned for the treatment of covid 19 infection and cardiovascular effects

Chapitre 7 : Étude in silico: Cyclo-oxygénase (COX), une cible inconnue de l'hydroxychloroquine, et risque cardiovasculaire chez les patients hypertendus avec Covid 19

Introduction

Alors que les principales recherches scientifiques se sont penchées sur les maladies chroniques non transmissibles, ces dernières décennies. L'année 2019-2020 a été marquée par l'apparition d'une nouvelle épidémie COVID-19 causée par le coronavirus 2 du syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS-CoV-2) . (Vellingiri et al., 2020), (Chen et al., 2020).

Cette pandémie (OMS 2020) a mis en difficulté les systèmes de santé du monde entier. L'hydroxychloroquine (4-amino-quinoléine), largement utilisée pour traiter certaines maladies auto-immunes et les affections inflammatoires, a été repositionnée comme une nouvelle piste contre l'infection au COVID-19 (Ferner et al., 2020), (Zhai et al., 2020).

Des études préliminaires ont suggéré que l'hydroxychloroquine inhibe l'entrée du virus SARS-CoV2 méfiée par le récepteur ACE2. . (Yao et al. , 2020), (Devaux et al., 2020) et ait une action anti-inflammatoires et immuno-modulatrices particulièrement intéressante dans la tempête de cytokines au cours de l'infection au COVID-19(Guastalegname et al., 2020).

Par la suite, de nouvelles recherches ont mis en évidence l'évolution défavorable de cette infection chez les patients traités par les anti-inflammatoires non stéroïdiens. (Day 2020).

Outre les effets gastro-digestifs, des complications cardiovasculaires graves ont été auparavant rapportées lors de l'utilisation des inhibiteurs de la cyclo-oxygénase qu'il s'agisse d'AINS traditionnels ou de coxib (développés comme une alternative) (Karsh 2006).

L'objectif est de vérifier si, en partageant des propriétés anti-inflammatoires avec les AINS en se liant à la cyclooxygénase, l'hydroxychloroquine, provoque des effets cardiovasculaires fatals chez les patients hypertendus atteints de Covid 19.

Matériels et méthodes

La structure cristallographique aux rayons X de l'ibuprofène lié à la cyclooxygénase-2 (4PH9) (de *Mus musculus*) (Orlando et al., 2015) a été obtenue auprès de la Protein Data Bank (PDB) (<http://www.rcsb.org>) à une résolution < 3,00 Å (résolution: 1,81 Å, valeur R libre: 0,197, valeur R travail: 0,160, valeur R observée: 0,162).

Le fichier PDB de la protéine a été efficacement préparé à l'aide de l'AutoDock / Vina (Molecular Graphics Lab, Le plugin Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA) et

enregistré en tant que fichiers pdbqt. Les hydrogènes polaires et les charges Kollman ont été ajoutés.

Les informations nécessaires sur l'hydroxychloroquine ont été recueillies sur la plateforme ChemSpider(<http://www.chemspider.com/>) : - Hydroxychloroquine (Formule moléculaire: $C_{18}H_{26}ClN_3O$, Masse moyenne: 335,871 Da, Masse monoisotopique: 335,176453 Da, ChemSpider ID: 3526) - Chloroquine (Formule moléculaire $C_{18}H_{26}ClN_3$, Masse moyenne 319,872 Da, Monoisotopique mass319.181519 Da, ID ChemSpider: 2618) . Leurs structures chimiques sont presque similaire (Zhou et al., 2020).

Ces deux antipaludiques et antirhumatismaux ont une activité antivirale in vitro. La chloroquine interfère avec différentes étapes du cycle de vie viral (Yan et al., 2013) .

La structure 3D du Ligand a été téléchargée à partir de la base de données Drugbank (<https://www.drugbank.ca/>): Numéro d'accès DB01611. Puis l'identification et la vérification a été effectuée sur Discovery Studio Visualizer version 2.5.5 .

Le ligand a été ensuite exporté sur AutoDock tools 1.5.6 . Les liaisons de torsion ont été vérifiées. Le ligand a été enregistré dans le même dossier d'ancrage au format pdbqt. Les charges ont ensuite été ajoutées. Les calculs d'amarrage ont été effectués à l'aide des paramètres standard par défaut d'AutoDock Vina.

Pour prédire la bioactivité de l'hydroxychloroquine sur les récepteurs cox2, nous avons utilisé Molinspiration (<https://www.molinspiration.com/>).

Ce serveur prédit également le score de bioactivité pour les cibles thérapeutiques les plus importantes telles que les récepteurs GPCR, les inhibiteurs de kinases, les modulateurs de canaux ioniques, les enzymes et les récepteurs nucléaires (Ertl et al., 2000).

La base de données SwissADME (Swissadme.ch/index.php) était utilisé pour comparer les propriétés physicochimiques, les paramètres ADME et les propriétés pharmacocinétiques de l'hydroxychloroquine avec certains médicaments anti-inflammatoires. Les smiles (structure chimique) de chaque structure ont été téléchargés sur la base de données Drug bank (Drugbank.ca/).

Les analyses statistiques (moyenne et déviation standard) ont été effectuées à l'aide du logiciel statistique Minitab Version 16. Le test de Mann-Whitney a été utilisé pour la comparaison des valeurs médianes du Docking

Résultats et discussion

Le complexe formé par Ibuprofene (pose1) -COX 2 du modèle expérimental de Orlando et al a la valeur énergétique la plus faible et donne le meilleur score d'amarrage (Affinité: -7,3 (kcal / mol) avec un écart quadratique moyen de (RMSD = 23,884).

Les détails d'amarrage reçus après l'ancrage de toutes les poses hydroxychloroquine avec la cible COX 2 ont été notés.

Le test de Mann-Whitney révèle que l'affinité médiane du complexe Hydroxychloroquine /COX2 (égale à -6,350 kcal / mol) est significativement supérieure à l'affinité médiane du complexe du modèle cristallisé par Orlando et al en 2015 : Ibuprofene /COX2 (-6,250 kcal / mol) , (P-Value= 0,6712) , IC (95 %) :(-0,200 ; 1,200) .

La pose qui aurait la plus faible énergie de liaison du score d'amarrage sera considérée comme la meilleure pose et inhibe le récepteur cible car l'énergie de liaison inférieure correspond à une affinité de liaison plus élevée (Simon et al., 2017) .

La comparaison des scores de poses- complexes a révélée que le complexe formé par l'hydrochloroquine (pose1) -COX 2 a la valeur énergétique la plus faible et donne le meilleur score d'amarrage (Affinité: -7,6 (kcal / mol) avec le meilleur écart quadratique moyen (RMSD = 2,542) .

On peut considérer que le complexe Hydrochloroquine (pose1) -COX 2 est stable avec une affinité de liaison plus élevée.

D'après ces résultats d'amarrage, nous pouvons classer l'hydrochloroquine comme un bon inhibiteur de l'enzyme COX2.

Les représentations 3D des meilleures interactions de pose entre les poses et le récepteur ont été visualisées à l'aide d'Autodock.

L'hydroxychloroquine se lie à COX2 par deux liaisons hydrogène (dans H-GLY136 et H-GLY45) et quatre liaisons hydrophobes: Cl -CYS36, O -CYS36, O -CYS47 et O -PRO154) à différentes distances (2.68043) Å, 2.46642 Å, 4,47781 Å, 5,06953 Å, 4,66876 Å et 4,23862 Å, respectivement).

La glycine à radical hydrogène (H) est dépourvue de tout caractère hydrophobe ou hydrophile. GLY45 et GLY136 se lient à l'hydroxychloroquine par des liaisons hydrogène, H-GLY136 et H-GLY45).

La cystéine est hydrophobe, mais son groupe SH se lie à une autre cystéine pour produire une liaison forte (covalente), le pont disulfure. CYS36 et CYS47 sont impliqués dans les liaisons hydrophobes avec l'hydroxychloroquine.

Fait intéressant, CYS36 est doublement engagé, avec les atomes d'oxygène et de chlore de l'hydroxychloroquine.

Bien que la signification physiologique de la liaison du chlorure à cette position soit inconnue, les ions chlorure ont déjà été utilisés pour identifier le site de liaison de l'oxygène moléculaire dans diverses protéines, y compris les dioxygénases (Colloc'h et al., 2008), (Steiner et al., 2010).

Cela soulève la possibilité que l'ion chlorure puisse être indicatif de la position de l'oxygène moléculaire avant l'incorporation dans les substrats COX.

De plus, la proline (PRO154), qui est hautement hydrophobe, se lie comme CYS36 et CYS47 à l'atome d'oxygène de l'hydroxychloroquine.

Les inhibiteurs de l'acide arylcarboxylique se lient dans l'une des deux orientations du site actif COX (Duggan et al., 2010).

e flurbiprofène se lie de manière canonique avec sa fraction carboxylate appariée à l'hydrogène aux résidus du site de constriction Arg-120 et Tyr-355 (Duggan, 2010).

En revanche, le diclofénac se lie dans une orientation inversée dans laquelle son carboxylate est lié à l'hydrogène aux chaînes latérales de Tyr-385 et Ser-530 (Rowlinson et al., 2003).

L'ibuprofène occupe une zone de l'enzyme entre l'ouverture du canal du substrat et le sommet du site actif. Un total de treize contacts est établi entre le groupe isobutyle de l'ibuprofène et Trp-387, Met-522, Val-523, Gly-526, Ala-527 et Ser-530. De plus, le groupe α -méthyle de l'ibuprofène établit un contact avec le Val-349 et le Leu-359. (Orlando, 2015).

Le rofécoxib se lie au site actif de la cyclooxygénase dans la même conformation générale que celle observée pour le célécoxib (Wang et al., 2010).

Le rofécoxib effectue un total de 42 contacts avec des résidus tapissant le canal de la cyclooxygénase (Marnett 2009) .

La diversité des cibles médicamenteuses possibles (dont chacune nécessite une combinaison différente de caractéristiques moléculaires correspondantes) est si énorme.

Pour prédire la biactivité de l'hydroxychloroquine sur les récepteurs *cox2*; nous avons utilisé Molinspiration (<https://www.molinspiration.com/>).

Ce serveur prédit également le score de bioactivité pour les cibles thérapeutiques les plus importantes telles que les récepteurs GPCR, les inhibiteurs de kinases, les modulateurs de canaux ioniques, les enzymes et les récepteurs nucléaires (Ertl, 2000).

La bioactivité d'un composé a été décidée sur la base du score de bioactivité. Si le score de bioactivité est > 0 , il s'agit d'un composé actif tandis que $< -5,0$ est un composé inactif et la plage comprise entre $-5,0$ et $0,0$ correspond aux composés modérément actifs (Balakrishnan et al., 2015).

L'hydroxychloroquine était la seule à montrer une activité élevée contre plus d'un récepteur cible (GPCR, inhibiteurs de kinase, modulateurs de canal ionique et inhibiteur de protéases) (bioactivité supérieure à zéro).

Du point de vue de la découverte de médicaments, l'activité contre plusieurs cibles signifie normalement qu'une molécule présentera de multiples effets secondaires.

Preuve supplémentaire de nos résultats de docking l'hydroxychloroquine est un inhibiteur d'enzyme COX2 (la bioactivité comme inhibiteur d'enzyme égale à 0,15) comme les autres AINS dont la biactivité inhibitrice enzymatique est située entre 0.12 et 0.25.

L'hydroxychloroquine est active sur les récepteurs du ligand GPCR (bioactivité = 0,35). L'impact des structures GPCR sur la découverte de médicaments est très important. La conception de médicaments basée sur la structure a été appliquée à un nombre croissant de cibles GPCR au cours de la dernière décennie (Congreve et al., 2020) .

L'hydroxychloroquine était également active sur les récepteurs modulateurs des canaux ioniques (bioactivité = 0,30).

Les canaux ioniques dépendants des ligands sont également des cibles pharmacologiques pour le développement de nouvelles thérapies (Lara et al., 2020) .

Pour les récepteurs des inhibiteurs de kinases, la bioactivité de l'hydroxychloroquine est de 0,44). Les récepteurs tyrosine kinases (RTK) sont des régulateurs clés des processus

cellulaires et leur rôle dans la physiopathologie de nombreuses maladies est bien reconnue (Pottier et al., 2020).

La structure de l'hydroxychloroquine, qui diffère de celle des anti-inflammatoires non stéroïdiens, a tendance à montrer une activité contre une grande variété de cibles biologiques. Sur ce fait, on dit parfois que ces composés ont un comportement de promiscuité.

Plusieurs médicaments peuvent présenter une promiscuité, en particulier dans le cas de la réutilisation de médicaments (Gupta et al., 2020) ce qui pourrait expliquer les effets cardiovasculaires liés au repositionnement de l'hydroxychloroquine chez les patients hypertendus au cours de l'infection au COVID19.

La base de données SwissADME (Swissadme.ch/index.php) a été utilisée pour comparer les données physico-chimiques et les propriétés pharmacocinétiques de l'hydroxychloroquine avec certains médicaments anti-inflammatoires.

Les smiles (structure chimique) de chaque structure ont été téléchargés dans la base de données Drugbank (Drugbank.ca/).

Dans un premier temps, nous avons vérifié si les molécules respectent les conditions des cinq règles de Lipinski suivantes (Lipinski 2001): poids moléculaire: ≤ 500 , nombre de donneurs de liaisons hydrogène : ≤ 5 , nombre d'accepteurs de liaison hydrogène: ≤ 10 , lipophilie (exprimée en LogP): ≤ 5 . Autant que les autres AINS l'hydroxychloroquine respecte la règle de lipinski . L'ibuprofène, le diclofénac, le naproxène, le piroxicam et le cécoxib ont respectivement les poids moléculaires suivants: 335,87, 206,28, 296,15, 230,26, 331,35, 381,37), g / mol, ils ont tous un poids moléculaire ≤ 500 g / mol.

En comparant les valeurs de lipophilie (LogP) de nos ligands, nous observons qu'ils ont tous des valeurs inférieures à 5 et peuvent donc être facilement absorbés par l'organisme.

Cependant, tous les ligands ont un certain nombre de donneurs de liaisons hydrogène: ≤ 5 , un certain nombre d'accepteurs de liaisons hydrogène: ≤ 10 . Le fait que l'hydroxychloroquine soit prise en compte pour la prise en charge des patients COVID-19 souligne clairement la nécessité de mieux comprendre sa pharmacocinétique.

La biodisponibilité après administration orale de l'hydroxychloroquine peut atteindre 80% avec un pic plasmatique d'environ 2 à 4 h . Son grand volume de distribution (200 à 800

L / kg) explique sa longue demi-vie qui pourrait aller de 30 à 60 jours,(Rainsford et al., 2015), (Yamada et al., 2011).

La chloroquine et l'hydroxychloroquine sont métabolisées via les enzymes CYP-450 en d'autres composés actifs, qui sont responsables des actions pharmacologiques étendues et de la toxicité accrue. L'hydroxychloroquine est principalement excrété par voie rénale (60%) sous forme inchangée ou métabolisée, et le reste (40%) est généralement éliminé par le foie, les matières fécales et la peau ou stocké dans d'autres tissus corporels maigres (Kalia, 2007).

Conclusion

Au regard des effets cardiovasculaires rapportés chez les patients hypertendus, une attention particulière devrait être accordée à l'hydroxychloroquine repositionnée dans le traitement du COVID 19.

Nos résultats révèlent pour la première fois en détail atomique comment l'hydrochloroquine, l'un des médicaments les plus controversés se lie à une nouvelle cible moléculaire (COX2) avec un score d'amarrage (Affinité: -7,6 (kcal / mol) et un écart quadratique moyen (RMSD = 2,542).

L'hydroxychloroquine s'est avérée promiscuiteuse. Sa structure, qui diffère de celle des anti-inflammatoires non stéroïdiens, a tendance à montrer une activité contre une grande variété de cibles biologiques .

Cette découverte permet d'améliorer la compréhension de son mécanisme d'action et des effets indésirables qui lui sont attribués.



Received on 05 October 2020; received in revised form, 30 December 2020; accepted, 31 December 2020; published 01 February 2021

IN-SILICO STUDY: COX2 (CYCLO-OXYGENASE 2), AN UNKNOWN TARGET OF HYDROXYCHLOROQUINE REPOSITIONED FOR THE TREATMENT OF COVID 19 INFECTION AND CARDIOVASCULAR EFFECTS

Hamza Nadjib Merad-Boudia *, Majda Dali-Sahi, Baya Guermouche and Nouria Dennouni-Medjati

Department of Biology, Analytical Chemistry and Electrochemistry Laboratory, Abou Bekr Belkaid University, Tlemcen, 13000, Algeria.

Keywords:

Covid 19, Cardiovascular effects, Hydroxychloroquine, Cyclooxygenase 2, Molecular docking

Correspondence to Author:

Hamza Nadjib Merad-Boudia

Department of Biology, Analytical Chemistry and Electrochemistry Laboratory, Abou Bekr Belkaid University, Tlemcen, 13000, Algeria.

E-mail: mbhnaguib@yahoo.fr

ABSTRACT: Hydroxychloroquine, widely used to treat certain autoimmune diseases and inflammatory conditions, has been repositioned as a new lead against the COVID-19 pandemic. Preliminary studies have suggested that hydroxychloroquine inhibits the entry of the SARS-CoV2 virus mediated by the ACE2 receptor and is a particularly interesting anti-inflammatory and immunomodulatory action in the cytokine storm during COVID-19 infection. Furthermore, cardiovascular effects have been reported in hypertensive patients. These last are thought to result from the inhibition of cyclooxygenase 2. Our results reveal for the first time in atomic detail how hydroxychloroquine, one of the most controversial drugs, has an affinity for a new molecular target (COX2) with a docking score: -7.6 (kcal/mol) and a root mean square deviation (RMSD = 2.542). Hydroxychloroquine binds to cyclo-oxygenase 2 via two hydrogen bonds (H-GLY136 and H-GLY45) and four hydrophobic bonds: Cl -CYS36, O -CYS36, O -CYS47 and O -PRO154). This mechanism has never been elucidated. Hydroxychloroquine proved to be promiscuous. Its structure, which differs from that of non-steroidal anti-inflammatory drugs, tends to show activity against a wide variety of biological targets: As an enzyme inhibitor (bioactivity = 0.15), GPCR receptor ligand (bioactivity = 0.35), ion channel modulator (bioactivity = 0.30), kinase inhibitor (bioactivity = 0.44) and protease inhibitor (bioactivity = 0.12). This approach improves the understanding of its mechanism of action and the side effects attributed to it.

INTRODUCTION: While the main scientific research has focused on chronic non-communicable diseases in recent decades. The year 2019-2020 was marked by the emergence of a new COVID-19 epidemic caused by the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) ^{1, 2}. This pandemic has challenged health systems around the world ³.

Hydroxychloroquine (4-amino-quinoline), widely used to treat some autoimmune diseases and inflammatory affections, has been repositioned as a new lead against COVID-19 infection ^{4, 5}.

Preliminary studies have suggested that hydroxychloroquine inhibits ACE2 receptor-mediated entry of the SARS-CoV2 virus ^{6, 7} and has an anti-inflammatory and immunomodulating action particularly interesting in the cytokine storm during COVID-19 infection ⁸. Thereafter, new research has highlighted the unfavourable evolution of this infection in patients treated with non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) ⁹. Besides the gastro-digestive effects, serious cardiovascular complications have been previously reported when

QUICK RESPONSE CODE

DOI:
10.13040/IJPSR.0975-8232.12(2).1000-09

This article can be accessed online on
www.ijpsr.com

DOI link: [http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.12\(2\).1000-09](http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.12(2).1000-09)

using cyclo-oxygenase. In the light of scientific debates led by researchers from all over the world on the benefit/risk ratio of hydroxychloroquine, the objective is to check if, by sharing anti-inflammatory properties with NSAIDs by binding to cyclooxygenase, hydroxychloroquine, causes fatal cardiovascular effects in hypertensive patients with Covid 19.

MATERIALS AND METHODS:

Preparation of Receptor: In the literature, several crystalline structures of COX-1 and COX-2 in complex with several inhibitors and substrates have been identified. With arachidonic acid (their physiological substrate)¹⁰, classic NSAIDs such as Diclofenac classic NSAIDs such as Diclofenac¹¹, Naproxen¹², as well as coxibs such as celecoxib¹³. COX-2 is induced by inflammation, while COX-1 is physiological. The X-ray crystallographic structure of ibuprofen bound to cyclooxygenase-2 (4PH9) (*Mus musculus*)¹⁴, was obtained from the Protein Data Bank (PDB) (<http://www.rcsb.org>) with a resolution <3.00 Å (resolution: 1.81 Å, free R-value: 0.197, working R-value: 0.160, observed R-value: 0.162). This file is not directly used by the Autodock 1.5.6 tools. It was first visualized using Discovery Studio Visualizer version 2.5.5.

Discovery Studio is a software package of biological molecular design for chemists and computational biologists. (Discovery Studio 2.5 (CDOCKER Dock, Dassault Systemes BIOVIA, USA). Water molecules, ligands and other heteroatoms have been removed from the protein. This crystallographic structure has been preserved without any treatment for molecular docking. Co-crystallized inhibitors/substrates (ibuprofen) were used to define the corresponding active site, the flexible residues within this active site is a criterion for the validation of mooring calculations (re-docking). By a literature review, common residues involved in the binding site were identified^{10, 15, 12, 16, 14}. The PDB file of the protein has been efficiently prepared using the AutoDock / Vina (Molecular Graphics Lab, Le plugin Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA), and saved as pdbqt file. Polar hydrogens and Kollman charges have been added.

Preparation of the Ligand: The necessary information about hydroxychloroquine was collected on the ChemSpider platform (<http://www.chemspider.com/>): Hydroxychloroquine (Molecular formula: C₁₈H₂₆ClN₃O, Average mass: 335.871 Da, Monoisotopic mass: 335.176453 Da, ChemSpider ID: 3526). - Chloroquine (Molecular formula C₁₈H₂₆ClN₃, Average mass 319,872 Da, Monoisotopic mass 319.181519 Da, ChemSpider ID: 2618). Their chemical structures are almost similar to¹⁷. These two anti-malarial and anti-rheumatic drugs have antiviral activity *in-vitro*. Chloroquine interferes with different stages of the viral life cycle¹⁸. The 3D structure of the Ligand was downloaded from the Drugbank database (<https://www.drugbank.ca/>): Access number DB01611. Then the identification and verification were performed on Discovery Studio Visualizer version 2.5.5. The ligand was then exported to AutoDock tools 1.5.6. Torsional connections have been verified. The ligand was saved in the same docking folder in pdbqt format. Charges were then added.

Molecular Docking Protocol: Docking calculations were performed using the standard AutoDock Vina parameters. AutoDock Vina docking programme is generally in the top position among all the methods tested in CASF-2013. Vina is the best of all methods in terms of reception power. Ligand minimisation has a significant impact, reducing the performance difference between AutoDock and Vina¹⁹. The active site was placed in a 40 × 50 × 40 Å grid box, in the geometrical center of the set of selected flexible residues at 0.375 Å as the grid spacing. Values of the root mean square deviation (RMSD) between the docking and the initial poses have been calculated. Results of the docking were initially examined in Discovery Studio. (Discovery Studio 2.5 (CDOCKER Dock, Dassault Systemes BIOVIA, USA). The best poses were ranked according to Vina scores (kcal/mol), evaluated by the free bond energies (score S, kcal/mol) and the binding interactions between the ligand atom and the residues of the active site. To predict the bioactivity of hydroxychloroquine for cox2 receptors, we used Molinspiration (<https://www.molinspiration.com/>). This server predicts bioactivity score for the most important therapeutic targets such as GPCR receptors, kinase inhibitors, ion channel modulators, enzymes, and nuclear receptors²⁰. SwissADME database (<http://www.swissadme.ch/index.php>) was used to compare physiochemical properties, ADME parameters and pharmacokinetic properties of hydroxychloroquine

with certain anti-inflammatory drugs. Smiles (chemical structure) for each structure were downloaded from the Drug Bank database (Drugbank.ca/). Statistical analyses (mean and standard deviation) were performed using Minitab statistical software Version 16. Mann-Whitney test was used to comparison of median Docking values.

RESULTS AND DISCUSSION:

Identification of the COX2 Interaction Site:

Each COX isoform is considered as heterodimer

with a catalytic site and an allosteric site ²¹. Inhibitors may act at one or both sites, depending on the structure and concentration of the inhibitor ²². Whatever the site, binding requires that a small molecule must first enter through the binding domain to the four-helix membrane in an open area called the "lobby" ²³. As shown in **Fig. 1a** and **1b**, Ibuprofen was first identified in the pocket of the COX2 enzyme binding site.

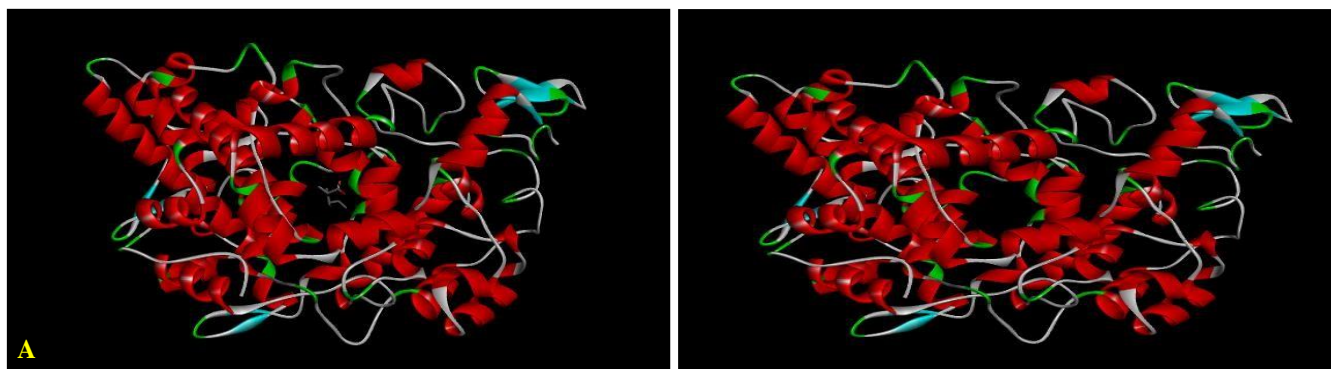


FIG. 1: COX2 POCKET (1A: BINDING IBUPROFEN, 1B FREE)

Interactions between COX2-Ibuprofen have been illustrated in Fig. 2a and 2b.

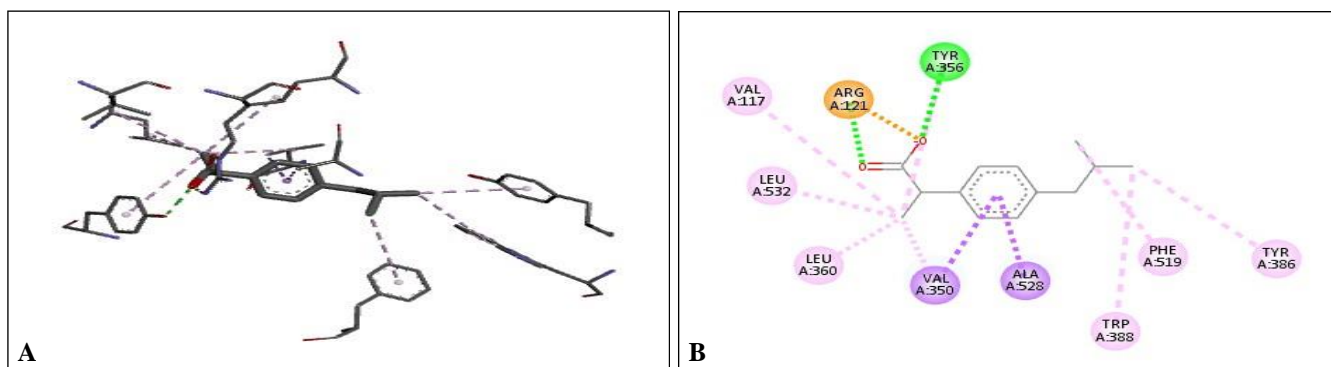


FIG 2: A AND B: RECEIVER-LIGAND INTERACTIONS ON A 2D DIAGRAM

Coordinates of the Grid Box (X, Y, Z points, dimensions and spacing) used for the Ibuprofen-COX2 model (shown in **Fig. 3**) have been noted to

help identify the Hydroxychloroquine-COX2 interaction. Prepared hydroxychloroquine must first enter through the open area called the "hall" **Fig. 4**.

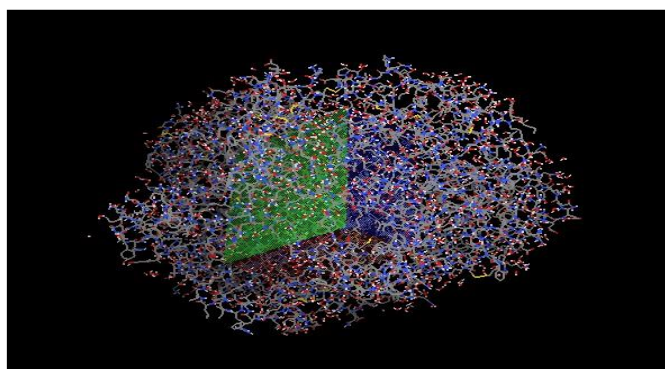


FIG. 3: GRID BOXIBUPROFEN-COX2

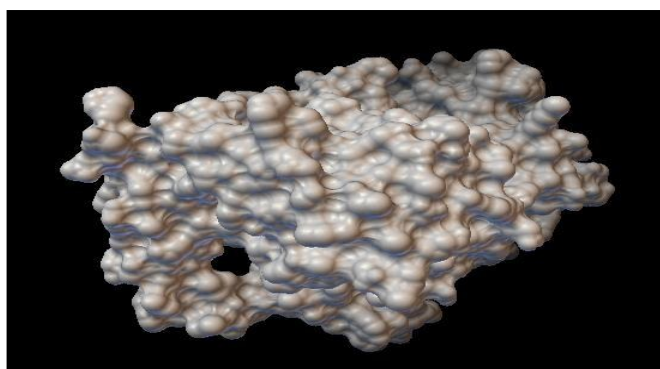


FIG. 4 : PREPARED RECEPTOR (COX2)

Molecular Docking Simulations: Molecular docking was chosen as the first choice as a method of discrimination of the hydroxychloroquine-COX2 interaction due to the ability to simulate the binding of small compounds in the active site of enzymes, based on *in-silico* prediction of putative competitors.

In our work, the active site was identified in the A chain of COX2 of ibuprofen bound COX2 structure. Our simulations involved only a single monomer, as some works²⁵, or others that have focused on a smaller fragment of protein, as the membrane-binding domain²⁶, or the membrane binding domain and helices comprising active site of cyclooxygenase²⁷. In addition, previous studies have indicated that many NSAIDs (including IBP) bind tightly to a single monomer of COX-2 dimer and allosterically inhibit the oxygenation of the substrate in the partner monomer^{28, 29}.

Binding affinities of the different poses in the COX2 active site A validation docking of crystal structure of murine (mu) COX-2 in complex with Ibuprofen (IBP)¹⁴. (PDB ID: 4PH9) (<http://www.rcsb.org/pdb>) was performed on Autodock vina after viewing on discovery studio and treatment of the ligand and receptor. Results are shown in **Table 1**.

TABLE 1: RESULTS OF THE BEST MOLECULAR DOCKING POSES: IBUPROFEN-COX2

Mode	Affinity (kcal / mol)	Distribution of RMSD	Best mode RMSD
1	-7,3	22,181	23,884
2	-6,4	22,236	23,890
3	-6,3	21,384	22,730
4	-6,3	22,279	23,833
5	-6,2	14,475	15,595
6	-6,1	23,055	24,780
7	-6,1	16,577	17,580
8	-6,0	25,852	27,421

Complex formed by Ibuprofen (pose 1) -COX 2 of experimental model of Orlando and al has the lowest energy value and shows the best mooring score (Affinity: -7.3 (kcal/mol) with a root mean

TABLE 3: PARAMETER OF THE MANN-WHITNEY TEST

Complex	Median affinity (kcal/mol)	Average affinity (kcal/mol)	Standard deviation (kcal/mol)	Maximum affinity (kcal/mol)	Minimum affinity (kcal/mol)	Coefficient of variation
Hydroxychloroquine/COX2	-6,350	-6,625	0,6671	-7,6	-6,0	0,1
Ibuprofene/COX2	-6,250	-6,3375	0,4103	-7,3	-6,0	0,06

square deviation of (RMSD = 23.884). Docking results of all hydroxychloroquine poses with the target (COX 2) are shown in **Table 2**.

TABLE 1: DOCKING RESULTS OF ALL HYDROXYCHLOROQUINE POSES WITH THE TARGET (COX 2)

Mode	Affinity (kcal / mol)	Distribution of RMSD	Best mode RMSD
1	-7,6	1,816	2,542
2	-7,3	4,402	8,010
3	-7,3	2,936	4,617
4	-6,5	3,815	5,854
5	-6,2	11,579	14,151
6	-6,1	10,063	13,409
7	-6,0	12,299	15,319
8	-6,0	13,774	16,865

Mann-Whitney test **Table 3** reveals that the median affinity of the Hydroxychloroquine/COX2 complex (-6,350 kcal/mol) is significantly higher than the median affinity of the complex of the model crystallized by Orlando *et al.*, in 2015: Ibuprofen /COX2 (-6,250 kcal/mol), (P-Value= 0.6712), IC (95%): (-0.200; 1.200).

Pose that has the lowest binding energy of the docking score will be considered the best pose and inhibits the target receptor because lower binding energy corresponds to higher binding affinity³⁰. Comparison of the pose-complex scores revealed that the complex formed by Hydrochloroquine (pose1) -COX 2 has the lowest energy value and gives the best docking score (Affinity: -7.6 (kcal/mol) with the best root mean square deviation (RMSD = 2.542). Hydroxychloroquine -COX 2 complex can be considered to be stable with a higher binding affinity.

Based on these docking results, we can classify hydroxychloroquine as a good inhibitor of the COX2 enzyme. 3D representations of the best pose interactions between poses and receptor were visualized using Discovery studio software. The COX2-hydroxychloroquine poses formed are shown in **Fig. 5**.

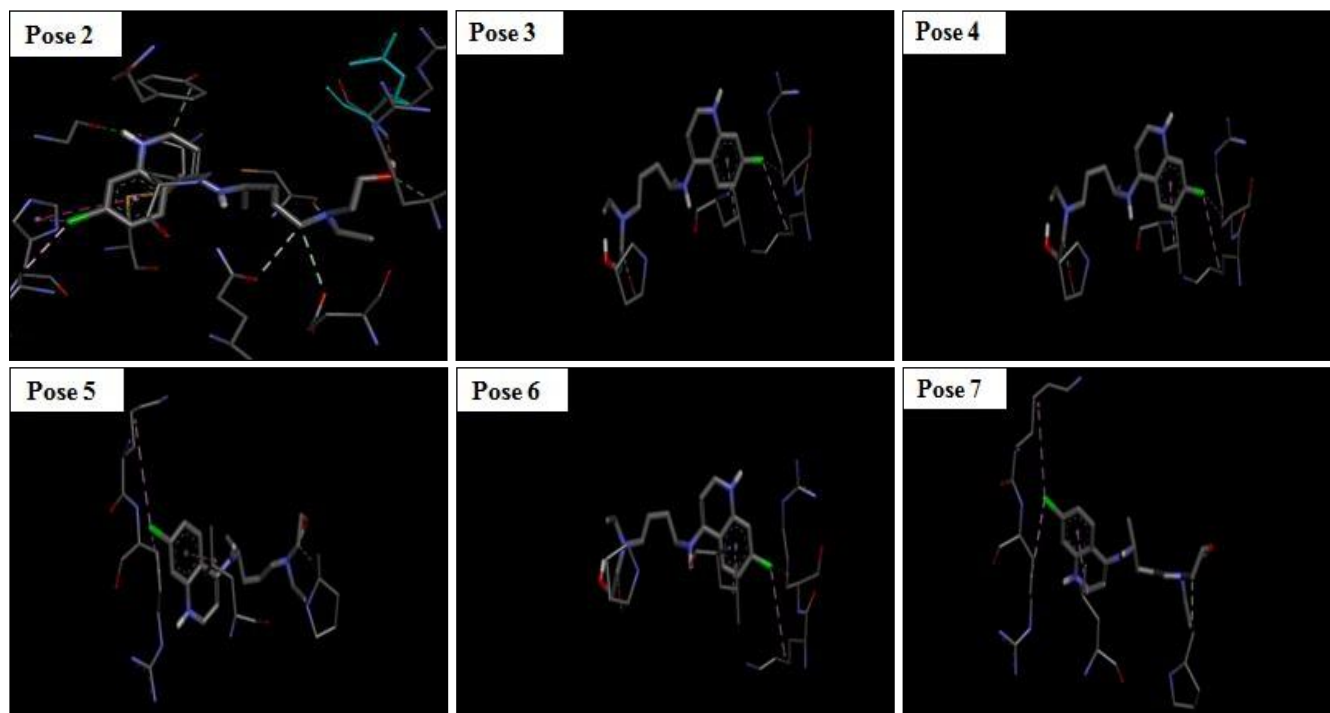


FIG. 5: COX2-POSES COMPLEXES FORMED (COX2 BOUND TO HYDROXYCHLOROQUINE)

Binding mode observed for the best pose with receptor pocket is shown in **Fig. 6, 7**.

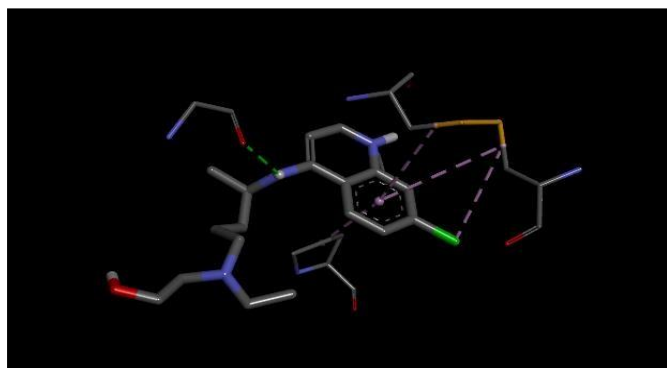


FIG. 6: 3D VIEW OF HYDROXYCHLOROQUINE (POSE1) - COX2 INTERACTION

Types of interactions, bonds, and amino acids involved in the Hydroxychloroquine-COX2 complex are shown in **Table 4**. Hydroxychloroquine binds to COX2 through two hydrogen bonds (in H-GLY136 and H-GLY45) and four hydrophobic bonds: Cl -CYS36, O -CYS36, O -CYS47, and O -PRO154) at different distances (2.68043 Å, 2.46642 Å, 4.47781 Å, 5.06953 Å, 4.66876 Å and 4.23862 Å, respectively). Glycine with a hydrogen (H) radical is devoid of any hydrophobic or hydrophilic character. GLY45 and GLY136 bind to hydroxychloroquine through hydrogen bonds, H-GLY136 and H-GLY45). Cysteine is hydrophobic, but its SH group binds to another cysteine to produce a strong (covalent) bond, the disulfide bridge. CYS36 and CYS47 are involved in

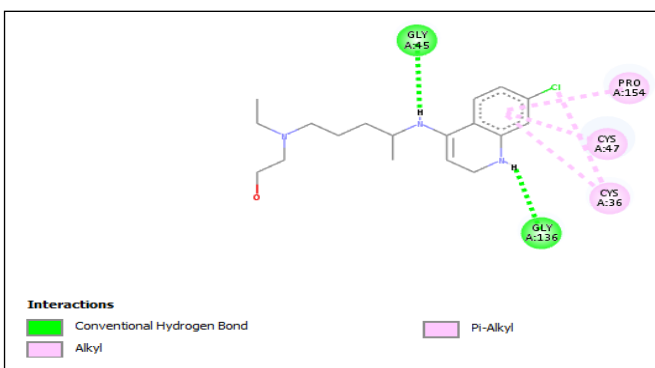


FIG. 7: 2D VIEW OF HYDROXYCHLOROQUINE (POSE1) - COX2 INTERACTION

hydrophobic bonds with hydroxychloroquine. Interestingly, CYS36 is doubly committed, with oxygen and chlorine atoms of hydroxychloroquine. Although the physiological significance of chloride binding at this position is unknown, chloride ions have previously been used to identify the molecular oxygen binding site in various proteins, including dioxygenases^{31, 32}. This raises the possibility that the chloride ion may be indicative of the position of molecular oxygen prior to incorporation into COX substrates. In addition, proline (PRO154), which is highly hydrophobic, binds like CYS36 and CYS47 to the oxygen atom of hydroxychloroquine. Arylcarboxylic acid inhibitors bind in one of two orientations of the COX active site¹². Flurbiprofen binds canonically with its hydrogen paired carbo-

xylate fraction to the Arg-120 and Tyr-355 residues constriction site¹². In contrast, diclofenac binds in an inverted orientation in which its carboxylate is hydrogen-bonded to the side chains of Tyr-385 and Ser-530¹¹. Ibuprofen occupies an area of the enzyme between the opening of the substrate channel and the top of the active site. A total of thirteen contacts is made between the isobutyl

group of ibuprofen and Trp-387, Met-522, Val-523, Gly-526, Ala-527, and Ser-530. In addition, the α -methyl group of ibuprofen makes contact with Val-349 and Leu-359¹⁴. Rofecoxib binds to the active site of cyclooxygenase in the same general conformation as observed for celecoxib¹⁶. Rofecoxib makes a total of 42 contacts with residues lining the cyclooxygenase channel³³.

TABLE 4: TYPES OF INTERACTIONS, BONDS AND AMINO ACIDS INVOLVED: HYDROXYCHLOROQUINE-COX2

Nom	Distance	Catégories	Types	From	From chemistry	To	To chemistry	Angle DHA	Angle HAY
:UNK0:H5 - A:GLY136:O	2,68043	Hydrogen Bond	Conventional Hydrogen Bond	:UNK0:H5	H-Donor	A:GLY136:O	H-Acceptor	104,688	154,153
:UNK0:H31 - A:GLY45:O	2,46642	Hydrogen Bond	Conventional Hydrogen Bond	:UNK0:H31	H-Donor	A:GLY45:O	H-Acceptor	136,328	138,467
:UNK0:Cl - A:CYS36	4,47781	Hydrophobic	Alkyl	:UNK0:Cl	Alkyl	A:CYS36	Alkyl		
:UNK0 - A:CYS36	5,06953	Hydrophobic	Pi-Alkyl	:UNK0	Pi-Orbitals	A:CYS36	Alkyl		
:UNK0 - A:CYS47	4,66876	Hydrophobic	Pi-Alkyl	:UNK0	Pi-Orbitals	A:CYS47	Alkyl		
:UNK0 - A:PRO154	4,23862	Hydrophobic	Pi-Alkyl	:UNK0	Pi-Orbitals	A:PRO154	Alkyl		

Prediction of Bioactivity: The diversity of possible drug targets (each of which requires a different combination of corresponding molecular characteristics) is so enormous. To predict the bioactivity of hydroxychloroquine for different receptors, we used Molinspiration (<https://www.molinspiration.com/>). This server predicts the bioactivity score for the most important therapeutic

targets such as GPCR receptors, kinase inhibitors, ion channel modulators, enzymes, and nuclear receptors²⁰. The bioactivity of a compound was decided based on the bioactivity score. If the bioactivity score is > 0, it is an active compound while < -5.0 is an inactive compound, and the range between -5.0 and 0.0 corresponds to moderately active compounds³⁴.

TABLE 5: PREDICTION OF THE BIOACTIVITY OF HYDROXYCHLOROQUINE AND OTHER NONSTEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY DRUGS

Molecules	GPCR Ligand	Ion channel	Kinase inhibitor	nuclear receptor	Protease inhibitor	Enzyme inhibitor
hydroxychloroquine	0,35	0,30	0,44	-0,12	0,12	0,15
Ibuprofen	-0,17	-0,01	-0,72	0,05	-0,21	0,12
Diclofenac	0,14	0,20	0,17	0,09	-0,10	0,25
Naproxène	-0,11	-0,06	-0,38	0,14	-0,26	0,15
Piroxicam	-0,42	-0,57	-0,50	-0,73	-0,04	0,18
Célécoxib	-0,06	-0,27	0,01	-0,28	-0,06	0,17

Hydroxychloroquine was the only one to show high activity against more than one target receptor. (GPCR, kinase inhibitors, ion channel modulators, protease inhibitor, and enzyme inhibitor) in **Table 5** (bioactivity greater than zero). In drug discovery, activity against multiple targets means that a molecule will have multiple side effects. Further proof of our docking results, hydroxychloroquine is a COX2 enzyme inhibitor (bioactivity as an enzyme inhibitor : 0.15), like other NSAIDs whose enzymatic inhibitory bioactivity is between 0.12 and 0.25. Hydroxychloroquine is active on GPCR ligand receptors (bioactivity : 0.35). Impact of GPCR structures on drug discovery is very

important. Structure-based drug design has been applied to an increasing number of GPCR targets over the last decade³⁵. Hydroxychloroquine was also active on modulating ion channel receptors (bioactivity : 0.30). Ligand-dependent ion channels are also pharmacological targets for the development of new therapies³⁶. For receptors of kinase inhibitors, the bioactivity of hydroxychloroquine is 0.44). Receptor tyrosine kinases are key regulators of cellular processes and their role in the pathophysiology of many diseases is well recognized³⁷. The structure of hydroxychloroquine, which differs from that of nonsteroidal anti-inflammatory drugs, tends to show activity against

a wide variety of biological targets. On this fact, it is sometimes said that such a compound has a promiscuous behavior. Several drugs may be promiscuous, especially in the case of drug reuse³⁸, which could explain the cardiovascular effects related to the repositioning of hydroxychloroquine in hypertensive patients during COVID 19 infection.

Pharmacokinetics of Hydroxychloroquine: The SwissADME database (Swissadme.ch/index.php) was used to compare physicochemical data and

pharmacokinetic properties of hydroxychloroquine with certain anti-inflammatory drugs. The smiles (chemical structure) of each structure were downloaded from the Drugbank database (Drugbank.ca). First, we checked whether the molecules comply with the conditions of the following five Lipinski rules³⁹): molecular weight: ≤ 500 , number of hydrogen bond donors: ≤ 5 , number of hydrogen bond acceptors: ≤ 10 , lipophilicity (in LogP): ≤ 5 . Lipinsky's rule analysis with SwssADME in **Table 6**.

TABLE 6: LIPINKY'S RULE FOR HYDROXYCHLOROQUINE AND CERTAIN NONSTEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY DRUGS

Molecules	Formula	Molecular weight (g / mol)	Number of H Acceptors	Number of H donors	LogP
Hydroxychloroquine	<chem>C18H26ClN3O</chem>	335.87	3	2	3.87
Ibuprofen	<chem>CC(C)CC(=O)C(C)C(O)=O</chem>	206.28	2	1	3.5
Diclofenac	<chem>OC(=O)C1=CC=CC=C1NC1=C(C)C=CC=C1Cl</chem>	296.15	2	2	4.98
Naproxène	<chem>COC1=CC2=C(C=C1)C=C(C=C2)[C@H](C)C(O)=O</chem>	230.26	3	1	3.29
Piroxicam	<chem>CN1C(C(=O)NC2=NC=CC=C2)=C(O)C2=C(C=CC=C2)S1(=O)=O</chem>	331.35	5	2	2.2
Célécoxib	<chem>CC1=CC=C(C=C1)C1=CC(=NN1)C1CC=C(C=C1)S(N)(=O)=O</chem>	381.37	7	1	3.99

As much as other NSAIDs, hydroxychloroquine respects the lipinski rule **Table 6**. Ibuprofen, diclofenac, naproxen, piroxicam and cecoxib have the following molecular weights, respectively: 335.87, 206.28, 296.15, 230.26, 331.35, 381.37), g/mol, they all have a molecular weight ≤ 500 g/mol. By comparing the lipophilicity (LogP) values of our ligands, we observed that they all have values below 5 and therefore can be easily absorbed. However, all ligands have a number of hydrogen bond donors: ≤ 5 , a number of hydrogen bond acceptors: ≤ 10 . The fact that hydroxychloroquine is taken into account for the management of COVID-19 patients clearly highlights the need to better understand its pharmacokinetics. The bioavailability after oral administration of hydroxychloroquine can reach 80% with a plasma peak of approximately 2 to 4 hours. Its large volume of distribution (200 to 800 L / kg) explains its long half-life, which could range from 30 to 60 days^{40, 41}. Hydroxychloroquine are metabolized *via* CYP-450 enzymes into other active compounds, which are responsible for extensive pharmacological actions and increased toxicity. Hydroxychloroquine is mainly excreted via the kidneys (60%) as unchanged or

metabolized, and the remainder (40%) is usually eliminated by the liver, feces and skin or stored in other lean body tissues⁴².

CONCLUSION: In view of the cardiovascular effects reported in hypertensive patients, particular attention should be paid to repositioned hydroxychloroquine in the treatment of COVID 19. Our results reveal for the first time in atomic detail how hydrochloroquine, one of the most controversial drugs binds to a new molecular target (COX2) with a mooring core (Affinity: -7.6 kcal/mol) and a root mean square deviation (RMSD = 2.542). Hydroxychloroquine has been shown to be promiscuous. Its structure, which differs from that of non-steroidal anti-inflammatory drugs, tends to show activity against a wide variety of biological targets. This discovery improves the understanding of its mechanism of action and the adverse effects attributed to it.

REFERENCES:

- Vellingiri B, Jayaramayya K, Iyer M, Narayanasamy A, Govindasamy V, Giridharan B, Ganesan S, Venugopal A, Venkatesan D, Ganesan H, Rajagopalan K, Rahman P, Cho SG, Kumar NS and Subramaniam MD: Covid-19: A promising cure for the global panic. Sci Total Environ 2020; 725: 138277.

2. Chen J, Lu H, Melino G, Boccia S, Piacentini M, Ricciardi W, Wang Y, Shi Y and Zhu T: Covid-19 infection: The china and italy perspectives. *Cell Death Dis* 2020; 11: 438.
3. WHO. Who announces covid-19 epidemic a pandemic. World Health Organization, Genève, Suisse 2020.
4. Ferner RE and Aronson JK: Chloroquine and hydroxychloroquine in covid-19. *Bmj* 2020; 369: m1432
5. Zhai P, Ding Y, Wu X, Long J, Zhong Y and Li Y: The epidemiology, diagnosis and treatment of covid-19. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2020; 55: 105955.
6. Yao X, Ye F, Zhang M, Cui C, Huang B, Niu P, Liu X, Zhao L, Dong E, Song C, Zhan S, Lu R, Li H, Tan W and Liu D: *In-vitro* antiviral activity and projection of optimized dosing design of hydroxychloroquine for the treatment of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (sars-cov-2). *Clin Infect Dis* 2020; 71: 732-39.
7. Devaux CA, Rolain JM, Colson P and Raoult D: New insights on the antiviral effects of chloroquine against coronavirus: What to expect for covid-19? *International Journal of Antimicrobial Agents* 2020; 55: 105938.
8. Guastalegname M and Vallone A: Could chloroquine /hydroxychloroquine be harmful in coronavirus disease 2019 (covid-19) treatment? *Clin Infect Dis* 2020; 71: 888-89.
9. Day M: Covid-19: Ibuprofen should not be used for managing symptoms, say doctors and scientists. *Bmj* 2020; 368: m1086.
10. Kiefer JR, Pawlitz JL, Moreland KT, Stegeman RA, Hood WF, Gierse JK, Stevens AM, Goodwin DC, Rowlinson SW, Marnett LJ, Stallings WC and Kurumbail RG: Structural insights into the stereochemistry of the cyclooxygenase reaction. *Nature* 2000; 405: 97-101.
11. Rowlinson SW, Kiefer JR, Prusakiewicz JJ, Pawlitz JL, Kozak KR, Kalgutkar AS, Stallings WC, Kurumbail RG, Marnett LJ: A novel mechanism of cyclooxygenase-2 inhibition involving interactions with ser-530 and tyr-385. *Journal of Biological Chemistry* 2003; 278: 45763-769.
12. Duggan KC, Walters MJ, Musee J, Harp JM, Kiefer JR, Oates JA and Marnett LJ: Molecular basis for cyclooxygenase inhibition by the non-steroidal anti-inflammatory drug naproxen. *Journal of Biological Chemistry* 2010; 285: 34950-959.
13. Wang JL, Limburg D, Graneto MJ, Springer J, Hamper JRB, Liao S, Pawlitz JL, Kurumbail RG, Maziasz T and Talley JJ: The novel benzopyran class of selective cyclooxygenase-2 inhibitors. Part 2: The second clinical candidate having a shorter and favorable human half-life. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2010; 20: 7159-63.
14. Orlando BJ, Lucido MJ and Malkowski MG: The structure of ibuprofen bound to cyclooxygenase-2. *J Struct Biol* 2015; 189: 62-66.
15. Rowlinson SW, Kiefer JR, Prusakiewicz JJ, Pawlitz JL, Kozak KR, Kalgutkar AS, Stallings WC, Kurumbail RG and Marnett LJ: A novel mechanism of cyclooxygenase-2 inhibition involving interactions with ser-530 and tyr-385. *J Biol Chem* 2003; 278: 45763-769.
16. Wang JL, Carter J, Kiefer JR, Kurumbail RG, Pawlitz JL, Brown D, Hartmann SJ, Graneto MJ, Seibert K and Talley JJ: The novel benzopyran class of selective cyclooxygenase-2 inhibitors-part i: The first clinical candidate. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2010; 20: 7155-58.
17. Zhou D, Dai SM, Tong Q. COVID-19: a recommendation to examine the effect of hydroxychloroquine in preventing infection and progression. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2020 Jul 1;75(7):1667-70 .
18. Yan Y, Zou Z, Sun Y, Li X, Xu K-F, Wei Y, Jin N and Jiang C: Anti-malaria drug chloroquine is highly effective in treating avian influenza a h5n1 virus infection in an animal model. *Cell Research* 2013; 23: 300-02.
19. Gaillard T: Evaluation of autodock and autodock vina on the casf-2013 benchmark. *Journal of Chemical Information and Modeling* 2018; 58: 1697-1706.
20. Ertl P, Rohde B and Selzer P: Fast calculation of molecular polar surface area as a sum of fragment-based contributions and its application to the prediction of drug transport properties. *J Med Chem* 2000; 43: 3714-17.
21. Mitchener MM, Hermanson DJ, Shockley EM, Brown HA, Lindsley CW, Reese J, Rouzer CA, Lopez CF and Marnett LJ: Competition and allostery govern substrate selectivity of cyclooxygenase-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2015; 112: 12366-371.
22. Dong L, Sharma NP, Jurban BJ and Smith WL: Pre-existent asymmetry in the human cyclooxygenase-2 sequence homodimer. *Journal of Biological Chemistry* 2013; 288: 28641-655.
23. Picot D, Loll PJ and Garavito RM: The x-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin h2 synthase-1. *Nature* 1994; 367: 243-49.
24. Wu CH, Arighi CN, Ross KE. *Protein Bioinformatics : From Protein Modifications and Networks to Proteomics*, Springer New York. *Methods in Molecular Biology* 2017 Feb 3; 472.
25. Cukier RI and Seibold S: Molecular dynamics simulations of prostaglandin endoperoxide h synthase-1. Role of water and the mechanism of compound i formation from hydrogen peroxide. *The Journal of Physical Chemistry B* 2002; 106: 12031-44.
26. Nina M, Bernèche S and Roux B: Anchoring of a monotopic membrane protein: The binding of prostaglandin H₂ synthase-1 to the surface of a phospholipid bilayer. *Eur Biophys J* 2000; 29: 439-54.
27. García-Nieto R, Pérez C and Gago F: Automated docking and molecular dynamics simulations of nimesulide in the cyclooxygenase active site of human prostaglandin-endoperoxide synthase-2 (cox-2). *J Comput Aided Mol Des* 2000; 14: 147-60.
28. Dong L, Vecchio AJ, Sharma NP, Jurban BJ, Malkowski MG and Smith WL: Human cyclooxygenase-2 is a sequence homodimer that functions as a conformational heterodimer. *J Biol Chem* 2011; 286: 19035-46.
29. Duggan KC, Hermanson DJ, Musee J, Prusakiewicz JJ, Scheib JL, Carter BD, Banerjee S, Oates JA and Marnett LJ: (r)-profens are substrate-selective inhibitors of endocannabinoid oxygenation by cox-2. *Nat Chem Biol* 2011; 7: 803-09.
30. Simon L, Imane A, Srinivasan K, Pathak L and Daoud I: *In-silico* drug-designing studies on flavanoids as anticancer agents: Pharmacophore mapping, molecular docking, and monte carlo method-based qsar modeling. *Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences* 2017; 9: 445-58.
31. Colloc'h N, Gabison L, Monard G, Altarsha M, Chiadmi M, Marassio G, Sopkova-de Oliveira Santos J, El Hajji M, Castro B, Abraini JH and Prangé T: Oxygen pressurized x-ray crystallography: Probing the dioxygen binding site in cofactorless urate oxidase and implications for its catalytic mechanism. *Biophys J* 2008; 95: 2415-22.
32. Steiner RA, Janssen HJ, Roversi P, Oakley AJ and Fetzner S: Structural basis for cofactor-independent dioxygenation of n-heteroaromatic compounds at the alpha/beta-hydrolase fold. *Pro Nat Aca Sci U S A* 2010; 107: 657-62.

33. Marnett LJ: The coxib experience: A look in the rearview mirror. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2009; 49: 265-90.
34. Balakrishnan N and Raj NK: *In-silico* studies on new indazole derivatives as gsk-3 β inhibitors". *International J of Pharmacy and Pharmaceutical Sci* 2015; 7: 295-99.
35. Congreve M, de Graaf C, Swain NA and Tate CG: Impact of gpcr structures on drug discovery. *Cell* 2020; 181: 81-91.
36. Lara CO, Burgos CF, Moraga-Cid G, Carrasco MA and Yévenes GE: Pentameric ligand-gated ion channels as pharmacological targets against chronic pain. *Frontiers in Pharmacology* 2020; 11: 167.
37. Pottier C, Fresnais M, Gilon M, Jérusalem G, Longuespée R and Sounni NE: Tyrosine kinase inhibitors in cancer: Breakthrough and challenges of targeted therapy. *Cancers* 2020; 12: 731.
38. Gupta MN, Alam A and Hasnain SE: Protein promiscuity in drug discovery, drug-repurposing and antibiotic resistance. *Biochimie* 2020; 175: 50-57.
39. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW and Feeney PJ: Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev* 2001; 46: 3.
40. Rainsford K, Parke AL, Clifford-Rashotte M and Kean W: Therapy and pharmacological properties of hydroxy-chloroquine and chloroquine in treatment of systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and related diseases. *Inflammopharmacology* 2015; 23: 231-69.
41. Yamada Y, Hidefumi K, Shion H, Oshikata M and Haramaki Y: Distribution of chloroquine in ocular tissue of pigmented rat using matrix-assisted laser desorption/ionization imaging quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2011; 25: 1600-08.
42. Kalia S and Dutz JP: New concepts in antimalarial use and mode of action in dermatology. *Dermatologic Therapy* 2007; 20: 160-74.

How to cite this article:

Merad-Boudia HN, Dali-Sahi M, Guermouche B and Dennoun-Medjati N: *In-silico* study: COX2 (cyclo-oxygenase 2), an unknown target of hydroxychloroquine repositioned for the treatment of Covid 19 infection and cardiovascular effects. *Int J Pharm Sci & Res* 2021; 12(2): 1000-09. doi: 10.13040/IJPSR.0975-8232.12(2).1000-09.

All © 2013 are reserved by the International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. This Journal licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 Unported License.

This article can be downloaded to **Android OS** based mobile. Scan QR Code using Code/Bar Scanner from your mobile. (Scanners are available on Google Playstore)

**Chapitre 8 : Exhaustive Review of Studies in Silico Conducted
in the Fight against COVID-19 that involved
Hydroxychloroquine and/or Chloroquine alone, in
Combination or Compared to other Therapeutic Agents**

Chapitre 8 : Revue exhaustive des études in Silico menées dans la lutte au COVID-19 qui ont engagé l'hydroxychloroquine et ou chloroquine seule, combinée ou comparés à d'autres agents thérapeutiques

Introduction

En Mars 2020, les gouvernements du monde entier étaient mis en garde quant aux conséquences potentielles d'un relâchement prématuré des interventions. Des études ont prouvé par modélisation que le résultat d'une telle décision pouvait conduire à une hausse de contagiosité supérieure à 1. C'est-à-dire une deuxième vague d'infection (Leung et al., 2020). Une situation que nous vivons aujourd'hui.

Les sociétés pharmaceutiques créent habituellement des programmes de médicaments autour du concept : Besoin médicaux non satisfaits (pour des problèmes de santé insuffisamment traités). Les principales conditions du programme : Besoin médical non satisfaits sont :

- Une maladie sans traitement existant ou satisfaisant.
- Une demande urgente d'une thérapie efficace qui touche de plus en plus les patients.

Ce concept est parfaitement applicable à la pandémie actuelle au COVID 19. Pour déterminer un besoin médical non satisfait, il faut comprendre la maladie, les thérapies disponibles et les éventuelles lacunes dans les traitements. Actuellement, les stratégies potentielles de lutte contre la COVID 19 se résument autour des antiviraux, des corticostéroïdes, de plasma de convalescence et des vaccins. (Shamim et al., 2020) .

Plusieurs essais sont en cours (Davis et al., 2020) , mais plusieurs questions se posent , notamment , la production d'anticorps neutralisants ou pas , la durabilité de l'immunité , la réinfection et l'innocuité des nouveaux traitements. Dans ce contexte, les études in silico prennent une place particulière dans la lutte contre la COVID 19 .

Ces dernières optimisent le temps et le cout de la recherche et offrent de nouvelles perspectives dans le développement et le repositionnement des médicaments.

Cette revue exhaustive, tente d'examiner toutes les approches in silico abordées depuis le début de la lutte contre la COVID 19.

Méthodes

Etant donné le caractère nouveau et récent de cette pandémie au covid-19 . Le filtre de recherche a été ajusté sur les données disponibles depuis le début de la pandémie (c'est-à-dire durant l'année écoulée) et mis a jour jusqu'au 31 octobre 2020.

Compte tenu du développement rapide du domaine et de la diffusion accélérée des découvertes scientifiques concernant COVID-19, plus de 20 000 articles ont été publiés.

Pour répondre à l'objectif principal, une recherche exhaustive a été effectuée sur toutes les études *in Silico* menées dans la lutte au COVID-19 qui ont impliqué l'hydroxychloroquine et ou chloroquine seule, combinée ou comparés à d'autres agents thérapeutiques. La requête Pubmed a été effectuée pour les études concernant le SRAS-CoV-2 en utilisant les mots clés (MeshData) suivants : Hydroxychloroquine and molecular docking and covid 19 .

La base de données Pubmed a été consultée sans restriction linguistique. Après avoir examiné le titre et le résumé 42 études en texte intégral ont été récupérées. 40 études répondant aux critères d'inclusion ont été retenues.

Pour l'identification des ligands étudiés les banques de données Drug bank (<https://go.drugbank.com/>) et chemspider (<http://www.chemspider.com/>) ont été consultés. La banque de données Proteines Data Bank (pdb) (<https://www.rcsb.org/>) a été consultée pour les cibles étudiées. Les recherches sur les plantes, les produits chimiques, la bioactivité et l'ethnobotanique ont été effectuées sur la base de données phytochimiques et ethnobotaniques actuelles de Dr Duke (US Department of Agriculture, Agricultural Research Service. 1992-2016. Bases de données phytochimiques et ethnobotaniques du Dr Duke. :, <https://phytochem.nal.usda.gov/>).

La base de données PubChem a été aussi consultée (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) .

Résultats

Étaient utilisés comme ligands :

-La Chloroquine, l'hydroxychloroquine , dérivés d'imidazole à base de 7-chloro-4-aminoquinoléine, analogues de la 4-aminoquinoléine et de la 8-aminoquinoléine de la chloroquine., leur pharmacophore. (Hathout et al., 2020) , (Celi et al., 2020) , (Baidya et al., 2020) , (Nimgampalle et al., 2020) , (Wang et al., 2020) , (Mukherjee et al., 2020) , (Beck et al., 2020) , (Gentile et al., 2020) , (Belhassan et al., 2020) , (Achutha et al., 2020) , (Beura and Chetti, 2020) , mais aussi combiné à l'azithromycine (Fantini et al., 2020) , (Braz et al., 2020)

- Les antiviraux seuls ou versus hydroxychloroquine (Silva Arouche et al., 2020) , (Elfiky, 2020) , (Skariyachan et al., 2020)

-Les produits naturels phytochimiques , flavonoides et non flavonoides (Hamza et al., 2020) , (Maiti et Banerjee, 2020) , (Gandhi et al., 2020) , (Pandey et al., 2020) , (Dave et al., 2020) , (Basu et al., 2020) , (Kumar et al., 2020) , (Abdelli et al., 2020) , (Enmozhi et al., 2020) La Caulerpine et ses dérivés comme médicament d'appoint contre les protéines réceptrices du SRAS-CoV-2 , ou en comparaison avec la chloroquine, l'hydroxychloroquine, l'azithromycine, le remdesivir, le baloxvir, le lopinavir et le favipiravir (Ahmed et al., 2020) , (Abdelrheem et al., 2020) une molécule hybride «VTAR» conçu de novo basée sur des fragments de molécules sélectionnées, à savoir l'ascorbate, la ribavirine, le lopinavir et l'hydroxychloroquine (Tiwari, 2020)

Analogues synthétiques (notamment de la coumarine) (Chidambaram et al., 2020). Produits issus du criblage structure cristalline de la protéase principale COVID-19 en complexe avec d'autres produits (Rajagopal et al., 2020)

-Le repositionnement ou réutilisation : Des médicaments bien tolérés et largement utilisés ont été sélectionnés pour des simulations de dynamique moléculaire afin d'évaluer les interactions médicament-protéine et leur persistance dans des conditions physiologiques exp

La tétracycline, la dihydroergotamine, l'ergotamine, le dutastéride, le nelfinavir et la palipéridone , l'eltrombopag, le tipranavir, l'ergotamine et le conivaptan, la dihydroergotamine, la bromocriptine, le dutastéride, le conivaptan, la palipéridone et le tipranavir (Gul et al., 2020) , ou alors la famotidine en association avec d'autres médicaments antiviraux comme bithérapie recommandée (Ortega et al., 2020). Autant que l'hydroxychloroquine , l'artémisinine et ses dérivés (agent antipaludique) (Sehailia and Chemat, 2020) , certains antiviraux et d'autres antipaludiques ont été testés. (Nandi et al., 2020) .

Les cibles étaient

- la principale protéase COVID-19 extraite des différentes structure du virus co cristallisés a partir de la protéine Data Bank exp (PDB: 6LU7) et (PDB ID: 2GTB et 3TNT) (Silva Arouche et al., 2020) , (Hagar et al., 2020) , (Abdelrheem et al., 2020)

- le domaine de liaison aux ganglioside d'attachement d'hôte pour les virus SARS-CoV-2 (Fantini et al., 2020)

- Les récepteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine 2 (ACE-2) (Hathout et al., 2020)

- Des modèles l'ARN polymérase ARN-dépendante de la protéine virale (RdRp) construits par l'amarrage et les simulations de dynamique (Elfiky, 2020)
- Le domaine de liaison au récepteur de la protéine SARS-CoV-2 Spike (Sehailia et Chemat, 2020)
- Des cellules HEK293T à haute expression ACE2 sur virus pseudotypé du pic 2019-nCoV dans les cellules ACE2 h (cellules ACE2^h) (Wang et al., 2020)
- CCR4 (cible immunomodulatrices) sept récepteur transmembranaire couplé aux protéines G (GPCR) exprimé dans tout le corps humain avec des niveaux d'expression les plus élevés dans la moelle osseuse et le tissu lymphoïde pour induire une réduction significative de la libération de cytokines pro-inflammatoires et de la septicémie associée au cours de l'infection au COVID-19 (Beck et al., 2020)
- La protéine de pointe du SRAS-CoV-2 (Pandey et al., 2020)
- La protéine d'enveloppe (E), nécessaire dans les processus de maturation du virus (Gentile et al., 2020).
- L'interface d'interaction RBD-hACE2 (Tiwari, 2020)
- Une protéine Nsp15 ayant une similitude de 89% avec l'autre SRAS-CoV (Mittal et al., 2020)
- Dans d'autres travaux, la masse de séquences d'acides aminés a été calculée et traduite à partir du génome entier du SARS-CoV2 pour identifier des peptides qui peuvent être une cible d'inhibition (Hamza et al., 2020)

Discussion

Plusieurs examens critique (Singh et al., 2020a), revus systématiques (Antonio et al., 2020) , et pharmacologiques (Singh et al., 2020b) ont été publiées sur les différents traitements ou essais utilisés dans la lutte au COVID-19.

Aucune revue exhaustive et exclusive des études in silico de l'hydroxychloroquine et ou chloroquine seule, combinée ou comparés a d'autres agents thérapeutiques n'a été effectuée.

Pour la première fois nous nous proposons de discuter les récents résultats obtenue par l'amarrage moléculaire des ligands identifiés comme potentiels dans différents travaux avec

plusieurs cibles impliquées dans la pénétration, la réplication et la transmission de l'infection au COVID-19.

Baidya et al ont conclu que l'hydroxychloroquine confère une bonne réponse inhibitrice de la protéase principale COVID-19 (Baidya et al., 2020) .

Cependant, l'allongement de l'intervalle QT chez les patients prenant de l'hydroxychloroquine avec de l'azithromycine, une association qui s'est avérée efficace dans les essais cliniques européens, a soulevé des inquiétudes concernant l'utilisation de ces médicaments dans le traitement COVID-19 (Mazzanti et al., 2020).

L'étude de Beck et al a identifié le CCR4 (un récepteur transmembranaire, GPCR) exprimé à des niveaux élevés dans la moelle osseuse et le tissu lymphoïde) comme la cible immunomodulatrice de l'hydroxychloroquine.

Les auteurs proposent de substituer cette dernière par les antagonistes du CCR4 qui ne favorisent pas l'allongement de l'intervalle QT, tels que le médicament approuvé par la FDA, le mogamulizumab ou le composé expérimental K777 dans le traitement de la maladie grave à coronavirus en monothérapie ou en association avec des antiviraux. (Beck et al., 2020) .

Nimgampalle et al ont démontré que la chloroquine et l'hydroxychloroquine peuvent se lier à des protéines structurelles et non structurales spécifiques impliquées dans la pathogenèse du SRAS-CoV- 2 infection avec des efficacités différentes (Nimgampalle et al., 2020) .

Ces résultats corroborent avec ceux de Wang et al sur des cellules HEK293T à haute expression ACE2 (cellules ACE2 h) (Wang et al., 2020) .

Les résultats de Gentile et al ont montré que la CQ et la HCQ ont influencé la fonctionnalité de la protéine d'enveloppe (E), nécessaire dans les processus de maturation du virus, en raison d'interactions qui modifient la flexibilité de la structure de la protéine. En outre, CQ et HCQ ont également influencé la relecture et le plafonnement de l'ARN viral dans le SARS-CoV-2, réalisés par nsp10 / nsp14 et nsp10 / nsp16. En particulier, HCQ a démontré une meilleure liaison énergétique avec les cibles examinées par rapport à CQ (Gentile et al., 2020) .

Achutha et al ont prouvé l'efficacité de quatre composés analogues de la 4-aminoquinoléine et de la 8-aminoquinoléine de la chloroquine présentant une ressemblance avec le SRAS-CoV-2 . (Achutha et al., 2020) .

Beura et Chetti ont montré que le modèle pharmacophore (CQD15) de la chloroquine et des dérivés de la chloroquine ont de meilleures interactions pour l'inhibition du SRAS-CoV-2 que ces deux dernières (Beura et Chetti, 2020).

La principale protéase virale (M^{pro}) et l'hôte cathepsine L (CTSL) font partie des systèmes protéolytiques impliqués dans l'activation de la protéine SARS-CoV-2 S et le domaine de liaison au récepteur (RBD) de la protéine du pic SARS-CoV-2 (S).

Braz et al ont montré que l'azithromycine avait de fortes interactions avec ACE2, CTSL, M^{pro} et RBD. Les scores d'affinité CQ ont montré trois résultats à faible énergie (moins négatifs) avec ACE2, CTSL et RBD. Pour HCQ, deux résultats (ACE2 et M^{pro}) étaient fermement liés aux récepteurs (Braz et al., 2020).

Une thérapie combinée hydroxychloroquine (CLQ-OH) / azithromycine (ATM), in silico proposée par Fantini, Chahinian et al a eu des effets bénéfiques synergique chez les patients atteints de COVID-19 (Fantini et al., 2020). Ces résultats sont contradictoires avec ceux de Fiolet, Guihur et al.

Une revue systématique et méta analyse ont été réalisées par les auteurs pour évaluer l'effet de l'hydroxychloroquine avec ou sans azithromycine sur la mortalité des patients atteints de COVID-19.

L'hydroxychloroquine seule n'a pas été associée à une réduction de la mortalité chez les patients hospitalisés atteints de COVID-19, mais l'association d'hydroxychloroquine et d'azithromycine a considérablement augmenté la mortalité. (Fiolet et al., 2020)

D'autres anti paludiques ont aussi été testé (Nandi et al., 2020). Pour l'artémisinine et ses dérivés. En prenant comme cible le domaine de liaison au récepteur de la protéine SARS-CoV-2 Spike. Sehailia et Chemat ont remarqué que l'hydroxychloroquine pouvait agir comme un bon inhibiteur mais l'artémisinine et des composés dérivés avaient un meilleur score d'amarrage Vina (meilleure affinité).

Au vu d'excellents antécédents de sécurité chez l'homme contre diverses affections, les auteurs ont demandé un protocole d'extraction de l'artémisinine à partir d' *Artemisia annua*. (Sehailia et Chemat, 2020).

Un examen critique de la pharmacologie, des études précliniques et cliniques a été effectué par Singh, Singh et al sur le Remdesivir dans COVID-19. Selon les auteurs, l'utilisation compassionnelle initiale du remdesivir a montré un résultat assez bon, mais difficile à quantifier, en l'absence de bras témoin. Alors que le tout premier essai randomisé en double aveugle, contrôlé par placebo, mené à Wuhan, n'a trouvé aucun avantage significatif par rapport au contrôle, le résultat préliminaire d'un autre essai multicentrique similaire a montré un temps de récupération plus rapide mais sans aucune différence de mortalité. (Singh et al., 2020a).

Concernant les expérimentations *in silico*. Dans l'étude de Silva Arouche, Reis et al qui a inclus comme ligands le remdesivir, la ribavirine, le favipiravir, le galidesivir, l'hydroxychloroquine et la chloroquine. Les valeurs d'énergie d'affinité obtenues pour les ligands hydroxychloroquine étaient de -9,9 kcal / mol et pour la chloroquine de -10. 8 kcal / mol indiquant que le couplage contribue à une amélioration efficace des énergies d'affinité avec la principale protéase COVID-19 en complexe avec un inhibiteur de la protéase COVID-19 N3. (Silva Arouche et al., 2020).

Le résultats de l'amarrage de huit autres composés presque similaires (sofosbuvir, ribavirine, galidesivir, remdesivir, favipiravir, céfuroxime, ténofovir, et Hydroxychloroquine) avec des modèles d'ARN polymérase ARN-dépendante de la protéine virale (RdRp) construits par simulations de dynamique a montré des affinités de liaison moyennes pour tous les médicaments dans la même gamme (-6,13 (Hydroxychloroquine) et jusqu'à -7,46 (Sofosbuvir) kcal / mol) (Elfiky, 2020).

Par ailleurs le remdesvir testé contre quinze cibles potentielles du SRAS-CoV-2 a montré une meilleure liaison aux cibles prioritaires par rapport à la liaison de la chloroquine, du favipiravir et de l'hydroxychloroquine, mais a montré un potentiel de liaison moindre par rapport à l'interaction entre le ritonavir et le lopinavir. (Skariyachan et al., 2020)

Hagar, Ahmed et al ont sélectionné certains médicaments hétérocycliques (Favipiravir, Amodiaquine, 2'-Fluoro-2'-désoxycytidine et Ribavirine) évalués comme inhibiteurs et analogues nucléotidiques du COVID-19. Ancrés sur la protéase principale du SRAS-CoV-2 (PDB: 6LU7), l'hydroxychloroquine avait une faible affinité de liaison par rapport à l'Amodiaquine : -6,06 Kcal / mol. (Hagar et al., 2020).

Dans la même perspective, l'ancrage moléculaire et la dynamique moléculaire ont été réalisés pour deux récepteurs ACE2 et le récepteur complexe [SARS-CoV-2 / ACE2] dans deux sites actifs pour trouver un ligand, qui peut inhiber COVID-19. Parmi les dix-huit médicaments, dont la structure est similaire à la chloroquine et à l'hydroxychloroquine, les inhibiteurs potentiels de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE2). Le ramipril, le delapril et le lisinopril avaient montré une bonne liaison au récepteur ACE2 et au complexe [SARS-CoV-2 / ACE2] que la chloroquine et l'hydroxychloroquine (Khelfaoui et al., 2020).

Le ritonavir, le lopinavir, le remdesivir, la chloroquine, l'hydroxychloroquine (HCQ), les antiviraux de routine comme l'oseltamivir et la ribavirine des molécules ayant des actions anti-inflammatoires comme l'acide mycophénolique (MPA), le pémirolast, l'isoniazide et l'ériodictyol ont également été testées contre les protéines responsables de la propagation virale (3Clpro, Nsp10 / 16, protéine Spike, domaine de liaison au récepteur de la protéine

SRAS, protéine de liaison virale simple brin Nsp 9 et hélicase virale) . Les interactions moléculaires du ritonavir, du lopinavir et du remdesivir contre les protéines du SRAS-CoV-2 ont amélioré leur potentiel en tant que médicament candidat pour le traitement de COVID-19 . (Deshpande et al., 2020) .

Ahmed, Abdelrheem et al ont testé la caulerpine et ses dérivés comme médicament d'appoint contre les protéines réceptrices du SRAS-CoV-2: la protéase principale SARS-CoV-2 et la protéine de pointe du SRAS-CoV-2 .

En association avec le lopinavir, le siméprévir, l'hydroxychloroquine, la chloroquine et l'amprénavir , la caulerpine pourrait être utilisé pour perturber la stabilité des protéines des récepteurs du SRAS-CoV2 afin d'augmenter l'activité antivirale . (Ahmed et al., 2020) .

La liaison de l'énergie libre entre la caulerpine et la protéase principale du SARS-CoV-2-3CL (6LU7) a confirmé l'efficacité de la molécule de caulerpine . (Abdelrheem et al., 2020).

D'autres produits phytochimiques naturels, les flavonoïdes et les non flavonoïdes ont démontré leur efficacité *in silico* . Une revue de Antonio, Wiedemann et al visait à évaluer systématiquement les métabolites naturels qui pourraient potentiellement être utilisés contre cette nouvelle maladie en regardant leurs sources naturelles, leur mécanisme d'action et leurs usages pharmacologiques antérieurs (Antonio et al., 2020).

Cependant, des questions importantes doivent encore être abordées quant à la biodisponibilité et l'efficacité *in vivo*.

Dans notre revue nous avons sélectionné, sur Medline, uniquement ceux qui ont été testés *in silico* depuis le début de la pandémie au COVID-19. L'étude de Kumar, Kashyap et al a démontré avec succès la liaison de composés phytochimiques tels que la sarsasapogénine, l'acide ursonique, la curcumine, l'ajmalicine, la novobiocine, la silymarine et l'aranotine, la pipérine, le gingérol, l'acide rosmarinique et l'acétate d'alpha terpinyle à la protéine virale Nsp15 et ils pourraient jouer un rôle clé dans l'inhibition de la réplication du SARS-CoV-2. L'hydroxychloroquine était utilisée comme contrôle positif (Kumar et al., 2020) .

Les flavonoïdes du thé (le gallate d'épigallocatechine et le gallate de théaflavine) ont démontré une valeur d'énergie de contact atomique (ACE) plus élevée, une énergie de liaison, une valeur K_i , une efficacité de ligand, une surface et plus d'acide aminé interactions que l'hydroxychloroquine (HCQ) lors de la liaison dans le canal central de la protéine de pointe. Ces flavonoïdes se liaient sur trois sites de liaison distincts (I, II et III) du noyau de pointe lorsque HCQ se lie uniquement au site III (le plus éloigné du contact nCoV-RBD du contact

ACE2). (Maiti et Banerjee, 2020). Gandhi, Rupareliya et al ont émis l'hypothèse d'utiliser Nagaradi Kashaya qui comprend Sunthi (Zingiber officinale Roscoe), Pushkarmool (Inula racemose Hook.F.), Guduchi (Tinospora cordifolia Miers.) , Kantakari (Solanum virginianum L.) en comparaison avec l'hydroxychloroquine et à la quinine.

L'énergie de liaison et l'inhibition de l'acide 6 gingesulfonique de Zingiber Officinalis (Sunthi) sont supérieures à l'hydroxychloroquine et à la quinine (Gandhi et al., 2020). Un total de 30 composés de Solanum tuberosum et de résidus d'eau de fumée de Brassica juncea ont été testés.

L'analyse d'amarrage a indiqué (a) curcuménol, (b) N-desméthylsélégiline, (c) la phentermine et (d) les dérivés de sphingolipides comme candidats sélectifs et puissants par rapport à l'hydroxychloroquine pour le traitement au COVID-19. (Dave et al., 2020) .

En prenant la curcumine comme composé de référence, Basu, Veeraraghavan et al. 2020 ont identifié un nouveau composé de cyclohexanone disponible dans le commerce, le ZINC07333416 Versus Lopinavir, l'analogue nucléosidique Remdesivir et le médicament réutilisé hydroxychloroquine .

Le ZINC07333416 avec une énergie de liaison (-8,72 kcal / mol) meilleure que celle des médicaments anti-Covid-19 couramment conçus comme l'inhibiteur de protéase virale Lopinavir, l'analogue nucléosidique Remdesivir et le médicament réutilisé hydroxychloroquine lorsqu'il est ciblé sur le site actif de la protéase principale du SRAS-CoV-2 (Mpro) (Basu et al., 2020).

L'enzyme de conversion de l'angiotensine 2 (ACE2) en tant que récepteur du SRAS-CoV-2, cible thérapeutique potentielle du COVID -19 virus a été ancré à des composés naturels (Isothymol, Thymol, Limonène, P-cymène et γ -terpinène) dérivés de l'huile essentielle de la plante antivirale et antimicrobienne Ammoides verticillata . L'isothymol, un composant majeur de cette plante, donne les meilleurs scores d'amarrage, par rapport à l'inhibiteur co-cristallisé β -D-mannose de l'enzyme ACE2, au médicament Captropil comme bon inhibiteur de l'ACE2 et au médicament antiviral Chloroquine également impliqué dans d'autres mécanismes comme l'inhibition du récepteur cellulaire ACE (Abdelli et al., 2020).

L'Andrographolide d' Andrographis paniculata en a été utilisé car la chloroquine et les dérivés d'hydroxychloroquine ne conviennent pas aux patients souffrant d'affections telles que le diabète, l'hypertension et des problèmes cardiaques.

L'andrographolide a été ancré avec succès dans le site de liaison de SARS-CoV-2 Mpro. (Enmozhi et al., 2020)

Conclusion

Toutes les études in silico identifiées ont testé l'hydroxychloroquine et / ou la chloroquine seules, en association ou comparées à d'autres agents thérapeutiques ancrés à différentes cibles du virus COVID-19 mais pas à d'autres cibles collatérales. Il est vrai que la pharmacologie des médicaments repositionnés dans la lutte au COVID-19 est connue et approuvée mais l'incertitude entourant ce nouveau virus met en évidence un débat contradictoire au sein de la communauté scientifique.

Il serait raisonnable de reconsidérer les espoirs fondés sur la découverte de nouveaux médicaments pour l'induction d'une immunité fiable (anticorps neutralisants) et durable dans le temps. Dans ce contexte, les études in silico doivent être poursuivies pour une meilleure compréhension de l'infection au COVID-19.



Exhaustive Review of Studies in Silico Conducted in the Fight against COVID-19 that involved Hydroxychloroquine and/or Chloroquine alone, in Combination or Compared to other Therapeutic Agents

Hamza Nadjib Merad-Boudia¹, Majda Dali-Sahi², Nouria Dennouni-Medjati³

^{1, 2, 3}Department of Biology, Laboratory of Analytical Chemistry and Electrochemistry, University of Tlemcen, 13000, Algeria

Abstract: While the implementation of a SARS CoV2 vaccine is slow in coming. Several countries around the world are in the midst of a second wave of the COVID-19 pandemic. Current data shows considerable progress but also very questionable and sometimes contradictory results. Studies in silico optimize the time and cost of research. This exhaustive review on Pubmed, attempts to examine all the approaches in silico addressed since the start of fight against COVID 19, which have involved hydroxychloroquine and or chloroquine alone, combined or compared to other therapeutic agents such as antivirals. , phytochemicals and many more. Were used as targets, proteins involved in the pathways by which this virus enters host cell: Main protease COVID-19, receptor binding domain of SRAS-CoV-2 Spike protein, peak protein of SRAS -CoV-2 and envelope protein necessary in maturation processes of virus. . Other solutions to overcome challenges related to pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of chloroquine and hydroxychloroquine were discussed. Well-tolerated and widely used drugs have also been selected for molecular dynamics simulations. The results will be reported in this review to allow future research to investigate new leads

Keywords: Dynamic simulation, SRAS-CoV-2, Ligands, Covid-19

I. INTRODUCTION

In March 2020, governments around the world were warned of the potential consequences of a premature slackening of interventions. Studies have shown by modeling that the result of such decision could lead to an increase in contagiousness greater than 1. That is, a second wave of infection (Leung, Wu and al. 2020) . A situation we are living today. Pharmaceutical companies usually create drug programs around the concept: Unmet medical needs (for under-treated health problems). The main conditions of the Unmet Medical Need program are: -Disease with no existing or satisfactory treatment.

An urgent demand for effective therapy that is increasingly affecting patients. This concept is perfectly applicable to the current pandemic at COVID-19 . Determining an unmet medical need requires an understanding of the disease, available therapies, and possible gaps in treatment. Currently, potential strategies to control COVID-19 are summarized around antivirals, corticosteroids, convalescent plasma and vaccines. (Shamim, Khan and al. 2020). Several trials are in progress (Davis, Ferreira and al. 2020) , but several questions arise , in particular, the production of neutralizing or non-neutralizing antibodies, durability of immunity, reinfection and safety of new treatments. Within this context, in silico studies take a special place in the fight against COVID 19. These optimize the time and cost of research and offer new perspectives in development and repositioning of drugs. This exhaustive review attempts to examine all the in silico approaches that have been addressed since the beginning of the fight against COVID 19.

II. METHODS

On March 13, 2020, international science and technology advisers from a dozen countries, including the United States, called on publishers to voluntarily make their publications related to COVID-19 and coronavirus, as well as the available data supporting them, immediately available in PubMed Central (PMC) to support ongoing public health emergency response efforts (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/about/covid-19/>). Therefore, access to the full text of all publications was allowed. Given the new and recent nature of this pandemic at covid-19 . The search filter has been adjusted based on data available since the beginning of the pandemic (i.e. within the past year) and updated to October 31, 2020. Given the rapid development of the field and the accelerated diffusion of scientific discoveries concerning COVID-19 , more than 20,100 articles have been published. To meet our main objective, an exhaustive search was conducted on all in Silico studies conducted in the fight against COVID-19 that involved hydroxychloroquine and/or chloroquine alone, combined or compared to other therapeutic agents.





The Pubmed survey was conducted for the SARS-CoV-2 studies using the following MeshData: Hydroxychloroquine and molecular docking and covid 19. The Pubmed database was consulted without language restriction . After reviewing the title and abstract 42 full-text studies were retrieved. 40 studies meeting the inclusion criteria were selected.

For identification of ligands studied, the databases Drug bank (<https://go.drugbank.com/>) and chemspider (<http://www.chemspider.com/>) were consulted. The Proteines Data Bank (pdb) (<https://www.rcsb.org/>) was consulted for the targets studied. The research on plants, chemicals, bioactivity and ethnobotany was based on Dr. Duke's current phytochemical and ethnobotanical data. (US Department of Agriculture, Agricultural Research Service. 1992-2016. Dr. Duke's phytochemical and ethnobotanical databases, <https://phytochem.nal.usda.gov/>). PubChem database was also consulted (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>).

III. RESULTS

In all the published studies in silico , the approaches were very different depending on the ligand and the target proposed in the molecular docking (Table 1).

Author/Year	Ligand	Targets	Interaction site
(Silva Arouche, Reis and al. 2020)	Remdesivir , ribavirin , favipiravir , galidesivir , hydroxychloroquine and chloroquine	The main COVID-19 protease (in complex with a COVID-19 N3 protease inhibitor)	The highest affinity values found in order from highest to lowest: Chloroquine , hydroxychloroquine , favipiravir , galidesivir , Remdesivir and ribavirin .
(Fantini, Chahinian and al. 2020)	Combined Therapy: Hydroxychloroquine (CLQ-OH) / Azithromycin (ATM)	Binding domain and site of attachment of the SARS-CoV-2 virus on gangliosides near the primary receptor of the virus, the angiotensin-2 converting enzyme (ACE-2).	MTA is directed against the virus while CLQ-OH is directed against cell attachment co- factors.
(Bailly and Vergoten 2020)	Natural Glycyrrhizic Acid (GLR)	At the membrane , the cholesterol of the lipid rafts that are important for the entry of the virus into the cell.	GLR a good candidate to be tested against Cov-2 SARS, alone and in combination with other drugs.
(Hagar, Ahmed and al. 2020)	Selected heterocyclic drugs: Favipiravir , amodiaquine , 2'-Fluoro-2'-deoxycytidine and ribavirin as an inhibitor and nucleotide analogues of COVID-19.	Main Protease of SRAS CoV-2 (PDB: 6LU7)	Amodiaquine has the lowest binding energy (-7.77 Kcal/mol) and could serve as a good inhibitor of SRAS CoV-2, remdesivir has a binding affinity of 4.96 Kcal/mol).
(Rajagopal, Varakumar and al. 2020)	Novel oxazine-substituted 9-anilinoacridines	Main protease of Sras CoV-2 (PDB: 5R82)	A38 has the highest G-score (-7.83) compared to all standard compounds proposed for the treatment of COVID-19 such as ritonavir (-7.48), nelfinavir (-5.93), lopinavir (-6.94), hydroxychloroquine (-5.47) and mataquine (-5.37).
(Nandi, Kumar and al. 2020)	34 drugs, including antivirals and antimalarials,	binding to COVID-19 proteases	13 compounds with good binding affinity were predicted to inhibit binding to COVID-19 proteases.
(Hamza, Ali and al. 2020)	Moringa oleifera, phytochemical leaf extracts (aqueous and ethanol) of flavonoids, anthraquinone and hydroxychloroquine.	Mass of amino acid sequences has been calculated and translated from the entire CoV2-SARS genome and identification of peptides that may be a target for inhibition.	Maximum energy obtained for hydroxychloroquine is -5.1 kcal/mol, kaempferol (flavonoid) is -6.2 kcal/mol and for anthraquinone -6 kcal/mol.
(Maiti and Banerjee 2020)	Tea flavonoids catechin products mainly epigallocatechin gallate or other such as theaflavin gallate and hydroxychloroquine (HCQ)	The central channel of the peak protein.	Tea flavonoids produced catechin products mainly epigallocatechin gallate or other such as theaflavin gallate have demonstrated a higher atomic contact energy (ACE) value, binding energy, Ki value, ligand efficiency, surface area and more amino acid interactions than hydroxychloroquine (HCQ) when bound.



(Hathout, Abdelhamid and al. 2020)	Chloroquine CQ and Hydroxychloroquine HCQ	Angiotensin converting enzyme-2 (ACE-2) receptors, heparin sulfate proteoglycan and phosphatidylinositol-binding clathrin assembly protein (PICALM), which are expressed in lung and intranasal tissues and represent the initial sites of viral particles on the surface of respiratory cells.	Good binding of CQ and HCQ to these receptors
(Elfiky 2020)	sofosbuvir, ribavirine, galidesivir, remdesivir, favipiravir, céfuroxime, ténofovir, and Hydroxychloroquine	Viral protein-dependent RNA polymerase-RNA polymerase (RdRp) models built by docking and dynamics simulations	sofosbuvir, ribavirin, galidesivir, remdesivir, favipiravir, cefuroxime, tenofovir, and hydroxychloroquine, bind to SRAS-CoV-2 RdRp
(Khelfaoui, Harkati and al. 2020)	Eighteen drugs from the ACE2 Approved Drug Library that are structurally similar to chloroquine and hydroxychloroquine, the potential angiotensin-converting enzyme (ACE2) inhibitors	Two ACE2 receptors and the complex receptor [SARS-CoV-2 / ACE2] in two active sites	Ramipril , delapril and lisinopril , chloroquine and hydroxychloroquine bind to the ACE2 receptor and [SRAS-CoV-2 / ACE2] complex.
(Sehailia and Chemat 2020)	Artemisinin and its derivatives, hydroxychloroquine, artémimol	SRAS-CoV-2 Spike protein receptor binding domain	Further screening for artemisinin and derived compounds produced a better Vina docking score than hydroxychloroquine (-7.1 kcal mol ⁻¹ for artelinic acid versus -5.5 kcal mol ⁻¹ for hydroxychloroquine). Artesunate, artemisinin and artemimol showed two modes of interaction with the Spike protein binding hot spots Lys353 and Lys31.
(Ahmed, Abdelrheem and al. 2020)	caulerpine and its derivatives	Caulerpine and its derivatives as an adjunct to the SARS-CoV-2 receptor proteins: SRAS-CoV-2 Core Protease and SRAS-CoV-2 Spike Protein.	Molecular docking analysis showed that the binding energies of most of the caulerpine derivatives were higher than those of all the drugs suggested for both the
(Celi, Onay-Besı Kcı and al. 2020)	hydroxychloroquine and chloroquine	Crystalline structures of the SRAS-CoV-2 and ACE2 proteins	Hydroxychloroquine and chloroquine do not interact with the CoV-2-SRAS proteins, but bind to the amino acids ASP350, ASP382, ALA348, PHE40 and PHE390 at the allosteric ACE2 site rather than the active ACE2 site.
(Enmozhi, Raja and al. 2020)	Andrographolide of Andrographis paniculataen	Main protease of SRAS-VOC-2 (Mpro)	Andrographolide was successfully anchored in the SARS-CoV-2 Mpro binding site.
(Skariyachan, Gopal and al. 2020)	Chloroquine, Hydroxychloroquine, Favipiravir, Lopinavir, Remdesivir and Ritonavir)	15 potential targets for SRAS-CoV-2	Among the selected drugs, ritonavir and lopinavir showed improved binding to priority targets with minimal binding energy (kcal/mol), cluster-RMS, number of interacting residues and stabilizing forces relative to the binding of chloroquine, favipiravir and hydroxychloroquine
(Baidya, Ghosh and al. 2020)	Hydroxyxhloroquine	Main protease COVID-19	Snapshots of structural changes over time clearly indicate that the drug molecule has a profound impact on the binding sites as well as on the overall geometry of the protease moiety.
(Braz, Silveira and al. 2020)	Azythromycine (AZM) , Chloroquine (CQ) , and hydroxychloroquine (HCQ)	The main viral protease (M pro) and the cathepsin L host (CTSL) involved in the activation of the SARS-CoV-2 S peak protein and the receptor binding domain (RBD) of the SRAS-CoV-2 peak protein (S)	Results showed AZM affinity scores (ΔG) with strong interactions with ACE2, CTSL, M pro and RBD. CQ affinity scores showed three low energy (less negative) results with ACE2, CTSL and RBD. For HCQ, two results (ACE2 and M pro) were strongly related to receptors



(Nimgampalle, Devanathan and al. 2020)	Chloroquine, l'hydroxychloroquine	SRAS-CoV-2 viral proteins.	Chloroquine and hydroxychloroquine can bind to specific structural and non-structural proteins involved in the pathogenesis of SRAS-CoV-2 infection with different efficiencies.
(Abdelrheem, Ahmed and al. 2020)	Caulerpine, chloroquine, hydroxychloroquine, azithromycin, remdesivir, baloxvir, lopinavir and favipiravir.	Main protease of CoV-SRAS-2-3CL (PDB ID: 6LU7) and the main proteases of CoV-SRAS (PDB ID: 2GTB and 3TNT)	Free energy binding between caulerpine and 6LU7 confirmed the efficacy of the caulerpine molecule against the main CoV-2-SRAS protease
(Deshpande, Tiwari and al. 2020)	Ritonavir, lopinavir, remdesivir, chloroquine, hydroxychloroquine (HCQ), routine antivirals such as oseltamivir and ribavirin. In addition, small molecules with anti-inflammatory actions such as mycophenolic acid (MPA), pemirolast, isoniazid and eriodictyol were also tested.	Proteins responsible for viral propagation, namely 3Clpro, Nsp10 / 16, Spike protein, SRAS protein receptor binding domain, single-stranded viral binding protein Nsp 9 and viral helicase The virus protein that penetrates the human angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) receptor in the host cell is also used as a target for molecular anchoring.	The data generated confirm the potential of ritonavir, lopinavir and remdesivir as therapeutic candidates for SRAS-CoV-2. Eriodictyol is observed to bind to almost all selected target proteins with good binding energy, suggesting its importance in the treatment of COVID 19.
(Wang, Han and al. 2020)	Chloroquine (CQ) and Hydroxychloroquine (HCQ)	HEK293T high-expression ACE2 cells (ACE2 h cells)	Chloroquine (CQ) and Hydroxychloroquine (HCQ) show an equivalent suppression effect for the entry of the pseudotyped 2019-nCoV peak virus into ACE2 h cells.
(Beura and Chetti 2020)	Pharmacophore model (CQD15) of chloroquine and chloroquine derivatives	PDB_ID: 6LU7 Crystal structure of the main COVID-19 protease in complex with an N3 inhibitor	CQD15 which shows better interactions for the inhibition of SRAS-CoV-2 compared to chloroquine and hydroxychloroquine.
(Mukherjee, Dasgupta and al. 2020)	L'hydroxychloroquine (HCQ)	Viral genetic material is transcribed and replicated by the 3C protease. the main protease SRAS-CoV-2	A detailed structural overview of the presence of a water-mediated catalytic triad was obtained, which could be useful for inhibitor modeling.
(Chidambaram, Ali and al. 2020)	coumarin-based derivatives	The main protease of the SRAS coronavirus in complex with α -ketoamide (PDB ID: 5N5O)	the natural coumarin analogue, toddacoumaquinone, showed a remarkable inhibition capacity with a binding energy of -7.8 kcal/mol than other compounds against the main SRAS coronavirus protease in complex with α -ketoamide (PDB ID: 5N5O).
(Beck, Beck and al. 2020)	Hydroxychloroquine	CCR4: A G protein-coupled transmembrane receptor (GPCR) expressed throughout the human body with highest levels of expression in bone marrow and lymphoid tissue.	Such as improved survival rates due to a significant reduction in pro-inflammatory cytokine release and associated sepsis. These data suggest a potential role for the use of CCR4 antagonists in the treatment of COVID-19 patients.
(Gandhi, Rupareliya and al. 2020)	The phytoconstituents of the drugs: Nagaradi Kashaya which includes Sunthi (Zingiber officinalis Roscoe), Pushkarmool (Inula racemose Hook.F.), Guduchi (Tinospora cordifolia Miers.), Kantakari (Solanum virginianum L.) in comparison with hydroxychloroquine and quinine	SARS-CoV-2: An Ayurvedic perspective for SRAS-CoV-2-like symptoms with an in silico study	Binding energy and inhibition of Zingiber Officinalis (Sunthi) 6 gingesulfonic acid is superior to hydroxychloroquine and quinine



(Achutha, Pushpa and al. 2020)	4-aminoquinoline and 8-aminoquinoline analogs of chloroquine.	Viral protease, called cysteine protease of the chymotrypsin type, also known as the main protease (3CL pro)	Six compounds provided better binding energies than chloroquine and hydroxychloroquine. Interactions with residues at the active site, particularly with Cys145 and His41, which are involved in the catalytic diad for proteolysis, make these compounds powerful inhibitors of the main protease
(Pandey, Rane and al. 2020)	10 potential natural phytochemical compounds (flavonoids / non-flavonoids) compared their affinity with hydroxychloroquine	The SRAS-CoV-2 lead protein	Fisetin, quercetin and kamferol bind to the hACE2-S complex with low free binding energy. The study provided an indication that these molecules may have the potential to disrupt the binding of the hACE2-S complex.
(Han, Wang and al. 2020)	Chloroquine, Hydroxychloroquine, Remdesivir, Ritonavir, Beclabuvir, Indinavir and Favipiravir) and a newly developed drug α -ketoamide (13b) inhibitor at the molecular level	3CL hydrolase (Mpro), indicating its ability to inhibit SRAS-CoV-2.	Chloroquine has the highest binding affinity for 3CL hydrolase (Mpro) among clinically approved drugs, indicating its effective inhibitory capacity for SRAS-CoV-2. However, the newly designed 13b inhibitor has potentially improved inhibition efficacy with higher binding energy compared to chloroquine.
(Gentile, Fuochi and al. 2020)	chloroquine (CQ) and hydroxychloroquine (HCQ)	Envelope protein (E), necessary in the maturation process of the virus,	CQ and HCQ have influenced the functionality of the envelope protein (E), which is necessary in the virus maturation processes, due to interactions that alter the flexibility of the protein structure. In addition, CQ and HCQ have also influenced viral RNA reuptake and capping in CoV-2-SRAS, achieved by nsp10 / nsp14 and nsp10 / nsp16. In particular, HCQ demonstrated better energy binding to the targets examined compared to CQ
(Ortega, Serrano and al. 2020)	Famotidine	Catalytic site of the three proteases associated with the replication of SRAS-CoV2.	Famotidine could interact in the catalytic site of the three proteases associated with the replication of SRAS-CoV2. However, the low binding affinity of famotidine to these proteases suggests that successful famotidine therapy could probably only be achieved in combination with other antiviral drugs.
(Dave, Rakholiya and al. 2020)	Total of 30 compounds of Solanum tuberosum and Brassica juncea flue water residues	SRAS-CoV-1, SARS-CoV-2 and cellular proteins involved in the mechanism of infection.	Docking analysis identified lead molecules with favorable binding energy, pose number and hydrogen bonding interactions, indicating efficient modulation of ACE2 and TMPRSS2 receptors.
(Belhassan, En-Nahli and al. 2020)	eighteen imidazole derivatives based on 7-chloro-4-aminoquinoline	Main protease of SARS-CoV-2.	Molecules Nos. 3, 7 and 14 have higher binding energy to the newly crystallized CoV-2-SRAS core protease (bp code 6LU7) compared to other imidazole derivatives and the two drugs; chloroquine and hydroxychloroquine.
(Basu, Veeraraghavan and al. 2020)	Using curcumin as the reference compound, a commercially available cyclohexanone compound, ZINC07333416 versus Lopinavir, the nucleoside analogue Remdesivir and the reused drug hydroxychloroquine	Actif site of the SRAS-CoV-2 main protease (Mpro)	ZINC07333416 with better binding energy (-8.72 kcal/mol) than the commonly designed anti-Covid-19 drugs such as the viral protease inhibitor Lopinavir, the nucleoside analogue Remdesivir and the reused drug hydroxychloroquine .



(Tiwari 2020)	VTAR-01 designed by novo based on fragments of selected molecules, namely ascorbate, ribavirin, lopinavir, and hydroxychloroquine.	RBD-hACE2 interaction interface	Ribavirin, ascorbate, lopinavir and hydroxychloroquine have a strong interaction at the RBD-hACE2 interface.
(Gul, Ozcan and al. 2020)	Tetracycline, dihydroergotamine, ergotamine, dutasteride, nelfinavir and paliperidone, eltrombopag, tipranavir, ergotamine and conivaptan, dihydroergotamine, bromocriptine, dutasteride, conivaptan, paliperidone and tipranavir.	SRAS-CoV-2 3C protease (3CL pro) and viral RNA-dependent RNA polymerase (RdRp)	Tetracycline, dihydroergotamine, ergotamine, dutasteride, nelfinavir and paliperidone formed stable interactions with 3CL pro eltrombopag, tipranavir, ergotamine and conivaptan bound to the enzyme with high free binding energies. Mooring results suggest that ergotamine, dihydroergotamine, bromocriptine, dutasteride, conivaptan, paliperidone and tipranavir can bind to both enzymes with high affinity.
(Kumar, Kashyap and al. 2020)	Phytochemical compounds such as sarsasapogenin, ursolic acid, curcumin, ajmalicin, novobiocin, silymarin and arantone, piperine, gingerol, rosmarinic acid and alpha terpinyl acetate. Hydroxychloroquine is used as a positive control, as well as nelfinavir.	Nsp15 protein was selected because it has an 89% similarity with the other SRAS-CoV, which caused the previous epidemic. The hypothesis is that inhibition of SP15 inhibits viral replication.	Phytochemicals such as sarsasapogenin, ursolic acid, curcumin, ajmalicin, novobiocin, silymarin and arantone, piperine, gingerol, rosmarinic acid and alpha terpinyl acetate to viral protein against SP15 could play a key role in inhibiting the replication of CoV-2-SRAS
(Abdelli, Hassani and al. 2020)	Natural compounds (Isothymol, Thymol, Limonene, P-cymene and γ -terpinene) derived from the essential oil of the antiviral and antimicrobial plant <i>Ammoides verticillata</i>	Angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) as a SRAS-CoV-2 receptor	Isothymol gives the best docking scores compared to the co-crystallized β -D-mannose inhibitor of the ACE2 enzyme, the drug Captropil as a good inhibitor of ACE2 and the antiviral drug Chloroquine also involved in other mechanisms such as the inhibition of the ACE2 cell receptor

IV. DISCUSSION

Several critical reviews (Singh, Singh and al. 2020) , systematic reviews (Antonio, Wiedemann and al. 2020) , and pharmacological (Singh, Parida and al. 2020) have been published on different treatments or trials used in the fight against COVID-19. No exhaustive and exclusive review o studies in silico of hydroxychloroquine and or chloroquine alone, combined or compared with other therapeutic agents has been conducted. For the first time we propose to discuss the recent results obtained by molecular docking of ligands identified as potentials in different works with several targets involved in penetration, replication and transmission of COVID-19 infection.

To date, more than 30 peer-reviewed articles published on Medline have reported the results of molecular docking of hydroxychloroquine and chloroquine alone, in combination or as positive controls for SARS CoV2-19 (Table 1).

Baildya and al concluded that hydroxyxhloroquine confers good inhibitory response to the main protease COVID-19 (Baildya, Ghosh and al. 2020) . However, prolongation of the QT interval in patients taking hydroxychloroquine with azithromycin, a combination that has proven effective in European clinical trials, raised concerns about the use of these drugs in the treatment of COVID-19 (Mazzanti and al., 2020). Beck and al's study identified CCR4 (Transmembrane receptor,(GPCR) expressed at high levels in bone marrow and lymphoid tissue) as immunomodulatory target of hydroxychloroquine. Authors propose to substitute the latter with CCR4 antagonists that do not promote prolongation of QT interval, such as the FDA-approved drug mogamulizumab or investigational compound K777 for the treatment of severe coronavirus disease as monotherapy or in combination with antivirals (Beck, Beck and al. 2020) . Nimgampalle and al demonstrated that chloroquine and hydroxychloroquine can bind to specific structural and non-structural proteins involved in pathogenesis of SRAS-CoV-2 infection with different effectiveness (Nimgampalle, Devanathan and al. 2020) . These results corrobhorate with those of Wang and al on HEK 293T cells with high ACE2 expression (ACE2 h cells) (Wang, Han and al. 2020). Results of Gentile and al showed that CQ and HCQ influenced the functionality of envelope protein (E), necessary in the virus maturation processes, due to interactions that alter flexibility of the protein structure.



In addition, Chloroquine and HCQ also influenced rereading and capping of viral RNA in SRAS-CoV-2, made by nsp10 / nsp14 and nsp10 / nsp16. In particular, Hydroxychloroquine demonstrated better energetic binding with targets examined compared to Chloroquine (Gentile, Fuochi and al. 2020). Achutha and al demonstrated efficacy of four 4-aminoquinoline and 8-aminoquinoline analogues of chloroquine showing resemblance to SARS-CoV-2 (Achutha, Pushpa and al. 2020). Beura and Chetti showed that pharmacophore model (CQD15) of chloroquine and chloroquine derivatives have better interactions for inhibition of SRAS-CoV-2 than the latter two (Beura and Chetti 2020). Main viral protease (M pro) and host cathepsin L (CTSL) are part of proteolytic systems involved in the activation of the SRAS-CoV-2 S protein and receptor binding domain (RBD) of the SRAS-CoV-2 (S) peak protein. Braz and al showed that azithromycin had strong interactions with ACE2, CTSL, M pro and RBD. Chloroquine affinity scores showed three low energy (less negative) results with ACE2, CTSL and RBD. For Hydroxychloroquine, two results (ACE2 and M pro) were strongly related to receptors (Braz, Silveira and al. 2020). Combined hydroxychloroquine / azithromycin therapy, proposed in silico by Fantini and al had synergistic beneficial effects in patients with COVID-19 (Fantini, Chahinian and al. 2020). These results are contradictory with those of Fiolet and al. Systematic review and meta-analysis was conducted by authors to evaluate effect of hydroxychloroquine with or without azithromycin on mortality in patients with COVID-19. Hydroxychloroquine alone was not associated with reduced mortality in hospitalized patients with COVID-19, but combination of hydroxychloroquine and azithromycin significantly increased mortality. (Fiolet, Guihur and al. 2020).

Other anti-malarial drugs have also been tested. (Nandi, Kumar and al. 2020). For artemisinin and its derivatives, by taking as target the receptor binding domain of the SRAS-CoV-2 Spike protein. Sehailia and Chemat noted that hydroxychloroquine could act as good inhibitor but artemisinin and derived compounds had better Vina docking score (better affinity). In view of an excellent history of safety in humans against various conditions, authors requested a protocol for extracting artemisinin from *Artemisia annua*. (Sehailia and Chemat 2020). Critical review of pharmacology, preclinical and clinical studies was performed by Singh, Singh and al on Remdesivir in COVID-19. According to authors, initial compassionate use of remdesivir showed fairly good result, but difficult to quantify, in the absence of a control arm. While the very first randomized, double-blind, placebo-controlled trial conducted in Wuhan found no significant advantage over the control, the preliminary result of another similar multi-center trial showed faster recovery time but no difference in mortality. (Singh, Singh and al. 2020)

Concerning in silico experimentations. In the study of Silva Arouche, Reis and al which included as ligands remdesivir, ribavirin, favipiravir, galidesivir, hydroxychloroquine and chloroquine. affinity energy values obtained for hydroxychloroquine ligands were -9.9 kcal/mol and for chloroquine -10.8 kcal/mol indicating that the coupling contributes to an effective improvement in affinity energies with the main protease of COVID-19 in complex with a COVID-19 N3 protease inhibitor (Silva Arouche, Reis and al. 2020).

Results of docking eight other almost similar compounds (sofosbuvir, ribavirin, galidesivir, remdesivir, favipiravir, cefuroxime, tenofovir, and Hydroxychloroquine) with viral protein-dependent RNA polymerase RNA (RdRp) models constructed by dynamic simulations showed mean binding affinities for all drugs in the same range (-6.13 (Hydroxychloroquine) and up to -7.46 (Sofosbuvir) kcal/mol) (Elfiky 2020). In addition, remdesivir tested against fifteen potential SRAS-CoV-2 targets showed better binding to priority targets compared to binding of chloroquine, favipiravir and hydroxychloroquine, but showed lower binding potential compared to interaction between ritonavir and lopinavir (Skariyachan, Gopal and al. 2020). Hagar and al have selected certain heterocyclic drugs (Favipiravir, Amodiaquine, 2'-Fluoro-2'-deoxycytidine and Ribavirin) evaluated as inhibitors and nucleotide analogues of COVID-19. Docked to the main protease SRAS-CoV-2 (PDB: 6LU7), hydroxychloroquine had low binding affinity compared to amodiaquine: -6.06 Kcal/mol (Hagar, Ahmed and al. 2020). In same perspective, molecular docking and molecular dynamics were performed for two ACE2 receptors and complex receptor [SARS-CoV-2 / ACE2] in two active sites to find ligand, which can inhibit COVID-19. Of the eighteen drugs, which are similar structure to chloroquine and hydroxychloroquine, potential angiotensin converting enzyme (ACE2) inhibitors, Ramipril, delapril and lisinopril had shown good binding to ACE2 receptor and [SARS-CoV-2 / ACE2] complex than chloroquine and hydroxychloroquine (Khelfaoui, Harkati and al. 2020). Ritonavir, lopinavir, remdesivir, chloroquine, hydroxychloroquine (HCQ), routine antivirals such as oseltamivir and ribavirin molecules with anti-inflammatory actions such as mycophenolic acid, pemirolast, isoniazid and eriodictyol were also tested against proteins responsible for viral propagation (3Clpro, Nsp10/16, Spike protein, SRAS protein receptor binding domain, single-stranded viral binding protein Nsp 9 and viral helicase). Molecular interactions of ritonavir, lopinavir and remdesivir against SRAS-CoV-2 proteins have enhanced their potential as drug candidate for treatment of COVID-19. (Deshpande, Tiwari and al. 2020). Ahmed and al tested caulerpipin and its derivatives as an adjunct drug against SARS-CoV-2 receptor proteins: Main protease SARS-CoV-2 and peak protein of SRAS-CoV-2.



In combination with lopinavir, simeprevir, hydroxychloroquine, chloroquine and amprenavir, caulerpine could be used to disrupt stability of SRAS-CoV2 receptor proteins, to increase antiviral activity (Ahmed, Abdelrheem and al. 2020). Free energy binding between caulerpine and main protease of SRAS-CoV-2-3CL (6LU7) confirmed efficacy of caulerpine molecule (Abdelrheem, Ahmed and al. 2020).

Other phytochemical, natural, flavonoid and non-flavonoid products have demonstrated their effectiveness in silico. Review by Antonio and al aimed to systematically evaluate natural metabolites that could potentially be used against this new disease by looking at their natural sources, mechanism of action and previous pharmacological uses (Antonio, Wiedemann and al. 2020)

However, important questions still need to be addressed regarding in vivo bioavailability and efficacy. In our review we have selected, on Medline, only those that have been tested in silico since the beginning of COVID-19 pandemic Study by Kumar and al successfully demonstrated binding of phytochemical compounds such as sarsasapogenin, ursonic acid, curcumin, ajmalicin, novobiocin, silymarin and arantone, piperine, gingerol, rosmarinic acid and alpha terpinyl acetate to viral protein Nsp15 and could play key role in inhibiting replication of SRAS CoV-2. Hydroxychloroquine was used as positive control (Kumar, Kashyap and al. 2020). Tea flavonoids (epigallocatechin gallate and theaflavin gallate) demonstrated higher atomic contact energy (ACE) value, binding energy, Ki value, ligand efficiency, surface area and more amino acid interactions than hydroxychloroquine when binding in central channel of the peak protein. These flavonoids bound to three distinct binding sites (I, II, and III) of spike nucleus when HCQ binds only at site III (the site furthest from the nCoV-RBD contact of ACE2) (Maiti and Banerjee 2020). Gandhi and al have hypothesized to use Nagaradi Kashaya which includes Sunthi (Zingiber officinalis Roscoe), Pushkarmool (Inula racemose Hook.F.), Guduchi (Tinospora cordifolia Miers.), Kantakari (Solanum virginianum L. Binding energy and inhibition of 6 gingesulfonic acid of Zingiber Officinalis (Sunthi) was higher than hydroxychloroquine and quinine (Gandhi, Rupareliya and al. 2020). A total of 30 compounds of Solanum tuberosum and Brassica juncea smoke water residues were tested. Docking analysis indicated (a) curcumenol, (b) N-desmethylelegiline, (c) phentermine and (d) sphingolipid derivatives as selective and potent candidates over hydroxychloroquine for treatment with COVID-19 (Dave, Rakholiya and al. 2020). Using curcumin as reference compound, Basu and al identified new commercially available cyclohexanone compound, ZINC07333416 Versus Lopinavir, the nucleoside analogue Remdesivir and the reused drug hydroxychloroquine. ZINC07333416 with better binding energy (-8.72 kcal/mol) than commonly designed anti-Covid-19 drugs such as viral protease inhibitor Lopinavir, the nucleoside analog Remdesivir and the reused drug hydroxychloroquine when targeted to active site of main protein SRAS-CoV-2 (Mpro) (Basu, Veeraraghavan and al. 2020). Angiotensin Converting Enzyme 2 (ACE2) as a SARS-CoV-2 receptor, a potential therapeutic target for COVID-19 virus has been docked to natural compounds (Isothymol, Thymol, Limonene, P-cymene and γ -terpinene) derived from essential oil of antiviral and antimicrobial plant Ammoides verticillata. Isothymol, a major component of this plant, gives best docking scores compared to co-crystallized β -D-mannose inhibitor of ACE2 enzyme, Captropil as a good inhibitor of ACE2 and Chloroquine also involved in other mechanisms such as inhibition of ACE2 cell receptor. (Abdelli, Hassani and al. 2020).

Andrographolide from Andrographis paniculataen has been used because chloroquine and hydroxychloroquine derivatives are not suitable for patients with conditions such as diabetes, hypertension and heart problems. Andrographolide was successfully docked in binding site of SRAS-CoV-2 Mpro. (Enmozhi, Raja and al. 2020).

Other leads have been investigated:

Some new oxazine-substituted 9-anilinoacridines have been identified by molecular docking as significantly active inhibitors against the main protease of SRAS-CoV-2 compared to hydroxychloroquine (Rajagopal, Varakumar and al. 2020)

VTAR-01 was developed by new method on selected molecular fragments, namely ascorbate, ribavirin, lopinavir and hydroxychloroquine. This hybrid molecule provided better interaction with RBD-hACE2 interface than any antiviral drug used to design it (Tiwari 2020). In another approach, natural coumarin analog, toddacoumaquinone, showed remarkable inhibition capacity with binding energy of -7.8 kcal/mol than other compounds against main protease SRAS coronavirus in complex with α -ketoamide (PDB ID: 5N5O) (Chidambaram, Ali and al. 2020).

Currently, there is no safe and effective therapy option for COVID-19. The reuse approach is seen as the best alternative since it involves less time and cost to find new therapeutic agent. Singh and al reviewed mechanism of action, pharmacokinetics, and tolerability of these already approved drugs (Singh, Parida and al. 2020). In Drug Design, in silico studies that use these molecules are therefore taking big step towards the fight against COVID-19 Well-tolerated and widely used drugs have been selected for molecular dynamics simulations with SRAS-CoV-2 3C protease (3CL pro) and viral RNA-dependent RNA polymerase (RdRp).



Tetracycline, dihydroergotamine, ergotamine, dutasteride, nelfinavir and paliperidone formed stable interactions with 3CL pro . Eltrombopag, tipranavir, ergotamine, and conivaptan bound to enzyme with high free binding energies. Docking results suggest that ergotamine, dihydroergotamine, bromocriptine, dutasteride, conivaptan, paliperidone and tipranavir can bind to both enzymes with high affinity(Gul, Ozcan and al. 2020). Famotidine could also interact in catalytic site of the three proteases associated with SRAS-CoV2 replication. Pharmacokinetic parameters indicated that its effect against SRASS-CoV2 infection could only be achieved by intravenous administration (Ortega, Serrano and al. 2020). This prospect of reuse is very broad given available drugs that may be candidates against SRAS-CoV2.

V. CONCLUSION

All identified studies in silico tested hydroxychloroquine and/or chloroquine alone, in combination or compared to other therapeutic agents docked to different targets of COVID-19 virus but not to other collateral targets. It is true that pharmacology of drugs repositioned in fight against COVID-19 is known and approved but the uncertainty surrounding this new virus highlights contradictory debate in scientific community. It would be reasonable to reconsider hopes based on discovery of new drugs for induction of reliable immunity (neutralizing antibodies) and lasting over time. In this context, studies in silico should be continued for better understanding of COVID-19 infection.

REFERENCES

- [1] Abdelli, I., F. Hassani, S. Bekkel Briki and S. Ghalem (2020). "In silico study the inhibition of angiotensin converting enzyme 2 receptor of COVID-19 by Ammoides verticillata components harvested from Western Algeria." *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*: 1-14.
- [2] Abdelrheem, D. A., S. A. Ahmed, H. R. Abd El-Mageed, H. S. Mohamed, A. A. Rahman, K. N. M. Elsayed and S. A. Ahmed (2020). "The inhibitory effect of some natural bioactive compounds against SARS-CoV-2 main protease: insights from molecular docking analysis and molecular dynamic simulation." *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* 55(11): 1373-1386.
- [3] Achutha, A. S., V. L. Pushpa and S. Suchitra (2020). "Theoretical Insights into the Anti-SARS-CoV-2 Activity of Chloroquine and Its Analogs and In Silico Screening of Main Protease Inhibitors." *J Proteome Res*.
- [4] Ahmed, S. A., D. A. Abdelrheem, H. R. A. El-Mageed, H. S. Mohamed, A. A. Rahman, K. N. M. Elsayed and S. A. Ahmed (2020). "Destabilizing the structural integrity of COVID-19 by caulerpin and its derivatives along with some antiviral drugs: An in silico approaches for a combination therapy." *Struct Chem*: 1-22.
- [5] Baildya, N., N. N. Ghosh and A. P. Chattopadhyay (2020). "Inhibitory activity of hydroxychloroquine on COVID-19 main protease: An insight from MD-simulation studies." *J Mol Struct* 1219: 128595.
- [6] Bailly, C. and G. Vergoten (2020). "Glycyrrhizin: An alternative drug for the treatment of COVID-19 infection and the associated respiratory syndrome?" *Pharmacol Ther* 214: 107618.
- [7] Basu, S., B. Veeraghavan, S. Ramaiah and A. Anbarasu (2020). "Novel cyclohexanone compound as a potential ligand against SARS-CoV-2 main-protease." *Microb Pathog* 149: 104546.
- [8] Beck, T. C., K. R. Beck, C. B. Holloway, R. A. Hemings, Jr., T. A. Dix and R. A. Norris (2020). "The C-C Chemokine Receptor Type 4 Is an Immunomodulatory Target of Hydroxychloroquine." *Front Pharmacol* 11: 1253.
- [9] Belhassan, A., F. En-Nahli, H. Zaki, T. Lakhlifi and M. Bouachrine (2020). "Assessment of effective imidazole derivatives against SARS-CoV-2 main protease through computational approach." *Life Sci* 262: 118469.
- [10] Beura, S. and P. Chetti (2020). "In-silico strategies for probing chloroquine based inhibitors against SARS-CoV-2." *J Biomol Struct Dyn*: 1-13.
- [11] Braz, H. L. B., J. A. M. Silveira, A. D. Marinho, M. E. A. de Moraes, M. O. Moraes Filho, H. S. A. Monteiro and R. J. B. Jorge (2020). "In silico study of azithromycin, chloroquine and hydroxychloroquine and their potential mechanisms of action against SARS-CoV-2 infection." *Int J Antimicrob Agents* 56(3): 106119.
- [12] Ceh, K. I., A. Onay-Best Kci and L. G. Ayhan-Kilci (2020). "Approach to the mechanism of action of hydroxychloroquine on SARS-CoV-2: a molecular docking study." *J Biomol Struct Dyn*: 1-7.
- [13] Chidambaram, S. K., D. Ali, S. Alarifi, S. Radhakrishnan and I. Akbar (2020). "In silico molecular docking: Evaluation of coumarin based derivatives against SARS-CoV-2." *J Infect Public Health*.
- [14] Dave, G. S., K. D. Rakholiya, M. J. Kaneria, B. P. Galvadiya, S. R. Vyas, V. H. Kanbi and M. P. Patel (2020). "High affinity interaction of Solanum tuberosum and Brassica juncea residue smoke water compounds with proteins involved in coronavirus infection." *Phytother Res*.
- [15] Davis, J. S., D. Ferreira, J. T. Denholm and S. Y. Tong (2020). "Clinical trials for the prevention and treatment of COVID-19: current state of play." *The Medical journal of Australia* 213(2): 86-93.
- [16] Deshpande, R. R., A. P. Tiwari, N. Nyayanit and M. Modak (2020). "In silico molecular docking analysis for repurposing therapeutics against multiple proteins from SARS-CoV-2." *Eur J Pharmacol* 886: 173430.
- [17] Elfiky, A. A. (2020). "SARS-CoV-2 RNA dependent RNA polymerase (RdRp) targeting: an in silico perspective." *Journal of biomolecular structure & dynamics*: 1-9.
- [18] Enmozhi, S. K., K. Raja, I. Sebastine and J. Joseph (2020). "Andrographolide as a potential inhibitor of SARS-CoV-2 main protease: an in silico approach." *J Biomol Struct Dyn*: 1-7.
- [19] Fantini, J., H. Chahinian and N. Yahi (2020). "Synergistic antiviral effect of hydroxychloroquine and azithromycin in combination against SARS-CoV-2: What molecular dynamics studies of virus-host interactions reveal." *Int J Antimicrob Agents* 56(2): 106020.
- [20] Gandhi, A. J., J. D. Rupareliya, V. J. Shukla, S. B. Donga and R. Acharya (2020). "An Ayurvedic Perspective along with in Silico Study of the Drugs for the Management of Sars-Cov-2." *J Ayurveda Integr Med*.



- [21] Gentile, D., V. Fuochi, A. Rescifina and P. M. Furneri (2020). "New Anti SARS-Cov-2 Targets for Quinoline Derivatives Chloroquine and Hydroxychloroquine." *Int J Mol Sci* 21(16).
- [22] Gul, S., O. Ozcan, S. Asar, A. Okyar, I. Baris and I. H. Kavakli (2020). "In silico identification of widely used and well-tolerated drugs as potential SARS-CoV-2 3C-like protease and viral RNA-dependent RNA polymerase inhibitors for direct use in clinical trials." *J Biomol Struct Dyn*: 1-20.
- [23] Hagar, M., H. A. Ahmed, G. Aljohani and O. A. Alhaddad (2020). "Investigation of Some Antiviral N-Heterocycles as COVID 19 Drug: Molecular Docking and DFT Calculations." *International journal of molecular sciences* 21(11): 3922.
- [24] Hamza, M., A. Ali, S. Khan, S. Ahmed, Z. Attique, S. Ur Rehman, A. Khan, H. Ali, M. Rizwan, A. Munir, A. M. Khan, F. Siddique, A. Mehmood, F. Nouroz and S. Khan (2020). "nCoV-19 peptides mass fingerprinting identification, binding, and blocking of inhibitors flavonoids and anthraquinone of Moringa oleifera and hydroxychloroquine." *Journal of biomolecular structure & dynamics*: 1-11.
- [25] Han, Y., Z. Wang, J. Ren, Z. Wei and J. Li (2020). "Potential inhibitors for the novel coronavirus (SARS-CoV-2)." *Brief Bioinform*.
- [26] Hathout, R. M., S. G. Abdelhamid and A. A. Metwally (2020). "Chloroquine and hydroxychloroquine for combating COVID-19: Investigating efficacy and hypothesizing new formulations using Bio/chemoinformatics tools." *Inform Med Unlocked* 21: 100446.
- [27] Khelfaoui, H., D. Harkati and B. A. Saleh (2020). "Molecular docking, molecular dynamics simulations and reactivity, studies on approved drugs library targeting ACE2 and SARS-CoV-2 binding with ACE2." *J Biomol Struct Dyn*: 1-17.
- [28] Kumar, S., P. Kashyap, S. Chowdhury, S. Kumar, A. Panwar and A. Kumar (2020). "Identification of phytochemicals as potential therapeutic agents that binds to Nsp15 protein target of coronavirus (SARS-CoV-2) that are capable of inhibiting virus replication." *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*: 153317-153317.
- [29] Leung, K., J. T. Wu, D. Liu and G. M. Leung (2020). "First-wave COVID-19 transmissibility and severity in China outside Hubei after control measures, and second-wave scenario planning: a modelling impact assessment." *The Lancet*.
- [30] Maiti, S. and A. Banerjee (2020). "Epigallocatechin gallate and theaflavin gallate interaction in SARS-CoV-2 spike-protein central channel with reference to the hydroxychloroquine interaction: Bioinformatics and molecular docking study." *Drug Dev Res*.
- [31] Mukherjee, S., S. Dasgupta, T. Adhikary, U. Adhikari and S. S. Panja (2020). "Structural insight to hydroxychloroquine-3C-like proteinase complexation from SARS-CoV-2: inhibitor modelling study through molecular docking and MD-simulation study." *J Biomol Struct Dyn*: 1-13.
- [32] Nandi, S., M. Kumar, M. Saxena and A. K. Saxena (2020). "The Antiviral and Antimalarial Drug Repurposing in Quest of Chemotherapeutics to Combat COVID-19 Utilizing Structure-Based Molecular Docking." *Comb Chem High Throughput Screen*.
- [33] Nimgampalle, M., V. Devanathan and A. Saxena (2020). "Screening of Chloroquine, Hydroxychloroquine and its derivatives for their binding affinity to multiple SARS-CoV-2 protein drug targets." *J Biomol Struct Dyn*: 1-13.
- [34] Ortega, J. T., M. L. Serrano and B. Jastrzebska (2020). "Class A G Protein-Coupled Receptor Antagonist Famotidine as a Therapeutic Alternative Against SARS-CoV2: An In Silico Analysis." *Biomolecules* 10(6).
- [35] Pandey, P., J. S. Rane, A. Chatterjee, A. Kumar, R. Khan, A. Prakash and S. Ray (2020). "Targeting SARS-CoV-2 spike protein of COVID-19 with naturally occurring phytochemicals: an in silico study for drug development." *J Biomol Struct Dyn*: 1-11.
- [36] Rajagopal, K., P. Varakumar, B. Aparna, G. Byran and S. Jupudi (2020). "Identification of some novel oxazine substituted 9-anilinoacridines as SARS-CoV-2 inhibitors for COVID-19 by molecular docking, free energy calculation and molecular dynamics studies." *J Biomol Struct Dyn*: 1-12.
- [37] Sehailea, M. and S. Chemat (2020). "Antimalarial-agent artemisinin and derivatives portray more potent binding to Lys353 and Lys31-binding hotspots of SARS-CoV-2 spike protein than hydroxychloroquine: potential repurposing of artemimol for COVID-19." *J Biomol Struct Dyn*: 1-11.
- [38] Shamim, S., M. Khan, Z. J. Kharaba, M. Ijaz and G. Murtaza (2020). "Potential strategies for combating COVID-19." *Archives of virology* 165(11): 2419-2438.
- [39] Silva Arouche, T. D., A. F. Reis, A. Y. Martins, S. C. JF, R. N. Carvalho Junior and J. C. N. AM (2020). "Interactions Between Remdesivir, Ribavirin, Favipiravir, Galidesivir, Hydroxychloroquine and Chloroquine with Fragment Molecular of the COVID-19 Main Protease with Inhibitor N3 Complex (PDB ID:6LU7) Using Molecular Docking." *J Nanosci Nanotechnol* 20(12): 7311-7323.
- [40] Skariyachan, S., D. Gopal, S. Chakrabarti, P. Kempanna, A. Uttarkar, A. G. Muddebihalkar and V. Niranjana (2020). "Structural and molecular basis of the interaction mechanism of selected drugs towards multiple targets of SARS-CoV-2 by molecular docking and dynamic simulation studies- deciphering the scope of repurposed drugs." *Comput Biol Med* 126: 104054.
- [41] Tiwari, V. (2020). "De novo design, retrosynthetic analysis and combinatorial synthesis of a hybrid antiviral (VTAR-01) to inhibit the interaction of SARS-CoV2 spike glycoprotein with human angiotensin-converting enzyme 2." *Biol Open* 9(10).
- [42] Wang, N., S. Han, R. Liu, L. Meng, H. He, Y. Zhang, C. Wang, Y. Lv, J. Wang, X. Li, Y. Ding, J. Fu, Y. Hou, W. Lu, W. Ma, Y. Zhan, B. Dai, J. Zhang, X. Pan, S. Hu, J. Gao, Q. Jia, L. Zhang, S. Ge, S. Wang, P. Liang, T. Hu, J. Lu, X. Wang, H. Zhou, W. Ta, Y. Wang, S. Lu and L. He (2020). "Chloroquine and hydroxychloroquine as ACE2 blockers to inhibit viropexis of 2019-nCoV Spike pseudotyped virus." *Phytomedicine* 79: 153333.

Discussion Générale

Discussion Générale

Il existe une importante variabilité clinique, biologique et génétique des individus et de leur forme d'hypertension. A ses débuts, cette dernière cause rarement des symptômes tangibles, de sorte que beaucoup de sujets ne sont pas diagnostiqués.

Les hypertendus recrutés étaient âgés de 40 ans et plus (pour les deux sexes) avec ou sans diabète de type 2 confirmé.

Les participants ont été identifiés comme étant atteints de diabète de type 2 sans complication selon la nouvelle classification internationale des maladies CIM-11 de l'année 2018 (codes 5A11 : www.who.int/classifications/icd/en/).

Cette classification définit le diabète de type 2 comme étant un trouble métabolique caractérisé par une glycémie élevée, associée à une résistance à l'insuline et à un déficit relatif en insuline.

Les patients ont été classés en deux groupes selon la nature de leur traitement antidiabétique (code de classification anatomique des substances chimiques thérapeutiques ATC A10, contrôlée par le Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology de l'OMS : https://www.whocc.no/atc_ddd_index/?code=A10):

-les diabétiques de type 2 (code PMSI : E1190 : insulino-traités, sans complication) sous insuline (Glargine, Detemir, Glulisine, Insuline lispro rapide et Insuline asparte rapide) et antidiabétiques oraux (ADO).

-les diabétiques de type 2 (code PMSI : E1198 : non insulino-traités, sans complication) sous ADO ou analogue des incrélines exclusivement (sulfonylurée, biguanides, glinides, inhibiteurs de l'alpha-glucosidase et Liraglutide).

Les données cliniques ont été obtenues à l'inclusion des patients. Les antécédents médicaux, les traitements médicamenteux et les données anthropométriques ont été recueillis à l'aide d'un questionnaire administré à tous les participants. Le diagnostic de diabète de type 2 a été fait selon les critères du comité d'experts international (CEI 2009) (Gillett, 2009), de l'American Diabetes Association (2010) et des critères de l'OMS (2011)(Kumar et al., 2016) (glycémie à jeun ≥ 7 mmol/L en deux prises ou glycémie 2h après un test de charge $\geq 11,1$ mmol/L et/ou HbA1c $\geq 6,5$ %).

Les avantages d'une détection précoce, d'un traitement adéquat et d'un suivi biologique de l'hypertension sont très importants. En s'attaquant à des facteurs de risque comportementaux comme la mauvaise alimentation ou l'usage du tabac ou encore la sédentarité, on peut aider à prévenir l'hypertension. Les études en cours démontrent qu'il est extrêmement rare que l'hypertension soit due à un seul facteur.

Développer un modèle de prédiction simple de diagnostic de l'HTA basé sur les différents aspects a permis d'améliorer les performances de prédictions et de diagnostic de l'HTA dans nos populations de l'ouest Algérien.

Les variables intégrées dans notre modèle sont à l'issue d'un raisonnement biologique clinique, épidémiologique et thérapeutique.

Par ailleurs outre les facteurs traditionnels, il existe un certain nombre de différends dans diverses études concernant la variabilité des paramètres hématologiques chez les patients souffrant d'hypertension et les sujets normotendus. Des paramètres hématologiques altérés peuvent fortement indiquer une atteinte hypertensive des organes terminaux, en particulier une insuffisance rénale (Babu et al., 2015) (AL-Hamdani, 2010) (Jadeja et al., 2011).

Notre étude montre une association statistiquement significative entre le risque de développer une pression artérielle élevée pour les deux sexes et certains paramètres hématologiques, quel que soit l'âge, notamment: Ratio des globules rouges, VCM, CCMH, ratio des plaquettes et ratio de sédimentation.

Nos résultats montrent que les sujets avec moins de globules rouges ont un risque trois fois et demi de développer une hypertension par rapport à ceux qui ont une pression artérielle normale.

De nombreuses études ont montré que les patients anémiques ont une prévalence élevée d'hypertension (Gandhi et al., 2017) .

Notre modèle logistique a également retenu le taux de VCM comme facteur hématologique associé à l'hypertension.

Nous avons constaté que les sujets avec un VCM inférieur sont plus exposés à l'hypertension avec un risque qui est treize fois et demi plus grand que les sujets qui ont un VCM normal . Les anciens rapports suggèrent que les personnes souffrant d'hypertension ont des VCM inférieurs à ceux des sujets ayant une pression artérielle normale (Bruschi et al., 1986) (Postnov et al., 1988).

Rakotovao-Ravahatra ZD et al ont étudié l'hémogramme chez les patients hypertendus. Parmi 151 patients hypertendus, 41% d'entre eux souffraient d'anémies microcytaires avec MCV inférieur à la normale (Rakotovao-Ravahatra et al., 2016). Notre étude montre aussi que les sujets dont le CCMH est inférieur à la normale sont moins exposés à l'hypertension. En 2017, Enawgaw B et al ont mené une étude transversale comparative de certains paramètres hématologiques d'individus hypertendus et normotendus (Enawgaw et al., 2017). Dans cette étude, VCM et CCMH ont augmenté de manière significative dans les groupes hypertendus.

Mais d'autres études sur ces mêmes paramètres ont montré des idées contradictoires. Par exemple, une étude menée par Babu KR et al. (Babu et al., 2015) montre une VCM significativement plus faible et une CCMH significativement plus élevée.

Pour les plaquettes, les sujets avec des niveaux inférieurs à la normale sont 12 fois plus exposés à l'hypertension que les sujets avec une numération plaquettaire normale. Une corrélation entre la numération plaquettaire et la gravité de la maladie coronarienne a été observée dans l'étude de Hilal Bektas Uysal et al (Uysal et al., 2016) .

Nous notons également que l'augmentation du taux de sédimentation à une heure augmente le risque d'hypertension de 56,63 fois par rapport aux sujets ayant un taux de sédimentation normal.

La détection et le traitement de l'hypertension chez le diabétique sont parmi les mesures les plus efficaces pour prévenir les complications tandis que la pharmacothérapie est une des façons les plus efficaces pour maintenir des niveaux cibles de TA en contexte de soins primaires.

Chez les patients hypertendus , les récentes enquêtes de prévalence montrent que le diabète de type 2 n'est pas détecté dans au moins 30 % des cas et que le développement de complications micro- et macrovasculaires peut précéder la progression vers le diabète déclaré de type 2 (Rydén et al., 2013) .

Outre le déséquilibre de la glycorégulation, sur le plan physiopathologique, le diabète de type 2 est aussi associé à un dysfonctionnement profond du métabolisme des acides aminés (Kahn et al., 2014).

Ces deux notions ont conduit à explorer une nouvelle voie dans la pathogenèse et l'évolution du diabète.

Nous avons étudié l'implication de la voie des kynurénines dans le suivi du diabète de type 2 chez les hypertendus et de ses complications chez les hypertendus.

Les rares données épidémiologiques concernant la voie des kynurénines en relation avec le diabète de type 2 montrent que des valeurs élevées du ratio plasmatique K/T sont associées à des pronostics cardiovasculaires défavorables (Pedersen et al., 2011).

Les hommes et les femmes diabétiques de type 2 insulinotraités de notre échantillon avaient un âge moyen de plus de 60 ans, ce résultat est concordant avec ceux de Deo et al ou la prévalence globale de l'hypertension et du diabète était modeste, sauf dans le groupe d'âge des 60 ans et plus, dans lequel 50% étaient aussi hypertendus (Deo et al., 2017).

Dans le groupe des diabétiques de type 2 non insulinotraités, l'âge moyen était de 45 ans à presque 50 ans pour les hommes et les femmes. Dans cette cohorte portant sur des cas

avérés de DT2 hypertendus, l'activité enzymatique de l'IDO s'est révélé un facteur étroitement lié à la progression du diabète de type 2 indépendamment des autres facteurs potentiels.

Les rôles de la voie de dégradation du tryptophane et de l'excrétion rénale de kynurénine dans le développement du diabète de type 2 devraient être davantage élucidés afin de fournir de nouvelles stratégies d'intervention dans la thérapie du diabète sucré.

La thérapie et les conseils nutritionnels font partie intégrante du traitement et de l'autogestion du diabète. Cependant la dénutrition est fréquemment sous-estimée chez les sujets diabétiques hypertendus, car ses manifestations cliniques sont non spécifiques.

L'évaluation du risque de dénutrition par le score au MNA (dans sa version complète, par un score total compris entre (17-23.5) révèle une élévation non significative du risque de dénutrition chez les patients hypertendus non diabétiques par rapport aux patients hypertendus diabétiques mais l'IMC (ou indice de Quételet calculé par le poids/ taille²) moyen des sujets hypertendus diabétiques était significativement (0,004) plus élevé que celui des hypertendus non diabétiques.

Il est important de noter la part du traitement dans la dénutrition, le but du traitement de l'hypertension artérielle n'est pas seulement de ramener à la normale les chiffres de la pression artérielle. Mais il faut aussi éviter une dégradation du statut nutritionnel. Dans la revue d'Alibhai et al. (Alibhai et al., 2005), ces traitements apparaissent comme l'une des causes les plus fréquentes de perte de poids involontaire, en accord avec les recommandations de l'ESPEN (Kondrup et al., 2003).

Tous les patients hypertendus étaient sous la même thérapie anti hypertensive depuis au moins une année. Les pourcentages des sujets hypertendus diabétiques sous monothérapie anti hypertensive (67%) et bithérapie anti hypertensive (libre ou combinée) (33 %) se rapprochent aux pourcentages des sujets hypertendus non diabétiques avec monothérapie (68,09%) et bithérapie (31,90%) avec $p=0,804$. Les hypertendus diabétiques de notre étude qui étaient traités par un ARA2, un IEC ou une association ARA2/diurétique étaient plus exposés au risque de dénutrition ($p = 0.009$, $p = 0.026$ et $p = 0.013$).

Sur le plan nutritionnel, ces deux classes d'anti hypotensives ne semblent pas dénudées d'effets secondaires et peuvent majorer, en conséquence un risque de dénutrition (Loesche et al., 1995).

En bithérapie anti hypertensive, même si l'association ARA 2 et diurétique est significativement plus efficace que chacun des composants pris séparément (Melian and

Jarvis, 2002), ces derniers ne sont pas sans danger et sont associés à un risque de dénutrition ($p = 0.013$).

La population de patients hypertendus diabétiques est une population qui présente un risque élevé de dénutrition précoce (à partir de 50 ans). Le présent travail retrouve une relation statistiquement significative entre le sexe, l'IMC, le traitement de l'HTA à savoir les ARA2, les IEC et les diurétiques. L'utilisation de ces derniers peut apporter une explication quant aux mécanismes sous-jacents du risque accru de dénutrition observé chez les sujets hypertendus diabétiques de notre population d'étude.

Dans le débat en cours, autour de l'HTA, un véritable retournement de la situation sanitaire mondiale s'est produit. L'épidémie COVID-19 causée par le coronavirus 2 du syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS-CoV-2) a été signalée pour la première fois en décembre 2019. Des cas similaires ont rapidement émergé dans le monde. (Vellingiri et al., 2020), (Phua et al., 2020), (Chen et al., 2020).

L'OMS a déclaré une urgence de santé publique de portée internationale le 30 janvier 2020 et a déclaré l'épidémie de coronavirus à propagation rapide comme une pandémie le 11 mars 2020. Le virus a atteint presque tous les pays du monde. En juin 2020, les cas confirmés cumulés ont considérablement augmenté, tout comme le nombre de décès dans le monde. (WHO, 2020). Les soins urgents et d'urgence pour les patients atteints de COVID-19 nécessitaient des médicaments efficaces pour contrôler la maladie et arrêter la pandémie. Des effets cardiovasculaires ont été rapportés chez des patients hypertendus avec COVID-19 lorsqu'ils étaient traités par hydroxychloroquine (Oren et al., 2020). Bien que cette molécule ait une activité anti-inflammatoire connue.

Nos résultats révèlent pour la première fois en détail atomique comment l'un des médicaments les plus controversés se lie à une autre cible moléculaire (COX2). Cela pourrait vraisemblablement améliorer la compréhension de son mécanisme d'action et des effets indésirables qui lui sont attribués.

Au regard des résultats obtenus, L'arrimage moléculaire a été choisi comme une discrimination de première ligne des bioactifs de l'espace chimique mentionné ci-dessus lié à l'interaction hydroxychloroquine-COX2 en raison de la capacité à simuler la liaison de petits composés dans le site actif des enzymes, en tant que procédure de discrimination basée sur la structure pour la prédiction *in silico* des concurrents putatifs (Li et al., 2017).

À cet égard, certaines préoccupations étaient prises en compte en utilisant des paramètres précis pour une sélection appropriée des procédures d'échantillonnage et de notation pendant le dépistage basé sur la structure (Westermaier et al., 2015).

Les enzymes cyclooxygénases (COX) sont responsables de l'étape engagée dans la biosynthèse des prostaglandines. En conséquence, ces enzymes sont des cibles pharmacologiquement importantes pour les médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens, tels que l'aspirine et les nouveaux inhibiteurs sélectifs de la COX-2 (Liu et al., 2012).

Les molécules qui avaient la plus faible énergie de liaison du score d'ancrage étaient considérées comme la meilleure molécule et inhibaient le récepteur cible car l'énergie de liaison inférieure correspond à une affinité de liaison plus élevée (Simon et al., 2017). Notre étude a révélé que l'hydroxychloroquine se lie à COX2 par six contacts (deux liaisons hydrogène et quatre liaisons hydrophobes).

En comparaison avec les autres AINS l'hydroxychloroquine a été la seule à montrer une activité élevée contre plus d'un récepteur cible GPCR, inhibiteurs de kinase, modulateurs de canal ionique et inhibiteur de protéases. Du point de vue de la découverte de médicaments, l'activité contre plusieurs cibles signifie normalement qu'une molécule présentera de multiples effets secondaires.

La structure de l'hydroxychloroquine, qui diffère de celles des anti-inflammatoires non stéroïdiens, avait tendance à montrer une activité contre une grande variété de cibles biologiques.

On dit parfois que de tels composés ont une activité de promiscuité. Des ligands peuvent également se révéler promiscueux, en particulier dans le cas de la réutilisation de médicaments (Gupta et al., 2020).

L'hydroxychloroquine n'était pas la seule à respecter la règle de lipinski. L'ibuprofène, le diclofénac, le naproxène, le piroxicam et le célécoxib ont tous un poids moléculaire ≤ 500 g / mol.

En comparant les valeurs de lipophilie (LogP) de nos ligands, nous observons qu'ils ont tous des valeurs inférieures à 5 et peuvent donc être facilement absorbés par l'organisme.

Cependant, tous les ligands ont un certain nombre de donneurs de liaisons hydrogène: ≤ 5 , un certain nombre d'accepteurs de liaisons hydrogène: ≤ 10

Le fait que la chloroquine et l'hydroxychloroquine soient prises en compte pour la prise en charge des patients atteints de COVID-19 met clairement en évidence la nécessité de mieux comprendre leurs paramètres pharmacocinétiques.

Cependant, une compréhension complète de ces paramètres a été difficile malgré les nombreuses études rapportées. En général, les paramètres pharmacocinétiques de la chloroquine et de l'hydroxychloroquine sont comparables (Kalia et al., 2007).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion

Le but de ce travail n'est pas de quantifier la fréquence de l'hypertension et des facteurs de risque qui y sont associés, bien que cela demeure préalable à la détermination « des besoins en santé. » d'une population et donc à l'élaboration de toute politique de santé. Dans notre cas, nous avons souhaité transformer l'appréhension traditionnelle de la valeur des connaissances actuelles sur le suivi des patients hypertendus et de proposer de nouvelles approches.

Ce travail revêt une signification particulière. La dernière décennie a vu une croissance substantielle de la littérature sur l'hypertension artérielle. Comment aborder ce thème avec une démarche à la fois simple et inédite. On retient que la meilleure façon d'avoir une bonne idée est d'en avoir plusieurs. Avec des outils innovants de la biologie moléculaire, nous avons voulu changer le regard que l'on porte sur le diagnostic de l'hypertension artérielle et des mécanismes moléculaires sous-jacents.

Le déficit était difficile à surmonter. Les renseignements nominatifs que nous avons recueillis, posent des problèmes, car ils ne renferment pas toutes les informations requises. Des variables qui peuvent être associées à l'hypertension n'ont pas été rapportées. Le milieu de résidence (urbain ou en ville), la situation familiale, la profession, et le revenu. Et surtout la part des individus qui ne répondent pas aux traitements et leurs particularités.

Il nous est apparu difficile voire impossible de répertorier la totalité des complications liées à l'hypertension artérielle dans notre région d'étude et d'en donner un aperçu descriptif; il est vrai que le diabète était le plus souvent associé à l'HTA. Mais peu de données de haute qualité provenant de la surveillance de l'évolution du diabète et du métabolisme des acides aminés sont disponibles. Notons aussi une déperdition importante du nombre de patients. Elle s'explique à la fois par des raisons objectives (déménagement), ou médicales (développement de complications) mais aussi par le refus explicite de certains patients de participer à l'enquête. Il nous est apparu aussi difficile, le fait de travailler sur l'hypertension dans un contexte pandémique particulier de trouver de nouveaux candidats dans la lutte au COVID-19. Malgré ces conditions, nous avons mis en évidence des stratégies originales d'évaluation des traitements qui ont été proposés.

Dans la suite de notre travail, nous concentrerons nos efforts sur le repositionnement d'autres molécules thérapeutiques et l'ancrage moléculaire avec des cibles méconnues.

Dans la lutte contre le Sars Cov 2. Etaient utilisés comme ligands :

-La Chloroquine , l'hydroxychloroquine , dérivés d'imidazole à base de 7-chloro-4-aminoquinoléine, analogues de la 4-aminoquinoléine et de la 8-aminoquinoléine de la chloroquine., leur pharmacophore., mais aussi combiné à l'azithromycine

- Les antiviraux seuls ou versus hydroxychloroquine

-Les produits naturels phytochimiques , flavonoides et non flavonoides

-La Caulerpine et ses dérivés comme médicament d'appoint contre les protéines réceptrices du SRAS-CoV-2 , ou en comparaison avec la chloroquine, l'hydroxychloroquine, l'azithromycine, le remdesivir, le baloxvir, le lopinavir et le favipiravir .

- Une molécule hybride «VTAR» conçu de novo basée sur des fragments de molécules sélectionnées, à savoir l'ascorbate, la ribavirine, le lopinavir et l'hydroxychloroquine

-Analogues synthétiques (notamment de la coumarine)

-Produits issus du criblage structure cristalline de la protéase principale COVID-19 en complexe avec d'autres produits.

- Le repositionnement ou réutilisation : Des médicaments bien tolérés et largement utilisés ont été sélectionnés pour des simulations de dynamique moléculaire afin d'évaluer les interactions médicament-protéine et leur persistance dans des conditions physiologiques exp

La tétracycline, la dihydroergotamine, l'ergotamine, le dutastéride, le nelfinavir et la palipéridone , l'eltrombopag, le tipranavir, l'ergotamine et le conivaptan, la dihydroergotamine, la bromocriptine, le dutastéride, le conivaptan, la palipéridone et le tipranavir , ou alors la famotidine en association avec d'autres médicaments antiviraux comme bithérapie recommandée (Ortega et al., 2020). Autant que l'hydroxychloroquine , l'artémisinine et ses dérivés (agent antipaludique) , certains antiviraux et d'autres antipaludiques ont été testés.

Dans un autre volet notre recherche se poursuivra sur la pharmacogénétique pour adapter la thérapie avec la meilleure réponse et la plus grande marge de sécurité . Une décision médicale doit être personnalisée pour chaque patient. Pour cela l'identification du profil génétique permettra de mieux comprendre la prédisposition des patients à l'hypertension artérielle et leur réponse aux traitements.

Perspectives

Proposer une réflexion sur les réalités de l'hypertension artérielle dans les populations de l'extrême ouest Algérien en dégagant des perspectives plausibles et concrètes dans la lutte contre l'hypertension peuvent donner des résultats concluants. Les problématiques développées dans ce travail contribueront à appréhender les particularités de l'hypertension artérielle dans un contexte spécifique. L'idée de base de cette recherche consistait à appréhender la complexité de l'hypertension dans son ensemble, au moyen de méthodes les moins restrictives possibles sur le plan descriptif.

Afin d'améliorer la compréhension et l'interprétation des facteurs sous jacents accompagnant cette affection métabolique à l'heure du Covid.

Afin d'adapter la thérapie avec la meilleure réponse et la plus grande marge de sécurité une décision médicale doit être personnalisée pour chaque patient. Pour cela l'identification du profil génétique permettra de mieux comprendre la prédisposition des patients à l'hypertension artérielle et leur réponse aux traitements.

L'appréhension du bilan hématologique devrait être reconsidérée. Des modifications quantitatives permettent de détecter une hypertension artérielle précoce et de mieux la traiter.

Le dosage du tryptophane et kynurénines sériques doit être inclus dans le bilan de suivi du diabète. Contrairement au dosage de l'hémoglobine glyquée qui reflète la glycémie des trois mois récents. Le ratio kynurénines /Tryptophane sérique offre une alternative plus précise pour comprendre l'évolution au long court du diabète chez les patients hypertendus

Le MNA est un outil d'évaluation de l'état nutritionnel des personnes âgées à risque de malnutrition, qui est moins coûteuse ; rapide, simple non invasive et validée de façon internationale. Le recours systématique à cette évaluation au moment du diagnostic du diabète chez les patients hypertendus et dans le suivi du traitement permet de identifier une dénutrition souvent sous-estimée chez ces malades car ses manifestations cliniques ne sont pas spécifiques.

Le rôle du biologiste n'est pas de faire une veille sanitaire cependant nous proposons de renforcer le suivi des hypertendus. La surveillance consiste à recueillir de manière systématique et permanente et à analyser les données afin de fournir des informations sur le l'hypertension dans notre pays.

Les systèmes de suivi doivent recueillir des informations fiables sur les facteurs de risque et leurs déterminants. Ces données sont essentielles pour l'élaboration de modèles de prédictions et de diagnostics.

A l'heure du COVID L'HTA, en tant que premier facteur de risque de morbi-mortalité cardiovasculaire, favorise les formes sévères de ce dernier.

Nous nous devons d'apporter les preuves scientifiques qui nous permettent ainsi de conclure si l'infection au coronavirus est plus importante chez les patients prenant un traitement antihypertenseur notamment les IEC et les ARA2.

Les outils dont nous disposons actuellement est que nous avons mis en œuvre sont désormais tout naturellement à l'avant-garde de la lutte contre l'hypertension et la Covid-19. Elles permettent, de proposer des outils de dépistage et de diagnostic, mais encore et surtout d'accélérer la recherche de thérapies.

Il ne s'agit pas dans ce contexte, de « découvrir » directement, par le seul calcul, le médicament mais de faire le tri, de sélectionner et de repositionner des molécules dignes d'intérêt. Les candidats repérés in silico seront passés au crible des tests.

Enfin, nous espérons au cours de ce travail enregistrer les particularités cliniques et biologiques des patients qui ne répondent pas, ou insuffisamment, aux traitements actuellement disponibles dans notre pays. Mais en vain

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- AKALU, Y. & BELSTI, Y. 2020. Hypertension and Its Associated Factors Among Type 2 Diabetes Mellitus Patients at Debre Tabor General Hospital, Northwest Ethiopia. *Diabetes, metabolic syndrome and obesity : targets and therapy*, 13, 1621-1631.
- AL-HAMDANI, I. A. H. 2010. Estimation of Serum Uric Acid, Urea and Creatinine in Essential Hypertensive Patients. *Tikrit Medical Journal*, 16.
- ALIBHAI, S. M., GREENWOOD, C. & PAYETTE, H. 2005. An approach to the management of unintentional weight loss in elderly people. *Cmaj*, 172, 773-80.
- BABU, K. R., SOLEPURE, A. & SHAIKH, R. 2015. Comparison of hematological parameters in primary hypertensives and normotensives of sangareddy. *Int J Biomed Res*, 6, 309-15.
- BIAN, J. & LI, Z. 2021. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2): SARS-CoV-2 receptor and RAS modulator. *Acta pharmaceutica Sinica. B*, 11, 1-12.
- BOMBARDIER, C., LAINE, L., REICIN, A., SHAPIRO, D., BURGOS-VARGAS, R., DAVIS, B., DAY, R., FERRAZ, M. B., HAWKEY, C. J. & HOCHBERG, M. C. 2000. Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis. *New England Journal of Medicine*, 343, 1520-1528.
- BRUSCHI, G., MINARI, M., BRUSCHI, M. E., TACINELLI, L., MILANI, B., CAVATORTA, A. & BORGHETTI, A. 1986. Similarities of essential and spontaneous hypertension. Volume and number of blood cells. *Hypertension*, 8, 983-9.
- CHEN, J., LU, H., MELINO, G., BOCCIA, S., PIACENTINI, M., RICCIARDI, W., WANG, Y., SHI, Y. & ZHU, T. 2020. COVID-19 infection: the China and Italy perspectives. *Cell Death Dis*, 11, 438.
- COLSON, P., ROLAIN, J. M., LAGIER, J. C., BROUQUI, P. & RAOULT, D. 2020. Chloroquine and hydroxychloroquine as available weapons to fight COVID-19. *Int J Antimicrob Agents*, 55, 105932.
- CUSSOTTO, S., DELGADO, I., ANESI, A., DEXPERT, S., AUBERT, A., BEAU, C., FORESTIER, D., LEDAGUENEL, P., MAGNE, E., MATTIVI, F. & CAPURON, L. 2020. Tryptophan Metabolic Pathways Are Altered in Obesity and Are Associated With Systemic Inflammation. *Frontiers in immunology*, 11, 557-557.
- DENNIS, E. A. & NORRIS, P. C. 2015. Eicosanoid storm in infection and inflammation. *Nat Rev Immunol*, 15, 511-23.
- DEO, M. G., PAWAR, P. V., KANETKAR, S. R. & KAKADE, S. V. 2017. Prevalence and risk factors of hypertension and diabetes in the Katkari tribe of coastal Maharashtra. *Journal of postgraduate medicine*, 63, 106-113.
- DEVAUX, C. A., ROLAIN, J. M., COLSON, P. & RAOULT, D. 2020. New insights on the antiviral effects of chloroquine against coronavirus: what to expect for COVID-19? *Int J Antimicrob Agents*, 55, 105938.
- DIAZ, J. H. 2020. Hypothesis: angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers may increase the risk of severe COVID-19. *J Travel Med*, 27.
- ENAWGAW, B., ADANE, N., TEREFE, B., ASRIE, F. & MELKU, M. 2017. A comparative cross-sectional study of some hematological parameters of hypertensive and normotensive individuals at the university of Gondar hospital, Northwest Ethiopia. *BMC Hematol*, 17, 21.
- FANELLO, S., FOUCAULT, S., DELBOS, V. & JOUSSET, N. 2000. Évaluation de l'état nutritionnel de la personne âgée hospitalisée. *Santé Publique* 12, 83-90.
- FANG, L., KARAKIULAKIS, G. & ROTH, M. 2020. Are patients with hypertension and diabetes mellitus at increased risk for COVID-19 infection? *Lancet Respir Med*, 8, e21.
- FERNER, R. E. & ARONSON, J. K. 2020. Chloroquine and hydroxychloroquine in covid-19. *Bmj*, 369, m1432.
- FORRESTER, S. J., BOOZ, G. W., SIGMUND, C. D., COFFMAN, T. M., KAWAI, T., RIZZO, V., SCALIA, R. & EGUCHI, S. 2018. Angiotensin II Signal Transduction: An Update on Mechanisms of Physiology and Pathophysiology. *Physiol Rev*, 98, 1627-1738.

- GANDHI, S. J., HAGANS, I., NATHAN, K., HUNTER, K. & ROY, S. 2017. Prevalence, comorbidity and investigation of anemia in the primary care office. *Journal of Clinical Medicine Research*, 9, 970.
- GARAVITO, R. M., MALKOWSKI, M. G. & DEWITT, D. L. 2002. The structures of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 68-69, 129-52.
- GAUTRET, P., LAGIER, J. C., PAROLA, P., HOANG, V. T., MEDDEB, L., MAILHE, M., DOUDIER, B., COURJON, J., GIORDANENGO, V., VIEIRA, V. E., TISSOT DUPONT, H., HONORÉ, S., COLSON, P., CHABRIÈRE, E., LA SCOLA, B., ROLAIN, J. M., BROUQUI, P. & RAOULT, D. 2020. Hydroxychloroquine and azithromycin as a treatment of COVID-19: results of an open-label non-randomized clinical trial. *Int J Antimicrob Agents*, 56, 105949.
- GAZZOTTI, C., ALBERT, A., PEPINSTER, A. & PETERMANS, J. 2000. Clinical usefulness of the mini nutritional assessment (MNA) scale in geriatric medicine. *J Nutr Health Aging*, 4, 176-81.
- GILLETT, M. J. 2009. International Expert Committee report on the role of the A1c assay in the diagnosis of diabetes: *Diabetes Care* 2009; 32(7): 1327-1334. *The Clinical biochemist. Reviews*, 30, 197-200.
- GREGG, E. W., CHENG, Y. J., CADWELL, B. L., IMPERATORE, G., WILLIAMS, D. E., FLEGAL, K. M., NARAYAN, K. M. & WILLIAMSON, D. F. 2005. Secular trends in cardiovascular disease risk factors according to body mass index in US adults. *JAMA*, 293, 1868-74.
- GRIEP, M. I., METS, T. F., COLLYS, K., VERTE, D., VERLEYE, G., PONJAERT-KRISTOFFERSEN, I. & MASSART, D. L. 1999. MNA and odor perception. *Nestle Nutr Workshop Ser Clin Perform Programme*, 1, 41-59; discussion 59-60.
- GRILLO, A., SALVI, L., CORUZZI, P., SALVI, P. & PARATI, G. 2019. Sodium intake and hypertension. *Nutrients*, 11, 1970.
- GUASTALEGGNAME, M. & VALLONE, A. 2020. Could Chloroquine /Hydroxychloroquine Be Harmful in Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Treatment? *Clin Infect Dis*, 71, 888-889.
- GUIGOZ, Y., VELLAS, B. & GARRY, P. J. 1994. A practical assessment tool for grading the nutritional state of elderly patients. *Fats and Research. Gerontology*, 2, 15-59.
- GUO, J., HUANG, Z., LIN, L. & LV, J. 2020. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) and Cardiovascular Disease: A Viewpoint on the Potential Influence of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors/Angiotensin Receptor Blockers on Onset and Severity of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Infection. *J Am Heart Assoc*, 9, e016219.
- HILL, M. & BORDONI, B. 2020. Hyperlipidémie. *Treasure Island (FL) StatPearls*. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559182/>.
- JADEJA, U., JADEJA, J. & NAIK, S. 2011. Comparative study of haemoglobin concentration in hypertensive and normotensive subjects. *Indian Journal of Applied Basic Medical Sciences*, 13, 1-6.
- KACHEKOUCHE, Y., DALI-SAHI, M., BENMANSOUR, D. & DENNOUNI-MEDJATI, N. 2018. Hematological profile associated with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Metab Syndr*, 12, 309-312.
- KAHN, S. E., COOPER, M. E. & DEL PRATO, S. 2014. Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present, and future. *Lancet*, 383, 1068-83.
- KARSH, J. 2006. Can anti-inflammatories be safe? *CMAJ : Canadian Medical Association Journal*, 175, 451-451.
- KEMCHE, B., SAHA FOUJOU, B. U. & FOKOU, E. 2020. Risk Factors of Hypertension among Diabetic Patients from Yaoundé Central Hospital and Etoug-Ebe Baptist Health Centre, Cameroon. *Journal of diabetes research*, 2020, 1853516-1853516.
- KONDRUP, J., ALLISON, S. P., ELIA, M., VELLAS, B. & PLAUTH, M. 2003. ESPEN guidelines for nutrition screening 2002. *Clin Nutr*, 22, 415-21.
- KOPIN, L. & LOWENSTEIN, C. 2017. Dyslipidemia. *Ann Intern Med*, 167, ITC81-ITC96.
- KUMAR, R., NANDHINI, L. P., KAMALANATHAN, S., SAHOO, J. & VIVEKANADAN, M. 2016. Evidence for current diagnostic criteria of diabetes mellitus. *World J Diabetes*, 7, 396-405.
- LAUQUE, S., GILLETTE-GUYONNET, S., ROLLAND, Y. & VELLAS, B. 2000. Les différents outils d'évaluation nutritionnelle chez la personne âgée. *Age Nutr* . 11, 105-12.

- LIU, J., CAO, R., XU, M., WANG, X., ZHANG, H., HU, H., LI, Y., HU, Z., ZHONG, W. & WANG, M. 2020. Hydroxychloroquine, a less toxic derivative of chloroquine, is effective in inhibiting SARS-CoV-2 infection in vitro. *Cell Discov*, 6, 16.
- LIU, W., POOLE, E. M., ULRICH, C. M. & KULMACZ, R. J. 2012. Decreased cyclooxygenase inhibition by aspirin in polymorphic variants of human prostaglandin H synthase-1. *Pharmacogenetics and genomics*, 22, 525-537.
- LOESCHE, W. J., BROMBERG, J., TERPENNING, M. S., BRETZ, W. A., DOMINGUEZ, B. L., GROSSMAN, N. S. & LANGMORE, S. E. 1995. Xerostomia, xerogenic medications and food avoidances in selected geriatric groups. *J Am Geriatr Soc*, 43, 401-7.
- MARX, W., MCGUINNESS, A. J., ROCKS, T., RUUSUNEN, A., CLEMINSON, J., WALKER, A. J., GOMES-DA-COSTA, S., LANE, M., SANCHES, M., DIAZ, A. P., TSENG, P. T., LIN, P. Y., BERK, M., CLARKE, G., O'NEIL, A., JACKA, F., STUBBS, B., CARVALHO, A. F., QUEVEDO, J., SOARES, J. C. & FERNANDES, B. S. 2020. The kynurenine pathway in major depressive disorder, bipolar disorder, and schizophrenia: a meta-analysis of 101 studies. *Mol Psychiatry*.
- MELIAN, E. B. & JARVIS, B. 2002. Candesartan cilexetil plus hydrochlorothiazide combination: a review of its use in hypertension. *Drugs*, 62, 787-816.
- MITCHENER, M. M., HERMANSON, D. J., SHOCKLEY, E. M., BROWN, H. A., LINDSLEY, C. W., REESE, J., ROUZER, C. A., LOPEZ, C. F. & MARNETT, L. J. 2015. Competition and allostery govern substrate selectivity of cyclooxygenase-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112, 12366-12371.
- OREN, O., YANG, E. H., GLUCKMAN, T. J., MICHOS, E. D., BLUMENTHAL, R. S. & GERSH, B. J. 2020. Use of Chloroquine and Hydroxychloroquine in COVID-19 and Cardiovascular Implications: Understanding Safety Discrepancies to Improve Interpretation and Design of Clinical Trials. *Circ Arrhythm Electrophysiol*, 13, e008688.
- ORTEGA, J. T., SERRANO, M. L. & JASTRZEBSKA, B. 2020. Class A G Protein-Coupled Receptor Antagonist Famotidine as a Therapeutic Alternative Against SARS-CoV2: An In Silico Analysis. *Biomolecules*, 10.
- OXENKRUG, G. 2013. Insulin resistance and dysregulation of tryptophan-kynurenine and kynurenine-nicotinamide adenine dinucleotide metabolic pathways. *Molecular neurobiology*, 48, 294-301.
- PEDERSEN, E. R., MIDTTUN, Ø., UELAND, P. M., SCHARTUM-HANSEN, H., SEIFERT, R., IGLAND, J., NORDREHAUG, J. E., EBBING, M., SVINGEN, G., BLEIE, Ø., BERGE, R. & NYGÅRD, O. 2011. Systemic markers of interferon- γ -mediated immune activation and long-term prognosis in patients with stable coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 31, 698-704.
- PHUA, J., WENG, L., LING, L., EGI, M., LIM, C. M., DIVATIA, J. V., SHRESTHA, B. R., ARABI, Y. M., NG, J., GOMERSALL, C. D., NISHIMURA, M., KOH, Y. & DU, B. 2020. Intensive care management of coronavirus disease 2019 (COVID-19): challenges and recommendations. *Lancet Respir Med*, 8, 506-517.
- POSTNOV, Y. V., KRAVTSOV, G. M., ORLOV, S. N., POKUDIN, N. I., POSTNOV, I. Y. & KOTELEVTSSEV, Y. V. 1988. Effect of protein kinase C activation on cytoskeleton and cation transport in human erythrocytes. Reproduction of some membrane abnormalities revealed in essential hypertension. *Hypertension*, 12, 267-73.
- RAKOTOVAO-RAVAHATRA, Z. D., RANDRIATSARAFARA, F. M., RAZAFIMANANTSOA, F., RABETOKOTANY, F. R. & RAKOTOVAO, A. L. 2016. [Blood count results from hypertensive patients seen in laboratory of CHU-HJRB Antananarivo in 2013]. *The Pan African medical journal* [Online], 23. Available: <http://europepmc.org/abstract/MED/27217875>

<https://doi.org/10.11604/pamj.2016.23.49.8900>

<https://europepmc.org/articles/PMC4862782>

<https://europepmc.org/articles/PMC4862782?pdf=render> [Accessed 2016].

- RYDÉN, L., GRANT, P. J., ANKER, S. D., BERNE, C., COSENTINO, F., DANCHIN, N., DEATON, C., ESCANED, J., HAMMES, H. P., HUIKURI, H., MARRE, M., MARX, N., MELLBIN, L. & OSTERGREN, J. 2013. ESC Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases developed in collaboration with the EASD: the Task Force on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and developed in collaboration with the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Eur Heart J*, 34, 3035-87.
- SALETTI, A., LINDGREN, E. Y., JOHANSSON, L. & CEDERHOLM, T. 2000. Nutritional status according to mini nutritional assessment in an institutionalized elderly population in Sweden. *Gerontology*, 46, 139-45.
- SALVA, A., JOSE BLEDA, M. & BOLIBAR, I. 1999. The Mini Nutritional Assessment in clinical practice. *Nestle Nutr Workshop Ser Clin Perform Programme*, 1, 123-9; discussion 129-30.
- SAPRA, A. & BHANDARI, P. 2020. Diabetes Mellitus. *StatPearls*. Treasure Island (FL), Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551501/>.
- SMEBYE, M. L., IVERSEN, E. K., HØIEGGEN, A., FLAA, A., OS, I., KJELDSSEN, S. E., OLSEN, M. H., CHATTOPADHYAY, A., HILLE, D. A. & LYLE, P. A. 2007. Effect of hemoglobin levels on cardiovascular outcomes in patients with isolated systolic hypertension and left ventricular hypertrophy (from the LIFE study). *The American journal of cardiology*, 100, 855-859.
- STRAUS, D. S. & GLASS, C. K. 2001. Cyclopentenone prostaglandins: new insights on biological activities and cellular targets. *Med Res Rev*, 21, 185-210.
- TLEYJEH, I. M., KASHOUR, Z., ALDOSARY, O., RIAZ, M., TLAYJEH, H., GARBATI, M. A., TLEYJEH, R., AL-MALLAH, M. H., SOHAIL, M. R., GERBERI, D., BIN ABDULHAK, A. A., GIUDICCESSI, J. R., ACKERMAN, M. J. & KASHOUR, T. 2020. The Cardiac Toxicity of Chloroquine or Hydroxychloroquine in COVID-19 Patients: A Systematic Review and Meta-regression Analysis. *Mayo Clin Proc Innov Qual Outcomes*.
- TOURET, F. & DE LAMBALLERIE, X. 2020. Of chloroquine and COVID-19. *Antiviral Res*, 177, 104762.
- UYSAL, H. B., DAĞLI, B., AKGÜLLÜ, C., AVCIL, M., ZENCIR, C., AYHAN, M. & SÖNMEZ, H. M. 2016. Blood count parameters can predict the severity of coronary artery disease. *The Korean journal of internal medicine*, 31, 1093-1100.
- VELLINGIRI, B., JAYARAMAYYA, K., IYER, M., NARAYANASAMY, A., GOVINDASAMY, V., GIRIDHARAN, B., GANESAN, S., VENUGOPAL, A., VENKATESAN, D., GANESAN, H., RAJAGOPALAN, K., RAHMAN, P., CHO, S. G., KUMAR, N. S. & SUBRAMANIAM, M. D. 2020. COVID-19: A promising cure for the global panic. *Sci Total Environ*, 725, 138277.
- WHELTON, P. K., CAREY, R. M., ARONOW, W. S., CASEY, D. E., JR., COLLINS, K. J., DENNISON HIMMELFARB, C., DEPALMA, S. M., GIDDING, S., JAMERSON, K. A., JONES, D. W., MACLAUGHLIN, E. J., MUNTNER, P., OVBIAGELE, B., SMITH, S. C., JR., SPENCER, C. C., STAFFORD, R. S., TALER, S. J., THOMAS, R. J., WILLIAMS, K. A., SR., WILLIAMSON, J. D. & WRIGHT, J. T., JR. 2018. 2017 ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Hypertension*, 71, e13-e115.
- WHO 2020. WHO announces COVID-19 epidemic a pandemic. World Health Organization, Genève, Suisse.
- WILLIAMS, B., MANCIA, G., SPIERING, W., AGABITI ROSEI, E., AZIZI, M., BURNIER, M., CLEMENT, D. L., COCA, A., DE SIMONE, G., DOMINICZAK, A., KAHAN, T., MAHFOUD, F., REDON, J., RUILOPE, L. & ZANCHETTI, A. 2018. 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension. *Eur Heart J*, 39, 3021-3104.
- YAO, X., YE, F., ZHANG, M., CUI, C., HUANG, B., NIU, P., LIU, X., ZHAO, L., DONG, E., SONG, C., ZHAN, S., LU, R., LI, H., TAN, W. & LIU, D. 2020. In Vitro Antiviral Activity and Projection of Optimized Dosing Design of Hydroxychloroquine for the Treatment of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *Clin Infect Dis*, 71, 732-739.
- ZHAI, P., DING, Y., WU, X., LONG, J., ZHONG, Y. & LI, Y. 2020. The epidemiology, diagnosis and treatment of COVID-19. *Int J Antimicrob Agents*, 55, 105955.

ZHOU, D., DAI, S. M. & TONG, Q. 2020. COVID-19: a recommendation to examine the effect of hydroxychloroquine in preventing infection and progression. *J Antimicrob Chemother*, 75, 1667-1670.

Annexes

Questionnaire Du Malade

Nom et prénom :.....
 Age:.....ans
 Sexe: Masculin Féminin
 Poids :.....Kg Taille:.....m IMC:.....Kg/m²
 Tour de taille:.....m Tour de hanche:.....m
 PAS :.....mmHg PAD:.....mmHg

Paramètres anthropo-sociologiques

Niveau d'instruction : Analphabète Primaire Secondaire Universitaire
 Activité professionnelle: Sans profession Avec profession Retraité
 Type d'Habitat : Individuel Collectif
 Situation familiale: Marié Célibataire Autre

ATCD personnel

Cardiopathie :
 HTA: Oui Non Diabète: Oui Non
 Dyslipidémie: Oui Non

Facteurs de risque

HTA: Oui Non Diabète: Oui Non
 Dyslipidémie: Oui Non Obésité: Oui Non
 Tabac: Oui Non Alcool: Oui Non ATCD Familiaux: Oui Non

Examen Biochimique

Troponine:.....Asat (TGO) :..... Alat (TGP):.....
 Myoglobine:..... LDH:..... CK MB:.....
 Glycémie:.....Créatinine:..... Urée:.....
 Cholestérol total:.....Triglycérides :..... CRP:.....
 HDL cholestérol:.....LDL cholestérol :.....

Traitement: Oui Non

Citer :

Mini Nutritional Assessment

MNA®

Nestlé
Nutrition Institute

Nom :	Prénom :			
Sexe :	Age :	Poids, kg :	Taille, cm :	Date :

Répondez à la première partie du questionnaire en indiquant le score approprié pour chaque question. Additionnez les points de la partie Dépistage, si le résultat est égal à 11 ou inférieur, complétez le questionnaire pour obtenir l'appréciation précise de l'état nutritionnel.

Dépistage

A Le patient présente-t-il une perte d'appétit? A-t-il moins mangé ces 3 derniers mois par manque d'appétit, problèmes digestifs, difficultés de mastication ou de déglutition ?

- 0 = baisse sévère des prises alimentaires
1 = légère baisse des prises alimentaires
2 = pas de baisse des prises alimentaires

B Perte récente de poids (<3 mois)

- 0 = perte de poids > 3 kg
1 = ne sait pas
2 = perte de poids entre 1 et 3 kg
3 = pas de perte de poids

C Motricité

- 0 = au lit ou au fauteuil
1 = autonome à l'intérieur
2 = sort du domicile

D Maladie aiguë ou stress psychologique au cours des 3 derniers mois?

- 0 = oui 2 = non

E Problèmes neuropsychologiques

- 0 = démence ou dépression sévère
1 = démence légère
2 = pas de problème psychologique

F Indice de masse corporelle (IMC) = poids en kg / (taille en m)²

- 0 = IMC < 19
1 = 19 ≤ IMC < 21
2 = 21 ≤ IMC < 23
3 = IMC ≥ 23

Score de dépistage
(sous-total max. 14 points)

12-14 points: état nutritionnel normal
8-11 points: à risque de dénutrition
0-7 points: dénutrition avérée

Pour une évaluation approfondie, passez aux questions G-R

Evaluation globale

G Le patient vit-il de façon indépendante à domicile ?
1 = oui 0 = non

H Prend plus de 3 médicaments par jour ?
0 = oui 1 = non

I Escarres ou plaies cutanées ?
0 = oui 1 = non

J Combien de véritables repas le patient prend-il par jour ?

- 0 = 1 repas
1 = 2 repas
2 = 3 repas

K Consomme-t-il ?

- Une fois par jour au moins des produits laitiers? oui non
 - Une ou deux fois par semaine des œufs ou des légumineuses oui non
 - Chaque jour de la viande, du poisson ou de volaille . oui non
- 0,0 = si 0 ou 1 oui
0,5 = si 2 oui
1,0 = si 3 oui

L Consomme-t-il au moins deux fois par jour des fruits ou des légumes ?

- 0 = non 1 = oui

M Quelle quantité de boissons consomme-t-il par jour ? (eau, jus, café, thé, lait...)

- 0,0 = moins de 3 verres
0,5 = de 3 à 5 verres
1,0 = plus de 5 verres

N Manière de se nourrir

- 0 = nécessite une assistance
1 = se nourrit seul avec difficulté
2 = se nourrit seul sans difficulté

O Le patient se considère-t-il bien nourri ?

- 0 = se considère comme dénutri
1 = n'est pas certain de son état nutritionnel
2 = se considère comme n'ayant pas de problème de nutrition

P Le patient se sent-il en meilleure ou en moins bonne santé que la plupart des personnes de son âge ?

- 0,0 = moins bonne
0,5 = ne sait pas
1,0 = aussi bonne
2,0 = meilleure

Q Circonférence brachiale (CB en cm)

- 0,0 = CB < 21
0,5 = CB ≤ 21 ≤ 22
1,0 = CB > 22

R Circonférence du mollet (CM en cm)

- 0 = CM < 31
1 = CM ≥ 31

Évaluation globale (max. 16 points)

Score de dépistage

Score total (max. 30 points)

Appréciation de l'état nutritionnel

de 24 à 30 points état nutritionnel normal
de 17 à 23,5 points risque de malnutrition
moins de 17 points mauvais état nutritionnel

Ref. Vellas B, Villars H, Abellan G, et al. Overview of the MNA® - Its History and Challenges. J Nutr Health Aging 2006;10:456-465.
Rubenstein LZ, Harker JO, Salva A, Guigoz Y, Vellas B. Screening for Undernutrition in Geriatric Practice: Developing the Short-Form Mini Nutritional Assessment (MNA-SF). J. Geront 2001;56A: M366-377.
Guigoz Y. The Mini-Nutritional Assessment (MNA®) Review of the Literature - What does it tell us? J Nutr Health Aging 2006; 10:466-487.
© Société des Produits Nestlé, S.A., Vevey, Switzerland, Trademark Owners
© Nestlé, 1994, Revision 2006. N67200 12/99 10M
Pour plus d'informations : www.mna-elderly.com

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Abou-Bekr-Belkaid Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences
de la Terre de l'Univers
Département de biologie

Madame, Monsieur,

Vous participez à un projet de recherche sur le diabète de type 2 et ses facteurs de risque sur la santé. Dans le cadre de ce projet, un prélèvement d'échantillon de sang est proposé. Le volume de ce prélèvement est de 5 ml de sang.

La conservation de vos échantillons de sang s'effectuera dans des conditions strictes de confidentialité des données médicales sans que votre nom, votre prénom ou d'autres données directement nominatives ne soient transmises avec le prélèvement.

Conformément à la loi du 6 juillet 1992 portant code de la déontologie médicale. Le protocole est lu et approuvé par le conseil régional de déontologie médicale.

Après avoir lu cette information et pu poser toutes les questions que je jugeais utiles au médecin qui me suit.

J'accepte qu'un prélèvement de sang soit effectué conformément aux objectifs et aux méthodes décrits ci-dessus.

Prénom et nom du patient: Date:

1. Signature:

2. Signature:

Un exemplaire original signé de ce formulaire de consentement doit être conservé par le patient.

