



# UNIVERSITE DE LILLE

Ecole Doctorale de Biologie et Santé de Lille

## THESE

Pour l'obtention du grade de

## DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE

Discipline : Neurosciences

Présentée par Caio Fernando FERREIRA COELHO

### Études sur des implications neuroendocrines de la Covid-19 : le rôle protecteur neurovasculaire de la mélatonine et les effets délétères de la neuro-Covid sur le contrôle hypothalamique de la reproduction

Soutenue le 4 décembre de 2023, devant le Jury composée de :

- Rapporteurs : Mr Philippe CIOFI, Directeur de Recherche Inserm U1215  
Mme Valérie SIMONNEAUX, Directrice de Recherche CNRS UPR3212
- Examineurs : Mr François TROTTEIN, Directeur de Recherche CNRS UMR8204  
Mme Erika Cecon, Chercheuse statutaire CNRS UMR8104
- Invitée : Mme Martine DUTERQUE-COQUILLAUD, Directrice de Recherche CNRS UMR8161
- Présidente : Mme Sophie SUSEN, PU-PH Inserm U1011
- Directeur de thèse : Mr Vincent PREVOT, Directeur de Recherche Inserm U1172
- Co-directrice de thèse : Mme. Daniela FERNANDOIS, Chercheuse Inserm U1172



« Pour être grand, sois entier : rien  
En toi n'exagère ou n'exclus.  
Sois tout en chaque chose. Mets tout ce que tu es  
Dans le plus petit de tes actes.  
Ainsi en chaque lac brille la lune entière  
Pour la raison qu'elle vit haut. »

(Fernando Pessoa)

A ma mère Silvia Rosana Costa Ferreira et à mon frère Gabriel Ferreira Coelho, qui constituent une partie de ce que je suis, physique et spirituellement.

Aux sept-cent mil brésiliens qui sont décédés à cause de la COVID-19 entre 2019 et 2022 (*in memoriam*), victimes de l'ingérence antiscientifique de l'Etat brésilien.

## Remerciements

J'exprime d'abord mes remerciements à ma mère, Silvia Rosana et mon frère, Gabriel. Au cours de toutes ces années loin du Brésil et inquiété par l'impact affreux de la pandémie de COVID-19 dans mon pays natal, leurs conseils et leur amour m'ont donné de la force pour poursuivre cette thèse.

Ma gratitude à M. le Docteur Vincent Prévot, qui m'a accueilli au sein de son laboratoire pour accomplir cette thèse. Je lui exprime tous mes remerciements pour la patience qu'il a eue à mon égard. Je le remercie aussi pour toutes ses critiques constructives au cours de mon doctorat.

Je remercie tous les membres de ce Jury pour avoir consacré leur temps à la lecture, l'évaluation et la critique de ce travail et en particulier Mme le Docteur Erika Cecon, dont la collaboration a généré un des articles qui intègrent cette thèse. Je remercie aussi M. le Docteur François Trottein et à M. Cyril Robil pour nous avoir donné la possibilité d'analyser des échantillons, ce qui a donné naissance à la troisième partie de cette thèse. Aussi à M. le Docteur Philippe Ciofi, qui a fait partie de mes deux Comités de suivi individuel et m'a toujours secondé grâce à sa connaissance fascinante. Merci à Mme Valérie Simonneaux qui a accepté promptement d'être rapportrice.

Je tiens à remercier avec beaucoup de gratitude Mme le Docteur Daniela Fernandois, pour toute la connaissance qu'elle m'a donnée, toute l'aide et l'enseignement à la paillasse, tous les conseils et toutes nos conversations. Je la remercie d'avoir été un grand pilier de ma formation scientifique pendant ma thèse. J'aimerais remercier mes collègues de doctorat du laboratoire qui ne m'ont pas laissé seul dans cette aventure, plus particulièrement à Virginia Delli, Fatima Timzoura, Eleonora Deligia, Laurine Decoster et Ophélie Hanot. Avec vous, j'ai partagé les joies et les tristesses de la vie en thèse. J'aimerais remercier tous les postdoctorants de l'équipe DPNB pour leurs conseils qui m'ont aidé à poursuivre dans la thèse et à améliorer mon travail.

Je tiens à remercier tous mes amis au Brésil, qui m'ont toujours donné un support émotionnel et dont l'amitié n'est jamais retombée à cause de la distance atlantique. Leur importance pour mon succès m'amène à les citer nominalement. A Nilson Carlos, Otilia Ribeiro et Imaira Portela, qui m'ont accueilli pendant mon unique séjour au Brésil pendant cette thèse, et dont les conversations m'ont fait rêver plusieurs fois encore. A Juliana Cutrim, l'amie qui m'a appris la phénoménologie et les plus belles chansons de sa voix. A Mariana

Reis, Mariana Santos, Arthur Marques, Deysielle Chagas, Rodrigo Viana aussi, pour ces années d'amitié et de notre partage de rêves. Nos échanges ont transformé et modifient encore toute ma façon d'interpréter le monde.

Je tiens à remercier aussi mes amis qui m'ont été donnés par ces années dans la recherche médicale au Brésil : Marcus Paes, Samira Abdalla, Perla Lopes, Thamys Marinho, Iandeiara Savanna, Emily Moraes. Sans vous, je n'aurais jamais pu accomplir mon rêve de faire une thèse à l'étranger.

J'ai toute ma gratitude à Simon Eloir, mon amoureux, à la famille Eloir et à ses amis, qui m'ont accueilli dans leur vie sans aucun type de préjugé et m'ont toujours supporté dans mes plans ici en France.

Je veux remercier tous mes amis brésiliens diasporiques qui ont été le soleil et les épices brésiliennes de mes trois années à Lille. Vous m'avez aidé à ne pas oublier la chaleur du Brésil et à apaiser le mal du pays.

Finalement, je me dois de remercier toute l'équipe Développement et plasticité du cerveau neuroendocrine (DPNB) pour les moments et les partages de connaissance. Aux dames du secrétariat du Bâtiment Biserte, j'exprime aussi toute ma gratitude, et spécialement à Mme Céline Brand. J'exprime d'abord mes remerciements à ma mère Silvia Rosana et mon frère Gabriel. Au cours de toutes ces années loin du Brésil et inquiété par l'impacte affreux de la pandémie de COVID-19 dans mon pays natal, leurs conseils et leur amour m'ont donné de la force pour poursuivre cette thèse.

## RESUME

En décembre 2019, un nouveau bêta-coronavirus a été identifié comme l'agent étiologique d'une nouvelle forme de Syndrome Respiratoire Aigu Sévère (SRAS) et nommé SRAS-CoV-2. En février 2020, la dénommée COVID-19 (maladie à coronavirus de 2019) fut déjà considérée comme une pandémie. En outre, les taux de transmission élevés du SRAS-CoV-2 ont imposé un défi logistique aux systèmes de santé du monde entier. Bien que la plupart des cas évoluent en une maladie légère à modérée dans les voies respiratoires supérieures, certains patients à risque peuvent développer une pneumonie potentiellement mortelle. Les réponses immunitaires dysfonctionnelles et l'état prothrombotique ont été décrits comme jouant un rôle majeur dans la maladie aiguë. Même si le SRAS-CoV-2 cible principalement les poumons, la COVID-19 peut également se manifester par une panoplie de signaux et de symptômes neurologiques appelés Neuro-COVID. Certains d'entre eux, comme le brouillard cérébral et l'anosmie, peuvent persister dans la COVID longue, c'est à dire une forme de la maladie où les symptômes persistent au-delà de 4 semaines après l'infection par le SARS-CoV2. Le virus peut infecter les cellules endothéliales du cerveau, favorisant la rupture de la barrière hémato-encéphale et endommageant les petits vaisseaux du cerveau.

Dans le contexte d'un effort mondial de la recherche sur la COVID-19, cette thèse reprend le travail de notre équipe qui a été développé sur deux lignes de front. La première visait à caractériser les effets d'un traitement à la mélatonine ou à des composés mélatoninergiques dans l'infection cérébrale du SRAS-CoV-2 chez des souris K18-hACE2. Certains articles d'hypothèse proposaient la mélatonine comme traitement adjuvant de la COVID-19, à cause de ses propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes, mais aucune étude préclinique testant cette théorie n'avait été réalisée jusqu'alors.

D'autre part, nous avons cherché à étudier les lésions hypothalamiques dans le contexte de la Neuro-COVID. Par conséquent, nous avons cherché à étudier sa relation avec les symptômes endocrines et neurologiques décrits chez les patients atteints de COVID longue. Afin d'atteindre cet objectif, nous avons d'abord exploré le profil hormonal (testostérone, LH et FSH) de l'axe reproductif des patients atteints de COVID-19. Nous avons également examiné les cibles de l'infection par le SRAS-CoV-2 dans l'hypothalamus de patients décédés et dans les tissus fœtaux humains. Par la suite, notre troisième étude s'est appuyée sur le modèle hamster mâle que le SRAS-CoV-2 infecte naturellement. Les taux circulants de

testostérone, LH et progestérone ont été dosés parallèlement jusqu'au 45<sup>ème</sup> jour après l'infection. Nous avons également examiné l'expression des gènes liés au contrôle par le cerveau de la reproduction et notamment l'expression de la kisspeptine.

Les résultats de notre premier travail montrent que les injections quotidiennes de mélatonine et de composés mélatonergiques diminuent l'infection par le SRAS-Cov-2 dans le cerveau des souris K18-hACE2 en altérant l'entrée virale dans les cellules cibles, et vraisemblablement dans les cellules endothéliales cérébrales, et diminuent les dommages aux petits vaisseaux, l'infiltration des cellules immunitaires et l'inflammation du cerveau. En utilisant les analyses de modélisation moléculaire et les approches *in vitro*, nous avons pu démontrer que l'entrée du SRAS-CoV-2 dans les cellules endothéliales est empêchée par la liaison de la mélatonine à un site de liaison allostérique sur l'enzyme 2 de conversion de l'angiotensine humaine (ACE2), interférant ainsi avec la fonction de l'ACE2 en tant que récepteur d'entrée du SRAS-CoV-2.

Nous avons constaté une hypotestostéronémie d'origine hypothalamique chez certains hommes, soit en phase aiguë, soit durant la phase de COVID longue. En outre, des changements dans les niveaux de testostérone et de la masse corporelle au fil du temps étaient inversement corrélés. À cet égard, nous avons montré par qPCR et l'hybridation *in situ* que l'hypothalamus des cerveaux de patients décédés de la COVID-19 pouvait être infecté par le SRAS-CoV-2 et que les neurones à GnRH (hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires ou gonadolibérine) pouvaient être directement ciblés et que cela pouvait engendrer la mort de ces neurones pilotant la fonction de reproduction par apoptose. En utilisant le modèle hamster nous avons aussi découvert que le système kisspeptinergique qui contrôle la pulsativité de la sécrétion de GnRH pouvait aussi être altéré.

L'ensemble de nos travaux pointent vers l'hypothèse que certains des symptômes de la COVID longue pourraient être liés à un déficit du fonctionnement de l'axe neuroendocrinien contrôlant la reproduction et notamment une altération de la sécrétion pulsatile de GnRH qui a récemment été montrée pour aussi jouer un rôle important dans le contrôle de la cognition. Cette déficience du système à GnRH pourrait contribuer à la physiopathologie de la Neuro-COVID. De plus, nos travaux suggèrent que la mélatonine pourrait être une molécule intéressante pour la prise en charge de la Neuro-COVID du fait qu'elle est capable de diminuer la neuroinvasion du SRAS-CoV-2 et les phénomènes neuroinflammatoires qui y sont associés dans un modèle préclinique de COVID-19 sévère.

## ABSTRACT

In December 2019, a new beta-coronavirus was identified as the etiological agent of a new form of Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) and named SARS-CoV-2. In February 2020, the so-called COVID-19 (coronavirus disease of 2019) was already considered a pandemic. In addition, the high transmission rates of SARS-CoV-2 have imposed a logistical challenge on healthcare systems worldwide. Although most cases progress to mild to moderate upper respiratory tract disease, some at-risk patients may develop life-threatening pneumonia. Dysfunctional immune responses and a prothrombotic state have been described as playing a major role in acute illness. Although SARS-CoV-2 primarily targets the lungs, COVID-19 can also manifest as a panoply of neurological signals and symptoms known as Neuro-COVID. Some of these, such as brain fog and anosmia, may persist during long COVID. The virus can infect the brain's endothelial cells, promoting disruption of the blood-brain barrier and damaging the brain's small vessels.

In the context of a worldwide research effort on COVID-19, this thesis takes up our team's work, which was developed on two fronts. The first was to characterize the effects of treatment with melatonin or melatonergic compounds in SARS-CoV-2 brain infection in K18-hACE2 mice. Some hypothesis papers proposed melatonin as an adjuvant treatment for COVID-19, due to its anti-inflammatory and antioxidant properties, but no preclinical studies testing this theory had been carried out to date.

On the other hand, we sought to study hypothalamic lesions in the context of Neuro-COVID. Consequently, we sought to investigate its relationship with the endocrine and neurological symptoms described in patients with long COVID. To achieve this goal, we first explored the hormonal profile (testosterone, LH and FSH) of the reproductive axis in COVID-19 patients. We also examined the targets of SARS-CoV-2 infection in the hypothalamus of deceased patients and in human fetal tissue. Subsequently, our third study was based on the male hamster model that SARS-CoV-2 naturally infects. Circulating levels of testosterone, LH and progesterone were assayed in parallel ~~with infection~~ up to 45 days post-infection. We also examined the expression of genes linked to the brain's control of reproduction, in particular the expression of kisspeptin.

The results of our first work show that daily injections of melatonin and melatonergic compounds diminish SARS-Cov-2 infection in the brains of K18-hACE2 mice by altering viral entry into target cells, and presumably brain endothelial cells, and decrease small-vessel

damage, immune cell infiltration and brain inflammation. Using molecular modeling analyses and in vitro approaches, we were able to demonstrate that SARS-CoV-2 entry into endothelial cells is prevented by melatonin binding to an allosteric binding site on human angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2), thereby interfering with the function of ACE2 as a SARS-CoV-2 entry receptor.

We found hypothalamic hypotestosteronemia in some men, either in the acute phase or during the long COVID phase. In addition, changes in testosterone levels and body mass over time were inversely correlated. In this respect, we showed by qPCR and in situ hybridization that the hypothalamus of brains from patients who died of COVID-19 could be infected by SARS-CoV-2 and that GnRH (gonadotropin-releasing hormone) neurons could be directly targeted, resulting in the death by apoptosis of these neurons that drive reproductive function. Using the hamster model, we also discovered that the kisspeptinergic system, which controls the pulsatility of GnRH secretion, could also be altered.

Taken together, our work points to the hypothesis that some of the symptoms of long COVID could be linked to a deficit in the functioning of the neuroendocrine axis controlling reproduction, and in particular an alteration in pulsatile GnRH secretion, which has recently also been shown to play an important role in the control of cognition. This impairment of the GnRH system could contribute to the pathophysiology of Neuro-COVID. Furthermore, our work suggests that melatonin could be an interesting molecule for the management of Neuro-COVID, as it is able to decrease SARS-CoV-2 neuroinvasion and associated neuroinflammatory phenomena in a preclinical model of severe COVID-19.

## PUBLICATIONS

Ce travail a été réalisé à l'Unité 1172 Inserm, au Laboratoire de Plasticité et Développement du Cerveau Neuroendocrine, et à donné lieu aux publications et communications suivantes :

### Articles :

- Cecon E, Fernandois D, Renault N, **Coelho CFF**, Wenzel J, Bedart C, Isabelle C, Gallet S, Le Poder S, Klonjkowski B, Schwaninger M, Prevot V, Dam J, Jockers R. Melatonin drugs inhibit SARS-CoV-2 entry into the brain and virus-induced damage of cerebral small vessels. *Cell Mol Life Sci*. **2022** Jun 13;79(7):361. doi: 10.1007/s00018-022-04390-3. PMID: 35697820; PMCID: PMC9191404.
- Sauve F, Nampoothiri S, Clarke SA, Fernandois D, **Ferreira Coelho CF**, Dewisme J, Mills EG, Ternier G, Cotellessa L, Iglesias-Garcia C, Mueller-Fielitz H, Lebouvier T, Perbet R, Florent V, Baroncini M, Sharif A, Ereño-Orbea J, Mercado-Gómez M, Palazon A, Mattot V, Pasquier F, Catteau-Jonard S, Martinez-Chantar M, Hrabovszky E, Jourdain M, Deplanque D, Morelli A, Guarnieri G, Storme L, Robil C, Trottein F, Nogueiras R, Schwaninger M, Pigny P, Poissy J, Chachlaki K, Maurage CA, Giacobini P, Dhillon W, Rasika S, Prevot V. Long-COVID cognitive impairments and reproductive hormone deficits in men may stem from GnRH neuronal death. *EBioMedicine*. **2023** Oct;96:104784. doi: 10.1016/j.ebiom.2023.104784. Epub 2023 Sep 13. PMID: 37713808; PMCID: PMC10507138.

### Communication affichée :

- **Coelho CFF**, Cecon E, Fernandois D, Renault N, Wenzel J, Bedart C, Isabelle C, Gallet S, Le Poder S, Klonjkowski B, Schwaninger M, Prevot V, Dam J, Jockers R. Melatonin drugs inhibit SARS-CoV-2 entry into the brain and virus-induced damage of cerebral small vessels. International Congress of Neuroendocrinology, Glasgow, August 2022.

# Sommaire

<b>Sommaire.....</b>	<b>1</b>
<b>Liste d'abréviations.....</b>	<b>3</b>
<b>Introduction.....</b>	<b>6</b>
<b>I- La pandémie de COVID-19 et la Neuro-COVID : du mécanisme de l'infection virale à la COVID longue.....</b>	<b>6</b>
<b>1.1 Le SARS-CoV2 et le mécanisme d'infection cellulaire via le récepteur ACE2.3</b>	
1.1.1 Le SARS-CoV2 en perspective : contexte initial et comparaison avec les autres coronavirus épidémiques.....	6
1.1.2 Les coronavirus .....	8
<b>1.2 Les aspects physiopathologiques majeurs de la COVID-19.....</b>	<b>12</b>
1.2.1 Les portes d'entrée du virus.....	12
1.2.2 L'orage cytokinique.....	13
1.2.3 Le dialogue entre les événements thrombotiques et les actions des cellules immunitaires dans l'évolution de la COVID-19.....	14
<b>1.3 Aspects cliniques et épidémiologiques de la COVID-19 .....</b>	<b>19</b>
<b>1.4 La Neuro-COVID comme conséquence des atteintes de la barrière hémato-encéphalique .....</b>	<b>22</b>
1.4.1 La barrière hémato-encéphalique.....	22
1.4.2 La Neuro-COVID : aspects cliniques et pathologiques.....	25
1.4.3 Les atteintes de la barrière hémato-encéphalique par le SARS-CoV2 : une bataille à plusieurs fronts .....	32
<b>1.5 COVID longue : emphase sur ses répercussions neuropsychiatriques et neuroendocrines.....</b>	<b>37</b>
1.5.1 COVID principaux signes et symptômes et mécanismes physiopathologiques.....	37
1.5.2 Symptômes neuropsychiatriques de la COVID longue.....	44
1.5.3 Symptômes reproductives de la COVID longue.....	46
<b>1.6 Les modèles animaux pour l'étude du SARS-CoV2.....</b>	<b>47</b>
<b>II- Mélatonine : physiologie et applications thérapeutiques.....</b>	<b>54</b>
<b>2.1 L'évolution de la mélatonine et ses propriétés antioxydantes .....</b>	<b>54</b>
<b>2.2 La régulation du cycle circadien par la mélatonine et ses récepteurs.....</b>	<b>58</b>

2.3 Les propriétés thérapeutiques de la mélatonine et des drogues mélatoninergiques .....	59
<b>Objectives .....</b>	<b>61</b>
<b>Matériel et méthodes .....</b>	<b>63</b>
<b>Résultats .....</b>	<b>67</b>
<b>Etude 1 - La mélatonine et les drogues mélatoninergiques inhibent l'entrée du SARS-CoV2 dans le cerveau et la formation de vaisseaux fantômes induite par le virus (Article 1) .....</b>	<b>70</b>
<b>Etude 2 - Les troubles cognitifs et le déficit en hormones sexuelles masculines pourrait être liés à la mort de neurones à GnRH (Article 2).</b>	<b>93</b>
<b>Etude 3 - Le SARS-CoV2 infecte des neurones à GnRH dans le cerveau des souris K18-hACE2.....</b>	<b>115</b>
<b>Etude 4 - L'infection par le SARS-CoV2 entraine une l'hypotestostéronémie et une altération de l'expression de la kisspeptine dans le noyau arqué de l'hypothalamus chez hamster.....</b>	<b>119</b>
<b>Discussion.....</b>	<b>125</b>
<b>Conclusions.....</b>	<b>130</b>
<b>Références Bibliographiques.....</b>	<b>131</b>
<b>Annexe1.....</b>	<b>168</b>

# Liste d'abréviations

- ACE2 : Enzyme de conversion de l'angiotensine 2
- ADAMTS13 : Une désintégrine et une métalloprotéinase à motifs thrombospondine 3
- AMPc : Adénosine monophosphate cyclique
- ARN : Acide ribonucléique
- Bsg : Basigine
- CCL2 : Ligand de chimiokine 2
- CCL3 : Ligand de chimiokine 3
- CCL4 : Ligand de chimiokine 4
- COVID-19 : de l'anglais, *coronavirus disease 2019*
- CXCL1 : Ligand de chimiokine 1
- CXCL10 : Ligand de chimiokine 10
- DAMPs : Motif moléculaire associé aux dégâts
- dsRNA : ARN double brin
- ELISA : de l'anglais, *enzyme-linked immunosorbent assay*
- FLAIR : de l'anglais, *fluid attenuated inversion recovery*
- FT : Facteur tissulaire
- FvW : Facteur de von Willebrand
- GMPc : Guanosine monophosphate cyclique
- GPR50 : Récepteur couplé à la protéine G 50
- HLA-DR : Antigène des leucocytes humains DR
- IFN-I : Interféron de type I
- IFN- $\gamma$  : Interféron  $\gamma$
- IL-1 : Interleukine 1
- IL-1 $\beta$  : Interleukine 1 $\beta$
- IL-2 : Interleukine 2
- IL-6 : Interleukine 6
- IL-8 : Interleukine 8
- IL-12 : Interleukine 12

IP3 : Inositol trisphosphate

LFA : de l'anglais, *lateral flow assay*

MERS-CoV : coronavirus du syndrome respiratoire du Moyen-Orient

M<sup>pro</sup> : Principal protéase du SARS-CoV2

MT1 : Récepteur à la mélatonine 1

MT2 : Récepteur à la mélatonine 2

Mtrn1a : Gène codant le MT1

Mtrn1b : Gène codant le MT2

NFκB : Facteur nucléaire κB

NOTCH3 : Protéine homologue 3 du locus neurogénique notch

NRLP-1 : Protéine 1 de la famille des récepteurs Nod-like

Nrp1 : Neuropiline 1

NSC : Noyau suprachiasmatique

ORF : Cadre de lecture ouvert

PCR : Réaction en chaîne de la polymérase

PDGF-B : Sous-unité B du facteur de croissance dérivé des plaquettes

PDGFRβ : Récepteur beta de du facteur de croissance dérivé des plaquettes

RBD : Domaine de liaison au récepteur

RNS : Espèces réactives de nitrogène

ROS : Espèces réactives d'oxygènes

RT-PCR : Réaction en chaîne de la polymérase en temps réel

SARS-CoV1 : coronavirus du syndrome respiratoire aigu sévère 1

SARS-CoV2 : coronavirus du syndrome respiratoire aigu sévère 2

SFC/EM : Syndrome de la fatigue chronique/ encéphalomyélite myalgique

SIRT3 : Sirtuine 3

SOD2 : Superoxyde dismutase 2

TLR : Récepteurs Toll-like

TMPRSS1 : Protéase transmembranaire à sérine 1

TMPRSS2 : Protéase transmembranaire à sérine 2

TMPRSS11A/B : Protéase transmembranaire à sérine 11A/B

TNF- $\alpha$  : Facteur nucléaire tissulaire  $\alpha$

TSPT : Trouble du stress post-traumatique

VE : Vésicules extracellulaires

+ssARN : Virus à l'ARN double brin à polarité positive

# Introduction

## I- La pandémie de COVID-19 et la Neuro-COVID : du mécanisme de l'infection virale à la COVID longue

---

### 1.1 Le SARS-CoV2 et le mécanisme d'infection cellulaire via le récepteur ACE2

#### 1.1.1 Le SARS-CoV2 en perspective : contexte initial et comparaison avec les autres coronavirus épidémiques

En décembre 2019, une nouvelle maladie respiratoire se manifestant par une pneumonie virale mal connue et une évolution rapide vers un Syndrome Respiratoire Aigu Sévère (SRAS) a été rapportée à Wuhan, en Chine (Zhu et al., 2020). Son agent étiologique a été promptement identifié comme un nouveau beta-coronavirus par séquençage metagénomique d'ARN et, le 11 février 2020, le Comité International en Taxonomie de Virus l'a nommé « SARS-CoV2 » et l'Organisation Mondiale de la Santé a dénommé la maladie « COVID19 » (Gorbalenya et al., 2020; Wu et al., 2020). De même que les infections par SARS-Cov1 et MERS (les coronavirus qui ont aussi engendré des épidémies), celle du SARS-Cov2 se traduit d'abord par l'apparition de fièvre, toux et inconfort thoracique, les cas plus sévères présentant de la dyspnée et des infiltrations pulmonaires bilatérales (Zhu et al., 2020).

Le SARS-CoV2 a 79% de sa génétique en commun avec le SARS-CoV1 et 50% avec le MERS-CoV (R. Lu et al., 2020). Son organisation génomique est, comme pour d'autres beta-coronavirus, six cadres de lecture ouverts (ORF, *open reading frame*, en anglais) : réplicase (ORF1a et ORF1b), la protéine spike (S), la protéine de l'enveloppe (E), de la membrane (M) et celle du capsid (N) (Chan et al., 2020). En effet, la majorité des protéines codées par le génome du SARS-CoV2 ont une structure et une longueur similaires au SARS-CoV1, sauf pour la protéine S qui est la protéine d'insertion du virus dans la cellule cible (R. Lu et al., 2020). Pour ce faire, elle se lie à l'enzyme de conversion à angiotensine 2 (ACE2) (Hoffmann et al., 2020). A cet égard, le domaine de liaison au récepteur (RBD, *receptor binding domain*, en anglais) de la protéine S pour l'ACE2 n'a seulement que 73% de sa séquence d'acides aminés similaires au SARS-CoV1 (Andersen et al., 2020). Bien que la COVID-19 n'induisse un taux de mortalité moindre que la MERS et le SARS-CoV1, le haut taux de transmission du SARS-

CoV2 a permis la propagation du virus à un point tel que la COVID19 a été classée comme pandémie dès le 11 mars 2020 (Hu et al., 2021). Ces différences structurelles et génomiques entre le SARS-CoV2 et les autres virus ont donné des pistes quant aux raisons de la propagation rapide de celui-ci dans la population humaine (Andersen et al., 2020; Chan et al., 2020).

L'ACE2 est un homologue de l'enzyme de conversion à l'angiotensine qui contrebalance le système rénine-angiotensine. Tandis que l'action prolongée des angiotensines I et II (des peptides vasoconstricteurs) peuvent provoquer de la pro-inflammation et du stress oxydatif dans l'endothélium, l'ACE2 converti respectivement ces deux peptides en angiotensine 1-7 et angiotensine 1-9. Ensuite, ces dérivés se lient au récepteur Mas pour déclencher des effets contraires à ceux induits par l'activation des récepteurs de l'angiotensine par l'angiotensine : vasodilatation, anti-inflammation et production de monoxyde d'azote (Santos et al., 2018). L'ACE2 se décline en deux isoformes, l'une soluble et l'autre membranaire, les deux étant décrites comme porte d'entrée du virus dans ses cellules-cibles (Hoffmann et al., 2020).

Le SARS-CoV2 ne reconnaît pas seulement l'ACE2 humaine, mais aussi l'ACE2 du porc, du furet, du singe *Rhesus*, du chat, du pangolin, de la chauve-souris, du lapin et du chien (Hu et al., 2021). D'ailleurs, l'hypothèse de la transmission zoonotique du virus à l'être humain par accumulation de mutations, processus nommé « effet de débordement viral », est l'une des explications possibles de l'apparition du SARS-CoV2 (Lytras et al., 2021). Selon cette hypothèse, trois animaux seraient suspectés d'être la source : le pangolin, le chien viverrin et la chauve-souris ; et son lieu d'origine serait le marché aux fruits de mer de Wuhan (Holmes et al., 2021). La deuxième hypothèse serait un accident ou une fuite de laboratoire d'un coronavirus de chauve-souris, la souche RaTG13, à l'Institut de Virologie de Wuhan (SAGO, WHO, 2022). En ce qui concerne la chauve-souris, une étude de l'Institut Pasteur éloigne cette explication : il paraît peu probable que ces mammifères soient à l'origine des virus qui ont acquis les capacités d'infection du SARS-CoV2 (Temmam et al., 2023).

Finalement, le SARS-Cov2 peut compter sur la coopération entre des corécepteurs et l'ACE2 pour rentrer dans la cellule-cible : le récepteur à basigine (Bsg), la protéase transmembranaire à sérine 2 (TMPRSS2, *transmembrane protease serine 2*, en anglais) et la neuropiline 1 (Nrp1) (Eslami et al., 2022). Une nouveauté génomique du SARS-Cov2 en comparaison avec les autres coronavirus est la formation d'un site polybasique dans la jonction des sous-unités S1 et S2 de la protéine S, permettant l'action de protéases (Coutard et al., 2020).

Donc, TMPRSS2 et Bsg peuvent participer à l'infection en clivant ce site-là afin de changer la conformation de S1 et exposer le RBD pour qu'il se lie avec ACE2 (Daly et al., 2020; Kalejaiye et al., 2022; K. Wang et al., 2020). Ce clivage permet aussi d'activer S2 ainsi que sa fusion à la membrane de la cellule hôte, étape cruciale pour l'entrée de la machinerie virale et la réplication consécutive du virus. Le processus de fusion de la membrane virale et la membrane de la cellule cible est illustré dans la **Figure 1c**. D'ailleurs, Nrp1 fonctionne comme un récepteur aux produits de clivage de la furine, une autre protéase dont le principal substrat sont les sites polybasiques de type R-XX-R (connue comme *C-end rule*, où R représente l'acide aminé arginine (Arg), qui peut être remplacée par un résidu de lysine, et où X peut être n'importe quel acide aminé) (Kyrou et al., 2021). Or, la jonction de S1-S2 du SARS-CoV2 est elle-même une séquence Arg-Arg-Ala-Arg (RRAR) (**Figure 2b**) dont le clivage entraîne la liaison de S1 à la Nrp1 et favorise l'entrée et l'infectivité des cellules par le SARS-CoV2 (Daly et al., 2020).

### 1.1.2 Les coronavirus

Afin de mieux comprendre les différences entre le SARS-CoV2 et les autres coronavirus humains, il est nécessaire d'expliquer les aspects généraux des coronavirus. Il s'agit d'une famille de virus à ARN, Coronaviridae, enveloppés, qui peuvent infecter des oiseaux et des mammifères, et constituent dans certaines de ces espèces la principale cause de maladies respiratoires et entériques (Masters, 2006). Par ailleurs, ils peuvent aussi y engendrer des hépatites et des maladies neurologiques (Masters, 2006). En plus, leur génome est monocaténaire, avec un simple brin d'ARN non-segmenté et à polarité positive (+ssRNA) (Anindita et al., 2015; Masters, 2006). En microscopie électronique, ces virus sont visualisés sous la forme semblable à une couronne, la raison pour leur nom « corona » (couronne) virus (Almeida & Tyrrell, 1967). Ces sont des virus sphériques et modérément pléomorphes, dont les protéines S s'étendent en dehors de l'enveloppe sous la forme de pétales (Becker et al., 1967). En étant des virus à +ssRNA, leur ARN peut être directement traduit par la machinerie cellulaire au même titre que les ARN messager de l'hôte (Chen et al., 2020; Snijder et al., 2006). Dans ce sens, un autre aspect qui distingue les coronavirus des autres virus à ARN c'est la grande taille de leur génome (26 à 32 kb) avec de multiples ORFs qui codent pour différentes protéines structurelles et non-structurelles (Chen et al., 2020).

Comme pour le SARS-CoV2, le génome des coronavirus codifie 4 principales protéines structurelles : la S, la N, la E et la M (Artika et al., 2020). Pour quelques coronavirus, lorsqu'ils sont dans la cellule cible, il n'est pas nécessaire d'assembler toutes les protéines virales pour

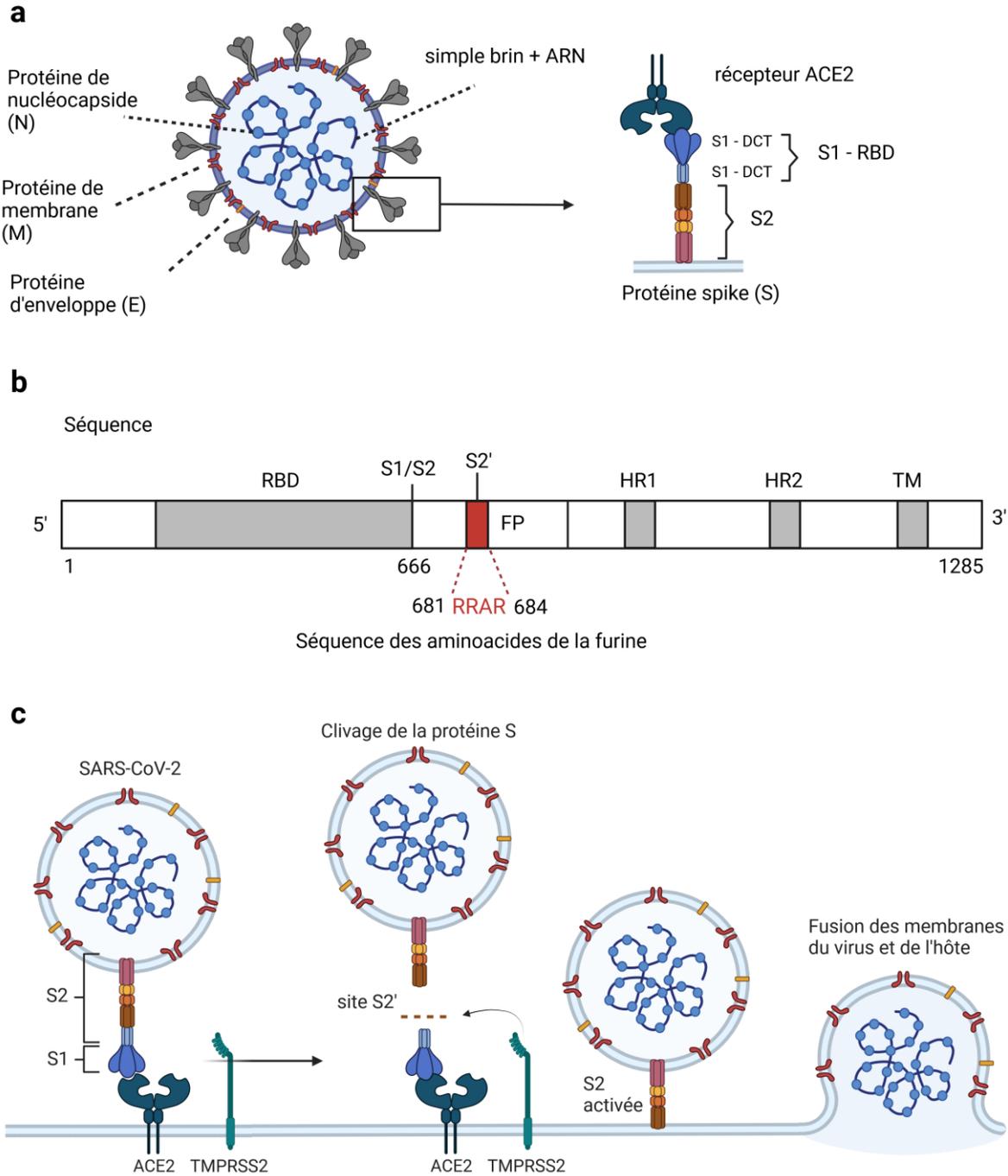
produire des particules virales complètes (Artika et al., 2020; Masters, 2006). En outre, l'enveloppe de quelques coronavirus est aussi composée par l'hémagglutinine estérase, ce qui n'est pas le cas des SARS-CoV1 et 2 (Lu et al., 2020; Zandi et al., 2021). Chez les coronavirus la protéine N est l'unique protéine à se lier à l'ARN pour former la nucléoprotéine, en stabilisant le génome viral (McBride et al., 2014). Singulièrement, les coronavirus emballent leur long génome comme le font les cellules eucaryotiques, dans une structure dense et enroulée (McBride et al., 2014).

Les membres de la famille Coronaviridae sont distribués parmi quatre groupes différents en accord avec leur sérologie et leur groupement phylogénétique : alpha-, beta-, gamma- and delta-coronavirus (Artika et al., 2020). Deux de ces groupes (alpha et beta) comprennent des virus qui infectent les mammifères (Masters, 2006). Normalement, les coronavirus sont très spécialisés pour infecter une seule espèce, où l'infection peut se manifester de façon aiguë et/ou chronique, et leur transmission peut s'effectuer par des voies respiratoires ou fécal-oral (Masters, 2006). Cependant, quelques espèces ont réussi à surpasser la barrière « hôte-espèce », comme le HCoV-229E et HCoV-OC4, un alpha- et un beta-coronavirus, respectivement, identifiés dans les années 60 (Artika et al., 2020; Hamre & Procknow, 1966). Il s'agit des deux premières espèces de coronavirus capables d'infecter l'être humain. Par ailleurs, l'émergence du SARS-CoV1 dans les années 2000 a initié la recherche de nouveaux coronavirus dont l'humain serait l'hôte définitif. Dans ce sens, un nouvel alpha-coronavirus a été décrit en 2004 (HCoV-NL63) et un nouveau beta-coronavirus (HCoV-HKU1) en 2005 (Fouchier et al., 2004; Woo et al., 2005). L'épidémie de MERS-CoV en 2012 a été le signal d'alerte de l'émergence de nouveaux coronavirus à fort pouvoir pathogène (Fisman & Tuite, 2014). A l'exception du SARS-CoV1, du MERS-CoV et du SARS-CoV2, l'infection des coronavirus humains est limitée à des symptômes modérés au niveau des voies aériennes supérieures (Artika et al., 2020) même si les individus immunodéficients ou âgés sont tout de même à risque de développer des formes pulmonaires de la maladie (Enjuanes et al., 2016).

A l'exception du SARS-CoV2, dont l'origine demeure un sujet de débat, les coronavirus humains sont apparus à partir des coronavirus des chauves-souris (ceux des familles Hipposideridae et Rhinolophidae) (Cui et al., 2018). Il est déjà admis que la franche augmentation du contact entre les forêts et les villes en zones d'urbanisation intense facilite l'émergence et réémergence des nouveaux coronavirus (Djikeng & Spiro, 2009; Rosenberg et al., 2013). En outre, le rythme d'échanges dans le marché international et l'intensité des voyages

internationaux contribuent à leur propagation (Rosenberg et al., 2013). Toutes ces conditions sont réunies dans quelques régions asiatiques, sur lesquelles les coronavirus humains sont émergés et se sont propagés (Artika et al., 2020). A partir des chauves-souris, ces virus peuvent être transmis directement à l'être humain ou ils peuvent encore avoir un hôte intermédiaire, comme les civettes (*Paguma larvata*), dans le cas du SARS-CoV1, ou les chameaux, pour le MERS-CoV (Alagaili et al., 2014; Kan et al., 2005).

L'effet de débordement viral est très important pour dépasser les barrières d'espèce à partir de l'accumulation de mutations dans le génome (Y. Chen et al., 2020; Djikeng & Spiro, 2009). La transmission inter-espèces peut être facilitée par des événements pendant la recombinaison homologue, qui altèrent ou suppriment des bases du génome. Pour les SARS-CoVs, des analyses montrent que leur séquence génétique est presque identique à celle des virus des civettes (Kan et al., 2005). Néanmoins, les gènes de la protéine S et le ORF8 ont exhibé une variation majeure. L'ORF8 est très important pour la transmission inter-espèces et la délétion d'une signature de 29 nucléotides est à l'origine de deux nouveaux ORFs : 8a et 8b (Z. Wu et al., 2016). L'altération de deux résidus d'acides aminés (479 et 487) de la protéine S est essentielle pour sa liaison à l'ACE2 et le passage d'un hôte comme la civette à l'être humain (Qu et al., 2005).



**Figure 1.** Schéma du virus SARS-CoV-2, de la protéine spike et de l'entrée du virus dans la cellule cible. **a.** La structure du virus SARS-CoV2 montrant l'ARN simple brin positif avec son enveloppe (E), sa membrane (M), la nucléocapside (N) et la protéine *spike* (S). La protéine S avec l'ACE2 est représentée. Le RBD est le domaine de liaison au récepteur. S2 est la partie C-terminale de la protéine. **b.** La structure de la protéine S avec le site de clivage de la furine et d'autres. S1/S2 est la jonction des domaines S1 et S2. S2' contient un site de clivage de la furine avec l'acide aminé unique RRAR de séquence acide présent dans le SARS-CoV2. FP est le peptide de fusion, HR1 et HR2 sont des répétitions heptadiques, la TM est une transmembranaire domaine. **c.** La protéine S se lie à l'ACE2, ce qui permet son clivage par la TMPRSS2, et engendre la fusion entre la membrane du virus et celle de l'hôte (Figure créée avec BioRender.com et adapté de Veleri, 2022 et Laamers & Haagmans, 2022).

## 1.2 Les aspects physiopathologiques majeurs de la COVID-19

### 1.2.1 Les portes d'entrée du virus

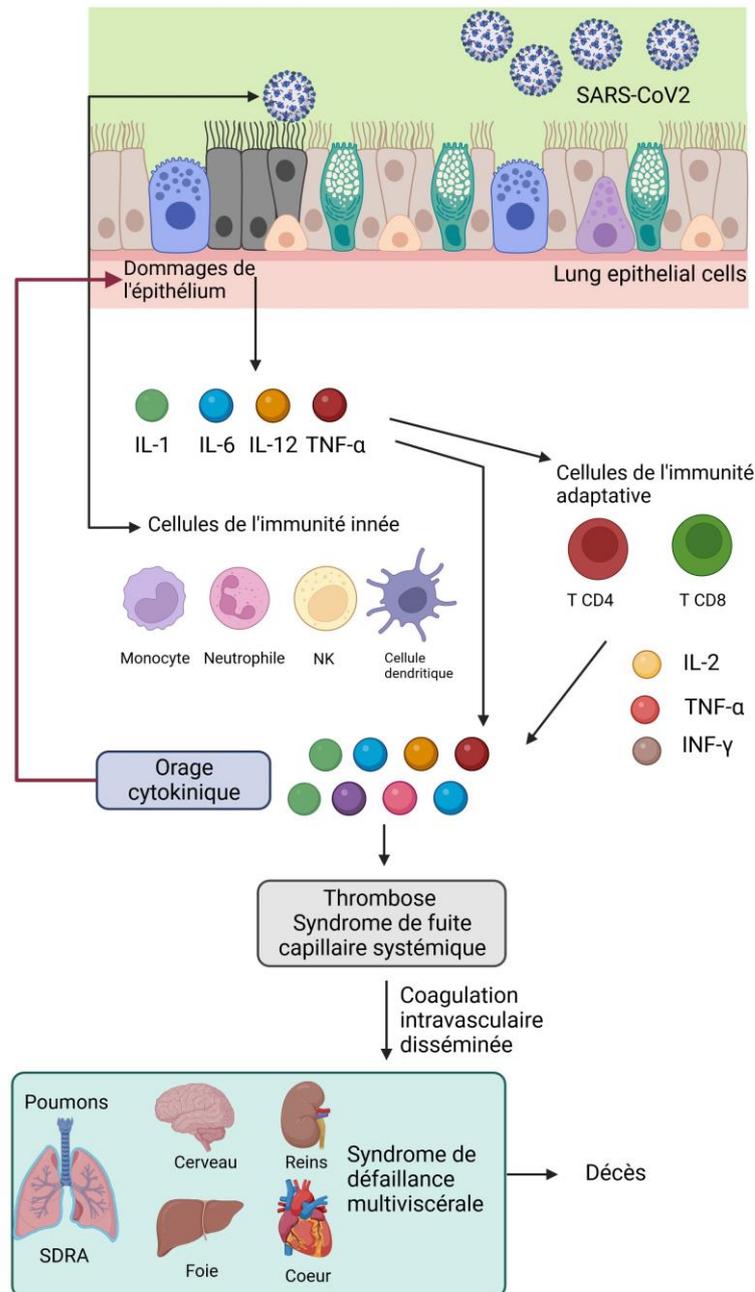
Le SARS-CoV2 est transmissible à partir d'aérosols de fluides respiratoires et une fois les voies aériennes supérieures atteintes, le virus infecte les cellules sustentaculaires de l'épithélium olfactif et les cellules ciliées du larynx et de la trachée (Khan et al., 2021; Verma et al., 2022). La réplication virale dans ces cellules hôtes occasionne la formation d'intermédiaires de transcription d'ARN en double hélice (dsRNA), qui peuvent déjà être reconnus par les récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (Yin et al., 2021). Parmi eux, le principal récepteur capable de détecter le SARS-Cov2 est le MDA5 (Yin et al., 2021). Il reconnaît le dsRNA et déclenche alors une cascade de signalisation menant à la transcription d'interférons (IFNs) de type I et III. Les cellules épithéliales, les macrophages et les neutrophiles de ces tissus infectés peuvent eux-mêmes produire et libérer des chimiokines et interférons, soit en réponse à l'activation des récepteurs *Toll-like* (TLRs) soit par action paracrine des IFNs (Zheng et al., 2021). Le but est toujours d'attirer les lymphocytes T auxiliaires et la maturation des lymphocytes B adaptatifs afin d'éliminer le virus.

Une autre porte d'entrée peut être le tractus gastro-intestinal (TGI), dans lequel le virus peut induire nécrose des cellules épithéliales, perte de villosités intestinales et infiltration de macrophages et neutrophiles dans la *lamina propria* (Livanos et al., 2021). En effet, le TGI a une forte expression d'ACE2 et la COVID-19 peut se manifester sur des symptômes intestinaux qui peuvent précéder les respiratoires (Friedel & Cappell, 2023). Il est estimé qu'entre 10 et 20% des patients COVID-19 peuvent présenter de la diarrhée et que les symptômes gastrointestinaux chez les enfants indiquent des marqueurs d'inflammation plus élevés et une plus grande propension à évoluer vers des formes sévères de la maladie (Friedel & Cappell, 2023). D'ailleurs, des travaux montrent que la réplication virale peut aussi moduler le microbiote intestinal, en vue de diminuer la réponse antivirale de l'hôte (Devaux et al., 2021). Il a déjà été démontré qu'il y a moins de diversité bactérienne chez les patients COVID-19 et une plus grande abondance relative de bactéries pathogènes, comme *Streptococcus*, *Rothia*, *Veillonella*, et *Actinomyces* (Gu et al., 2020). Cette dysbiose peut mener à des dégâts sur la barrière intestinale, contribuant ainsi aux infections bactériennes secondaires dans les poumons des patients (Devaux et al., 2021). Elle est en effet associée à une plus grande sévérité de la maladie (Zuo et al., 2020). Par contre, la transmission fécal-oral du SARS-CoV2 n'a pas encore été établie.

### 1.2.2 L'orage cytokinique

Quand l'immunité innée n'arrive pas à éliminer le SARS-CoV2 au niveau des voies aériennes supérieures, le virus passe dans les poumons, où il infecte principalement les cellules alvéolaires de type II, responsables de la production de surfactant (Katsura et al., 2020). La mort de ces cellules occasionne la libération des motifs moléculaires associés aux dégâts (DAMPs) qui par la suite activent les TLRs (Zheng et al., 2021). Les mécanismes susmentionnés de la production d'IFNs et l'attraction des macrophages et neutrophiles qui en résulte, ont aussi lieu dans les alvéoles. En effet, la réponse de l'IFN-I est la première ligne protectrice contre les infections virales, en attendant d'effectuer une clairance virale et moduler les réponses de l'immunité innée et adaptative. A l'évidence, les effets protecteurs de la réponse de l'IFN-I sont dramatiquement réduits chez les patients COVID-19 (Hadjadj et al., 2020). Cette réduction est liée aux propres protéines du SARS-CoV2, qui peuvent inhiber ou retarder la réponse IFN-I et même l'activation du facteur nucléaire  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) (Hadjadj et al., 2020; Wenzel et al., 2021).

En conséquence des dommages alvéolaires diffus et de la réponse IFN-I retardée, une hyper-inflammation paradoxale se produit. Alors, ces macrophages et neutrophiles produisent des cytokines comme IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- $\alpha$  et autres chimiokines, qui attirent encore plus de cellules de l'immunité innée (pas seulement de macrophages, mais aussi des *natural killers* (NK) et des cellules dendritiques) et activent les cellules de l'immunité adaptative (lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>) pour produire IL-2, IFN- $\gamma$  et TNF- $\alpha$  (Yang et al., 2021). Par la suite, cette production cytokinique induit de la myélopoïèse et la granulopoïèse qui étendent la lésion épithéliale et alvéolaire (Wu et al., 2021). A la fin de ces événements il y a une forte production systémique de cytokines, phénomène nommé « orage cytokinique », qui déclenche l'activité macrophagique et l'érythrophagocytose, en plus des perturbations de la coagulation et de l'homéostasie vasculaire (Yang et al., 2021). Par ailleurs, ces événements entraînent une augmentation de la perméabilité des capillaires, de la coagulation intravasculaire disséminée et de la thrombose, ce qui fait que la maladie peut évoluer en SRAS et engendrer le syndrome de défaillance multiviscérale et par conséquent la mort (Jing et al., 2022). Cet impact pronostique a poussé les services des soins intensifs à penser à établir un système de scores afin d'identifier précocement l'orage cytokinique et intervenir (Caricchio et al., 2021; Mehta et al., 2020; Shcherbak et al., 2021).



**Figure 2. Les mécanismes immunopathologiques de l'orage cytokinique.** Le SARS-CoV2 infecte les cellules épithéliales ou les cellules immunitaires, provoquant des lésions tissulaires et la libération de cytokines inflammatoires (notamment l'IL-1, l'IL-6, l'IL-12 et le TNF $\alpha$ ) par les cellules épithéliales et les cellules immunitaires. Ces cytokines inflammatoires recrutent ensuite des cellules immunitaires innées (monocytes, macrophages, neutrophiles, DC et cellules NK) et activent des cellules immunitaires adaptatives (lymphocytes T CD4+ et lymphocytes T CD8+) pour induire l'apparition d'une myélopoïèse et d'une granulopoïèse d'urgence, ainsi que la production de cytokines circulantes soutenues et excessives qui peuvent aggraver davantage les lésions épithéliales. De plus, la surproduction de cytokines systémiques déclenche l'activation des macrophages et l'érythro-phagocytose, entraînant une perturbation de l'hémostase vasculaire, ce qui mène à une coagulation intravasculaire disséminée et par conséquent, au syndrome de défaillance multiviscérale. (Figure créée avec BioRender.com et adapté de Yang et al., 2021).

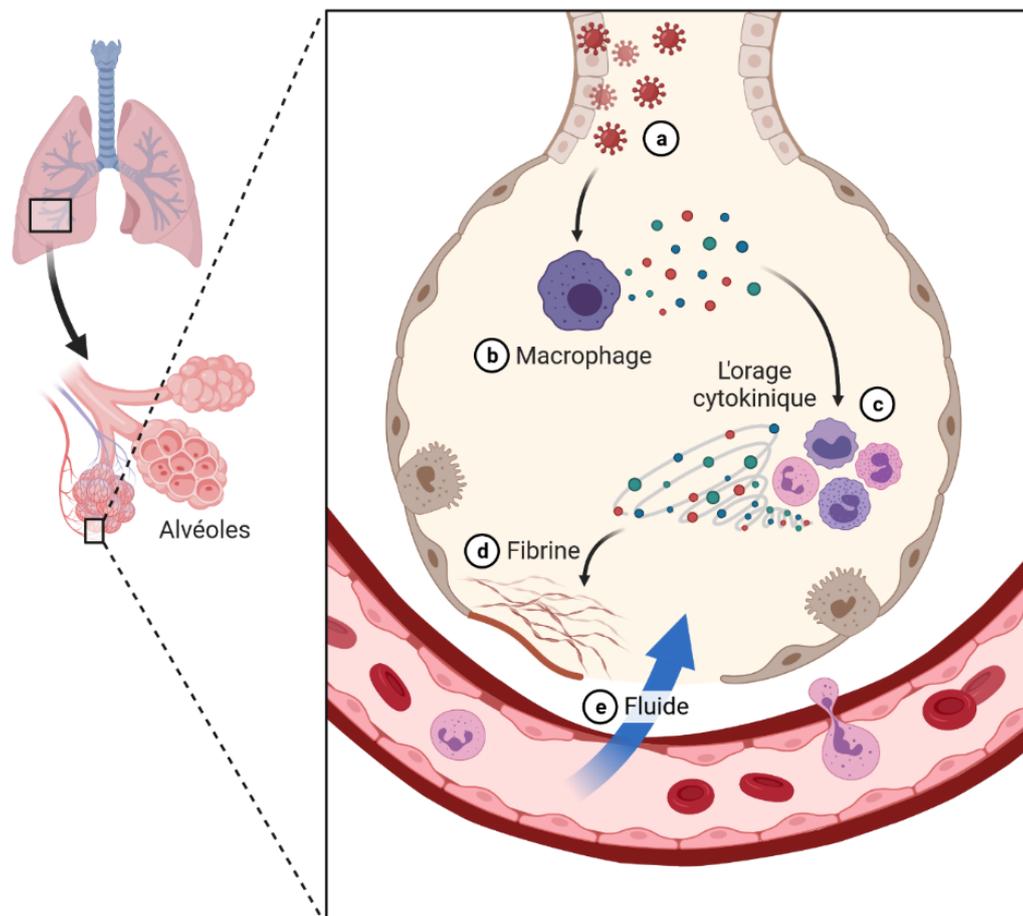
L'ARN du SARS-CoV2 tout comme le double-brin intermédiaire ont été retrouvés dans les monocytes et les macrophages, ce qui suggère qu'ils peuvent également être infectés (Grant et al., 2021). Cette infection peut engendrer la pyroptose, une mort cellulaire programmée des macrophages qui résulte de la libération de cytokines pro-inflammatoires, notamment l'IL-1 $\beta$  (Grant et al., 2021). Ce processus peut être engendré par l'activateur d'inflammasome NLRP-1, dont il a été récemment démontré être activé par le dsRNA (Bauernfried et al., 2021). Les macrophages dont le virus est internalisé peuvent faciliter la dispersion du virus dans les poumons, et cette internalisation peut être dérivée de la phagocytose de cellules épithéliales mortes (Grant et al., 2021). En fait, chez les patients COVID-19, le nasopharynx peut déjà être infiltré par des macrophages qui expriment CCL2, CCL3, CCL20, CXCL1, CXCL3, CXCL10, IL-8, IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$  (Chua et al., 2020). En effet, l'IL-1 $\beta$  provenant du macrophage ou le monocyte infecté et l'IL-6 provenant des cellules épithéliales sont des facteurs uniques dans l'infection par SARS-CoV2, en comparaison avec d'autres maladies pulmonaires (Melms et al., 2021).

Les neutrophiles sont les premiers recrutés dans plusieurs infections virales, surtout dans les infections des voies aériennes (Galani & Andreakos, 2015). Or, le nasopharynx des patients atteints de COVID-19 est déjà gorgé de neutrophiles (Chua et al., 2020). D'ailleurs, malgré le fait que seulement 30% de patients avec COVID-19 présentent de la neutrophilie dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire et que les neutrophiles ne sont pas prédominants dans les histologies des poumons des patients décédés par COVID-19, la neutrophilie est souvent présente dans le sang périphérique des patients avec COVID-19 sévère mais aussi chez les patients asymptomatiques (Grant et al., 2021; Rendeiro et al., 2021). Néanmoins, le profil de la population des neutrophiles diffère entre ces deux types de patients, ce qui indique que les neutrophiles jouent un rôle protecteur ou pathologique en fonction du moment de l'infection (P. Wu et al., 2021). Une étude propose, par exemple, que le ratio neutrophile/lymphocyte, parmi d'autres critères, aurait un pouvoir diagnostique sur l'orage cytokinique de la COVID-19 (Chen et al., 2020).

Des taux élevés d'IL-8, IL-6, de la protéine chimiotactique de monocyte-1 et de TNF- $\alpha$  sont présents dans le sérum des patients COVID-19 (Pitt et al., 2022). L'augmentation de TNF- $\alpha$ , particulièrement, est un marqueur de mauvais pronostic et peut mener à la dysfonction endothéliale chez ces patients (Ruan et al., 2020). Par ailleurs, IL-6 joue un rôle essentiel dans l'orchestration des réponses inflammatoires pathologiques, étant associée aux issues les plus

défavorables de la maladie (Del Valle et al., 2020). Dans ce sens, une étude avec 2782 patients COVID-19 avait montré une association entre les taux de protéine C réactive et la progression de cas sévères, de lésion rénale aiguë, et de tout autre cause de mortalité (Del Valle et al., 2020). Enfin, ce marqueur a été attesté comme étant capable de prédire le risque de thrombose.

L'orage cytokinique est la conséquence d'un contexte de « lésion alvéolaire diffuse » (**Figure 2**), terme qui désigne les dégâts épithéiaux et alvéolaires qui mènent à l'œdème et à l'exsudation cellulaire et qui peut progresser en une fibrose interstitielle (Lamers & Haagmans, 2022). Cette lésion est caractérisée non seulement par un œdème, mais aussi par l'inflammation, la mort cellulaire et la présence de membranes hyalines (Katzenstein et al., 1976). Par la suite, les cellules alvéolaires de type II subissent une hyperplasie dans le but de régénérer les alvéoles. L'examen histopathologique des patients décédés par COVID-19 a montré que ce type de lésion est prédominant dans leurs poumons (Carsana et al., 2020; Menter et al., 2020).



**Figure 3. Mécanismes pathophysiologiques de la lésion alvéolaire diffuse.** (Figure créée par l'auteur sur Biorender.com).

### 1.2.3 Le dialogue entre les événements thrombotiques et les actions des cellules immunitaires dans l'évolution de la COVID-19

L'atteinte de l'épithélium alvéolaire et son inflammation provoquent un déséquilibre entre coagulation et fibrinolyse qui cause la formation de membranes d'hyalines et des microthrombi, des caillots sanguins trouvés dans les capillaires artériels (Klok et al., 2020; Menter et al., 2020). Par conséquent, les concentrations de D-dimères, élevées en cas d'événements thrombotiques, augmentent chez les patients COVID-19, il s'agit aussi d'un mauvais signe pronostique (Grasselli et al., 2020). La thrombopénie est également un marqueur de sévérité puisque les plaquettes sont épuisées par la formation de caillots (Klok et al., 2020; Lippi, Plebani, et al., 2020). Dans le contexte de la COVID-19, les plaquettes sont hyperactives : l'agrégation est augmentée et elles expriment fortement de la CD40 et de la sélectine P, des molécules d'adhésion (Fenyves et al., 2021). En outre, DAMPs et les cytokines mènent à la transition des cellules endothéliales d'un phénotype anti-coagulant à un phénotype pro-coagulant ; ces cellules commencent à libérer le facteur de von Willebrand (FvW), auquel les plaquettes se lient à travers de la glycoprotéine Ib (Jing et al., 2022). Dans ce sens, il a déjà été décrit que les patients avec COVID-19 sévère ont les moindres concentrations de ADAMTS13, une métalloprotéase qui régule la taille des multimères du FvW et peut les cliver (Mancini et al., 2021). L'infection SARS-CoV2 dans les alvéoles peut donc provoquer l'activation de la voie intrinsèque de la coagulation.

Par ailleurs, en condition physiologique, les cellules endothéliales expriment le facteur tissulaire (FT) qui, à cause des dégâts de l'épithélium alvéolaire et par la suite, de la couche endothéliale, est libéré et interagit avec les facteurs de coagulation (Lamers & Haagmans, 2022). Il s'agit donc de l'activation de la voie extrinsèque de la coagulation. Le FT forme un complexe enzymatique avec le facteur VIIa, qui par ailleurs a pour fonction de cliver le fibrinogène en fibrine, composant majeur des caillots sanguins et des membranes hyalines (Butenas et al., 2009). Les neutrophiles peuvent aussi exprimer le FT, en plus des pièges extracellulaires de neutrophiles (NET, *neutrophil extracellular trap*) qui activent, eux, le facteur XII de la coagulation (Galani & Andreacos, 2015). Les patients avec COVID-19 sévère présentent des neutrophiles avec une haute expression de NET et FT, qui sont libérés ensemble en activant les deux voies de coagulation (Jing et al., 2022; P. Wu et al., 2021). La production épithéliale d'IL-6 dans les poumons des patients COVID-19 est également un facteur contribuant à la formation des caillots étant donné que cette cytokine stimule la synthèse de

facteurs de coagulation dans le foie et l'expression de FT dans les cellules endothéliales (Lamers & Haagmans, 2022).

Les plaquettes activées et les vésicules extra-cellulaires dérivées des plaquettes (VEs) sont aussi des marqueurs et des médiateurs de l'immuno-thrombose dans la COVID-19. D'ailleurs, ces VEs sont aussi responsables de la formation de NET et de la mort des cellules endothéliales (Chen et al., 2020). Effectivement, les taux de VEs sont plus grands chez les patients nécessitant l'hospitalisation en comparaison avec les autres (Cappellano et al., 2021). En plus, des taux augmentés de FT et de VEs dans le sérum des patients COVID sont associés à la formation de thrombine, à une sévérité de la condition respiratoire et au risque de mortalité (Guervilly et al., 2021). Un type de VEs ces sont les microparticules, enveloppées par une double couche lipidique et libérées par des cellules activées ou apoptotiques. Les microparticules sont des pro-coagulants qui par effet de l'exposition de la phosphatidylsérine se lient aux facteurs de la coagulation V et VIII. A mesure que la maladie empire, de plus en plus de cellules libèrent des microparticules, pas seulement les plaquettes, mais aussi des macrophages/monocytes et des cellules endothéliales (Jing et al., 2022). Puis, la phosphatidylsérine active la cascade extrinsèque de la coagulation.

La plus forte expression de molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales, comme la sélectine P et E, favorise le recrutement de lymphocytes et de macrophages ainsi que l'attachement de neutrophiles (Jing et al., 2022). Des analyses histologiques *post-mortem* des patients COVID-19 montre que les infiltrés cellulaires alvéolaires sont largement composés de macrophages dérivés des monocytes dans le lumen et de lymphocytes dans l'interstitium (Carsana et al., 2020). D'autre part, les neutrophiles et plaquettes peuvent former des agrégats lorsque les neutrophiles se lient à la sélectine P et les plaquettes aux FvW exprimés à la surface des cellules endothéliales (Kurose et al., 1994). En effet, les agrégats leucocytes-plaquettes sont trouvés en concentrations plus élevées chez les patients COVID-19 et elles peuvent aussi déterminer l'admission ou non de ces patients dans les Unités de Soins Intensifs (USI) (Kanth Manne et al., 2020). En ce qui concerne les lymphocytes, une analyse de *single-cell* de patients avec COVID-19 montre une augmentation de cellules NK mais pas de différence dans la présence des lymphocytes T (Delorey et al., 2021; Maucourant et al., 2020). L'augmentation de cellules NK circulantes contenant de hautes concentrations de protéines cytotoxiques associée à une atteinte de la réponse des lymphocytes T (mise en évidence par la pauvre infiltration de ces cellules dans les alvéoles), est une condition qui peut contribuer à

l'évolution vers un stade léthal de la COVID-19 (Maucourant et al., 2020). Finalement, les monocytes sont recrutés à partir de l'expression de sélectine E par les cellules endothéliales, et eux-mêmes peuvent être une source de FT (Lamers & Haagmans, 2022). Son profil cellulaire peut aussi diverger entre patients de COVID-19 sévère et modérée : chez ces derniers les monocytes expriment de plus grands taux de HLA-DR, une protéine de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité ; l'expression réduite de cette protéine signale une dysfonction monocytaire (Schulte-Schrepping et al., 2020).

L'infection SARS-CoV2 active la cascade du système du complément par la voie classique ou la voie de la lectine. Pour rappel, la voie classique est activée quand le facteur C1 par sa sous-unité se lie à l'anticorps, qui est lui-même lié à l'antigène. Une cascade d'activation des autres facteurs s'en suit dans l'ordre suivante : C1 clive C4, la fraction C4b se lie à C2 et forme C4bC2a, ce complexe clive C3 et la fraction C4bC2aC3b clive C5. La voie de la lectine est similaire à la voie classique sauf par son activation : la lectine liant le mannose lié à la structure de polysaccharides de la paroi des bactéries clive les protéines C4 et C2 à l'aide des protéines MASP1 et MASP2. C3a et C5a aident à recruter des monocytes et neutrophiles pour libérer encore des cytokines comme IL-6 et IL-8 (Dunkelberger & Song, 2009). C5a peut encore moduler l'expression de FT dans les neutrophiles et les cellules endothéliales, qui exercent donc son effet pro-coagulant. Une étude *in vitro* a montré que le sérum des patients COVID-19 entraîne la libération de NET d'une manière dépendante de C5a (Skendros et al., 2020). Des facteurs du système complément (C5b, C4b et MASP2) sont trouvés dans la microvasculature pulmonaire des patients avec COVID-19 sévère (Magro et al., 2020).

### **1.3 Aspects cliniques et épidémiologiques de la COVID-19**

Le SARS-CoV2 peut infecter toutes les tranches d'âge, malgré la différence de manifestations symptomatiques que ces différentes tranches peuvent montrer. L'âge moyen des personnes infectées est de 50 ans, mais ces sont les plus âgés (>60 ans) qui risquent de développer une forme sévère de la maladie requérant une hospitalisation voire même des soins intensifs (O'Driscoll et al., 2021). L'âge, l'obésité et le sexe masculin sont indubitablement des facteurs de risque pour le développement de la COVID-19 sévère (Guan et al., 2020). Dans ce sens, des prédispositions génétiques associées aux mauvais pronostics ont été aussi décrites. Le plus grand risque des hommes à l'infection a partiellement une explication génétique : l'ACE2 étant un gène lié au chromosome X, les femmes disposent de deux polymorphismes alléliques possibles d'ACE2 dont un aurait moins d'affinité au RBD du SARS-CoV2. En plus, le taux

d'homozygotie d'ACE2 chez les femmes est extrêmement bas, de telle façon que l'expression de variants ACE2 plus puissants à l'interaction avec le virus est plus impactante chez l'homme (Darbani, 2020). Quelques comorbidités peuvent aussi augmenter les risques d'un mauvais pronostic : l'hypertension, l'insuffisance cardiaque, l'arythmie, le diabète, l'insuffisance rénale, l'asthme, la maladie pulmonaire obstructive chronique et la maladie chronique du foie (Karagiannidis et al., 2020). Les patients immunodéprimés ont également plus de risque d'être infectés : SIDA non-traité ou avancé, receveurs d'un transplant ou prise d'immunosuppresseurs. Le tabagisme est aussi un facteur de risque pour la COVID-19 sévère (Karagiannidis et al., 2020).

Les enfants sont, dans la majorité des cas, asymptomatiques mais certains peuvent manifester des complications respiratoires, comme le croup et la bronchiolite. En plus, une petite partie des enfants guéris d'une infection au SARS-CoV2 peut développer un syndrome inflammatoire systémique 2 à 6 semaines après la guérison. Les jeunes enfants prématurés, ceux atteints de désordres neurologiques ou de maladies cardiaques, et les enfants immunodéprimés ont un risque élevé de développer la forme sévère de l'infection (Choi et al., 2022; Wanga et al., 2021). Et, finalement, dans ce groupe, l'âge peut aussi définir le pronostic, les enfants de moins d'un an et ceux âgés de 11 et 14 ans ont un risque accru de développer des complications de la COVID-19 (Choi et al., 2022; Wanga et al., 2021).

La grossesse n'a pas été identifiée comme étant un facteur de risque pour l'infection par le virus SARS-CoV2 (Allotey et al., 2022). Néanmoins, il s'agit d'une condition qui favorise la survenue de complications sévères de la COVID-19. Ce risque augmente en cas d'infection avant les 28 semaines de grossesse peut entraîner le décès fœtal et néonatal, la prématurité (enfants < 37 semaines) et une hypertension de la mère (Allotey et al., 2020). La transmission verticale du virus est considérée comme rare (Allotey et al., 2022).

Le diagnostic de l'infection par SARS-CoV2 peut se faire par la PCR (*polymerase chain reaction*, réaction en chaîne par polymérase, en anglais) et par dosage d'anticorps, basée soit sur l'ELISA soit sur l'immunodosage à flux latéral (LFA, *lateral flow assay*) (Yüce et al., 2021). La PCR est la méthode *gold-standard* pour la détection du virus, souvent faite à partir des prélèvements nasaux ou nasopharyngés (Yüce et al., 2021). Le 11 janvier 2020 l'Institut Malaien pour la Recherche Médicale avait annoncé la production de primers spécifiques pour la RT-PCR chez le SARS-CoV2, le même jour où des scientifiques chinois ont mis à disposition la séquence génomique entière du virus (Schnirring, 2020; General of Health Malaysia, 2020).

A la fin du mois de février 2020, le CDC (*Central Disease Center*, des EUA) a approuvé chez le *U.S. Food and Drugs Administration* (FDA) le kit nommé « CDC-2019 Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel » (Manager & Affairs, 2022; U.S. Food and Drug Administration, 2020). En juin 2020, le FDA avait déjà autorisé 72 kits commerciaux PCR (Yüce et al., 2021). Ces kits pour la détection du SARS-CoV2 sont toujours composés de 3 ou 2 paires de primers et probes pour l'amplification de régions spécifiques du génome viral (Yüce et al., 2021). Bien qu'elle soit la méthode la plus fiable pour le diagnostic, sa sensibilité est dépendante de la quantité d'ARN dans l'échantillon du patient et son prix est cher (Yüce et al., 2021).

Le test LFA a permis d'avancer sur le dépistage massif de la population, vu qu'il est moins cher, plus rapide à donner un résultat et ne requiert pas un technicien de laboratoire pour l'opérer (Soh et al., 2020). En fonction du test utilisé, il est possible de détecter autant l'IgM que l'IgG contre le SARS-CoV2 (Soh et al., 2020). La majorité des patients développe des anticorps dans les 5 à 14 jours après l'infection (Lamers & Haagmans, 2022). Donc, le principal inconvénient de cette approche c'est sa sensibilité, vu qu'il peut susciter de faux négatifs (Yüce et al., 2021).

Après l'infection au SARS-CoV2, la période moyenne d'incubation est de 4 à 5 jours et elle peut durer jusqu'à 14 jours (Guan et al., 2020). Même si l'infection peut évoluer de façon asymptomatique pour une partie des patients, d'autres présentent plus souvent de la fièvre, de la fatigue et une toux sèche (Guan et al., 2020). D'autres symptômes peuvent être présents dans un spectre de maladie respiratoire légère à modérée, avec céphalée, diarrhée, nausée, mal à la poitrine, mal de gorge et vomissements (Guan et al., 2020). Cette maladie respiratoire progresse vite en une pneumonie virale qui peut se manifester par expectoration et même de l'hémoptysie (Casey et al., 2020). Des symptômes neurologiques comme l'anosmie et des altérations du goût sont aussi rapportées, l'anosmie étant déjà associée à des cas de COVID-19 sévère (Rogers et al., 2021). Les symptômes et manifestations neurologiques de la COVID-19 (tous compris dans une entité nommée Neuro-COVID) sont discutés en détails dans la **session 1.4** de cette introduction.

La COVID-19 sévère peut commencer à montrer des signes et symptômes déjà une semaine après l'infection, en se manifestant d'abord sous la forme de dyspnée et d'hypoxémie (Chen et al., 2020). Ces patients évoluent vite vers une forme de SRAS et nécessitent une ventilation mécanique et du support aux USI (Chen et al., 2020; Guan et al., 2020). La tomographie (CT, *Computed Thomographie*) du thorax montre fréquemment des images de poumons en « verre dépoli » chez ces patients (Goh et al., 2020). Ceux hospitalisés sont plus facilement atteints

d'une pneumonie bactérienne secondaire (jusqu'à 29% des patients), tandis que seulement 3-3,5% des patients avec une COVID-19 légère ou modérée en sont porteurs à l'admission (Westblade et al., 2021). Les dosages de protéine C réactive, de D-dimères et de ferritine élevés sont associés aux mauvais pronostics (Del Valle et al., 2020). Au sein des USI, certaines personnes peuvent développer de la lymphopénie, celle-ci étant plus sévère chez les personnes décédées (Chen et al., 2020; Wang et al., 2020). Dans ce sens, l'âge compte aussi pour l'avenir du patient après son entrée aux USI : ceux plus âgés (>68 ans) ont un risque plus grand de développer des complications au sein de ces unités : insuffisance respiratoire, infarctus myocardique ou insuffisance cardiaque, malgré l'absence d'une comorbidité précédente (Chen et al., 2020; Yang et al., 2020). L'orage cytokinique se présente principalement dans le contexte de la forme sévère de la COVID-19 et mène aux insuffisances rénale et hépatique, aux arythmies, à la rhabdomyolyse, la coagulopathie et au choc septique (Chen et al., 2020; Yang et al., 2020).

## **1.4 La Neuro-COVID comme conséquence des atteintes de la barrière hémato-encéphalique**

### **1.4.1 La barrière hémato-encéphalique**

La barrière hémato-encéphalique (BHE) est composée des cellules endothéliales cérébrales qui forment avec les péricytes périvasculaires et les pieds astrocytaires les unités neurovasculaires (UN). Les cellules endothéliales cérébrales disposées en monocouches sont reliées entre elles par des jonctions serrées (Iadecola, 2017). Cette monocouche est un des aspects qui distingue les cellules endothéliales cérébrales des autres types de cellules endothéliales dans le corps (Knox et al., 2022). Il existe cependant une diversité dans la composition des unités neurovasculaires, notamment entre les vaisseaux profonds du cerveau et ceux qui convergent vers les grosses veines extra-crânielles (Schaeffer & Iadecola, 2021). De ce fait, les UNs montrent une diversité de perméabilité et de vasoactivité, mais aussi différents niveaux de susceptibilité aux agressions diverses (Schaeffer & Iadecola, 2021).

Dès l'entrée des artères et des veines dans l'espace sous-arachnoïdien, celles-ci sont entourées d'un réseau complexe de lamelles enchevêtrées de la membrane arachnoïde, de fibroblastes, de cellules leptoméningées et de macrophages méningés (Schaeffer & Iadecola, 2021). Par ailleurs, les artérioles et veinules sont recouvertes par des macrophages périvasculaires et des cellules leptoméningées de la pie-mère (Schaeffer & Iadecola, 2021). A mesure que les artérioles deviennent plus fines au niveau des capillaires, la membrane

vasculaire composée de cellules musculaires lisses et la membrane gliale fusionnent et l'espace périvasculaire donne place à une intime relation entre une couche de péricytes et une autre de cellules endothéliales cérébrales (Schaeffer & Iadecola, 2021).

En ce qui concerne les répercussions neurologiques, tous les éléments de l'UN sont impliqués dans la physiopathologie de l'infection du SARS-CoV2 (Crunfli et al., 2022; Khan et al., 2022; Wenzel et al., 2021). Les mécanismes jusqu'à présent connus sont discutés dans la session suivante et sont résumés dans la **Figure 4**. Dans cette section nous allons faire une description succincte de chacun des composants de l'UN, et mettre en évidence les caractéristiques singulières de l'endothélium cérébral et la contribution des péricytes et astrocytes au fonctionnement de la BHE.

- Endothélium

L'angiogenèse dans le SNC commence chez la souris le jour embryonnaire 9.5 (E9.5) et chez l'humain à la semaine gestationnelle 8 (Wälchli et al., 2023). A ce moment-là, les progéniteurs rentrent dans le cortex et vascularisent le SNC (Wälchli et al., 2023). L'interaction de ces cellules avec les cellules du SNC tels que les astrocytes, mais aussi les péricytes, est cruciale pour l'acquisition de leur phénotype, ce qui les distingue des cellules endothéliales périphériques (Bell et al., 2010). C'est un mouvement finement orchestré qui commence par la sécrétion de facteurs tels que le VEGF et Wnt par les progéniteurs neuronaux et d'initier l'angiogenèse (Wälchli et al., 2023). Avec le recrutement des péricytes puis des astrocytes en fin d'embryogenèse, il y a un renforcement progressif des propriétés de barrière des cellules endothéliales cérébrales (Daneman et al., 2010).

Le premier événement de distinction de ces cellules est l'expression de protéines des jonctions serrées et l'expression de GLUT-1 (le transporteur de glucose de classe 1)(Tang et al., 2021). Aussi ces cellules perdent la fenestration de leur endothélium au cours du développement foetal et ont un très faible degré de transcytose ce qui limite le transport transcellulaire à travers la couche endothéliale (Joó, 1996). Les cellules endothéliales cérébrales sont fortement polarisées et les membranes luminale et abluminale ont des propriétés biochimiques et fonctionnelles différentes (Joó, 1996). Cette polarité permet le transport actif des solutés à travers les capillaires cérébraux (Joó, 1996). De plus, ces cellules endothéliales expriment des transporteurs de nutriments assez spécifiques, de même que des transporteurs d'efflux (Joó, 1996). Et finalement, elles n'expriment quasiment pas des molécules d'adhésion aux leucocytes en situations physiologiques (Knox et al., 2022).

- Péricytes

Les péricytes sont des cellules murales en intime relation avec les cellules endothéliales cérébrales et couvertes par une membrane basale (Stratman et al., 2009). Cette population est très hétérogène et les rôles des plusieurs classes de péricytes en parties différentes du cerveau n'ont pas encore été très bien décrits (Brown et al., 2019). En outre, distinguer les péricytes des cellules musculaires lisses est aussi difficile puis qu'il y a un gradient de sous-types cellulaires qui ont des propriétés des deux cellules dans la transition d'artérioles aux capillaires et de ceux en veinules (Schaeffer & Iadecola, 2021). Il est possible de les classifier selon 3 types, en accord avec la localisation et la morphologie : ceux associés aux capillaires et aux veinules postcapillaires, ceux associés aux jonctions artério-capillaires et ceux du milieu du capillaire (Brown et al., 2019).

Les péricytes, à l'aide des cellules endothéliales cérébrales, produisent les composants de la membrane basale : collagène IV, laminine, nidogène et perlécane (Stratman et al., 2009). Ces cellules endothéliales à leur tour communiquent avec eux à partir de la production du facteur de croissance dérivé de plaquettes B (PDGF-B), dont le récepteur (PDGFR $\beta$ ) est exprimé chez les péricytes (Lindblom et al., 2003). L'activation de celui-ci, par ailleurs, module des cascades de signalisation impliquées dans la prolifération, la migration et le recrutement des péricytes (Bell et al., 2010).

L'adhésion entre les péricytes et les cellules endothéliales est régulée par la production de TFG- $\beta$  de ces deux populations (Zonneville et al., 2018). Pour ce faire, la signalisation de TFG- $\beta$  chez les péricytes engendre l'expression de fibronectine, la synthèse de facteurs de la membrane basale et stimule la production de protéines de la jonction serrée (Zonneville et al., 2018). Enfin, les péricytes induisent l'expression de gènes de la spécialisation des cellules endothéliales cérébrales autant que la polarisation des pieds astrocytaires (Armulik et al., 2010).

- Astrocytes

Les astrocytes sont fondamentaux pour la manutention du SNC et peuvent être classifiés en plusieurs sous-types en accord avec leur morphologie et leur fonction, comme les astrocytes protoplasmiques et fibreux de la substance grise, les astrocytes velate du cervelet et du bulbe olfactif, les astrocytes radiaux, les astrocytes périvasculaires et marginaux et les épendymocytes, entre autres (Verkhatsky & Nedergaard, 2018).

Les astrocytes sont indispensables à la formation et au maintien de la BHE. Bien que ces mécanismes de manutention ne soient pas très bien décrits, des facteurs provenant des astrocytes y interfèrent, comme le GDNF, bFGF et le TGF $\beta$  (Knox et al., 2022). Ils sont aussi capables de jouer sur la perméabilité de la BHE pour permettre l'entrée de lymphocytes T dans le cerveau (Barcia et al., 2013). Les pieds astrocytaires périvasculaires sont le centre des interactions de ce groupe cellulaire avec les péricytes et l'endothélium (Barcia et al., 2013). Il ne s'agit pas d'une barrière physique proprement dite, mais ils contrôlent les échanges ioniques et l'entrée de l'eau à partir du canal de potassium Kir4.1 et du canal d'eau aquaporine 4 (Abbott et al., 2006).

Ces cellules sont aussi responsables de la vigilance immunitaire dans le SNC (Colombo & Farina, 2016). Elles font la communication entre les cellules du SNC et les cellules immunitaires qui s'infiltrent dans le cerveau lorsqu'il subit un processus inflammatoire (Colombo & Farina, 2016). Dans ce contexte, les astrocytes peuvent aussi réguler les fonctions des lymphocyte B et T (Xiao et al., 1998). Pour répondre aux dégâts du tissu nerveux, les astrocytes activent leur profil d'astrogliose, en augmentant leur expression de protéines d'acides fibrillaires gliales (GFAP), vimentine et nestine, et en étendant leurs prolongements (Duggal et al., 1997; Kamphuis et al., 2015).

#### **1.4.2 La Neuro-COVID : aspects cliniques et pathologiques**

Au-delà des symptômes respiratoires, les patients COVID-19 peuvent aussi manifester des symptômes neurologiques, notamment l'agueusie et l'anosmie, présentes chez 38.5 % de ces patients (Von Bartheld et al., 2020). D'autres atteintes neurologiques peuvent apparaître selon la sévérité de l'infection du système nerveux central (SNC), telles que confusion mentale, crises épileptiques, céphalée, syndrome de Guillain-Barré, hémorragie cérébrale et/ou une augmentation du risque d'accident vasculaire cérébral, tout cela étant réuni sous la dénomination de Neuro-COVID (Finsterer & Scorza, 2021). L'atteinte du SNC peut engendrer des symptômes neuropsychiatriques à long-terme ou bien la persistance de quelques symptômes neurologiques apparus lors de la phase aigüe (E. Xu et al., 2022). Tous ces symptômes sont compris dans une nouvelle maladie appelée COVID longue (détaillée dans la **session 1.5**). En effet, les patients aux USI atteints de Neuro-COVID sévère ont plus de risque de développer ces symptômes neuropsychiatriques au cours de la COVID longue (Etter et al., 2022). Il faut toutefois attirer l'attention sur le fait qu'un patient peut développer la COVID longue sans forcément développer ces symptômes et indépendamment de la sévérité de l'infection COVID-19 initiale (Douaud et al., 2022). Et, en plus, il faut noter que quelques symptômes de la Neuro-

COVID, comme la myalgie, sont davantage rapportés chez les cas non-sévères (Lippi, Wong, et al., 2020).

Depuis le début de la pandémie de COVID-19 en Chine, des chercheurs ont observé des patients sévères avec encéphalopathie et encéphalite, avec une infection virale confirmée par RT-PCR (Chen et al., 2020). Malgré l'absence de transcrits détectés par RT-PCR dans le liquide céphalo-rachidien (LCR), des études ultérieures ont trouvé des anticorps dirigés contre la protéine S du virus chez les patients porteurs de Neuro-COVID sévère (Etter et al., 2022; Paterson et al., 2021). Environ 57% de ces patients manifestaient des symptômes neurologiques tels que des vertiges et des événements cérébro-vasculaires aigus (Garg et al., 2021). Les complications neurologiques de la COVID-19 sont similaires à celles décrites pour les autres coronavirus, comme le SARS-CoV1 et le MERS (Bergmann et al., 2006). Par contre, si l'on compare avec le SARS-CoV1 et MERS-CoV, le SARS-CoV2 a affecté un plus grand nombre de personnes au monde (Iadecola et al., 2020). De plus, la proportion des patients infectés avec des symptômes neuronaux met en évidence une plus forte capacité d'atteinte neurologique (Kim et al., 2017).

Cependant, une atteinte directe du SNC était aussi sujet à débat à cause du manque d'imagerie cérébrale et d'analyse biochimique du LCR dans quelques études, autant que l'impossibilité de se défaire complètement de l'hypothèse de l'hypoxie cérébrale par ventilation ou comme conséquence de la formation des caillots (Cosentino et al., 2021; Solomon et al., 2020; Thakur et al., 2021). En plus, il était admis parmi une partie des neurologues et scientifiques que les manifestations neurologiques de la COVID-19 pouvaient être tout simplement causées par la réponse immunitaire contre le virus ou par la sévérité de la maladie pulmonaire/systémique qui peut résulter en une dysfonction multiple des organes (Cosentino et al., 2021; Solomon et al., 2020). Ce débat a été clos grâce aux études qui ont démontré l'infection des éléments de la BHE par le virus et aux analyses histopathologiques des cerveaux des patients décédés par COVID-19 qui ont pu détecter la protéine S par immunomarquage ou l'ARN par hybridation *in situ* (Crunfli et al., 2022; Khan et al., 2022; Thakur et al., 2021; Wenzel et al., 2021).

Un autre phénomène qui avait intrigué les chercheurs qui travaillaient sur les atteintes du SNC par la COVID-19 c'était les rapports de l'« hypoxie silencieuse », où, comme le nom le suggère, les patients ne s'apercevaient pas de leur dyspnée et arrivaient aux urgences avec des baisses de saturation (Nouri-Vaskeh et al., 2020). Ce phénomène pourrait être la conséquence

d'un traitement dysfonctionnel par le cerveau de l'information intéroceptive (Nouri-Vaskeh et al., 2020).

En ce qui concerne le débat de l'entrée du SARS-CoV2 dans le SNC, trois hypothèses se sont avérées : (i) transport rétrograde à partir des neurones de la muqueuse nasale, passant par le bulbe olfactif, en atteignant le cortex ; (ii) transport trans-synaptique à partir du nerf vague ou d'un autre nerf crânien jusqu'au tronc cérébral, par lequel le virus aurait accès principalement via l'intestin ; (iii) par une route hémogénique, en passant de l'endothélium cérébral à l'astrocyte et en croisant la BHE (Dey et al., 2021; Iadecola et al., 2020).

- Anosmie

Le symptôme neurologique le plus rapporté chez les patients COVID-19 était l'anosmie (Finsterer & Scorza, 2021). Dans les premières vagues de COVID-19, entre la moitié et trois quarts des patients infectés rapportaient ce symptôme (Von Bartheld et al., 2020, 2021). Ce fait a inspiré l'hypothèse de l'existence d'une route neurale de la propagation du virus vers le cerveau, par laquelle le virus infecterait les neurones olfactifs dans la muqueuse nasale et se propagerait jusqu'au cerveau via les axones de ces neurones qui se projettent dans le bulbe olfactif du cerveau (Iadecola et al., 2020). Il y a cependant une controverse à ce sujet car certaines études suggèrent que le virus n'infecterait pas les neurones sensoriels mais les cellules sustentaculaires de l'épithélium muqueux nasal (Khan et al., 2021; Verma et al., 2022). La dysfonction olfactive de la COVID-19 est singulière de par sa soudaineté et par la multiplicité de manifestations possibles : elle peut être quantitative, avec une perte partielle ou complète de l'olfaction ; ou elle peut être qualitative, avec une perception altérée des odeurs (parosmie) (Butowt et al., 2023). Elle peut durer longtemps ou finir au bout de quelques jours, de façon abrupte ou graduelle. L'anosmie/parosmie peut encore durer pendant la COVID longue, malgré que ce mécanisme ne soit pas encore totalement expliqué (Butowt et al., 2023).

Deux différentes hypothèses expliquent la perte d'odeur dans la phase aiguë de la COVID-19 : (i) élimination des cellules de support avec conséquences pour la fonction neuronale ; (ii) la réponse immunitaire peut mener à la régulation négative des récepteurs de l'odeur et/ou à des dégâts de l'épithélium olfactif (Bourgon et al., 2022; Khan et al., 2021). La perte des cellules sustentaculaires réduit la formation de mucus qui recouvre l'épithélium ainsi que l'énergie fournie aux cils olfactifs, menant à leur rétraction (Butowt et al., 2023). Les mécanismes pour expliquer la parosmie ne sont guère compris. Le plus probable est un processus aberrant de dépolarisation des neurones olfactifs (Verma et al., 2022). Finalement, il faut noter que la

variante omicron du SARS-CoV2 est moins capable d'infecter les cellules de la muqueuse nasale, ce qui implique une prévalence mineure d'anosmie/parosmie chez les patients infectés par cette variante (Spinicci et al., 2022).

- Encéphalopathie et encéphalite

Les encéphalopathies primaires associées à la COVID-19 peuvent être dues à des facteurs non neurologiques, mais conséquentes de l'infection elle-même ou d'origine métabolique/toxique (Garg et al., 2021). L'encéphalopathie est caractérisée par une altération du niveau de conscience allant de la confusion mentale ou du delirium jusqu'au coma. D'autres symptômes peuvent se présenter tels que des épisodes de convulsion, de céphalée et des signes extrapyramidaux (dystonie et akathisie, par exemple). L'altération des niveaux de conscience précédant une encéphalopathie est présente chez 20% des patients et est plus commune chez les personnes âgées (Garg et al., 2021). Le delirium par ailleurs est la principale manifestation chez les patients COVID-19 avec encéphalopathie modérée ou sévère et son apparition est associée chez eux à un plus long séjour à l'hôpital et à un haut taux de mortalité (Pranata et al., 2021). Une étude de série des cas de patients avec delirium a identifié que les patients avec encéphalopathie sévère présentaient significativement de la céphalée et une perte de l'attention comme des symptômes-clé d'un mauvais pronostic (Al-Hashel et al., 2021). La céphalée chez ces patients dure plus de soixante-douze heures et est résistante à l'analgésie (Al-Hashel et al., 2021). Enfin, les convulsions sont des symptômes qui précèdent aussi l'altération de la conscience (Romero-Sánchez et al., 2020). Une rare forme d'encéphalopathie hémorragique aigüe nécrosante est aussi décrite dans quelques rapports de cas, caractérisée par des lésions multiples et symétriques au thalamus aux ganglions de la base, à la substance blanche et au tronc cérébral (Agrawal et al., 2022; Poyiadji et al., 2020).

D'ailleurs, l'encéphalite se distingue cliniquement de l'encéphalopathie par la fièvre et les déficits neurologiques focaux, tandis que la méningite se différencie cliniquement de ceux-ci par des signes méningés (Quist-Paulsen et al., 2019). A titre de distinction, l'encéphalite est une inflammation du cerveau et des tissus autour, tandis que la méningite affecte les méninges et la moëlle épinière (Quist-Paulsen et al., 2019). Les régions du cerveau les plus atteintes par l'encéphalite associée au SARS-CoV2 sont le lobe temporal, la substance blanche, le lobe frontal et le corpus callosum (Maury et al., 2021). L'encéphalite et la méningite par COVID-19 peuvent être retrouvées parmi tous les tranches d'âges, les plus de 30 ans y étant plus

vulnérables (68,75% de ces patients) (Huo et al., 2021). Des atteintes pulmonaires ont été retrouvées dans la quasi-totalité des patients avec encéphalite (Huo et al., 2021).

Le LCR, chez la majorité des patients COVID-19 avec encéphalopathie, ne présente pas d'altérations, mais dans encéphalite/méningite il y a un profil inflammatoire, avec pléïocytose et élévation de la concentration de protéines (Huo et al., 2021; Quist-Paulsen et al., 2019). Dans ce cas, la présence du SARS-CoV2 dans le LCR est très importante pour fournir la preuve d'une atteinte neuronale par le virus (Cosentino et al., 2021). Par ailleurs, l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) montre de l'hyperintensité de la substance blanche corticale ou sous-corticale en T2/FLAIR (Conklin et al., 2021; Conte et al., 2020; Huo et al., 2021; Maury et al., 2021; Radmanesh et al., 2020). L'hyperintensité et les micro-saignements en IRM sont liés à la microangiopathie (Conklin et al., 2021; Radmanesh et al., 2020). Finalement, dans le cadre de l'encéphalite, on peut trouver une lymphocytose, tandis que l'encéphalopathie peut être suivie d'une lymphopénie, due à l'orage cytokinique (Garg et al., 2021).

- L'autopsie du cerveau des patients COVID-19

La première série d'analyses histopathologiques des différentes zones du cerveau des patients décédés de la COVID-19 a constaté des lésions hypoxiques présentes dans le cerveau et le cervelet de ces patients, mais elle n'a pas observé d'immunomarquage du virus sur le cerveau des 18 patients analysés (Solomon et al., 2020). La plus grande série d'autopsies publiée en 2020 a réussi à identifier le virus par PCR ou immunomarquage dans le cerveau de quelques patients, mais aussi des ischémies liées à des événements thrombotiques, de l'astroglie et de la microglie (Matschke et al., 2020). Ces sont définies par une augmentation d'activation d'astrocytes et microglies, respectivement, et identifiées dans les analyses histologiques par le nombre augmenté de ces cellules sur certaines zones du cerveau (Cosentino et al., 2021). Cependant, les auteurs n'ont pas réussi à établir une relation causale entre l'infection directe par le SARS-CoV2 et les résultats de l'analyse de ces échantillons (Matschke et al., 2020). Donc, l'activation des astrocytes et microglies comme l'infiltration des lymphocytes seraient, selon les auteurs de cette étude, plus probablement dérivées de la réponse immunitaire systémique au virus qu'à l'effet direct engendré par son entrée dans le SNC (Matschke et al., 2020). En effet, les patients avec Neuro-COVID présentent de hautes concentrations d'autoanticorps dans leurs LCR, qui peuvent diriger l'immunité contre leur propre tissu nerveux (Etter et al., 2022; Schulte-Schrepping et al., 2020).

En effet, le défi des études pendant la pandémie était tout d'abord d'obtenir des prélèvements de bonne qualité pour la RT-PCR et l'immunomarquage (Frank, 2020). En plus, un prélèvement du cerveau avec le résultat positif pour le SARS-CoV2 en PCR ne concluait pas que le virus passait dans le SNC, vu que la question de savoir s'il était vraiment dans le tissu nerveux ou bien dans le sang restait sans réponse (Frank, 2020). L'hybridation *in situ* était aussi une technique difficile à réaliser, en considérant le temps de fixation des échantillons prélevés des patients COVID-19 (Thakur et al., 2021). Par contre, elle est concluante pour l'infection viral en cas d'observation de l'ARN viral (Wenzel et al., 2021). L'interprétation des observations histopathologiques est aussi un facteur qui ajoute des éléments à ce débat. En plus des comorbidités des patients décédés, les traitements qu'ils ont subis, comme la ventilation mécanique et l'usage de dexaméthasone, interviennent dans les altérations trouvées (Agrawal et al., 2022; Dondaine et al., 2022). Toutefois, il faut considérer que les études en autopsie ont tendance à analyser les cas les plus sévères de la maladie, de sorte que ces observations pathologiques ne peuvent pas être généralisées à tous les patients COVID-19 (Agrawal et al., 2022; Dondaine et al., 2022).

Au-delà de la congestion cérébrale, de l'œdème et de la perte neuronale, les observations dans les lames histopathologiques des cerveaux des patients décédés de COVID-19 peuvent être divisées en deux altérations principales : les dégâts vasculaires et les processus inflammatoires. Par ailleurs, les observations les plus fréquentes sont : des nodules microgliales (indiquant une microgliose), une lymphocytose périvasculaire (indicative d'endothélite), une infiltration lymphocytaire dans le parenchyme et les méninges, des zones d'ischémie, de l'astrogliose, des hémorragies et la formation de caillots sanguins. Pourtant, les autopsies ne sont pas concluantes sur les conséquences directes de l'action du virus (Agrawal et al., 2022; Cosentino et al., 2021; Lou et al., 2021; Solomon et al., 2020; Thakur et al., 2021).

L'astrogliose et la microgliose associées aux infiltrés de lymphocytes T sont trouvées dans presque la moitié des autopsies analysées (Agrawal et al., 2022). Dans le contexte de la physiopathologie de la COVID-19, les microglies sont activées par des cytokines provenant de la circulation, comme IL-6 et IFN- $\gamma$  (Etter et al., 2022). Ces cellules sont donc responsables de phagocyter les neurones morts, tandis que les astrocytes ont pour mission de restaurer les dégâts tissulaires. Les infiltrations lymphocytaires et l'activation microgliale peuvent être présentes chez des patients septiques non-COVID-19 (Agrawal et al., 2022). Par ailleurs, l'astrogliose est davantage rencontrée chez les patients les plus âgés, de telle sorte qu'elle est plus associée à la tranche d'âge qu'à l'infection proprement dite (Cosentino et al., 2021). Cependant, ni

l'astrogliose ni la microgliose n'ont de corrélation avec la présence de symptômes neurologiques dans une méta-analyse des études histopathologiques réalisées entre 2020 et 2021 (Agrawal et al., 2022).

Les maladies neurodégénératives sont associées à des changements pathologiques qui peuvent rendre confuses les observations dans les autopsies, surtout l'activation microgliale et les infiltrations des lymphocytes T CD8+ (Matschke et al., 2020). Les maladies d'Alzheimer, de Parkinson et la sclérose multiple peuvent être associées à la microgliose (Cosentino et al., 2021). Néanmoins, la région du cerveau où ces changements sont trouvés peut aider à différencier si elle provient ou pas de la COVID-19. Pour une cohorte de patients COVID-19 en comparaison avec des patients décédés d'Alzheimer par exemple, la microgliose au niveau du tronc cérébral est spécifique de la Neuro-COVID, tandis que la microgliose dans l'hippocampe et dans les lobes préfrontaux seraient communes aux deux types de patients (Agrawal et al., 2022). L'artériosclérose des artérioles est un facteur de risque de démence et peut générer aussi des zones d'ischémie dans le parenchyme cérébral (Matschke et al., 2020).

Finalement, l'ischémie et la formation des caillots peuvent être liées à la ventilation mécanique (Solomon et al., 2020; Song et al., 2021). En outre, l'hypoxie peut mener à l'hypercoagulabilité et à l'occlusion des vaisseaux cérébraux par des caillots sanguins. Les événements thrombotiques de la maladie peuvent également contribuer à la formation de zones d'ischémie et mener à l'accident vasculaire cérébral proprement (Song et al., 2021). Les lésions hypoxiques et ischémiques ont des corrélations avec la manifestation des symptômes neurologiques, mais aussi avec des comorbidités cardiovasculaires (Magro et al., 2020; Pitt et al., 2022). En revanche, une autre étude basée sur l'autopsie de patients sans ces comorbidités a révélé qu'ils présentaient aussi la formation des zones d'ischémie (Agrawal et al., 2022).

Cependant, dans quelques autopsies, le virus a été détecté par immunomarquage dans quelques neurones et cellules endothéliales du cortex, aussi bien que dans les racines des nerfs crâniens au niveau du tronc cérébral (Matschke et al., 2020). Malgré ce fait, la détection du SARS-CoV2 dans le cerveau n'a pas de corrélation avec la sévérité des symptômes neurologiques dans ces études (Cosentino et al., 2021). A ce sujet, une question technique mérite d'être discutée : les anticorps anti-proteine S semblent être plus efficaces que ceux dirigés contre la protéine de la nucléocapside, et l'usage de la combinaison des deux anticorps semble plus sensible pour détecter le virus, vu que quelques cellules peuvent avoir du signal pour l'anticorps anti-nucléocapside, mais pas pour l'anticorps anti-S (Agrawal et al., 2022).

D'ailleurs, des études montrent une formation de nodules microgliales préférentiellement au niveau du tronc cérébral, notamment de la médulle oblongue, du marquage positif pour la protéine S du virus et de la neuronophagie (Agrawal et al., 2022; Matschke et al., 2020). En pathologie, la neuronophagie est définie et observée comme un neurone mort entouré par des microglies ou macrophages. Cela suggère un possible mécanisme neurologique pour l'hypoxémie silencieuse, où le patient respire normalement à des saturations d'oxygène très basses (Agrawal et al., 2022). Les observations histopathologiques sont donc en faveur de l'hypothèse de la perte de perception intéroceptive, dont les informations afférentes sont traitées dans la médulle oblongue (Nouri-Vaskeh et al., 2020).

Bien que les études en autopsie ne soient pas concluantes à propos d'une action directe du SARS-CoV2 dans le SNC, ou qu'elles ne vérifient pas l'hypothèse de l'existence d'une neuroinvasion du virus, par laquelle les observations histopathologiques ne seraient que la conséquence de la réponse immunitaire systémiques exacerbée au virus et de la formation des caillots sanguins dans la périphérie, ces études ont, par définition, un biais de sélection : les patients décédés sont en majorité les plus âgés et/ou ceux avec des comorbidités (Solomon et al., 2020). Par contre, la formation des zones d'ischémie identifiées à l'autopsie de quelques jeunes patients qui n'avaient pas de comorbidités, comme l'apparition du déficit cognitif chez les jeunes patients adultes qui n'ont pas développé nécessairement une forme sévère de la COVID-19, suggère fortement l'existence de mécanismes physiopathologiques provoqués directement par le virus (Agrawal et al., 2022).

#### **1.4.3 Les atteintes de la barrière hémato-encéphalique par le SARS-CoV2 : une bataille à plusieurs fronts**

Les études sur la Neuro-COVID ont mis la BHE au centre de sa physiopathologie, non seulement à cause de l'ischémie cérébrale provoquée par des événements thrombotiques, mais aussi par les études en IRM chez des patients COVID-19 qui montrent des images suggérant une atteinte microvasculaire (Conklin et al., 2021; Dewisme et al., 2023; Radmanesh et al., 2020). De plus, d'autres études montrent une augmentation d'albumine sur les dosages ELISA du LCR chez les patients Neuro-COVID, ce qui met en évidence une rupture de la BHE chez ces patients (Etter et al., 2022; Paterson et al., 2021). En effet, l'autopsie du cerveau de quelques patients COVID-19 montre la formation de zones d'ischémie en l'absence de facteurs de risques cardiovasculaires ou de maladie neurodégénérative de base (Agrawal et al., 2022), ce qui suggère une action directe du virus sur le SNC, notamment au niveau des capillaires.

D'ailleurs, tous les groupes cellulaires qui la composent sont des cibles potentielles à l'infection du SARS-CoV2. L'ACE2 a déjà été identifiée dans les péricytes et cellules musculaires lisses de la vascularisation cérébrale, mais pas dans l'endothélium ou chez les astrocytes (Crunfli et al., 2022; Muhl et al., 2022). En revanche, ces deux derniers possèdent des récepteurs alternatifs par lesquels le SARS-CoV2 pourrait les infecter, notamment la Nrp1 et la Bsg (Wenzel et al., 2021). En outre, la présence de l'ACE2 dans son isoforme soluble pourrait faciliter la pénétration du virus dans ces cellules. Dans ce contexte, une variété de protéases comme la TMPRSS11A/B, les cathepsines B et L et la furine peuvent y contribuer en clivant la protéine S (Eslami et al., 2022).

La protéine S du SARS-CoV2 tout comme son ARN ont déjà été retrouvés dans l'endothélium cérébral des patients Neuro-COVID dans différentes études (Song et al., 2021; Wenzel et al., 2021). De plus, dans un modèle murin qui exprimait l'ACE2 humaine, la protéine S a été capable de surpasser la BHE (Rhea et al., 2021). Dans des études *in vitro*, elle a réussi à changer les propriétés de la BHE sans forcément diminuer la viabilité des cellules endothéliales : elle a réduit leur expression des protéines des jonctions serrées (notamment ZO1, occludine et claudine 5) et augmenté celle des molécules d'adhésion et des métalloprotéinases, *i.e.*, les réduits l'étanchéité et les augmentés l'adhésion aux cellules inflammatoires (Almutairi et al., 2021; Choi et al., 2022; DeOre et al., 2021; Montezano et al., 2023).

Cependant, d'autres mécanismes viraux sont plus délétères pour ces cellules, comme l'action de l'enzyme virale M<sup>pro</sup>. Cette protéase dégrade le modulateur de NF- $\kappa$ B (NEMO) dans l'endothélium cérébral chez l'humain et les rongeurs sur plusieurs sites de clivage. D'ailleurs, NEMO est un composant essentiel de la voie canonique de l'activation de NF- $\kappa$ B par des facteurs inflammatoires tels qu'IL-1 $\beta$ . Néanmoins l'expression de M<sup>pro</sup> dans les cellules endothéliales cérébrales bloque cette signalisation et empêche la translocation nucléaire de la sous-unité p65 du NF- $\kappa$ B. Tout ceci engendre la cascade de la nécroptose dans les cellules endothéliales infectées et conduit à la formation de « vaisseaux fantômes » : il s'agit de la membrane basale des anciens capillaires (détectée par l'immunomarquage de collagène IV) en l'absence de cellules endothéliales (détectées par l'immunomarquage de CD34) (Wenzel et al., 2021). Ces vaisseaux fantômes sont retrouvés en plus grand nombre chez les patients décédés de la COVID19 que chez les personnes décédées d'une autre cause. Même si ces altérations semblent être partielles ou totalement réversibles, l'hypoxie et la mort neuronale qui sont susceptibles d'en résulter expliquent l'augmentation de Nfl (protéine du neurofilament,

marqueur de mort neuronal) dans le sérum des patients Neuro-COVID (Etter et al., 2022; Paterson et al., 2021).

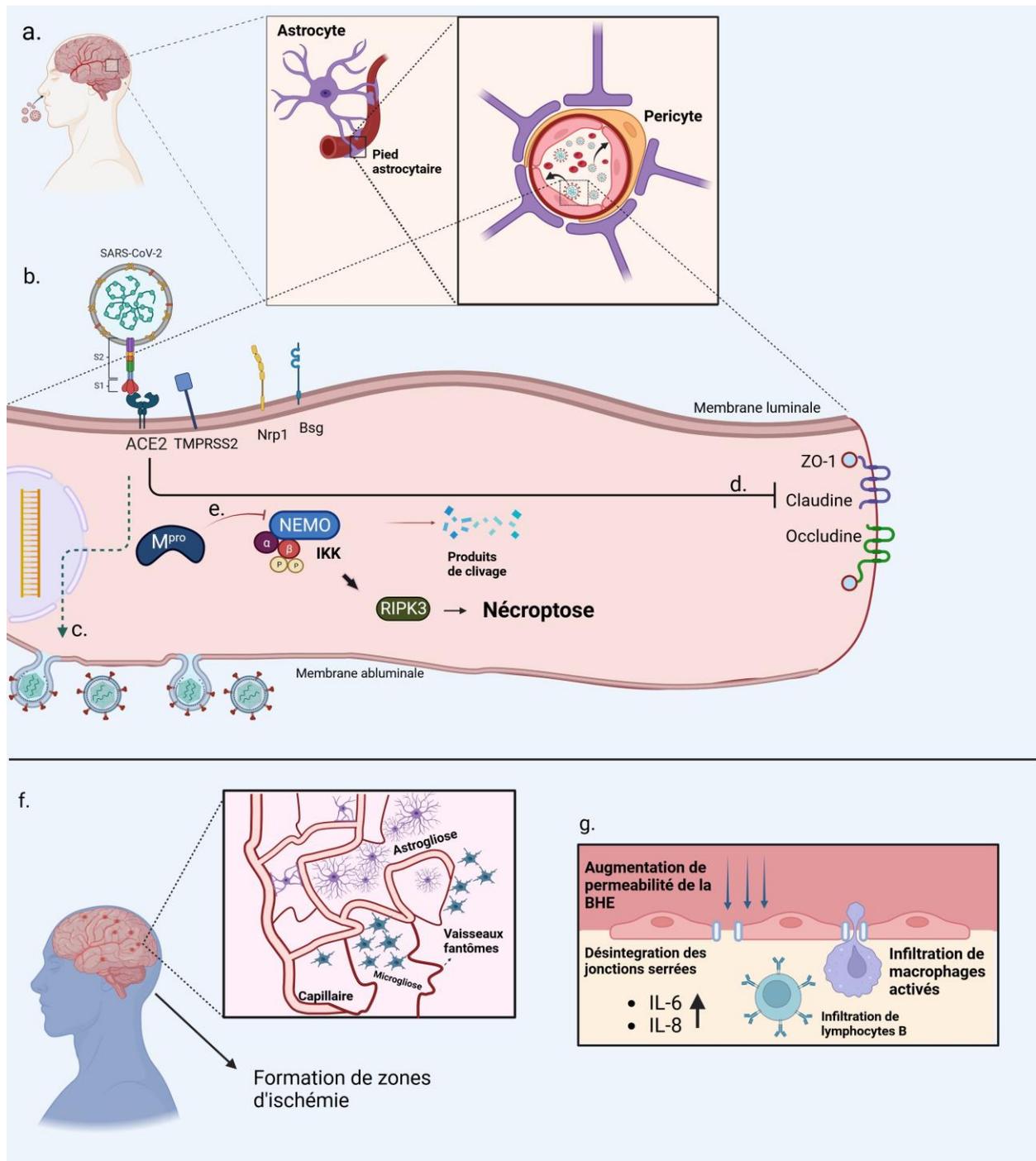
Les péricytes changent leur phénotype après l'exposition *in vitro* à la protéine S via un remaniement de leur profil contractile pour un profil miofibrogénique, par l'augmentation de l'expression d'alpha-actine musculaire lisse ( $\alpha$ -SMA), de la fibronectine, du collagène I et de la NOTCH3 (Khaddaj-Mallat et al., 2021). D'ailleurs, la liaison entre le RBD de la protéine S et l'ACE2 sur les péricytes peut conduire à des constriction microvasculaires chez le hamster, dont l'ACE2 rassemble l'humaine. Cet effet a été associé à une diminution de la conversion d'angiotensine II en angiotensine (1-7), à cause de l'enlèvement de l'ACE2 de la surface de la cellule lorsqu'il se lie à la protéine S (Khan et al., 2022).

L'infection des astrocytes par le virus *in vitro* altère leur capacité à maintenir la survie des neurones dans un modèle de co-culture, un mécanisme qui pourrait participer à l'atrophie corticale observée à long-terme chez les patients qui manifestent les répercussions neuropsychiatriques de la COVID longue (Crunfli et al., 2022). Par contre, l'astrogliose a été associée à l'âge des patients grâce à une révision systématique d'autopsies (Cosentino et al., 2021). Toutefois, une autre étude d'accompagnement de longue durée a observé que les patients en Neuro-COVID sévère présentent des taux sériques élevés de GFAP (Kanberg et al., 2020). Une autre étude a trouvé des taux sériques élevés de GFAP en patients COVID-19 modérée, alors qu'autant GFAP que NfL étaient augmentées chez les patients sévères (Etter et al., 2022). Tout cela indique que la réaction astrocytaire serait le premier front de la réponse immunitaire locale au moment de l'infection du SNC par le SARS-CoV2.

La perte d'étanchéité de la BHE augmente le passage des cytokines inflammatoires provenant de périphérie, notamment l'interleukine-6, -8, et l'IFN- $\gamma$ , produites par l'orage cytokinique systémique (Etter et al., 2022). L'augmentation de l'expression de molécules d'adhésion contribue à l'infiltration de macrophages et de lymphocytes B dans le SNC de ces patients (Etter et al., 2022). Les deux hypothèses qu'expliquent la physiopathologie de la COVID-19 sont donc complémentaires et non pas concurrentes. Etter et al., en 2022, ont démontré que les signes plus proéminents de la COVID-19 sévère sont la rupture de la BHE, l'élévation des marqueurs d'activation microgliale et la réponse humorale auto-médiée et non-auto-médiée. L'âge constitue là encore un facteur de risque, puisque la BHE chez les personnes âgées est déjà plus perméable et que les cellules endothéliales expriment plus de molécules d'adhésion (Knox et al., 2022). Les mécanismes décrits ci-dessus sont alors exacerbés chez les patients COVID-19 âgés, ou avec des comorbidités cardiovasculaires, métaboliques et/ou des

maladies neurodégénératives (Knox et al., 2022). Ces derniers contribuent aussi soit à une inflammation de base dans le parenchyme cérébral, soit à un profil pro-inflammatoire de l'endothélium cérébral (Dewisme et al., 2023; Knox et al., 2022). De cette façon, cela expliquerait les trouvailles des études histopathologiques en Neuro-COVID concernant la microgliose et l'astrogliose (Cosentino et al., 2021).

Ces différents processus physiopathologiques peuvent conduire à la réduction du volume de matière grise dans le cerveau des patients COVID longue et expliquer, au moins en partie, les symptômes neuropsychiatriques qui en résultent (Crunfli et al., 2022; Douaud et al., 2022; Etter et al., 2022). L'atteinte de certaines régions du système limbique pourrait expliquer l'augmentation de la prévalence de dépression et des troubles de l'anxiété dans cette population (Crunfli et al., 2022). Les différentes manifestations neuropsychiatriques seront expliquées en détails au **point 1.5** de cette thèse. Dans la **Figure 4**, ces sont illustrés les mécanismes de perte d'étanchéité de la BHE et de la formation des vaisseaux fantômes.



**Figure 4. Le virus SARS-Cov-2 peut infecter les trois groupes de cellules qui composent l'unité neurovasculaire dans l'atteinte de la barrière hématoencéphalique.** **a.** Par voie hémogénique, le virus peut atteindre et infecter les péricytes et les astrocytes. **b.** Pour y parvenir, il entre dans la cellule endothéliale cérébrale à l'aide de trois co-récepteurs : Nrp1, TMPRSS2 et Bsg. **c.** Le virus se réplique et traverse l'endothélium de la membrane luminale vers la membrane abluminale à partir de laquelle, il peut infecter les autres cellules de l'unité neurovasculaire. **d.** L'exposition à la protéine S diminue l'expression des protéines des jonctions serrées. **e.** Finalement, la M<sup>pro</sup> du SARS-CoV-2 clive NEMO et induit une nécroptose via l'activation de RIPK3 dans les cellules endothéliales. **f.** La mort de ces cellules mène à la formation de « vaisseaux fantômes », et de zones d'ischémie dans le cerveau dues à la Neuro-COVID. Microgliose et astrogliose peuvent aussi être présentes comme trouvaill

histopathologiques chez les patients décédés. **g.** Au final, les altérations dans les propriétés BHE, comme la perte d'étanchéité et la plus grande expression de molécules d'adhésion, augmentent le passage de cytokines pro-inflammatoires (notamment IL-6 et IL-8) et l'infiltration de macrophages et lymphocytes B. (Figure créée sur Biorender.com)

## **1.5 La COVID longue : emphase sur ses répercussions neuropsychiatriques et neuroendocrines**

### **1.5.1 COVID longue : principaux signes et symptômes et mécanismes physiopathologiques**

- Définition et épidémiologie

Depuis juillet 2020, les rapports de suivis des premiers patients qui ont survécu et/ou guéri de la COVID-19 commencent à être publiés (Saloner et al., 2020). La fibrose pulmonaire résiduelle des patients de COVID-19 était la principale séquelle, décrite comme incapacitante dans plusieurs cas (Duong-Quy et al., 2023). Des infarctus myocardiques et des attaques vasculaires cérébrales ont aussi été notés comme des conséquences incapacitantes des événements thrombotiques de la maladie (Charfeddine et al., 2021; Katsoularis et al., 2022). Au fur et à mesure, d'autres signes et symptômes ont été recueillis dans le récemment nommé Syndrome de Séquelles Post-Aigües de la COVID-19 (PASC) (Moghimi et al., 2021). Cependant, la terminologie d'alors était très diverse, avec différents auteurs utilisant différents termes pour désigner les symptômes prolongés qui suivent un épisode de COVID-19 (Amenta et al., 2020; Moghimi et al., 2021). L'absence d'un terme unitaire a, pour un certain temps, entravé quelques recherches épidémiologiques (Rubin, 2020). Cette absence de consensus a aussi été signalée comme un facteur qui compromettrait les décisions des politiques à prendre en matière de santé publique et dans la prise en charge des patients (Rubin, 2020). En octobre 2021, l'OMS a réuni plus de 200 signes et symptômes chroniques post-COVID sous le terme général de COVID longue, dans le Consensus de Delphi. Selon elle, la COVID longue englobe tous les symptômes qui surviennent souvent trois mois après l'infection du SARS-CoV2, durent au moins deux mois et ne peuvent pas être expliqués par un autre diagnostic (WHO, 2021; Soriano et al., 2022).

Faire le bilan des patients COVID-19 dont la maladie évolue en COVID longue demeure difficile à cause des différentes méthodologies appliquées (Altmann et al., 2023). Les études ne sont pas uniformes surtout en ce qui concerne le délai entre la collecte des données et le début de la phase aigüe de l'infection, si 4 ou 12 semaines (Altmann et al., 2023). Cette différence

parmi ces études aboutit en une différence de prévalence de COVID longue. L'étude longitudinale REACT-2, de l'*Imperial College*, a analysé les symptômes rapportés par 660 000 personnes et a établi une cinétique de la COVID-19/COVID longue au cours d'une année entière (Whitaker et al., 2022). D'après cette étude, 40% des patients ont encore rapporté un ou plusieurs symptômes quatre semaines après le début de la phase aigüe. Après 12 semaines, ce chiffre a très peu diminué (38%) et est resté stable au cours des six mois suivants de l'étude. Donc, la majorité des patients (60%) voient leurs symptômes s'estomper durant ces quatre premières semaines, mais après 12 semaines, le reste de ces patients auront une longue persistance de ces symptômes.

Le terme « COVID longue » englobe de multiples manifestations cliniques dont une bonne partie rend les patients inaptes au travail (La Voix Du Nord, 2023). Les symptômes peuvent durer des mois et dans les pires des cas, des années. Elle inclut l'apparition de conditions communes, comme des maladies cardiovasculaires, neurovasculaires et thrombotiques, des diabètes type II, une encéphalomyélite myalgique/syndrome de fatigue chronique (EM/SFC) et une dysautonomie, spécifiquement le syndrome de tachycardie orthostatique postural (STOP) (Davis et al., 2023). La sévérité de la COVID-19 est rapportée comme un facteur qui augmente la probabilité de développer ces symptômes/signes (Altmann et al., 2023). Cependant, une étude prospective chez des patients COVID-19 à faible risque de mortalité (seulement 19% ont été hospitalisés) rapporta que 70% des 201 patients évalués eurent de séquelles avec des dégâts à au moins un organe, et 29% en avaient à plusieurs organes (Dennis et al., 2021). Dans ce sens, une analyse de la base de données du Département des Affaires des Vétérans a inclus le suivi de 150 000 individus pour un an après l'infection par SARS-CoV2 (Xie et al., 2022). Elle a conclu que cette infection a augmenté le risque de diabète de type II et de maladies cardiovasculaires comme l'insuffisance cardiaque, la dysrythmie et les accidents vasculaires cérébraux, et ce indépendamment de la sévérité initiale de la COVID-19.

Une révision systématique et méta-analyse avec des études de cohorte publiées jusqu'en mars 2021 a décrit que les symptômes les plus fréquents étaient : une « faiblesse » (41%), un malaise général (33%), de la fatigue (31%), des difficultés de concentration (26%) et un souffle court (25%) (Lopez-Leon et al., 2021). De plus, elle a démontré qu'au moins 80% des patients avec COVID-19 confirmée par PCR continuent à présenter au moins un effet de la maladie autour des deux semaines après l'infection (Lopez-Leon et al., 2021). Pour les auteurs, les effets s'agissent des conséquences de la COVID-19 : symptômes, signes et paramètres cliniques. La fatigue, l'anosmie, la dysfonction pulmonaire, des anomalies de CT/radiographie thoracique,

et des désordres neurologiques ont été identifiés comme les plus fréquents. Par ordre d'incidence, les cinq symptômes les plus fréquents étaient la fatigue (58%), la céphalée (44%), le déficit d'attention (27%), la perte de cheveux (25%) et la dyspnée (24%) (Lopez-Leon et al., 2021). L'un des autres symptômes neuropsychiatriques majeurs rapporté pour la COVID longue est le « brouillard mental » (de l'expression en anglais, *brain fog*), qui se caractérise par un ralentissement intellectuel et de la pensée en général aperçu au quotidien (Xie et al., 2022). L'apparition des neuropathies diverses ont été aussi associées aux épisodes d'infection pour le SARS-CoV2 et peuvent donc faire partie du cadre de la COVID longue (H. E. Davis et al., 2023).

Les différentes variantes du SARS-CoV2 déclenchent différents symptômes de la COVID longue. Si l'on compare les cas de COVID longue de la première vague avec ceux de la vague de la variante Alpha, on observe une augmentation de la fréquence de la myalgie, de l'anxiété et du brouillard mental, tandis que l'anosmie et l'agueusie ont tendance à diminuer. L'infection par le variant de la première vague ou l'Omicron aboutissent plus fréquemment à des troubles du sommeil, tandis que la variante Delta a un effet contraire. L'Omicron augmente aussi la probabilité de myalgie. Malgré le fait que la variante Omicron soit plus transmissible et engendre de symptômes plus sévères, une analyse de 41000 individus infectés pendant la vague de la Delta et 56000 de l'Omicron a observé que l'infection par cette dernière a moins de chances de causer un syndrome de COVID longue (Aloè et al., 2023; Antonelli et al., 2022; Du et al., 2022).

Finalement, ce qui fait de la COVID longue un défi de santé publique c'est aussi le fait que la vaccination contre le SARS-CoV2 ne diminue pas la probabilité de la développer en cas d'infection (Strain et al., 2022). Il est déjà prouvé que la vaccination protège les patients contre les formes plus sévères de la COVID-19, mais cela ne semble pas le cas pour la COVID longue (Al-Aly et al., 2022). L'Office Britannique de Statistiques Nationales montre que, des 2 millions de cas britanniques de COVID longue, environ la moitié est apparue pendant les vagues post-vaccinales, notamment celles de la souche Delta et de l'Omicron (Al-Aly et al., 2022) Néanmoins, des études montrent que la vaccination pourrait jouer un rôle sur la durée des symptômes de COVID longue, sur leur intensité et par conséquent sur leur impact dans la vie des personnes atteintes (Tran et al., 2023).

- Syndrome de Fatigue Chronique, dysautonomie et COVID longue

La fatigue rapportée dans la méta-analyse susmentionnée peut être forcément associée au syndrome de fatigue chronique/encéphalomyélite myalgique (SFC/EM) (Davis et al., 2023). Effectivement, environ la moitié des patients avec COVID longue remplissent les critères diagnostiques pour SFC/EM (Haffke et al., 2022; Kedor et al., 2022). Ce syndrome est un diagnostic controversé, vu que 90% des patients n'ont pas encore été diagnostiqués (Valdez et al., 2019). D'ailleurs, le scepticisme sur la gravité de cette condition est encore très répandu parmi des professionnels de santé (Valdez et al., 2019). De plus, il s'agit d'une condition sans un biomarqueur ni une caractéristique biologique propre. La clinique demeure donc le seul moyen pour le diagnostic de ce trouble, qui est défini comme « un épuisement chronique inexpliqué par une autre pathologie ou un effort prolongé, qui est nouveau pour le patient et qui dure depuis au moins six mois. Cette fatigue chronique n'est pas soulagée par le repos et réduit significativement toutes ses activités ». Le malaise post-effort et le sommeil non-réparateur sont aussi des critères nécessaires au diagnostic. Ou l'intolérance orthostatique ou le déficit cognitif doit être présent aussi. Finalement, il n'est surprenant d'observer la survenue de SFC/EM à la suite d'une infection par SARS-CoV2, puisque 27,1% des personnes qui avaient été infectées par SARS-CoV1 dans les années 2000 ont remplis les critères de ce syndrome 4 ans après l'infection (Lam et al., 2009).

Le SFC/EM dans la COVID longue pourrait avoir un lien avec le virus Epstein-Barr (Altmann et al., 2023). Le virus Epstein-Barr est décrit comme un des pathogènes de la SFC/EM (Choutka et al., 2022). Un des mécanismes physiopathologiques proposés pour la COVID longue est la réactivation de l'infection de l'Epstein-Barr par les lymphocytes B de mémoire (Shafiee et al., 2022). Une étude rétrospective de l'Université de Wuhan, en Chine, a été le premier à démontrer que la co-infection du SARS-CoV2 et de l'Epstein-Barr augmentait en presque trois fois le risque de développer de la COVID-19 sévère (Chen et al., 2021). Une autre étude longitudinale a démontré l'association entre la virémie par Epstein-Barr et la fatigue dans la COVID longue (Su et al., 2022). L'insomnie, la céphalée, la myalgie et la confusion mentale pourraient aussi être dues à la réactivation de l'Epstein-Barr (Gold et al., 2021). Cependant, les résultats d'une étude sur une cohorte de 280 patients suggèrent à contrario que la fatigue et le déficit cognitive dans la COVID longue ne seraient pas liés à la réactivation du virus Epstein-Barr (Peluso et al., 2023).

La dysautonomie, particulièrement le STOP, est aussi associé au SFC/EM et a aussi une infection virale comme déclencheur. La STOP est un syndrome chronique défini par l'augmentation du rythme cardiaque au changement de posture, sans une hypotension orthostatique associée (Shaw et al., 2019). Il est donc une intolérance orthostatique. Des symptômes associés empirent aussi au soulèvement, ces sont la fatigue, des palpitations, du tremblement, de la vision floue, de la syncope et des étourdissements (Shaw et al., 2019). L'étude d'une cohorte de 2314 personnes avait trouvé de la STOP dans 67% des patients de COVID longue (Larsen et al., 2022). Le mécanisme humoral de la COVID longue participe dans la physiopathologie du STOP, vu que les autoanticorps contre les récepteurs adrénergiques et muscariniques y jouent un rôle (Wallukat et al., 2021). La neuropathie de petites fibres est aussi associée à la STOP, et les deux sont souvent trouvées chez les patients de COVID longue. Cette neuropathie s'agisse d'une altération des fibres A et C de la nociception, et le patient manifeste de la douleur intense et/ou altération de la perception du froid/chaud (Oaklander et al., 2022).

La COVID longue peut aussi toucher les enfants de tout âge. Comme les adultes, les enfants qui développent la COVID longue ressentent de la fatigue, des malaises post-effort, souffrent d'altération cognitive, de perte de mémoire, de céphalées, d'intolérance orthostatique, de troubles du sommeil et d'un souffle court (Sørensen et al., 2022). Un centre de traitement qui prend en charge d'adolescents porteurs de COVID longue sévère ou modérée rapporte qu'ils remplissent en effet les critères pour le diagnostic de SFC/EM (Morrow et al., 2022). Il a été relevé que les enfants sujets à des troubles déficitaires de l'attention, avec unurticaire chronique et une rhinite allergique était plus à risques de développer la COVID longue suite à l'infection par le SARS-CoV2 (Merzon et al., 2022). Enfin, il est aussi probable que les enfants nés de mères ayant eu la COVID-19 durant sa grossesse aient un risque accru de développer des troubles du neurodéveloppement avant l'âge d'un an (Edlow et al., 2022).

- Mécanismes physiopathologiques généraux

Comme l'on peut observer par la myriade de symptômes et signes compris, la COVID longue est une maladie des multiples organes dont les processus physiopathologiques surpassent la simple infection des cellules cibles qui expriment de l'ACE2 (Dennis et al., 2021). Ces dégâts aux multiples organes sont attribués à la formation de caillots sanguins dans la phase aigüe et/ou par la réponse immunitaire au virus, aigüe et chronique (Jing et al., 2022). Une réduction de la densité vasculaire de long terme, spécialement au niveau des capillaires, a été

observé chez les patients porteurs de COVID longue (Osiaevi et al., 2023). En ce qui concerne les poumons, par exemple, des patients qui présentaient du souffle court ou de la désaturation aux moindres efforts ont été scannés par IRM moléculaire à base de xénon hyperpolarisé par laser et par tomographie dans un suivi (Matheson et al., 2023). Cette même étude a aussi mesuré la capacité de diffusion de monoxyde de carbone des poumons. L'association entre ces trois paramètres ont mis en évidence une insuffisance des échanges gazeuses dans les compartiments vasculaires des poumons. Une autre étude montre que la formation persistante de caillots sanguins chez 5% des patients avec COVID longue avec des symptômes pulmonaires (Dhawan et al., 2021). Une autre montre que chez quelques patients avec COVID longue, les taux de FvW ont une corrélation inverse avec la performance au teste de la marche de 6 minutes, et aussi avec la désaturation ou augmentation de lactate au teste des levers de chaise d'une minute (Fogarty et al., 2021; Prasannan et al., 2022). Néanmoins pour le cœur, ces études radiologiques ne sont pas concluantes, malgré le fait que d'autres lui montrent comme le plus affecté parmi les organes dans le contexte de la COVID longue (Altmann et al., 2023).

Une hypothèse peu explorée pour expliquer les effets de la COVID longue c'est de la séquestration du virus dans un organe même après la phase aigüe de la maladie (Altmann et al., 2023). L'appareil digestive est l'un des candidats les plus probables. Plusieurs études montrent en effet la persistance de l'ARN virale dans le matériel fécal de ces patients pendant jusqu'à 8 mois après le début des symptômes (Cheung et al., 2022; Gaebler et al., 2021; Swank et al., 2023; Zollner et al., 2022). Cependant, il est difficile de faire la corrélation entre la PCR fécale positive et la présence des symptômes de COVID longue, vu qu'une partie importante des patients avec ce résultat sont asymptomatiques et vice-versa (Cheung et al., 2022; Y. Wu et al., 2020). Cependant, une étude a montré la persistance du virus dans des biopsies du tube digestif haut et bas jusqu'à 6 mois après l'infection, et ceci sans infiltration des cellules inflammatoires dans le tissu intestinal mais une activation continue des lymphocytes B de mémoire. Cela suggère une stimulation antigénique continue (Gaebler et al., 2021). Dans ce sens, une autre étude réussi à démontrer la présence de la protéine S dans le sérum chez 60% des patients avec COVID longue même un an après le début des symptômes de la COVID-19 (Swank et al., 2023). D'ailleurs, d'autres organes sont aussi proposés comme étant des réservoirs potentiels du virus par certaines études post-mortem (Stein et al., 2022). Donc, cela suggère que partie des symptômes de la COVID longue pourraient être liés à la persistance du virus dans le corps, au moins dans un sous-groupe de patients.

La formation d'auto-anticorps est aussi un aspect pertinent de la physiopathologie de la COVID longue. Une étude pionnière pendant la première vague de COVID-19 a démontré que les patients dont le pronostic vital est engagé développent des auto-anticorps anti-IFN de type I (lire le rôle que le IFN-I joue comme première défense immunitaire au SARS-CoV2 dans la session 1.2) (Bastard et al., 2020). Le SARS-CoV2 induit la production d'un grand répertoire d'auto-anticorps qui sont aussi associés à la sévérité de la maladie (Altmann et al., 2023).

Il est connu que les lymphocytes B sont capables même physiologiquement de produire d'autoanticorps. Par contre, ces autoanticorps sont dans la majorité des cas des anticorps IgM de basse affinité et aussi biaisés pour se lier à des antigènes solubles du plasma, au lieu de ceux sur la surface des cellules. La capacité de générer des anticorps avec une affinité précise aux antigènes des pathogènes se fait grâce aux centres germinaux. Ces sont des structures temporaires dans les tissus lymphoïdes secondaires et les plaques de Payer où les lymphocyte B subissent des mutations somatiques dans les gènes codant les récepteurs à ces antigènes. Ils servent donc à produire des plasmocytes matures et des lymphocytes B de mémoire (Elsner & Shlomchik, 2020).

Dans ce sens, les patients en COVID-19 sévère ont une augmentation des lymphocytes B double-négatifs (négatifs pour le CD27 – marqueur de mémoire – et pour IgD). Ces lymphocytes ont une tendance à s'activer de façon extra-folliculaire, i.e., dehors le tissu lymphoïde, ce qui favorise la formation d'autoanticorps (Knight et al., 2021). De plus, il y a chez ses patients un effondrement de l'activité des centres germinaux et une altération de la sélection négative des lymphocytes B (importante pour leur maturation et leur spécificité) (Kaneko et al., 2020). Par conséquent, plus de 260 auto-anticorps IgM ont été identifiés chez les patients avec COVID-19 aigüe (Wong et al., 2021). Une autre étude montre qu'environ la moitié des patients hospitalisés pour COVID-19 développent des autoanticorps (Chang et al., 2021). Finalement, une étude de cohorte ayant analysé des patients sévères en USI et des patients porteurs de COVID-19 légère/modérée a observé que plus que la moitié des patients dans chacun de ces deux groupes avaient développé des auto-anticorps (Richter et al., 2021). L'IgM anti-ACE2 peut être trouvé dans 27% des patients avec une COVID-19 sévère (Casciola-Rosen et al., 2022). Des anticorps anti-nucléaires comme dans le lupus peuvent aussi être observé chez ses patients (Knight et al., 2021). Finalement, un article de synthèse a proposé que la coagulopathie observée dans la COVID-19 puisse être similaire à celle retrouvée dans le syndrome anti-phospholipide, une condition engendrée par quelques auto-anticorps spécifiques aux phospholipides (Knight et al., 2021).

La dysbiose est aussi identifiée chez les patients avec COVID longue, avec un enrichissement de *Ruminococcus gnavus* et *Bacteroides vulgatus* et une diminution de l'abondance de *Faecalibacterium prausnitzii*, par exemple (Liu et al., 2022). Il est probable que cette dysbiose qui est décrite dans la physiopathologie de la COVID-19 aigüe, et est associée à la sévérité de la maladie puisse contribuer par sa persistance aux symptômes de sa forme longue (Liu et al., 2022). Les dysbioses dans la COVID longue augmentent la production de butyrate, dont le rôle protecteur dans les maladies auto-immunes, métaboliques ou cardiovasculaires est déjà décrit (Rosser et al., 2020). De manière intéressante, une réduction de la présence de *F. prausnitzii* accompagnée d'une déficience en butyrate est aussi retrouvée dans le contexte de SFC/EM (Guo et al., 2023). Une étude prospective a démontré que la fatigue et les symptômes neuropsychiatriques dans la COVID longue étaient corrélés à la présence de pathogènes intestinaux nosocomiaux, *Clostridium innocuum* et *Actinomyces naeslundii*, et inversement corrélé à la présence de bactéries productrices de butyrate (Q. Liu et al., 2022).

### 1.5.2 Symptômes neuropsychiatriques de la COVID longue

Les symptômes neuropsychiatriques sont un composant majeur de la COVID longue et incluent des symptômes sensorimoteurs, la perte de la mémoire, le déficit cognitif, la paresthésie, le malaise et troubles de l'équilibre, l'hypersensibilité à la lumière et aux bruits, la perte du goût ou de l'odorat, ou l'altération des fonctions autonomes (Lopez-Leon et al., 2021). L'étude des répercussions neuropsychiatriques de l'infection par le SARS-CoV2 a pu se faire à la lumière de celles développées par les patients ayant survécus aux épidémies de SARS-CoV1 et de MERS.

La méta-analyse des symptômes de la COVID longue effectuée par Lopez-Leon *et al.* a identifié plusieurs symptômes neuropsychiatriques, comme la céphalée (44%), le déficit d'attention (27%) et l'anosmie (21%) (Lopez-Leon et al., 2021). Les patients ayant développés une COVID longue peuvent présenter aussi des troubles du sommeil et un brouillard mental, comme décrit précédemment, et ont un risque augmenté de développer des problèmes psychiatriques, comme la dépression, l'anxiété et une démence. D'ailleurs, la perte de cheveux trouvée chez ces patients pourrait être liée au phénomène appelé l'*effluvium* télogène, défini comme une importante perte capillaire face à un événement stressant ou une infection (Lopez-Leon et al., 2021). Le risque de développer un Trouble du Stress Post-Traumatique (TSPT) est aussi augmenté (Steardo et al., 2022). De nombreux troubles psychiatriques ont émergés dans la population 20 mois après le premier épisode de COVID-19 ; 18,3% de la population a développé une dépression, 17,9% un TSPT, 16,2% de l'anxiété, et 13,5% des troubles de

sommeil(Zeng et al., 2022). Un épisode aigu de COVID-19 peut être aussi entrainer une complication des symptômes déjà existants. Une autre étude montre que 16% des patients ayant développé un COVID sévère sont aussi atteints de TSPT (Yuan et al., 2021).

La pathologie psychiatrique associée à la COVID longue semble commencer par une asthénie (un sentiment de fatigue intense et persistante), un sens d'apathie avec perte d'intérêt de relations interpersonnels et une décroissance du plaisir vers les activités qui plaisaient le patient avant (Ceban et al., 2022). La dépression associée à la COVID longue semble quant à elle avoir une forme atypique et se distinguer des formes « classiques » de dépression (Steardo et al., 2021). Celle-ci peut être en effet accompagnée de traits psychotiques, d'agitation psychomotrice, de détérioration neurocognitive et d'un changement du rythme veille-sommeil (Steardo et al., 2021). Dans le cadre de ces derniers, les patients montrent notamment des difficultés à initier un sommeil profond (Ceban et al., 2022). Il est à noter que même dans le cadre de la COVID-19 aigüe, 74,8% des patients ont rapportés des problèmes de sommeil (Jahrami et al., 2021).

La méta-analyse de Ceban et al., de 2022, montre qu'environ 22% des patients avec COVID-19 peuvent présenter du déficit cognitif même après 1 an de la phase aigüe. Cet effet est indépendant de l'anxiété et de la dépression qui ont aussi rapportées pendant la pandémie, et peut atteindre dans les mêmes proportions les personnes hospitalisées et non-hospitalisées (Ceban et al., 2022). Une étude réalisée sur 1,3 millions de personnes ayant contracté la COVID-19 montre que la prévalence de l'anxiété et de la dépression diminue au cours du temps, pour laisser place à d'autres symptômes tels que le brouillard mental, des convulsions, la démence, la psychose et d'autres conditions neurocognitives qui persistent pendant 2 ans ou plus (Taquet et al., 2022). L'activation de la voie de la kynurénine est aussi associée aux impacts de la COVID-19 sur la cognition, et est donc un point de convergence entre la dysbiose et ses impacts neuropsychiatriques (Cysique et al., 2022). La voie de la kynurénine est une voie de production de nicotinamide adenine dinucleotide (NAD+) à partir des métabolites du tryptophane. Il faut noter que le tryptophane est un aminoacide essentiel qui sert de base à la production de la sérotonine et, par conséquence de la mélatonine(Davis & Liu, 2015).

Une étude *post-mortem* a montré que chez les patients COVID-19 les voies de signalisations impliquées dans la formation de la Tau hyperphosphorylée étaient exacerbées (Reiken et al., 2022). Une étude de cohorte a montré que les marqueurs de neuroinflammation et rupture de la BHE étaient corrélés avec la perte de volume de masse grise dans l'amygdale,

le cortex entorhinal, les ganglions de la base, le gyrus cingulaire et les areas orbitofrontales chez les patients porteurs de Neuro-COVID (Etter et al., 2022). Notamment, 81% des aires incriminées étaient associées au traitement des informations gustatives et olfactives par le cortex (Etter et al., 2022). Une autre étude menée par la UK BioBank a montré que même les patients non-hospitalisés ont subi une altération du volume de la substance grise, surtout dans le cortex orbitofrontal et dans le gyrus parahippocampique (Douaud et al., 2022). Une réduction du lobule cognitif du cervelet crus II a été aussi observée et les auteurs ont trouvé une corrélation avec le déclin cognitif. La puissance de ce dernier travail réside dans le fait que chaque personne impliquée dans l'étude avait réalisé une IRM avant et après l'épisode de COVID19 et que seule une proportion d'entre eux avait été infectée par le SARS-CoV2 (Douaud et al., 2022).

### **1.5.3 Répercussions reproductives de la COVID longue**

Un impact sur le système reproducteur a aussi été rapporté chez les patients avec une COVID longue, même si les mécanismes ne sont pas encore bien connus. Une étude a par exemple montré qu'à Wuhan les femmes affectées par la COVID-19 avaient une diminution de la réserve ovarienne et présentaient des troubles de la reproduction (Ding et al., 2021). Une altération du cycle menstruel a aussi été décrite chez les femmes ayant développé une COVID longue (Medina-Perucha et al., 2022). De manière surprenante, pendant le cycle menstruel, la période des règles et la semaine précédant celles-ci sont associées au déclenchement cyclique de certains symptômes de COVID longue tels que la SFC/EM (Davis et al., 2021) (Davis et al., 2023).

ACE2 est aussi exprimé dans le système reproducteur masculin. ACE2 et TMPRSS2 sont fortement exprimés par les spermatogonies, les cellules de Leydig et de Sertoli dans les testicules, et aussi dans les autres organes reproducteurs comme la prostate, les vésicules séminales et les glandes bulbo-urétrales (Cardona Maya & Carvajal, 2020; Fan et al., 2021; Zupin et al., 2020). Chez l'homme par ailleurs la présence persistante du virus dans le tissu pénien serait la cause de l'augmentation du risque de dysfonction érectile chez les patients COVID-19 (Maleki & Tartibian, 2021). Ces problèmes sont probablement liés à l'action du virus sur l'endothélium pénien. De plus, une détérioration de qualité du sperme, avec le changement de plusieurs paramètres, comme le volume du sperme, le comptage et la concentration des spermatozoïdes, autant que leur motilité et leur morphologie a été montrée. Le liquide séminal de ces patients présente aussi des concentrations élevées de cytokines et la présence des caspases 3, 8 et 9 (Kresch et al., 2021).

## 1.6 Les modèles animaux pour l'étude du SARS-CoV2

L'étude de l'infection du SARS-CoV2 dépend tout d'abord de la capacité de ces animaux d'être infectés, ce qui est défini principalement par la similarité entre l'ACE2 humaine (dans cette session abrégée comme hACE2). Depuis les épidémies de SARS-CoV1 et MERS, un modèle d'infection avait été développé à partir de l'insertion de l'hACE2 dans le génome de la souris sous le promoteur du kératinocyte 18, générant le modèle nommé K18-hACE2 (McCray et al., 2007). Une autre option a été l'utilisation des primates non-humains et de hamsters syriens, dont l'ACE2 est similaire à l'ACE2 humaine et qui de ce fait sont naturellement infectés par le SARS-CoV2 (Lu et al., 2020; Sia et al., 2020). Cependant, ces modèles ont certaines limitations et ne permettent pas, par exemple, de récapituler l'ensemble des comorbidités retrouvés chez les patients COVID19 les plus sévères. Aucun de ces modèles ne permet encore d'étudier la transition entre les formes aiguës parfois asymptomatiques et les formes chroniques parfois sévères de la COVID19 (Fan et al., 2022). Le **tableau 1** à la fin de cette session résume chacun de ses modèles décrits ci-dessus.

- Les primates non-humains

Plusieurs espèces de primates non-humains ont été utilisées pour d'étudier les symptômes et la physiopathologie de la COVID-19. Cependant, la physiopathologie de la COVID-19 varie fortement en fonction des espèces. Celle dont le profil de la maladie est plus proche de la COVID humaine, les macaques rhésus présentent à l'histopathologie du poumon une décoloration, une consolidation, une infiltration, une hémorragie, de la cicatrice, une nécrose et une pneumonie interstitiel (Lu et al., 2020; Munster et al., 2021). Cliniquement, les macaques rhésus infectés présentent de la fièvre, une perte du poids et de l'appétit et de la dyspnée (Lu et al., 2020). Une thrombopénie et une lymphopénie peuvent être aussi trouvées aux analyses cliniques (Lu et al., 2020). Cependant, ils n'évoluent pas vers le SRAS, en ayant une rémission des symptômes cliniques vers 11 jours après l'infection (Blair et al., 2021; H. Zheng et al., 2020). Par ailleurs, il semble un potentiel modèle pour étudier la NeuroCOVID et les conséquences de la COVID longue chez les patients COVID-19 légère ou modérée, vu que ces animaux exhibent immunomarquage de la protéine N dans le cerveau après l'inoculation intranasal du SARS-CoV2 (Jiao et al., 2021). Cette invasion comprend l'hippocampe, l'area entorhinal et le cortex prépyriforme (Jiao et al., 2021). Un autre modèle est le macaque cynomolgus qui exhibe des symptômes similaires aux macaque rhésus, mais présentent aussi de la consolidation pulmonaire et les dommages alvéolaires diffus à l'autopsie des poumons

(Rockx et al., 2020). Comme le macaque rhésus, l'ARN viral est abondant dans le tractus respiratoire, mais les macaque cynomolgus montrent une clairance virale plus rapide que les premiers (Johnston et al., 2021). Par ailleurs, les macaques cynomolgus âgés exhibent plus de symptômes évidents, tandis que les jeunes peuvent être asymptomatiques (Rockx et al., 2020; Urano et al., 2021).

Le singe vert africain et le babouin ont aussi été utilisés comme modèles d'étude de la COVID-19 (Blair et al., 2021; Johnston et al., 2021; Woolsey et al., 2021). Les singes verts africains âgés apparaissent être un bon modèle mimant le SRAS (Blair et al., 2021). A l'infection par le SARS-CoV2, ils développent les mêmes symptômes que les macaques cynomolgus, avec en plus une augmentation du nombre des monocytes dans le sang et des taux sériques d'aspartate et d'alanine aminotransférases (Blair et al., 2021). Mais avec le temps, les singes verts développent une maladie sévère et de fortes lésions histopathologiques dans les poumons (Woolsey et al., 2021). Ils peuvent aussi présenter une décoloration pulmonaire, de l'opacité, de la bronchiolisation, de l'hyperémie et des adhésions pleurales (Woolsey et al., 2021). Finalement, chez le babouin la sévérité de l'infection et des lésions pulmonaires ainsi que les symptômes associés s'accroissent avec l'âge (Singh et al., 2021).

- Le hamster doré ou syrien

Depuis l'épidémie de SARS-CoV1, les hamsters dorés ou syriens se sont révélés être des hôtes possibles pour ce beta-coronavirus. Ils ont été proposés comme un modèle pour étudier les formes légères et modérées de COVID-19, même si ce modèle se heurte à plusieurs limitations techniques liées au manque d'outils disponibles pour cette espèce (anticorps, sondes Taqman, RNAscope, etc) (Fan et al., 2022). Les séquences de l'ACE2 humaine et de hamster sont similaires (Pach et al., 2021). Lors de l'infection par les SARS-CoVs, les hamsters syriens développent une maladie respiratoire, accompagnée d'une perte de poids, le principal indicateur de la gravité de l'infection (Sia et al., 2020). La réplication du virus dans les voies aériennes décline après 2 semaines et la perte de poids est rapidement compensée. Par contre, l'obésité peut prolonger la période d'endommagement pulmonaire et retarder la reprise de poids post-infection (Briand et al., 2022). Pendant cette période de la maladie, il est possible de détecter le virus dans l'épithélium bronchique, les cellules épithéliales alvéolaires de type I et de type II et les macrophages (Osterrieder et al., 2020). Quelques études montrent aussi une faible réplication virale dans le cerveau, le TGI et les testicules (Li et al., 2022; Osterrieder et al., 2020).

Malgré le fait d'être un modèle plus physiologique que les souris transgéniques, les hamsters infectés ne récapitulent pas les formes sévères de COVID-19 (Rosenke et al., 2020a). La propagation du virus engendre une inflammation, des lésions tissulaires et des anomalies pulmonaires, y compris la pneumonie interstitielle, l'infiltration de cellules inflammatoires, l'épaississement septal alvéolaire et les lésions distinctives du système vasculaire (Y. Q. Deng et al., 2022). Cependant, la réponse immunitaire pulmonaire innée pilotée par les macrophages s'installe rapidement, suivie de l'infiltration de lymphocytes T CD3+ et de monocytes dans la région péribronchique (Sia et al., 2020). L'efficacité de la réponse immunitaire innée du hamster suite à une infection par le SARS-CoV2 est la raison pour laquelle les symptômes y sont limités et la guérison rapide (Rosenke et al., 2020a), même dans le cas de l'invalidation génétique d'IL2 qui prolonge le temps de séjour du virus dans les poumons chez le hamster (Rosenke et al., 2020a), ou dans le cas du Syndrome Métabolique induit par diète (Briand et al., 2022). Lorsque la charge virale pulmonaire diminue, les changements histopathologiques provoqués par le SARS-CoV2 régressent et les lésions pulmonaires disparaissent quelques jours suivants l'infection (Sia et al., 2020).

Les hamsters présentent des altérations histopathologiques endothéliales comparables à l'endothéliose chez les patients infectés par le SARS-CoV2 (Osterrieder et al., 2020) et certaines altérations à long terme, y compris dans le système sensoriel olfactif, le système reproducteur et le système cardiovasculaire (Li et al., 2022; Rizvi et al., 2022; Zhang et al., 2021). De ce fait, les hamsters apparaissent être un bon modèle pour étudier la COVID longue suite à une phase aiguë de COVID-19 d'intensité faible ou modérée (Heydemann et al., 2023). Dans ce sens, une des altérations présentes dans la COVID longue, la dysbiose peut aussi être trouvée chez les hamsters infectés (Sencio et al., 2022). La femelle hamster infectée par le SARS-CoV2 présente aussi des pathologies cardiovasculaires à long terme, comme de la fibrose interstitielle myocardique et l'épaississement des parois ventriculaires. De plus, l'infection par le SARS-CoV-2 modifie les profils de lipides et de métabolites sériques dans cette espèce, comme chez les patients humains (Rizvi et al., 2022). Une autre étude a révélé que l'infection par le SARSCoV-2 causait une diminution aiguë du nombre de spermatozoïdes et de testostérone circulante chez le hamster mâle, ainsi qu'une réduction de la taille des testicules et des taux d'hormones sexuelles pendant les mois suivant l'infection (Li et al., 2022). La souche circulante Omicron s'est avérée causer des changements similaires, alors que la vaccination protégé les hamsters mâles des lésions testiculaires (Li et al., 2022) Finalement, la progression du SARS-CoV2 chez les hamsters syriens dépend de l'âge et les hamsters plus âgés présentent des signes

cliniques plus graves, et le renouvellement des cellules sènescentes pulmonaire améliore les séquelles pulmonaires et systémiques de l'infection (Delval et al., 2023; Osterrieder et al., 2020).

- Les modèles souris

Les souris sauvages ne peuvent pas être infectés par le SARS-CoV2, contrairement aux hamsters. En effet, l'ACE2 des souris et de rat n'ont pas assez de similitudes avec l'ACE2 humaine (Hu et al., 2021), même s'il a été montré que certaines souches virales de SARS-CoV2, tel que le variant B.1.1.7, étaient capable d'infecter les souris âgées (Chen et al., 2022).

Plusieurs modèles de souris humanisées ont été générées et notamment des souris transgéniques K18-hACE2 (Jiang et al., 2020; McCray et al., 2007; Yang et al., 2007; Zhou et al., 2021). Ces modèles expriment l'hACE2 de manière stable dans plusieurs organes. Cependant, les différences de profils d'expression de hACE2, les différentes souches de SARS-CoV2, ainsi que les diverses voies d'infection et doses virales, entraînent différentes manifestations cliniques et changements pathologiques (Zhou et al., 2021). La plupart de modèles murins ont été développé sur le fond génétique C57BL6; développer d'autres modèles sur d'autres fonds génétiques tel que le fond BALB/c pourraient être utile notamment pour évaluer les conséquences de l'infection SARS-CoV2 dans un contexte de réponse Th2 plus marqué (Fan et al., 2022).

Par chance, les souris K18-hACE2 avaient été créés pour les études sur SARS-CoV1 en 2007 (McCray et al., 2007), ce qui a permis de lancer les premières expériences mécanistiques dès le printemps 2020. Après une exposition intranasale au SARS-CoV2, ces animaux présentent une infection systémique, avec un virus détectable dans l'épithélium nasal, la trachée, les poumons, le cœur, la rate, le foie, les reins, l'estomac, le gros intestin, l'intestin grêle et le cerveau (Zheng et al., 2021). La perte de poids est le signe clinique le plus évident et le plus important chez la souris (Bao et al., 2020). Ce modèle, tout comme le modèle HFH4-hACE2, qui exprime hACE2 sous le contrôle du promoteur bronchiolaire HFH4, exhibent une détresse respiratoire, une biomécanique pulmonaire nettement anormale et de la dyspnée (Bao et al., 2020; Jiang et al., 2020). Le cerveau peut être également un organe cible de l'infection chez les souris K18-hACE2 et chez les HFH4-hACE2, suggérant une invasion du système nerveux secondaire à des infections respiratoires (Golden et al., 2020; Jiang et al., 2020). Ce profil d'infection par le SARS-CoV2 a été récapitulé par un modèle CAG-hACE2, avec un tropisme similaire pour les poumons et le cerveau (Asaka et al., 2021). Par ailleurs, le modèle HFH4-

hACE2 semble reproduire l'aspect sévère de la NeuroCOVID, étant donné que la réplication virale dans le cerveau est la condition pour une perte de poids de plus de 20% ou même le décès chez ce modèle (Jiang et al., 2020). Finalement, le modèle K18-hACE2 présente une exubérante dissémination du virus dans le cerveau, bien qu'elle ne soit que partiellement dépendante de l'expression de hACE2 dans le tissu nerveux de ce modèle murin (Carossino et al., 2022).

Ces trois modèles sont capables d'imiter la pneumonie associée à une infection grave par le SARS-COV2, avec des lésions alvéolaires diffuses, une pneumopathie interstitielle et des infiltrats inflammatoires ou lymphocytaires (Asaka et al., 2021; Bao et al., 2020; Golden et al., 2020; Yinda et al., 2021). Cependant, ils expriment de l'hACE2 d'une façon non-physiologique, ce qui a limitée la transposition des résultats qui y ont été obtenu à la clinique humaine (Muñoz-Fontela et al., 2020). De toute manière, ces animaux peuvent mimer la thrombose caractéristique des formes graves de la COVID19 (Zheng et al., 2021). De plus, ces modèles permettent la description des processus immunologiques de la COVID-19 qui reflètent des changements dans la réponse immunitaire des poumons. En particulier, plusieurs chimiokines (CCL2, CCL3, CCL4, CXCL1 et CXCL10) et cytokines inflammatoires (TNF $\alpha$  et IL-6) associées à la gravité de la maladie COVID-19 chez l'homme sont fortement induits dans ces modèles (Golden et al., 2020; Lee et al., 2023; Oladunni et al., 2020; Winkler et al., 2020). Enfin ces modèles ont pu être utilisés pour les études pré-cliniques de la mise au point des vaccins et médicaments pour lutter contre l'infection du SARS-CoV2 (Cáceres et al., 2021; Lee et al., 2023; M.-Q. Liu et al., 2022; Villadiego et al., 2023).

Depuis 2020, des modèles plus physiologiques de souris mutantes ont été générés, en utilisant notamment le promoteur endogène ACE2 de souris pour conduire l'expression d'hACE2 (Sun et al., 2020; Zhou et al., 2021). Ces modèles ne développent pas les symptômes sévères de la COVID-19. Par contre, ces souris montrent des lésions distinctes du système vasculaire et une progression pathologique liée à leur âge, comme chez l'humain (Sun et al., 2020). Par ailleurs, un modèle *knock-out* pour l'IFN- $\gamma$  a été développé sur le fond de KI-hACE2 et ces souris développent une pneumonie sévère après infection par le SARS-CoV2 (Sun et al., 2020). Un modèle de triple ou double *knock-in* sur le fond KI-hACE2 avec des corécepteurs importants aussi humanisés, tels que la Nrp1, la TMPRSS1 et Bsg pourraient être une alternative pour modéliser la transition entre les formes aiguës bénignes et les formes chroniques sévères (Fan et al., 2022).

Tableau 1 – Modèles animaux pour l'infection avec le SARS-CoV2

	Signes cliniques	Pathologie	Organes infectés	Cinétique de la maladie	Références
<b>Primates</b>					
<b>Macaque rhésus</b>	De la fièvre, de la perte de poids, l'asthénie, une baisse de plaquettes, neutropénie, lymphopénie.	De la décoloration pulmonaire, de la consolidation, des infiltrées inflammatoires, du verre dépoli, de la nécrose.	Les poumons, les ganglions lymphatiques paratrachéaux, le pharynx, la trachée le foie, la rate, le cerveau.	Les symptômes durent jusqu'à 11-14 jours après l'infection. Les prélèvements nasaux et rectaux sont positifs jusqu'à 27 jours après l'inoculation.	Jiao et al., 2021 Zheng et al., 2020 Singh et al., 2021 Munster et al., 2021
<b>Macaque cynomolgus</b>	De la fièvre, de la perte de poids, de l'élévation aiguë des transaminases et de l'écoulement nasal. Les macaques jeunes sont asymptomatiques.	De la lésion alvéolaire diffuse, de la décoloration pulmonaire, de la consolidation, des infiltrées inflammatoires, du verre dépoli, de la nécrose.	Les poumons, les ganglions lymphatiques paratrachéaux, le pharynx, la trachée le foie, la rate, l'intestin.	Les symptômes durent jusqu'à 14 jours après l'infection. Les prélèvements nasaux et rectaux sont positifs jusqu'à 19 jours après l'inoculation.	Rockx et al., 2020 Lu et al., 2020 Urano et al., 2021
<b>Macaque vert d'Afrique</b>	De la fièvre, de la perte de poids, l'asthénie, une baisse de plaquettes, neutropénie, lymphopénie, de l'élévation aiguë de transaminases.	De la consolidation et des infiltrations sévères dans les poumons, hyperémie et hémorragie, des adhérences pleurales et de la pneumonie interstitielle.	Tract respiratoire.	Les symptômes peuvent durer jusqu'à 18 jours après l'infection. Les prélèvements nasaux sont positifs jusqu'à 14 jours après l'inoculation, tandis que les rectaux, jusqu'à 21 jours.	Woolsey et al., 2021 Hartman et al., 2020 Blair et al., 2021
<b>Babouin</b>	Pneumonie diagnostiquée à la radiographie de thorax.	Des infiltrées inflammatoires et la formation de syncytia pulmonaires.	Pharynx, poumons	Des prélèvements nasaux et rectaux sont positifs jusqu'à 17 jours.	Singh et al., 2021

Hamster doré					
	De la perte de poids (varie conforme l'âge des hamsters), diminution des spermatozoïdes au comptage, diminution de la taille et du poids des testicules, diminution de la concentration des spermatozoïdes dans le sperme.	De l'inflammation pulmonaire avec une progressive consolidation. Dans les cornets nasaux, une infiltration modérée de cellules inflammatoires. De la perte de neurones olfactifs dans la muqueuse nasale. Des lésions pulmonaires sévères chez les âgés. Dans les testicules de quelques hamsters infectés, de l'œdème, de l'hémorragie, de l'infiltration de cellules inflammatoires avec nécrose des tubes séminifères.	Les cornets nasaux, les poumons, les reins, l'intestin, les testicules.	Reprise de poids 10 jours après l'infection. Rémission des signes pathologiques pulmonaires 25 jours après l'infection. Clearance virale pulmonaire entre 7-10 jours après l'infection.	Sia et al., 2020 Imai et al., 2020 Li et al., 2022 Heydemann et al. 2023
Souris					
<b>KI8-hACE2</b>	Des symptômes variés, comme de la perte de poids (plus que 25%), du fermement des yeux, de la respiration, de la piloérection, de l'altération de la biomécanique pulmonaire. Du décès. Survie de 0 à 50% en dépendant de la concentration de virus inoculé.	De la pneumonie progressive avec de l'inflammation périvasculaire et intra-alvéolaire, de l'œdème et de la consolidation pulmonaire. De la nécrose et hépatite dans le foie. Dans le cerveau, de l'inflammation progressive du tissu nerveux, des microthrombi, de l'astroglie, de la microglie. De l'immunomarquage du virus dans l'hippocampe, le cortex et l'hypothalamus.	Les poumons, le cœur, le cerveau, les reins, la rate, l'intestin.	Le décès occurrent entre 7 à 10 jours après l'infection. Pour les animaux survivants, la reprise de poids se fait à partir du 8 <sup>ème</sup> jour vers l'infection.	Oladunni et al., 2020 Winkler et al., 2020 Zheng et al., 2020 Golden et al., 2020 Vidal et al., 2022 Carossino et al, 2022
<b>KI-hACE2</b>	Une perte de poids légère. Pas d'autres symptômes particuliers.	De la pneumonie interstitielle.	Les cornets nasaux, les poumons, le cerveau et les bulbes olfactifs.	Réplication du virus dans tous les organes cibles jusqu'au 4 <sup>ème</sup> jour post-infection.	Zhou et al, 2021
<b>KI-hACE2 (Crispr/9)</b>	De la perte de poids chez les âgés. Pas des symptômes particuliers chez les souris jeunes.	De la pneumonie interstitielle, avec des infiltrées modérées de lymphocytes, macrophages et neutrophiles. De la nécrose sur la paroi bronchique et de la nécrose alvéolaire. De la dégénération fibrinoïde de vaisseaux pulmonaires.	La trachée, les poumons et le cerveau.	Chez les âgés, de la perte de poids jusqu'au 3 <sup>ème</sup> jour post-infection. Du virus dans les organes cibles détecté au 6 <sup>ème</sup> jour post-infection.	Sun et al., 2020 Yang et al, 2022
<b>HFH4-hACE2</b>	De la perte progressive de poids et décès. Vers 50% des animaux peuvent survivre à l'infection et être asymptomatique. Quelques animaux peuvent évoluer vers l'encéphalite et conséquent décès.	De la pneumonie interstitielle modérée avec des infiltrées inflammatoires (de lymphocytes et de monocytes), de l'œdème alvéolaire, des exsudates de fibrine, nécrose.	Les poumons, les yeux, le cerveau, le cœur.	Les souris qui décèdent perdent du poids à partir du 4 <sup>ème</sup> jour post-infection. Décès au 6 <sup>ème</sup> jour. Le virus est présent dans les poumons jusqu'à 7 jours après l'infection.	Jiang et al, 2020 Liu, 2022

## II- Mélatonine : physiologie et applications thérapeutiques

---

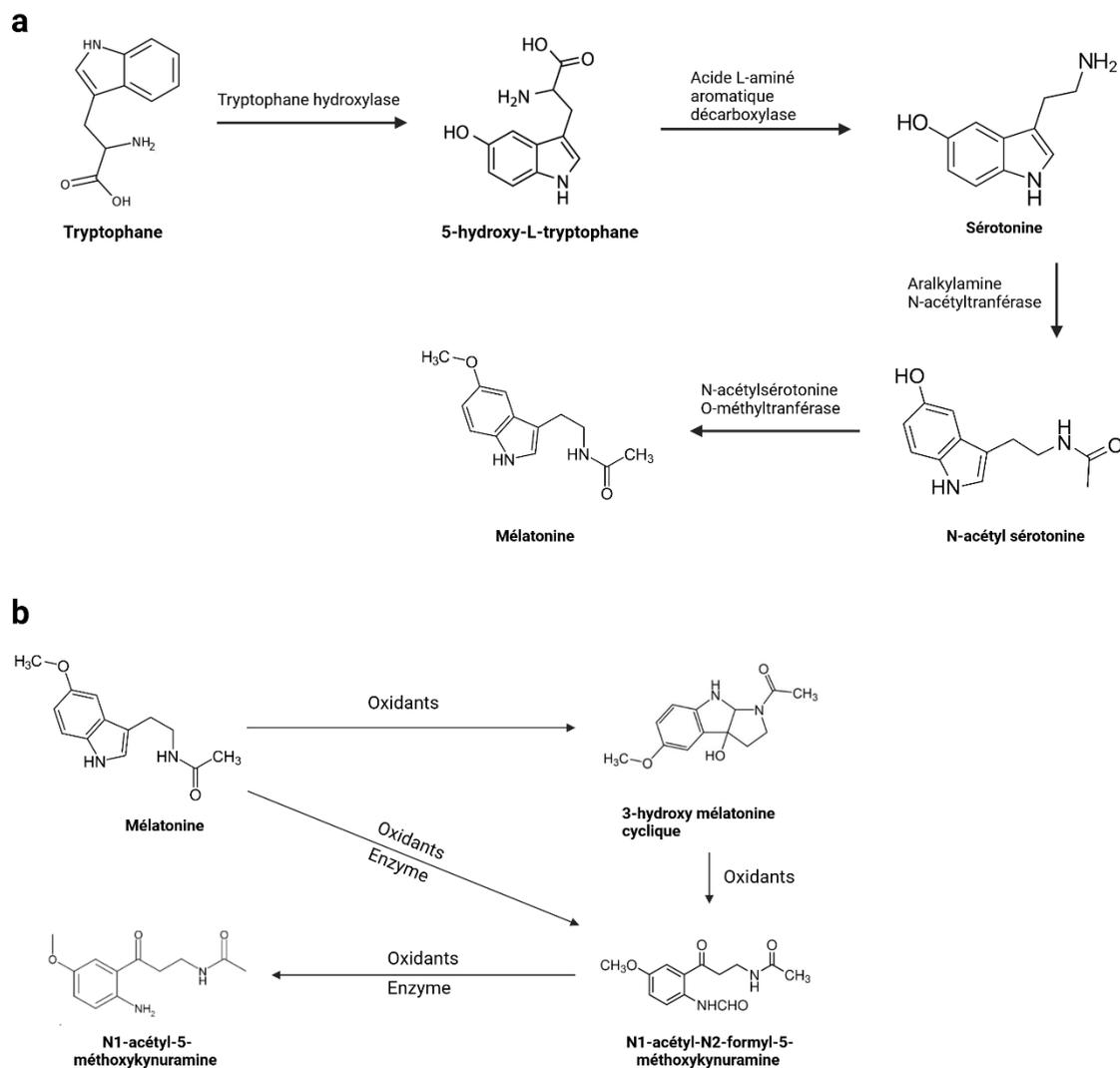
### 2.1 L'évolution de la mélatonine et ses propriétés antioxydantes

La mélatonine (nommée aussi N-acetyl-5-methoxytryptamine) est une des plus anciennes molécules synthétisées chez les organismes vivants, si l'on considère l'échelle évolutive (Zhao et al., 2019). Après avoir été découverte à partir d'extraits de glande pinéale de la vache (Lerner et al., 1960), elle a été retrouvée chez les bactéries, plantes et une variété d'animaux. Synthétisées déjà chez protéobactéries et les cyanobactéries, la diversité des organismes où la mélatonine est synthétisée a occasionné l'émergence de nombreuses voies, sites et mécanismes de régulation de sa synthèse (Zhao et al., 2019). Cependant, sa structure demeure la même, c'est-à-dire celle synthétisée chez les cyanobactéries d'il y a 3 milliards d'années (Manchester et al., 2015). De plus, de différentes fonctions sont apparues pour cette molécule : 1 - une la fonction cytoprotectrice pour les organismes unicellulaires, et 2- un rôle dans le contrôle de la chronobiologique des organismes pluricellulaires (Cardinali, 1981; Manchester et al., 2015).

Malgré le fait qu'elle soit majoritairement produite dans la glande pinéale chez les mammifères, d'autres cellules et notamment certains compartiments subcellulaires spécifiques seraient capables de produire aussi la mélatonine. En effet, les mitochondries et les chloroplastes sont des centres de production de mélatonine chez tous les organismes aérobies. Cette production est indépendante de la synthèse de la glande pinéale, qui est elle-même dépendante du cycle lumière-obscurité. Dans les organelles, la mélatonine contrôle la formation des espèces réactives de l'oxygène (ROS), qui sont produites durant la respiration cellulaire et la photosynthèse.

La mélatonine est synthétisée à partir de la sérotonine, qui est par ailleurs produite à partir du tryptophane. Le tryptophane est un acide aminé qui peut être synthétisée dans les plantes, mais que les mammifères doivent l'acquérir par l'alimentation. En étant une molécule liposoluble, la mélatonine peut avoir un effet protecteur contre les agressions de la part des radicaux libres ou des espèces réactives du nitrogène (RNS) à la fois dans les compartiments cellulaires lipidiques ou aqueux. Ainsi la mélatonine a un rôle protecteur pour les lipides, les protéines et l'ADN (Deng et al., 2016; Espino et al., 2010; Mollaoglu et al., 2007; Waseem et al., 2016). Pour son structure indole, il a été suggéré que la mélatonine aurait une capacité de *sacavenger* de ROS/RNS due à sa stabilité de résonance (Tan et al., 2002). De plus, les chaînes d'amide et de méthoxyle contribuent à l'activité antioxydante (Tan et al., 2002). Par ailleurs, la

mélatonine peut se lier à des métaux de transition, qui sont la source de la formation des radicaux  $\cdot\text{OH}$  et aussi stimuler la synthèse de la glutathionne, un autre antioxydant (Galano et al., 2015; Limson et al., 1998; Urata et al., 1999). Elle peut aussi augmenter l'expression et l'activité de la SIRT3, une desacetylase de classe III, qui par ailleurs désacétyle l'enzyme superoxyde dismutase 2 (SOD2) (Zhai et al., 2017). Ses métabolites, résultants de son oxydation, sont aussi des anti-oxydants qui par leurs propriétés de *scavenger* des ROS/RNS constituent ce qu'on appelle la cascade antioxydante de la mélatonine (Poeggeler et al., 1994).



**Figure 5. Voies de synthèse et de la cascade antioxydante de la mélatonine.** **a.** La mélatonine est synthétisée à partir du tryptophane dans quatre étapes enzymatiques, où la sérotonine est l'intermédiaire clé. **b.** La cascade de antioxydante de la mélatonine démontre qu'une simple molécule de mélatonine peut séquestrer (*scavenger*) plusieurs espèces réactives d'oxygène/nitrogène. (Adaptée de Manchester et al., 2015 et Zhao et al., 2019).

## 2.2 La régulation du cycle circadien par la mélatonine et ses récepteurs

En outre de la formation de la mélanine pour la pigmentation de la peau (Lerner et al., 1960), une des premières fonctions identifiées de la mélatonine était sa capacité à réguler la fertilité des mammifères qui ont une reproduction saisonnière (Hoffman & Reiter, 1965). La durée des niveaux nocturnes élevés de mélatonine change en fonction de la durée de la nuit elle-même, de sorte qu'elle peut moduler l'activité de l'axe gonadotrope et donc la fertilité des espèces tempérées et arctiques (Reiter, 1972). D'ailleurs, la mélatonine fournit un signal de la variation du cycle lumière-obscurité qui permet le maintien de homéostasiques de l'organisme en synchronisant l'horloge biologique centrale qui, chez les mammifères, est localisée dans le noyau suprachiasmatique de l'hypothalamus (Feng et al., 2021).

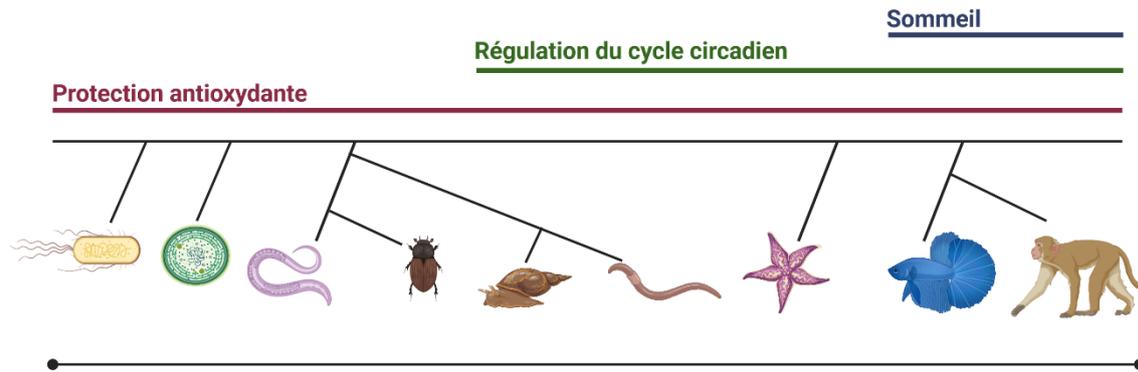
La glande pinéale est l'un des organes circumventriculaires du cerveau caractérisé par la présence de capillaires à endothélium fenêtrés, ce qui permet un accès facilité à la circulation sanguine et notamment de capter le tryptophane circulant et sécréter librement la mélatonine dans le sang. (Arendt & Aulinas, 2022; Jones et al., 2021). Innervée par des afférences post-ganglionnaires sympathiques du ganglion cervical supérieur, l'activité de la glande pinéale est régulée par les afférences adrénergiques. La norépinephrine augmente la concentration intracellulaire d'AMP cyclique dans les pinélocytes (Møller & Baeres, 2002). Cela active l'enzyme arylalkylamine N-acétyltransférase, qui modifie la sérotonine en N-acétylsérotinine, ce qui constitue une étape limitante à la synthèse de la mélatonine (Zimmermann et al., 1993). La deuxième étape limitante de la synthèse de mélatonine est par la suite la transformation de la N-acétylsérotinine par l'activation de l'hydroxy indole-O-méthyl transférase (Axelrod & Weissbach, 1960). Les neurones du ganglion cervical supérieur sont activés suite à l'inhibition des neurones du noyau paraventriculaire, qui reçoivent des afférences gabaergiques du noyau suprachiasmatique (NSC) (Jones et al., 2021; Møller & Baeres, 2002). Le NSC reçoit les informations des variations de la lumière à travers du tractus rétinohypothalamique (Hannibal, 2021) (**Figure 6b**).

La mélatonine produite est libérée dans la circulation et traverserait la BHE par diffusion passive, vu qu'elle est une molécule amphiphile (Feng et al., 2021; Yu et al., 2016). Une fois dans la circulation, elle peut véhiculer son action à travers de l'un de ses récepteurs (L. Liu et al., 2019). Au-delà de préparer le corps pour le sommeil chez les espèces diurnes et de réguler le cycle circadien, la mélatonine a des fonctions anti-inflammatoires, anti-fibrotiques, oncostatiques et contrôle le poids corporel (Cardinali & Hardeland, 2017; González-Fernández

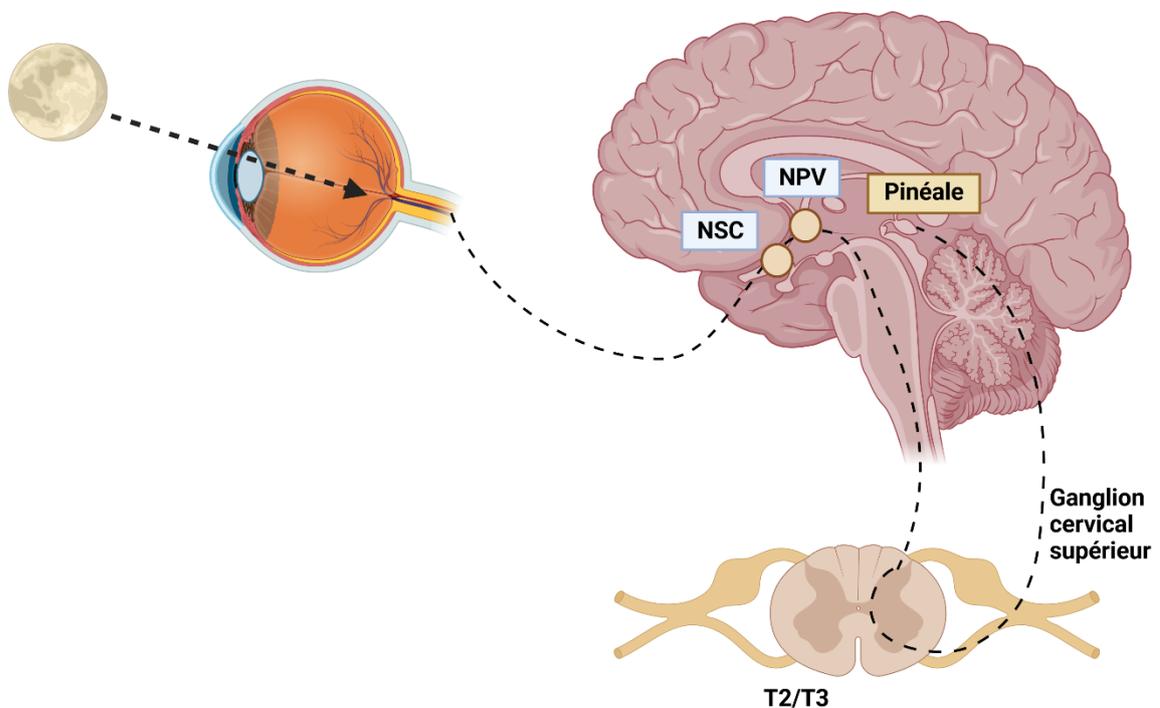
et al., 2017; Hill et al., 2015; W. Hu et al., 2016; Puchalski et al., 2003; P. Xu et al., 2017). Il y a plusieurs récepteurs, enzymes et transporteurs décrits avec la capacité de se lier à la mélatonine, mais les récepteurs mélatoninergiques les mieux caractérisés sont des récepteurs liés à la protéine G (GPCR) (Liu et al., 2019).

Il y a deux récepteurs GPCR à la mélatonine : le MT1 (Mtrn1a), le MT2 (Mtrn1b) et un récepteur apparenté, le GPR50 (Jockers et al., 2016) qui ne lie pas à la mélatonine chez les mammifères, il correspond à l'orthologue du récepteur Mel1c des non-mammifères (Dufourny et al., 2008). Ce récepteur a perdu la capacité de se lier à la mélatonine durant la divergence évolutive des thériens à partir des monotrèmes (Gautier et al., 2018). Les récepteurs MT1 et MT2 présentent des polymorphismes dont certains variants sont associés à des pathologies telles que le diabète (Bonfond et al., 2012; Bouatia-Naji et al., 2008a, 2008b; Chaste et al., 2011; Jockers et al., 2016; Lyssenko et al., 2008; Prokopenko et al., 2008). Les récepteurs MT1 et MT2 agissent comme des récepteurs couplés aux protéines hétérotrimériques Gi/Go et Gq/11, respectivement, et activent les voies de l'adénylyl cyclase, la phospholipase A2 et la phospholipase C (Jockers et al., 2016). Cette signalisation se produit en diminuant la synthèse de l'AMPc et du GMPc et/ou en augmentant la formation de diacylglycérol et d'IP3 (Jockers et al., 2016). Ces récepteurs et leur activation sont particulièrement impliqués dans le contrôle de l'activité noyau suprachiasmatique qui contrôle les rythmes circadiens (Gerdin et al., 2004; Weaver & Reppert, 1996). La mélatonine affecte la phase et l'amplitude de l'oscillation du cycle circadien (Gerdin et al., 2004). L'activation du récepteur MT1 supprime les décharges neuronales tandis que le MT2 déphase le cycle circadien (Hunt et al., 2001; C. Liu et al., 1997). La suppression de la décharge neuronale est un des mécanismes par lequel la mélatonine contribue à la synchronisation du sommeil chez les mammifères diurnes (Feng et al., 2021).

a



b



**Figure 6. Fonctions de la mélatonine.** a. La mélatonine est originalement une molécule dont la fonction est de protéger les cellules de la formation d'espèces réactives d'oxygènes. Au cours de l'évolution, la mélatonine a été sélectionnée pour d'autres fonctions comme le régulateur du rythme circadien et le déclenchement du sommeil. b. L'induction de la synthèse de mélatonine par le changement de la lumière-obscurité. Les informations sont transmises au noyau suprachiasmatique (NSC) par le tractus rétinohypothalamique et les afférences noradrénergiques partantes du ganglion cervical supérieur déclenchent la production de la mélatonine dans la glande pinéale et sa libération dans la circulation. (Adaptée de (Schippers & Nichols, 2014) et Feng et al., 2021).

### 2.3 Les propriétés thérapeutiques de la mélatonine et des drogues mélatoninergiques

La première application thérapeutique de la mélatonine était l'induction du sommeil (Hardeland et al., 2008). La mélatonine prise entre 2 à 4 heures avant la phase d'endormissement diminue le délai d'endormissement (Zhdanova et al., 1996). En plus, la mélatonine n'a pas d'effets secondaires et ne provoque pas des symptômes de sevrage, comme le font les benzodiazépines et le Zolpidem (Xie et al., 2017). Par contre, l'effet hypnotique de la mélatonine est léger et la demi-vie de cette molécule dans la circulation est courte (Hardeland et al., 2008). Pour cette raison, des agonistes des récepteurs mélatoninergiques ont été synthétisés, tel quel le ramelteon et l'agomelatine, qui ont une plus forte affinité pour MT1 et MT2 dans le NSC et une plus longue demi-vie) (Kato et al., 2005; Millan et al., 2003). Le ramelteon est indiqué pour le traitement d'insomnie et le décalage horaire, tandis que l'agomelatine est utilisée aussi pour le traitement de la dépression, du fait qu'elle a aussi un effet antagoniste sur l'activité du récepteur sérotoninergique 5-HT<sub>2C</sub> (récepteur de la sérotonine (5-hydroxytryptamine) 2C (Bourin et al., 2004; Kato et al., 2005; Millan et al., 2003; Zee et al., 2010).

Le ramelteon a aussi l'avantage d'avoir une affinité sélective pour les récepteurs MT1 et MT2, ce qui indique que son action hypnotique est issue de son effet sur le NSC (Kato et al., 2005). Le métabolisme hépatique du ramelteon donne origine à des métabolites différents de ceux formés par le métabolisme de la mélatonine (Hardeland et al., 2008). Les effets du ramelteon sur le sommeil sont multiples : il améliore la qualité du sommeil, augmente la durée du sommeil, réduit le délai d'endormissement (Kato et al., 2005; Richardson et al., 2008; Zee et al., 2010). Le ramelteon est aussi très indiqué pour traiter les problèmes de santé et dérégulation du cycle circadien chez les travailleurs de nuit et postés (Richardson et al., 2008). L'agomelatine est utilisé comme un antidépresseur qui améliore la qualité du sommeil chez les patients avec du désordre de dépression majeure (DDM) (Guaiana et al., 2013). Des patients en DDM rapportent aussi des problèmes de sommeil, et l'agomelatine pourrait être une option thérapeutique pour ces patients (Guaiana et al., 2013). Initialement proposée pour la dépression saisonnière, une méta-analyse Cochrane a conclu qui n'y a pas de différence entre un traitement par l'agomelatine et un traitement par l'agomelatine et un traitement par l'agomelatine et un traitement par l'agomelatine (Nussbaumer-Streit et al., 2019).

Quelques études cliniques ont essayé de démontrer que la mélatonine pourrait être une thérapie adjuvante dans le traitement de différents types de cancer, avec des résultats limités (Kostoglou-Athanassiou, 2013). En effet, *in vitro* la mélatonine inhibe la croissance des cellules cancéreuses du sein, des cellules cancéreuses du col de l'utérus et des cellules cancéreuses de

l'ovaire (Kostoglou-Athanassiou, 2013). En outre, une étude a montré que la fréquence de la cachexie, de la thrombocytopénie et de la lymphopénie était significativement plus faible chez les patients recevant de la mélatonine que chez ceux recevant uniquement un traitement de soutien (Lissoni et al., 1995).

Les propriétés anti-inflammatoires de la mélatonine ont fait remonter l'hypothèse de que la mélatonine pourrait être utile dans le traitement de maladies auto-immunes (Lin et al., 2013). Des études précliniques concernant l'arthrite rhumatoïde, le lupus érythémateux systémique et la diabète *mellitus* de type 1 ont obtenu des résultats prometteurs, mais les études cliniques eurent des résultats limités (Lin et al., 2013). De la même façon, l'usage de la mélatonine comme adjuvant aux thérapies de maladies neurodégénératives montre des effets positifs dans les études utilisant des modèles animaux ; cet effet est à confirmer par des études cliniques a grande échelle chez l'humain (Cardinali, 2019).

# Objectifs

La pandémie de COVID-19 a changé la chaîne de production de la science au cours de ces trois dernières années afin d'obtenir de nouvelles informations à propos de cette maladie dans les plus courts délais. En mai de cette année l'OMS a déclaré la fin de la pandémie, mais les séquelles de cette maladie persistent chez les patients dont la maladie a progressé et s'est transformé en COVID longue. Dès les premières descriptions de la maladie, l'observation de symptômes et manifestations neurologiques chez certains patients COVID-19 a inspiré l'hypothèse de l'invasion du SNC par le SARS-CoV2. Le fait de que quelques patients infectés par le SARS-CoV1 pouvaient aussi développer des manifestations neurologiques renforçait aussi l'hypothèse de la neuroinvasion, vu que les virus utilisent le même récepteur pour infecter les cellules, c.a.d. l'ACE2. En outre, les analyses histopathologiques des cerveaux de patients décédés de la COVID-19 ont observé le transcrit ou des protéines du SARS-CoV2. Au contraire de ce que soutenaient quelques commentaires critiques quant à ces premières descriptions, la démonstration que le SARS-CoV2 provoquait une atteinte de la BHE, avec des conséquences sur la symptomatologie de la COVID-19 aiguë et de sa forme chronique, suggèrent que les répercussions neuronales de la maladie sont les conséquences d'un effet direct du virus sur le cerveau. Les symptômes neuropsychiatriques de la COVID longue ont augmenté le besoin d'explorer les mécanismes des atteintes neuronales de la COVID-19. Finalement la COVID longue a aussi des impacts sur le système reproducteur mais ses mécanismes ne sont pas encore très bien connus, ouvrant donc une nouvelle voie de recherche à ce sujet dans la COVID-19.

Lors de ce travail de thèse, nous avons cherché à déterminer si les atteintes de la fonction de reproduction et cognitives de la COVID-19 et la COVID longue pouvaient avoir une origine neuroendocrine. Nous avons aussi nous intéressé au fait qu'une hormone tel que la mélatonine pourrait avoir des effets préventifs sur la Neuro-COVID. De ce fait, nous nous sommes intéressés à plusieurs points qui constituent les objectifs de cette thèse :

- **Etudier les effets du traitement par la mélatonine ou des drogues mélatoninergiques sur la progression de l'infection virale cérébrale des souris K18-hACE2 inoculées avec le SARS-CoV2 (Etude 1).**
- **Déterminer si le SARS-CoV2 peut accéder à l'hypothalamus et infecter et engendrer la mort des neurones à GnRH à partir des modèles murins et des échantillons *post-mortem* de patients COVID-19 (Etude 2 et 3).**

- **Évaluer si l'hypotestostéronémie des patients COVID-19 et COVID longue a une cause neuroendocrinienne à partir de l'étude de cohortes et l'analyse d'échantillons sanguins de patients infectés par le SARS-CoV2 hospitalisés en soins intensifs ou non (Etude 2) et de l'analyse du cerveau et des dosages hormonaux chez les hamsters infectés avec le virus (Etude 4).**
- **Étudier l'impact de l'infection sur l'expression de kisspeptine dans le noyau arqué comme mécanisme potentiel pour l'induction d'un hypogonadisme hypogonadotrope dans la COVID longue (Etude 4).**

# Matériel et méthodes

- **Animaux et infection avec le SARS-CoV2**

La lignée de souris exprimant l'hACE2 sous le contrôle du promoteur de la kératine 18 (K18 ou cytokératine) sur fond C57BL/6 (B6.Cg-Tg(K18-hACE2)2Prln/J) (McCray et al., 2007) a été achetée chez Jackson Laboratories. Les souris ont été logées dans des conditions exemptes d'agents pathogènes à 21-22 °C dans un cycle lumière/obscurité de 12 heures. L'accès à la nourriture et à l'eau a été assuré ad libitum tout au long de l'expérience. La souche BetaCoV/France/IDF0372/2020 du SARS-CoV-2 a été fournie par le Centre National de référence des virus respiratoires hébergé par l'Institut Pasteur (Paris, France). Infection virale des expériences ont été menées dans une installation de biosécurité de niveau 3 (BSL3) de l'Institut National Vétérinaire École de Maisons-Alfort, selon un protocole approuvé par le Comité d'éthique de l'ANSES/EnvA/UPEC (CE2A-16) et agréé par le Ministère de la Recherche sous le numéro APAFIS#25384-2020041515287655v6 conformément à la réglementation française et européenne. Mâle de 8 à 10 semaines de souris transgéniques ont été anesthésiées par injection intraveineuse de kétamine (100 mg par kg de poids corporel) et de xylazine (10 mg par kg de poids corporel) et infectées par voie intranasale avec 50 µl de DMEM contenant  $5 \times 10^3$  TCID50 de SARS-CoV2. Pour la préparation du cerveau, les animaux ont été euthanasiés par injection i.p. de pentobarbital (140 mg/kg de poids corporel) 7 jours après l'infection. Des cerveaux ont été prélevés et fixés par immersion dans 4 % de PFA dans le PBS à 4 °C pendant 48h avant de sortir du L3, pour les cerveaux infectés afin d'éliminer les particules virales infectieuses, et sur la nuit pour les cerveaux non infectés, et transférés dans une solution de saccharose à 30 % le lendemain. Le lendemain, les cerveaux ont été congelés et entreposés à -80 °C.

Les souris *Gnrh::gfp* sont une donation de D. J. Spergel (University of Chicago, Chicago, IL) (Spergel et al., 1999). Les études avec eux ont été réalisées avec l'accord des Comités d'éthique institutionnels et de la Commission française d'éthique Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (APAFIS#2617-2015110517317420 v5).

Les hamsters syriens dorés (*Mesocricetus auratus*) mâles âgés de 8 à 10 semaines ont été achetés au laboratoire Janvier (Le Genest-St-Isle, France). Les hamsters ont été logées dans des

conditions exemptes d'agents pathogènes à 21-22 °C dans un cycle lumière/obscurité de 12 heures. Les hamsters ont été anesthésiés par injection i.p. de kétamine (100 mg par kg de poids corporel), d'atropine (0,75 mg par kg de poids corporel) et de diazépam (2,5 mg par kg de poids corporel) et infectés par voie intranasale avec 100 µl de DMEM contenant (ou non, dans les échantillons factices)  $2 \times 10^4$  DICT50 (dose infectieuse de culture tissulaire de 50 %) de SARS-CoV-2.

- **Marquage par immunofluorescence et analyse de l'immunomarquage de kisspeptine**

Pour l'immunohistochimie des coupes de cerveau de souris, des sections flottantes de 40 µm d'épaisseur ont été rincées 4 fois dans 0,1 M de PBS pH 7,4 et bloquées pendant 30 min à température ambiante dans une solution de blocage (PBS contenant 0,1 % de BSA, 10 % de sérum d'âne normal et 0,4 % de Triton X-100). Les coupes ont été incubées pendant une nuit à 4 °C avec un mélange d'anticorps primaires dilués dans une solution bloquante (voir le tableau 2 des anticorps). Les coupes ont été lavées trois fois dans du PBS et incubées à température ambiante pendant 2 h avec des anticorps secondaires conjugués au fluor Alexa (dilutions de 1 :500 dans une solution de blocage). Après trois lavages au PBS, les noyaux ont été contre-colorés en incubant les coupes pendant 3 min dans du DAPI (dilution 1 :5 000 dans du PBS) avant d'être montés et recouverts avec du Mowiol maison. Les anticorps utilisés dans ce travail sont cités dans le tableau ci-dessous. Pour les images en confocal, un microscope Axio Observer (LSM 710, Zeiss, Oberkochen, Allemagne) avec un EC Plan NeoFluar et des objectives 10×/0.3 NA, 20×/0.5 NA, et 40×/1.3 NA (Zeiss) ont été utilisés (Bâtiment d'Imagerie IFR114 de l'Université de Lille, France). Le logiciel Photoshop CS5 (Adobe Systems, San Jose, CA) a été utilisé pour monter les figures.

Les marquages immuno fluorescents pour la kisspeptine dans l'hypothalamus médiobasal ont été prises avec une objective Zeiss 20× (N.A. 0.8) et visualisés à l'aide du microscope à fluorescence Axio Imager Z2 (Zeiss). L'ensemble des photos ont été acquises en utilisant les mêmes paramètres. Les images ont été vectorisées et le seuil ajusté à l'aide du logiciel ImageJ (*National Institutes of Health, Bethesda, MD*). Le logiciel a été utilisé pour marquer les zones d'intérêts correspondants à l'éminence médiane et au noyau arqué afin de compter l'aire relative occupée par le signal positif à la kisspeptine.

**Tableau 1 – Anticorps pour l'immunomarquage**

Anticorps	Fournisseur	Référence	Dilution
Guinea-pig anti GnRH	Cadeau Erik Hrabovsky		1/ 6000
Rabbit anti-SARS-CoV2 spike protein	Sino Biological	40150-T62-Cov2	1/200
Mouse anti-SARS-CoV2 nucleocapside protein	Sino Biological	40,143-MM05	1/200
Rabbit anti-kisspeptine	Cadeau Alain Caraty		1/5000

- **Tri des neurones GnRH::GFP**

Le tri par FACS des neurones *Gnrh::gfp* a été réalisé comme indiqué ailleurs (Messina et al., 2016). Brièvement, la région préoptique a été microdisséquée et dissociée à l'aide d'un système de dissociation de la papaine (Worthington) pour obtenir une suspension unicellulaire. Le FACS a été réalisé à l'aide d'un cytomètre trieur de cellules ARIA SORP et du logiciel FACSDiva 8.0 (BD Bioscience). Les données ont été analysées à l'aide du logiciel Kaluza 2.0 (Beckman Coulter). La décision de tri a été basée sur des mesures de fluorescence EGFP (excitation : 488 nm, 50 mW ; détection : passe-bande GFP 530/30 nm, bande passante d'autofluorescence 695/40 nm) en comparant les suspensions cellulaires de la région préoptique et du cortex cérébral d'animaux *Gnrh::gfp*.

- **Extraction d'ARN et analyses quantitatives RT-PCR**

L'ARN total des échantillons des cerveaux humains a été extrait de deux coupes d'hypothalamus de 18 µm d'épaisseur obtenus à partir de cerveaux fixés pendant 1 semaine à température ambiante dans la formaline 10%, cryoprotégés, congelés et coupés au cryostat, à l'aide du système ReliaPrep FFPE Total RNA Miniprep System (cat : Z1002, Promega). Pour les échantillons de cerveau de souris, les régions d'intérêt ont été disséquées et l'ARN extrait comme détaillé ci-dessus. Pour les échantillons de hamster, les régions ont été microdisséquées sur lames de 20 µm d'épaisseur : bulbe olfactif (BO), area pré-optique (POA), et hypothalamus

medio-basal (MBH). Le cortex a été isolé sur les coupes contenant la POA et le MBH et l'hippocampes sur les coupes passant par le MBH. Les échantillons d'ARN ont été immédiatement quantifiés à l'aide d'un appareil Nanodrop et stockés à -80°C jusqu'à l'étape de transcription inverse. Pour les analyses de l'expression des gènes, les échantillons d'ARN total ont été transcrits à l'aide du kit de transcription inverse d'ADNc à haute capacité (réf. 4368814 d'Applied Biosystems). Pour les échantillons de cerveau humain fixés, une étape de préamplification linéaire a été réalisée à l'aide du protocole TaqMan PreAmp Master Mix Kit (réf. 4488593 d'Applied Biosystems). Pour les échantillons humains et de souris, la PCR en temps réel a ensuite été réalisée à l'aide de TaqMan Universal Master Mix II (réf Applied Biosystems 4440049) et pour les échantillons de hamster, la PCR en temps réel a été réalisée à l'aide du protocole de SYBR Green du kit GoTaq qPCR and RT qPCR Systems (réf A6001 de Promega). La qPCR a été réalisée sur le système de PCR rapide en temps réel 7900HT d'Applied Biosystems. Les sondes TaqMan utilisées dans cette étude sont énumérées ci-dessous:

**Tableau 2 – Probes TaqMan**

Code	Gène	Nom de la protéine ou du gène
Mm01159006_m1	<i>Ace2</i>	Enzyme de conversion de l'angiotensine (peptidyl-dipeptidase A) 2 de la souris
Hs01085333_m1	<i>ACE2</i>	Enzyme de conversion de l'angiotensine humaine
Mm04207460_m1	<i>Cxcl1</i>	Ligand de chimiokine (C-X-C motif) 1
Mm00436450_m1	<i>Cxcl2</i>	Ligand de chimiokine (C-X-C motif) 2
Mm01263580_m1	<i>Elavl4</i>	Protéine ELAV-like 4 (Hu-antigen D, HuD)
Mm00434228_m1	<i>Il1b</i>	Interleukine -1 beta
Mm00446190_m1	<i>Il6</i>	Interleukine 6
Mm01197662_m1	<i>Ms4a8a</i>	Membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 8A
Mm00476361_m1	<i>Nfkb1</i>	Sous-unité p105 du facteur nucléaire kappa-B
Mm01253208_m1	<i>Nrp1</i>	Neuropiline-1
Mm01242576_m1	<i>Pecam1</i>	Molécule d'adhésion de la cellule endothéliale et de la plaquette
Mm00501346_m1	<i>Rela</i>	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene u homolog A (avian)
Mm03928990_g1	<i>Rn18s</i>	ARN ribosomique 18S
Mm00443687_m1	<i>Tmprss2</i>	Protéase transmembranaire, serine 2
Mm00443258_m1	<i>Tnf</i>	Facteur de nécrose tumoral, TNF-alpha
Mm01278455_m1	<i>Trem1</i>	triggering receptor expressed on myeloid cells 1

L'ARN ribosomique 18S a été utilisé comme transcription d'entretien pour la normalisation.

Les amorces utilisées pour la PCR en temps réel chez le hamster sont :

**Tableau 3 – Pairs de primers pour RT-PCR en SybrGreen**

Gène	Sens	Antisens
<i>Actg1</i>	ACAGAGAGAAGATGACGCAGATAATG	GCCTGA ATGGCCACGTACA
<i>Ar</i>	GACCTTATGGGGACATGCGT	TACTTCTGCTTCCCTTCAGCG
<i>Ers1</i>	AGAGAGTGCCAGGCTTTGG	AGCGCCAGATGAGACCAATC
<i>Fpr2</i>	CCTGGGGTGACACTCAAGAA	TGGGTTGAGGCAACTGTTGAA
<i>Fshr</i>	ACGCCATTGAACTGAGGTTTG	GAAGGCCTCGGGATTGATGT
<i>Gnrh</i>	AGGGACCTTCGAGGAGTTCT	TGCCAAGAAGCCAATGTGGT
<i>Gnrhr</i>	TCATCTTCACCCTCACACG	GTGGCAAATGCGACTGTCAT
<i>Kiss1</i>	TGGTTATCTTTGACCTCCGGC	TGCCAAGAAGCCAATGTGGT
<i>Kiss1r</i>	ACTACATCCAGCAGGTCTCGG	ACCCAGATGCTAAGGCTGAC
<i>Lhr</i>	GGAATTTGCCCAAGAAAGAACAGA	TCCTCAAAAATAGCCGAATAAAGC
<i>Pr</i>	ATGGTCCTTGGAGGTCGGAAG	TGATGAGCGGAGGGATAAGC

L'ARN de la  $\gamma$ -actine a été utilisé comme transcription d'entretien pour la normalisation chez les hamsters.

L'expression de la protéine N du SARS-CoV-2 a été évaluée à l'aide du panel de diagnostic RT-PCR en temps réel du CDC 2019-Novel Coronavirus, tel que décrit ailleurs (Rhoads et al., 2020; Sekulic et al., 2020). Toutes les données sur l'expression des gènes ont été analysées à l'aide de la méthode  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

- **Marquage du RNAscope**

L'expression de la protéine S du SARS-CoV2 dans les cerveaux humains *post mortem* et dans le bulbe olfactif de la souris K18-hACE2 a été évaluée à l'aide d'un test de réactif fluorescent multiplex RNAscope® v2 et de la sonde V-nCov2019-S, référence : 848561 (tous deux d'Advanced Cell Diagnostics Inc.). Brièvement, des coupes hypothalamiques de 20  $\mu$ m d'épaisseur ont été coupées au cryostat, puis recueillies sur une lame en verre. Les lames ont

ensuite été rincées deux fois pendant 10 min en Gibco® DPBS (ThermoFisher) et cuites à sec dans un four HybEZ™ II (Advanced Cell Diagnostics Inc.) à 60°C pendant 30 min. Ils ont ensuite été fixés par immersion dans du paraformaldéhyde à 4 % PBS 0,1M, pH 7,4, préparés dans de l'eau traitée au DEPC, pendant 1 h à 4 °C et lavés à nouveau deux fois pendant 10 min dans du Gibco® DPBS. Ensuite, les coupes ont été traitées selon les instructions du fabricant (déshydratation à l'éthanol, traitement au peroxyde d'hydrogène RNAscope et récupération de cibles), incubées avec la protéase RNAscope IV pendant 10 min à température ambiante, et le signal a été révélé à l'aide du test fluorescent multiplex RNAscope.

- **Dosages hormonaux par ELISA**

Les dosages de la testostérone et de la progestérone ont été réalisés à l'aide des kits commerciaux d'ELISA Demeditec réfés : DEV9911 et DEV9988, respectivement (Demeditec Diagnostics GmbH, Kiel, Allemagne), en suivant les instructions des fournisseurs. Les dosages de la LH ont été réalisés en dupliquât comme il a été décrit par d'autres (Steyn et al., 2013). Le fond des puits d'une microplaque d'haute affinité de liaison (9018 ; Corning) ont été recouverts avec 50 µL de l'anticorps de capture (anticorps monoclonal, sous-unité bêta de la LH bovine, 518B7 ; Université de Californie) à une dilution finale de 1 :1 000 (dans une solution de NaHCO<sub>3</sub>/NaH<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH = 9,6) et incubé pendant une nuit à 4 °C. Ensuite, les puits ont été incubés avec 200 µl du tampon de blocage [du lait écrémé en poudre à 5 % (p/v) dans PBS-T 1x (PBS 1x avec 0,05 % de Tween 20)] pendant 2 h en température ambiante (RT). Une courbe standard a été générée à l'aide d'une dilution sériée en duplicate de la mLH (la préparation de référence, AFP-5306A ; Institut national du diabète et des maladies digestives et rénales – Programme national d'hormones et d'hypophyse [NIDDK-NHPP]) dans 1 % (p/v) de BSA en PBS-T 1x. Les points de la courbe étalon et les 25 µl de sérum en dupliquât de chaque animal ont été incubés pendant 1,5 h. Après 3 lavages avec du PBS-T 1x, les puits ont été incubés avec 50 µl d'anticorps de détection (anticorps polyclonal, antisérum LH de lapin, AFP240580Rb ; NIDDK-NHPP) à une dilution finale de 1 :10 000 pendant 1,5 h (à RT). Chaque puits contenant un substrat lié a été incubé avec 50 µl d'anticorps conjugués à la peroxydase (anti-lapin polyclonal de chèvre, PI-1000 Vector Laboratories) à une dilution finale de 1 :2 000. Après une incubation d'une heure et demie, 100 µl d'o-phénylènediamine (002003 ; Invitrogen), un substrat contenant 0,1 % de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a été ajouté à chaque puits et laissé à RT pendant 10 à 30 min (estimé en fonction de l'intensité de la réaction). La réaction a été arrêtée en rajoutant 50 µl de HCl 3 M, et l'absorbance de chaque puit a été lue à une longueur d'onde de 490 nm (Multiskan Ascent Thermo LabSystems, Ascent Software).

- **Statistiques**

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Prism 7 (GraphPad Software). Pour les expériences quantitatives de RT-PCR (n = 5 patients témoins contre 4 patients infectés par le SARS-CoV-2 ; n = 3 souris infectées fictives par rapport à 5 souris infectées par le SRAS-CoV), un test t bilatéral non apparié a été utilisé pour comparer les niveaux d'expression entre les cerveaux infectés et témoins. Le test de comparaison multiple de Friedman suivi d'un post-test de Dunn non corrigé a été utilisé pour comparer les niveaux d'expression génique entre le cortex, le bulbe olfactif et l'hypothalamus de souris infectées. Quant aux données obtenues dans la quatrième étude, le test *t* de Student non-apparié a été utilisé dans le cas où la distribution des données suivait la loi normale, alors que le test de Mann-Whitney a été utilisé pour les distributions non-normales.

# Résultats

## **Etude 1 - La mélatonine et les drogues mélatoninergiques inhibent l'entrée du SARS-CoV2 dans le cerveau et la formation de vaisseaux fantômes induite par le virus (Article 1)**

---

Comme il a été discuté dans la session 1.4 de l'introduction, les symptômes neurologiques observés chez des personnes atteintes de COVID-19 est à l'issue d'une neuroinvasion par le SARS-CoV2. Bon nombre de ces symptômes persistent longtemps après la fin de la maladie aiguë, un phénomène décrit comme la COVID longue. Plusieurs mécanismes possibles expliquant les symptômes neurologiques et le potentiel neuro-invasif du SARS-CoV2 ont été discutés (Iadecola et al., 2020) . Par exemple, les mécanismes sous-jacents aux symptômes neurologiques pourraient être le résultat d'une neuroinflammation, qui peut être induite par le transport de cytokines à travers la barrière hémato-encéphalique (BHE) pendant la tempête de cytokines, ou déclenchée par l'entrée de la protéine S1 elle-même qui peut traverser directement la BHE (DeOre et al., 2021; Etter et al., 2022; Rhea et al., 2021).

Beaucoup d'attention a été accordée à l'identification de traitements potentiels pour l'infection pulmonaire et au contrôle de la tempête de cytokines, mais très peu d'efforts ont été faits jusqu'à présent pour traiter ou prévenir les symptômes de la COVID longue. Depuis le début de la pandémie en 2020, la mélatonine a été proposée comme potentiel médicament adjuvant au traitement et à la prévention de la COVID sévère (Shneider et al., 2020). Actuellement, il y a des médicaments mélatoninergiques commercialisés (rameltéon, agomélatine, tasimeltéon et mélatonine à libération lente) pour la dépression, l'insomnie et le *jet lag*. Des études *in silico* ont suggéré que la mélatonine pouvait avoir des actions anti-COVID. La mélatonine pourrait donc être une molécule utile pour la prévention ou la prise en charge de la COVID-19 (Artigas et al., 2020; Zhou et al., 2020). Par ailleurs, la mélatonine est déjà proposée comme thérapie adjuvante pour le delirium aux patients hospitalisés dans les USIs, principalement ceux hospitalisés pour COVID-19 (Marra et al., 2019; Richards et al., 2021; Woolley, 2021). Des essais cliniques sont en cours pour la mélatonine à la fois pour les personnes en USI et les patients COVID19 développant des formes non sévères (Ameri et al., 2021; Brusco et al., 2021; Rodríguez-Rubio et al., 2020). Une étude clinique finalisée a conclu que la mélatonine avait des effets positifs significatifs sur la saturation d'oxygène des patients

COVID-19, au-delà d'améliorer la qualité du sommeil chez ses patients (Mousavi et al., 2022). Finalement, la mélatonine est aussi proposée comme potentiel thérapie pour la EM/SFC et pour les troubles du sommeil concurrents dans le contexte de la COVID longue (Cardinali et al., 2022).

La mélatonine est une hormone naturelle produite par la glande pinéale pendant la nuit avec un large éventail d'effets sur le système nerveux central (SNC), y compris la régulation de l'activité du noyau suprachiasmatique, le centre de l'horloge biologique et des noyaux impliqués dans le contrôle du sommeil. La mélatonine agit par l'intermédiaire d'une variété de récepteurs dont les récepteurs MT1 et MT2, couplés aux protéines G, sont les mieux décrits (Jockers et al., 2016; Liu et al., 2019). D'autre part, la mélatonine aurait des actions neuroprotectrices, anti-inflammatoires et anti-oxydantes (Cardinali, 2019). Comme nous l'avons mentionné dans l'introduction, la mélatonine comme propriété d'éliminer des espèces réactives de l'oxygène et réduit la formation de peroxy-nitrite pendant les premières étapes de la cascade de l'ischémie (Blanco et al., 2017).

Dans le contexte de la COVID-19, Cecon et al., en 2020, ont montré que le traitement avec la mélatonine retardait l'émergence des symptômes respiratoires sévères chez les souris K18-hACE2 infectée par le SARS-CoV2. Un traitement par la mélatonine augmente la survie des animaux et diminue la production de IFN de type I et III dans les poumons (Cecon et al., 2022).

Notre première étude a eu pour but de déterminer si le traitement par la mélatonine ou des composés mélatoninergiques avait un effet sur la capacité du SARS-CoV2 à infecter le cerveau. Ici, nous montrons que l'administration quotidienne de mélatonine et de molécules mélatoninergiques diminue considérablement la neuro-invasion par le SARS-CoV2 chez la souris K18-hACE2. Pour cet article, mes contributions ont été les PCRs et les immunomarquages pour les virus sur les tranches de cerveau, comme décrit dans les méthodologies. Ces composés ont pour effet de diminuer la charge virale dans le cerveau, et l'atteinte par le virus des cellules endothéliales cérébrales. En conséquence, les animaux traités ont développé moins de vaisseaux fantômes qui apparaissent suite à la nécroptose des cellules endothéliales suite à l'expression de la protéine virale Mpro et la dégradation par clivage de la protéine NEMO dont l'activité est indispensable à la survie de ce type cellulaire (Wenzel et al., 2021), et permette ainsi le maintien d'une meilleure vascularisation du cerveau et diminue probablement le nombre d'événements ischémiques. Cela s'accompagne d'une réduction concomitante des marqueurs neuro-inflammatoires et des marqueurs d'infiltration des cellules

immunitaires dans le cerveau. En plus de véhiculer ses effets bénéfiques, au moins en partie, via une action sur ses récepteurs, la mélatonine pourrait avoir un effet protecteur contre l'infection par le SARS-CoV2 en se liant à ACE2 et entrer en compétition avec la protéine S virale pour sa liaison sur son récepteur.



# Melatonin drugs inhibit SARS-CoV-2 entry into the brain and virus-induced damage of cerebral small vessels

Erika Cecon<sup>1</sup> · Daniela Fernandois<sup>2</sup> · Nicolas Renault<sup>3</sup> · Caio Fernando Ferreira Coelho<sup>2</sup> · Jan Wenzel<sup>4,5</sup> · Corentin Bedart<sup>3,6</sup> · Charlotte Izabelle<sup>1</sup> · Sarah Gallet<sup>2</sup> · Sophie Le Poder<sup>7</sup> · Bernard Klonjowski<sup>7</sup> · Markus Schwaninger<sup>4,5</sup> · Vincent Prevot<sup>2</sup> · Julie Dam<sup>1</sup> · Ralf Jockers<sup>1</sup>

Received: 31 March 2022 / Revised: 11 May 2022 / Accepted: 20 May 2022 / Published online: 13 June 2022  
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature Switzerland AG 2022

## Abstract

COVID-19 is a complex disease with short- and long-term respiratory, inflammatory and neurological symptoms that are triggered by the infection with SARS-CoV-2. Invasion of the brain by SARS-CoV-2 has been observed in humans and is postulated to be involved in post-COVID state. Brain infection is particularly pronounced in the K18-*hACE2* mouse model of COVID-19. Prevention of brain infection in the acute phase of the disease might thus be of therapeutic relevance to prevent long-lasting symptoms of COVID-19. We previously showed that melatonin or two prescribed structural analogs, agomelatine and ramelteon delay the onset of severe clinical symptoms and improve survival of SARS-CoV-2-infected K18-*hACE2* mice. Here, we show that treatment of K18-*hACE2* mice with melatonin and two melatonin-derived marketed drugs, agomelatine and ramelteon, prevents SARS-CoV-2 entry in the brain, thereby reducing virus-induced damage of small cerebral vessels, immune cell infiltration and brain inflammation. Molecular modeling analyses complemented by experimental studies in cells showed that SARS-CoV-2 entry in endothelial cells is prevented by melatonin binding to an allosteric-binding site on human angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2), thus interfering with ACE2 function as an entry receptor for SARS-CoV-2. Our findings open new perspectives for the repurposing of melatonergic drugs and its clinically used analogs in the prevention of brain infection by SARS-CoV-2 and COVID-19-related long-term neurological symptoms.

**Keywords** SARS-CoV-2 · COVID-19 · Melatonin · Drug repurposing · Brain infection · Neuro-vasculature

Erika Cecon, Daniela Fernandois, Nicolas Renault, Caio Fernando Ferreira Coelho, Jan Wenzel have contributed equally to this work.

Markus Schwaninger, Vincent Prevot, Julie Dam, Ralf Jockers are co-senior authors.

✉ Ralf Jockers  
ralf.jockers@inserm.fr

<sup>1</sup> Université Paris Cité, Institut Cochin, INSERM, CNRS, 75014 Paris, France

<sup>2</sup> Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, Lille Neuroscience and Cognition, UMR-S 1172, FHU 1000 Days for Health, Lille, France

<sup>3</sup> Univ Lille, INSERM, CHU Lille, U-1286 - INFANTE - Institute for Translational Research in Inflammation, 59000 Lille, France

## Introduction

As of February 17, 2022, the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) is estimated to have infected globally approximately 410 million people, with more than 5 million deaths and currently more than 2,000,000 new confirmed infected cases per 24 h, as reported by WHO (<https://covid19.who.int/>). Although COVID-19,

<sup>4</sup> Institute for Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology, Center for Brain, Behavior and Metabolism (CBBM), University of Lübeck, Lübeck, Germany

<sup>5</sup> DZHK (German Research Centre for Cardiovascular Research), Hamburg-Lübeck-Kiel, Hamburg, Germany

<sup>6</sup> Par'Immune, Bio-incubateur Eurasanté, 70 rue du Dr. Yersin, 59120 Loos-Lez-Lille, France

<sup>7</sup> UMR Virologie, INRAE, ANSES, École Nationale Vétérinaire d'Alfort, 94700 Maisons-Alfort, France

the acute respiratory disease caused by the SARS-CoV-2 virus, targets primarily the lungs leading to an acute respiratory disease, increasing evidence indicates a more widespread infection of other organs including the heart and blood vessels, kidneys, gut, and brain [1]. Despite some initial controversies, an increasing number reports the presence of SARS-CoV-2 in the central nervous system [2–4] (see Ref. [5] for review). The penetration of SARS-CoV-2 into the brain could account for the neurological symptoms observed in a large majority of people with COVID-19. Various neurologic signs and symptoms have been reported, such as headache, nausea, anosmia, myalgia, hemorrhage, syncope, seizure, and stroke [6]. Many of these symptoms remain long after the acute illness has passed, a phenomenon described as “long-COVID”, post-COVID-19 condition [7] or post-acute sequelae of SARS-CoV-2 infection (PASC) [8, 9]. The estimated incidence of a neurological or psychiatric diagnosis in the following 6 months of infection is of 33% with no apparent correlation with severity of COVID-19 in the acute phase, using electronic health records of over 236,000 patients with COVID-19 [10]. Several possible mechanisms explaining the neurological symptoms and the neuro-invasive potential of SARS-CoV-2 have been discussed [11]. For example, the mechanisms underlying the neurological symptoms could be the result of neuro-inflammation, which may be induced by the transport of cytokines across the blood–brain barrier (BBB) during the cytokine storm [12], or triggered by the entry of the S1 protein itself [13] which can directly cross the BBB [14]. Other mechanisms that cause neurological symptoms also arise from direct infection of the brain by the virus. Mechanisms by which the virus accesses the brain include a direct viral infection of host endothelial cells, altering the tight junction proteins forming the BBB resulting in a leaky BBB (paracellular migration), or a phagocytosis by circulating immune cells followed by brain infiltration of these cells (“Trojan horse” strategy, by transcellular migration) [11, 15, 16]. Another entry gate into the central nervous system is located at the neural-mucosa interface in the olfactory mucosa [4]. Much attention has been given to identify potential treatments for lung infection and to control the cytokine storm, but only very few efforts to treat or prevent symptoms of post-COVID condition have been made so far.

Melatonin is a natural hormone produced by the pineal gland during the night with a wide range of effects on the central nervous system (CNS) including the regulation of the biological master clock in the hypothalamus and sleep onset. Additional favorable effects are its neuroprotective, anti-inflammatory and anti-oxidant actions [17]. Melatonin acts through a variety of target proteins [18] of which the two high-affinity G protein-coupled receptors,  $MT_1$  and  $MT_2$ , are best-described [19]. Currently marketed drugs (ramelteon, agomelatine, tasimelteon and slow-release melatonin)

acting on  $MT_1$  and  $MT_2$  are indicated for insomnia, «jet-lag», and depression [20] and have been proven to show a good safety profile displaying few or no side effects [21, 22]. Recent systems-network-pharmacology studies revealed melatonin as one of the top-scoring molecules with potential anti-COVID-19 action [23, 24]. Based on this large spectrum of action of melatonin, its potential beneficial effects to treat COVID-19 have been postulated in several review articles [25–28]. However, only very few experimental data from animal models or humans are currently available. We have recently shown that melatonin treatment of K18-*hACE2* mice (expressing the human ACE2 receptor) delayed the occurrence of severe clinical outcome and improved survival, associated with a dampening of virus-induced type I and type III interferon production in the lungs [29].

Here, we show that daily injection of melatonin and melatonergic compounds largely diminishes SARS-CoV-2 infection of the brain in the K18-*hACE2* COVID-19 mouse model, which displays high level of viral brain penetration, by reducing viral entry through brain endothelial cells and damage of cerebral small vessels. This goes along with a concomitant reduction of neuro-inflammatory markers and of markers of immune cell infiltration. Furthermore, we identified a new binding target of melatonin, as melatonin reduces the entry of SARS-CoV-2 into brain cells by binding to ACE2, the SARS-CoV-2 cell entry receptor.

## Results

### Melatonin treatment improves the clinical score and decreases viral load in the brain

To evaluate the potential beneficial effect of melatonin and the two clinically used melatonin receptor ligands agomelatine (AgoMLT) and ramelteon (RML) on SARS-CoV-2 infection in the brain, we chose the K18-*hACE2* mice, a robust model of brain infection by SARS-CoV-2 [30, 31]. For melatonin, two doses were chosen, 10 mg/kg (MLT10) and 50 mg/kg (MLT50), aiming to maintain levels high over time as melatonin has a short plasma half-life of 20–30 min [32]. Based on our previous observation of SARS-CoV-2 infection of brains of K18-*hACE2* mice [33], we evaluated the effectiveness of the pharmacological intervention at day 7 post infection (DPI-7). Intra-peritoneal treatment of mice with compounds started two days before intranasal infection of mice and was repeated daily until sacrifice at DPI-7. Lungs and brain were collected for biochemical and histological analysis.

The course of development of COVID-19 in infected K18-*hACE2* mice was followed daily by evaluating body weight, activity and piloerection, respiration, lethargy and eye closure and a clinical score ranging from 0 to 14 was

determined according to previously established guidelines with a score of 0 being perfectly healthy and a score of 14 being severely ill [34].

Clinical scores worsened markedly from DPI-5 to DPI-6 in vehicle-treated animals, as expected, while a significant improvement on DPI-6 for MLT10 and MLT50 groups and a tendency for improvement for AgoMLT and RML was observed, as previously described [29] (Supplemental Fig. S1A). At DPI-7, the beneficial effect was only maintained for MLT50 (Supplemental Fig. S1A). This differential clinical evolution in treated groups is further evidenced when analyzing the frequency distribution of mice with high clinical score within each group, with a persistent beneficial effect at DPI-7, with the exception of MLT10 (Supplemental Fig. S1B). These data suggest that treatment with melatonin and melatonergic drugs delays the onset of clinical symptoms and slows down disease progression.

We then compared the viral load in the lungs and in the cerebral cortex by monitoring the transcripts for the SARS-CoV-2 nucleocapsid (or N protein) by RT-PCR using a set of FDA-approved primers used to diagnose COVID-19 patients. In accordance with previous observations, the level of viral RNA in the lungs showed strong inter-individual heterogeneity in this model (Fig. 1A) [29, 31]. Overall, the treatments did not seem to affect pulmonary viral load (Fig. 1A). The N protein transcript was also detected in the cortex of 100% of the mice in the vehicle group, although at overall levels, approximately three orders of magnitude lower than those in the lungs (Fig. 1B). Despite the inter-individual heterogeneity, treatments with MLT10, AgoMLT and RML showed a tendency to lower viral load in the cortex, while MLT50 significantly decreases cortical viral load, an observation that was confirmed with two other FDA-approved N protein primer pairs (Fig. 1B) (Supplemental Fig. S1C, D). The effect of the treatment is confirmed when analyzing the distribution of mice into three categories according to their viral RNA load in the cortex classified per percentiles (Fig. 1C). Whereas the majority of the mice in the vehicle-treated group falls into the category with the highest virus load, the treatment decreases the contingency in this category, and the frequency distribution was significantly different among the groups ( $\chi^2$  test,  $p=0.0065$ ). When analyzing the contingency distribution of mice for each treatment compared to the vehicle group, MLT50 ( $\chi^2$  test,  $p=0.0357$ , Supplemental Figure S1E) was the most efficient treatment, as MLT50 largely suppressed the category of mice with the highest viral load and conversely increased the number of animals with low viral load in the cortex (Fig. 1C; Supplemental Fig. S1E). To a lower extent, MLT10 and RML also improved the distribution of mice ( $\chi^2$  test,  $p=0.0498$  and  $0.0357$ , respectively, Supplemental Fig. S1E) increasing the intermediate category and decreasing the category of high cortical virus load. Decreased expression of the N protein in

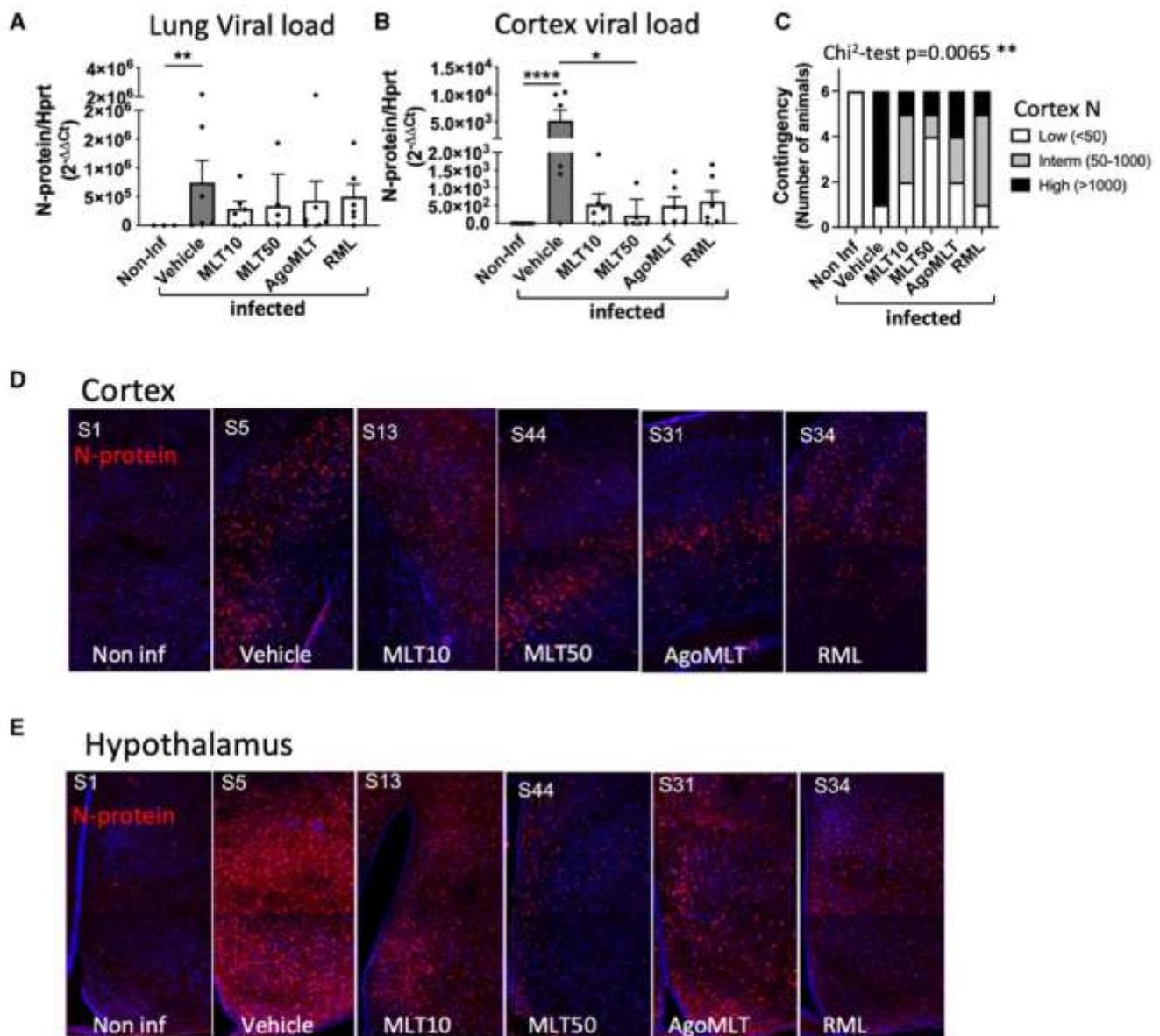
treated mice was confirmed by microscope imaging of brain slices and the difference was even more pronounced in the heavily infected hypothalamic region of the brain (Fig. 1D, E) (Supplemental Figs. S2, 3). These results indicate that treatment with melatonin drugs decreases infection of the brain by SARS-CoV-2, even in the K18-*hACE2* mouse model highly susceptible to brain infection.

### Melatonin diminishes brain inflammation

The well-documented anti-inflammatory effect of melatonin has been hypothesized to be beneficial in COVID-19 treatment (see Ref. [35] for review). In cortex samples of SARS-CoV-2-infected K18-*hACE2* mice, MLT50 treatment tends to decrease the virus-induced mRNA expression levels of the pro-inflammatory cytokines *Tnf* ( $p=0.0514$ ), *Il1b* ( $p=0.1191$ ) and *Il6* ( $p=0.0864$ ) compared to vehicle-treated mice (Fig. 2A–C). Interestingly, the MLT50 treatment also tended to decrease mRNA levels of the chemokines *Cxcl1* ( $p=0.1607$ ) and *Cxcl2* ( $p=0.0690$ ) (Fig. 2D, E) and of markers of infiltrating macrophages *Trem1* ( $p=0.0964$ ) and *Ms4a8a* ( $p=0.0223$ ) (Fig. 2F, G). When considering the contingency distribution of infected mice in different treatment categories according to the tertile classification of inflammatory markers in low, intermediate and high levels, a significant effect of MLT50 compared to vehicle was observed (Fig. 2H–N). MLT50 significantly decreased the number of mice with high levels and conversely increases the number of mice with low levels of *Il1b* ( $p=0.0384$ ), *Il6* ( $p=0.0350$ ), *Cxcl1* ( $p=0.0472$ ), *Cxcl2* ( $p=0.0221$ ), *Ms4a8a* ( $p=0.0357$ ) with tendencies for *Tnf* ( $p=0.0989$ ) and *Trem1* ( $p=0.0578$ ) (Fig. 2H–N). The other treatments (MLT10, AgoMLT and RML) had either no effect or a weaker effect than the MLT50 condition. Taken together, in particular MLT50 treatment had a favorable effect on preventing SARS-CoV-2-induced brain inflammation in K18-*hACE2* mice, in accordance with the lowest levels of viral brain infection observed in this group.

### Melatonin inhibits virus-induced damage of cerebral small vessels

Recent evidence indicated that COVID-19 damages cerebral small vessels in humans and K18-*hACE2* mice by infecting brain endothelial cells [33], which might favor brain infection by disrupting the blood–brain barrier. When staining cortical sections of our SARS-CoV-2-infected K18-*hACE2* mice for the basement membrane component collagen IV and the endothelial marker caveolin-1, we were able to replicate these results by showing the presence of string vessels that are formed when endothelial cells die (Fig. 3A). The analysis showed increased string vessel number and length upon SARS-CoV-2 infection (Fig. 3B, C). Interestingly, both



**Fig. 1** Treatment with melatonin receptor ligands decreases viral load in the brain. **A, B** RNA levels of viral N protein in the lungs (**A**) or in the cerebral cortex (**B**) of SARS-CoV-2-infected mice at DPI-7 ( $n=6$ ). \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.0001$  by Kruskal–Wallis test with two-stage linear step-up procedure of Benjamini, Krieger and Yekutieli as post test for multiple comparisons. **C** Contingency distri-

bution of mice according to 3 groups of RNA level of viral N protein in the cortex grouped by tertiles ( $\chi^2$  test:  $p$  value = 0.0065). **D, E** Immunolabeling for N protein (red) and nucleus (blue) in the cortex (**D**) or hypothalamus (**E**) of K18-*hACE2*-infected mice 7 days after SARS-CoV-2 infection ( $n=6$ )

parameters were significantly decreased in MLT50-, AgoMLT- and RML-treated animals (Fig. 3A–C), while MLT10 showed only a tendency for decrease (Fig. 3A–C).

Interestingly, the overall brain vascular density was found to be decreased in brains of mice infected with SARS-CoV-2, and MLT50 as well as RML and AgoMLT treatments protected the brains from capillary rarefaction (Fig. 3D, E). The mechanism by which SARS-CoV-2 damages cerebral small vessels involves the cleavage of the host

protein NF-kappa-B Essential Modulator (NEMO), shown to be required for the anti-viral immune response [36], by M<sup>pro</sup>, the main protease of SARS-CoV-2 [33]. As melatonin has been shown to inhibit NF-kappa-B activation [37, 38], we evaluated whether melatonin and melatonergic ligands have an effect on M<sup>pro</sup>-induced cell death by investigating cell survival of cultured brain endothelial hCMEC/D3 cells transfected with a plasmid encoding for M<sup>pro</sup>. Treatment of hCMEC/D3 cells with melatonin, AgoMLT or

RML (100  $\mu$ M, 48 h) did not abrogate the effect of M<sup>pro</sup> on cell death (Fig. 3F, G). Expression of the catalytically inactive C145A-M<sup>pro</sup> mutant [39] was used as a control and was without effect on cell survival, as expected (Fig. 3F, G). Collectively, these data indicate that all treatments prevent SARS-CoV-2-induced string vessel formation and protected the vascular system density. These effects could not be explained by inhibition of apoptosis of endothelial cells induced by the viral M<sup>pro</sup> protease, suggesting thus that melatonin and its derivative act upstream of M<sup>pro</sup>, likely at the level of SARS-CoV-2 cell entry.

### Effect of melatonin on the expression of SARS-CoV-2 target proteins in the brain

To explore an action of melatonin in endothelial cells occurring upstream of the M<sup>pro</sup> viral protease activity, such as SARS-CoV-2 cell entry mechanisms, we analyzed the effect of the treatments on the expression levels of the major components of the SARS-CoV-2 entry machinery: ACE2, neuropilin 1 (NRP1) and TMPRSS2 [40, 41]. SARS-CoV-2 infection or compound treatments did not change the global mRNA levels of human ACE2 (under the control of the K18 promoter), *Nrp1* or *Tmprss2* neither in the cortex nor in the lungs (Supplemental Fig. S4). Similarly, no effect was observed on the expression of mouse *Ace2*, which does not participate in the virus entry in this model but could indicate an effect of the ligands on the regulation of the endogenous ACE2 promoter (Supplemental Fig. S4).

Knowing that the expression of melatonin receptors can be restricted to specific cell subpopulations in the mouse brain [42], we analyzed their expression on brain slices of the cortical vasculature of mice by RNAscope. Expression of MT<sub>1</sub> and MT<sub>2</sub> melatonin receptors (encoded by the *Mtnr1a* and *Mtnr1b* genes, respectively) were specifically expressed in collagen IV-positive endothelial cells in the brain (Fig. 4A). These results indicate that vascular endothelia might be the target of melatonin and its derivatives mediating their protective effects against brain infection.

We next isolated the CD31<sup>+</sup> endothelial cell population by FACS sorting from the cortex of *K18-hACE2* mice treated with vehicle or MLT50 for 9 days to further evaluate the effect of melatonin on gene expression. Successful enrichment of endothelial cells in the CD31<sup>+</sup> fraction vs. neurons in the CD31<sup>-</sup> fraction was confirmed by the strong reciprocal expression of *Pecam* (CD31) in CD31<sup>+</sup> cells and *Elavl4* (HuD, neuronal marker) in CD31<sup>-</sup> cells (Fig. 4B, C). Consistent with the notion that brain endothelial cells are SARS-CoV-2 entry cells, expression of *Nrp1* and murin *Ace2*, two SARS-CoV-2 entry receptors, was particularly prominent in CD31<sup>+</sup> cells with an enrichment of 3 and 34 times, respectively, over CD31<sup>-</sup> cells (Fig. 4D, E). Expression of human ACE2 (under the control of the K18 promoter) was similar in

both fractions (Fig. 4F), while *Tmprss2* was predominantly expressed in CD31<sup>-</sup> cells (Fig. 4G).

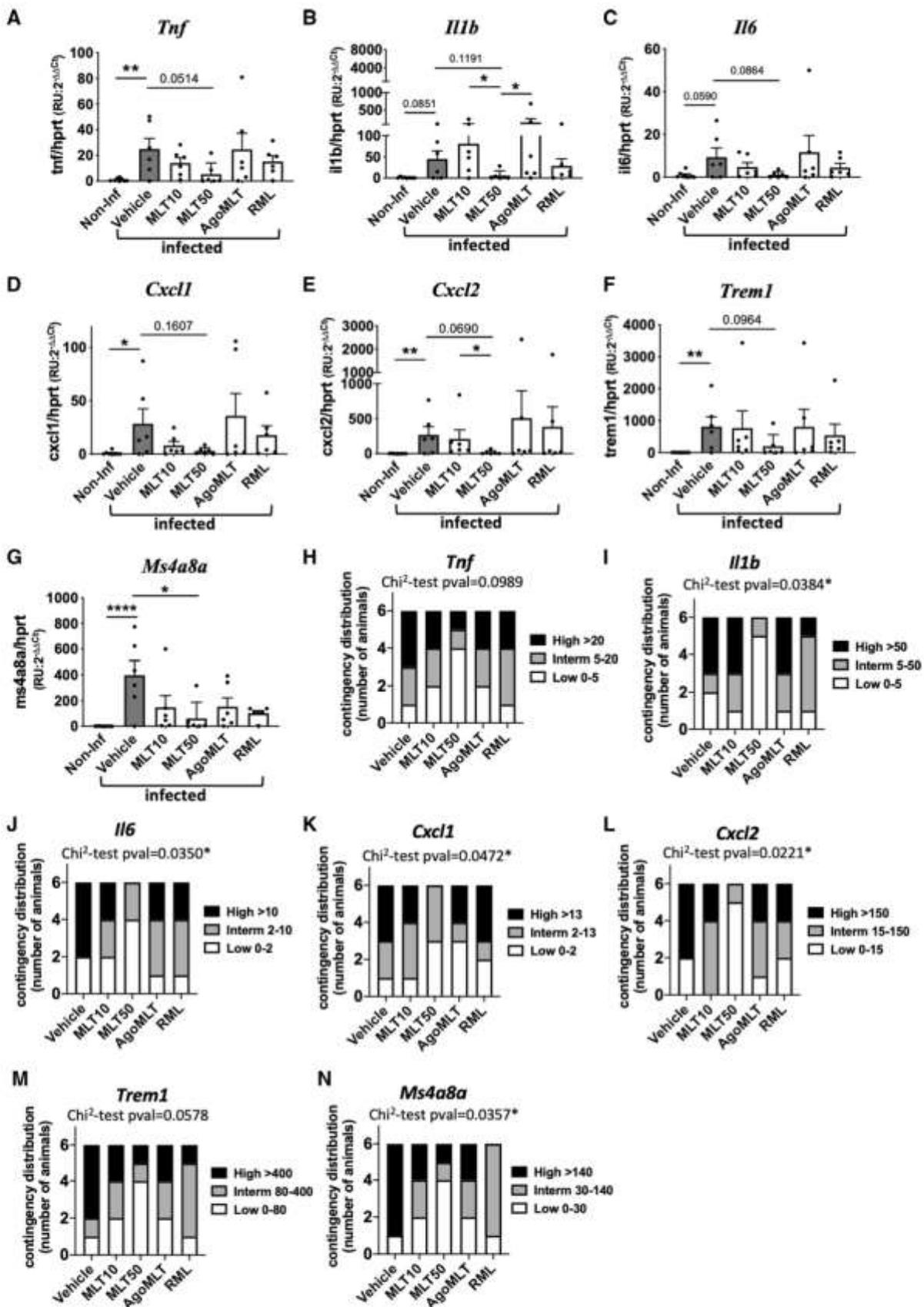
*Nrp1* levels were unaffected by MLT50 treatment while murine *Ace2* expression was decreased by half in CD31<sup>+</sup> cells from MLT50-treated mice (Fig. 4D, E). MLT50 treatment did not modify the expression of the human ACE2 under the control of the K18 promoter (Fig. 4F). Additionally, the MLT50 treatment downregulated *Nfkb1* and *Rela* expression, two genes of the NF $\kappa$ B pathway (Fig. 4H, I), the decrease of which might participate in the reduction of endothelial inflammation.

Collectively, these results show that brain endothelial cells are potential melatonin target cells for receptor-mediated melatonin effects and that melatonin decreases the expression of the endogenous ACE2 and NF $\kappa$ B pathway genes in these cells thus potentially contributing to the protective effect of melatonin on cerebral small vessels. However, downregulation of mouse *Ace2* cannot explain the reduction of virus entry in *K18-hACE2* mice, which is dependent on human ACE2 expressed under the control of the K18 promoter and the latter is not downregulated by melatonin, suggesting another inhibitory mechanism by melatonin.

### Binding of melatonin to ACE2 interferes with SARS-CoV-2 entry into brain endothelial cell line hCMEC/D3

To address whether melatonin interferes directly with viral entry into host cells, we used a SARS-CoV-2 pseudo-virus luciferase reporter assay in HEK293 cells. Naïve HEK293 cells are resistant to infection but become highly susceptible for infection upon ectopic expression of human ACE2 (Fig. 5A). Melatonin inhibited ACE2-dependent virus entry in a concentration-dependent manner, with an estimated EC<sub>50</sub> of 20  $\mu$ M and a maximal inhibition of 60–70% at the highest concentration (Fig. 5B). These results were recapitulated in human brain endothelial hCMEC/D3 cells, in which pseudo-virus cell entry is also shown to be dependent on the level of ACE2, and melatonin significantly inhibited the entry of the SARS-CoV-2 pseudo-virus by 40% in hCMEC/D3 cells (Fig. 5C). These data show that melatonin directly interferes with ACE2-dependent SARS-CoV-2 entry.

We then determined the effect of melatonin on the spike/ACE2 interaction in an in vitro assay measuring the binding of recombinant biotinylated receptor-binding domain (RBD) of spike to purified ACE2 immobilized on the plate. Melatonin was unable to interfere with RBD binding to ACE2, whereas an excess (400 nM) of non-biotinylated S1 significantly diminished RBD binding, as expected, indicating that melatonin does not directly compete with RBD binding to ACE2 (Fig. 5D). We then employed a second, time-resolved FRET (TR-FRET)-based cellular spike-ACE2-binding assay



**Fig. 2** Melatonin diminishes brain inflammation. **A–G** mRNA levels of *Tnf*, *Il1b*, *Il6*, *Cxcl1*, *Cxcl2*, *Trem1*, *Ms4a8a* in the cortex of SARS-CoV-2-infected mice at sacrifice day 7 were determined by RT-qPCR ( $n=6$ ). \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\*\* $p<0.0001$ , by Kruskal–Wallis test with two-stage linear step-up procedure of Benjamini, Krieger and Yekutieli as post test for multiple comparisons. **H–N** Contingency distribution of infected mice in different treatment categories depending on tertile classification of inflammatory markers.  $p$  values of  $\chi^2$  test between vehicle and MLT50 treatment considering “Low” and “High” levels of inflammatory markers are indicated (\* $p<0.05$ )

[43]. The assay measures the binding of RBD to ACE2 in a cellular context, by following the energy transfer between the N-terminal SNAP-tagged human ACE2 labeled with the energy donor terbium (Tb) and RBD labeled with the energy acceptor d2 (RBD-d2) (Fig. 5E). The energy transfer reports on the molecular proximity between the two proteins coupled to the energy donor and acceptor if they are within a maximal distance of less than 10 nm [44]. Binding of the RBD-d2 tracer was readily detectable in this assay and was partially inhibited by micro-molar concentrations of melatonin with maximal inhibition levels reaching 20–30%, as compared to an excess of unlabeled RBD defining the specific TR-FRET signal (Fig. 5F). This reduction in TR-FRET signal can be either due to a direct competition of RBD binding to ACE2 by melatonin or to an allosteric effect of melatonin modifying the conformation of the RBD–ACE2 complex that moves the energy donor and acceptor apart. To address the question of whether melatonin modifies the affinity of RBD for ACE2, we performed competition TR-FRET binding assays with increasing concentration of unlabeled RBD in the absence and presence of melatonin. The  $pIC_{50}$  value of  $7.80 \pm 0.06$  ( $n=3$ ) confirmed the high-affinity binding of RBD which was, however, not modified by 10 or 100  $\mu$ M of melatonin ( $pIC_{50}$   $7.77 \pm 0.05$ , and  $7.59 \pm 0.08$ , respectively;  $n=3$ , data not shown). Taken together, the partial inhibition of viral entry and RBD binding to ACE2 by melatonin and the absence of any competitive response of melatonin on the RBD–ACE2 interaction strongly suggest an allosteric behavior and conformational modifications within the RBD–ACE2 complex induced by melatonin.

To gain insights in the potential binding mode of melatonin to the RBD–ACE2 complex, we performed a computational blind docking of melatonin using an exploration grid comprising the entire RBD and the same volume counterpart of ACE2 of three solved crystal structures of RBD–ACE2 complex, 6M17, 6M0J and 6VW1 [45, 46]. None of the docking solutions revealed the existence of a melatonin-binding pocket on RBD. The top-ranked solution revealed a melatonin-binding cavity on ACE2 that was located in close proximity to but not directly at the RBD–ACE2 interface (Fig. 5G). Molecular dynamics simulations confirmed the melatonin-binding site depicting the stability and the specificity of melatonin binding to ACE2 in the N-glycosylated

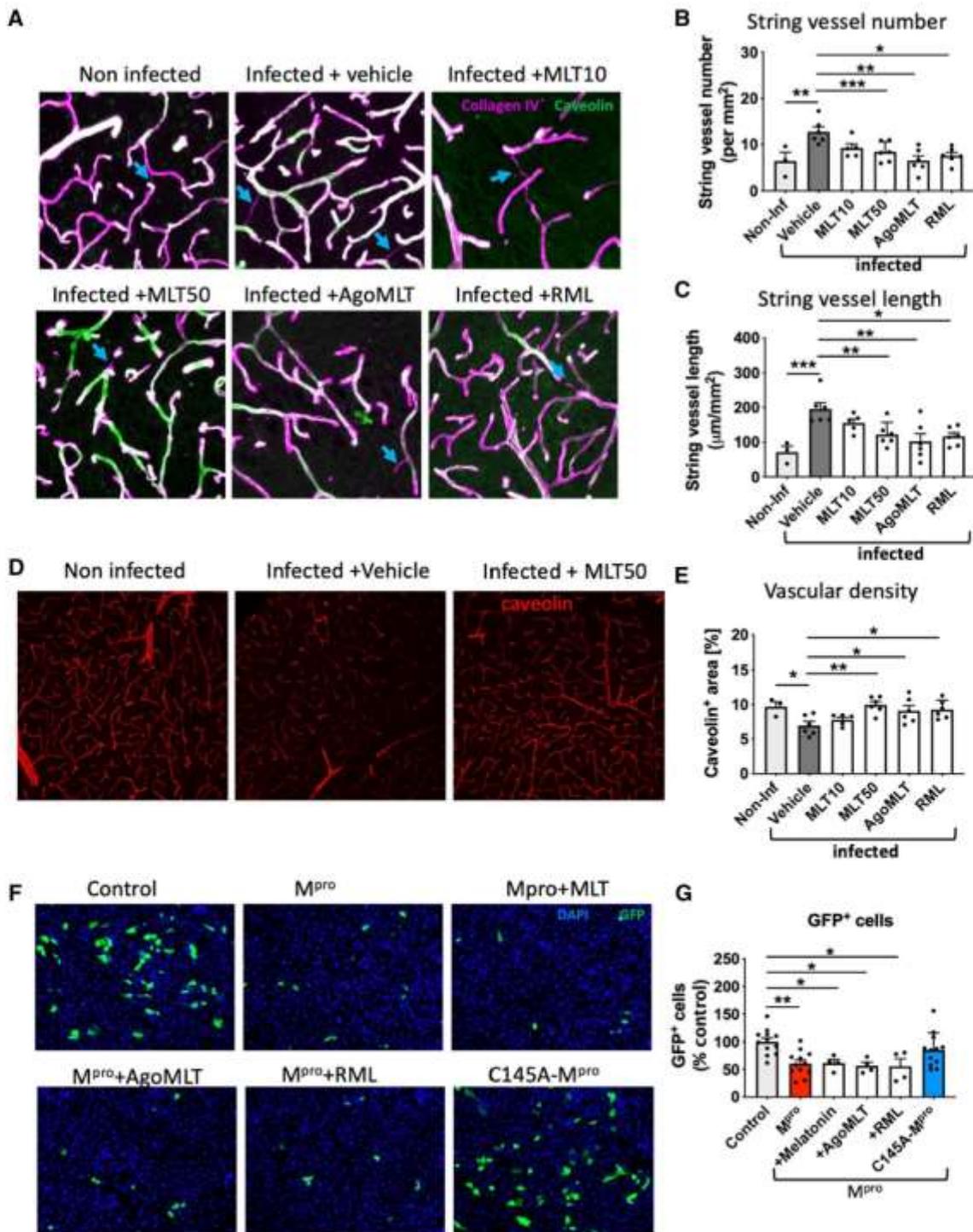
6VW1 PDB structure through three replicates of 500 ns (Supplemental Fig. S5). The stable binding site identified in the replicates, R1 and R2, is located close to the two helices of ACE2 (helix 19–52 and helix 53–89) interacting with RBD. Melatonin binds into a site delimited by Phe40, Trp69, Leu73, Ala99, N-glycosylated Asn103 and Lys562 as observed in two of the three replicates. The third replicate shows a rapid dissociation of melatonin from 100 ns. This new binding site is distinct from the central catalytic site of ACE2, an observation which is consistent with the absence of any effect of melatonin on the enzyme activity of ACE2, as assessed in an in vitro enzymatic assay (Fig. 5H).

The location of the binding site close to the two helices of ACE2 interacting with RBD indicates that melatonin might modulate the conformation of the ACE2 interface, thus impacting on the spike–ACE2 interaction. To test this hypothesis experimentally, we developed an intra-molecular TR-FRET assay to probe the movement of ACE helix 19–52 by measuring the distance between a Flag-tag introduced in front of ACE helix 19–52, and the SNAP-tag of ACE2 (Fig. 5I). As expected, unlabeled RBD, which modifies the position of ACE2 helix 19–52 compared to the apo-ACE2 state, changed the TR-FRET signal, reflecting RBD-induced conformational changes in ACE2 (Fig. 5J). Melatonin also triggered a change in TR-FRET signal, confirming its binding to ACE2 and its impact on the position of ACE2 helix 19–52 (Fig. 5J).

Taken together, our data indicate that melatonin binds to an allosteric-binding site at ACE2 and modulates the RBD–ACE2 complex by modifying the position of helix ACE2 19–52 helix that contacts RBD, directly impacting on viral cell entry.

## Discussion

SARS-CoV-2 infects several tissues including the brain, an observation which has been largely neglected as considered irrelevant for the acute phase of COVID-19. The description of persisting symptoms, several months after the acute phase, like increased incidence of headache, fatigue and neurological symptoms, points to a potential role of the brain as target of the virus. Strategies to protect the brain might be therefore of interest to prevent long-term consequences of SARS-CoV-2 infection. We show here in the K18-*hACE2* COVID-19 mouse model that treatment with melatonin, especially at a high dose, protects the brain endothelial cells by inhibiting SARS-CoV-2 entry. Melatonin binds to an allosteric-binding site at ACE2 that is connected to the molecular interface interacting with the viral spike protein, thus preventing ACE2 to serve as an efficient SARS-CoV-2 entry receptor.



**Fig. 3** Melatonin inhibits SARS-CoV-2-induced damage of cerebral small vessels. **A** Representative images of collagen IV (purple) and caveolin-1 (green) in the cortex of non-infected mice or infected mice and treated with either vehicle, MLT10, MLT50, AgoMLT or RML, 7 days post infection with SARS-CoV-2. Empty basement membrane tubes, also known as string vessels are indicated with arrowheads. **B**, **C** Quantification of string vessel number (**B**) and length (**C**) in non-infected mice and in treated SARS-CoV-2-infected mice. **D** Caveolin staining of vascular system in brain slices of infected mice treated with vehicle or MLT50 versus non-infected mice. **E** Quantification of

caveolin-positive area. **F** Fluorescence images of human endothelial hCMEC/D3 cells transfected with GFP (control), GFP and M<sup>pro</sup>, or GFP and the inactive form C145A-M<sup>pro</sup>. A low number of hCMEC/D3 cells (GFP+) survived after expressing the M<sup>pro</sup> protein while the expression of the inactive variant C145A-M<sup>pro</sup> does not change the number of GFP+ cells. Treatment with MLT10, MLT50, AgoMLT, and RML did not interfere with the cell death-inducing effect of M<sup>pro</sup>. **G** The numbers of surviving GFP+ hCMEC/D3 cells are plotted ( $n=6$ ). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  by ordinary One-way ANOVA test followed by Dunnett's post hoc test

Additional beneficial effects of melatonin may arise from the fact that melatonin drives endothelial cells to a less reactive inflammatory state due to lower expression of NF $\kappa$ B pathway genes. Additionally, reduced endogenous expression of *Ace2* could also participate in the decrease of viral entry in models where endogenous receptors are sensitive to SARS-CoV-2. We identified brain endothelial cells as the possible main melatonin target cells expressing ACE2 and MT<sub>1</sub> and MT<sub>2</sub> receptors. Our data indicate that melatonin has a major effect on the protection of cerebral small vessels by preventing SARS-CoV-2 entry, SARS-CoV-2-induced string vessel formation and reduction in vascular density. The protective effect of melatonin and its clinically used derivatives in K18-*hACE2* mice, a model of high SARS-CoV-2 infection compared to humans, puts them in a privileged position as repurposing candidates for long-COVID studies in humans.

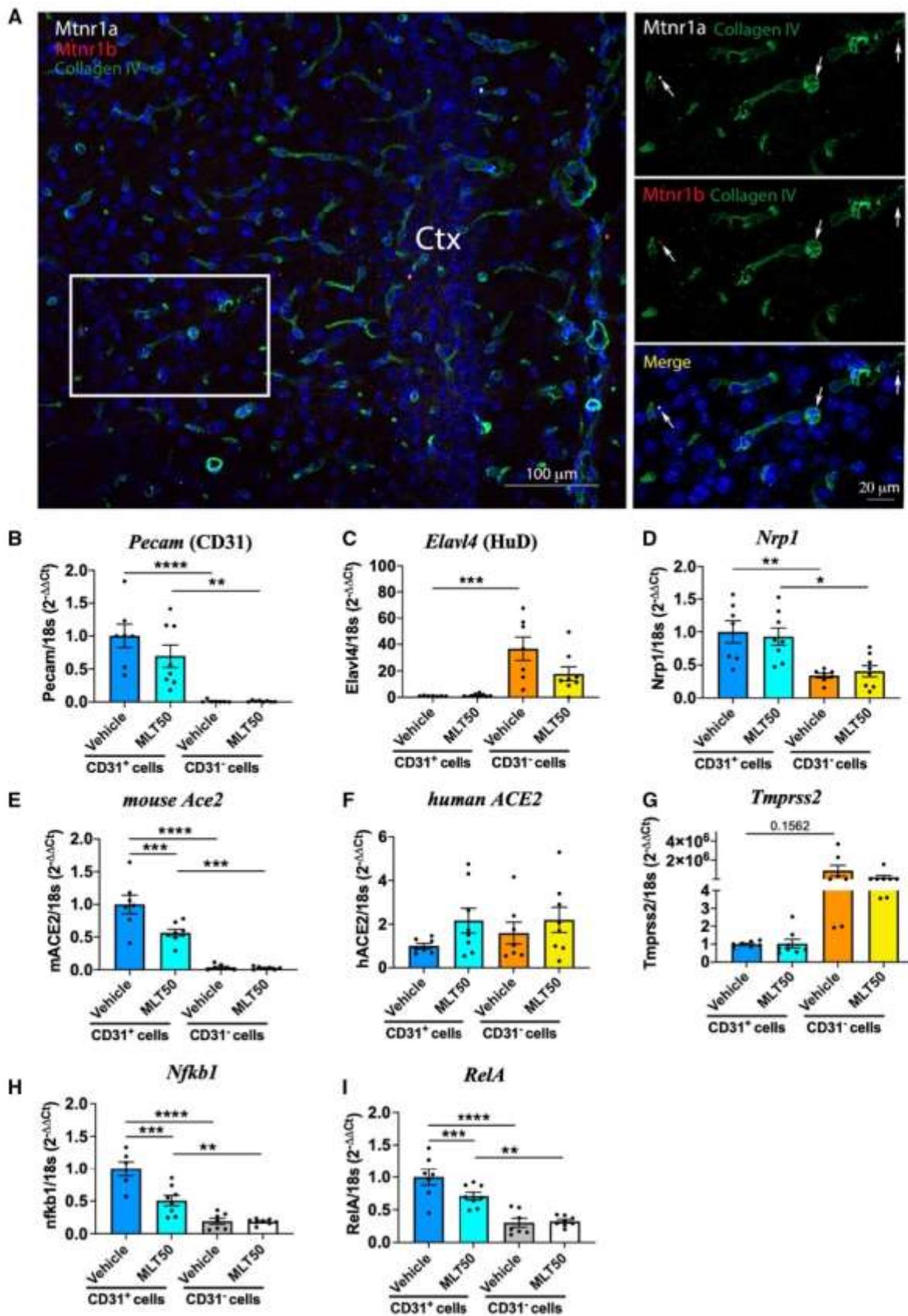
Several reviews suggest the beneficial use of melatonin to treat COVID-19 contrasts with the only few experimental evidences [25, 28, 47], a scenario that prompted us to evaluate the overall effect of melatonin and agomelatine and ramelteon, two highly potent clinically approved melatonin analogs. Despite the fact that all three compounds act on high-affinity melatonin receptors [19, 48], their effects were not identical in our study. Clearest effects were observed in the MLT50 group, followed by AgoMLT and RML, and finally MLT10. The difference between MLT10 and MLT50 argues rather against the involvement of high-affinity receptors which should be saturated at both doses. The similar pattern of effects observed for MLT50, AgoMLT, and RML for most parameters would suggest the involvement of a common, most likely low-affinity target, which could be ACE2. The need for the higher dose of melatonin (MLT50) compared to AgoMLT and RML could be explained by the shorter plasma half-life of melatonin compared to the synthetic drugs. The superior effect of MLT50 compared to AgoMLT and RML in many parameters could be either a dose effect or due to additional anti-oxidant properties of melatonin at this high dose that are not observed with AgoMLT and RML [17].

We identified brain endothelial cells as the possible main melatonin target cells expressing ACE2 and MT<sub>1</sub> and MT<sub>2</sub> receptors. A growing body of evidence indicate the susceptibility of endothelial cells to be infected by SARS-CoV-2 [49, 50] in a ACE2-dependent manner, contributing to microvascular pathology observed in the brains of SARS-CoV-2-infected patients [33, 51]. MT<sub>1</sub> receptor expression was observed in human cerebral micro-vessels [52] and activation of MT<sub>1</sub> and MT<sub>2</sub> receptors in smooth muscle cells to mediate vasoconstriction and vasodilation, respectively [48]. In rat microvasculature, melatonin acts on endothelial melatonin receptors to reduce acute inflammation by inhibiting leukocyte rolling and adhesion [53, 54]. A potential

role of endothelial melatonin receptors in the modulation of vascular tone has been also suggested [55]. Our complementary data indicate that melatonin, most likely by targeting high-affinity melatonin receptors in brain endothelial cells, might have additional beneficial effects in the context of COVID-19 by decreasing the expression of ACE2 and NF $\kappa$ B pathway genes.

The tissue-specific efficacy of melatonin treatment was striking, from no significant effect on viral load in the lungs to a substantial blockage of infection in the brain. Several factors might underlie this tissue selectivity of the melatonin effect. First, the SARS-CoV-2 infection follows a well-characterized dynamic, with the airway and lungs being the primary affected tissues while systemic infection is more tardive. Although we cannot discard potential beneficial effects of melatonin treatment at earlier stages, the absence of any effect of melatonin on the overall lung pathology argues against this possibility at least in the K18-*hACE2* model [29]. Second, and most importantly, the mechanisms of virus invasion significantly differ between the first phase and the systemic spreading. In the early phase of infection, the upper and lower airway epithelia and the lung alveoli are the primary cells targeted by SARS-CoV-2 and are also the location where active viral replication takes place [56, 57]. High virion concentration together with high expression of ACE2 in these cells [58], is certainly a favorable condition for virus cell entry, which is difficult to counteract by melatonin in the lungs. In contrast, the systemic spreading of the virus infection is characterized by relatively low viremia and low expression of ACE2 in the case of the brain tissue in humans [59], conditions more favorable to an effect of melatonin.

Two main mechanisms through which SARS-CoV-2 might reach brain tissues have been proposed and involves either a neuronal route from nerve terminals in contact with high viral load at the nasal cavity, or through systemic viremia and BBB crossing. The later might occur through direct viral invasion of host endothelial cells lining the vascular wall (transcellular migration), through brain infiltration of infected immune-system cells ("Trojan horse" strategy) or through disrupted BBB or caused by the virus infection (paracellular migration) [11, 15, 16]. Our data provide evidence for the two first mechanisms. The prevention of SARS-CoV-2-induced damage of cerebral small vessels argues in favor of the transcellular migration route. The low levels of markers of infiltrated macrophages in the brain observed in the MLT50 group suggests that melatonin might also prevent the "Trojan horse" strategy of virus brain invasion. Of note, high melatonin concentration has been previously shown to decrease the expression of cell-adhesion molecules necessary for cell migration through the endothelial cell layer also in a receptor-independent mechanism [38, 60]. The disclosed mechanisms of action of melatonin in interfering with the



**Fig. 4** Effect of melatonin on the expression of components involved in cell entry of SARS-CoV-2 in the brain. **A** Detection in mouse brain of melatonin receptor transcripts, *Mtnr1a* (white) and *Mtnr1b* (red), in the cortical vasculature (positive for collagen IV). **B–I** mRNA levels of *Pecam* (CD31, endothelial marker), *Elavl4* (HuD, neuronal marker), *Nrpl*, mouse *Ace2*, human *ACE2*, *Tmprss2*, *Nfkb1* and *RelA* in sorted cortical cells positive or negative for CD31 from non-infected K18-*hACE2* mice ( $n=6$ ). \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$ , \*\*\*\* $p<0.0001$  by One-way ANOVA with post hoc Tukey test for correction of multiple comparison

spike/ACE2 interaction and with cell migration at high concentrations probably explains the need for in vivo administration of high melatonin dose and the tissue-specificity of the protective effect. This conclusion is in line with the inhibitory effect of indole chloropyridinyl esters on SARS-CoV-2 infection [61] and of melatonin and other indoles on Swine coronavirus cellular entry [62]. However, the underlying mechanism of these in vitro effects observed at super high, milli-molar, melatonin concentrations, remained unclear. Other alternative entry receptors have been suspected to be used by SARS-CoV-2, in particular in the brain [12]. It is currently unknown whether additional mechanisms other than melatonin modulation of Spike/ACE2 interaction might be involved in the protective effect of melatonin against SARS-CoV-2 brain infection.

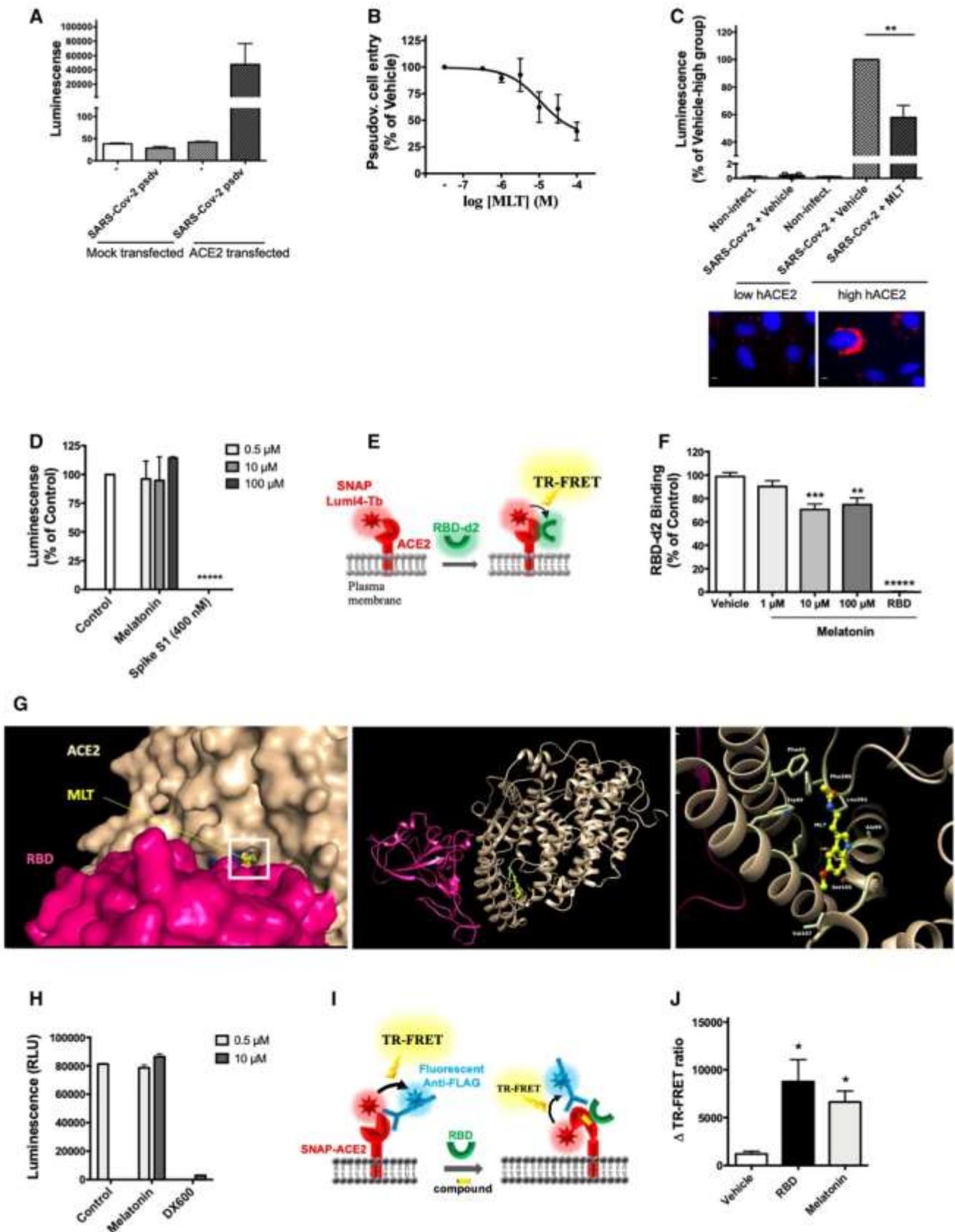
The therapeutic potential of melatonin in COVID-19 is supported by the observation that melatonin users show a 52% reduced likelihood of positive SARS-CoV-2 PCR test in African Americans [63]. Several clinical trials based on melatonin treatment were conducted during the sanitary crisis and the results of some of them have been gradually released and have underscored a beneficial effect of melatonin use on sleep quality and outcomes of COVID-19 patients [64]. Among them, although with a small number of patients, a randomized, double-blind clinical trial, concluded on the efficacy of melatonin as an adjunctive therapy in hospitalized patients with COVID-19, improving clinical symptoms and contributing to a faster recovery [65]. In addition, a randomized clinical trial designed to assess the efficacy of melatonin resulted in lower thrombosis, sepsis, and mortality rate in COVID-19 patients [66]. Finally, treatment with flvoxamine, one of the mechanisms of which is to increase plasma melatonin levels, has reduced the need for hospitalization in high-risk ambulatory patients with COVID-19 [67]. Altogether, these first clinical results highlight a therapeutic potential of melatonin in COVID-19. Considering the reduction in brain infection and the decrease in the central inflammatory response with melatonin treatment, it is predicted that mainly long-term neurological disorders could be avoided/attenuated with melatonin treatment. Melatonin is a medicine that can be obtained without a prescription. Unfortunately, retrospective studies, seeking to determine the efficacy of drugs against neurological disorders in COVID-19,

and which would be based on cohorts of already existing patients taking or not taking melatonin supplements, do not allow a well-controlled analysis because the dose and the time of taking melatonin-derived medicines are usually not known. In addition, the selection of melatonin patient group included in the retrospective analyzes may be initially biased as patients with previous neurological disorders (fatigue, depression, memory loss...) are more inclined to use alternative supplements such as melatonin. Thus, an analysis directly devoted to studying the effects of melatonin treatment, especially at high doses, in relieving long-term neurological effects would be required.

The commonly prescribed doses of melatonergic compounds to treat jetlag, insomnia or depression in humans are of 2–20 mg/day (melatonin), 8 mg/day (ramelteon), and 25–50 mg/day (agomelatine). In mice, these are equivalent to 0.41–4.1 mg/kg/day, 1.6 mg/kg/day, and 5–10 mg/kg/day, respectively, according to allometric dose equivalent calculations [68, 69]. The doses chosen for this study were intended to cover high- and low-affinity targets of melatonergic compounds and, thus, they are higher than the recommended doses prescribed (2.5–12-fold for melatonin; sixfold for ramelteon; 2–fourfold for agomelatine). These doses here are in the range of doses tested in previous human studies [70–75]. Of note, melatonin and melatonergic drugs have a good safety profile, even at doses higher than those typically prescribed for sleep and circadian disorders [76]. A high melatonin dose administered in humans (equivalent to 61 mg/kg in mice) was also well tolerated during an observation period of up to 2 years [77]. Caution is advised when using over the counter melatonin formulations which may not contain the indicated doses or meet the highest standards of purity.

When considering to use melatonin, agomelatine or ramelteon in the context of COVID-19, the chronobiological and sleep initiating effects of these three molecules have to be managed [20]. Application at the right time, in the evening before bedtime, and for a restricted period (probably during and shortly after the acute phase of infection), will minimize the risk of dysregulation of the circadian system and of sleep induction. Additional strategies include the combinatory therapies or chemical optimization of these melatonergic compounds to improve the specificity and affinity for ACE2 vs. MT<sub>1</sub> and MT<sub>2</sub> receptors.

The first antiviral drug, Paxlovid, has been recently approved for COVID-19 treatment. Paxlovid includes nirmatrelvir, a drug that blocks SARS-CoV-2 Mpro activity, and ritonavir, a potent inhibitor of the cytochrome P450-3A4 (CYP3A4) which improves the effect of nirmatrelvir by slowing down its metabolism [78]. Interestingly, melatonin and its derivatives are also metabolized by CYP450/CYP3A4 [79, 80]. Although our data do not support a direct role of melatonin on the SARS-CoV-2 Mpro protease, a



**Fig. 5** Melatonin inhibits SARS-CoV-2-cell entry by interfering with the spike-ACE2 interaction. **A** SARS-CoV-2 cell entry assessed by pseudo-virus luciferase reporter assay in HEK293 cells transfected with a human ACE2 expression plasmid or mock transfected. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM of 3 independent experiments, each performed in duplicates. **B** Concentration–response curves of melatonin on SARS-CoV-2 pseudo-virus cell entry in HEK293 cells expressing human ACE2. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM of 3 independent experiments, each performed in triplicates. **C** Inhibition of SARS-CoV-2 pseudo-virus cell entry by melatonin (100  $\mu$ M) in hCMEC/D3 cells transduced with human ACE2. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM of 3 independent experiments, each performed in triplicates. Bottom panel show ACE2 expression in transduced and non-transduced cells by immunofluorescence (red=ACE2; blue=DAPI-stained nucleus; scale bar=10  $\mu$ m). **D** In vitro binding assay of biotinylated S1 spike protein (50 nM) to immobilized human ACE2 in the absence or presence of melatonin at 0.5, 10 and 100  $\mu$ M; a competition by an excess of non-labeled S1 (400 nM) determines the specific signal. **E** Scheme illustrating the TR–FRET-based binding assay of RBD-d2 to SNAP-tagged ACE2 labeled with Lumi4-Tb at the cell surface. **F** Change in TR–FRET signal of RBD-d2 (5 nM) binding to Lumi4-Tb–SNAP–ACE2 by increasing concentrations of melatonin. Competition by an excess of non-labeled RBD (300 nM) determines the specific signal. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM of 3 independent experiments, each performed in triplicates. **G** Docking and molecular dynamic-based prediction of melatonin binding to the crystal structure of ACE2 in complex with the RBD domain of SARS-CoV-2 virus. At  $t_0$  (left panel), the molecular docking of melatonin into ACE2/RBD complex (6M17) shows a unique entry channel for melatonin located in close proximity to the interaction surface between ACE2 and the viral spike protein (left panel). At  $t=500$  ns of simulation using glycosylated ACE2/RBD complex (6VW1), a global view of the complex shows the migration of MLT to the interior side of two ACE2 helices interfacing RBD (central and right panel). Most hydrophobic interactions are exhibited in a zoomed view centered onto the binding site (right panel). **H** ACE2 enzyme activity in the absence or presence of melatonin at 0.5 and 10  $\mu$ M; DW600 inhibitor (10  $\mu$ M) is shown as a positive control. **I** Scheme illustrating the assay probing conformational change within ACE2 based on intramolecular TR–FRET between Lumi4-Tb-labeled SNAP–ACE2 and d2-labeled anti-FLAG tag antibody. **J** ACE2 conformational change in HEK293 cells in the presence of non-labeled RBD (5 nM), or melatonin (100  $\mu$ M). Data are expressed as change of TR–FRET signal ( $\Delta$ TRFRET  $\pm$  SEM) of 4 independent experiments, each performed in triplicates. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.005$ ; \*\*\*\* $p < 0.0005$  by one-way ANOVA, followed by Dunnett's multiple comparisons test compared to vehicle group

combination of melatonergic drugs with Paxlovid or ritonavir alone may be a good strategy to increase the half-life of melatonin (and thus its dose of administration) and improve the therapeutic armamentarium of patients with COVID-19.

Our study describes the first allosteric-binding site of ACE2 and melatonin is the first allosteric modulator of ACE2 which negatively regulates ACE2 binding to the SARS-CoV-2 spike protein. This opens additional opportunities for the development of ACE2-specific drugs that interfere with the spike interaction [81]. Importantly, binding of melatonin to this allosteric-binding site of ACE2 did not interfere with ACE2 enzyme activity, thus avoiding potential severe side effects as ACE2 activity is essential for the proper function of the renin–angiotensin system.

In conclusion, we disclosed ACE2 as a new binding target of melatonin, which leads to allosteric negative modulation of the spike/ACE2 interaction. This effect on the SARS-CoV-2 entry receptor function of ACE2, combined with the inhibition of NF $\kappa$ B expression and endogenous ACE2 expression in endothelial cells, is most likely the predominant mechanism for impaired SARS-CoV-2 brain invasion by melatonin and its derivatives.

## Methods

### Animals

K18-*hACE2* C57BL/6 transgenic mice (males, 10-week-old), which expresses human ACE2 driven by a human cytokeratin 18 (K18) promoter (Jackson Laboratory, <https://www.jax.org/strain/034860>) were housed in an animal facility of biosafety level 3 (BSL3) at the French National Veterinary School in Maisons–Alfort, with water and food ad libitum.

### SARS-CoV-2 virus infection

At day of infection (day post-infection DPI-0), mice were infected via intra-nasal inoculation of SARS-CoV-2 (10  $\mu$ L each nostril,  $10^4$  TCID<sub>50</sub> in total) in Dulbecco's modified Eagle's medium, under isoflurane anesthesia. The SARS-CoV-2 strain *BetaCoV/France/IDF/200107/20* was supplied by the Urgent Response to Biological Threats (CIBU) hosted by Institut Pasteur (Paris, France) and headed by Dr. Jean-Claude Manuguerra. The human sample, from which the strain *BetaCoV/France/IDF/200107/2020* was isolated, has been provided by Dr O. Paccoud from the La Pitié-Salpêtrière Hospital (Paris, France).

### In vivo treatment with melatonergic compounds

Melatonin, agomelatine and ramelteon were purchased from abcr GmbH (Karlsruhe, Germany). Compounds were reconstituted in vehicle solution (5% ethanol in sterile saline solution). K18-*hACE2* transgenic mice were randomly divided into the following groups (6 mice/group): vehicle, melatonin 10 mg/kg (MLT10), melatonin 50 mg/kg (MLT50), Ramelteon (RML, 10 mg/kg), and Agomelatine (AgoMLT, 20 mg/kg), and were intraperitoneally (i.p.) injected with vehicle or melatonergic ligands daily, one hour before lights off (to minimize the risk of disturbing the natural daily rhythm of endogenous melatonin production). The treatment started 2 days before virus inoculation and continued until the end of the experiment (7 days post-infection, DPI-7). A group of non-infected mice was housed under the same conditions and similarly monitored during the whole experiment. Mice were uniquely identified using ear tags and provided

an acclimation period of 1 week before the experiment. Mice were supplied nutrient gel when weights began to decrease. Mice that met the human endpoint criteria were euthanized to limit suffering. The study was ended at DPI-7 and surviving mice were sacrificed at that time for comparative analysis. Lung and brain samples were taken directly after sacrifice and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis.

### Clinical score evaluation

All mice were weighed and examined for the presence of clinical symptoms daily, or twice per day after DPI-4, when symptoms were evident. The score for clinical symptoms was attributed following an IACUC approved clinical scoring system, and included the following criteria: body weight, posture/fur, activity/mobility, eye closure, respiratory rate. Scoring was performed according to standard guidelines [34] with a maximal score of 14. Mice died either naturally from the disease or were sacrificed for ethical reasons when reaching a clinical score of 5 for 2 parameters and for 2 consecutive observation periods, or if weight loss was equal to or greater than 20%.

### Isolation of endothelial cells by fluorescence-activated cell sorting (FACS)

15 non-infected K18-*hACE2* male mice were injected ip either with vehicle (ethanol 5% in saline) or melatonin 50 mg/Kg (MLT50) daily for 9 consecutive days. The morning of the 10th day, brain was extracted and cortex immediately submerged in the cellular dissociation buffer. Mice cortex was enzymatically dissociated using a Papain Dissociation System (Worthington, Lakewood, NJ) to obtain a single-cell suspension. Cells were incubated with blocking Purified Rat Anti-Mouse CD16/CD32 (553142, Mouse BD Fc Block™) for 15 min at  $37^{\circ}\text{C}$  before incubation with primary antibodies Alexa Fluor 647 Rat Anti-mouse CD31 (BD Pharmigen cat:563608) for CD31 cell labeling and Alexa Fluor 647 Rat IgG2a,k Isotype control (BD Pharmigen cat:557690). Antibody labeling was performed for 1 h at  $37^{\circ}\text{C}$ . All steps of labeling and washing were performed in PBS-BSA 2%. Labeled cells were suspended in 5% glucose Hanks' Balanced Salt Solution before sorting. FACS was performed using an ARIA SORP cell sorter cytometer device (BD Bioscience, Inc). The sorting parameter was based on measurements of Alexa Fluor 647 fluorescence (excitation: 633 nm; detection: bandpass 670/30 nm) by comparing cell suspensions from non-labeled cortex of K18-*hACE2* mice and the corresponding Isotype control. For each animal, 4000 CD31-positive and 4000 tomato-negative cells were sorted directly into 10  $\mu\text{l}$  of lysis buffer (0.1% Triton® X-100 and 0.4 unit/ $\mu\text{l}$  RNaseOUT™ (Life Technologies)).

### RNA extraction and real-time qPCR analyses

For infected mice, total RNA was extracted from cortex using the ReliaPrep™ FFPE Total RNA Miniprep System (cat: Z1002, Promega); homogenization was carried out in a glass-glass tissue grinder. RNA samples were immediately quantified in a NanoDrop One (Thermo Scientific v2) and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until the retro-transcription step. For gene expression analyses, total RNA was reverse-transcribed using High capacity cDNA Reverse transcription kit (Applied Biosystems™ ref 4368814). For sorted CD31-positive cells, a linear preamplification step was performed using the TaqMan® Pre-Amp Master Mix Kit protocol (Applied Biosystems™ ref 4488593). Real-time PCR was carried out using TaqMan™ Universal Master Mix II (Applied Biosystems™ ref 4440049) on the Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System. For gene expression, the TaqMan® probes listed below were used (Table 1). SARS-CoV-2 viral infection was assessed by the CDC 2019-Novel Coronavirus Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel as described elsewhere [82, 83]. All gene expression data were analyzed by the  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  method.

### Immunofluorescence staining and confocal microscopy

For immunohistochemistry of mouse brain sections, 40  $\mu\text{m}$ -thick floating sections were rinsed 4 times in 0.1 M PBS pH 7.4 and blocked for 30 min at room temperature in blocking solution (PBS containing 0.1% BSA, 10% normal donkey serum and 0.4% Triton X-100). Sections were incubated overnight at  $4^{\circ}\text{C}$  with a mix of primary antibodies diluted in blocking solution (see Antibody Table 2). The sections were washed three times in PBS and incubated at room temperature for 2 h with Alexa Fluor-conjugated secondary antibodies (1:500 dilutions in blocking solution). After three washes with PBS, nuclei were counterstained by incubating the sections for 3 min in DAPI (dilution 1:5,000 in PBS) before mounting and coverslip with homemade Mowiol.

### Brain vascular pathology analysis

For string vessel measurements, pepsin antigen retrieval was performed for 5 min at  $37^{\circ}\text{C}$  (0.1 mg  $\text{ml}^{-1}$  pepsin in PBS, 0.2 N HCl) on 50  $\mu\text{m}$  thick brain sections. For vascular density, an antigen retrieval procedure (20 min at  $95^{\circ}\text{C}$  in 10 mM sodium citrate solution) was performed before the staining. Sections were blocked with 3% BSA in PBS containing 0.1% Triton X-100 for 6 h at room temperature, and incubation with primary antibodies (collagen IV: Bio-Rad, #134001, 1:200; caveolin-1: Cell Signaling Technology, #3267, 1:400) was performed at  $4^{\circ}\text{C}$  overnight, while incubation with secondary antibodies was performed in

**Table 1** List of TaqMan<sup>®</sup> probes used in this study

Code	Gene	Protein or gene name
Mm01159006_m1	<i>Ace2</i>	Mouse angiotensin I converting enzyme (peptidyl-dipeptidase A) 2
Hs01085333_m1	<i>ACE2</i>	Human angiotensin I converting enzyme 2
Mm04207460_m1	<i>Cxcl1</i>	chemokine (C-X-C motif) ligand 1
Mm00436450_m1	<i>Cxcl2</i>	chemokine (C-X-C motif) ligand 2
Mm01263580_mH	<i>Elavl4</i>	ELAV-like protein 4 (Hu-antigen D, HuD)
Mm00434228_m1	<i>Il1b</i>	Interleukin-1 beta
Mm00446190_m1	<i>Il6</i>	interleukin 6
Mm01197662_m1	<i>Ms4a8a</i>	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 8A
Mm00476361_m1	<i>Nfkb1</i>	Nuclear factor NF-kappa-B p105 subunit
Mm01253208_m1	<i>Nrp1</i>	Neuropilin-1
Mm01242576_m1	<i>Pecam1</i>	Platelet endothelial cell-adhesion molecule
Mm00501346_m1	<i>Rela</i>	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (avian)
Mm03928990_g1	<i>Rn18s</i>	18S ribosomal RNA
Mm00443687_m1	<i>Tmprss2</i>	transmembrane protease, serine 2
Mm00443258_m1	<i>Tnf</i>	tumor necrosis factor, TNF-alpha
Mm01278455_m1	<i>Trem1</i>	triggering receptor expressed on myeloid cells 1

**Table 2** List of antibodies used in this study

Antibody	Host	Manufacturer	Reference	Dilution
Anti-SARS Cov 1/2 nucleocapsid protein	mMouse	Sino Biological	40,143-MM05	1:200
Anti-mouse	Donkey	Invitrogen	A10037	1:500
Anti-rabbit	Donkey	Invitrogen	A21206	1:500
Anti-chicken	Donkey	Jackson Immuno Research	703-605-155	

blocking solution at room temperature for 2 h. Images were taken using a confocal laser scanning microscope (Leica, SP5). For all analyses, we imaged four fields from at least two sections per mouse and analysis was performed blinded using ImageJ.

## RNAscope

In situ hybridization was carried out using the protocol from Advanced Cell Diagnostics (ACDBio), following the manufacturer's guidelines (Cat. No. 323100, RNAscope<sup>®</sup> Multiplex Fluorescent Reagent Kit v2). To minimize the degradation of the RNA, all the solutions were prepared in Diethyl pyrocarbonate (DEPC, Sigma) treated water (DEPC-H<sub>2</sub>O). 18- $\mu$ m thick brain sections, mounted onto SuperFrost Plus Slides (Thermo Fisher), and fixed with PFA 4%, was dehydrated in ethanol 50%, 70% and 100% two times. For hybridization protocol, we followed the manufacturer's guideline and reagents. Using the probes for mouse *Mtnr1a-C3* (cat. No. 403601-C3, lot:21132B), *Mtnr1b* (cat. No. 502451, lot:21132B) designed by ACDBio. 3-plex negative and 3-plex positive probes were used as negative and positive controls. The positive probe hybridized with mouse *Ubc*, *Ppib* and *Polr2a* mRNA, and the negative probe hybridized

with bacterial *DapB* mRNA (both provided by ACDBio). After RNAscope<sup>®</sup> assays, a classical immunofluorescence was performed using the Anti-Collagen IV primary antibody (Anti-Collagen IV, Abcam: ab6586, 1:500<sup>o</sup>) and a secondary Alexa488 Fluor-conjugated antibody (1:500; Molecular Probes, Invitrogen) and DAPI (ACDBio) was used to stain the nuclei. Sections were analyzed using an Axio Imager.Z2 ApoTome microscope (Zeiss, Germany), equipped with a motorized stage and an AxioCam MRm camera (Zeiss, Germany). High-magnification photomicrographs were acquired with a  $\times 63$  objective (NA 1.4) using an inverted confocal microscope (LSM 710, Zeiss). Images of target probes and control probes were taken at the same exposure and acquisition parameters.

## Cell culture and transfection

### HEK293T cells

HEK293T (RRID:CVCL 0063) cells were obtained from Sigma-Aldrich and authenticated by the provider. Cell cultures were maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) Glutamax (Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% streptomycin:penicillin,

at 37 °C (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>). Cell lines were checked regularly for any mycoplasma contamination.

### hCMEC/D3 cells

For M<sup>pro</sup>-induced cell death assay, hCMEC/D3 cells were cultivated and transfected as described previously [33]. Briefly, after withdrawing heparin from the medium, we transfected the cells using Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific) and the following plasmids: pCAG-GFP, pCAG-p.Cys145Ala-Mpro-HA or pCAG-Mpro-HA (100 ng per well on 96-well plates). After lipofection, cells were treated with melatonin, AgoMLT, RML (all 100 μM) or DMSO as control for 48 h before they were fixed using 4% PFA for 20 min at room temperature. Staining was performed as described above using primary antibodies against GFP (Abcam, #ab13970, 1:2000) and DAPI (1:2000), and imaged using a fluorescence microscope (DMI6000B, Leica). Analysis was performed blinded using ImageJ.

For pseudo-virus luciferase reporter assay, hCMEC/D3 cells were transduced with lentivirus containing hACE2 transcript (BPS Bioscience) at a MOI of 5. Cultures were enriched with positively-transduced cells by antibiotic resistance selection (puromycin resistance gene delivered by the same lentivirus; puromycin at 1 μg/mL, for 7 days), and used as described in the pseudo-virus luciferase reporter assay.

### TR-FRET binding assay

Recombinant RBD proteins were purchased from SinoBiological (Beijing, China) and reconstituted in water according to provider's instructions. Fluorescently labeled spike RBD proteins were obtained by custom labeling of the recombinant proteins with d2 fluorophore on lysines with N-hydroxysuccinimide activated d2 dye in 100 mM PO<sub>4</sub> buffer (pH8) by Cisbio Bioassays. SNAP-tagged human ACE2 construct was designed as previously reported [43].

SNAP-tagged ACE2, expressed in HEK293 cells, were fluorescently labeled by incubating cells with a SNAP suicide substrate conjugated to the long-lived fluorophore Terbium cryptate (Tb; Lumi4-Tb, 100 nM; Cisbio Bioassays) in Tag-lite labeling medium (1 h, on ice) [84]. After several washes, cells were collected using enzyme-free cell dissociation buffer (Sigma-Aldrich), re-suspended in Tag-lite buffer and distributed into a 384-well plate. Cells were pre-incubated (1 h) with melatonin at the indicated concentration followed by addition of RBD-d2 (final reaction volume of 14 μl). Melatonin was reconstituted in DMSO at 100 mM stock solution and further dilution were made in either PBS or DMEM culture medium. Final concentration of DMSO was of 0.1% maximum. After 2 h incubation (room temperature), TR-FRET signals were detected using a plate reader (Tecan F500; Tecan, Männedorf, Switzerland) with the

following settings: excitation at 340 nm (Tb, energy donor), emission at 665 nm (d2, acceptor) and 620 nm (donor); delay of 150 μs; and integration time of 500 μs. Data are expressed as TR-FRET ratio (acceptor/donor). When indicated, TR-FRET ratio was normalized to % of basal or % of control group.

### TR-FRET ACE2 conformation assay

ACE2 conformational changes were assessed by performing intramolecular TR-FRET assay, as previously described [43]. Briefly, Lumi4-Tb-labeled ACE2 cells were incubated with d2-labeled anti-FLAG tag antibody (2 μg/mL, 1 h at room temperature; 61FG2DLF, Cisbio Bioassays), followed by addition of non-labeled RBD (5 nM) or melatonin (100 μM) and TR-FRET signal was immediately read during 1 h. Data are expressed as delta-TR-FRET ratio, corresponding to the difference in TR-FRET ratio signal between vehicle- and compounds-treated groups.

### In vitro ACE2-binding assay

In vitro binding of spike S1 to ACE2 in the absence or presence of melatonin was performed using a commercially available ACE2:SARS-CoV-2 spike S1 inhibitor screening assay kit (BPS Bioscience, San Diego, USA). The assay is based on Streptavidin-HRP detection of spike S1-Biotin protein bound to ACE2-coated wells in a 96-well plate. Compounds were pre-incubated with spike S1-Biotin (10 nM, 1 h, RT) and then added to the ACE2-coated wells. After several washes, streptavidin-HRP solution is added (1 h, RT) followed by addition of HRP substrate to produce chemiluminescence, which is then measured using a chemiluminescence reader.

### ACE2 enzyme activity assay

The exopeptidase activity of ACE2 was measured using commercially available kit (BPS Bioscience, San Diego, USA). The assay is based on fluorescent detection of a fluorogenic ACE2 substrate, incubated with recombinant ACE2 (1 h, RT) in the absence or presence of competitors (melatonin or DX600 (10 μM) competitor as positive control).

### SARS-CoV-2 cell entry assay

SARS-CoV-2 cell entry was assessed using a pseudo-virus luciferase reporter assay (BPS Bioscience). The SARS-CoV-2 spike pseudo-type lentivirus is produced with SARS-CoV-2 spike as the envelope glycoproteins. Since the pseudo-virions also contain the firefly luciferase gene, the spike-mediated cell entry is monitored via luciferase reporter

activity. ACE2-expressing HEK293 cells or hCMEC/D3 cells were pre-incubated with melatonin (1 h, 37 °C), followed by addition and incubation with the SARS-CoV-2 spike pseudo-type lentivirus (1 h, 37 °C). Cells were then washed, medium was replaced by OptiMEM medium, and 48 h post transduction, the luciferase activity was read by adding luciferase substrate (ONE-Glo EX luciferase assay system, Promega, Wisconsin, USA) using a luminescence plate reader (Envision, Perkin Elmer, Massachusetts, USA).

## Computational chemistry

Molecular system of RBD-ACE2 (6VW1 PDB entry, <http://doi.org/10.2210/pdb6VW1/pdb>) fully glycosylated with N-glycan penta-saccharides was extracted from the COVID-19 Proteins Library of the CHARMM-GUI Archive (<https://doi.org/10.1002/jcc.20945>). Docking of melatonin into RBD-ACE2 was performed using Autodock Vina docking engine [85] integrated into the UCSF Chimera software [86] with an exploration box including the whole RBD molecule-ACE2 complex. Molecular dynamics simulations were computed with GROMACS 2020.5 [87]. Structural models were hydrated with explicit TIP3P solvent water molecules into a triclinic box of approximately 80 Å × 90 Å × 130 Å. Then, 77 water molecules were substituted by 97 chloride and 123 sodium ions to neutralize the solute with a NaCl solution at 0.16 M. All calculations were performed with the CHARMM36m force field [88], and topology of melatonin was carried out from the CGenFF web server [89]. After harmonic restrains were applied to its  $\alpha$ -carbon trace, the system underwent successively 50,000 steps of steepest descent energy minimization, 100 ps of NVT equilibration at 300 K with the V-re-scale modified Berendsen thermostat, and 100 ps of NPT equilibration with Berendsen barostat. Restraints were left to produce triplicated molecular dynamics trajectories of 500 ns each. Differential analysis of RBD-ACE2 intermolecular interaction between both in complex with or without melatonin was performed with SINAPs tool (Renault et al., *J Chem Inf Model*, 2021, accepted) dedicated to highlight hydrogen bonds, salt bridges, and aromatic stacking exclusive to one of two trajectories.

## Statistical analysis

Data shown as the means  $\pm$  SEM. Sample sizes were designed to give statistical power while minimizing animal use. All statistical comparisons were performed using Prism 9 (GraphPad). The specific statistical tests used for each experiment are indicated in the figure legends. One- or Two-way ANOVA with two-stage linear step-up procedure of Benjamini, Krieger and Yekutieli as post test for multiple comparisons or uncorrected Tukey's test was applied

and statistical significance was determined as  $p$  value  $< 0.05$  ( $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$ ,  $****p < 0.0001$ ).

**Supplementary Information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04390-3>.

**Acknowledgements** We thank all the members of the Jockers lab, Drs Morgane Bomsel, Fernando Real (Institut Cochin) and Francisco Foriestiero (Sao Paulo) for the discussion at the initial phase of the project and Dr. Lara Jehi and her team (Cleveland Clinic) for assistance and Dr Loïc LE GUENNEC (Institut Cochin) for advices and discussion. We thank Wiebke Brandt and Beate Lembrich (both Lübeck) for expert technical assistance. The SARS-CoV-2 strain *BetaCoV/France/IDF/200107/2020* was kindly provided by Dr JC. Manuguerra, CIBU, Pasteur Institute. The authors thank Dr Pierre Olivier Couraud for the human hCMEC/D3 BBB cell line. The authors thank the Mesocenter of Lille University for computational resource.

**Author contributions** Conceptualization, EC, MS, VP, JD, and RJ; In vivo experiments: EC, CI, BK, SLP and JD; Biochemical investigation: EC, DF, CFFC, JW, SG and JD; Molecular docking and simulations NR, CB, EC; Data analysis EC, DF, CFFC, JW, JD, RJ; Writing—original draft, EC, NR, JD and RJ; Writing—review and editing, EC, NR, JW, MS, VP, JD, RJ.

**Funding** This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche ((ANR-RA-COVID-19 (ANR-20-COV4-0001 to RJ), (ANR-19-CE16-0025-01 to RJ), (ANR-16-CE18-0013 to JD)), by ANRS (Grant No ANRS 0167) to RJ, MS and VP and the European Research Council (ERC Synergy WATCH, No. 810331) to VP and MS, by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Deutsche Forschungsgemeinschaft (WE 6456/1-1 to J.W.). RJ was supported by the Fondation de la Recherche Médicale (Equipe FRM DEQ20130326503) and La Ligue Contre le Cancer N/Ref: RS19/75-127 and E.C. by the Association France Alzheimer (grant No. 2042). JD was supported by the Fondation de France.

**Availability of data and materials** The authors declare that all data supporting the findings of this study are available within the paper and its supplementary information files.

## Declarations

**Conflict of interest** The authors declare no competing interest.

**Ethics approval and consent to participate** All animal experiments were approved by the ANSES/EnvA/UPEC Ethics Committee (CE2A-16) and authorized by the French ministry of Research under the number APAFIS#25384-2020041515287655 v6, in accordance with the French and European regulations.

**Consent for publication** Not applicable.

## References

1. Wadman M, Couzin-Frankel J, Kaiser J, Maticic C (2020) A rampage through the body. *Science* 368(6489):356–360
2. Puelles VG, Lutgehetmann M, Lindenmeyer MT, Sperhake JP, Wong MN, Allweiss L, Chilla S, Heinemann A, Wanner N, Liu

- S et al (2020) Multiorgan and renal tropism of SARS-CoV-2. *N Engl J Med* 383(6):590–592
3. Paniz-Mondolfi A, Bryce C, Grimes Z, Gordon RE, Reidy J, Lednicki J, Sordillo EM, Fowkes M (2020) Central nervous system involvement by severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2). *J Med Virol* 92(7):699–702
  4. Meinhardt J, Radke J, Dittmayer C, Franz J, Thomas C, Mothes R, Laue M, Schneider J, Brunink S, Greuel S et al (2021) Olfactory transmucosal SARS-CoV-2 invasion as a port of central nervous system entry in individuals with COVID-19. *Nat Neurosci* 24(2):168–175
  5. Iadecola C, Anrather J, Kamel H (2020) Effects of COVID-19 on the nervous system. *Cell* 183(1):16–27 e11
  6. Doyle MF (2021) Central nervous system outcomes of COVID-19. *Transl Res*. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2021.09.002>
  7. [https://www.who.int/publications/i/item/WHO-2019-nCoV-Post\\_COVID-19\\_condition-Clinical\\_case\\_definition-2021.1](https://www.who.int/publications/i/item/WHO-2019-nCoV-Post_COVID-19_condition-Clinical_case_definition-2021.1)
  8. Nalbandian A, Sehgal K, Gupta A, Madhavan MV, McGroder C, Stevens JS, Cook JR, Nordvig AS, Shalev D, Sehwawat TS et al (2021) Post-acute COVID-19 syndrome. *Nat Med* 27(4):601–615
  9. Xie Y, Bowe B, Al-Aly Z (2021) Burdens of post-acute sequelae of COVID-19 by severity of acute infection, demographics and health status. *Nat Commun* 12(1):6571
  10. Taquet M, Geddes JR, Husain M, Luciano S, Harrison PJ (2021) 6-month neurological and psychiatric outcomes in 236 379 survivors of COVID-19: a retrospective cohort study using electronic health records. *Lancet Psychiatry* 8(5):416–427
  11. Achar A, Ghosh C (2020) COVID-19-associated neurological disorders: the potential route of CNS invasion and blood-brain relevance. *Cells* 9(11):2360
  12. Erickson MA, Rhea EM, Knopp RC, Banks WA (2021) Interactions of SARS-CoV-2 with the blood-brain barrier. *Int J Mol Sci* 22(5):2681
  13. Frank MG, Nguyen KH, Ball JB, Hopkins S, Kelley T, Baratta MV, Fleshner M, Maier SF (2022) SARS-CoV-2 spike S1 subunit induces neuroinflammatory, microglial and behavioral sickness responses: evidence of PAMP-like properties. *Brain Behav Immun* 100:267–277
  14. Rhea EM, Logsdon AF, Hansen KM, Williams LM, Reed MJ, Baumann KK, Holden SJ, Raber J, Banks WA, Erickson MA (2021) The S1 protein of SARS-CoV-2 crosses the blood-brain barrier in mice. *Nat Neurosci* 24(3):368–378
  15. Iroegbu JD, Ifenatuoha CW, Ijomone OM (2020) Potential neurological impact of coronaviruses: implications for the novel SARS-CoV-2. *Neurol Sci* 41(6):1329–1337
  16. Wu Y, Xu X, Chen Z, Duan J, Hashimoto K, Yang L, Liu C, Yang C (2020) Nervous system involvement after infection with COVID-19 and other coronaviruses. *Brain Behav Immun* 87:18–22
  17. Cardinali DP (2019) Melatonin: clinical perspectives in neurodegeneration. *Front Endocrinol (Lausanne)* 10:480
  18. Liu L, Labani N, Cecon E, Jockers R (2019) Melatonin target proteins: too many or not enough? *Front Endocrinol (Lausanne)* 10:791
  19. Jockers R, Delagrèze P, Dubocovich ML, Markus RP, Renault N, Tosini G, Cecon E, Zlotos DP (2016) Update on melatonin receptors. *IUPHAR review*. *Br J Pharmacol* 173(18):2702–2725
  20. Liu J, Clough SJ, Hutchinson AJ, Adamah-Biassi EB, Popovska-Gorevski M, Dubocovich ML (2016) MT1 and MT2 melatonin receptors: a therapeutic perspective. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 56:361–383
  21. de Bodinat C, Guardiola-Lemaitre B, Mocaer E, Renard P, Munoz C, Millan MJ (2010) Agomelatine, the first melatonergic antidepressant: discovery, characterization and development. *Nat Rev Drug Discov* 9(8):628–642
  22. Schrire ZM, Phillips CL, Chapman JL, Duffy SL, Wong G, D'Rozario AL, Comas M, Raisin I, Saini B, Gordon CJ et al (2021) Safety of higher doses of melatonin in adults: a systematic review and meta-analysis. *J Pineal Res* e12782
  23. Artigas L, Coma M, Matos-Filipe P, Aguirre-Plans J, Farres J, Valls R, Fernandez-Fuentes N, de la Haba-Rodriguez J, Olvera A, Barbera J et al (2020) In-silico drug repurposing study predicts the combination of pirfenidone and melatonin as a promising candidate therapy to reduce SARS-CoV-2 infection progression and respiratory distress caused by cytokine storm. *PLoS ONE* 15(10):e0240149
  24. Zhou Y, Hou Y, Shen J, Huang Y, Martin W, Cheng F (2020) Network-based drug repurposing for novel coronavirus 2019-nCoV/SARS-CoV-2. *Cell Discov* 6:14
  25. Romero A, Ramos E, Lopez-Munoz F, Gil-Martin E, Escames G, Reiter RJ (2020) Coronavirus disease 2019 (COVID-19) and its neuroinvasive capacity: is it time for melatonin? *Cell Mol Neurobiol*
  26. Cardinali DP, Brown GM, Pandi-Perumal SR (2020) Can melatonin be a potential “silver bullet” in treating COVID-19 patients? *Diseases* 8(4):44
  27. Reynolds JL, Dubocovich ML (2021) Melatonin multifaceted pharmacological actions on melatonin receptors converging to abrogate COVID-19. *J Pineal Res* 71:e12732
  28. Gholizadeh M, Abaj F, Hasani H, Mirzababaei A, Mirzaei K (2021) Does the melatonin supplementation decrease the severity of the outcomes in COVID-19 patients? A mini review of observational data in the in vivo and in vitro studies. *Melatonin Res* 4(2):348–359
  29. Cecon E, Isabelle C, Poder SL, Real F, Zhu A, Tu L, Ghigna MR, Klonjowski B, Bomsel M, Jockers R et al (2022) Therapeutic potential of melatonin and melatonergic drugs on K18-hACE2 mice infected with SARS-CoV-2. *J Pineal Res* 72(1):e12772
  30. Golden JW, Cline CR, Zeng X, Garrison AR, Carey BD, Mucker EM, White LE, Shamblin JD, Brocato RL, Liu J et al (2020) Human angiotensin-converting enzyme 2 transgenic mice infected with SARS-CoV-2 develop severe and fatal respiratory disease. *JCI Insight*. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.142032>
  31. Oladunni FS, Park JG, Pino PA, Gonzalez O, Akhter A, Allue-Guardia A, Olmo-Fontanez A, Gautam S, Garcia-Vilanova A, Ye C et al (2020) Lethality of SARS-CoV-2 infection in K18 human angiotensin-converting enzyme 2 transgenic mice. *Nat Commun* 11(1):6122
  32. Andersen LP, Werner MU, Rosenkilde MM, Harpsøe NG, Fuglsang H, Rosenberg J, Gogenur I (2016) Pharmacokinetics of oral and intravenous melatonin in healthy volunteers. *BMC Pharmacol Toxicol* 17:8
  33. Wenzel J, Lampe J, Müller-Fielitz H, Schuster R, Zille M, Müller K, Krohn M, Korbelen J, Zhang L, Ozorhan U et al (2021) The SARS-CoV-2 main protease M(pro) causes microvascular brain pathology by cleaving NEMO in brain endothelial cells. *Nat Neurosci* 24(11):1522–1533
  34. Moreau GB, Burgess SL, Sturek JM, Donlan AN, Petri WA, Mann BJ (2020) Evaluation of K18-hACE2 mice as a model of SARS-CoV-2 infection. *Am J Trop Med Hyg* 103(3):1215–1219
  35. Ramos E, Lopez-Munoz F, Gil-Martin E, Egea J, Alvarez-Merz I, Painuli S, Semwal P, Martins N, Hernandez-Guijo JM, Romero A (2021) The coronavirus disease 2019 (COVID-19): key emphasis on melatonin safety and therapeutic efficacy. *Antioxidants (Basel)* 10(7):1152
  36. Wu J, Chen ZJ (2014) Innate immune sensing and signaling of cytosolic nucleic acids. *Annu Rev Immunol* 32:461–488
  37. Gilad E, Wong HR, Zingarelli B, Virag L, O'Connor M, Salzman AL, Szabo C (1998) Melatonin inhibits expression of the inducible

70. Jacob S, Poeggeler B, Weishaupt JH, Siren AL, Hardeland R, Bahr M, Ehrenreich H (2002) Melatonin as a candidate compound for neuroprotection in amyotrophic lateral sclerosis (ALS): high tolerability of daily oral melatonin administration in ALS patients. *J Pineal Res* 33(3):186–187
71. Nordlund JJ, Lerner AB (1977) The effects of oral melatonin on skin color and on the release of pituitary hormones. *J Clin Endocrinol Metab* 45(4):768–774
72. Karim A, Tolbert D, Cao C (2006) Disposition kinetics and tolerance of escalating single doses of ramelteon, a high-affinity MT1 and MT2 melatonin receptor agonist indicated for treatment of insomnia. *J Clin Pharmacol* 46(2):140–148
73. Johnson MW, Suess PE, Griffiths RR (2006) Ramelteon: a novel hypnotic lacking abuse liability and sedative adverse effects. *Arch Gen Psychiatry* 63(10):1149–1157
74. Loo H, Dalery J, Macher JP, Payen A (2003) Pilot study comparing in blind the therapeutic effect of two doses of agomelatine, melatonin-agonist and selective 5HT<sub>2c</sub> receptors antagonist, in the treatment of major depressive disorders. *Encephale* 29(2):165–171
75. Eser D, Baghai TC, Moller HJ (2010) Agomelatine: the evidence for its place in the treatment of depression. *Core Evid* 4:171–179
76. Boutin JA, Jockers R (2021) Melatonin controversies, an update. *J Pineal Res* 70(2):e12702
77. Weishaupt JH, Bartels C, Polking E, Dietrich J, Rohde G, Poeggeler B, Mertens N, Sperling S, Bohn M, Huther G et al (2006) Reduced oxidative damage in ALS by high-dose enteral melatonin treatment. *J Pineal Res* 41(4):313–323
78. Cully M (2022) A tale of two antiviral targets - and the COVID-19 drugs that bind them. *Nat Rev Drug Discov* 21(1):3–5
79. Ma X, Idle JR, Krausz KW, Gonzalez FJ (2005) Metabolism of melatonin by human cytochromes p450. *Drug Metab Dispos* 33(4):489–494
80. Liu X, Lu YF, Guan X, Zhao M, Wang J, Li F (2016) Characterizing novel metabolic pathways of melatonin receptor agonist agomelatine using metabolomic approaches. *Biochem Pharmacol* 109:70–82
81. Gross LZ, Sacerdoti M, Piper A, Zeuzem S, Leroux AE, Biondi RM (2020) ACE2, the receptor that enables infection by SARS-CoV-2: biochemistry, structure, allostery and evaluation of the potential development of ACE2 modulators. *ChemMedChem* 15(18):1682–1690
82. Sekulic M, Harper H, Nezami BG, Shen DL, Sekulic SP, Koeth AT, Harding CV, Gilmore H, Sadri N (2020) Molecular detection of SARS-CoV-2 infection in FFPE samples and histopathologic findings in fatal SARS-CoV-2 cases. *Am J Clin Pathol* 154(2):190–200
83. Rhoads DD, Cherian SS, Roman K, Stempak LM, Schmotzer CL, Sadri N (2020) Comparison of Abbott ID now, DiaSorin Simplexa, and CDC FDA emergency use authorization methods for the detection of SARS-CoV-2 from nasopharyngeal and nasal swabs from individuals diagnosed with COVID-19. *J Clin Microbiol*. <https://doi.org/10.1128/JCM.00760-20>
84. Keppler A, Gendreizig S, Gronemeyer T, Pick H, Vogel H, Johnsson K (2003) A general method for the covalent labeling of fusion proteins with small molecules in vivo. *Nat Biotechnol* 21(1):86–89
85. Trott O, Olson AJ (2010) AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem* 31(2):455–461
86. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE (2004) UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* 25(13):1605–1612
87. Abraham MJ, Murtola T, Schulz R, Palla S, Smith JC, Hess B, Lindahl E (2015) GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX* 1–2:19–25
88. Huang J, Rauscher S, Nawrocki G, Ran T, Feig M, de Groot BL, Grubmuller H, MacKerell AD Jr (2017) CHARMM36m: an improved force field for folded and intrinsically disordered proteins. *Nat Methods* 14(1):71–73
89. Vanommeslaeghe K, Hatcher E, Acharya C, Kundu S, Zhong S, Shim J, Darian E, Guvench O, Lopes P, Vorobyov I et al (2010) CHARMM general force field: a force field for drug-like molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force fields. *J Comput Chem* 31(4):671–690

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

## **Etude 2 – Les troubles cognitifs et le déficit en hormones sexuelles masculines pourrait être liés à la mort de neurones à GnRH (Article 2)**

---

Les neurones sécrétant la GnRH constituent une population clairsemée de quelques milliers de cellules chez l'homme, principalement situées dans le noyau infundibulaire de la région tubéreuse de l'hypothalamus (Baroncini et al., 2007; Casoni et al., 2016). Ces neurones envoient des projections vers la zone externe de l'éminence médiane, où ils libèrent la neurohormone à proximité du système porte hypophysaire, caractérisé par capillaires aux parois « fenêtrées » (Baroncini et al., 2007). Ces capillaires sont donc hautement perméables, contrairement à la couche endothéliale fermée et sélective de la BHE (Schaeffer & Iadecola, 2021; Sisó et al., 2010). Dans la zone externe de l'éminence médiane, ces terminaisons neuronales à GnRH s'entremêlent et sont engainées par les pieds des tanocytes, des cellules spécialisées de type glie radiale qui forment le plancher et les parois du troisième ventricule (Baroncini et al., 2007; Clasadonte & Prevot, 2018; Prevot et al., 2018). L'absence de la BHE traditionnelle portée par les vaisseaux et la présence de cellules endothéliales à l'endothélium fenêtré dans l'éminence médiane permet non seulement aux neurohormones peptidiques telles que la GnRH d'atteindre facilement leurs cellules cibles dans l'hypophyse via la circulation porte hypothalamo-hypophysaire, mais aussi aux signaux périphériques circulants d'entrer dans le parenchyme cérébral par diffusion passive et être potentiellement pris en charge par les tanocytes et être transporté de manière active dans le liquide céphalorachidien (Prevot et al., 2018). Or, dans le contexte d'une infection virale, cette adaptation, nécessaire au maintien de l'homéostasie corporelle en permettant l'échange d'informations entre le cerveau et la périphérie, pourrait au contraire représenter une brèche dans le système de défense du cerveau contre les agents pathogènes (Pellegrini et al., 2020; Schulz & Engelhardt, 2005).

Actuellement, plusieurs études ont montré que les patients masculins atteints de COVID-19 présentent des taux de testostérone circulante inférieurs à ceux des non-infectés : il s'agit d'un effet qui peut durer plusieurs mois après la guérison de l'infection (Salonia et al., 2022). L'hypotestostéronémie est aussi corrélée à des moins bons pronostics (Cinislioglu et al., 2022; Dhindsa et al., 2021; Vena et al., 2022). Cependant, des patients ayant de la COVID-19 modérée ou légère sont aussi au risque de présenter une chute dans les taux de testostérone (Cinislioglu et al., 2022; H. E. Davis et al., 2023). L'infection de hamsters mâles par le SARS-CoV2 peut aussi résulter en une chute de la testostéronémie, même s'ils ne développent pas une pathologie

sévère (Li et al., 2022). Notre travail a utilisé des échantillons de sang de patients humains COVID-19 et des cerveaux post mortem, ainsi que des tissus fœtaux humains et des lignées cellulaires, nous avons cherché à savoir si cet hypogonadisme chez les patients COVID-19 pourrait être dû à l'infection des neurones à GnRH hypothalamiques plutôt qu'à des effets purement périphériques, comme il était supposé jusqu'à présent.

Dans notre travail, nous avons retrouvés des marqueurs du SARS-CoV2 dans l'hypothalamus de trois patients décédés des suites de la COVID-19, notamment dans les tanocytes de l'éminence médiane. J'ai contribué à cette publication avec des expériences d'immunomarquage et les RT-PCRs. Cela suggère que cet organe circumventriculaire pourrait être l'une des portes d'entrée du cerveau pour le virus SARS-CoV2, tout comme pourraient l'être les plexus choroïdes (Pellegrini et al., 2020).

Nous avons évalué deux cohortes de patients COVID19 masculins. L'une issue de l'USI du CHU de Lille et une autre suivie à l'Impérial College London qui comportait des volontaires non hospitalisés, mais qui ont bénéficié d'un suivi 3 mois et 1 an après l'infection par le SARS-CoV2. Suite à l'analyse des taux sériques de testostérone, de LH et de FSH des deux cohortes, nous avons identifié dans chacune des cohortes de patients ayant développés une hypotestostéronémie liée à un l'hypogonadisme hypogonadotrope. Malgré le fait que les patients admis en soin intensif développent un hypogonadisme hypogonadotrope même en absence d'une infection par le SARS-CoV2 (Spratt et al., 1993), la présence de ce trouble chez les personnes non hospitalisées plusieurs mois après l'infection suggère l'existence d'une altération de la fonction hypothalamique suite à l'infection virale.

Finalement, notre étude montre que les neurones à GnRH hypothalamiques peuvent être directement infectés par le SARS-CoV2 et que la COVID19 peut induire la mort par apoptose de ces neurones. La capacité des neurones à GnRH à être infectés par ce virus a été confirmée sur une lignée fœtale de neurones à GnRH humaine, les cellules FNC-B4. L'atteinte des neurones à GnRH pourrait expliquer la survenue d'un hypogonadisme hypogonadotrope chez certains patients développant une COVID longue, mais aussi peut-être expliquer les altérations cognitives chez certains d'entre eux. En effet, une étude récente du laboratoire a démontré qu'en plus d'être impliquée dans le contrôle de la reproduction, l'activité des neurones à GnRH était nécessaire au maintien des performances cognitives tout au long de la vie (Manfredi-Lozano et al., 2022; Prévot et al., 2023).

# Long-COVID cognitive impairments and reproductive hormone deficits in men may stem from GnRH neuronal death



Florent Sauve,<sup>a,†</sup> Sreekala Nampoothiri,<sup>a,†</sup> Sophie A. Clarke,<sup>b,†</sup> Daniela Fernandes,<sup>a,‡</sup> Caio Fernando Ferreira Coêlha,<sup>a,†</sup> Julie Dewisme,<sup>a,†</sup> Edouard G. Mills,<sup>b</sup> Gaetan Ternier,<sup>a</sup> Ludovica Cotellessa,<sup>a</sup> Cristina Iglesias-Garcia,<sup>a</sup> Helge Mueller-Fielitz,<sup>a</sup> Thibaud Lebouvier,<sup>a,†</sup> Romain Perbet,<sup>a,†</sup> Vincent Florent,<sup>a</sup> Marc Baroncini,<sup>a</sup> Ariane Sharif,<sup>a</sup> June Ereño-Orbea,<sup>a,§</sup> María Mercado-Gómez,<sup>a,§</sup> Asis Palazon,<sup>a,§</sup> Virginie Mattot,<sup>a</sup> Florence Pasquier,<sup>a,†</sup> Sophie Catteau-Jonard,<sup>a,‡</sup> María Martínez-Chantar,<sup>a,§</sup> Erik Hrabovszky,<sup>a</sup> Mercè Jourdain,<sup>a</sup> Dominique Deplanque,<sup>a,‡,¶</sup> Annamaria Morelli,<sup>a</sup> Giulia Guamieri,<sup>a</sup> Laurent Storme,<sup>a</sup> Cynil Robil,<sup>a</sup> François Trottein,<sup>a</sup> Ruben Nogueiras,<sup>a</sup> Markus Schwaninger,<sup>a</sup> Pascal Pigry,<sup>a,†</sup> Julien Poissy,<sup>a,‡</sup> Konstantina Chachlaki,<sup>a,†</sup> Claude-Alain Maurage,<sup>a,‡,¶</sup> Paolo Giacobini,<sup>a,¶</sup> Waljit Dhilla,<sup>b,\*,§</sup> S. Rasika,<sup>a,\*,§,¶</sup> and Vincent Prevot<sup>a,\*,§,¶</sup>

<sup>a</sup>Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, Lille Neuroscience & Cognition, UMR-S 1172, DistAlz, Lille, France

<sup>b</sup>Section of Endocrinology and Investigative Medicine, Imperial College London, London, United Kingdom

<sup>c</sup>CHU Lille, Department of Pathology, Centre Biologie Pathologie, France

<sup>d</sup>CIMUS, Universidade de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, 15782, Spain

<sup>e</sup>Institute for Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology, University of Lübeck, Lübeck, Germany

<sup>f</sup>CHU Lille, Department of Neurology, Memory Centre, Reference Centre for Early-Onset Alzheimer Disease and Related Disorders, Lille, France

<sup>g</sup>CIC bioGUNE, Basque Research and Technology Alliance (BRTA) Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

<sup>h</sup>CHU Lille, Department of Gynecology and Obstetrics, Jeanne de Flandres Hospital, F-59000, Lille, France

<sup>i</sup>Laboratory of Reproductive Neurobiology, Institute of Experimental Medicine, Budapest, Hungary

<sup>j</sup>Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, Service de Médecine Intensive Réanimation, U1190, EGD, F-59000 Lille, France

<sup>k</sup>University Lille, Inserm, CHU Lille, Centre d'investigation Clinique (CIC) 1403, F-59000, Lille, France

<sup>l</sup>LICORNE Study Group, CHU Lille, Lille, France

<sup>m</sup>Department of Experimental and Clinical Medicine, University of Florence, Italy

<sup>n</sup>CHU Lille, Department of Neonatology, Hôpital Jeanne de Flandre, FHU 1000 Days for Health, F-59000, France

<sup>o</sup>University Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019 - UMR 9017 - CIIL - Center for Infection and Immunity of Lille, F-59000 Lille, France

<sup>p</sup>CHU Lille, Service de Biochimie et Hormonologie, Centre de Biologie Pathologie, Lille, France

<sup>q</sup>Univ. Lille, Inserm U1285, CHU Lille, Pôle de Réanimation, CNRS, UMR 8576 - UGSF - Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, F-59000, Lille, France

<sup>r</sup>Department of Endocrinology, Imperial College Healthcare NHS Trust, London, United Kingdom

<sup>s</sup>Bizkaia Technology Park, Building 801A, 48160, Derio, Bizkaia, Spain

## Summary

**Background** We have recently demonstrated a causal link between loss of gonadotropin-releasing hormone (GnRH), the master molecule regulating reproduction, and cognitive deficits during pathological aging, including Down syndrome and Alzheimer's disease. Olfactory and cognitive alterations, which persist in some COVID-19 patients, and long-term hypotestosteronaemia in SARS-CoV-2-infected men are also reminiscent of the consequences of deficient GnRH, suggesting that GnRH system neuroinvasion could underlie certain post-COVID symptoms and thus lead to accelerated or exacerbated cognitive decline.

**Methods** We explored the hormonal profile of COVID-19 patients and targets of SARS-CoV-2 infection in post-mortem patient brains and human fetal tissue.

**Findings** We found that persistent hypotestosteronaemia in some men could indeed be of hypothalamic origin, favouring post-COVID cognitive or neurological symptoms, and that changes in testosterone levels and body weight over time were inversely correlated. Infection of olfactory sensory neurons and multifunctional hypothalamic glia called tanycytes highlighted at least two viable neuroinvasion routes. Furthermore, GnRH neurons themselves were dying in all patient brains studied, dramatically reducing GnRH expression. Human fetal olfactory and

eBioMedicine

2023;96: 104784

Published Online 13

September 2023

[https://doi.org/10.](https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2023.104784)

[1016/j.ebiom.2023.](https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2023.104784)

104784

\*Corresponding author.

\*\*Corresponding author.

E-mail addresses: [vincent.prevot@inserm.fr](mailto:vincent.prevot@inserm.fr) (V. Prevot), [sowmyalakshmi.rasika@inserm.fr](mailto:sowmyalakshmi.rasika@inserm.fr) (S. Rasika).

<sup>†</sup>These authors contributed equally to this work.

<sup>‡</sup>These authors contributed equally to this work.

vomeroneasal epithelia, from which GnRH neurons arise, and fetal GnRH neurons also appeared susceptible to infection.

**Interpretation** Putative GnRH neuron and tanycyte dysfunction following SARS-CoV-2 neuroinvasion could be responsible for serious reproductive, metabolic, and mental health consequences in long-COVID and lead to an increased risk of neurodevelopmental and neurodegenerative pathologies over time in all age groups.

**Funding** European Research Council (ERC) grant agreements No 810331, No 725149, No 804236, the European Union Horizon 2020 research and innovation program No 847941, the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) and the Agence Nationale de la Recherche en Santé (ANRS) No ECTZ200878 Long Covid 2021 ANRS0167 SIGNAL, Agence Nationale de la recherche (ANR) grant agreements No ANR-19-CE16-0021-02, No ANR-11-LABEX-0009, No ANR-10-LABEX-0046, No ANR-16-IDEX-0004, Inserm Cross-Cutting Scientific Program HuDeCA, the CHU Lille Bonus H, the UK Medical Research Council (MRC) and National Institute of Health and care Research (NIHR).

**Copyright** © 2023 The Author(s). Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

**Keywords:** COVID-19; GnRH; Neurodevelopment; Cognition; Infertility; Hypothalamus

#### Research in context

##### Evidence before this study

Neuroendocrine neurons expressing the master reproductive hormone, gonadotropin-releasing hormone (GnRH), while mostly hypothalamic, have also been shown to migrate or project to parts of the brain involved in intellectual functions, and their correct maturation is important for brain development in general. Interestingly, cognitive deficits in both individuals with Down syndrome (DS), who display olfactory deficits, premature aging and an Alzheimer disease (AD)-like neurodegenerative pathology, as well as in animal models of DS and AD, appear to be associated with the deficient expression of GnRH. In addition, menopause/andropause, when gonadotropin levels are deregulated, is also associated with altered cognitive function. GnRH insufficiency due to age or disease might thus be a widespread mechanism underlying several types of cognitive decline over time. A significant proportion of male COVID-19 patients also display persistent low testosterone levels, reminiscent of absent or aberrant GnRH production, and SARS-CoV-2 has been shown to invade the brain. Taken together, these findings raise the possibility that in such patients, the GnRH system may be infected or dysfunctional, leading to the accelerated aging and cognitive deficits observed in patients with “long-COVID” or post-COVID syndrome. However, in what way and for how long GnRH neurons or their function may be affected in COVID-19 patients is still unknown.

##### Added value of this study

By studying the hormonal profile of male COVID-19 patients at different time points after infection, we found that persistent hypotestosteronaemia in some men could indeed be of hypothalamic origin, and that changes over time in testosterone levels and body weight, another physiological function regulated by the hypothalamus, were inversely correlated. Next, by looking for the targets of SARS-CoV-2 infection in post-mortem COVID-19 patient brains, we observed the infection of olfactory sensory neurons and multifunctional hypothalamic glia called tanycytes, highlighting at least two viable routes for viral entry into the brain and access to the GnRH system. Furthermore, GnRH neurons themselves were dying in all patient brains studied, dramatically reducing GnRH expression. Finally, our study of human fetal olfactory and vomeronasal epithelia, from which GnRH neurons arise, and fetal GnRH neurons indicates that GnRH neurons could also be susceptible to SARS-CoV-2 infection in fetuses or new-borns.

##### Implications of all the available evidence

SARS-CoV-2 is capable of invading the hypothalamus through at least 2 distinct invasion routes. The resulting dysfunction of GnRH neurons and tanycytes could thus be responsible for serious reproductive, metabolic, and mental health consequences in long-COVID patients, and may lead to a delayed increase in the risk of neurodevelopmental and neurodegenerative pathologies in all age groups.

## Introduction

The cognitive decline associated with age-related dementias, estimated to affect some 55 million people worldwide, is a growing problem in aging societies. In a ground-breaking study, we have recently shown that cognitive deficits in both individuals with Down

syndrome (DS), a disorder also characterized by olfactory deficits, premature aging and an Alzheimer disease (AD)-like neurodegenerative pathology,<sup>1</sup> as well as in a trisomic animal model of DS,<sup>2</sup> are caused by the progressive loss of expression of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) by neuroendocrine neurons in the

brain. Interestingly, although GnRH has long been considered to be merely the master hormone regulating the reproductive axis, GnRH neurons have been found to also migrate and project to brain regions implicated in intellectual functions.<sup>23</sup> Together with a similar association between GnRH and cognition in a mouse model of AD,<sup>2</sup> as well as the known association between menopause/andropause or gonadotropin levels and altered cognitive function,<sup>4,8</sup> these results suggest that GnRH insufficiency due to age or disease might be a widespread mechanism underlying several types of cognitive decline with age.<sup>9</sup>

COVID-19 infection also appears to be associated with accelerated aging and an increased risk of neurodegenerative conditions such as AD in affected patients.<sup>10–14</sup> In addition, despite the continued emergence of new variants of SARS-CoV-2, “long COVID” or “post-COVID-19 syndrome”, rather than acute infections, is becoming the major preoccupation from both the healthcare and economic points of view. While definitions of “long COVID” vary, a significant proportion of individuals infected with SARS-CoV-2 continue to experience symptoms consistent with reports of neuroinvasion by the virus, including fatigue, cognitive difficulties or “brain fog”, headaches and persistent anosmia, from several months to more than a year after the initial infection.<sup>15–28</sup> Interestingly, a significant proportion of male COVID-19 patients also display low testosterone levels that can persist for months after recovery from infection, reminiscent of absent or aberrant GnRH production or secretion and the dysfunction of the hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis.<sup>19,20</sup>

In light of the potentially serious population-wide repercussions of post-COVID-19 GnRH loss for age-related cognitive decline and accelerated or exacerbated neurodegeneration in the decades to come, we explored the link between these different signs and brain infection by SARS-CoV-2 using human COVID-19 patient blood samples, post mortem brains, fetal tissues and cell lines.

## Methods

### Ethics authorizations

All human tissues were obtained in accordance with French laws (Good Practice Concerning the Conservation, Transformation, and Transportation of Human Tissue to Be Used Therapeutically, published on December 29, 1998). Informed consent was obtained from all patients involved in the study.

Adult COVID-19 patient brains and blood samples and control brains were obtained under authorization for the GonadoCOVID study (French protocol # 2-20-056 id8504) and authorized by the Lille Neurobiobank.

The Imperial College London study was performed in accordance with the Declaration of Helsinki with ethical approval granted by the London Bridge Research Ethics Committee (REC ref 20/HRA/4110) and was registered

on the ISRCTN Trial Registry (ISRCTN15615697). All participants provided written informed consent prior to inclusion in the study.

The studies on human fetal tissue were approved by the French agency for biomedical research (Agence de la Biomédecine, Saint-Denis la Plaine, France, protocol no: PFS16-002). Non-pathological human fetuses were obtained at GW7, GW11 and GW14 from voluntarily terminated pregnancies after written informed consent from the donors (Gynaecology Department, Jeanne de Flandre Hospital, Lille, France).

### COVID-19 ICU patient blood sample and hormonal analysis (CHU Lille)

Sixty male patients, 35–82 years of age, admitted to the resuscitation unit of the Lille University Hospital with a positive COVID-19 PCR were included in the “GonadoCOVID” study (French protocol # 2-20-056 id8504). Exclusion factors were a previous history of cancer or cirrhosis. Due to the difficulty of following the menstrual cycles of female patients in the ICU, female patients were excluded. For each patient, blood samples yielding 2000 µl of serum were obtained during the first week following admission, at 2 weeks and at 4 weeks if still hospitalized. The sampling week was defined based on the day the samples were obtained, where D1, D3, D5 sampling days were grouped to Week 1; D7, D9, D14 to week 2 and D30 to week 4. Sixteen patients died while in the ICU. Patient profiles are provided in [Table S1](#).

The patients were categorized into four groups based on the severity of the decrease in testosterone (T) and LH levels (Group 1 = testosterone <2.88 ng/ml with LH ≤ 2 IU/L, Group 2 = testosterone <2.88 ng/ml with LH > 2 but <12 IU/L, Group 3 = testosterone <2.88 ng/ml with LH > 12 IU/L, Group 4 = testosterone >2.88 ng/ml).

### Control ICU patient blood sample and hormonal analysis (CHU Lille)

Non-COVID-19 infected ICU patients (n = 50) used as controls belonged to the READIAB study (PHRC 2007 of the French Ministry of Health and Social Affairs: READIAB-G4; ClinicalTrials.gov: NCT03055169), a prospective, observational, multicentre study conducted from April 2012 to August 2016 in the ICUs of six French hospitals. Enrolled patients were aged 28–87 years and admitted to the ICU for at least two organ failures, defined according to sequential organ failure assessment (SOFA) scores. Pregnant women, patients admitted for <48 h, and patients who, or whose family members/surrogates, did not give their consent were excluded. Blood samples were obtained during a 3-day observational period while the patients were in the ICU.

### Post-COVID-19 patient blood sample and hormonal analysis (Imperial College London)

Male participants for this study were recruited from a cohort of patients who attended Imperial College

Healthcare NHS Trust with a clinical suspicion of COVID-19 between March and November 2020. Additional participants were recruited via advertisements placed on social media asking for patients who had tested positive for COVID-19. All participants attended at least 3 months following diagnosis with COVID-19. Participants were aged  $\geq 18$  years with a diagnosis of COVID-19 confirmed using either real-time RT-PCR testing of a nasopharyngeal swab, confirmatory imaging (chest radiograph or computed tomography scan), or a positive serum SARS-CoV-2 IgG antibody test taken after symptom onset. Exclusion criteria included those prescribed steroids following recovery from COVID-19. Patient profiles are provided in [Table S2](#).

Participants ( $n = 47$ ) attended for their study visit at least 3 months following their initial presentation with COVID-19. This was part of a wider study<sup>11</sup> evaluating adrenal and thyroid function in COVID-19 survivors. Participants were non-fasting and study visits commenced between 8:00 and 9:30 AM to control for circadian hormonal changes. Participants ( $n = 22$ ) attended for a second follow-up visit more than 1 year after presentation with COVID-19 for a repeat measurement of serum LH, FSH and testosterone.

Serum LH, FSH and testosterone were measured using automated chemiluminescent immunoassays (Abbott Diagnostics, UK). Intra-assay and inter-assay coefficients of variation were as follows: LH, <5%; FSH, <5%; total testosterone, <5%; cortisol, <10%. Limits of detection for each assay were as follows: LH in international units per litre (IU/L), 0.07; FSH in IU/L, 0.05; total testosterone in nanomoles per litre (nmol/L).

#### COVID-19 patient and control brains

The brains of 4 subjects (3 males and 1 female) who died of COVID-19 infection in the Lille University Hospital and 5 control subjects (4 males and 1 female) who did not test positive for COVID-19, including 2 who died before the pandemic began, were used for this study. COVID-19 and control subjects were matched for age, sex and comorbidities as far as possible. Their clinical characteristics are summarized in [Table 1](#).

In keeping with strict protocols regarding the treatment of SARS-CoV-2-infected human tissues, human brains were immersion-fixed in 10% formalin for 1 week at room temperature. The hypothalamus was then dissected out and immersion-fixed in 4% paraformaldehyde in PBS 0.1 M, pH 7.4, for an additional 48 h at 4 °C, cryoprotected in 30% sucrose for an additional week at 4 °C, embedded in Tissue-Tek and frozen in liquid nitrogen at the crystallization temperature of isopentane.

#### Human fetuses

Non-pathological human fetuses (7, 11 and 14 gestational weeks (GW),  $n = 1$  per developmental stage) were

obtained from voluntarily terminated pregnancies after written informed consent was obtained from the parents (Gynaecology Department, Jeanne de Flandre Hospital, Lille, France). Fetuses were fixed by immersion in 4% PFA at 4 °C for 5 days. The tissues were then cryoprotected in PBS containing 30% sucrose at 4 °C overnight, embedded in Tissue-Tek OCT compound (Sakura Finetek), frozen on dry ice, and stored at  $-80$  °C until sectioning. Frozen samples were cut serially at 20  $\mu\text{m}$  intervals with a Leica CM 3050 S cryostat (Leica Biosystems Nussloch GmbH) and immunolabelled as described below.

#### COVID-19 patient and control nasal epithelia

The olfactory epithelia of 3 deceased patients (2 COVID-19 patients and 1 control) were collected at the Lille University Hospital. Their clinical characteristics are summarized in [Table 1](#).

Tissues were formalin-fixed in 10% formalin for at least 1 week at room temperature, then decalcified by immersion in ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 20%, pH 7.4, 3 times for 48 h. After that, they were immersed in 30% sucrose at 4 °C until they sank, for cryoprotection. Finally, they were embedded in Tissue-Tek, frozen in liquid nitrogen and cut into 20  $\mu\text{m}$ -thick sections.

#### FNC-B4 fetal human GnRH neuronal cell line

FNC-B4 cells<sup>12</sup> were kept in culture in Coon's modified Ham's F12 medium complemented with 10% FBS at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> and medium was changed twice weekly. Cells were used for pseudoviral infection and gene expression analysis when they reached 70% confluency. Gene expression assays for GnRH, ACE2, and NRP1 were carried out on uninfected cells by quantitative RT-PCR.

#### Pseudotyped viral particle infection of cultured FNC-B4 cells for flow cytometry and immunocytofluorescence

Pseudotyped viral particles used for the infection were constructed according to the method detailed in Crawford et al., 2020<sup>13</sup> using a five-plasmid system lentiviral backbone 10 (CMV promoter to express ZsGreen Fluorescent Protein), the SARS-CoV-2 spike protein, HDM-Hgpm2, pRC-CMV-Rev1b and HDM-tat1b. Cells infected with the viral particles emit green fluorescence due to the expression of ZsGreen, allowing their detection by flow cytometry. FNC-B4 cells were infected by treatment with  $1.1 \times 10^4$  viral particles per mL in conditioned medium for 36 h. Cells were then trypsinized, pelleted at 1000 g for 5 min and resuspended in PBS for flow cytometry. Flow cytometry was performed using a CytoFLEX LX flow cytometer (Beckman Coulter). The gating strategy was based on measurements of green fluorescence by comparing cell

suspensions from green-fluorescence positive cells and negative cells. For each replicate, green positive events were counted from a total of 50,000 events.

For immunocytofluorescence, FNC-B4 cells were plated on cover glasses coated with 0.01% Poly-L-lysine at low confluency. Cells were fixed in 4% PFA for 15 min and stored at 4 °C in PBS containing 0.05% sodium azide. Prior to primary antibody incubation, non-specific binding sites were blocked and cells permeabilized using an incubation solution (0.3% Triton, 0.3% BSA in PBS, pH 7.4) for an hour at room temperature. Cells were then incubated with the primary antibodies (Antibody table) in incubation solution overnight at 4 °C. After three washes with PBS, cells were incubated with secondary antibodies (Antibody table) in incubation solution for an hour at room temperature. After three washes, cells were counterstained with DAPI and mounted in Mowiol.

**SARS-CoV-2 infection of FNC-B4 cells**

Viral infection experiments were carried out in a biosafety level 3 (BSL3) facility at the Institut Pasteur de Lille campus and complied with current national and institutional regulations and ethical guidelines (Institut Pasteur de Lille/B59-350,009). The cells were seeded in 24-well plates with pre-coated coverslips (40,000 cells/w). 3 days later the cells were counted before infection and then infected at MOI 1, 2, and 5 with SARS-CoV-2 variant D614G for 1 h. After 1 h the inoculum was removed, the cells were rinsed with PBS, and then recultured for 24 h in fresh medium. In some wells, to increase infection efficiency, trypsin-TPCK (1 µg/mL) was added to the fresh medium. After 24 h, the supernatant was kept for TCID50 viral load testing and the cells were rinsed with PBS 1X and fixed with 4% paraformaldehyde for 30 min followed by several rinses with PBS before labelling. All experiments were performed within the biosafety level 3 suite.

**RNA extraction and quantitative RT-PCR analyses**

For cultured human FNC-B4 cells, total RNA extraction was performed with the E.Z.N.A. Total RNA Kit I (cat: R6834-02, Omega Bio-tek, Inc.) according to the manufacturer’s instructions. For human brain samples, total RNA was extracted from two fixed unstained hypothalamic slides (18 µm each) using the ReliaPrep FFPE Total RNA Miniprep System (cat: Z1002, Promega). RNA samples were immediately quantified using a Nanodrop apparatus and stored at -80 °C until the reverse transcription step. For gene expression analyses, total RNA samples were reverse transcribed using the High-capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems ref 4,368,814). For fixed human brain samples, a linear preamplification step was performed using the TaqMan PreAmp Master Mix Kit protocol (Applied Biosystems ref 4,488,593). Real-time PCR was then carried out using TaqMan Universal Master Mix II

Patient Group	Age	Sex	BMI	Time between first positive PCR and death (days)	Time between first positive PCR and first negative one (days)	ICU stay duration (days)	Post mortem delay (hours)	Cause of death	Associated cause of death	Comorbidities
1 <sup>†</sup>	69	M	31	NA	NA	27	21	Septic shock due to Fournier’s gangrene	Supra and sub tentorial ischemic injuries	Peripheral arterial disease, chronic glaucoma
2 <sup>†</sup>	62	M	7	NA	NA	25	19	Septic shock due to Candida fungemia	Fournier’s gangrene due to rectal adenocarcinoma, Mesencephalic injuries	Stroke, arterial hypertension, dyslipidemia
3 <sup>†</sup>	64	F	?	NA	NA	NA	27	Unknown, probably due to a hemorrhagic shock following a prostate hemorrhage	Subacute cholecystitis; extensive peritoneal, retroperitoneal and perirenal prostate hematoma	Arterial hypertension, atrial fibrillation, aortic infectious endocarditis
4 <sup>†</sup>	36	M	?	NA	NA	NA	80	Massive left ventricular infarction, extended to the interventricular septum	Atherosclerosis	Atherosclerosis
5 <sup>†</sup>	50	M	?	NA	NA	NA	16	?	?	Epilepsy, dyslipidemia, ischemic heart disease
6 <sup>†,‡</sup>	63	M	30	39	29	40	45	Multi-organ failure	Lung parenchyma damage (>75%) requiring ECMO, multiple septic shock	Baschow’s Disease
7 <sup>†,‡</sup>	82	M	28	67	NA	0	96	Disturbance of vigilance	Meningeal hemorrhage	Sensory neuropathy of all limbs, atrial fibrillation with left atrial closure, arterial hypertension, cerebral amyloid angiitis ?
8 <sup>†</sup>	63	F	20	55	Positive at death	25	17	Septic shock in context of refractory hypoxia	Invasive pulmonary aspergillosis, lung parenchyma damage (25-50%)	Granulomatosis with polyangiitis
9 <sup>†</sup>	59	M	30	74	73	46	24	Septic shock	Multiple hemorrhagic and ischemic brain injuries, diffuse meningeal hemorrhage, multiple lacunae in the basal ganglia	Arterial hypertension
10 <sup>†</sup>	74	F	26	NA	NA	NA	24	Septic context	Huntington disease	Diabetes, arterial hypertension, dyslipidemia, hematopoietic stem cell transplant

<sup>†</sup>Patients and controls for whom brain tissues were analysed (hypothalamus and/or olfactory bulb). <sup>‡</sup>Patients and control for whom the olfactory epithelium was analysed.

**Table 1: Clinical characteristics of control and COVID-19 patients whose post mortem brains were used in the study.**

(Applied Biosystems ref 4,440,049) on the Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System. The TaqMan probes used in this study are listed in [Table S3](#).

The 18S ribosomal RNA was used as the house-keeping transcript for normalization. SARS-CoV-2 N-protein expression was assessed using the CDC 2019-Novel Coronavirus Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel, as described elsewhere.<sup>24,25</sup> All gene expression data were analysed using the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method.

### RNAscope labelling

Expression of the SARS-Cov2 S-protein in post mortem brains was assessed using an RNAscope<sup>®</sup> Multiplex Fluorescent Reagent kit v2 Assay and the V-nCov2019-S probe, reference: 848,561 (both from Advanced Cell Diagnostics Inc.). Briefly, 20  $\mu\text{m}$ -thick hypothalamic sections were cut on a cryostat, slides washed twice for 10 min in Gibco<sup>®</sup> DPBS (ThermoFisher) and dry baked in a HybEZ<sup>™</sup> II oven (Advanced Cell Diagnostics Inc.) at 60 °C for 30 min. They were then immersion-fixed in 4% paraformaldehyde PBS 0.1 M, pH 7.4, prepared in DEPC-treated water, for 1 h at 4 °C and washed again twice for 10 min in Gibco<sup>®</sup> DPBS. Next, the sections were processed according to manufacturer's instructions (ethanol dehydration, RNAscope hydrogen peroxide treatment and target retrieval), incubated with RNAscope protease IV for 10 min at room temperature, and the signal revealed using the RNAscope multiplex fluorescent assay.

### Immunohistochemistry and quantification for viral and host-cell markers in human tissues

Dissected, postfixed and cryoprotected blocks of adult human patient brains containing the hypothalamus or olfactory bulb were cut into 20  $\mu\text{m}$  sections and mounted. A citrate-buffer antigen retrieval step, 10 mM Citrate in TBS-Triton 0.1% pH 6 for 30 min at 70 °C, was performed on 20  $\mu\text{m}$  sections. After 3 washes of 5 min with TBS-Triton 0.1%, sections were blocked in incubation solution (10% normal donkey serum, 1 mg/ml BSA in TBS-Triton 0.1% pH 7.4) for 1 h. Blocking was followed by primary antibody incubation ([Table 2](#)) in incubation solution for 48 h at 4 °C. Primary antibodies were then rinsed out, before incubation in fluorophore-coupled secondary antibodies or, in case of amplified immunolabelling biotinylated secondary antibodies for 1 h in TBS-Triton 0.1% at room temperature. For classic immunohistochemistry, secondary antibodies were washed and sections counterstained with DAPI (D9542, Sigma). For amplified immunohistochemistry, after secondary antibodies were rinsed, sections were incubated with VECTASTAIN<sup>®</sup> Elite ABC-HRP kit (PK-6100, Vector laboratories) following manufacturer's instructions. Sections were then incubated with biotinyl-tyramide reagent (SAT700001EA, PerkinElmer) following manufacturer's recommendations, washed and incubated with fluorophore-coupled streptavidin (1/500 dilution in

TBS-Triton 0.1%) before counterstaining with DAPI. Finally, the sections were incubated with Auto-fluorescence Eliminator Reagent (2160, Millipore) following manufacturer's instructions and mounted with Fluoromount<sup>™</sup> (F4680, Sigma). Immunolabelling in the human brain using the two antibodies to human ACE2 (R&D Systems, with tyramide amplification, and Abcam, without amplification), labelled similar cells.

For immunolabelling of human fetuses, 20  $\mu\text{m}$ -thick sections of entire heads at GW 7, GW 11 and GW 14 were processed as follows. Slides first underwent antigen retrieval for 20 min in a 5 mM citrate buffer heated to 90 °C, then were rinsed in TBS and blocked/permeabilized for 2 h at room temperature in TBS +0.3% Triton +0.25% BSA +5% Normal Donkey Serum ("Incubation solution", ICS). Sections were then incubated with primary antibodies ([Table 2](#)) for two nights at 4 °C in ICS. After rinses in TBS, the sections were incubated with secondary antibodies for 2 h at room temperature in ICS, then rinsed again in TBS. Finally, nuclei were stained with DAPI (Sigma D9542, 1:5000 in TBS) for 5 min, and sections were rinsed before coverslipping with homemade Mowiol.

For immunolabelling of mouse brain sections, 30  $\mu\text{m}$ -thick floating sections were rinsed 4 times in 0.1 M PBS pH 7.4 and blocked for 1 h at room temperature in blocking solution (PBS containing 10% normal donkey serum and 0.3% Triton X-100). Sections were incubated overnight at 4 °C with a mix of primary antibodies diluted in blocking solution ([Table 2](#)). The sections were washed three times in 0.1 M PBS and incubated at room temperature for 1 h with Alexa Fluor-conjugated secondary antibodies (1:500 dilution; all purchased from Molecular Probes, Invitrogen, San Diego, CA) in blocking solution. A biotin-streptavidin amplification step was added for TMPRSS2 to verify expression in some tissues. The sections were then rinsed 3 times in 0.1 M PBS. Nuclei were counterstained by incubating the sections for 1 min in DAPI before mounting and coverslipping as above. Information on the antibodies used is listed in [Table 2](#).

### Statistics

Statistical comparisons were carried out using Graph-Pad Prism 8. All correlations were performed using *R stats version 4.2.1*. Testosterone, LH, and FSH were compared between the four patient groups using two-tailed unpaired t-test. For the CHU Lille cohort of COVID-19 patients, Pearson's product moment correlation of (`cor.test()` of *R stats version 4.2.1*) was used to estimate the strength of association between testosterone (ng/ml) vs CRP (mg/ml) in all patients irrespective of sampling week. Pearson's Chi-squared test was performed to determine the association between percentage of mortality among patients and the HPG axis status. The correlation plots and the dot plots were generated using `ggplot2 version 3.4.1` in *R (v 4.2.1)*.

Antibody	Manufacturer	Reference	RRID	Dilution	sample	Validation (references or Figures)
Goat anti-human ACE2	R&D Systems	AF933	<a href="#">AB_355722</a>	1/100	Human brain tissue	<sup>26</sup>
Rabbit anti-human ACE2	Abcam	Ab15348	<a href="#">AB_301861</a>	1/100-1/200	Human brain tissue	<sup>27,28</sup>
Rabbit anti-TMPRSS2	Abcam	Ab92323	<a href="#">AB_10585592</a>	1/100-1/1000	Human brain tissue	<sup>29</sup>
Chicken anti-vimentin	Millipore	AB5733	<a href="#">AB_11212377</a>	1/500	Human brain tissue	<sup>30</sup>
Goat anti-TAG1	R&D Systems	AF4439	<a href="#">AB_2044647</a>	1/500	Human brain tissue	<sup>31</sup>
Goat anti-OMP	Wako	544-10001	<a href="#">AB_664696</a>	1/200	Human brain tissue	<sup>32</sup>
Guinea Pig anti GnRH	Erik Hirabovszky	In-house		1/3000-1/6000	Human brain tissue & Cells	<sup>33</sup>
Mouse anti-dsRNA	SCICONS J2	1001050	<a href="#">AB_2651015</a>	1/500	Human brain tissue	Fig. 3c and d
Mouse anti-SARS-CoV-2 spike protein	GeneTex	GTX632604	<a href="#">AB_2864418</a>	1/200	Human brain tissue	Figure S2
Rabbit anti-SARS nucleocapsid protein	Novus Bio	NB100-56576	<a href="#">AB_838838</a>	1/100	Human brain tissue	Fig. 3c and d
Goat anti-NRP1	R&D Systems	AF566	<a href="#">AB_355445</a>	1/100	Human brain tissue & Cells	<sup>34,35</sup>
Rabbit anti-cleaved caspase 3	Cell Signalling	#9664	<a href="#">AB_2070042</a>	1/200	Human brain tissue	<sup>36</sup>

**Table 2:** List of the primary antibodies used for immunofluorescence.

For the Imperial College London cohort, the relationship between admission CRP and testosterone was determined using Spearman's rank correlation. Testosterone levels measured in the acute phase were compared by WHO severity group using the Kruskal-Wallis test.

For quantitative RT-PCR experiments ( $n = 5$  control patients vs 4 SARS-CoV-2-infected patients;  $n = 3$  mock infected mice vs 5 SARS-CoV-2-infected mice), a two-tailed unpaired t-test was used to compare expression levels between infected and control brains. The Friedman multiple comparison test followed by an uncorrected Dunn's post hoc test was used to compare gene expression levels between the cortex, OB and hypothalamus of infected mice.

For the quantification of the proportion of GnRH neurons showing normal or abnormal morphology in control and COVID-19 patients, a two-way ANOVA was used, followed by Sidak's post hoc test ( $n = 18$  and 20 sections, 85 and 116 GnRH neurons, respectively;  $n = 4$  patients per group). To compare the proportion of GnRH neurons with normal or abnormal morphology that expressed cleaved caspase 3 in COVID-19 patients, a two-sided Fisher's exact test was used ( $n = 66$  GnRH neurons,  $n = 4$  patients).

Data from flow cytometry experiments were compared using an unpaired t-test.

### Role of funders

The funding sources for this project played no role in the study design, data collection, analysis, interpretation, writing, or editing of the manuscript.

### Results

When the HPG axis functions correctly, GnRH released by neurons into pituitary portal blood vessels underlying the median eminence of the hypothalamus is carried to the anterior pituitary, where it elicits the secretion of the

gonadotropins, luteinizing hormone (LH) and follicle-stimulating hormone (FSH), which then act on the gonads to stimulate steroid hormone production and gametogenesis.<sup>37</sup> Feedback from gonadal steroids then influences the further release of GnRH and gonadotropins, such that low gonadal steroid levels would trigger a compensatory increase in LH and FSH levels, and vice versa.<sup>38</sup> In order to verify whether the HPG axis was functioning correctly in COVID-19 patients, we thus retrospectively measured plasma testosterone, and LH and FSH concentrations, which serve as surrogates for GnRH release, in a cohort of 60 male COVID-19 patients, 35–82 years old, hospitalized in the intensive care unit (ICU) of the Lille Medical University Hospital (CHU Lille) (Table S1). During their first week in the ICU, 57 patients (Groups 1–3) showed testosterone levels that were moderately low (0.92–2.88 ng/ml) or severely low, indicative of hypogonadism (<0.92 ng/ml), while only 3 patients showed normal or near-normal testosterone levels (>2.88 ng/ml; Group 4) (Fig. 1a). Of the 57 patients with low testosterone levels, only 6 (Group 3) showed the compensatory increase in LH expected when the HPG axis functions normally (>12 IU/L) (Fig. 1b), while 38 patients (Group 2) showed intermediate concentrations of LH (2–12 IU/L) and 13 patients (Group 1) showed very low LH concentrations (<2 IU/L), indicating an impairment of the HPG axis (Fig. 1b). Of these, 10 of 13 patients (Group 1) and 15 of 38 patients (Group 2) had severely low testosterone levels (<0.92 ng/ml, indicating the existence of hypogonadotropic hypogonadism) (Fig. 1a and b). Patients with normal or near-normal testosterone levels (Group 4) all had the expected intermediate concentrations of LH (2–12 IU/L) (Fig. 1b). FSH levels broadly followed a similar pattern to that of LH (Fig. 1c). Surprisingly, given previous reports of a correlation between the intensity of the inflammatory response and low testosterone levels,<sup>39</sup> the level of C-reactive protein (CRP), an indicator of inflammation, was not found to be a

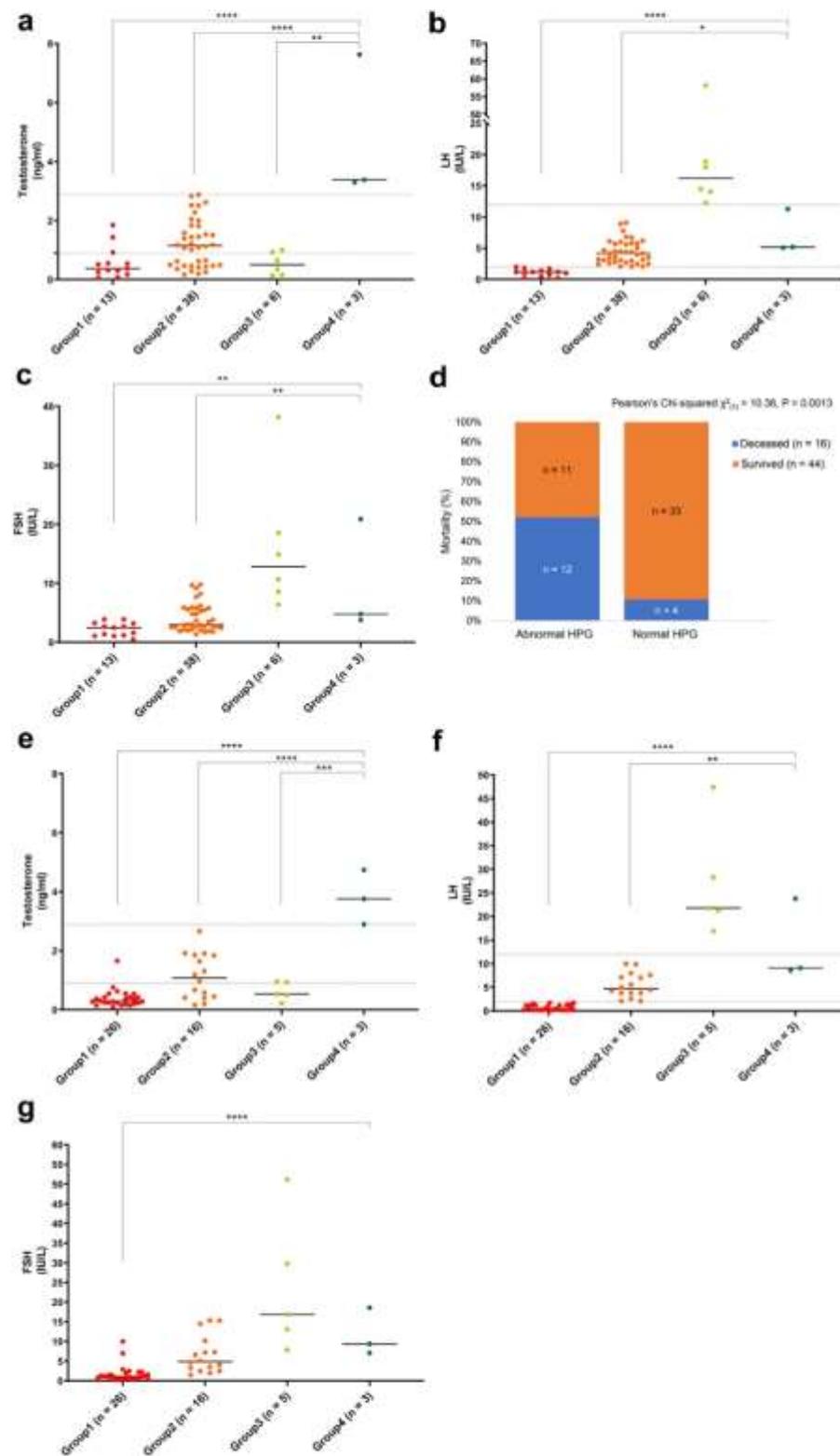


Fig. 1: Serum testosterone, and gonadotropin (LH & FSH) concentrations in a male patients hospitalized in the intensive care unit (ICU) of the Lille Medical University Hospital (CHU Lille). (a-d) COVID-19 infected patients in the ICU were divided into 4 groups depending on

confounding factor for hypogonadism (Figure S1a, Table S4).

COVID-19 patients who underwent an extended ICU stay were also sampled at weeks 2 and 4 in the ICU (Figure S1b and c). In these, the functioning of the HPG axis was seen to switch between “normal” (Groups 3 and 4), i.e., where testosterone levels provided feedback to LH levels, and “abnormal” (Groups 1 and 2), i.e., where LH levels were not appropriate for testosterone levels (Fig. 1a and b). Among the 16 patients who died (26.6%), HPG axis function was abnormal in 12 (75%) at the time of death (Figure S1b), whereas this condition was seen in only 11 out of 44 (25%) of the patients who survived (Figure S1c) (mortality associated with abnormal HPG function, Pearson’s Chi-squared  $\chi^2_{(1)} = 10.38$ ,  $p = 0.0013$ ) (Fig. 1d). Together, these results suggest that the severely low total testosterone levels seen in the majority of COVID-19 patients in the ICU and the associated risk of mortality are not just a reflection of gonadal insufficiency but of impaired hypothalamic GnRH function, or hypogonadotropic hypogonadism, which may also underlie the poor prognosis reported in men with low testosterone levels.<sup>40,41</sup>

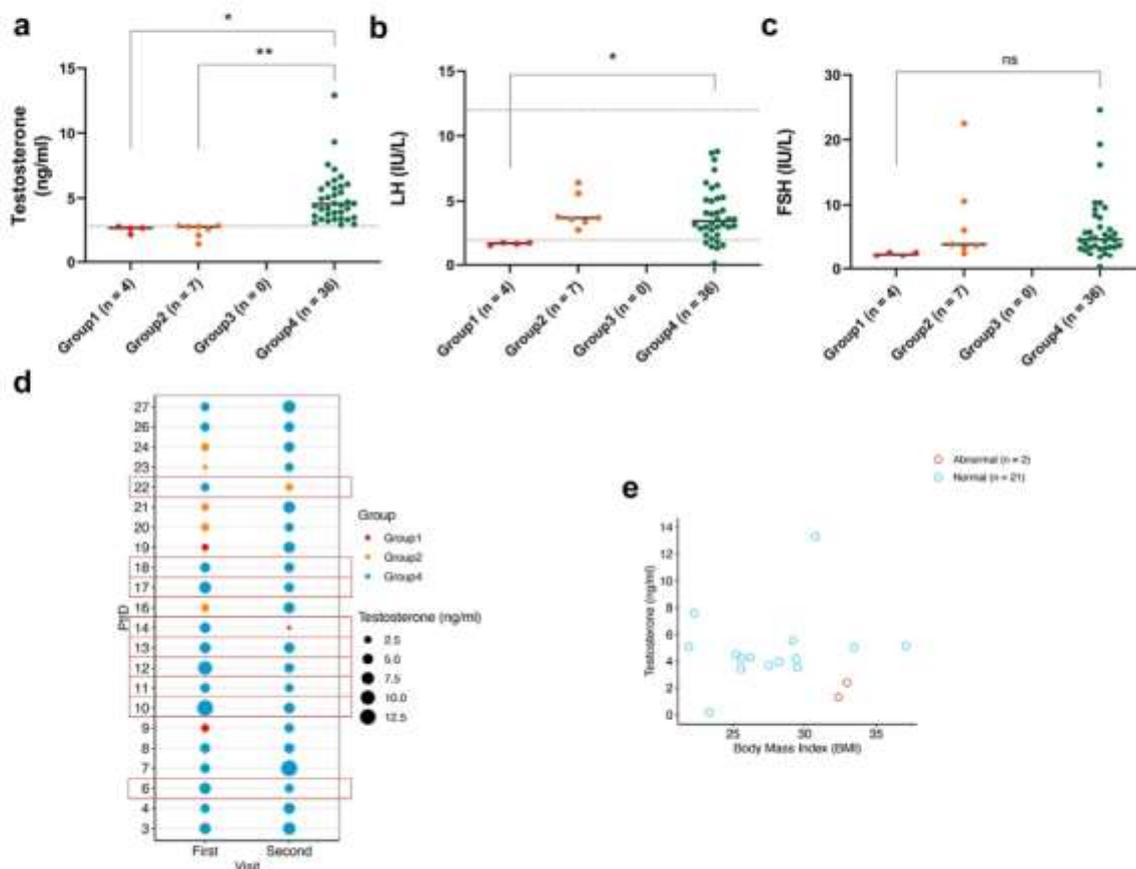
However, hospitalization in the ICU could itself suppress GnRH release and lead to transient hypogonadotropic hypogonadism.<sup>42,43</sup> To verify whether this could be the case in our patients, in the absence of uninfected control patients hospitalized in the ICU from the same period, we reanalysed testosterone, LH and FSH concentrations obtained from 50 male ICU patients from the READIAB study, aged 28–87 years, before the emergence of COVID-19. Unfortunately, 42 of these non-COVID-19 ICU patients (84%) also displayed hypogonadotropic hypogonadism according to the criteria used above (Fig. 1e–g).

In order to distinguish between HPG axis suppression as a result of the ICU stay and that due to a durable

loss of GnRH following SARS-CoV-2 infection, we performed similar analyses in another cohort of 47 male patients followed at Imperial College London, 3 months or more after contracting COVID-19 (Table S2). Of these patients, 11 still had low total testosterone at this delayed time point (median days since initial presentation: 217) (Fig. 2a). None of the 11 had a compensatory increase in LH, instead having either low LH levels of <2 IU/L (4/11 patients) or normal LH levels of 2–12 IU/L (7/11 patients), indicating a persistent dysregulation of the HPG axis in 23% of men (Fig. 2b); FSH levels were mostly normal (Fig. 2c). There was no correspondence between HPG status at this delayed time point and WHO disease severity rating during the acute phase (Figure S1d). As in the Lille cohort, CRP values were not a confounding factor for HPG axis status (Figure S1e). However, the patients displayed a slight but significant increase in body weight between diagnosis and the first follow-up visit (two-tailed paired t test,  $t_{(14)} = 3.025$ ,  $p = 0.0091$ ).

Testosterone levels and other parameters were measured in 22 of these male patients at a second follow-up visit more than 1 year after presentation with COVID-19 (median days since initial presentation: 464; median days since first post-COVID visit: 237 days). Interestingly, all 7 patients with abnormal HPG axis function (Groups 1 or 2) during the first visit who attended the second follow-up now displayed normal testosterone levels (Group 4) (Fig. 2d). Two men displayed extremely low total testosterone levels (<2.88 ng/ml) without compensatory high LH levels (Fig. 2e), again confirming that hypogonadism in these patients might be of hypothalamic origin. These data suggest that COVID-19 infection can lead to persistent or delayed hypogonadotropic hypogonadism more than a year later in some patients. Interestingly, neither of the two men with hypotestosteronaemia at the second visit had displayed low testosterone levels at the first. A similar delayed decrease in testosterone levels was also

total testosterone and LH levels, where Group 1 = testosterone <2.88 ng/ml with LH ≤ 2 IU/L, Group 2 = testosterone <2.88 ng/ml with LH > 2 but <12 IU/L, Group 3 = testosterone <2.88 ng/ml with LH > 12 IU/L, Group 4 = testosterone >2.88 ng/ml. A two-tailed unpaired t-test was used to estimate the significance of the difference between groups (total n = 60 patients) during their first week in the ICU. (a) Testosterone (two-tailed unpaired t-test, Group 4 (n = 3) vs Group 1 (n = 13),  $t_{(14)} = 6.195$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ ; Group 4 (n = 3) vs Group 2 (n = 38),  $t_{(39)} = 6.124$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ ; Group 4 (n = 3) vs Group 3 (n = 6),  $t_{(7)} = 4.392$ , \*\* $p = 0.0032$ ) (b) Luteinizing hormone (LH) (two-tailed unpaired t-test Group 4 (n = 3) vs Group 1 (n = 13),  $t_{(14)} = 6.616$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ ; Group 4 (n = 3) vs Group 2 (n = 38),  $t_{(39)} = 2.333$ , \* $p = 0.0249$ ; Group 4 (n = 3) vs Group 3 (n = 6),  $t_{(7)} = 1.460$ ,  $p = 0.1877$ ) (c) Follicle-stimulating hormone (FSH) (Group 4 (n = 3) vs Group 1 (n = 13),  $t_{(14)} = 3.137$ , \*\* $p = 0.0073$ ; Group 4 (n = 3) vs Group 2 (n = 38),  $t_{(39)} = 2.977$ , \*\* $p = 0.0050$ ; Group 4 (n = 3) vs Group 3 (n = 6),  $t_{(7)} = 0.8167$ ,  $p = 0.4410$ ) (d) Percentage of mortality among patients with normal (n = 37) and abnormal HPG status (n = 23). Pearson’s Chi-squared test with Yates’ continuity correction,  $\chi^2_{(1)} = 10.38$ ,  $p = 0.0013$  (e–g) Non-COVID-19 male ICU patients (n = 50) were divided into 4 groups depending on total testosterone and LH levels, where Group 1 = testosterone <2.88 ng/ml with LH ≤ 2 IU/L, Group 2 = testosterone <2.88 ng/ml with LH > 2 but <12 IU/L, Group 3 = testosterone <2.88 ng/ml with LH > 12 IU/L, Group 4 = testosterone >2.88 ng/ml. A two-tailed unpaired t-test was used to estimate the significance of the difference between groups (total n = 50 patients). (e) Testosterone (two-tailed unpaired t-test, Group 4 (n = 3) vs Group 1 (n = 26),  $t_{(27)} = 14.45$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ ; Group 4 (n = 3) vs Group 2 (n = 16),  $t_{(17)} = 5.399$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ ; Group 4 (n = 3) vs Group 3 (n = 5),  $t_{(6)} = 7.346$ , \*\*\* $p = 0.0003$ ) (f) Luteinizing hormone (LH) (two-tailed unpaired t-test, Group 4 (n = 3) vs Group 1 (n = 26),  $t_{(27)} = 8.926$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ ; Group 4 (n = 3) vs Group 2 (n = 16),  $t_{(17)} = 3.495$ , \*\* $p = 0.0028$ ; Group 4 (n = 3) vs Group 3 (n = 5),  $t_{(6)} = 1.654$ ,  $p = 0.1493$ ) (g) Follicle-stimulating hormone (FSH) Group 4 (n = 3) vs Group 1 (n = 26),  $t_{(27)} = 6.139$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ ; Group 4 (n = 3) vs Group 2 (n = 16),  $t_{(17)} = 1.635$ ,  $p = 0.1204$ ; Group 4 (n = 3) vs Group 3 (n = 5),  $t_{(6)} = 1.134$ ,  $p = 0.2999$ .



**Fig. 2: Serum testosterone, and gonadotropin (LH & FSH) concentrations in male patients followed at Imperial College London 3 months after contracting COVID-19.** COVID-19 infected male patients (n = 47) were divided into 4 groups depending on total testosterone and LH levels, where Group 1 = testosterone <2.88 ng/ml with LH ≤ 2 IU/L, Group 2 = testosterone <2.88 ng/ml with LH > 2 but <12 IU/L, Group 3 = testosterone <2.88 ng/ml with LH > 12 IU/L, Group 4 = testosterone >2.88 ng/ml. A two-tailed unpaired t-test was used to estimate the significance of the difference between groups (total n = 47 patients). (a) Testosterone (two-tailed unpaired t-test, Group 4 (n = 36) vs Group 1 (n = 4), t (38) = 2.384, \*p = 0.0222; Group 4 (n = 36) vs Group 2 (n = 7), t (41) = 3.262, \*\*p = 0.0022. (b) Luteinizing hormone (LH) (two-tailed unpaired t-test, Group 4 (n = 36) vs Group 1 (n = 4), t (38) = 2.093, \*p = 0.0431; Group 4 (n = 36) vs Group 2 (n = 7), t (41) = 0.2810, p = 0.7801. (c) Follicle-stimulating hormone (FSH) (two-tailed unpaired t-test, Group 4 (n = 36) vs Group 1 (n = 4), t (38) = 1.535, p = 0.1330; Group 4 (n = 36) vs Group 2 (n = 7), t (41) = 0.6067, p = 0.5474. (d) Testosterone levels of patients between visits. The colour of the dot represents the HPG axis status (Group1 in red, Group 2 in orange, and Group4 in blue). The size of the dot is representative of the testosterone levels (ng/ml). Except Pt 14 and Pt 22 who switched to Group1/Group 2, all other patients were in Group 4 in the follow-up visit (median days since initial presentation: 464; median days since first post-COVID visit: 237 days). The 9 patients who displayed lower testosterone levels during the second visit than the first are outlined. (e) Testosterone levels at the second visit and the BMI of patients. Two men, both of whom had a BMI above 30, displayed extremely low total testosterone levels without compensatory high LH levels. The colour of the dot represents the HPG axis status (abnormal in red (n = 2) and normal in blue (n = 21)).

observed in 9 other patients from Group 4 (Fig. 2d), indicating a progressive dysfunction of varying severity of the HPG axis in a subpopulation of infected patients.

Hypogonadotropic hypogonadism due to SARS-CoV-2 neuroinvasion could be caused by the loss of GnRH neurons or by deficient or abnormal GnRH synthesis and release due to a perturbation of the transcription factor or cell network regulating its production.<sup>44,45</sup> In humans, neurons secreting GnRH constitute a sparse population of barely a couple of thousand cells,<sup>1</sup> principally located in the infundibular nucleus of the tuberal

region of the hypothalamus.<sup>1,46</sup> Their neuroendocrine terminals contact fenestrated vessels of the pituitary portal system underlying the median eminence to secrete the hormone, in a process controlled by the remodelling of a specialized population of hypothalamic glia, the tanycytes. Unlike other hypothalamic neurons driving bodily functions, GnRH neurons are not born in the brain but originate in the olfactory placode, from where they migrate into the brain during embryogenesis,<sup>47,48</sup> while remaining in contact with the olfactory bulb (OB) via long dendrites.<sup>1,49</sup> GnRH neurons might

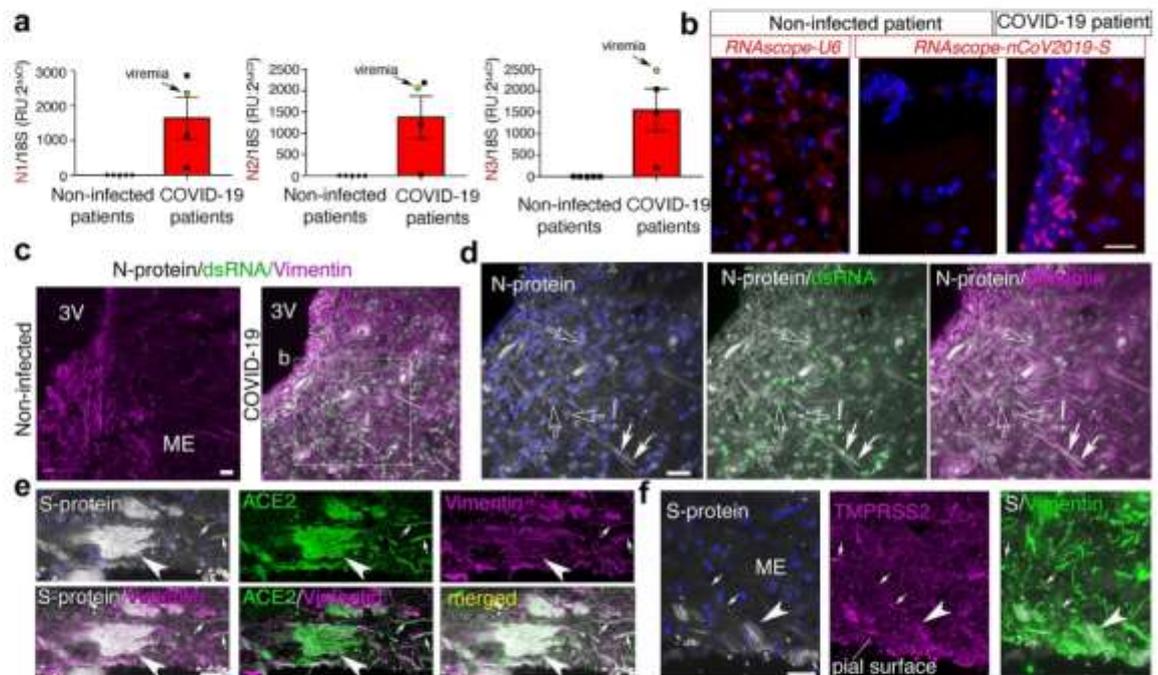
thus be exposed to SARS-CoV-2 either through the olfactory route or through the hematogenic route at the level of the median eminence in patients with viremia.

In order to determine whether GnRH neurons could be exposed to SARS-CoV-2 in COVID-19 patients, we looked for the presence of viral proteins and RNA in the brains of four patients who died of COVID-19 in the ICU in 2020, including one who displayed viremia at the time of death (Table S1), and compared them with the brains of four age-matched uninfected patients (deceased before the pandemic or with negative nasal swab PCR results), using primer pairs and antibodies specific to early SARS-CoV-2 variants and validated previously in brain tissue from the K18-hACE2 mouse model of SARS-CoV-2 infection.<sup>30</sup> We observed that all three of the four COVID-19 patients for whom the median eminence was available, including the one with viremia, had readily detectable levels of N-protein transcripts in the hypothalamus (Fig. 3a). Next, perfecting a technique for multiplex fluorescent in situ hybridization (RNAscope) in the hypothalamus in human brain tissue fixed in paraformaldehyde for longer than a week, we detected S-protein transcripts in vessels, some neuron-like cells and cells of the ependymal wall, while such labelling was absent in control patients despite the strong visualization of positive-control U6 mRNA (Fig. 3b).

Two host-cell factors are important for SARS-CoV-2 viral entry into a number of cell types: angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2), which is bound by S-protein, and transmembrane protease, serine 2 (TMPRSS2), which cleaves S-protein, allowing this binding to take place. Immunofluorescence labelling for SARS-CoV-2 viral proteins and these two host-cell factors also revealed abundant N-protein and double-stranded RNA (dsRNA) in numerous cells of the median eminence/infundibular nucleus of COVID-19 patients (Fig. 3c and d), unlike uninfected controls (Fig. 3c), indicating robust SARS-CoV-2 entry and replication. However, while N-protein was often colocalized with vimentin-immunoreactive tanyctic processes, dsRNA labelling was fainter in tanyctic cell bodies lining the ventricular wall than in the nuclei of non-tanyctic cells morphologically associated with tanyctic processes (Fig. 3c and d). Interestingly, immunolabelling for S-protein, which mediates host-cell entry,<sup>31</sup> was extremely high in ACE2- and TMPRSS2-coexpressing tanyctic endfeet, which contact fenestrated capillaries at the external pial surface of the median eminence (Fig. 3e and f). Tanyctic endfeet are known to ensheath and dynamically interact with GnRH axon terminals, thus controlling the periodic secretion of GnRH,<sup>32</sup> a process that could break down in infected patients and contribute to the observed HPG axis dysregulation. These findings suggest that in patients contracting COVID-19, SARS-CoV-2 was infecting hypothalamic cell types.

With regard to the olfactory route, while some reports do indicate the olfactory epithelium, in which some GnRH cell bodies may remain anchored in adulthood,<sup>33</sup> and olfactory bulb (OB) as ports of infection,<sup>34,35</sup> others have suggested that olfactory sensory neurons are not themselves very susceptible to infection, and that the propagation of the virus may be arrested in the OB by local immune mechanisms.<sup>34,37</sup> In our post mortem patient brains, immunofluorescence labelling showed abundant S-protein labelling along with ACE2 and TMPRSS2 in the olfactory nerve layer (ONL), where olfactory marker protein (OMP)-expressing axons from sensory neurons of the olfactory epithelium enter the OB (Figure S2a–c). In addition, viral dsRNA was present in numerous OB cells bordering the ONL and within the glomerular layer of COVID-19 patient brains, unlike controls (Figure S2c). Furthermore, in the decalcified nasal epithelium of one patient, immunolabelling for S-protein was clearly colocalized with OMP- and ACE2-positive olfactory sensory neurons (Figure S2a), indicating potential SARS-CoV-2 entry and replication along this second route of infection.

Given the anatomical relationship between GnRH neurons and both neuroinvasion routes, we next examined our post mortem patient brains for signs that GnRH neurons were themselves infected. Despite the extreme paucity of GnRH neurons and their scattered distribution in the hypothalamus, we identified GnRH neurons expressing both ACE2 and neuropilin 1 (NRP1), a semaphorin receptor that they use during embryonic life to migrate to their final destinations,<sup>34,35,38,39</sup> and which has been found to be a co-receptor or alternative receptor that facilitates SARS-CoV-2 host cell entry,<sup>40–42</sup> in all the brains studied (Fig. 4a and b). Furthermore, more than one-third of GnRH neurons in the brain of COVID-19 patients displayed a bloated or abnormal morphology rather than the typical fusiform morphology, suggesting that they were sick or dying (Fig. 4c and d); the number of such abnormal GnRH neurons was negligible in control brains (Fig. 4d). In keeping with the view that SARS-CoV-2 infection was causing the death of GnRH neurons, directly or indirectly through the infection of associated cell populations, some GnRH neurons were immunoreactive for cleaved caspase-3, an apoptosis marker expressed by other infected cells in the brain,<sup>43</sup> in all infected patient brains (Fig. 4c). A majority of these dying neurons also displayed an abnormal morphology (Fig. 4e). No cleaved caspase-3 labelling was noted in GnRH neurons in uninfected control brains. Interestingly, while GnRH neurons are an extremely small and scattered population in the human hypothalamus, we were able to observe a GnRH neuron positive for the viral S-protein in one patient brain (Fig. 4b). Further supporting the putative death or dysfunction of GnRH neurons on a massive scale, RT-PCR analysis of

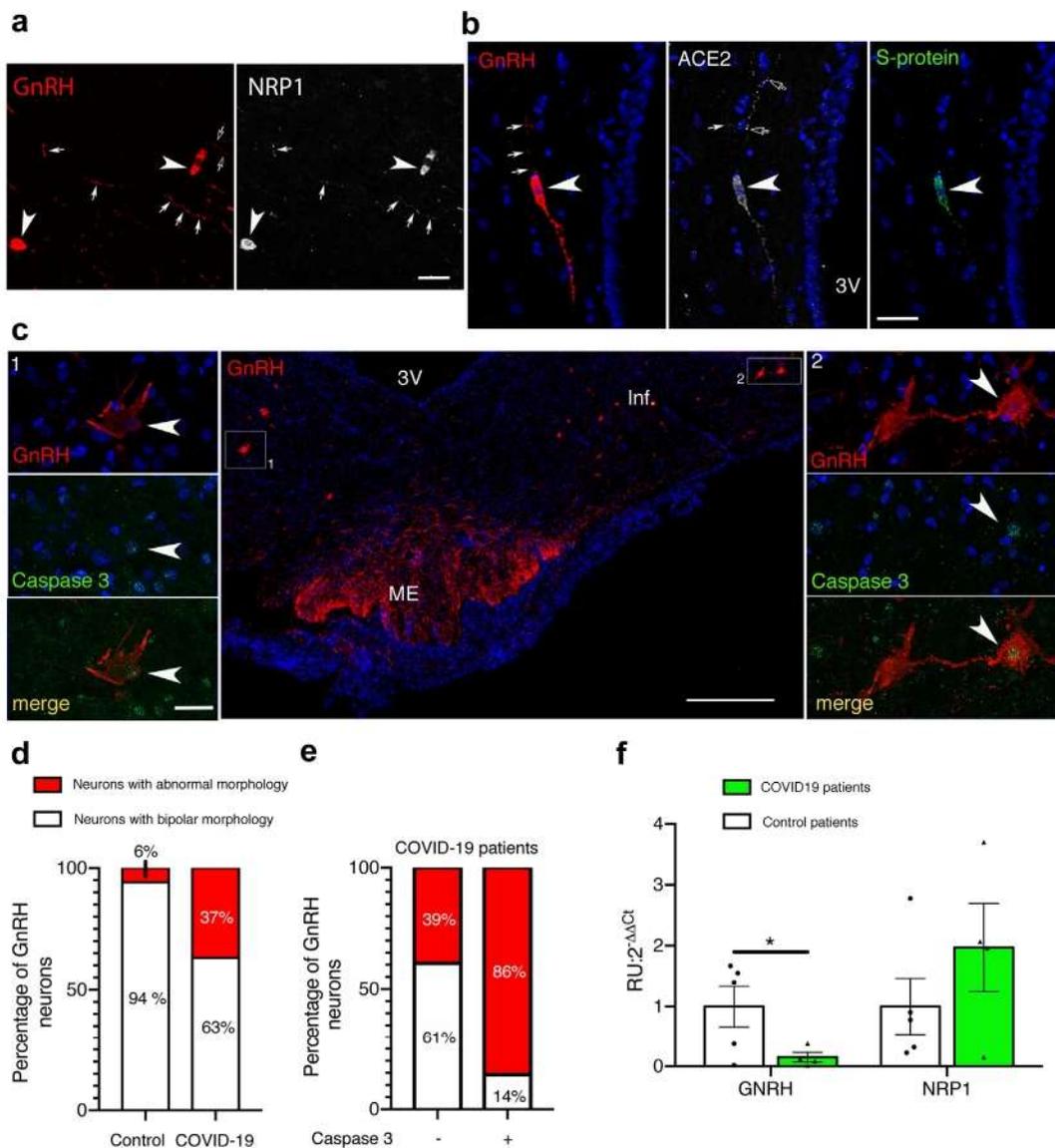


**Fig. 3: Expression of viral transcripts and proteins, ACE2 and TMPRSS2 in the hypothalamus of COVID-19 patients and non-infected controls.** (a) Quantitative PCR analysis of N-protein mRNA in the hypothalamus of COVID-19 patients using three distinct sets of probes (N1, N2 and N3).  $n = 5$  control patients and 4 SARS-CoV-2-infected patients. Note that one COVID-19 patient (yellow point) had viremia at the time of death. Two-tailed unpaired t test, for N1  $t(7) = -3.097$ ,  $p = 0.0174$ , for N2  $t(7) = 3.143$ ,  $p = 0.0163$  and for N3  $t(7) = 3.587$ ,  $p = 0.0089$ . (b) RNAscope labelling for S-protein mRNA (pink) in the hypothalamus of a control (non-infected) patient and a COVID-19 patient. U6 RNA was used as a positive control. Blue: DAPI. Scale bar: 20  $\mu\text{m}$ . (c) Immunolabelling for SARS-CoV-2 N-protein (white), viral dsRNA (green) and vimentin (magenta) to identify tanycytes, indicating that viral markers are absent in the hypothalamus of controls (left) but heavily expressed in a 63-year-old COVID-19 patient (right). 3V: third ventricle. Scale bar: 30  $\mu\text{m}$ . (d) N-protein (white), dsRNA (green) and vimentin (magenta) immunolabelling showing abundant N-protein colocalization with vimentin in numerous tanycytic fibres (white arrows) and its presence in non-tanycytic cell bodies (empty arrows) near the median eminence (ME). dsRNA is not present in the vimentin-rich tanycytic cell body layer lining the ventricular wall. Blue: DAPI. Scale bar: 30  $\mu\text{m}$ . (e,f) Extremely strong labelling for S-protein (white) seen in the end-feet (white arrowhead) of tanycytes (vimentin; magenta in e; green in f), which also express ACE2 (green in e) and TMPRSS2 (magenta in f), at the pial surface of the ME, where tanycytic processes (white arrows) contact fenestrated capillaries. Blue: DAPI. Scale bar: 20  $\mu\text{m}$ .

the hypothalamus of four COVID-19 patient brains revealed an almost complete disappearance of GnRH transcripts as compared to five control brains, whereas NRP1, which is expressed by other cell populations in the hypothalamus, was not significantly affected (Fig. 4f).

Given the importance of physiological GnRH secretion appears to have for cognitive function in adulthood,<sup>2</sup> to verify whether the GnRH neuronal infection and HPG axis abnormalities observed in COVID-19 patients could be associated with cognitive deficits, we analysed cognitive symptoms reported by male patients in the London cohort, who underwent extensive testing at >3 months and >1 year after infection (Table S5). At both follow-up visits, the proportion of patients reporting impaired memory or attention (“DePaul Symptom” questionnaire), regardless of

frequency or severity, or difficulty concentrating (“Long COVID” questionnaire) tended to be slightly higher in the group with abnormal HPG axis function, although the patient numbers were not sufficient to draw statistically valid conclusions (100%, for  $n = 7$  of 7 for the first visit and  $n = 2$  of 2 for the second visit), than in the group with normal function (81%,  $n = 13$  of 16 for the first visit; 80%,  $n = 16$  of 20 for the second visit). A similar pattern emerged for neurological symptoms (abnormal HPG axis function: 100%,  $n = 7$  of 7 for the first visit and  $n = 2$  of 2 for the second visit; normal HPG axis function: 87%,  $n = 14$  of 16 for the first visit and 90%,  $n = 18$  of 20 for the second visit). Although these are subjective measures reported in a small sample of patients, they suggest that the time course and pathogenic mechanisms underlying the effects of neuroinvasion, and more specifically, the interplay



**Fig. 4: SARS-CoV-2 infects GnRH neurons and leads to their death in COVID-19 patients.** (a) Immunolabelling for GnRH (red) and NRP1 (white) in hypothalamic GnRH neurons in a control patient. Arrowheads show a double-labelled GnRH neuron, while white arrows show a GnRH-immunoreactive process expressing NRP1. Scale bar: 50  $\mu$ m. (b) Immunolabelling for GnRH (red), ACE2 (white), and S-protein (green) in hypothalamic GnRH neurons in a COVID-19 patient. Arrowheads show a triple-labelled GnRH neuron, white arrows show a GnRH-immunoreactive process that does not express ACE2, and empty arrows show an ACE2-immunoreactive neuron-like process that does not express GnRH. Blue: DAPI. Scale bar: 50  $\mu$ m. (c) Immunolabelling for GnRH (red) and cleaved caspase 3 (green) in the infundibular nucleus (Inf)-median eminence (ME) area of the hypothalamus of a COVID-19 patient. Blue: DAPI. Scale bars: 500  $\mu$ m (inset 30  $\mu$ m). (d) Quantification of proportion of GnRH neurons showing normal or abnormal morphology in control and COVID-19 patients (two-sided Fisher's exact test,  $p < 0.0001$ ,  $n = 66$  GnRH neurons,  $n = 4$  patients). (e) Proportion of cleaved caspase 3-expressing or healthy GnRH neurons with normal or abnormal morphology in COVID-19 patients (two-sided Fisher's exact test,  $p = 0.0387$ ,  $n = 66$  GnRH neurons,  $n = 4$  patients). (f) Quantitative RT-PCR for GnRH and NRP1 in the infundibular nucleus-median eminence of COVID-19 and control patients showing the almost complete disappearance of GnRH expression in patients (two-tailed unpaired t-test  $t(7) = 2.197$ ,  $p = 0.0320$  for control vs COVID-19 brains.  $n = 5$  for control patient and  $n = 4$  for COVID-19 brains).

between HPG axis dysfunction and cognition deficits, require further large-scale retrospective or prospective investigations.

The existence of an olfactory route combined with the vulnerability of GnRH neurons to SARS-CoV-2 also raises another spectre: that of an infection of these

neurons, which are born in the nose, during embryonic development or early childhood. Indeed, the migration, maturation and correct adult function of GnRH neurons may be important not only for the establishment or maintenance of cognitive or metabolic function,<sup>2,38,66</sup> but could also play a role in normal or pathological aging.<sup>3</sup> We therefore analysed the olfactory epithelium of 7-, 11- and 14-week-old human fetuses, and found abundant expression of ACE2 and TMPRSS2 in both olfactory sensory neurons and their TAG-1-immunoreactive axons extending into the OB (Figure S3a–c), adding to previous reports of these susceptibility factors in other cell populations of the olfactory epithelium.<sup>65</sup> Serendipitously, neurons composing the putative vomeronasal organ,<sup>3</sup> the birthplace of GnRH neurons (Fig. 5a–d, Figure S3d–f), as well as the axonal tracts along which they migrate into the brain (Fig. 5e), also abundantly expressed ACE2 and TMPRSS2 as well as NRP1 (Fig. 5e), as we have previously shown,<sup>34</sup> potentially further favouring SARS-CoV-2 cell entry and infection of this crucial neuronal population.<sup>66,67</sup>

Finally, to directly verify that human fetal GnRH neurons can be infected by SARS-CoV-2, we tested the ability of pseudotyped viral particles expressing the full-length SARS-CoV-2 S-protein and the ZsGreen reporter gene<sup>23</sup> or the SARS-CoV-2 virus to infect a human fetal GnRH-expressing cell line, FNC-B4.<sup>66</sup> Interestingly, cells differentiating into GnRH neurons not only expressed susceptibility factors for infection (Fig. 5f and g), but a fraction of these cells were confirmed to be infected by the pseudovirus, using flow cytometry ( $p = 0.0235$ , two-tailed unpaired t-test) (Fig. 5h and i), or by SARS-CoV-2 itself, using immunocytochemistry (Fig. 5j). These experiments raise the strong possibility that at least some GnRH neurons in human fetuses or new-borns could indeed be infected by SARS-CoV-2 in case of vertical transmission from infected mothers (see for example<sup>67,68</sup>), with potential long-term mental and nonmental consequences later in life.

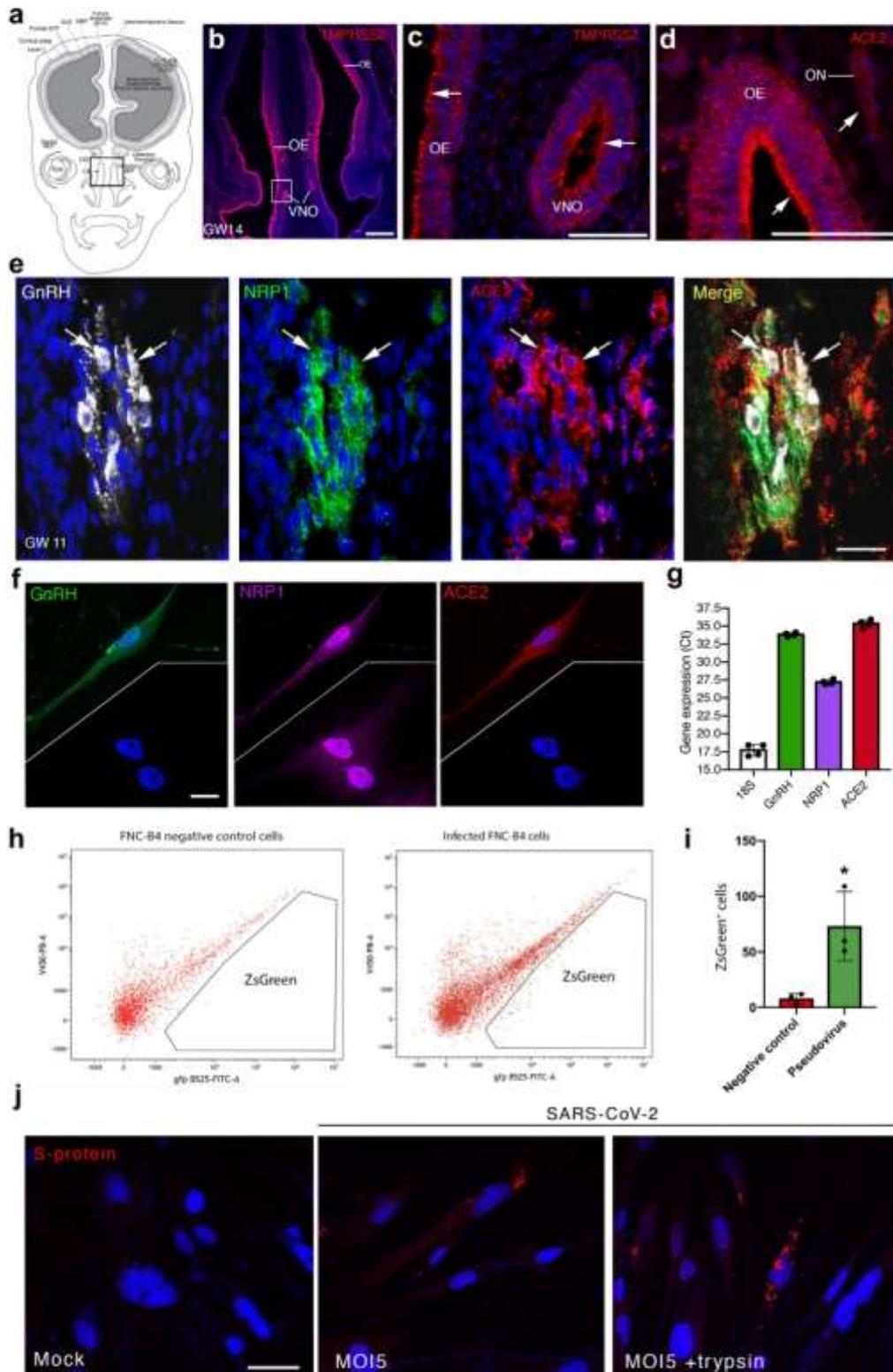
## Discussion

The triad of anosmia, hypogonadism and cognitive deficits, which occurs in a significant proportion of “long COVID” cases, is also reminiscent of another disease: Down syndrome or Trisomy 21. Our recent identification of a peripubertal decline in GnRH production as the likely causative factor underlying not only the dysfunction of the gonadotropic axis but also the progressive cognitive decline and AD-like neurodegeneration observed in Down syndrome patients<sup>3</sup> prompted us to study whether GnRH system dysfunction due to neuroinvasion by SARS-CoV-2 could underlie some of these symptoms in COVID-19 patients. Our work demonstrates that GnRH neurons as well as other associated hypothalamic cells could indeed be infected by SARS-CoV-2 through at least two routes, and

that this results in a dramatic decrease in GnRH expression in the brain. Moreover, even human fetal GnRH neurons express susceptibility factors for SARS-CoV-2 host-cell entry and can be infected by the virus. Together, this vulnerability of developing and mature GnRH neurons to SARS-CoV-2 neuroinfection creates a potential for devastating long-term effects on cognitive and metabolic aging, in addition to the expected dysfunction of the reproductive axis.

That SARS-CoV-2 invades and has profound effects on the brain is no longer in doubt, although not all parts of the brain may be equally vulnerable to infection.<sup>69–74</sup> Unlike some previous studies, we found ample evidence of olfactory sensory neuronal infection in the nasal epithelium of COVID-19 patients, supporting the existence of a viable route for the virus into the brain along the olfactory and terminal nerves.<sup>75</sup> Blood-borne SARS-CoV-2 viral particles might also directly enter the brain by extravasating from fenestrated vessels of circumventricular organs and thus bypassing the blood–brain barrier. This hypothesis is supported by the abundance of viral markers in the median eminence of the hypothalamus in the three patient brains for whom this tissue was available. Interestingly, the absence of the traditional blood–brain barrier in the median eminence, an adaptation essential to allow peptide neurohormones such as GnRH to easily reach their target cells in the pituitary and for circulating peripheral signals necessary for the establishment of homeostasis to enter the brain, could instead represent a breach in the brain’s defences against pathogens. In addition, we have previously shown that endothelial cells of the blood–brain barrier are themselves infected by SARS-CoV-2, potentially allowing viral passage into the brain.<sup>61</sup> Indeed, recent accounts of SARS-CoV-2 brain infection put the incidence of viremia at up to 40%,<sup>72</sup> greatly increasing the likelihood of a viable hematogenic route for the virus. GnRH neurons, which both maintain contact with the nasal epithelium where they are born, and extend neuroendocrine terminals to the perivascular space around the fenestrated vessels of the median eminence, and which express NRP1 as well as ACE2, could thus potentially be infected by either route, or through viral propagation by adjacent cells.

The infection of either GnRH neurons themselves or of tanycytes, which interact with their terminals, would likely be sufficient to cause hypogonadotropic hypogonadism either through decreased GnRH expression, as we observed in post mortem patient brains, or perturbed secretion, as reflected by gonadotropin levels in our cohorts, although hospitalization in the ICU may itself cause a transient impairment of the HPG axis through a variety of intrinsic and extrinsic factors. However, many GnRH neurons, which normally constitute a stable population, were also bloated and dying in our COVID-19 patient brains. The irreversible loss of GnRH that would entail could thus develop along



**Fig. 5: Human fetal GnRH neurons are susceptible to SARS-CoV-2 viral infection.** (a) Schematic representation of a horizontal section through the nose and brain of a gestational week (GW) 14 human fetus, showing region immunolabelled in (b–d). (b–d) TMPRSS2 (b,c, red) and

a longer time course, a phenomenon that could be exacerbated by the recently reported persistence of active virus in the brain, including in the hypothalamus, for weeks or months after infection.<sup>72</sup> In light of the multiple brain functions in which GnRH seems to be involved, this impairment could have several putative deleterious effects.

The most obvious repercussion of a long-term decline in GnRH production, given the role of GnRH as the master molecule controlling the reproductive axis, is a delayed effect on fertility in both male and female patients who survive infection. This can be seen in two men from our London cohort, in whom hypogonadism developed several months after infection, and a few case reports<sup>76,77</sup> (see also a meta-analysis<sup>78</sup>). Extrapolated over the millions of infections reported worldwide, this is especially concerning considering the current global decline in human fertility, including in Europe ([https://www.euro.who.int/\\_\\_data/assets/pdf\\_file/0010/73954/EN63.pdf](https://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0010/73954/EN63.pdf)). Interestingly, mutations in NRP1, a molecule that can potentiate SARS-CoV-2 host cell infection,<sup>66,67</sup> cause Kallmann syndrome in humans, in which hypogonadotropic hypogonadism is associated with anosmia,<sup>69</sup> by perturbing GnRH neuronal migration.<sup>68</sup> A significant proportion of COVID-19 patients display anosmia or dysosmia<sup>79</sup> and defects in GnRH neuronal function may also be associated with alterations in olfactory perception.<sup>2,35,44,80</sup> It would thus be interesting to investigate whether some persistent olfactory deficits in COVID-19 patients could also be linked to the loss of GnRH.

More importantly, GnRH neurons also project to parts of the brain involved in cognition, such as the cortex or hippocampus,<sup>3</sup> and GnRH is involved in maintaining brain connectivity and cognitive function in adulthood, a process that breaks down with the loss of its expression.<sup>2,81</sup> Conversely, restoring physiological levels and patterns of GnRH improves connectivity and cognitive performance, for instance in Down syndrome patients and in an animal model of AD, while restoring a microRNA involved in GnRH expression, miR200b, also normalizes the expression of myelination genes, as well as inter-hippocampal neuronal communication,<sup>2</sup>

providing an anatomical substrate for these changes. Interestingly, the most debilitating short- and long-term consequences of SARS-CoV-2 infection include cognitive symptoms, such as “brain fog”, and demyelination, altered gene expression mimicking accelerated aging and AD-like neurodegenerative changes are among the mechanisms proposed to explain these symptoms (see for example,<sup>10–12,71,72</sup>). It is thus worth considering whether the dramatic downregulation of GnRH and the death of GnRH neurons in the brain of COVID-19 patients could contribute to an acceleration or exacerbation of age-related cognitive decline. In the adult brain, the loss of a substantial proportion of GnRH neurons can occur without leading to functional impairments of the reproductive axis.<sup>82</sup> However, the threshold for GnRH loss at which cognitive changes are triggered is not known, and it is conceivable that not only reduced GnRH expression levels but merely a dysregulation of its pulsatile pattern may lead to cognitive deficits, as seen in Down syndrome.<sup>2</sup> While the small patient numbers and heterogeneity of our study cohorts did not allow for in-depth measurements or valid statistical comparisons, the fact that all men in the impaired HPG axis group displayed persistent cognitive symptoms, regardless of disease severity, supports a role for GnRH loss or dysregulation in the aetiology of these symptoms. There is thus an urgent need for further studies to confirm this correlation, long-term monitoring of hormone levels as an indicator of the risk of cognitive decline in COVID-19 survivors, and an evaluation of the usefulness of GnRH replacement therapy to compensate for the deficits.

GnRH neurons are also implicated in the regulation of normal energy metabolism,<sup>15</sup> as are hypothalamic tanycytes to a very large extent, by transcytosing peripheral metabolic signals such as leptin and glucose from the blood to hypothalamic neurons that control food intake.<sup>83</sup> Survivors of COVID-19 also appear to be at higher risk of developing diabetes,<sup>15,84</sup> suggesting a breakdown of this tanycytic shuttle in the brain of COVID-19 patients. Several factors could contribute to this breakdown: the potential saturation of the endocytotic mechanism suggested by the extremely high signal

ACE2 (d, red) immunolabelling in the olfactory epithelium (OE), vomeronasal organ (VNO) and olfactory nerve (ON) of a GW 14 fetus. Blue: DAPI. Scale bars: 1 mm in b and 100  $\mu$ m in c-d. (e) In a GW 11 human fetus, many GnRH neurons (white) migrating out of the VNO also express NRP1 (green) and/or ACE2 (red), host cell proteins that mediate SARS-CoV-2 infection (white arrows), while NRP1 and ACE2 are also expressed by some olfactory and vomeronasal nerve axons that form the scaffold for GnRH neurons. Blue: DAPI. Scale bar: 40  $\mu$ m (f) Differentiating FNC-B4 cells in culture showing the presence of NRP1 (magenta) and ACE2 protein expression (red) in cells that have begun to express GnRH (green, top view). Non-GnRH cells (bottom view) also express NRP1, in keeping with the more widespread expression of this guidance molecule in the fetal nose and brain. Blue: DAPI. Scale bar: 10  $\mu$ m. (g) RT-PCR analysis demonstrating the expression of mRNAs for GnRH, NRP1, and ACE2 by FNC-B4 cells. The housekeeping 18 S RNA was used as a control. n = 3 wells. (h) Fluorescence-activated cell sorting (FACS) of FNC-B4 cells (red) infected with pseudotyped lentiviral particles carrying a full-length SARS-CoV-2 spike protein and a ZsGreen reporter gene (green), showing infection of some cells by the pseudovirus. (i) ZsGreen expression, indicating pseudotyped viral particle entry, is almost undetectable in uninfected negative control cells treated only with vehicle (two-tailed unpaired t-test t (4) = 3.566 p = 0.0235, n = 3 wells). (j) Immunolabelling of the SARS-CoV-2 S-protein in FNC-B4 cells. Scale bar: 20  $\mu$ m.

for SARS-CoV-2 S-protein at the endfeet of tanycytes, perturbed feedback or signalling from morbid GnRH neurons to the tanycytic endfeet with which they interact, or the inflammation of infected tanycytes by the activation of the NF $\kappa$ B subunit NEMO in tanycytes by circulating proinflammatory cytokines, many of which persist in “long COVID” patients.<sup>41,46</sup> Indeed NEMO activation is involved in inflammation-mediated anorexia in certain non-infectious diseases,<sup>47</sup> and the SARS-CoV-2 major protease, Mpro, cleaves NEMO,<sup>48</sup> setting up a tug-of-war between the competing effects of acute or persistent systemic inflammation on tanycytes and potential post-COVID-19 swings of energy metabolism. The occurrence of such perturbations is suggested by the strong inverse correlation between change in testosterone levels and change in weight between the first and second follow-up visits in our London cohort, and the emergence of two subpopulations: patients in whom both HPG axis function (i.e., GnRH secretion) and energy metabolism eventually became normal, suggesting the recovery of tanycytes, and patients with persistent hypothalamic dysfunction (Figure S4).

Finally, in light of the unusual vulnerability of fetal GnRH neurons, particular attention must also be paid to the consequences of maternal or perinatal COVID-19 infection in neonates.<sup>49</sup> Indeed, the growing evidence that some neonates born to infected mothers may be COVID-19-positive<sup>50</sup> is especially concerning since the first postnatal activation of the HPG axis, i.e., mini-puberty, a phenomenon that plays a key role in the later maturation of the reproductive system<sup>15,50</sup> and likely also in brain development in a broader sense,<sup>51</sup> occurs shortly after birth. The impairment of mini-puberty,<sup>51,52</sup> for example by premature birth,<sup>53,54</sup> may be correlated with the incidence of a range of age-related non-communicable diseases or metabolic dysfunction,<sup>49,51,54</sup> and early reports already indicate that antenatal or neonatal exposure to SARS-CoV-2 may lead to neurodevelopmental delays.<sup>55</sup> Studies following cohorts of babies born during the pandemic, such as the mini-COVID study by the European miniNO consortium (<https://www.minino-project.com>) are thus essential to fully understand the repercussions of these mostly asymptomatic infections on well-aging and to take steps to mitigate them.

A limitation of our study comes from the safety-related, ethical, and organizational challenges posed by the COVID-19 pandemic with regard to the collection of biological samples and the unavailability of human resources for all non-essential clinical research tasks. For example, we measured hormone levels in 3 different cohorts to draw our conclusions: severely ill COVID-19 patients hospitalized in the ICU at the Lille University Hospital, France, an uninfected control group hospitalized in the ICU at Lille but belonging to a different cohort, and finally COVID-19 patients with different

degrees of severity of the disease, but not uninfected controls, who were subjected to medium-to-long-term follow up at the Endocrinology Department of the Imperial College Healthcare NHS Trust, London, UK. In addition, by definition, our post mortem brain and olfactory epithelium tissues were obtained from COVID-19 patients who had died of the disease, indicating a degree of infection severity and possibly of neuroinvasion that might be rarer in the surviving population. Finally, the time-course of these changes is unknown (we observed abnormal HPG axis function more than a year after infection in two patients who were normal at the first visit, even though most patients who were abnormal at the first visit had become normal by the second), which will make it hard to pin down causality in a variable human population during an ongoing pandemic. Nevertheless, our findings of abnormal and dying GnRH neurons in all the patient brains at our disposal, the dramatic reduction in GnRH expression, and the incipient correlation between HPG axis function, energy metabolism and cognitive or neurological dysfunction underline the necessity for longitudinal studies in COVID-19 survivors, to anticipate a possible delayed-onset wave of developmental, reproductive, metabolic and mental disorders.

#### Contributors

S.R. and V.P. designed the study, analysed data, prepared the figures, and wrote the manuscript. F.S., S.N., D.F., C.F.F.C. processed human tissues and performed immunofluorescence and in situ hybridization and qRT-PCR analyses, and all were involved in all aspects of study design, interpretation of results, and manuscript preparation. S.A.C., E.M. and W.D. followed and collected the data from the London cohort. G.T., L.C., C.L.-G. and A.S. prepared tissues and performed immunofluorescence; K.C. performed FACS experiments. A.P., J.E.-O., M.M.-G. produced the pseudotyped virus; F.T. and C.B. infected FNC-B4 cells with SARS-CoV-2; E.H., M.J., D.D., A.M., G.G. contributed material, J.P., T.L. V.F., R.P., F.P., S.C.J., L.S., J. Dewisme and C.A.-M. monitored the Lille cohort and collected clinical samples and data, P.P. performed hormonal assays; S.R., V.P., P.G. and W.D. verified the underlying data. H.M.-F., V.F., M.B., M.M.-C., J.P., K.C., M.S., R.N., C.A.-M., P.P., V.M., P.G. and W.D. were involved in study design, interpretation of results, and preparation of the manuscript. All authors critically read and commented on the manuscript and approved the final version for submission.

#### Data sharing statement

Code used to generate plots plus related files could be accessed here: [https://github.com/sreekala03/Gorudo\\_Covid](https://github.com/sreekala03/Gorudo_Covid). All data collected for the study, including raw data other than the one displayed in Tables S1, S2, S4, and S5 of the manuscript and data analysis will be made available to others upon request. All data will be available upon publication of the manuscript, by contacting the corresponding authors.

#### Declaration of interests

The authors declare no competing interest.

#### Acknowledgements

The authors are grateful to the LICORNE study group for access to patient brains. The Lille COVID Research Network acknowledges the contribution of residents, medical students, nursing teams, laboratory technicians and clinical research associates throughout the SARS-CoV-2 pandemic. The authors thank the Biological Resources Centre of the Centre Hospitalier de Lille (BB 0033-00030) for providing biological samples from the LICORNE and READIAB cohorts.

This work was supported by European Research Council ERC-Synergy-Grant-2019-WATCH No 810331 (to R.N., V. P. and M.S.), ERC-2016-CoG-REPRODAMH No 725149 (to P.G.), ERC-2018-StG 804236-NEXTGEN-IO (to A.P.), the European Union Horizon 2020 research and innovation program No 847941 miniNO (to K.C., V.P. and L.S.), the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) and the Agence Nationale de la Recherche en Santé (No ECTZ200878 Long Covid 2021 ANRS0167 SIGNAL to V.P., R.J., FT, MS and RN), the Agence Nationale de la Recherche DistAlz (No. ANR-11-LABEX-0009 to V.P. & F.P.), EGID (No. ANR-10-LABEX-0046 to V.P.), I-SITE ULNE (No. ANR-16-IDEX-0004) and benefited from the technical support of UMS2014-US41. The authors also acknowledge support of the Inserm Cross-Cutting Scientific Program (HuDeCA to P.G.), the ANR-3D Human (ANR-19-CE16-0021-02 to P.G.) and the CHU Lille Bonus H. E.G.M. was funded by an MRC Clinical Training Fellowship and NIHR Clinical Lecturer Award. W.S.D. was funded by an NIHR Senior Investigator Award.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2023.104784>.

#### References

- Diessens M. Down syndrome: the brain in trisomic mode. *Nat Rev Neurosci.* 2012;13(12):844–858.
- Manfredi-Lozano M, Leysen V, Adamo M, et al. GnRH replacement rescues cognition in down syndrome. *Science.* 2022;377(6610):eabq4515.
- Casoni F, Malone SA, Belle M, et al. Development of the neurons controlling fertility in humans: new insights from 3D imaging and transparent fetal brains. *Development.* 2016;143(21):3969–3981.
- Buckley RF, O'Donnell A, McGrath ER, et al. Menopause status moderates sex differences in tau burden: a framingham pet study. *Ann Neurol.* 2022;92(1):11–22.
- Xiong J, Kang SS, Wang Z, et al. FSH blockade improves cognition in mice with Alzheimer's disease. *Nature.* 2022;603(7901):470–476.
- Wang M, Roussos P, McKenzie A, et al. Integrative network analysis of nineteen brain regions identifies molecular signatures and networks underlying selective regional vulnerability to Alzheimer's disease. *Genome Med.* 2016;8(1):104.
- Atwood CS, Bowen RL. The endocrine dyscrasia that accompanies menopause and andropause induces aberrant cell cycle signaling that triggers re-entry of post-mitotic neurons into the cell cycle, neurodysfunction, neurodegeneration and cognitive disease. *Horm Behav.* 2015;76:63–80.
- Ishii M, Iadecola C. Metabolic and non-cognitive manifestations of Alzheimer's disease: the hypothalamus as both culprit and target of pathology. *Cell Metab.* 2015;22(5):761–776.
- Prevot V, Tena-Sempere M, Pitteloud N. New horizons: gonadotropin-releasing hormone and cognition. *J Clin Endocrinol Metab.* 2023; dgad319.
- Hampshire A, Chatfield DA, AM MP, et al. Multivariate profile and acute-phase correlates of cognitive deficits in a COVID-19 hospitalised cohort. *eClinicalMedicine.* 2022;47:101417.
- Xu E, Xie Y, Al-Aly Z. Long-term neurologic outcomes of COVID-19. *Nat Med.* 2022;28(11):2406–2415.
- Mavrikaki M, Lee JD, Solomon IH, Slack FJ. Severe COVID-19 is associated with molecular signatures of aging in the human brain. *Nat Aging.* 2022;2:1130–1137.
- Devisme J, Lebouvier T, Vannod-Michel Q, Prevot V, Maturage CA. COVID-19 could worsen cerebral amyloid angiopathy. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2023;82(9):814–817.
- Cao X, Li W, Wang T, et al. Accelerated biological aging in COVID-19 patients. *Nat Commun.* 2022;13(1):2135.
- Al-Aly Z, Xie Y, Bowe B. High-dimensional characterization of post-acute sequelae of COVID-19. *Nature.* 2021;594(7862):259–264.
- Davis HE, McCorkell L, Vogel JM, Topol EJ. Long COVID: major findings, mechanisms and recommendations. *Nat Rev Microbiol.* 2023;21(3):133–146.
- Monje M, Iwasaki A. The neurobiology of long COVID. *Neuron.* 2022;110(21):3484–3496.
- The Lancet N. Long COVID: understanding the neurological effects. *Lancet Neurol.* 2021;20(4):247.
- Sakonia A, Pontillo M, Capogrosso P, et al. Severely low testosterone in males with COVID-19: a case-control study. *Andrology.* 2021;9(4):1043–1052.
- Sakonia A, Pontillo M, Capogrosso P, et al. Testosterone in males with COVID-19: a 7-month cohort study. *Andrology.* 2021;10(1):34–41.
- Clarke SA, Phylactou M, Patel B, et al. Normal adrenal and thyroid function in patients who survive COVID-19 infection. *J Clin Endocrinol Metab.* 2021;106(8):2208–2220.
- Vannelli GB, Ensolli F, Zomefrati R, et al. Neuroblast long-term cell cultures from human fetal olfactory epithelium respond to odors. *J Neurosci.* 1995;15(6):4382–4394.
- Crawford KHD, Eguia R, Dingens AS, et al. Protocol and reagents for pseudotyping lentiviral particles with SARS-CoV-2 spike protein for neutralization assays. *Viruses.* 2020;12(5):513.
- Sekulic M, Harper H, Nezami BG, et al. Molecular detection of SARS-CoV-2 infection in FFPE samples and histopathologic findings in fatal SARS-CoV-2 cases. *Am J Clin Pathol.* 2020;154(2):190–200.
- Rhoads DD, Cherian SS, Román K, Stentpak LM, Schmotzer CL, Sadri N. Comparison of Abbott ID now, DiaSorin Simplexa, and CDC FDA emergency use authorization methods for the detection of SARS-CoV-2 from nasopharyngeal and nasal swabs from individuals diagnosed with COVID-19. *J Clin Microbiol.* 2020;58(8):e00760–e007820.
- Baratchian M, McManus JM, Berk MP, et al. Androgen regulation of pulmonary AR, TMPRSS2 and ACE2 with implications for sex-discordant COVID-19 outcomes. *Sci Rep.* 2021;11(1):11130.
- Wu CT, Lidzky PV, Xiao Y, et al. SARS-CoV-2 replication in airway epithelia requires motile cilia and microvillar reprogramming. *Cell.* 2023;186(1):112–130.e20.
- Müller JA, Gross R, Conzelmann C, et al. SARS-CoV-2 infects and replicates in cells of the human endocrine and exocrine pancreas. *Nat Metab.* 2021;3(2):149–165.
- Kamle S, Ma B, He CH, et al. Chitinase 3-like-1 is a therapeutic target that mediates the effects of aging in COVID-19. *JCI Insight.* 2021;6(21):e148749.
- Parkash J, Messira A, Langlet F, et al. Semaphorin7A regulates neuroglial plasticity in the adult hypothalamic median eminence. *Nat Commun.* 2015;6:6385.
- Belle M, Godefroy D, Couly G, et al. Tridimensional visualization and analysis of early human development. *Cell.* 2017;169(1):161–173.e12.
- Iwata R, Kiyonari H, Imai T. Mechanosensory-based phase coding of odor identity in the olfactory bulb. *Neuron.* 2017;96(5):1139–1135.e7.
- Hrabovszky E, Molnar CS, Sipos MT, et al. Sexual dimorphism of kisspeptin and neurokinin B immunoreactive neurons in the infundibular nucleus of aged men and women. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2011;2:80.
- Hanchate NK, Giacobini P, Lhuillier P, et al. SEMA3A, a gene involved in axonal pathfinding, is mutated in patients with Kallmann syndrome. *PLoS Genet.* 2012;8(8):e1002896.
- Vanacker C, Trova S, Shrutti S, et al. Neurotrophin-1 expression in GnRH neurons regulates prepubertal weight gain and sexual attraction. *EMBO J.* 2020;39(19):e104633.
- Lim JS, Ilaseta A, Fischer MM, et al. Intratumoural heterogeneity generated by Notch signalling promotes small-cell lung cancer. *Nature.* 2017;545(7654):360–364.
- Casadonte J, Prevot V. The special relationship: glia-neuron interactions in the neuroendocrine hypothalamus. *Nat Rev Endocrinol.* 2018;14(1):25–44.
- Herbison AE. A simple model of estrous cycle negative and positive feedback regulation of GnRH secretion. *Front Neuroendocrinol.* 2020;57:100837.
- Lanser I, Burkert FR, Thommes L, et al. Testosterone deficiency is a risk factor for severe COVID-19. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2021;12:694083.
- Dhindsa S, Zhang N, McPhaul MJ, et al. Association of circulating sex hormones with inflammation and disease severity in patients with COVID-19. *JAMA Netw Open.* 2021;4(5):e2111398.
- Grislioglu AE, Grislioglu N, Demirdogen SO, et al. The relationship of serum testosterone levels with the clinical course and prognosis of COVID-19 disease in male patients: a prospective study. *Andrology.* 2021;10(1):24–33.
- Spratt DJ, Cox P, Orav J, Moloney J, Bigos T. Reproductive axis suppression in acute illness is related to disease severity. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993;76(6):1548–1554.
- Turner HE, Wass JA. Gonadal function in men with chronic illness. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1997;47(4):379–403.

- 44 Boehm U, Bouloux PM, Dattani MT, et al. Expert consensus document: European consensus statement on congenital hypogonadotropic hypogonadism—pathogenesis, diagnosis and treatment. *Nat Rev Endocrinol*. 2015;11(9):547–564.
- 45 Messina A, Langlet F, Chachlaki K, et al. A microRNA switch regulates the rise in hypothalamic GnRH production before puberty. *Nat Neurosci*. 2016;19(6):835–844.
- 46 Baroncini M, Allet C, Leroy D, Beauvillain JC, Francke JP, Prevot V. Morphological evidence for direct interaction between gonadotrophin-releasing hormone neurons and astroglial cells in the human hypothalamus. *J Neuroendocrinol*. 2007;19(9):691–702.
- 47 Wray S, Grant P, Gainer H. Evidence that cells expressing luteinizing hormone-releasing hormone mRNA in the mouse are derived from progenitor cells in the olfactory placode. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86(20):8132–8136.
- 48 Schwanzel-Fukuda M, Pfaff DW. Origin of luteinizing hormone-releasing hormone neurons. *Nature*. 1989;338(6211):161–164.
- 49 Chachlaki K, Messina A, Delli V, et al. NOS1 mutations cause hypogonadotropic hypogonadism with sensory and cognitive deficits that can be reversed in infantile mice. *Sci Transl Med*. 2022;14(665):eab2369.
- 50 Cecon E, Fernandois D, Renault N, et al. Melatonin drugs inhibit SARS-CoV-2 entry into the brain and virus-induced damage of cerebral small vessels. *Gliol Mol Life Sci*. 2022;79(7):361.
- 51 Hoffmann M, Kleins-Weber H, Schroeder S, et al. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell*. 2020;181(2):271–280.e8.
- 52 Prevot V, Debouck B, Sharif A, Ciofi P, Giacobini P, Clasadonte J. The versatile tanyocyte: a hypothalamic integrator of reproduction and energy metabolism. *Endocr Rev*. 2018;39(3):333–368.
- 53 Quinton R, Hasan W, Grant W, et al. Gonadotropin-releasing hormone immunoreactivity in the nasal epithelia of adults with Kallmann's syndrome and isolated hypogonadotropic hypogonadism and in the early midtrimester human fetus. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82(1):309–314.
- 54 de Melo GD, Lazarini F, Levallois S, et al. COVID-19-related anosmia is associated with viral persistence and inflammation in human olfactory epithelium and brain infection in hamsters. *Sci Transl Med*. 2021;13(596):eab8396.
- 55 Meinhardt J, Radke J, Dittmayer C, et al. Olfactory transmucosal SARS-CoV-2 invasion as a port of central nervous system entry in individuals with COVID-19. *Nat Neurosci*. 2021;24(2):168–175.
- 56 Khan M, Yoo SJ, Clijsters M, et al. Visualizing in deceased COVID-19 patients how SARS-CoV-2 attacks the respiratory and olfactory mucosae but spares the olfactory bulb. *Cell*. 2021;184(24):5932–5949.e15.
- 57 Khan M, Clijsters M, Choi S, et al. Anatomical barriers against SARS-CoV-2 neuroinvasion at vulnerable interfaces visualized in deceased COVID-19 patients. *Neuron*. 2022;110(23):3919–3913.e6.
- 58 Giacobini P, Parkash J, Campagne C, et al. Brain endothelial cells control fertility through ovarian-steroid-dependent release of semaphorin 3A. *PLoS Biol*. 2014;12(3):e1001808.
- 59 Marcos S, Monnier C, Rovira X, et al. Defective signaling through plexin-A1 compromises the development of the peripheral olfactory system and neuroendocrine reproductive axis in mice. *Hum Mol Genet*. 2017;26(11):2006–2017.
- 60 Cantuti-Castelvetri L, Ojha R, Pedro LD, et al. Neuropilin-1 facilitates SARS-CoV-2 cell entry and infectivity. *Science*. 2020;370(6518):856–860.
- 61 Daly JL, Simonetti B, Klein K, et al. Neuropilin-1 is a host factor for SARS-CoV-2 infection. *Science*. 2020;370(6518):861–865.
- 62 Grunfi F, Carregari VC, Veras FP, et al. Morphological, cellular, and molecular basis of brain infection in COVID-19 patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2022;119(15):e2200960119.
- 63 Wenzel J, Lampe J, Muller-Fielitz H, et al. The SARS-CoV-2 main protease M(pro) causes microvascular brain pathology by cleaving NEMO in brain endothelial cells. *Nat Neurosci*. 2021;24(11):1522–1533.
- 64 Framissen D, Barroso A, Ruiz-Pino F, et al. AMP-activated protein kinase (AMPK) signaling in GnRH neurons links energy status and reproduction. *Metabolism*. 2021;115:154460.
- 65 Fodoulan L, Tuberosa J, Rossier D, et al. SARS-CoV-2 receptors and entry genes are expressed in the human olfactory neuroepithelium and brain. *iScience*. 2020;23(12):101839.
- 66 Maggi M, Barni T, Fantoni G, et al. Expression and biological effects of endothelin-1 in human gonadotropin-releasing hormone-secreting neurons. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85(4):1658–1665.
- 67 Fenizia C, Biasin M, Cetin I, et al. Analysis of SARS-CoV-2 vertical transmission during pregnancy. *Nat Commun*. 2020;11(1):5128.
- 68 Facchetti F, Bugatti M, Drera E, et al. SARS-CoV2 vertical transmission with adverse effects on the newborn revealed through integrated immunohistochemical, electron microscopy and molecular analyses of Placenta. *iBioMedicine*. 2020;59:102951.
- 69 Matschke J, Lutgehetmann M, Hagel C, et al. Neuropathology of patients with COVID-19 in Germany: a post-mortem case series. *Lancet Neurol*. 2020;19(11):919–929.
- 70 Song E, Zhang C, Israelow B, et al. Neuroinvasion of SARS-CoV-2 in human and mouse brain. *J Exp Med*. 2021;218(3):e20202135.
- 71 Yang AC, Kem F, Losada PM, et al. Dysregulation of brain and choroid plexus cell types in severe COVID-19. *Nature*. 2021;595(7868):565–571.
- 72 Stein SR, Rumelli SC, Grazioli A, et al. SARS-CoV-2 infection and persistence in the human body and brain at autopsy. *Nature*. 2022;612(7941):758–763.
- 73 Douaud G, Lee S, Alfaro-Almagro F, et al. SARS-CoV-2 is associated with changes in brain structure in UK Biobank. *Nature*. 2022;604(7907):697–707.
- 74 Fernandez-Castaneda A, Lu P, Geraghty AC, et al. Mild respiratory COVID can cause multi-lineage neural cell and myelin dysregulation. *Cell*. 2022;185(14):2452–2468.e16.
- 75 Butowt R, von Bartheld CS. The route of SARS-CoV-2 to brain infection: have we been barking up the wrong tree? *Mol Neurodegener*. 2022;17(1):20.
- 76 Facondo P, Maltese V, Delbarba A, et al. Case report: hypothalamic amenorrhea following COVID-19 infection and review of literature. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022;13:840749.
- 77 Soejima Y, Otsuka Y, Tokumaru K, et al. Late-onset hypogonadism in a male patient with long COVID diagnosed by exclusion of ME/CFS. *Medicina (Kaunas)*. 2022;58(4):536.
- 78 Lebar V, Lagana AS, Chiantera V, Kunic T, Lukanovic D. The effect of COVID-19 on the menstrual cycle: a systematic review. *J Clin Med*. 2022;11(13):3800.
- 79 Lechien JR, Chiesa-Estomba CM, De Siani DR, et al. Olfactory and gustatory dysfunctions as a clinical presentation of mild-to-moderate forms of the coronavirus disease (COVID-19): a multicenter European study. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2020;277(8):2251–2261.
- 80 Hellier V, Brock O, Candlish M, et al. Female sexual behavior in mice is controlled by kisspeptin neurons. *Nat Commun*. 2018;9(1):400.
- 81 Zhang G, Li J, Purkayastha S, et al. Hypothalamic programming of systemic aging involving IKK-beta, NF-kappaB and GnRH. *Nature*. 2013;497(7448):211–216.
- 82 Herbison AE, Porteous R, Pape JR, Mora JM, Hurst PR. Gonadotropin-releasing hormone neuron requirements for puberty, ovulation, and fertility. *Endocrinology*. 2008;149(2):597–604.
- 83 Nampoothiri S, Nogueiras R, Schwaninger M, Prevot V. Glial cells as integrators of peripheral and central signals in the regulation of energy homeostasis. *Nat Metab*. 2022;4(7):813–825.
- 84 Kwan AC, Ebinger JE, Botting P, Navarrete J, Claggett B, Cheng S. Association of COVID-19 vaccination with risk for incident diabetes after COVID-19 infection. *JAMA Netw Open*. 2023;6(2):e2255965.
- 85 Schultheiss C, Willscher E, Paschold L, et al. The IL-1beta, IL-6, and TNF cytokine triad is associated with post-acute sequelae of COVID-19. *Cell Rep Med*. 2022;3(6):100663.
- 86 Mehndru S, Merad M. Pathological sequelae of long-haul COVID. *Nat Immunol*. 2022;23(2):194–202.
- 87 Botcher M, Muller-Fielitz H, Sundaram SM, et al. NF-kappaB signaling in tanyocytes mediates inflammation-induced anorexia. *Mol Metab*. 2020;39:101022.
- 88 Figueiredo CPF-DF, da Poian AT, Clarke JR. SARS-CoV-2-associated cytokine storm during pregnancy as a possible risk factor for neuropsychiatric disorder development in post-pandemic infants. *Neuropharmacology*. 2021;201:108841. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2021.108841>.
- 89 Villar J, Ariff S, Gunier RB, et al. Maternal and neonatal morbidity and mortality among pregnant women with and without COVID-19 infection: the INTERCOVID multinational cohort study. *JAMA Pediatr*. 2021;175(8):817–826.

- 90 Pellegriño G, Martín M, Allet C, et al. GnRH neurons recruit astrocytes in infancy to facilitate network integration and sexual maturation. *Nat Neurosci*. 2021;24(12):1660–1672.
- 91 Kuiri-Hanninen T, Kallio S, Seuri R, et al. Postnatal developmental changes in the pituitary-ovarian axis in preterm and term infant girls. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(11):3432–3439.
- 92 Kuiri-Hanninen T, Seuri R, Tyrvalinen E, et al. Increased activity of the hypothalamic-pituitary-testicular axis in infancy results in increased androgen action in premature boys. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(1):98–105.
- 93 D'Onofrio BM, Class QA, Rickert ME, Larsson H, Langstrom N, Lichtenstein P. Preterm birth and mortality and morbidity: a population-based quasi-experimental study. *JAMA Psychiatry*. 2013;70(11):1231–1240.
- 94 Liu TM, Katz SL, Leeson P, Thebaud B, Nuyt AM. Preterm birth: risk factor for early-onset chronic diseases. *CMAJ*. 2016;188(10):736–746.
- 95 Mulkey SB, Williams ME, Jadeed N, Zhang A, Israel S, DeBiasi RL. Neurodevelopment in infants with antenatal or early neonatal exposure to SARS-CoV-2. *Early Hum Dev*. 2022;175:105694.

## Etude 3 – Le SARS-CoV2 infecte des neurones à GnRH dans le cerveau des souris K18-hACE2

---

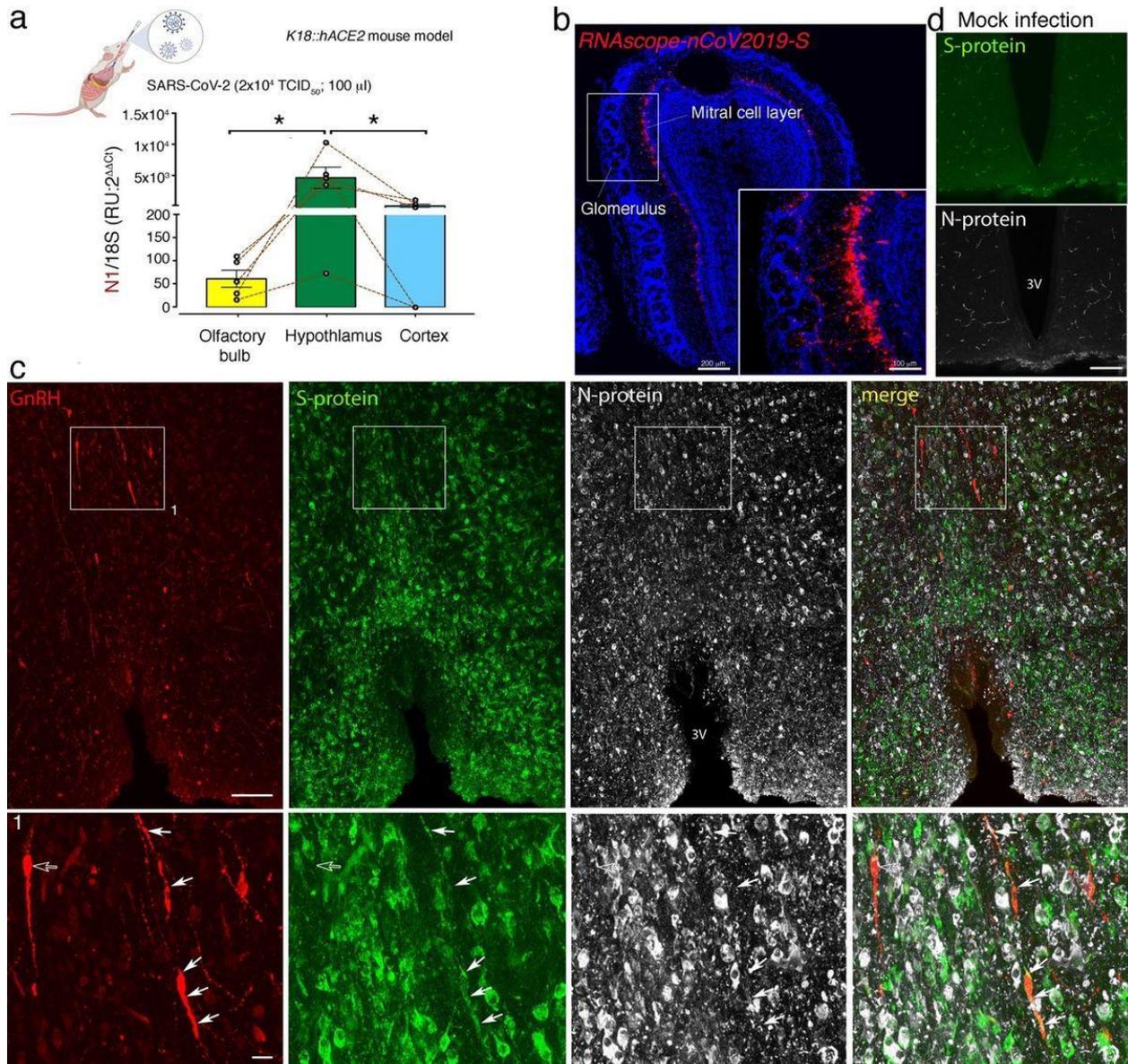
- **Rationnel**

Contrairement à d'autres neurones neuroendocriniens, les neurones à GnRH ne naissent pas dans le cerveau mais proviennent de la placode olfactive et migrent du nez vers le cerveau au cours de l'embryogenèse restant en contact avec le bulbe olfactif (OB) via de longues dendrites (Giacobini et al., 2014; Schwanzel-Fukuda & Pfaff, 1989; Wray et al., 1989). Parmi les signaux moléculaires clés du développement et de la fonction neuronale de la GnRH figurent les sémaphorines de classe 3, des ligands de la Nrp1, que les neurones à GnRH eux-mêmes expriment également (Giacobini et al., 2014; Hanchate et al., 2012; Vanacker et al., 2020). Comme il a été discuté dans l'Introduction, Nrp1 est reconnue comme un corécepteur pour la SARS-CoV2 (Daly et al., 2020). Nous avons souhaité donc vérifier si les neurones à GnRH pourraient également exprimer l'ACE2 et si ces neurones pourraient être infectés sur un modèle murin en exprimant l'ACE2 humanisée.

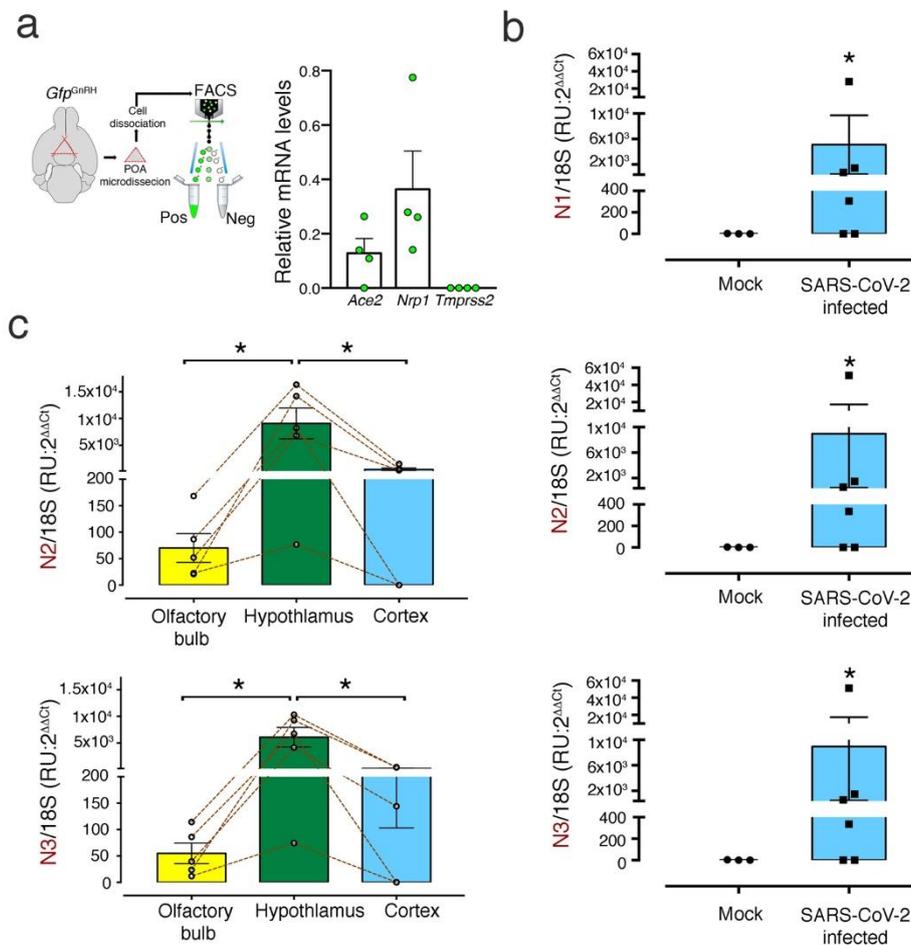
- **Résultats**

À la lumière de ces faits, nous avons évalué si les neurones à GnRH pouvaient eux-mêmes être sensibles à l'infection par le SARS-CoV-2 en isolant ces neurones chez les souris *Gnrh::gfp* à l'aide d'un tri cellulaire activé par fluorescence et en y quantifiant les transcrits d'*Ace2*, *Tmprss2* et *Nrp1* par RT-PCR. Bien que les transcrits de *TMPRSS2* soient indétectables dans ces neurones, ils expriment *Nrp1* et l'*Ace2* (**Figure 1a**), ce qui suggère que chez la souris comme chez l'humain, les neurones adultes à GnRH pourraient être la cible du SARS-CoV2 dans les nouveaux modèles de souris KI hACE2 (B. Zhou et al., 2021). N'ayant obtenu ce nouveau modèle que très tardivement au cours de ma thèse, nous avons tout d'abord étudié l'infection potentielle des neurones à GnRH dans la lignée de souris K18-hACE2. Nous avons constaté que 7 jours après l'infection intranasale par le SARS-CoV2, les transcrits de la protéine N ont été détectés dans tout le cerveau de ces souris par RT-PCR (**Figure 1a; Figures 2b,c**). De plus, les études par RNAscope ont clairement révélé la présence de transcrits de la protéine S dans les cellules mitrales du bulbe olfactif (**Figure 1b**). Il est intéressant de noter qu'à 7 jours après l'infection, les transcrits viraux étaient beaucoup plus abondants dans l'hypothalamus que dans les bulbes olfactifs ou le cortex des souris K18-hACE2 (test de comparaison multiple de Friedman suivi d'un post-test de Dunn non corrigé) (**Figure 1a ; Figure 2c**). Le marquage par

immunofluorescence des protéines S et N du SARS-CoV-2 a montré une infection virale massive dans l'ensemble du cerveau chez 4 souris sur 6 et une infection virale limitée à l'hypothalamus chez 2 souris, récapitulant les données RT-PCR obtenues sur les mêmes animaux (**Figure 2c**). Nos observations renforcent la possibilité d'une voie hématogène d'infection virale à travers les organes circumventriculaires hypothalamiques tels que l'éminence médiane. Nos triples marquages par immunofluorescence ont montré que comme dans l'espèce humaine les neurones à GnRH pouvaient être infectés par le SARS-CoV2 chez la souris K18-hACE2 (**Figure 1c**). Le signal fluorescent des marqueurs viraux était complètement absent dans le cerveau des souris K18-hACE2 infectées fictivement (**Figure 1d**), validant la spécificité de nos outils pour détecter l'infection par le SARS-CoV2.



**Figure 1. Le SARS-CoV2 infecte les neurones à GnRH dans le cerveau du modèle murin hACE2.** (a) Analyse qPCR de l'expression de la protéine N à l'aide de la sonde N1 dans le bulbe olfactif, l'hypothalamus et le cortex des souris K18-hACE2, 7 jours après l'infection de SARS-CoV2 par voie intranasale. Le test de comparaison multiple de Friedman ( $F_r=7\ 600$ ,  $p=0,0239$ ) suivi d'un post-test de Dunn non corrigé ; Bulbe olfactif vs Hypothalamus  $p = 0,0114$  et Cortex vs Hypothalamus  $p = 0,0269$ .  $n = 5$  souris infectées par le SARS-CoV-2) (b) Marquage du RNAscope en montrant l'expression du transcrite de la protéine S (rouge) dans la couche cellulaire mitrale du bulbe olfactif 7 jours après une infection par le SARS-CoV2. Bleu : DAPI. Barre d'échelle : 200  $\mu$ m (encart 200  $\mu$ m). c) Immunomarquage de la GnRH (rouge), de la protéine S (vert) et de la protéine N (en blanc) dans la région préoptique de l'hypothalamus chez les souris K18-hACE2 7 jours après une infection par le SARS-CoV2. 1: Grossissement élevé de l'encart montrant des neurones à GnRH exprimant ou non des protéines virales (flèche blanche et vide, respectivement). Barre d'échelle : 200  $\mu$ m (encart 20  $\mu$ m). d) Contrôle négatif montrant l'absence d'immunomarquage des protéines virales chez des souris infectées simulées. Barre d'échelle : 200  $\mu$ m.



**Figure 2. Analyse quantitative par PCR des facteurs de susceptibilité dans les neurones à GnRH et de la protéine N du SARS-CoV-2 dans le cerveau de souris infecté.** (a) Analyses quantitatives par qPCR pour *Ace2*, *Tmprss2* et *Nrp1* dans des neurones GnRH de souris isolés par tri cellulaire activé par fluorescence (FACS) à partir de souris *GnRH::Gfp*. (b) Analyse quantitative par PCR des taux de transcription de la protéine N dans le cortex de souris K18-hACE2 infectées ou pas avec le SARS-CoV2 7 jours après l'infection à l'aide de trois sondes distinctes (N1, N2 et N3). Les valeurs sont exprimées par rapport aux transcrits de l'ARN 18S d'entretien. (n = 3 animaux simulés et 5 animaux infectés par le SARS-CoV2; test U de Mann-Whitney à deux queues ; N1, N2 et N3 : U=2, P = 0,0476). (c) Analyse qPCR comparant les niveaux de transcription de la protéine N entre le bulbe olfactif, l'hypothalamus et le cortex de souris K18-hACE2 infectées par le SARS-CoV-2 7d à l'aide des ensembles de sondes N2 et N3 (en lien avec la figure 2a). Test de comparaison multiple de Friedman : N2 Fr = 7,600, P = 0,0239 ; N3 Fr = 7,600, P = 0,0239, suivi d'un post-test de Dunn non corrigé. N2 : bulbe olfactif vs hypothalamus p = 0,0114 et cortex vs hypothalamus p = 0,0269. N3 : bulbe olfactif vs hypothalamus p = 0,0114 et cortex vs hypothalamus p = 0,0269).

## **Etude 4 – L’infection par le SARS-CoV2 entraine une l’hypotestostéronémie et une altération de l’expression de la kisspeptine dans le noyau arqué de l’hypothalamus chez le hamster**

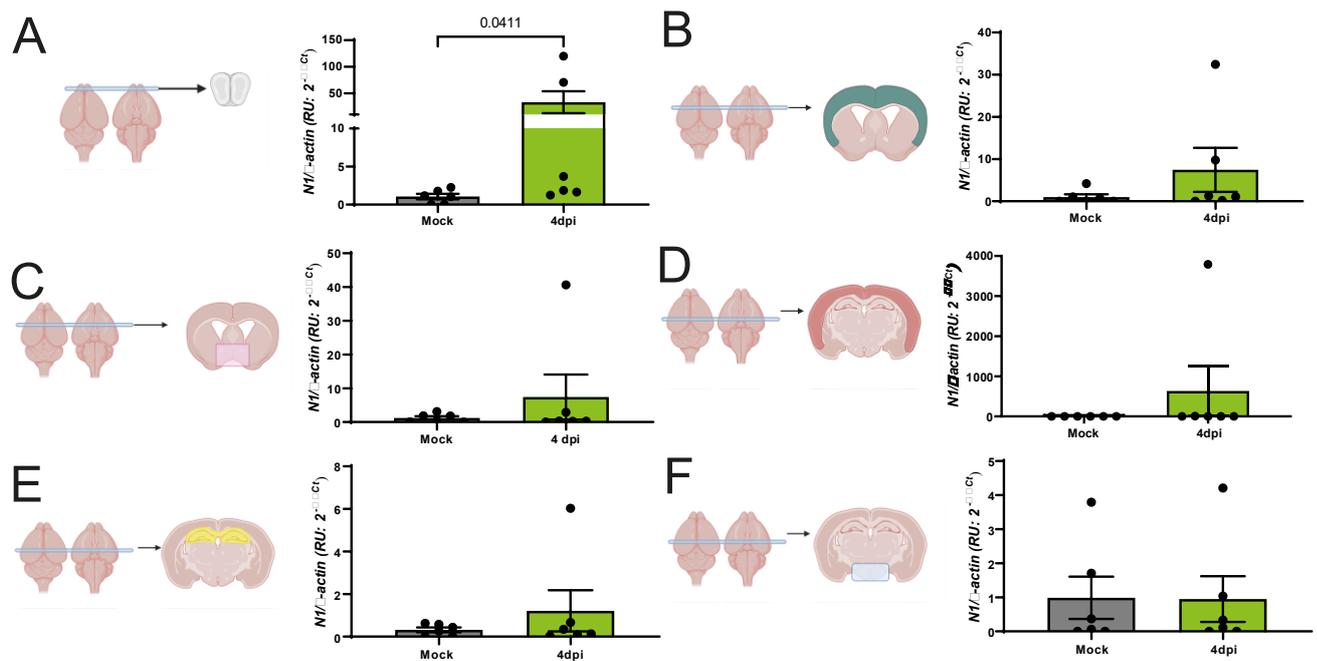
- **Rationnel**

Les impacts de la COVID-19 sur le système reproducteur masculin sont une nouvelle voie de recherche dans les études en COVID longue qui nécessitent l’exploration des mécanismes physiopathologiques sous-jacents (H. E. Davis et al., 2023). Le hamster n’est pas seulement un modèle plus physiologique pour mimer l’infection du SARS-CoV2 chez l’humain, mais aussi un modèle sur lequel il est possible d’explorer les possibles effets à long terme de cette infection (Rizvi et al., 2022; Rosenke et al., 2020; Sia et al., 2020). En outre, il est fort possible que le cerveau de hamster puisse être la cible du SARS-CoV2 car dans une étude conduite en collaboration avec Markus Schwaninger à l’Université de Lübeck (voir ANNEXE 1) nous avons montré la présence de « vaisseaux fantômes » qui sont la conséquence de la nécroptose des cellules endothéliales des micro vaisseaux du cerveau au pic d’infection (au jour 4) par le virus (Wenzel et al., 2021). Dans le cadre de nos recherches sur les potentiels mécanismes neuroendocrines de la COVID longue, nous avons eu recours à ce modèle afin d’observer les impacts de l’infection par le SARS-CoV2 dans le cerveau et ses conséquences endocrines.

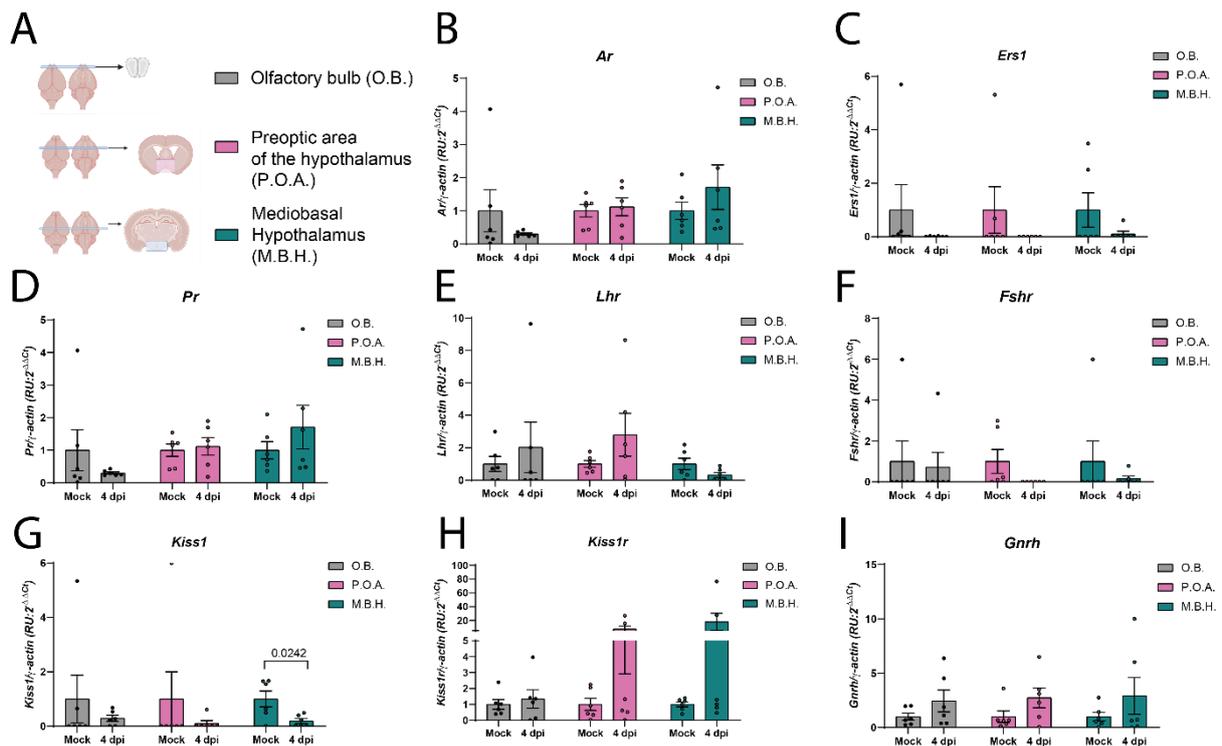
- **Résultats**

Nous avons analysé différentes aires cérébrales d’hamsters infectés ou non par le SARS-CoV2 par PCR en temps réel et nous avons identifié que les bulbes olfactifs étaient significativement infectés, en ayant une forte expression des transcrits pour la protéine N du SARS-CoV2 (**Figure 3a**). Seulement un animal a été positif pour les transcrits de la protéine N dans les cortex, l’area pré-optique et l’hippocampe (**Figure 3b-e**). Par ailleurs, nous recourûmes à la même stratégie pour identifier des possibles altérations dans l’expression de gènes fortement impliqués dans le contrôle de l’axe reproducteur. Aucune différence n’a été retrouvée pour l’expression des gènes du récepteur des androgènes (*Ar*), du récepteur de l’œstradiol alpha (*Esr1*), du récepteur de progestérone (*Pr*), du récepteur de l’hormone lutéinisante (*Lhr*), du récepteur de l’hormone folliculostimulante (*Fshr*), du récepteur de kisspeptine (*Kiss1r*) ou du récepteur de l’hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires ou gonadolibérine (*Gnrh*) (**Figure 4**). Cependant, nous avons trouvé une expression différentielle du gène de la kisspeptine dans le noyau arqué de l’hypothalamus ; les transcrits du gène codant pour la

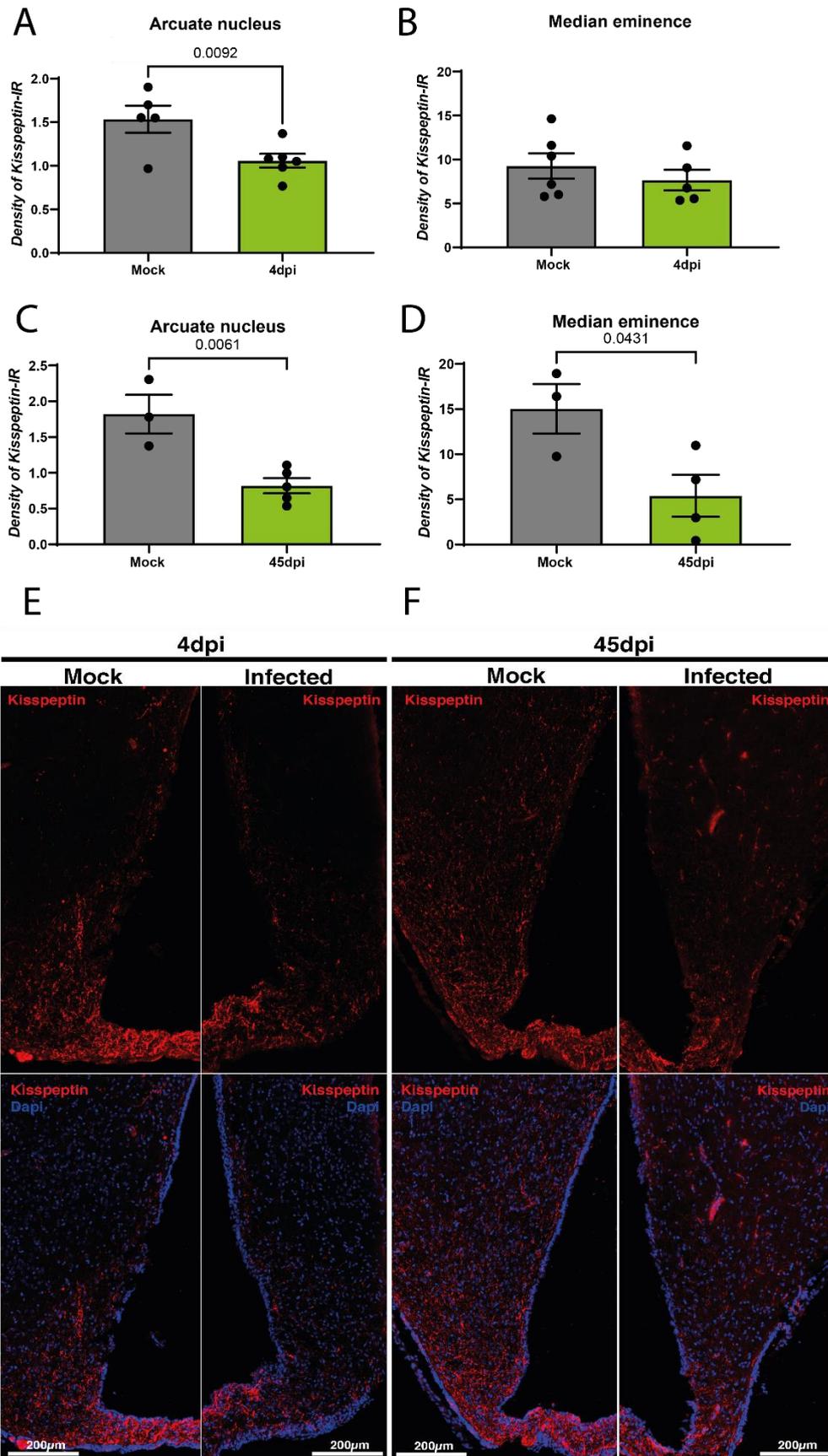
kisspeptine étaient significativement moins abondants chez les hamsters 45 jours après l'infection par le SARS-CoV2 (**Figure 5**). Des études immunohistochimiques sur les coupes de cerveau de ces hamsters a montré que ce déficit transcriptionnel de l'expression de kisspeptine se traduisait par une perte d'immunoréactivité pour la kisspeptine à la fois dans le noyau arqué de l'hypothalamus, mais aussi dans l'éminence médiane (**Figure 6**) où les axones des neurones à kisspeptine sont connus pour contrôler la pulsativité de la sécrétion de GnRH/LH. De manière intéressante, cet perte de production de kisspeptine semble apparaître dès la phase aiguë de d'infection à 4 jours (**Figure 6 A,B,E**) et se maintien 45 jours après infection (**Figure 6C,D,F**). Du fait de ces altérations, nous avons dosé les hormones LH, testostérone et progestérone chez les hamsters 45 jours après infection, en présence ou en absence d'inoculation virale. Les hamsters infectés par le SARS-CoV2 ont montré une hypotestostéronémie, sans toutefois affecter le taux des autres hormones (**Figure 7**).



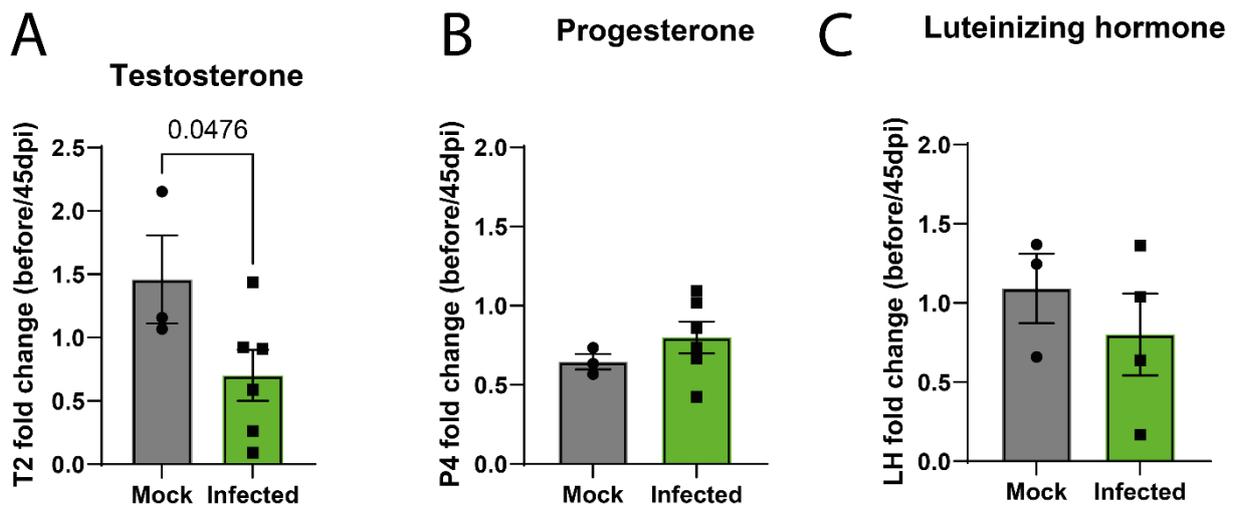
**Figure 3. Analyse quantitative par PCR des transcrits de la protéine N dans les cerveaux des hamsters infectés.** PCR en temps réel pour la protéine N du SARS-CoV2 (paire d'amorces N1). L'ARNm a été extrait des différentes aires microdisséquées sur coupe de cerveau de hamster. Les hamsters ont été euthanasiés 4 jours après l'infection (4dpi) ou l'infection « mock ». **A.** Le bulbe olfactif **B.** Du cortex positionné en dessus de l'aire pré-optique. **C.** Du cortex positionné au dessus de l'hypothalamus médiobasal. **E.** L'hippocampe, positionné au dessus de l'hypothalamus médiobasal. **F.** L'hypothalamus médiobasal. N= 6. Teste de Mann-Whitney U, pour des données non-paramètres. Les valeurs exactes de p sont dans les graphs.



**Figure 4. Analyse par PCR des gènes impliqués dans la reproduction.** L'ARNm a été extrait des différentes aires microdisséqués du cerveau du hamster. Les hamsters ont été euthanasiés 4 jours après l'infection (4dpi) ou l'infection « mock ». **A.** Figure représentative les régions du cerveau analysées. **B.** Récepteur des androgènes (*Ar*) **C.** Récepteur de l'œstradiol alpha (*Esr1*) **D.** Récepteur de progestérone (*Pr*) **E.** Récepteur de l'hormone lutéinisante (*Lhr*) **F.** Récepteur de l'hormone folliculostimulante (*Fshr*) **G.** De la kisséptine (*Kiss1*) **H.** Récepteur de kisséptine (*Kiss1r*) **I.** Récepteur de l'hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires (*Gnrh*). N= 6. Teste de Mann-Whitney U, pour des données non-paramètres. Les valeurs exactes de p sont dans les graphs.



**Figure 5. L'expression de la kisspeptine dans l'hypothalamus médiobasal des hamsters infectés avec le SARS-CoV2.** La densité des fibres a été quantifiée comme area d'immunoreactivité positive en pourcentage. **A-B.** Densité de fibres de kisspeptine dans le noyau arqué et l'éminence médiane des hamsters 4 jours après infection (dpi). **C-D.** Densité de fibres de kisspeptine dans le noyau arqué et l'éminence médiane des hamsters 45dpi. **E.** Figure représentative de l'immunomarquage de kisspeptine dans les hamsters Mock et le 4dpi. **F.** Figure représentative de l'immunomarquage de kisspeptine dans les hamsters Mock et le 45dpi. N=3-6. Teste *t* de Student non apparié pour les données paramètres. Les valeurs exactes de p sont dans les graphes.



**Figure 6. Les taux sériques de la testostérone (A), la progestérone (B) et de la LH (C) chez les hamsters 45 jours après infection (dpi).** Le sang a été extrait de chaque animal avant et 45 jours après l'inoculation du virus. Les hormones ont été dosées par ELISA. Le rapport de changement de chaque animal a été ploté sur les graphes. N=3-6. L'analyse statistique a été effectuée par le teste Mann-Whytney U, pour des données non-paramètres. Les valeurs de p sont montrées sur les graphes.

# Discussion

Le SARS-CoV-2 infecte plusieurs tissus, dont le cerveau, une observation qui a été largement négligée car considérée comme non pertinente pour la phase aiguë de la COVID-19 en début de pandémie (Cosentino et al., 2021). La description de symptômes persistants, plusieurs mois après la phase aiguë, comme l'augmentation de l'incidence des maux de tête, de la fatigue et des symptômes neurologiques, indique un rôle potentiel du cerveau en tant que cible du virus (E. Xu et al., 2022). Des stratégies de protection du cerveau pourraient donc être intéressantes à mettre en place pour la prise en charge des conséquences à long terme de l'infection par le SARS-CoV2. Dans le premier travail de cette thèse, nous montrons que sur un modèle murin de COVID-19 le traitement à la mélatonine, en particulier à fortes doses, protège les cellules endothéliales du cerveau en inhibant l'entrée du SARS-CoV-2 dans ces cellules. La mélatonine se lie à un site de liaison allostérique à l'ACE2 qui est connecté à l'interface moléculaire interagissant avec la protéine S, empêchant ainsi le SARS-CoV-2 d'interagir avec son récepteur d'entrée.

D'autres effets bénéfiques de la mélatonine peuvent découler du fait que la mélatonine conduit les cellules endothéliales à un état inflammatoire moins réactif en raison d'une expression plus faible des gènes de la voie NFkB. De plus, la réduction de l'expression endogène d'Ace2 pourrait également participer à la diminution de l'entrée virale dans les modèles où les récepteurs endogènes sont sensibles au SARS-CoV-2. Nous avons identifié que les cellules endothéliales cérébrales pourraient être les principales cellules cibles à l'action de la mélatonine, vu qu'elles expriment l'ACE2 et les récepteurs mélatoninergiques MT1 et MT2. Nos données indiquent aussi que la mélatonine a un effet protecteur sur les capillaires cérébraux, vu que le traitement diminue la formation de vaisseaux fantômes et prévient la réduction de la densité vasculaire. Le fait que la mélatonine et ses dérivés utilisés en clinique présentent un effet neuroprotecteur chez les souris K18-hACE2, qui est un modèle d'infection supra physiologique, ce qui suggère qu'il puisse s'agir de molécules intéressantes à repositionner pour la prise en charge de la COVID longue chez l'humain. Comme la mélatonine a des effets dépendants et indépendants des récepteurs (Liu et al., 2019), nous avons choisi l'agomélatine et le ramelteon pour évaluer plus spécifiquement l'action des récepteurs MT1 et MT2. Ces deux analogues de la mélatonine sont très spécifiques des récepteurs MT1 et MT2 et sont utilisés en clinique (Hardeland et al., 2008). Cependant, nous avons montré que leurs effets n'étaient pas identiques à ceux de la mélatonine. En effet, ceux-ci étaient plus modérés

suggérant que les effets neuroprotecteurs de la mélatonine en plus d'impliquer les récepteurs MT1 et MT2 pourrait aussi nécessiter une action sur d'autres cibles comme sa liaison sur le récepteur du virus ACE2 qui jouerait un rôle d'inhibition compétitive entravant les capacités d'infection du virus.

La spécificité tissulaire du traitement à la mélatonine était frappante, allant de l'absence d'effet sur la charge virale dans les poumons à un blocage conséquent de l'infection dans le cerveau. Plusieurs facteurs pourraient être à l'origine de cette sélectivité tissulaire de l'effet mélatonine. Tout d'abord, l'infection par le SARS-CoV-2 suit une dynamique bien caractérisée, les voies respiratoires et les poumons étant les principaux tissus touchés tandis que l'infection systémique est plus tardive. Bien que nous ne puissions pas écarter les effets bénéfiques potentiels du traitement à la mélatonine à des stades précoces, l'absence de tout effet de la mélatonine sur la pathologie pulmonaire globale plaide contre cette possibilité, au moins dans le modèle K18-hACE2 (Cecon et al., 2022). Deuxièmement, les mécanismes d'invasion du virus diffèrent considérablement entre la première phase et la propagation systémique. Dans la phase précoce de l'infection, les épithéliums des voies respiratoires supérieures et inférieures et les alvéoles pulmonaires sont les principales cellules ciblées par le SARS-CoV-2 et sont également l'endroit où la réplication virale active a lieu (Hui et al., 2020; Robinot et al., 2021). Une concentration élevée de virions associée à une forte expression d'ACE2 dans ces cellules est certainement une condition difficile à contrecarrer par la mélatonine dans les poumons (Winkler et al., 2020). En revanche, la propagation systémique de l'infection virale est caractérisée par une virémie relativement faible et une faible expression de l'ACE2 dans le cas du tissu cérébral chez l'homme, conditions plus favorables à un effet de la mélatonine (Frank, 2020).

Plusieurs essais cliniques fondés sur le traitement à la mélatonine ont été menés pendant la crise sanitaire et les résultats de certains d'entre eux commencent à être publiés et soulignent un effet bénéfique de l'utilisation de la mélatonine sur la qualité du sommeil et le devenir des patients COVID-19 (Mousavi et al., 2022). Dans ce sens, des études montrent que l'usage de la mélatonine peut être bénéfique chez les patients hospitalisés, y compris en USI. L'usage de mélatonine peut aider à diminuer le temps d'hospitalisation et réduit la fréquence d'évènements thrombotiques et de sepsis, ce qui contribue à une moindre mortalité (Farnoosh et al., 2022; Hasan et al., 2022). Dans l'ensemble, ces premiers résultats cliniques mettent en évidence un potentiel thérapeutique de la mélatonine dans le COVID-19. Compte tenu de la réduction de l'infection cérébrale et de la diminution de la réponse inflammatoire centrale avec le traitement

à la mélatonine, il est prévu que les troubles neurologiques à long terme pourraient être évités / atténués avec un traitement à la mélatonine. Finalement, l'effet sur la fonction du récepteur d'entrée du SARS-CoV2 de l'ACE2, combiné à l'inhibition de l'expression de NFκB et de l'expression endogène d'ACE2 dans les cellules endothéliales, est très probablement le mécanisme prédominant de l'altération de l'invasion cérébrale du SARS-CoV-2 par la mélatonine, et peut-être dans de moindres proportions celle de ses dérivés pharmacologiques qui n'activeraient pas les cibles autres que MT1 et MT2.

En ce qui concerne notre deuxième travail, nous montrons que les neurones à GnRH chez l'homme adulte et chez le fœtus expriment de multiples facteurs de susceptibilité au SARS-CoV2 et peuvent être infectés par le virus. Bien que nous ayons déjà montré que les cellules endothéliales du cerveau sont infectées par le SARS-CoV-2 (Wenzel et al., 2021), dans le cas de virémie les particules virales pourraient directement accéder au parenchyme de l'éminence médiane via les vaisseaux fenêtrés du système sanguin porte hypophysaire et cibler directement les terminaisons neuroendocrines à GnRH qui entrent en contact de l'espace périvasculaire de ces vaisseaux. Alors qu'une altération de la sécrétion de GnRH due à l'infection des neurones elle-même pourrait provoquer un hypogonadisme hypogonadotrope transitoire, et à terme conduire à la mort des neurones à GnRH et ainsi affecter les processus cognitifs contrôlés par la sécrétion pulsatile de GnRH. L'altération du rythme de sécrétion de GnRH a en effet été récemment montré contribuer au déclin cognitif dans certaines maladies neurodéveloppementales telles que la trisomie 21 (Manfredi-Lozano et al., 2022). L'altération du système à GnRH chez les individus en âge de procréer pourrait aussi contribuer à la diminution de la qualité du sperme ou de l'azoospermie décrite chez les hommes suite à un épisode aigu de COVID-19. Dans notre cohorte analysée, les patients ont présenté une baisse de la testostéronémie liée à un hypogonadisme hypogonadotrope 3 mois et parfois 1 an après l'infection. Ce nouveau symptôme de la COVID longue, pourrait-il permettre d'identifier les patients chez qui un traitement à la GnRH pulsatile permettrait de compenser certaines altérations neurologiques comme cela a été suggéré pour la prise en charge des altérations neurodéveloppementales mentionnées ci-dessus ?

Notre quatrième étude suggère un autre mécanisme qui pourrait conduire à un hypogonadisme hypogonadotrope et l'hypotéstostéronémie chez les patients souffrant de COVID longue. Chez les hamsters infectés avec le SARS-CoV2, nous avons identifié une tendance à la diminution d'expression de *kiss1*, le gene codant la kisspeptine qui se traduit par une diminution de la production du peptide kisspeptine par les neurones du noyau arqué de

l'hypothalamus dès 4 jours après infection, un phénomène qui est conservé jusqu'à 45 jours après l'infection. Ces observations sont pertinentes quand nous tenons compte de que le hamster est habituellement considéré comme étant un modèle de COVID-19 légère/modérée (Rosenke et al., 2020). Il faut ici stresser le fait que les patients qui développent la COVID longue ont la plupart eu une COVID-19 légère/modérée lors de la phase aiguë de l'infection (Altmann et al., 2023). De plus, grâce aux études d'imagerie, il est maintenant connu que les patients qui n'ont jamais été hospitalisés pour COVID-19 présentent des altérations cérébrales au niveau anatomique (Douaud et al., 2022). Cependant, l'hypotestostéronémie chez le hamster pourrait aussi s'expliquer par un déficit primaire du testicule du fait que comme chez l'homme, les testicules de hamster expriment l'ACE2 et constituent donc une cible possible pour le SARS-CoV2 (Campos et al., 2021). Si cela était vrai, la chute de la testostérone devrait se traduire au niveau hypothalamique par une augmentation de l'expression de kisspeptine dans le noyau arqué de l'hypothalamus et non pas le contraire. En effet, l'expression de kisspeptine dans la région tubérale de l'hypothalamus est connue pour être fortement inhibée par les stéroïdes gonadiques (Smith et al., 2005), y compris chez le hamster (Greives et al., 2008).

Les hamsters syriens sont des animaux saisonniers chez qui l'expression de kisspeptine joue un rôle important lors de la transition saisonnière entre période d'infertilité et de fertilité (Revel et al., 2006). Chez l'humain et l'ensemble des espèces de mammifères étudiées, la kisspeptine est impliquée dans la régulation de la pulsativité de la sécrétion de GnRH/LH et orchestre la régulation des pulses de libération de cette hormone (Delli et al., 2021; Patel et al., 2023). Dans nos travaux chez le hamster, il nous a malheureusement été possible d'obtenir qu'un seul point de sécrétion de LH lors du sacrifice des animaux. Les taux de LH au sacrifice n'ont pas montré de variation en fonction des conditions, cependant il n'est pas exclu que la pulsativité de sa sécrétion de la LH soit altérée chez les hamsters infectés par le SARS-CoV2. Nous avons trouvé dans notre deuxième étude que les patients décédés de la COVID-19 présentaient une perte de neurones à GnRH dans l'hypothalamus médiobasal, ce qui suggère que l'hypogonadisme hypogonadotrope des patients COVID-19 pourrait être lié à cette perte neuronale qui pourrait s'accompagner, d'après les résultats que nous avons obtenu chez le hamster 4 jours après infection, d'un dysfonctionnement des neurones kisspeptinergiques dans la région. Cette hypothèse pourra être testée sur nos coupes d'hypothalamus de patients décédés ou non de la COVID19. Les patients non-hospitalisés peuvent aussi développer de l'hypotestostéronémie dans le cadre de la COVID longue (Sauve et al., 2023; Yamamoto et al., 2022). L'altération de la fonction des neurones à kisspeptine pourrait être liée comme pour les

neurones à GnRH à une infection directe de ces neurones par le SARS-CoV2, possiblement via leurs axones innervant l'éminence médiane de l'hypothalamus où coule le système porte hypothalamo-hypophysaire qui est un système vasculaire perméable aux macromolécules. Pour renforcer cette hypothèse il nous faudrait déterminer si ces neurones expriment le récepteur du virus ACE2 et étudier par RNAscope l'éventuelle présence du virus dans ces neurones. Une hypothèse alternative serait que l'altération de la fonction des neurones à kisspeptine puisse être la conséquence de la nécroptose des vaisseaux de la barrière hématoencéphalique apportant les nutriments nécessaires à leur fonctionnement autour de leurs corps cellulaires, par analogie à ce que nous avons vu dans le cortex de hamsters infectés par le SARS-CoV2 (Wenzel et al., 2021).

Pour des raisons de temps, nous n'avons pas encore pu conduire d'expérience sur le modèle KI-hACE2 mais nous savons qu'il s'agit aussi d'un modèle d'infection qui reproduit une symptomatologie modérée/légère de la COVID19. Comme pour le hamster, ce modèle de souris semble guérir de la COVID19 et semble montrer une faible neuroinvasion (B. Zhou et al., 2021). Il serait intéressant de reproduire les résultats obtenus chez le hamster dans ce modèle qui pourrait bénéficier de tous les outils disponibles chez la souris et raffiner nos résultats, en permettant notamment d'évaluer la pulsativité de la sécrétion de GnRH/LH avant et après infection par le SARS-CoV2.

En conclusion, l'ensemble de nos trois dernières études pointent du doigt la possibilité que certains des symptômes de la COVID longue puisse être la conséquence d'une altération physiopathologique de l'axe neuroendocrinien contrôlant la reproduction.

# Conclusions

Notre premier travail a démontré que la mélatonine peut être un agent thérapeutique adjuvant de la COVID-19. Elle peut agir en prévenant les épisodes de Neuro-COVID sévère, vu qu'elle a pu montrer son efficacité sur un modèle d'infection par SARS-CoV2 sur un modèle murin où l'expression de hACE2 est supra-physiologique. Nos résultats suggèrent donc, que la mélatonine ou les molécules mélatoninergiques pourraient être utiles à la clinique pour prévenir l'émergence des symptômes neuropsychiatriques de la COVID longue. Pendant les différentes vagues de la pandémie de COVID-19, le fait d'avoir décrit le mécanisme d'une drogue qui a peu d'effets indésirables, peut constituer une contribution importante en apportant une explication mécanistique des effets cliniques décrits par d'autres équipes de recherche. Il serait intéressant de poursuivre la mise en place d'essais cliniques contrôlés à grande échelle afin de déterminer si l'usage de mélatonine pourrait être pertinent pour la prise en charge de la COVID longue en ambulatoire, chez les pneumologues, cardiologues, neurologues...

Les résultats de nos trois derniers travaux montrent que l'impact du SARS-CoV2 sur les neurones contrôlant la survie de l'espèce, mais aussi impliqués dans le maintien de la cognition mériteraient également d'être complétés par des protocoles de recherche clinique et épidémiologique. Enfin, les effets de l'infection du SARS-CoV2 sur l'activité du système à GnRH chez la femme avant et après la ménopause demeurent encore à être explorés.

# Références bibliographiques

- Abbott, N. J., Rönnbäck, L., & Hansson, E. (2006). Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. *Nature Reviews Neuroscience* 2006 7:1, 7(1), 41–53. <https://doi.org/10.1038/nrn1824>
- A clinical case definition of post COVID-19 condition by a Delphi consensus, 6 October 2021*. (n.d.). Retrieved October 24, 2023, from [https://www.who.int/publications/i/item/WHO-2019-nCoV-Post\\_COVID-19\\_condition-Clinical\\_case\\_definition-2021.1](https://www.who.int/publications/i/item/WHO-2019-nCoV-Post_COVID-19_condition-Clinical_case_definition-2021.1)
- Agrawal, S., Farfel, J. M., Arfanakis, K., Al-Harhi, L., Shull, T., Teppen, T. L., Evia, A. M., Patel, M. B., Ely, E. W., Leurgans, S. E., Bennett, D. A., Mehta, R., & Schneider, J. A. (2022). Brain autopsies of critically ill COVID-19 patients demonstrate heterogeneous profile of acute vascular injury, inflammation and age-linked chronic brain diseases. *Acta Neuropathologica Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/S40478-022-01493-7>
- Alagaili, A. N., Briese, T., Mishra, N., Kapoor, V., Sameroff, S. C., de Wit, E., Munster, V. J., Hensley, L. E., Zalmout, I. S., Kapoor, A., Epstein, J. H., Karesh, W. B., Daszak, P., Mohammed, O. B., & Ian Lipkin, W. (2014). Middle East respiratory syndrome coronavirus infection in dromedary camels in Saudi Arabia. *MBio*, 5(2). <https://doi.org/10.1128/MBIO.00884-14>
- Al-Aly, Z., Bowe, B., & Xie, Y. (2022). Long COVID after breakthrough SARS-CoV-2 infection. *Nature Medicine* 2022 28:7, 28(7), 1461–1467. <https://doi.org/10.1038/s41591-022-01840-0>
- Al-Hashel, J. Y., Abokalawa, F., Alenzi, M., Alroughani, R., & Ahmed, S. F. (2021). Coronavirus disease-19 and headache; impact on pre-existing and characteristics of de novo: a cross-sectional study. *Journal of Headache and Pain*, 22(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/S10194-021-01314-7/TABLES/6>
- Allotey, J., Chatterjee, S., Kew, T., Gaetano, A., Stallings, E., Fernández-García, S., Yap, M., Sheikh, J., Lawson, H., Coomar, D., Dixit, A., Zhou, D., Balaji, R., Littmoden, M., King, Y., Debenham, L., Llavall, A. C., Ansari, K., Sandhu, G., ... Thangaratinam, S. (2022). SARS-CoV-2 positivity in offspring and timing of mother-to-child transmission: living systematic review and meta-analysis. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 376. <https://doi.org/10.1136/BMJ-2021-067696>
- Allotey, J., Stallings, E., Bonet, M., Yap, M., Chatterjee, S., Kew, T., Debenham, L., Llavall, A. C., Dixit, A., Zhou, D., Balaji, R., Lee, S. I., Qiu, X., Yuan, M., Coomar, D., Van Wely, M., Van Leeuwen, E., Kostova, E., Kunst, H., ... Thangaratinam, S. (2020). Clinical manifestations, risk factors, and maternal and perinatal outcomes of coronavirus disease 2019 in pregnancy: living systematic review and meta-analysis. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 370. <https://doi.org/10.1136/BMJ.M3320>
- Almeida, J. D., & Tyrrell, D. A. (1967). The morphology of three previously uncharacterized human respiratory viruses that grow in organ culture. *The Journal of General Virology*, 1(2), 175–178. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-1-2-175>
- Almutairi, M. M., Sivandzade, F., Albekairi, T. H., Alqahtani, F., & Cucullo, L. (2021). Neuroinflammation and Its Impact on the Pathogenesis of COVID-19. *Frontiers in Medicine*, 8, 745789. <https://doi.org/10.3389/FMED.2021.745789>
- Aloè, T., Novelli, F., Puppo, G., Pinelli, V., Barisione, E., Trucco, E., Costanzo, R., Covesnon, M. G., Grillo, F., Zoccali, P., Milanese, M., Maniscalco, S., Tagliabue, E., Piroddi, I. M. G., Venturi, S., Serra, M., Scordamaglia, F., Ferrari, M., & Serafini, A. (2023). Prevalence of Long COVID Symptoms Related to SARS-CoV-2 Strains. *Life* 2023, Vol. 13, Page 1558, 13(7), 1558. <https://doi.org/10.3390/LIFE13071558>

- Altmann, D. M., Whettlock, E. M., Liu, S., Arachchillage, D. J., & Boyton, R. J. (2023). The immunology of long COVID. *Nature Reviews Immunology* 23:10, 23(10), 618–634. <https://doi.org/10.1038/s41577-023-00904-7>
- Amenta, E. M., Spallone, A., Rodriguez-Barradas, M. C., Sahly, H. M. E., Atmar, R. L., & Kulkarni, P. A. (2020). Postacute COVID-19: An Overview and Approach to Classification. *Open Forum Infectious Diseases*, 7(12). <https://doi.org/10.1093/OFID/OFAA509>
- Ameri, A., Asadi, M. F., Kamali, M., Vatankhah, M., Ziaei, A., Safa, O., Mahmudi, M., & Fathalipour, M. (2021). Evaluation of the effect of melatonin in patients with COVID-19-induced pneumonia admitted to the Intensive Care Unit: A structured summary of a study protocol for a randomized controlled trial. *Trials*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/S13063-021-05162-3>
- Andersen, K. G., Rambaut, A., Lipkin, W. I., Holmes, E. C., & Garry, R. F. (2020). The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nature Medicine*, 26(4), 450–452. <https://doi.org/10.1038/S41591-020-0820-9>
- Anindita, P. D., Sasaki, M., Setiyono, A., Handharyani, E., Orba, Y., Kobayashi, S., Rahmadani, I., Taha, S., Adiani, S., Subangkit, M., Nakamura, I., Sawa, H., & Kimura, T. (2015). Detection of coronavirus genomes in Moluccan naked-backed fruit bats in Indonesia. *Archives of Virology*, 160(4), 1113. <https://doi.org/10.1007/S00705-015-2342-1>
- Antonelli, M., Pujol, J. C., Spector, T. D., Ourselin, S., & Steves, C. J. (2022). Risk of long COVID associated with delta versus omicron variants of SARS-CoV-2. *The Lancet*, 399(10343), 2263–2264. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(22\)00941-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)00941-2)
- Arendt, J., & Aulinas, A. (2022). Physiology of the Pineal Gland and Melatonin. *Endotext*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK550972/>
- Armulik, A., Genové, G., Mäe, M., Nisancioglu, M. H., Wallgard, E., Niaudet, C., He, L., Norlin, J., Lindblom, P., Strittmatter, K., Johansson, B. R., & Betsholtz, C. (2010). Pericytes regulate the blood–brain barrier. *Nature* 2010 468:7323, 468(7323), 557–561. <https://doi.org/10.1038/nature09522>
- Artigas, L., Coma, M., Matos-Filipe, P., Aguirre-Plans, J., Farrés, J., Valls, R., Fernandez-Fuentes, N., De La Haba-Rodriguez, J., Olvera, A., Barbera, J., Morales, R., Oliva, B., & Mas, J. M. (2020). In-silico drug repurposing study predicts the combination of pifrenidone and melatonin as a promising candidate therapy to reduce SARS-CoV-2 infection progression and respiratory distress caused by cytokine storm. *PLoS ONE*, 15(10). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0240149>
- Artika, I. M., Dewantari, A. K., & Wiyatno, A. (2020). Molecular biology of coronaviruses: current knowledge. *Heliyon*, 6(8). <https://doi.org/10.1016/J.HELIYON.2020.E04743>
- Asaka, M. N., Utsumi, D., Kamada, H., Nagata, S., Nakachi, Y., Yamaguchi, T., Kawaoka, Y., Kuba, K., & Yasutomi, Y. (2021). Highly susceptible SARS-CoV-2 model in CAG promoter-driven hACE2-transgenic mice. *JCI Insight*, 6(19). <https://doi.org/10.1172/JCI.INSIGHT.152529>
- Axelrod, J., & Weissbach, H. (1960). Enzymatic O-methylation of N-acetylserotonin to melatonin. *Science*, 131(3409), 1312. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.131.3409.1312>
- Bao, L., Deng, W., Huang, B., Gao, H., Liu, J., Ren, L., Wei, Q., Yu, P., Xu, Y., Qi, F., Qu, Y., Li, F., Lv, Q., Wang, W., Xue, J., Gong, S., Liu, M., Wang, G., Wang, S., ... Qin, C. (2020). The pathogenicity of SARS-CoV-2 in hACE2 transgenic mice. *Nature* 2020 583:7818, 583(7818), 830–833. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2312-y>
- Barcia, C., Mitxitorena, I., Carrillo-de Sauvage, M. A., Gallego, J. M., Pérez-Vallés, A., & Barcia, C. (2013). Imaging the microanatomy of astrocyte-T-cell interactions in immune-mediated inflammation.

- Baroncini, M., Allet, C., Leroy, D., Beauvillain, J. C., Francke, J. P., & Prevot, V. (2007). Morphological evidence for direct interaction between gonadotrophin-releasing hormone neurones and astroglial cells in the human hypothalamus. *Journal of Neuroendocrinology*, 19(9), 691–702. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2826.2007.01576.X>
- Bastard, P., Rosen, L. B., Zhang, Q., Michailidis, E., Hoffmann, H. H., Zhang, Y., Dorgham, K., Philippot, Q., Rosain, J., Béziat, V., Manry, J., Shaw, E., Haljasmägi, L., Peterson, P., Lorenzo, L., Bizien, L., Trouillet-Assant, S., Dobbs, K., de Jesus, A. A., ... Casanova, J. L. (2020). Autoantibodies against type I IFNs in patients with life-threatening COVID-19. *Science (New York, N.Y.)*, 370(6515). <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.ABD4585>
- Bauernfried, S., Scherr, M. J., Pichlmair, A., Duderstadt, K. E., & Hornung, V. (2021). Human NLRP1 is a sensor for double-stranded RNA. *Science (New York, N.Y.)*, 371(6528). <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.ABD0811>
- Becker, W. B., McIntosh, K., Dees, J. H., & Chanock, R. M. (1967). Morphogenesis of Avian Infectious Bronchitis Virus and a Related Human Virus (Strain 229E). *Journal of Virology*, 1(5), 1019. <https://doi.org/10.1128/JVI.1.5.1019-1027.1967>
- Bell, R. D., Winkler, E. A., Sagare, A. P., Singh, I., LaRue, B., Deane, R., & Zlokovic, B. V. (2010). Pericytes control key neurovascular functions and neuronal phenotype in the adult brain and during brain aging. *Neuron*, 68(3), 409–427. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2010.09.043>
- Bergmann, C. C., Lane, T. E., & Stohlman, S. A. (2006). Coronavirus infection of the central nervous system: host-virus stand-off. *Nature Reviews. Microbiology*, 4(2), 121–132. <https://doi.org/10.1038/NRMICRO1343>
- Blair, R. V., Vaccari, M., Doyle-Meyers, L. A., Roy, C. J., Russell-Lodrigue, K., Fahlberg, M., Monjure, C. J., Beddingfield, B., Plante, K. S., Plante, J. A., Weaver, S. C., Qin, X., Midkiff, C. C., Lehmicke, G., Golden, N., Threton, B., Penney, T., Allers, C., Barnes, M. B., ... Rappaport, J. (2021). Acute Respiratory Distress in Aged, SARS-CoV-2-Infected African Green Monkeys but Not Rhesus Macaques. *The American Journal of Pathology*, 191(2), 274–282. <https://doi.org/10.1016/J.AJPATH.2020.10.016>
- Blanco, S., Hernández, R., Franchelli, G., Ramos-Álvarez, M. M., & Peinado, M. Á. (2017). Melatonin influences NO/NOS pathway and reduces oxidative and nitrosative stress in a model of hypoxic-ischemic brain damage. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*, 62, 32–43. <https://doi.org/10.1016/J.NIOX.2016.12.001>
- Bonnefond, A., Clément, N., Fawcett, K., Yengo, L., Vaillant, E., Guillaume, J. L., Dechaume, A., Payne, F., Roussel, R., Czernichow, S., Hercberg, S., Hadjadj, S., Balkau, B., Marre, M., Lantieri, O., Langenberg, C., Bouatia-Naji, N., Charpentier, G., Vaxillaire, M., ... Froguel, P. (2012). Rare MTNR1B variants impairing melatonin receptor 1B function contribute to type 2 diabetes. *Nature Genetics* 2012 44:3, 44(3), 297–301. <https://doi.org/10.1038/ng.1053>
- Bouatia-Naji, N., Bonnefond, A., Cavalcanti-Proença, C., Sparsø, T., Holmkvist, J., Marchand, M., Delplanque, J., Lobbens, S., Rocheleau, G., Durand, E., De Graeve, F., Chèvre, J. C., Borch-Johnsen, K., Hartikainen, A. L., Ruukonen, A., Tichet, J., Marre, M., Weill, J., Heude, B., ... Froguel, P. (2008a). A variant near MTNR1B is associated with increased fasting plasma glucose levels and type 2 diabetes risk. *Nature Genetics* 2008 41:1, 41(1), 89–94. <https://doi.org/10.1038/ng.277>

- Bouatia-Naji, N., Bonnefond, A., Cavalcanti-Proença, C., Sparsø, T., Holmkvist, J., Marchand, M., Delplanque, J., Lobbens, S., Rocheleau, G., Durand, E., De Graeve, F., Chèvre, J. C., Borch-Johnsen, K., Hartikainen, A. L., Ruukonen, A., Tichet, J., Marre, M., Weill, J., Heude, B., ... Froguel, P. (2008b). A variant near MTNR1B is associated with increased fasting plasma glucose levels and type 2 diabetes risk. *Nature Genetics* 2008 41:1, 41(1), 89–94. <https://doi.org/10.1038/ng.277>
- Bourgon, C., Albin, A. S., Ando-Grard, O., Da Costa, B., Domain, R., Korkmaz, B., Klonjowski, B., Le Poder, S., & Meunier, N. (2022). Neutrophils play a major role in the destruction of the olfactory epithelium during SARS-CoV-2 infection in hamsters. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 79(12). <https://doi.org/10.1007/S00018-022-04643-1>
- Bourin, M., Mocaër, E., & Porsolt, R. (2004a). Antidepressant-like activity of S 20098 (agomelatine) in the forced swimming test in rodents: involvement of melatonin and serotonin receptors. *Journal of Psychiatry and Neuroscience*, 29(2), 126. [/pmc/articles/PMC383344/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16333344/)
- Bourin, M., Mocaër, E., & Porsolt, R. (2004b). Antidepressant-like activity of S 20098 (agomelatine) in the forced swimming test in rodents: involvement of melatonin and serotonin receptors. *Journal of Psychiatry and Neuroscience*, 29(2), 126. [/pmc/articles/PMC383344/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16333344/)
- Briand, F., Sencio, V., Robil, C., Heumel, S., Deruyter, L., Machelart, A., Barthelemy, J., Bogard, G., Hoffmann, E., Infanti, F., Domenig, O., Chabrat, A., Richard, V., Prévot, V., Nogueiras, R., Wolowczuk, I., Pinet, F., Sulpice, T., & Trottein, F. (2022). Diet-Induced Obesity and NASH Impair Disease Recovery in SARS-CoV-2-Infected Golden Hamsters. *Viruses*, 14(9), 2067. <https://doi.org/10.3390/V14092067/S1>
- Brown, L. S., Foster, C. G., Courtney, J. M., King, N. E., Howells, D. W., & Sutherland, B. A. (2019). Pericytes and Neurovascular Function in the Healthy and Diseased Brain. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13. <https://doi.org/10.3389/FNCEL.2019.00282>
- Brusco, L. I., Cruz, P., Cangas, A., González Rojas, C., Vigo, D. E., & Cardinali, D. P. (2021). Efficacy of melatonin in non-intensive care unit patients with COVID-19 pneumonia and sleep dysregulation. *Melatonin Research*, 4(1), 173–188. <https://doi.org/10.32794/MR11250089>
- Butenas, S., Orfeo, T., & Mann, K. G. (2009). Tissue Factor in Coagulation: Which? Where? When?: Butenas Role of Tissue Factor in Blood Coagulation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 29(12), 1989. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.177402>
- Butowt, R., Bilinska, K., & von Bartheld, C. S. (2023). Olfactory dysfunction in COVID-19: new insights into the underlying mechanisms. *Trends in Neurosciences*, 46(1), 75–90. <https://doi.org/10.1016/J.TINS.2022.11.003>
- Cáceres, C. J., Cardenas-Garcia, S., Carnaccini, S., Seibert, B., Rajao, D. S., Wang, J., & Perez, D. R. (2021). Efficacy of GC-376 against SARS-CoV-2 virus infection in the K18 hACE2 transgenic mouse model. *Scientific Reports* 2021 11:1, 11(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-89013-w>
- Campos, R. K., Camargos, V. N., Azar, S. R., Haines, C. A., Eyzaguirre, E. J., & Rossi, S. L. (2021). Sars-cov-2 infects hamster testes. *Microorganisms*, 9(6). <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS9061318/S1>
- Cappellano, G., Raineri, D., Rolla, R., Giordano, M., Puricelli, C., Vilardo, B., Manfredi, M., Cantaluppi, V., Sainaghi, P. P., Castello, L., De Vita, N., Scotti, L., Vaschetto, R., Dianzani, U., & Chiocchetti, A. (2021). Circulating Platelet-Derived Extracellular Vesicles Are a Hallmark of Sars-Cov-2 Infection. *Cells*, 10(1), 1–10. <https://doi.org/10.3390/CELLS10010085>
- Cardinali, D. P. (1981). Melatonin. A Mammalian Pineal Hormone. *Endocrine Reviews*, 2(3), 327–346. <https://doi.org/10.1210/EDRV-2-3-327>

- Cardinali, D. P. (2019). Melatonin: Clinical Perspectives in Neurodegeneration. *Frontiers in Endocrinology*, 10(JULY). <https://doi.org/10.3389/FENDO.2019.00480>
- Cardinali, D. P., Brown, G. M., & Pandi-Perumal, S. R. (2022). Possible Application of Melatonin in Long COVID. *Biomolecules* 2022, Vol. 12, Page 1646, 12(11), 1646. <https://doi.org/10.3390/BIOM12111646>
- Cardinali, D. P., & Hardeland, R. (2017). Inflammaging, Metabolic Syndrome and Melatonin: A Call for Treatment Studies. *Neuroendocrinology*, 104(4), 382–397. <https://doi.org/10.1159/000446543>
- Cardona Maya, W. D., & Carvajal, A. (2020). SARS-CoV-2 and prostatitis: Dangerous relationship for male sexual and reproductive health. *Medical Hypotheses*, 144. <https://doi.org/10.1016/J.MEHY.2020.109914>
- Caricchio, R., Gallucci, M., Dass, C., Zhang, X., Gallucci, S., Fleece, D., Bromberg, M., & Criner, G. J. (2021). Preliminary predictive criteria for COVID-19 cytokine storm. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 80(1), 88–95. <https://doi.org/10.1136/ANNRHEUMDIS-2020-218323>
- Carossino, M., Kenney, D., O'connell, A. K., Montanaro, P., Tseng, A. E., Gertje, H. P., Grosz, K. A., Ericsson, M., Huber, B. R., Kurnick, S. A., Subramaniam, S., Kirkland, T. A., Walker, J. R., Francis, K. P., Klose, A. D., Paragas, N., Bosmann, M., Saeed, M., Balasuriya, U. B. R., ... Crossland, N. A. (2022). Fatal Neurodissemination and SARS-CoV-2 Tropism in K18-hACE2 Mice Is Only Partially Dependent on hACE2 Expression. *Viruses*, 14(3), 535. <https://doi.org/10.3390/V14030535/S1>
- Carsana, L., Sonzogni, A., Nasr, A., Rossi, R. S., Pellegrinelli, A., Zerbi, P., Rech, R., Colombo, R., Antinori, S., Corbellino, M., Galli, M., Catena, E., Tosoni, A., Gianatti, A., & Nebuloni, M. (2020). Pulmonary post-mortem findings in a series of COVID-19 cases from northern Italy: a two-centre descriptive study. *The Lancet. Infectious Diseases*, 20(10), 1135–1140. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30434-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30434-5)
- Casciola-Rosen, L., Thiemann, D. R., Andrade, F., Trejo-Zambrano, M. I., Leonard, E. K., Spangler, J. B., Skinner, N. E., Bailey, J., Yegnasubramanian, S., Wang, R., Vaghasia, A. M., Gupta, A., Cox, A. L., Ray, S. C., Linville, R. M., Guo, Z., Searson, P. C., Machamer, C. E., Desiderio, S., ... Rosen, A. (2022). IgM anti-ACE2 autoantibodies in severe COVID-19 activate complement and perturb vascular endothelial function. *JCI Insight*, 7(9). <https://doi.org/10.1172/JCI.INSIGHT.158362>
- Casey, K., Iteen, A., Nicolini, R., & Auten, J. (2020). COVID-19 pneumonia with hemoptysis: Acute segmental pulmonary emboli associated with novel coronavirus infection. *The American Journal of Emergency Medicine*, 38(7), 1544.e1-1544.e3. <https://doi.org/10.1016/J.AJEM.2020.04.011>
- Casoni, F., Malone, S. A., Belle, M., Luzzati, F., Collier, F., Allet, C., Hrabovszky, E., Rasika, S., Prevot, V., Chédotal, A., & Giacobini, P. (2016). Development of the neurons controlling fertility in humans: new insights from 3D imaging and transparent fetal brains. *Development (Cambridge, England)*, 143(21), 3969–3981. <https://doi.org/10.1242/DEV.139444>
- Ceban, F., Ling, S., Lui, L. M. W., Lee, Y., Gill, H., Teopiz, K. M., Rodrigues, N. B., Subramaniapillai, M., Di Vincenzo, J. D., Cao, B., Lin, K., Mansur, R. B., Ho, R. C., Rosenblat, J. D., Miskowiak, K. W., Vinberg, M., Maletic, V., & McIntyre, R. S. (2022). Fatigue and cognitive impairment in Post-COVID-19 Syndrome: A systematic review and meta-analysis. *Brain, Behavior, and Immunity*, 101, 93–135. <https://doi.org/10.1016/J.BBI.2021.12.020>
- Cecon, E., Isabelle, C., Poder, S. Le, Real, F., Zhu, A., Tu, L., Ghigna, M. R., Klonjkowski, B., Bomsel, M., Jockers, R., & Dam, J. (2022). Therapeutic potential of melatonin and melatonergic drugs on K18-hACE2 mice infected with SARS-CoV-2. *Journal of Pineal Research*, 72(1). <https://doi.org/10.1111/JPI.12772>
- Chang, S. E., Feng, A., Meng, W., Apostolidis, S. A., Mack, E., Artandi, M., Barman, L., Bennett, K., Chakraborty, S., Chang, I., Cheung, P., Chinthrajah, S., Dhingra, S., Do, E., Finck, A., Gaano, A.,

- Geßner, R., Giannini, H. M., Gonzalez, J., ... Utz, P. J. (2021). New-onset IgG autoantibodies in hospitalized patients with COVID-19. *Nature Communications* 2021 12:1, 12(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25509-3>
- Chan, J. F. W., Kok, K. H., Zhu, Z., Chu, H., To, K. K. W., Yuan, S., & Yuen, K. Y. (2020). Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. *Emerging Microbes & Infections*, 9(1), 221–236. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1719902>
- Charfeddine, S., Ibn Hadj Amor, H., Jdidi, J., Torjmen, S., Kraiem, S., Hammami, R., Bahloul, A., Kallel, N., Moussa, N., Touil, I., Ghrab, A., Elghoul, J., Meddeb, Z., Thabet, Y., Kammoun, S., Bouslama, K., Milouchi, S., Abdessalem, S., & Abid, L. (2021). Long COVID 19 Syndrome: Is It Related to Microcirculation and Endothelial Dysfunction? Insights From TUN-EndCOV Study. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 8, 745758. <https://doi.org/10.3389/FCVM.2021.745758/BIBTEX>
- Chaste, P., Clement, N., Botros, H. G., Guillaume, J. L., Konyukh, M., Pagan, C., Scheid, I., Nygren, G., Anckarsäter, H., Rastam, M., Ståhlberg, O., Gillberg, I. C., Melke, J., Delorme, R., Leblond, C., Toro, R., Huguët, G., Fauchereau, F., Durand, C., ... Bourgeron, T. (2011). Genetic variations of the melatonin pathway in patients with attention-deficit and hyperactivity disorders. *Journal of Pineal Research*, 51(4), 394–399. <https://doi.org/10.1111/J.1600-079X.2011.00902.X>
- Chen, L. Y. C., Hoiland, R. L., Stukas, S., Wellington, C. L., & Sekhon, M. S. (2020). Confronting the controversy: interleukin-6 and the COVID-19 cytokine storm syndrome. *The European Respiratory Journal*, 56(4). <https://doi.org/10.1183/13993003.03006-2020>
- Chen, N., Zhou, M., Dong, X., Qu, J., Gong, F., Han, Y., Qiu, Y., Wang, J., Liu, Y., Wei, Y., Xia, J., Yu, T., Zhang, X., & Zhang, L. (2020). Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet (London, England)*, 395(10223), 507–513. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30211-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30211-7)
- Chen, T., Song, J., Liu, H., Zheng, H., & Chen, C. (2021). Positive Epstein–Barr virus detection in coronavirus disease 2019 (COVID-19) patients. *Scientific Reports* 2021 11:1, 11(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-90351-y>
- Chen, T., Wu, D., Chen, H., Yan, W., Yang, D., Chen, G., Ma, K., Xu, D., Yu, H., Wang, H., Wang, T., Guo, W., Chen, J., Ding, C., Zhang, X., Huang, J., Han, M., Li, S., Luo, X., ... Ning, Q. (2020). Clinical characteristics of 113 deceased patients with coronavirus disease 2019: retrospective study. *BMJ*, 368. <https://doi.org/10.1136/BMJ.M1091>
- Chen, Y., Li, C., Liu, F., Ye, Z., Song, W., Lee, A. C. Y., Shuai, H., Lu, L., To, K. K. W., Chan, J. F. W., Zhang, A. J., Chu, H., & Yuen, K. Y. (2022). Age-associated SARS-CoV-2 breakthrough infection and changes in immune response in a mouse model. *Emerging Microbes & Infections*, 11(1), 368–383. <https://doi.org/10.1080/22221751.2022.2026741>
- Chen, Y., Liu, Q., & Guo, D. (2020). Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis. *Journal of Medical Virology*, 92(4), 418. <https://doi.org/10.1002/JMV.25681>
- Cheung, C. C. L., Goh, D., Lim, X., Tien, T. Z., Lim, J. C. T., Lee, J. N., Tan, B., Tay, Z. E. A., Wan, W. Y., Chen, E. X., Nerurkar, S. N., Loong, S., Cheow, P. C., Chan, C. Y., Koh, Y. X., Tan, T. T., Kalimuddin, S., Tai, W. M. D., Ng, J. L., ... Lim, K. H. (2022). Residual SARS-CoV-2 viral antigens detected in GI and hepatic tissues from five recovered patients with COVID-19. *Gut*, 71(1), 226–229. <https://doi.org/10.1136/GUTJNL-2021-324280>
- China releases genetic data on new coronavirus, now deadly* / CIDRAP. (n.d.). Retrieved October 21, 2023, from <https://www.cidrap.umn.edu/covid-19/china-releases-genetic-data-new-coronavirus-now-deadly>

- Choi, J. H., Choi, S. H., & Yun, K. W. (2022). Risk Factors for Severe COVID-19 in Children: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of Korean Medical Science*, 37(5). <https://doi.org/10.3346/JKMS.2022.37.E35>
- Choi, J. Y., Park, J. H., Jo, C., Kim, K. C., & Koh, Y. H. (2022). SARS-CoV-2 spike S1 subunit protein-mediated increase of beta-secretase 1 (BACE1) impairs human brain vessel cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 626, 66–71. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2022.07.113>
- Choutka, J., Jansari, V., Hornig, M., & Iwasaki, A. (2022). Unexplained post-acute infection syndromes. *Nature Medicine*, 28(5), 911–923. <https://doi.org/10.1038/S41591-022-01810-6>
- Chua, R. L., Lukassen, S., Trump, S., Hennig, B. P., Wendisch, D., Pott, F., Debnath, O., Thürmann, L., Kurth, F., Völker, M. T., Kazmierski, J., Timmermann, B., Twardziok, S., Schneider, S., Machleidt, F., Müller-Redetzky, H., Maier, M., Krannich, A., Schmidt, S., ... Eils, R. (2020). COVID-19 severity correlates with airway epithelium-immune cell interactions identified by single-cell analysis. *Nature Biotechnology*, 38(8), 970–979. <https://doi.org/10.1038/S41587-020-0602-4>
- Cinislioglu, A. E., Cinislioglu, N., Demirdogen, S. O., Sam, E., Akkas, F., Altay, M. S., Utlu, M., Sen, I. A., Yildirim, F., Kartal, S., Aydin, H. R., Karabulut, I., & Ozbey, I. (2022). The relationship of serum testosterone levels with the clinical course and prognosis of COVID-19 disease in male patients: A prospective study. *Andrology*, 10(1), 24–33. <https://doi.org/10.1111/ANDR.13081>
- Colombo, E., & Farina, C. (2016). Astrocytes: Key Regulators of Neuroinflammation. *Trends in Immunology*, 37(9), 608–620. <https://doi.org/10.1016/J.IT.2016.06.006>
- Conklin, J., Frosch, M. P., Mukerji, S. S., Rapalino, O., Maher, M. D., Schaefer, P. W., Lev, M. H., Gonzalez, R. G., Das, S., Champion, S. N., Magdamo, C., Sen, P., Harrold, G. K., Alabsi, H., Normandin, E., Shaw, B., Lemieux, J. E., Sabeti, P. C., Branda, J. A., ... Edlow, B. L. (2021). Susceptibility-weighted imaging reveals cerebral microvascular injury in severe COVID-19. *Journal of the Neurological Sciences*, 421. <https://doi.org/10.1016/J.JNS.2021.117308>
- Conte, G., Avignone, S., Carbonara, M., Meneri, M., Ortolano, F., Cinnante, C., & Triulzi, F. (2020). COVID-19-Associated PRES-like Encephalopathy with Perivascular Gadolinium Enhancement. *AJNR American Journal of Neuroradiology*, 41(12), 2206–2208. <https://doi.org/10.3174/AJNR.A6762>
- Cosentino, G., Todisco, M., Hota, N., Della Porta, G., Morbini, P., Tassorelli, C., & Pisani, A. (2021). Neuropathological findings from COVID-19 patients with neurological symptoms argue against a direct brain invasion of SARS-CoV-2: A critical systematic review. *European Journal of Neurology*, 28(11), 3856–3865. <https://doi.org/10.1111/ENE.15045>
- Coutard, B., Valle, C., de Lamballerie, X., Canard, B., Seidah, N. G., & Decroly, E. (2020). The spike glycoprotein of the new coronavirus 2019-nCoV contains a furin-like cleavage site absent in CoV of the same clade. *Antiviral Research*, 176. <https://doi.org/10.1016/J.ANTIVIRAL.2020.104742>
- Covid long: le retour au travail, un parcours d'épreuves - La Voix du Nord*. (n.d.). Retrieved October 25, 2023, from <https://www.lavoixdunord.fr/1344282/article/2023-06-26/covid-long-le-retour-au-travail-un-parcours-d-epreuves>
- Crunfli, F., Carregari, V. C., Veras, F. P., Silva, L. S., Nogueira, M. H., Antunes, A. S. L. M., Vendramini, P. H., Valença, A. G. F., Brandão-Teles, C., da Silva Zuccoli, G., Reis-De-Oliveira, G., Silva-Costa, L. C., Saia-Cereda, V. M., Smith, B. J., Codo, A. C., de Souza, G. F., Muraro, S. P., Parise, P. L., Toledo-Teixeira, D. A., ... Martins-De-Souza, D. (2022). Morphological, cellular, and molecular basis of brain infection in COVID-19 patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 119(35), e2200960119. [https://doi.org/10.1073/PNAS.2200960119/SUPPL\\_FILE/PNAS.2200960119.SAPP.PDF](https://doi.org/10.1073/PNAS.2200960119/SUPPL_FILE/PNAS.2200960119.SAPP.PDF)

- Cui, J., Li, F., & Shi, Z. L. (2018). Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nature Reviews Microbiology* 2018 17:3, 17(3), 181–192. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0118-9>
- Cysique, L. A., Jakabek, D., Bracken, S. G., Allen-Davidian, Y., Heng, B., Chow, S., Dehghani, M., Pires, A. S., Darley, D. R., Byrne, A., Phetsouphanh, C., Kelleher, A., Dore, G. J., Matthews, G. V., Guillemin, G. J., & Brew, B. J. (2022). Post-acute COVID-19 cognitive impairment and decline uniquely associated with kynurenine pathway activation: a longitudinal observational study. *MedRxiv*, 2022.06.07.22276020. <https://doi.org/10.1101/2022.06.07.22276020>
- Daly, J. L., Simonetti, B., Klein, K., Chen, K. E., Williamson, M. K., Antón-Plágaro, C., Shoemark, D. K., Simón-Gracia, L., Bauer, M., Hollandi, R., Greber, U. F., Horvath, P., Sessions, R. B., Helenius, A., Hiscox, J. A., Teesalu, T., Matthews, D. A., Davidson, A. D., Collins, B. M., ... Yamauchi, Y. (2020). Neuropilin-1 is a host factor for SARS-CoV-2 infection. *Science (New York, N.Y.)*, 370(6518), 861–865. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.ABD3072>
- Daneman, R., Zhou, L., Kebede, A. A., & Barres, B. A. (2010). Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis. *Nature*, 468(7323), 562–566. <https://doi.org/10.1038/NATURE09513>
- Darbani, B. (2020). The Expression and Polymorphism of Entry Machinery for COVID-19 in Human: Juxtaposing Population Groups, Gender, and Different Tissues. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(10). <https://doi.org/10.3390/IJERPH17103433>
- Davis, H. E., Assaf, G. S., McCorkell, L., Wei, H., Low, R. J., Re'em, Y., Redfield, S., Austin, J. P., & Akrami, A. (2021). Characterizing long COVID in an international cohort: 7 months of symptoms and their impact. *EClinicalMedicine*, 38. <https://doi.org/10.1016/J.ECLINM.2021.101019>
- Davis, H. E., McCorkell, L., Vogel, J. M., & Topol, E. J. (2023). Long COVID: major findings, mechanisms and recommendations. *Nature Reviews. Microbiology*, 21(3), 133–146. <https://doi.org/10.1038/S41579-022-00846-2>
- Davis, I., & Liu, A. (2015). What is the tryptophan kynurenine pathway and why is it important to neurotherapy? *Expert Review of Neurotherapeutics*, 15(7), 719. <https://doi.org/10.1586/14737175.2015.1049999>
- Delli, V., Silva, M. S. B., Prévot, V., & Chachlaki, K. (2021). The KiNG of reproduction: Kisspeptin/ nNOS interactions shaping hypothalamic GnRH release. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 532. <https://doi.org/10.1016/J.MCE.2021.111302>
- Delorey, T. M., Ziegler, C. G. K., Heimberg, G., Normand, R., Yang, Y., Segerstolpe, Å., Abbondanza, D., Fleming, S. J., Subramanian, A., Montoro, D. T., Jagadeesh, K. A., Dey, K. K., Sen, P., Slyper, M., Pita-Juárez, Y. H., Phillips, D., Biermann, J., Bloom-Ackermann, Z., Barkas, N., ... Regev, A. (2021). COVID-19 tissue atlases reveal SARS-CoV-2 pathology and cellular targets. *Nature*, 595(7865), 107–113. <https://doi.org/10.1038/S41586-021-03570-8>
- Del Valle, D. M., Kim-Schulze, S., Huang, H. H., Beckmann, N. D., Nirenberg, S., Wang, B., Lavin, Y., Swartz, T. H., Madduri, D., Stock, A., Marron, T. U., Xie, H., Patel, M., Tuballes, K., Van Oekelen, O., Rahman, A., Kovatch, P., Aberg, J. A., Schadt, E., ... Gnjjatic, S. (2020). An inflammatory cytokine signature predicts COVID-19 severity and survival. *Nature Medicine*, 26(10), 1636–1643. <https://doi.org/10.1038/S41591-020-1051-9>
- Delval, L., Hantute-Ghesquier, A., Sencio, V., Flaman, J. M., Robil, C., Angulo, F. S., Lipskaia, L., Çobanoğlu, O., Lacoste, A. S., Machelart, A., Danneels, A., Corbin, M., Deruyter, L., Heumel, S., Idziorek, T., Séron, K., Sauve, F., Bongiovanni, A., Prévot, V., ... Trottein, F. (2023). Removal of senescent cells reduces the viral load and attenuates pulmonary and systemic inflammation in SARS-

CoV-2-infected, aged hamsters. *Nature Aging* 2023 3:7,3(7),829–845. <https://doi.org/10.1038/s43587-023-00442-w>

- Deng, W. S., Xu, Q., Liu, Y., Jiang, C. H., Zhou, H., & Gu, L. (2016). Effects of melatonin on liver function and lipid peroxidation in a rat model of hepatic ischemia/reperfusion injury. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 11(5), 1955–1960. <https://doi.org/10.3892/ETM.2016.3160>
- Deng, Y. Q., Zhang, N. N., Zhang, Y. F., Zhong, X., Xu, S., Qiu, H. Y., Wang, T. C., Zhao, H., Zhou, C., Zu, S. L., Chen, Q., Cao, T. S., Ye, Q., Chi, H., Duan, X. H., Lin, D. D., Zhang, X. J., Xie, L. Z., Gao, Y. W., ... Qin, C. F. (2022). Lipid nanoparticle-encapsulated mRNA antibody provides long-term protection against SARS-CoV-2 in mice and hamsters. *Cell Research* 2022 32:4, 32(4), 375–382. <https://doi.org/10.1038/s41422-022-00630-0>
- Dennis, A., Wamil, M., Alberts, J., Oben, J., Cuthbertson, D. J., Wootton, D., Crooks, M., Gabbay, M., Brady, M., Hishmeh, L., Attree, E., Heightman, M., Banerjee, R., & Banerjee, A. (2021). Multiorgan impairment in low-risk individuals with post-COVID-19 syndrome: a prospective, community-based study. *BMJ Open*, 11(3). <https://doi.org/10.1136/BMJOPEN-2020-048391>
- DeOre, B. J., Tran, K. A., Andrews, A. M., Ramirez, S. H., & Galie, P. A. (2021). SARS-CoV-2 Spike Protein Disrupts Blood–Brain Barrier Integrity via RhoA Activation. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 16(4), 722–728. <https://doi.org/10.1007/S11481-021-10029-0/FIGURES/3>
- Devaux, C. A., Lagier, J. C., & Raoult, D. (2021). New Insights Into the Physiopathology of COVID-19: SARS-CoV-2-Associated Gastrointestinal Illness. *Frontiers in Medicine*, 8, 640073. <https://doi.org/10.3389/FMED.2021.640073/BIBTEX>
- Dewisme, J., Lebouvier, T., Vannod-Michel, Q., Prevot, V., & Maurage, C. A. (2023). COVID-19 could worsen cerebral amyloid angiopathy. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 82(9), 814–817. <https://doi.org/10.1093/JNEN/NLAD049>
- Dey, J., Alam, M. T., Chandra, S., Gupta, J., Ray, U., Srivastava, A. K., & Tripathi, P. P. (2021). Neuroinvasion of SARS-CoV-2 may play a role in the breakdown of the respiratory center of the brain. *Journal of Medical Virology*, 93(3), 1296–1303. <https://doi.org/10.1002/JMV.26521>
- Dhawan, R. T., Gopalan, D., Howard, L., Vicente, A., Park, M., Manalan, K., Wallner, I., Marsden, P., Dave, S., Branley, H., Russell, G., Dharmarajah, N., & Kon, O. M. (2021). Beyond the clot: perfusion imaging of the pulmonary vasculature after COVID-19. *The Lancet. Respiratory Medicine*, 9(1), 107–116. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(20\)30407-0](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30407-0)
- Dhindsa, S., Zhang, N., McPhaul, M. J., Wu, Z., Ghoshal, A. K., Erlich, E. C., Mani, K., Randolph, G. J., Edwards, J. R., Mudd, P. A., & Diwan, A. (2021). Association of Circulating Sex Hormones With Inflammation and Disease Severity in Patients With COVID-19. *JAMA Network Open*, 4(5). <https://doi.org/10.1001/JAMANETWORKOPEN.2021.11398>
- Ding, T., Wang, T., Zhang, J., Cui, P., Chen, Z., Zhou, S., Yuan, S., Ma, W., Zhang, M., Rong, Y., Chang, J., Miao, X., Ma, X., & Wang, S. (2021). Analysis of Ovarian Injury Associated With COVID-19 Disease in Reproductive-Aged Women in Wuhan, China: An Observational Study. *Frontiers in Medicine*, 8, 635255. <https://doi.org/10.3389/FMED.2021.635255/BIBTEX>
- Djikeng, A., & Spiro, D. (2009). Advancing full length genome sequencing for human RNA viral pathogens. *Future Virology*, 4(1), 47. <https://doi.org/10.2217/17460794.4.1.47>
- Dondaine, T., Ruthmann, F., Vuotto, F., Carton, L., Gelé, P., Faure, K., Deplanque, D., & Bordet, R. (2022). Long-term cognitive impairments following COVID-19: a possible impact of hypoxia. *Journal of Neurology*, 269(8), 3982–3989. <https://doi.org/10.1007/S00415-022-11077-Z>

- Douaud, G., Lee, S., Alfaro-Almagro, F., Arthofer, C., Wang, C., McCarthy, P., Lange, F., Andersson, J. L. R., Griffanti, L., Duff, E., Jbabdi, S., Taschler, B., Keating, P., Winkler, A. M., Collins, R., Matthews, P. M., Allen, N., Miller, K. L., Nichols, T. E., & Smith, S. M. (2022). SARS-CoV-2 is associated with changes in brain structure in UK Biobank. *Nature* 2022 604:7907, 604(7907), 697–707. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04569-5>
- Dufourny, L., Levasseur, A., Migaud, M., Callebaut, I., Pontarotti, P., Malpoux, B., & Monget, P. (2008). GPR50 is the mammalian ortholog of Mellc: Evidence of rapid evolution in mammals. *BMC Evolutionary Biology*, 8(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-8-105/FIGURES/6>
- Duggal, N., Schmidt-Kastner, R., & Hakim, A. M. (1997). Nestin expression in reactive astrocytes following focal cerebral ischemia in rats. *Brain Research*, 768(1–2), 1–9. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(97\)00588-X](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(97)00588-X)
- Du, M., Ma, Y., Deng, J., Liu, M., & Liu, J. (2022). Comparison of Long COVID-19 Caused by Different SARS-CoV-2 Strains: A Systematic Review and Meta-Analysis. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(23), 16010. <https://doi.org/10.3390/IJERPH192316010/S1>
- Dunkelberger, J. R., & Song, W. C. (2009). Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Research* 2010 20:1, 20(1), 34–50. <https://doi.org/10.1038/cr.2009.139>
- Duong-Quy, S., Vo-Pham-Minh, T., Tran-Xuan, Q., Huynh-Anh, T., Vo-Van, T., Vu-Tran-Thien, Q., & Nguyen-Nhu, V. (2023). Post-COVID-19 Pulmonary Fibrosis: Facts—Challenges and Futures: A Narrative Review. *Pulmonary Therapy*, 9(3), 295. <https://doi.org/10.1007/S41030-023-00226-Y>
- Edlow, A. G., Castro, V. M., Shook, L. L., Kaimal, A. J., & Perlis, R. H. (2022). Neurodevelopmental Outcomes at 1 Year in Infants of Mothers Who Tested Positive for SARS-CoV-2 During Pregnancy. *JAMA Network Open*, 5(6), E2215787. <https://doi.org/10.1001/JAMANETWORKOPEN.2022.15787>
- Elsner, R. A., & Shlomchik, M. J. (2020). Germinal Center and Extrafollicular B Cell Responses in Vaccination, Immunity, and Autoimmunity. *Immunity*, 53(6), 1136–1150. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2020.11.006>
- Enjuanes, L., Zuñiga, S., Castaño-Rodríguez, C., Gutierrez-Alvarez, J., Canton, J., & Sola, I. (2016). Molecular Basis of Coronavirus Virulence and Vaccine Development. *Advances in Virus Research*, 96, 245. <https://doi.org/10.1016/BS.AIVIR.2016.08.003>
- Eslami, N., Aghbash, P. S., Shamekh, A., Entezari-Maleki, T., Nahand, J. S., Sales, A. J., & Baghi, H. B. (2022). SARS-CoV-2: Receptor and Co-receptor Tropism Probability. *Current Microbiology*, 79(5). <https://doi.org/10.1007/S00284-022-02807-7>
- Espino, J., Bejarano, I., Ortiz, Á., Lozano, G. M., García, J. F., Pariente, J. A., & Rodríguez, A. B. (2010). Melatonin as a potential tool against oxidative damage and apoptosis in ejaculated human spermatozoa. *Fertility and Sterility*, 94(5), 1915–1917. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.12.082>
- Etter, M. M., Martins, T. A., Kulsvehagen, L., Pössnecker, E., Duchemin, W., Hogan, S., Sanabria-Diaz, G., Müller, J., Chiappini, A., Rychen, J., Eberhard, N., Guzman, R., Mariani, L., Melie-Garcia, L., Keller, E., Jelcic, I., Pargger, H., Siegemund, M., Kuhle, J., ... Hutter, G. (2022). Severe Neuro-COVID is associated with peripheral immune signatures, autoimmunity and neurodegeneration: a prospective cross-sectional study. *Nature Communications*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/S41467-022-34068-0>
- Fan, C., Lu, W., Li, K., Ding, Y., & Wang, J. (2021). ACE2 Expression in Kidney and Testis May Cause Kidney and Testis Infection in COVID-19 Patients. *Frontiers in Medicine*, 7. <https://doi.org/10.3389/FMED.2020.563893>

- Fan, C., Wu, Y., Rui, X., Yang, Y., Ling, C., Liu, S., Liu, S., & Wang, Y. (2022). Animal models for COVID-19: advances, gaps and perspectives. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/S41392-022-01087-8>
- Farnoosh, G., Akbariqomi, M., Badri, T., Bagheri, M., Izadi, M., Saeedi-Boroujeni, A., Rezaie, E., Ghaleh, H. E. G., Aghamollaei, H., Fasihi-ramandi, M., Hassanpour, K., & Alishiri, G. H. (2022). Efficacy of a Low Dose of Melatonin as an Adjunctive Therapy in Hospitalized Patients with COVID-19: A Randomized, Double-blind Clinical Trial. *Archives of Medical Research*, 53(1), 79–85. <https://doi.org/10.1016/J.ARCMED.2021.06.006>
- Feng, Z. Y., Yang, S. De, Wang, T., & Guo, S. (2021). Effect of Melatonin for Regulating Mesenchymal Stromal Cells and Derived Extracellular Vesicles. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 717913. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2021.717913/BIBTEX>
- Fenyves, B. G., Mehta, A., Kays, K. R., Team, M. C.-19 C. & P., Goldberg, M. B., Hacoheh, N., & Filbin, M. R. (2021). Plasma P-selectin is an early marker of thromboembolism in COVID-19. *MedRxiv*, 4, 10. <https://doi.org/10.1101/2021.07.10.21260293>
- Finsterer, J., & Scorza, F. A. (2021). Clinical and Pathophysiologic Spectrum of Neuro-COVID. *Molecular Neurobiology*, 58(8), 3787–3791. <https://doi.org/10.1007/S12035-021-02383-0>
- Fisman, D. N., & Tuite, A. R. (2014). The epidemiology of MERS-CoV. *The Lancet Infectious Diseases*, 14, 6–7. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70254-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70254-8)
- Fogarty, H., Townsend, L., Morrin, H., Ahmad, A., Comerford, C., Karampini, E., Englert, H., Byrne, M., Bergin, C., O’Sullivan, J. M., Martin-Loeches, I., Nadarajan, P., Bannan, C., Mallon, P. W., Curley, G. F., Preston, R. J. S., Rehill, A. M., McGonagle, D., Ni Cheallaigh, C., ... Fazavana, J. (2021). Persistent endotheliopathy in the pathogenesis of long COVID syndrome. *Journal of Thrombosis and Haemostasis : JTH*, 19(10), 2546–2553. <https://doi.org/10.1111/JTH.15490>
- Fouchier, R. A. M., Hartwig, N. G., Bestebroer, T. M., Niemeyer, B., De Jong, J. C., Simon, J. H., & Osterhaus, A. D. M. E. (2004). A previously undescribed coronavirus associated with respiratory disease in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(16), 6212–6216. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0400762101>
- Frank, S. (2020). Catch me if you can: SARS-CoV-2 detection in brains of deceased patients with COVID-19. *The Lancet. Neurology*, 19(11), 883–884. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(20\)30371-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(20)30371-9)
- Friedel, D. M., & Cappell, M. S. (2023). Diarrhea and Coronavirus Disease 2019 Infection. *Gastroenterology Clinics of North America*, 52(1), 59–75. <https://doi.org/10.1016/J.GTC.2022.11.001>
- Gaebler, C., Wang, Z., Lorenzi, J. C. C., Muecksch, F., Finkin, S., Tokuyama, M., Cho, A., Jankovic, M., Schaefer-Babajew, D., Oliveira, T. Y., Cipolla, M., Viant, C., Barnes, C. O., Bram, Y., Breton, G., Hägglöf, T., Mendoza, P., Hurley, A., Turroja, M., ... Nussenzweig, M. C. (2021). Evolution of antibody immunity to SARS-CoV-2. *Nature*, 591(7851), 639–644. <https://doi.org/10.1038/S41586-021-03207-W>
- Galani, I. E., & Andreakos, E. (2015). Neutrophils in viral infections: Current concepts and caveats. *Journal of Leukocyte Biology*, 98(4), 557–564. <https://doi.org/10.1189/JLB.4VMR1114-555R>
- Galano, A., Medina, M. E., Tan, D. X., & Reiter, R. J. (2015). Melatonin and its metabolites as copper chelating agents and their role in inhibiting oxidative stress: a physicochemical analysis. *Journal of Pineal Research*, 58(1), 107–116. <https://doi.org/10.1111/JPI.12196>
- Garg, R. K., Paliwal, V. K., & Gupta, A. (2021). Encephalopathy in patients with COVID-19: A review. *Journal of Medical Virology*, 93(1), 206–222. <https://doi.org/10.1002/JMV.26207>

- Gautier, C., Guenin, S. P., Riest-Fery, I., Perry, T. J., Legros, C., Nosjean, O., Simonneaux, V., Grützner, F., & Boutin, J. A. (2018). Characterization of the Mel1c melatoninergic receptor in platypus (*Ornithorhynchus anatinus*). *PLOS ONE*, *13*(3), e0191904. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0191904>
- Gerdin, M. J., Masana, M. I., Rivera-Bermúdez, M. A., Hudson, R. L., Earnest, D. J., Gillette, M. U., & Dubocovich, M. L. (2004). Melatonin desensitizes endogenous MT2 melatonin receptors in the rat suprachiasmatic nucleus: relevance for defining the periods of sensitivity of the mammalian circadian clock to melatonin. *The FASEB Journal*, *18*(14), 1646–1656. <https://doi.org/10.1096/FJ.03-1339COM>
- Giacobini, P., Parkash, J., Campagne, C., Messina, A., Casoni, F., Vanacker, C., Langlet, F., Hobo, B., Cagnoni, G., Gallet, S., Hanchate, N. K., Mazur, D., Taniguchi, M., Mazzone, M., Verhaagen, J., Ciofi, P., Bouret, S. G., Tamagnone, L., & Prevot, V. (2014). Brain endothelial cells control fertility through ovarian-steroid-dependent release of semaphorin 3A. *PLoS Biology*, *12*(3). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.1001808>
- Goh, K. J., Choong, M. C., Cheong, E. H., Kalimuddin, S., Duu Wen, S., Phua, G. C., Chan, K. S., & Haja Mohideen, S. (2020). Rapid Progression to Acute Respiratory Distress Syndrome: Review of Current Understanding of Critical Illness from Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Infection. *Annals of the Academy of Medicine, Singapore*, *49*(3), 1–9. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32200400/>
- Golden, J. W., Cline, C. R., Zeng, X., Garrison, A. R., Carey, B. D., Mucker, E. M., White, L. E., Shamblin, J. D., Brocato, R. L., Liu, J., Babka, A. M., Rauch, H. B., Smith, J. M., Hollidge, B. S., Fitzpatrick, C., Badger, C. V., & Hooper, J. W. (2020). Human angiotensin-converting enzyme 2 transgenic mice infected with SARS-CoV-2 develop severe and fatal respiratory disease. *JCI Insight*, *5*(19). <https://doi.org/10.1172/JCI.INSIGHT.142032>
- Gold, J. E., Okyay, R. A., Licht, W. E., & Hurley, D. J. (2021). Investigation of Long COVID Prevalence and Its Relationship to Epstein-Barr Virus Reactivation. *Pathogens* *2021*, Vol. 10, Page 763, *10*(6), 763. <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS10060763>
- González-Fernández, B., Sánchez, D. I., Crespo, I., San-Miguel, B., Álvarez, M., Tuñón, M. J., & González-Gallego, J. (2017). Inhibition of the SphK1/S1P signaling pathway by melatonin in mice with liver fibrosis and human hepatic stellate cells. *BioFactors (Oxford, England)*, *43*(2), 272–282. <https://doi.org/10.1002/BIOF.1342>
- Gorbalenya, A. E., Baker, S. C., Baric, R. S., de Groot, R. J., Drosten, C., Gulyaeva, A. A., Haagmans, B. L., Lauber, C., Leontovich, A. M., Neuman, B. W., Penzar, D., Perlman, S., Poon, L. L. M., Samborskiy, D. V., Sidorov, I. A., Sola, I., & Ziebuhr, J. (2020). The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nature Microbiology*, *5*(4), 536–544. <https://doi.org/10.1038/S41564-020-0695-Z>
- Grant, R. A., Morales-Nebreda, L., Markov, N. S., Swaminathan, S., Querrey, M., Guzman, E. R., Abbott, D. A., Donnelly, H. K., Donayre, A., Goldberg, I. A., Klug, Z. M., Borkowski, N., Lu, Z., Kihshen, H., Politanska, Y., Sichizya, L., Kang, M., Shilatifard, A., Qi, C., ... Ren, Z. (2021). Circuits between infected macrophages and T cells in SARS-CoV-2 pneumonia. *Nature*, *590*(7847), 635. <https://doi.org/10.1038/S41586-020-03148-W>
- Grasselli, G., Tonetti, T., Protti, A., Langer, T., Girardis, M., Bellani, G., Laffey, J., Carrafiello, G., Carsana, L., Rizzuto, C., Zanella, A., Scaravilli, V., Pizzilli, G., Grieco, D. L., Di Meglio, L., de Pascale, G., Lanza, E., Monteduro, F., Zompatori, M., ... Seccafico, C. (2020). Pathophysiology of COVID-19-associated acute respiratory distress syndrome: a multicentre prospective observational study. *The Lancet. Respiratory Medicine*, *8*(12), 1201–1208. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(20\)30370-2](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30370-2)

- Greives, T. J., Humber, S. A., Goldstein, A. N., Scotti, M. A. L., Demas, G. E., & Kriegsfeld, L. J. (2008). Photoperiod and testosterone interact to drive seasonal changes in kisspeptin expression in Siberian hamsters (*Phodopus sungorus*). *Journal of Neuroendocrinology*, 20(12), 1339–1347. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2826.2008.01790.X>
- Guaiana, G., Gupta, S., Chiodo, D., Davies, S. J., Haederle, K., & Koesters, M. (2013). Agomelatine versus other antidepressive agents for major depression. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2013(12). [https://doi.org/10.1002/14651858.CD008851.PUB2/MEDIA/CDSR/CD008851/IMAGE\\_N/NCD008851-CMP-002-22.PNG](https://doi.org/10.1002/14651858.CD008851.PUB2/MEDIA/CDSR/CD008851/IMAGE_N/NCD008851-CMP-002-22.PNG)
- Guan, W., Ni, Z., Hu, Y., Liang, W., Ou, C., He, J., Liu, L., Shan, H., Lei, C., Hui, D. S. C., Du, B., Li, L., Zeng, G., Yuen, K.-Y., Chen, R., Tang, C., Wang, T., Chen, P., Xiang, J., ... Zhong, N. (2020). Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *New England Journal of Medicine*, 382(18), 1708–1720. [https://doi.org/10.1056/NEJMOA2002032/SUPPL\\_FILE/NEJMOA2002032\\_DISCLOSURES.PDF](https://doi.org/10.1056/NEJMOA2002032/SUPPL_FILE/NEJMOA2002032_DISCLOSURES.PDF)
- Guervilly, C., Bonifay, A., Burtey, S., Sabatier, F., Cauchois, R., Abdili, E., Arnaud, L., Lano, G., Pietri, L., Robert, T., Velier, M., Papazian, L., Albanese, J., Kaplanski, G., Dignat-George, F., & Lacroix, R. (2021). Dissemination of extreme levels of extracellular vesicles: tissue factor activity in patients with severe COVID-19. *Blood Advances*, 5(3), 628–634. <https://doi.org/10.1182/BLOODADVANCES.2020003308>
- Guo, C., Che, X., Briese, T., Ranjan, A., Allicock, O., Yates, R. A., Cheng, A., March, D., Hornig, M., Komaroff, A. L., Levine, S., Bateman, L., Vernon, S. D., Klimas, N. G., Montoya, J. G., Peterson, D. L., Lipkin, W. I., & Williams, B. L. (2023). Deficient butyrate-producing capacity in the gut microbiome is associated with bacterial network disturbances and fatigue symptoms in ME/CFS. *Cell Host & Microbe*, 31(2), 288-304.e8. <https://doi.org/10.1016/J.CHOM.2023.01.004>
- Gu, S., Chen, Y., Wu, Z., Chen, Y., Gao, H., Lv, L., Guo, F., Zhang, X., Luo, R., Huang, C., Lu, H., Zheng, B., Zhang, J., Yan, R., Zhang, H., Jiang, H., Xu, Q., Guo, J., Gong, Y., ... Li, L. (2020). Alterations of the Gut Microbiota in Patients With Coronavirus Disease 2019 or H1N1 Influenza. *Clinical Infectious Diseases*, 71(10), 2669–2678. <https://doi.org/10.1093/CID/CIAA709>
- Hadjadj, J., Yatim, N., Barnabei, L., Corneau, A., Boussier, J., Smith, N., Péré, H., Charbit, B., Bondet, V., Chenevier-Gobeaux, C., Breillat, P., Carlier, N., Gauzit, R., Morbieu, C., Pène, F., Marin, N., Roche, N., Szwebel, T. A., Merklings, S. H., ... Terrier, B. (2020). Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients. *Science (New York, N.Y.)*, 369(6504), 718–724. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.ABC6027>
- Haffke, M., Freitag, H., Rudolf, G., Seifert, M., Doehner, W., Scherbakov, N., Hanitsch, L., Wittke, K., Bauer, S., Konietzschke, F., Paul, F., Bellmann-Strobl, J., Kedor, C., Scheibenbogen, C., & Sotzny, F. (2022). Endothelial dysfunction and altered endothelial biomarkers in patients with post-COVID-19 syndrome and chronic fatigue syndrome (ME/CFS). *Journal of Translational Medicine*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/S12967-022-03346-2>
- Hamre, D., & Procknow, J. J. (1966). A New Virus Isolated from the Human Respiratory Tract.\*. <https://doi.org/10.3181/00379727-121-30734>, 121(1), 190–193. <https://doi.org/10.3181/00379727-121-30734>
- Hanchate, N. K., Giacobini, P., Lhuillier, P., Parkash, J., Espy, C., Fouveaut, C., Leroy, C., Baron, S., Campagne, C., Vanacker, C., Collier, F., Cruaud, C., Meyer, V., García-Piñero, A., Dewailly, D., Cortet-Rudelli, C., Gersak, K., Metz, C., Chabrier, G., ... Dodé, C. (2012). SEMA3A, a gene involved in axonal pathfinding, is mutated in patients with Kallmann syndrome. *PLoS Genetics*, 8(8). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1002896>

- Hannibal, J. (2021). Comparative Neurology of Circadian Photoreception: The Retinohypothalamic Tract (RHT) in Sighted and Naturally Blind Mammals. *Frontiers in Neuroscience*, *15*, 640113. <https://doi.org/10.3389/FNINS.2021.640113/BIBTEX>
- Hardeland, R., Poeggeler, B., Srinivasan, V., Trakht, I., Pandi-Perumal, S. R., & Cardinali, D. P. (2008). Melatonergic drugs in clinical practice. *Arzneimittel-Forschung*, *58*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1055/S-0031-1296459>
- Hasan, Z. T., Atrakji, D. M. Q. Y. M. A. Al, & Mehuaiden, D. A. K. (2022). The Effect of Melatonin on Thrombosis, Sepsis and Mortality Rate in COVID-19 Patients. *International Journal of Infectious Diseases*, *114*, 79–84. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2021.10.012>
- Heydemann, L., Ciurkiewicz, M., Beythien, G., Becker, K., Schughart, K., Stanelle-Bertram, S., Schaumburg, B., Mounogou-Kouassi, N., Beck, S., Zickler, M., Kühnel, M., Gabriel, G., Beineke, A., Baumgärtner, W., & Armando, F. (2023). Hamster model for post-COVID-19 alveolar regeneration offers an opportunity to understand post-acute sequelae of SARS-CoV-2. *Nature Communications* *2023 14:1*, *14*(1), 1–19. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-39049-5>
- Hill, S. M., Belancio, V. P., Dauchy, R. T., Xiang, S., Brimer, S., Mao, L., Hauch, A., Lundberg, P. W., Summers, W., Yuan, L., Frasch, T., & Blask, D. E. (2015). Melatonin: an inhibitor of breast cancer. *Endocrine-Related Cancer*, *22*(3), R183–R204. <https://doi.org/10.1530/ERC-15-0030>
- Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., Krüger, N., Herrler, T., Erichsen, S., Schiergens, T. S., Herrler, G., Wu, N. H., Nitsche, A., Müller, M. A., Drosten, C., & Pöhlmann, S. (2020). SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*, *181*(2), 271–280.e8. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2020.02.052>
- Hoffman, R. A., & Reiter, R. J. (1965). PINEAL GLAND: INFLUENCE ON GONADS OF MALE HAMSTERS. *Science (New York, N.Y.)*, *148*(3677), 1609–1611. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.148.3677.1609>
- Holmes, E. C., Goldstein, S. A., Rasmussen, A. L., Robertson, D. L., Crits-Christoph, A., Wertheim, J. O., Anthony, S. J., Barclay, W. S., Boni, M. F., Doherty, P. C., Farrar, J., Geoghegan, J. L., Jiang, X., Leibowitz, J. L., Neil, S. J. D., Skern, T., Weiss, S. R., Worobey, M., Andersen, K. G., ... Rambaut, A. (2021). The origins of SARS-CoV-2: A critical review. *Cell*, *184*(19), 4848–4856. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2021.08.017>
- Hu, B., Guo, H., Zhou, P., & Shi, Z.-L. (2021). Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nature Reviews Microbiology*, *19*(3), 141–154. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00459-7>
- Hui, K. P. Y., Cheung, M. C., Perera, R. A. P. M., Ng, K. C., Bui, C. H. T., Ho, J. C. W., Ng, M. M. T., Kuok, D. I. T., Shih, K. C., Tsao, S. W., Poon, L. L. M., Peiris, M., Nicholls, J. M., & Chan, M. C. W. (2020). Tropism, replication competence, and innate immune responses of the coronavirus SARS-CoV-2 in human respiratory tract and conjunctiva: an analysis in ex-vivo and in-vitro cultures. *The Lancet Respiratory Medicine*, *8*(7), 687. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(20\)30193-4](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30193-4)
- Hunt, A. E., Al-Ghoul, W. M., Gillette, M. U., & Dubocovich, M. L. (2001). Activation of MT(2) melatonin receptors in rat suprachiasmatic nucleus phase advances the circadian clock. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, *280*(1). <https://doi.org/10.1152/AJPCELL.2001.280.1.C110>
- Huo, L., Xu, K. L., & Wang, H. (2021). Clinical features of SARS-CoV-2-associated encephalitis and meningitis amid COVID-19 pandemic. *World Journal of Clinical Cases*, *9*(5), 1058. <https://doi.org/10.12998/WJCC.V9.I5.1058>

- Hu, W., Ma, Z., Jiang, S., Fan, C., Deng, C., Yan, X., Di, S., Lv, J., Reiter, R. J., & Yang, Y. (2016). Melatonin: the dawning of a treatment for fibrosis? *Journal of Pineal Research*, *60*(2), 121–131. <https://doi.org/10.1111/JPI.12302>
- Iadecola, C. (2017). The Neurovascular Unit Coming of Age: A Journey through Neurovascular Coupling in Health and Disease. *Neuron*, *96*(1), 17–42. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2017.07.030>
- Iadecola, C., Anrather, J., & Kamel, H. (2020). Effects of COVID-19 on the Nervous System. *Cell*, *183*(1), 16–27.e1. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2020.08.028>
- Jahrami, H., BaHammam, A. S., Bragazzi, N. L., Saif, Z., Faris, M., & Vitiello, M. V. (2021). Sleep problems during the COVID-19 pandemic by population: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Clinical Sleep Medicine*, *17*(2), 299–313. [https://doi.org/10.5664/JCSM.8930/SUPPL\\_FILE/JCSM.8930.DS001.PDF](https://doi.org/10.5664/JCSM.8930/SUPPL_FILE/JCSM.8930.DS001.PDF)
- Jiang, R. Di, Liu, M. Q., Chen, Y., Shan, C., Zhou, Y. W., Shen, X. R., Li, Q., Zhang, L., Zhu, Y., Si, H. R., Wang, Q., Min, J., Wang, X., Zhang, W., Li, B., Zhang, H. J., Baric, R. S., Zhou, P., Yang, X. Lou, & Shi, Z. L. (2020). Pathogenesis of SARS-CoV-2 in Transgenic Mice Expressing Human Angiotensin-Converting Enzyme 2. *Cell*, *182*(1), 50–58.e8. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2020.05.027>
- Jiao, L., Yang, Y., Yu, W., Zhao, Y., Long, H., Gao, J., Ding, K., Ma, C., Li, J., Zhao, S., Wang, H., Li, H., Yang, M., Xu, J., Wang, J., Yang, J., Kuang, D., Luo, F., Qian, X., ... Peng, X. (2021). The olfactory route is a potential way for SARS-CoV-2 to invade the central nervous system of rhesus monkeys. *Signal Transduction and Targeted Therapy* *2021 6:1*, *6*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00591-7>
- Jing, H., Wu, X., Xiang, M., Liu, L., Novakovic, V. A., & Shi, J. (2022). Pathophysiological mechanisms of thrombosis in acute and long COVID-19. *Frontiers in Immunology*, *13*. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2022.992384>
- Jockers, R., Delagrangé, P., Dubocovich, M. L., Markus, R. P., Renault, N., Tosini, G., Cecon, E., & Zlotos, D. P. (2016). Update on melatonin receptors: IUPHAR Review 20. *British Journal of Pharmacology*, *173*(18), 2702–2725. <https://doi.org/10.1111/BPH.13536>
- Johnston, S. C., Ricks, K. M., Jay, A., Raymond, J. L., Rossi, F., Zeng, X., Scruggs, J., Dyer, D., Frick, O., Koehler, J. W., Kuehnert, P. A., Clements, T. L., Shoemaker, C. J., Coyne, S. R., Delp, K. L., Moore, J., Berrier, K., Esham, H., Shamblin, J., ... Nalca, A. (2021). Development of a coronavirus disease 2019 nonhuman primate model using airborne exposure. *PLOS ONE*, *16*(2), e0246366. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0246366>
- Jones, J. R., Chaturvedi, S., Granados-Fuentes, D., & Herzog, E. D. (2021). Circadian neurons in the paraventricular nucleus entrain and sustain daily rhythms in glucocorticoids. *Nature Communications* *2021 12:1*, *12*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25959-9>
- Joó, F. (1996). Endothelial cells of the brain and other organ systems: Some similarities and differences. *Progress in Neurobiology*, *48*(3), 255–257. [https://doi.org/10.1016/0301-0082\(95\)00046-1](https://doi.org/10.1016/0301-0082(95)00046-1)
- Kalejaiye, T. D., Bhattacharya, R., Burt, M. A., Travieso, T., Okafor, A. E., Mou, X., Blasi, M., & Musah, S. (2022). SARS-CoV-2 Employ BSG/CD147 and ACE2 Receptors to Directly Infect Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Kidney Podocytes. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *10*. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2022.855340>
- Kamphuis, W., Kooijman, L., Orre, M., Stassen, O., Pekny, M., & Hol, E. M. (2015). GFAP and vimentin deficiency alters gene expression in astrocytes and microglia in wild-type mice and changes the transcriptional response of reactive glia in mouse model for Alzheimer's disease. *Glia*, *63*(6), 1036–1056. <https://doi.org/10.1002/GLIA.22800>

- Kanberg, N., Ashton, N. J., Andersson, L. M., Yilmaz, A., Lindh, M., Nilsson, S., Price, R. W., Blennow, K., Zetterberg, H., & Gisslén, M. (2020). Neurochemical evidence of astrocytic and neuronal injury commonly found in COVID-19. *Neurology*, *95*(12), e1754–e1759. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000010111>
- Kan, B., Wang, M., Jing, H., Xu, H., Jiang, X., Yan, M., Liang, W., Zheng, H., Wan, K., Liu, Q., Cui, B., Xu, Y., Zhang, E., Wang, H., Ye, J., Li, G., Li, M., Cui, Z., Qi, X., ... Xu, J. (2005). Molecular evolution analysis and geographic investigation of severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in palm civets at an animal market and on farms. *Journal of Virology*, *79*(18), 11892–11900. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.18.11892-11900.2005>
- Kaneko, N., Kuo, H. H., Boucau, J., Farmer, J. R., Allard-Chamard, H., Mahajan, V. S., Piechocka-Trocha, A., Lefteri, K., Osborn, M., Bals, J., Bartsch, Y. C., Bonheur, N., Caradonna, T. M., Chevalier, J., Chowdhury, F., Diefenbach, T. J., Einkauf, K., Fallon, J., Feldman, J., ... Pillai, S. (2020). Loss of Bcl-6-Expressing T Follicular Helper Cells and Germinal Centers in COVID-19. *Cell*, *183*(1), 143–157.e13. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2020.08.025>
- Kanth Manne, B., Denorme, F., Middleton, E. A., Portier, I., Rowley, J. W., Stubben, C., Petrey, A. C., Tolley, N. D., Guo, L., Cody, M., Weyrich, A. S., Yost, C. C., Rondina, M. T., & Campbell, R. A. (2020). Platelet gene expression and function in patients with COVID-19. *Blood*, *136*(11), 1317–1329. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.2020007214>
- Karagiannidis, C., Mostert, C., Hentschker, C., Voshaar, T., Malzahn, J., Schillinger, G., Klauber, J., Janssens, U., Marx, G., Weber-Carstens, S., Kluge, S., Pfeifer, M., Grabenhenrich, L., Welte, T., & Busse, R. (2020). Case characteristics, resource use, and outcomes of 10 021 patients with COVID-19 admitted to 920 German hospitals: an observational study. *The Lancet. Respiratory Medicine*, *8*(9), 853–862. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(20\)30316-7](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30316-7)
- Kato, K., Hirai, K., Nishiyama, K., Uchikawa, O., Fukatsu, K., Ohkawa, S., Kawamata, Y., Hinuma, S., & Miyamoto, M. (2005). Neurochemical properties of ramelteon (TAK-375), a selective MT1/MT2 receptor agonist. *Neuropharmacology*, *48*(2), 301–310. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2004.09.007>
- Katsoularis, I., Fonseca-Rodríguez, O., Farrington, P., Jerndal, H., Lundevaller, E. H., Sund, M., Lindmark, K., & Fors Connolly, A. M. (2022). Risks of deep vein thrombosis, pulmonary embolism, and bleeding after covid-19: nationwide self-controlled cases series and matched cohort study. *BMJ*, *377*, e069590. <https://doi.org/10.1136/BMJ-2021-069590>
- Katsura, H., Sontake, V., Tata, A., Kobayashi, Y., Edwards, C. E., Heaton, B. E., Konkimalla, A., Asakura, T., Mikami, Y., Fritch, E. J., Lee, P. J., Heaton, N. S., Boucher, R. C., Randell, S. H., Baric, R. S., & Tata, P. R. (2020). Human Lung Stem Cell-Based Alveolospheres Provide Insights into SARS-CoV-2-Mediated Interferon Responses and Pneumocyte Dysfunction. *Cell Stem Cell*, *27*(6), 890–904.e8. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.10.005>
- Katzenstein, A. L. A., Bloor, C. M., & Leibow, A. A. (1976). Diffuse alveolar damage--the role of oxygen, shock, and related factors. A review. *The American Journal of Pathology*, *85*(1), 209. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2032554/>
- Kedor, C., Freitag, H., Meyer-Arndt, L., Wittke, K., Hanitsch, L. G., Zoller, T., Steinbeis, F., Haffke, M., Rudolf, G., Heidecker, B., Bobbert, T., Spranger, J., Volk, H. D., Skurk, C., Konietschke, F., Paul, F., Behrends, U., Bellmann-Strobl, J., & Scheibenbogen, C. (2022). A prospective observational study of post-COVID-19 chronic fatigue syndrome following the first pandemic wave in Germany and biomarkers associated with symptom severity. *Nature Communications*, *13*(1). <https://doi.org/10.1038/S41467-022-32507-6>

- Khaddaj-Mallat, R., Aldib, N., Bernard, M., Paquette, A. S., Ferreira, A., Lecordier, S., Saghatelian, A., Flamand, L., & ElAli, A. (2021). SARS-CoV-2 deregulates the vascular and immune functions of brain pericytes via Spike protein. *Neurobiology of Disease*, *161*. <https://doi.org/10.1016/J.NBD.2021.105561>
- Khan, A. O., Reyat, J. S., Hill, H., Bourne, J. H., Colicchia, M., Newby, M. L., Allen, J. D., Crispin, M., Youd, E., Murray, P. G., Taylor, G., Stamataki, Z., Richter, A. G., Cunningham, A. F., Pugh, M., & Rayes, J. (2022). Preferential uptake of SARS-CoV-2 by pericytes potentiates vascular damage and permeability in an organoid model of the microvasculature. *Cardiovascular Research*, *118*(15), 3085–3096. <https://doi.org/10.1093/CVR/CVAC097>
- Khan, M., Yoo, S. J., Clijsters, M., Backaert, W., Vanstapel, A., Speleman, K., Lietaer, C., Choi, S., Hether, T. D., Marcelis, L., Nam, A., Pan, L., Reeves, J. W., Van Bulck, P., Zhou, H., Bourgeois, M., Debaveye, Y., De Munter, P., Gunst, J., ... Van Gerven, L. (2021). Visualizing in deceased COVID-19 patients how SARS-CoV-2 attacks the respiratory and olfactory mucosae but spares the olfactory bulb. *Cell*, *184*(24), 5932–5949.e15. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2021.10.027/ATTACHMENT/23A2AFA1-C0BB-4E2B-8D0E-4237CB6C2CFC/MMC1.MP4>
- Kim, J. E., Heo, J. H., Kim, H. O., Song, S. H., Park, S. S., Park, T. H., Ahn, J. Y., Kim, M. K., & Choi, J. P. (2017). Neurological Complications during Treatment of Middle East Respiratory Syndrome. *Journal of Clinical Neurology (Seoul, Korea)*, *13*(3), 227. <https://doi.org/10.3988/JCN.2017.13.3.227>
- Klok, F. A., Kruij, M. J. H. A., van der Meer, N. J. M., Arbous, M. S., Gommers, D., Kant, K. M., Kaptein, F. H. J., van Paassen, J., Stals, M. A. M., Huisman, M. V., & Endeman, H. (2020). Confirmation of the high cumulative incidence of thrombotic complications in critically ill ICU patients with COVID-19: An updated analysis. *Thrombosis Research*, *191*, 148–150. <https://doi.org/10.1016/J.THROMRES.2020.04.041>
- Knight, J. S., Caricchio, R., Casanova, J. L., Combes, A. J., Diamond, B., Fox, S. E., Hanauer, D. A., James, J. A., Kanthi, Y., Ladd, V., Mehta, P., Ring, A. M., Sanz, I., Selmi, C., Tracy, R. P., Utz, P. J., Wagner, C. A., Wang, J. Y., & McCune, W. J. (2021). The intersection of COVID-19 and autoimmunity. *The Journal of Clinical Investigation*, *131*(24). <https://doi.org/10.1172/JCI154886>
- Knox, E. G., Aburto, M. R., Clarke, G., Cryan, J. F., & O'Driscoll, C. M. (2022). The blood-brain barrier in aging and neurodegeneration. *Molecular Psychiatry* *2022* *27*:6, *27*(6), 2659–2673. <https://doi.org/10.1038/s41380-022-01511-z>
- Kostoglou-Athanassiou, I. (2013). Therapeutic applications of melatonin. *Therapeutic Advances in Endocrinology and Metabolism*, *4*(1), 13–24. [https://doi.org/10.1177/20420188113476084/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1177\\_2042018813476084-FIG1.JPEG](https://doi.org/10.1177/20420188113476084/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1177_2042018813476084-FIG1.JPEG)
- Kresch, E., Achua, J., Saltzman, R., Khodamoradi, K., Arora, H., Ibrahim, E., Kryvenko, O. N., Almeida, V. W., Firdaus, F., Hare, J. M., & Ramasamy, R. (2021). COVID-19 Endothelial Dysfunction Can Cause Erectile Dysfunction: Histopathological, Immunohistochemical, and Ultrastructural Study of the Human Penis. *The World Journal of Men's Health*, *39*(3). <https://doi.org/10.5534/WJMH.210055>
- Kurose, I., Anderson, D. C., Miyasaka, M., Tamatani, T., Paulson, J. C., Todd, R. F., Rusche, J. R., & Granger, D. N. (1994). Molecular determinants of reperfusion-induced leukocyte adhesion and vascular protein leakage. *Circulation Research*, *74*(2), 336–343. <https://doi.org/10.1161/01.RES.74.2.336>
- Kyrou, I., Randeve, H. S., Spandidos, D. A., & Karteris, E. (2021). Not only ACE2—the quest for additional host cell mediators of SARS-CoV-2 infection: Neuropilin-1 (NRP1) as a novel SARS-CoV-2 host cell entry mediator implicated in COVID-19. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *6*(1). <https://doi.org/10.1038/S41392-020-00460-9>

- Laboratory Readiness for Detecting the 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) infection in Malaysia – From the Desk of the Director-General of Health Malaysia.* (n.d.). Retrieved October 21, 2023, from <https://kpkesihatan.com/2020/02/13/laboratory-readiness-for-detecting-the-2019-novel-coronavirus-2019-ncov-infection-in-malaysia/>
- Lamers, M. M., & Haagmans, B. L. (2022). SARS-CoV-2 pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology* 2022 20:5, 20(5), 270–284. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00713-0>
- Lam, M. H. B., Wing, Y. K., Yu, M. W. M., Leung, C. M., Ma, R. C. W., Kong, A. P. S., So, W. Y., Fong, S. Y. Y., & Lam, S. P. (2009). Mental morbidities and chronic fatigue in severe acute respiratory syndrome survivors: long-term follow-up. *Archives of Internal Medicine*, 169(22), 2142–2147. <https://doi.org/10.1001/ARCHINTERNMED.2009.384>
- Larsen, N. W., Stiles, L. E., Shaik, R., Schneider, L., Muppidi, S., Tsui, C. T., Geng, L. N., Bonilla, H., & Miglis, M. G. (2022). Characterization of autonomic symptom burden in long COVID: A global survey of 2,314 adults. *Frontiers in Neurology*, 13. <https://doi.org/10.3389/FNEUR.2022.1012668>
- Li, C., Ye, Z., Zhang, A. J. X., Chan, J. F. W., Song, W., Liu, F., Chen, Y., Kwan, M. Y. W., Lee, A. C. Y., Zhao, Y., Wong, B. H. Y., Yip, C. C. Y., Cai, J. P., Lung, D. C., Sridhar, S., Jin, D., Chu, H., To, K. K. W., & Yuen, K. Y. (2022b). Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Infection by Intranasal or Intratesticular Route Induces Testicular Damage. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 75(1), E974–E990. <https://doi.org/10.1093/CID/CIAC142>
- Limson, J., Nyokong, T., & Daya, S. (1998). The interaction of melatonin and its precursors with aluminium, cadmium, copper, iron, lead, and zinc: an adsorptive voltammetric study. *Journal of Pineal Research*, 24(1), 15–21. <https://doi.org/10.1111/J.1600-079X.1998.TB00361.X>
- Lindblom, P., Gerhardt, H., Liebner, S., Abramsson, A., Enge, M., Hellström, M., Bäckström, G., Fredriksson, S., Landegren, U., Nyström, H. C., Bergström, G., Dejana, E., Östman, A., Lindahl, P., & Betsholtz, C. (2003). Endothelial PDGF-B retention is required for proper investment of pericytes in the microvessel wall. *Genes & Development*, 17(15), 1835–1840. <https://doi.org/10.1101/GAD.266803>
- Lin, G. J., Huang, S. H., Chen, S. J., Wang, C. H., Chang, D. M., & Sytwu, H. K. (2013). Modulation by Melatonin of the Pathogenesis of Inflammatory Autoimmune Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(6), 11742. <https://doi.org/10.3390/IJMS140611742>
- Lippi, G., Plebani, M., & Henry, B. M. (2020). Thrombocytopenia is associated with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19) infections: A meta-analysis. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 506, 145. <https://doi.org/10.1016/J.CCA.2020.03.022>
- Lippi, G., Wong, J., & Henry, B. M. (2020). Myalgia may not be associated with severity of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *World Journal of Emergency Medicine*, 11(3), 193. <https://doi.org/10.5847/WJEM.J.1920-8642.2020.03.013>
- Lissoni, P., Barni, S., Meregalli, S., Fossati, V., Cazzaniga, M., Esposti, D., & Tancini, G. (1995). Modulation of cancer endocrine therapy by melatonin: a phase II study of tamoxifen plus melatonin in metastatic breast cancer patients progressing under tamoxifen alone. *British Journal of Cancer*, 71(4), 854–856. <https://doi.org/10.1038/BJC.1995.164>
- Liu, C., Weaver, D. R., Jin, X., Shearman, L. P., Pieschl, R. L., Gribkoff, V. K., & Reppert, S. M. (1997). Molecular dissection of two distinct actions of melatonin on the suprachiasmatic circadian clock. *Neuron*, 19(1), 91–102. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80350-5](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80350-5)
- Liu, L., Labani, N., Cecon, E., & Jockers, R. (2019). Melatonin Target Proteins: Too Many or Not Enough? *Frontiers in Endocrinology*, 10, 791. <https://doi.org/10.3389/FENDO.2019.00791>

- Liu, Q., Mak, J. W. Y., Su, Q., Yeoh, Y. K., Lui, G. C. Y., Ng, S. S. S., Zhang, F., Li, A. Y. L., Lu, W., Hui, D. S. C., Chan, P. K. S., Chan, F. K. L., & Ng, S. C. (2022). Gut microbiota dynamics in a prospective cohort of patients with post-acute COVID-19 syndrome. *Gut*, *71*(3). <https://doi.org/10.1136/GUTJNL-2021-325989>
- Livanos, A. E., Jha, D., Cossarini, F., Gonzalez-Reiche, A. S., Tokuyama, M., Aydilto, T., Parigi, T. L., Ladinsky, M. S., Ramos, I., Dunleavy, K., Lee, B., Dixon, R. E., Chen, S. T., Martinez-Delgado, G., Nagula, S., Bruce, E. A., Ko, H. M., Glicksberg, B. S., Nadkarni, G., ... Mehandru, S. (2021). Intestinal Host Response to SARS-CoV-2 Infection and COVID-19 Outcomes in Patients With Gastrointestinal Symptoms. *Gastroenterology*, *160*(7), 2435. <https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2021.02.056>
- Lopez-Leon, S., Wegman-Ostrosky, T., Perelman, C., Sepulveda, R., Rebolledo, P. A., Cuapio, A., & Villapol, S. (2021). More than 50 long-term effects of COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *Scientific Reports 2021 11:1*, *11*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95565-8>
- Lou, J. J., Movassaghi, M., Gordy, D., Olson, M. G., Zhang, T., Khurana, M. S., Chen, Z., Perez-Rosendahl, M., Thammachantha, S., Singer, E. J., Magaki, S. D., Vinters, H. V., & Yong, W. H. (2021). Neuropathology of COVID-19 (neuro-COVID): clinicopathological update. *Free Neuropathology*, *2*. <https://doi.org/10.17879/FRENEUROPATHOLOGY-2021-2993>
- Lu, R., Zhao, X., Li, J., Niu, P., Yang, B., Wu, H., Wang, W., Song, H., Huang, B., Zhu, N., Bi, Y., Ma, X., Zhan, F., Wang, L., Hu, T., Zhou, H., Hu, Z., Zhou, W., Zhao, L., ... Tan, W. (2020). Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet (London, England)*, *395*(10224), 565–574. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30251-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30251-8)
- Lu, S., Zhao, Y., Yu, W., Yang, Y., Gao, J., Wang, J., Kuang, D., Yang, M., Yang, J., Ma, C., Xu, J., Qian, X., Li, H., Zhao, S., Li, J., Wang, H., Long, H., Zhou, J., Luo, F., ... Peng, X. (2020). Comparison of nonhuman primates identified the suitable model for COVID-19. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *5*(1). <https://doi.org/10.1038/S41392-020-00269-6>
- Lysenko, V., Nagorny, C. L. F., Erdos, M. R., Wierup, N., Jonsson, A., Spégel, P., Bugliani, M., Saxena, R., Fex, M., Pulizzi, N., Isomaa, B., Tuomi, T., Nilsson, P., Kuusisto, J., Tuomilehto, J., Boehnke, M., Altshuler, D., Sundler, F., Eriksson, J. G., ... Groop, L. (2008). Common variant in MTNR1B associated with increased risk of type 2 diabetes and impaired early insulin secretion. *Nature Genetics* *2008 41:1*, *41*(1), 82–88. <https://doi.org/10.1038/ng.288>
- Lytras, S., Xia, W., Hughes, J., Jiang, X., & Robertson, D. L. (2021). The animal origin of SARS-CoV-2. *Science (New York, N.Y.)*, *373*(6558), 968–970. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.ABH0117>
- Magro, C., Mulvey, J. J., Berlin, D., Nuovo, G., Salvatore, S., Harp, J., Baxter-Stoltzfus, A., & Laurence, J. (2020). Complement associated microvascular injury and thrombosis in the pathogenesis of severe COVID-19 infection: A report of five cases. *Translational Research*, *220*, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2020.04.007>
- Maleki, B. H., & Tartibian, B. (2021). COVID-19 and male reproductive function: a prospective, longitudinal cohort study. *Reproduction*, *161*(3), 319–331. <https://doi.org/10.1530/REP-20-0382>
- Manager, J. T., & Affairs, R. (2022). *Abbott RealTime SARS-CoV-2 - Letter of Authorization*. <https://www.fda.gov/media/152406/download>.
- Manchester, L. C., Coto-Montes, A., Boga, J. A., Andersen, L. P. H., Zhou, Z., Galano, A., Vriend, J., Tan, D. X., & Reiter, R. J. (2015). Melatonin: an ancient molecule that makes oxygen metabolically tolerable. *Journal of Pineal Research*, *59*(4), 403–419. <https://doi.org/10.1111/JPI.12267>

- Mancini, I., Baronciani, L., Artoni, A., Colpani, P., Biganzoli, M., Cozzi, G., Novembrino, C., Boscolo Anzoletti, M., De Zan, V., Pagliari, M. T., Gualtierotti, R., Aliberti, S., Panigada, M., Grasselli, G., Blasi, F., & Peyvandi, F. (2021). The ADAMTS13-von Willebrand factor axis in COVID-19 patients. *Journal of Thrombosis and Haemostasis : JTH*, *19*(2), 513–521. <https://doi.org/10.1111/JTH.15191>
- Manfredi-Lozano, M., Leysen, V., Adamo, M., Paiva, I., Rovera, R., Pignat, J. M., Timzoura, F. E., Candlish, M., Eddarkaoui, S., Malone, S. A., Silva, M. S. B., Trova, S., Imbernon, M., Decoster, L., Cotellessa, L., Tena-Sempere, M., Claret, M., Paoloni-Giacobino, A., Plassard, D., ... Prevot, V. (2022). GnRH replacement rescues cognition in Down syndrome. *Science (New York, N.Y.)*, *377*(6610). <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.ABQ4515>
- Marra, A., McGrane, T. J., Henson, C. P., & Pandharipande, P. P. (2019). Melatonin in Critical Care. *Critical Care Clinics*, *35*(2), 329–340. <https://doi.org/10.1016/J.CCC.2018.11.008>
- Masters, P. S. (2006). The molecular biology of coronaviruses. *Advances in Virus Research*, *66*, 193–292. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(06\)66005-3](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(06)66005-3)
- Matheson, A. M., McIntosh, M. J., Kooner, H. K., Abdelrazek, M., Albert, M. S., Dhaliwal, I., Nicholson, J. M., Ouriadov, A., Svenningsen, S., & Parraga, G. (2023). Longitudinal follow-up of postacute COVID-19 syndrome: DLCO, quality-of-life and MRI pulmonary gas-exchange abnormalities. *Thorax*, *78*(4), 418–421. <https://doi.org/10.1136/THORAX-2022-219378>
- Matschke, J., Lütgehetmann, M., Hagel, C., Sperhake, J. P., Schröder, A. S., Edler, C., Mushumba, H., Fitzek, A., Allweiss, L., & Dandri, M. (2020). Neuropathology of patients with COVID-19 in Germany: a post-mortem case series. *The Lancet Neurology*, *19*(11), 919–929.
- Maucourant, C., Filipovic, I., Ponzetta, A., Aleman, S., Cornillet, M., Hertwig, L., Strunz, B., Lentini, A., Reinius, B., Brownlie, D., Cuapio, A., Ask, E. H., Hull, R. M., Haroun-Izquierdo, A., Schaffer, M., Klingström, J., Folkesson, E., Buggert, M., Sandberg, J. K., ... Björkström, N. K. (2020). Natural killer cell immunotypes related to COVID-19 disease severity. *Science Immunology*, *5*(50). <https://doi.org/10.1126/SCIIMMUNOL.ABD6832>
- Maury, A., Lyoubi, A., Peiffer-Smadja, N., de Broucker, T., & Meppiel, E. (2021). Neurological manifestations associated with SARS-CoV-2 and other coronaviruses: A narrative review for clinicians. *Revue Neurologique*, *177*(1–2), 51–64. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROL.2020.10.001>
- McBride, R., van Zyl, M., & Fielding, B. C. (2014). The coronavirus nucleocapsid is a multifunctional protein. *Viruses*, *6*(8), 2991–3018. <https://doi.org/10.3390/V6082991>
- McCray, P. B., Pewe, L., Wohlford-Lenane, C., Hickey, M., Manzel, L., Shi, L., Netland, J., Jia, H. P., Halabi, C., Sigmund, C. D., Meyerholz, D. K., Kirby, P., Look, D. C., & Perlman, S. (2007). Lethal infection of K18-hACE2 mice infected with severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Journal of Virology*, *81*(2), 813–821. <https://doi.org/10.1128/JVI.02012-06>
- Medina-Perucha, L., López-Jiménez, T., Holst, A. S., Jacques-Aviñó, C., Munrós-Feliu, J., Martínez-Bueno, C., Valls-Llobet, C., Pinzón-Sanabria, D., Vicente-Hernández, M. <sup>a</sup>. M., & Berenguera, A. (2022). Self-Reported Menstrual Alterations During the COVID-19 Syndemic in Spain: A Cross-Sectional Study. *International Journal of Women's Health*, *14*, 529–544. <https://doi.org/10.2147/IJWH.S354655>
- Mehta, P., McAuley, D. F., Brown, M., Sanchez, E., Tattersall, R. S., & Manson, J. J. (2020). COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *Lancet (London, England)*, *395*(10229), 1033–1034. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30628-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30628-0)
- Melms, J. C., Biermann, J., Huang, H., Wang, Y., Nair, A., Tagore, S., Katsyv, I., Rendeiro, A. F., Amin, A. D., Schapiro, D., Frangieh, C. J., Luoma, A. M., Filliol, A., Fang, Y., Ravichandran, H., Clausi, M. G.,

- Alba, G. A., Rogava, M., Chen, S. W., ... Izar, B. (2021). A molecular single-cell lung atlas of lethal COVID-19. *Nature*, *595*(7865), 114–119. <https://doi.org/10.1038/S41586-021-03569-1>
- Menter, T., Haslbauer, J. D., Nienhold, R., Savic, S., Hopfer, H., Deigendesch, N., Frank, S., Turek, D., Willi, N., Pargger, H., Bassetti, S., Leuppi, J. D., Cathomas, G., Tolnay, M., Mertz, K. D., & Tzankov, A. (2020). Postmortem examination of COVID-19 patients reveals diffuse alveolar damage with severe capillary congestion and variegated findings in lungs and other organs suggesting vascular dysfunction. *Histopathology*, *77*(2), 198–209. <https://doi.org/10.1111/HIS.14134>
- Merzon, E., Weiss, M., Krone, B., Cohen, S., Ilani, G., Vinker, S., Cohen-Golan, A., Green, I., Israel, A., Schneider, T., Ashkenazi, S., Weizman, A., & Manor, I. (2022). Clinical and Socio-Demographic Variables Associated with the Diagnosis of Long COVID Syndrome in Youth: A Population-Based Study. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *19*(10). <https://doi.org/10.3390/IJERPH19105993>
- Messina, A., Langlet, F., Chachlaki, K., Roa, J., Rasika, S., Jouy, N., Gallet, S., Gaytan, F., Parkash, J., Tena-Sempere, M., Giacobini, P., & Prevot, V. (2016). A microRNA switch regulates the rise in hypothalamic GnRH production before puberty. *Nature Neuroscience*, *19*(6), 835–844. <https://doi.org/10.1038/NN.4298>
- Millan, M. J., Gobert, A., Lejeune, F., Dekeyne, A., Newman-Tancredi, A., Pasteau, V., Rivet, J. M., & Cussac, D. (2003). The novel melatonin agonist agomelatine (S20098) is an antagonist at 5-hydroxytryptamine<sub>2C</sub> receptors, blockade of which enhances the activity of frontocortical dopaminergic and adrenergic pathways. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *306*(3), 954–964. <https://doi.org/10.1124/JPET.103.051797>
- Moghimi, N., Di Napoli, M., Biller, J., Siegler, J. E., Shekhar, R., McCullough, L. D., Harkins, M. S., Hong, E., Alaouieh, D. A., Mansueto, G., & Divani, A. A. (2021). The Neurological Manifestations of Post-Acute Sequelae of SARS-CoV-2 infection. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, *21*(9), 1–17. <https://doi.org/10.1007/S11910-021-01130-1/TABLES/2>
- Mollaoglu, H., Topal, T., Ozler, M., Uysal, B., Reiter, R. J., Korkmaz, A., & Oter, S. (2007). Antioxidant effects of melatonin in rats during chronic exposure to hyperbaric oxygen. *Journal of Pineal Research*, *42*(1), 50–54. <https://doi.org/10.1111/J.1600-079X.2006.00382.X>
- Møller, M., & Baeres, F. M. (2002). The anatomy and innervation of the mammalian pineal gland. *Cell and Tissue Research*, *309*(1), 139–150. <https://doi.org/10.1007/S00441-002-0580-5>
- Montezano, A. C., Camargo, L. L., Mary, S., Neves, K. B., Rios, F. J., Stein, R., Lopes, R. A., Beattie, W., Thomson, J., Herder, V., Szemiel, A. M., McFarlane, S., Palmarini, M., & Touyz, R. M. (2023). SARS-CoV-2 spike protein induces endothelial inflammation via ACE2 independently of viral replication. *Scientific Reports* *2023 13:1*, *13*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-41115-3>
- Morrow, A. K., Malone, L. A., Kokorelis, C., Petracek, L. S., Eastin, E. F., Lobner, K. L., Neuendorff, L., & Rowe, P. C. (2022). Long-Term COVID 19 Sequelae in Adolescents: the Overlap with Orthostatic Intolerance and ME/CFS. *Current Pediatrics Reports*, *10*(2), 31–44. <https://doi.org/10.1007/S40124-022-00261-4>
- Mousavi, S. A., Heydari, K., Mehravaran, H., Saedi, M., Alizadeh-Navaei, R., Hedayatizadeh-Omran, A., & Shamshirian, A. (2022). Melatonin effects on sleep quality and outcomes of COVID-19 patients: An open-label, randomized, controlled trial. *Journal of Medical Virology*, *94*(1), 263–271. <https://doi.org/10.1002/JMV.27312>
- Muhl, L., He, L., Sun, Y., Andaloussi Mäe, M., Pietilä, R., Liu, J., Genové, G., Zhang, L., Xie, Y., Leptidis, S., Mocchi, G., Stritt, S., Osman, A., Anisimov, A., Hemanthakumar, K. A., Räsänen, M., Hansson, E.

- M., Björkegren, J., Vanlandewijck, M., ... Betsholtz, C. (2022). The SARS-CoV-2 receptor ACE2 is expressed in mouse pericytes but not endothelial cells: Implications for COVID-19 vascular research. *Stem Cell Reports*, *17*(5), 1089–1104. <https://doi.org/10.1016/J.STEMCR.2022.03.016>
- Muñoz-Fontela, C., Dowling, W. E., Funnell, S. G. P., Gsell, P. S., Riveros-Balta, A. X., Albrecht, R. A., Andersen, H., Baric, R. S., Carroll, M. W., Cavaleri, M., Qin, C., Crozier, I., Dallmeier, K., de Waal, L., de Wit, E., Delang, L., Dohm, E., Duprex, W. P., Falzarano, D., ... Barouch, D. H. (2020). Animal models for COVID-19. *Nature*, *586*(7830), 509–515. <https://doi.org/10.1038/S41586-020-2787-6>
- Munster, V. J., Flagg, M., Singh, M., Yinda, C. K., Williamson, B. N., Feldmann, F., Pérez-Pérez, L., Schulz, J., Brumbaugh, B., Holbrook, M. G., Adney, D. R., Okumura, A., Hanley, P. W., Smith, B. J., Lovaglio, J., Anzick, S. L., Martens, C., van Doremalen, N., Saturday, G., & de Wit, E. (2021). Subtle differences in the pathogenicity of SARS-CoV-2 variants of concern B.1.1.7 and B.1.351 in rhesus macaques. *Science Advances*, *7*(43). <https://doi.org/10.1126/SCIADV.ABJ3627>
- Nouri-Vaskeh, M., Sharifi, A., Khalili, N., Zand, R., & Sharifi, A. (2020). Dyspneic and non-dyspneic (silent) hypoxemia in COVID-19: Possible neurological mechanism. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, *198*. <https://doi.org/10.1016/J.CLINNEURO.2020.106217>
- Nussbaumer-Streit, B., Greenblatt, A., Kaminski-Hartenthaler, A., Van Noord, M. G., Forneris, C. A., Morgan, L. C., Gaynes, B. N., Wipplinger, J., Lux, L. J., Winkler, D., & Gartlehner, G. (2019). Melatonin and agomelatine for preventing seasonal affective disorder. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, *2019*(6). [https://doi.org/10.1002/14651858.CD011271.PUB3/MEDIA/CDSR/CD011271/IMAGE\\_N/NCD011271-CMP-001-08.PNG](https://doi.org/10.1002/14651858.CD011271.PUB3/MEDIA/CDSR/CD011271/IMAGE_N/NCD011271-CMP-001-08.PNG)
- Oaklander, A. L., Mills, A. J., Kelley, M., Toran, L. S., Smith, B., Dalakas, M. C., & Nath, A. (2022). Peripheral Neuropathy Evaluations of Patients With Prolonged Long COVID. *Neurology(R) Neuroimmunology & Neuroinflammation*, *9*(3). <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000001146>
- O'Driscoll, M., Ribeiro Dos Santos, G., Wang, L., Cummings, D. A. T., Azman, A. S., Paireau, J., Fontanet, A., Cauchemez, S., & Salje, H. (2021). Age-specific mortality and immunity patterns of SARS-CoV-2. *Nature*, *590*(7844), 140–145. <https://doi.org/10.1038/S41586-020-2918-0>
- Oladunni, F. S., Park, J. G., Pino, P. A., Gonzalez, O., Akhter, A., Allué-Guardia, A., Olmo-Fontánez, A., Gautam, S., Garcia-Vilanova, A., Ye, C., Chiem, K., Headley, C., Dwivedi, V., Parodi, L. M., Alfson, K. J., Staples, H. M., Schami, A., Garcia, J. I., Whigham, A., ... Torrelles, J. B. (2020). Lethality of SARS-CoV-2 infection in K18 human angiotensin-converting enzyme 2 transgenic mice. *Nature Communications*, *11*(1). <https://doi.org/10.1038/S41467-020-19891-7>
- Osiaevi, I., Schulze, A., Evers, G., Harmening, K., Vink, H., Kumpers, P., Mohr, M., & Rovas, A. (2023). Persistent capillary rarefaction in long COVID syndrome. *Angiogenesis*, *26*(1), 53–61. <https://doi.org/10.1007/S10456-022-09850-9/TABLES/2>
- Osterrieder, N., Bertzbach, L. D., Dietert, K., Abdelgawad, A., Vladimirova, D., Kunec, D., Hoffmann, D., Beer, M., Gruber, A. D., & Trimpert, J. (2020). Age-Dependent Progression of SARS-CoV-2 Infection in Syrian Hamsters. *Viruses*, *12*(7). <https://doi.org/10.3390/V12070779>
- Pach, S., Nguyen, T. N., Trimpert, J., Kunec, D., Osterrieder, N., & Wolber, G. (2021). ACE2-Variants Indicate Potential SARS-CoV-2-Susceptibility in Animals: A Molecular Dynamics Study. *Molecular Informatics*, *40*(9). <https://doi.org/10.1002/MINF.202100031>
- Panther Fusion SARS-CoV-2 assay - Letter of Authorization | Enhanced Reader.* (n.d.).

- Patel, B., Koysombat, K., Mills, E. G., Tsoutsouki, J., Comninou, A. N., Abbara, A., & Dhillon, W. S. (2023). The emerging therapeutic potential of kisspeptin and neurokinin B. *Endocrine Reviews*. <https://doi.org/10.1210/ENDREV/BNAD023>
- Paterson, R. W., Benjamin, L. A., Mehta, P. R., Brown, R. L., Athauda, D., Ashton, N. J., Leckey, C. A., Ziff, O. J., Heaney, J., Heslegrave, A. J., Benedet, A. L., Blennow, K., Checkley, A. M., Houlihan, C. F., Mummery, C. J., Lunn, M. P., Manji, H., Zandi, M. S., Keddie, S., ... Schott, J. M. (2021). Serum and cerebrospinal fluid biomarker profiles in acute SARS-CoV-2-associated neurological syndromes. *Brain Communications*, 3(3). <https://doi.org/10.1093/BRAINCOMMS/FCAB099>
- Pellegrini, L., Albecka, A., Mallery, D. L., Kellner, M. J., Paul, D., Carter, A. P., James, L. C., & Lancaster, M. A. (2020). SARS-CoV-2 Infects the Brain Choroid Plexus and Disrupts the Blood-CSF Barrier in Human Brain Organoids. *Cell Stem Cell*, 27(6), 951. <https://doi.org/10.1016/J.STEM.2020.10.001>
- Peluso, M. J., Deveau, T. M., Munter, S. E., Ryder, D., Buck, A., Beck-Engeser, G., Chan, F., Lu, S., Goldberg, S. A., Hoh, R., Tai, V., Torres, L., Iyer, N. S., Deswal, M., Ngo, L. H., Buitrago, M., Rodriguez, A., Chen, J. Y., Yee, B. C., ... Henrich, T. J. (2023). Chronic viral coinfections differentially affect the likelihood of developing long COVID. *The Journal of Clinical Investigation*, 133(3). <https://doi.org/10.1172/JCI163669>
- Pitt, B., Tate, A. M., Gluck, D., Rosenson, R. S., & Goonewardena, S. N. (2022). Repurposing low-dose naltrexone for the prevention and treatment of immunothrombosis in COVID-19. *European Heart Journal. Cardiovascular Pharmacotherapy*, 8(4), 402–405. <https://doi.org/10.1093/EHJCVP/PVAC014>
- POEGGELER, B., SAARELA, S., REITER, R. J., TAN, D. -X, CHEN, L. -D, MANCHESTER, L. C., & BARLOW-WALDEN, L. R. (1994). Melatonin--a highly potent endogenous radical scavenger and electron donor: new aspects of the oxidation chemistry of this indole accessed in vitro. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 738(1), 419–420. <https://doi.org/10.1111/J.1749-6632.1994.TB21831.X>
- Poyiadji, N., Shahin, G., Noujaim, D., Stone, M., Patel, S., & Griffith, B. (2020). COVID-19-associated acute hemorrhagic necrotizing encephalopathy: Imaging features. *Radiology*, 296(2), E119–E120. <https://doi.org/10.1148/RADIOL.2020201187/ASSET/IMAGES/LARGE/RADIOL.2020201187.FIG2.JPEG>
- Pranata, R., Huang, I., Lim, M. A., Yonas, E., Vania, R., & Kuswardhani, R. A. T. (2021). Delirium and Mortality in Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) - A Systematic Review and Meta-analysis. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 95. <https://doi.org/10.1016/J.ARCHGER.2021.104388>
- Prasanna, N., Heightman, M., Hillman, T., Wall, E., Bell, R., Kessler, A., Neave, L., Doyle, A., Devaraj, A., Singh, D., Dehbi, H. M., & Scully, M. (2022). Impaired exercise capacity in post-COVID-19 syndrome: the role of VWF-ADAMTS13 axis. *Blood Advances*, 6(13), 4041–4048. <https://doi.org/10.1182/BLOODADVANCES.2021006944>
- Preliminary Report for the Scientific Advisory Group for the Origins of Novel Pathogens (SAGO)*. (n.d). Retrieved October 17, 2023, from <https://www.who.int/publications/m/item/scientific-advisory-group-on-the-origins-of-novel-pathogens-report>
- Prevot, V., Dehouck, B., Sharif, A., Ciofi, P., Giacobini, P., & Clasadonte, J. (2018). The Versatile Tanycyte: A Hypothalamic Integrator of Reproduction and Energy Metabolism. *Endocrine Reviews*, 39(3), 333–368. <https://doi.org/10.1210/ER.2017-00235>

- Prévo, V., Tena-Sempere, M., & Pitteloud, N. (2023). New Horizons: Gonadotropin-Releasing Hormone and Cognition. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *108*(11). <https://doi.org/10.1210/CLINEM/DGAD319>
- Prokopenko, I., Langenberg, C., Florez, J. C., Saxena, R., Soranzo, N., Thorleifsson, G., Loos, R. J. F., Manning, A. K., Jackson, A. U., Aulchenko, Y., Potter, S. C., Erdos, M. R., Sanna, S., Hottenga, J. J., Wheeler, E., Kaakinen, M., Lyssenko, V., Chen, W. M., Ahmadi, K., ... Abecasis, G. R. (2008). Variants in MTNR1B influence fasting glucose levels. *Nature Genetics* *2008 41:1*, *41*(1), 77–81. <https://doi.org/10.1038/ng.290>
- Puchalski, S. S., Green, J. N., & Rasmussen, D. D. (2003). Melatonin effect on rat body weight regulation in response to high-fat diet at middle age. *Endocrine*, *21*(2), 163–167. <https://doi.org/10.1385/ENDO:21:2:163>
- Quist-Paulsen, E., Kran, A. M. B., Lindland, E. S., Ellefsen, K., Sandvik, L., Dunlop, O., & Ormaasen, V. (2019). To what extent can clinical characteristics be used to distinguish encephalitis from encephalopathy of other causes? Results from a prospective observational study. *BMC Infectious Diseases*, *19*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/S12879-018-3570-2/FIGURES/2>
- Qu, X. X., Hao, P., Song, X. J., Jiang, S. M., Liu, Y. X., Wang, P. G., Rao, X., Song, H. D., Wang, S. Y., Zuo, Y., Zheng, A. H., Luo, M., Wang, H. L., Deng, F., Wang, H. Z., Hu, Z. H., Ding, M. X., Zhao, G. P., & Deng, H. K. (2005). Identification of two critical amino acid residues of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein for its variation in zoonotic tropism transition via a double substitution strategy. *The Journal of Biological Chemistry*, *280*(33), 29588–29595. <https://doi.org/10.1074/JBC.M500662200>
- Radmanesh, A., Derman, A., Lui, Y. W., Raz, E., Loh, J. P., Hagiwara, M., Borja, M. J., Zan, E., & Fatterpekar, G. M. (2020). COVID-19-associated Diffuse Leukoencephalopathy and Microhemorrhages. *Radiology*, *297*(1), E223–E227. <https://doi.org/10.1148/RADIOL.2020202040>
- Reiken, S., Sittenfeld, L., Dridi, H., Liu, Y., Liu, X., & Marks, A. R. (2022). Alzheimer’s-like signaling in brains of COVID-19 patients. *Alzheimer’s & Dementia*, *18*(5), 955. <https://doi.org/10.1002/ALZ.12558>
- Reiter, R. J. (1972). Evidence for refractoriness of the pituitary-gonadal axis to the pineal gland in golden hamsters and its possible implications in annual reproductive rhythms. *The Anatomical Record*, *173*(3), 365–371. <https://doi.org/10.1002/AR.1091730311>
- Rendeiro, A. F., Ravichandran, H., Bram, Y., Chandar, V., Kim, J., Meydan, C., Park, J., Fook, J., Hether, T., Warren, S., Kim, Y., Reeves, J., Salvatore, S., Mason, C. E., Swanson, E. C., Borczuk, A. C., Elemento, O., & Schwartz, R. E. (2021). The spatial landscape of lung pathology during COVID-19 progression. *Nature*, *593*(7860), 564–569. <https://doi.org/10.1038/S41586-021-03475-6>
- Rhea, E. M., Logsdon, A. F., Hansen, K. M., Williams, L. M., Reed, M. J., Baumann, K. K., Holden, S. J., Raber, J., Banks, W. A., & Erickson, M. A. (2021). The S1 protein of SARS-CoV-2 crosses the blood-brain barrier in mice. *Nature Neuroscience*, *24*(3), 368–378. <https://doi.org/10.1038/S41593-020-00771-8>
- Rhoads, D. D., Cherian, S. S., Roman, K., Stempak, L. M., Schmotzer, C. L., & Sadri, N. (2020). Comparison of Abbott ID Now, DiaSorin Simplexa, and CDC FDA Emergency Use Authorization Methods for the Detection of SARS-CoV-2 from Nasopharyngeal and Nasal Swabs from Individuals Diagnosed with COVID-19. *Journal of Clinical Microbiology*, *58*(8). <https://doi.org/10.1128/JCM.00760-20>
- Richards, G. A., Bentley, A., Gopalan, P. D., Brannigan, L., & Paruk, F. (2021). Is there a role for melatonin in the ICU? *Southern African Journal of Critical Care*, *37*(2), 77–82. <https://doi.org/10.7196/SAJCC.2021.V37I2.490>

- Richardson, G. S., Zee, P. C., Wang-Weigand, S., Rodriguez, L., & Peng, X. (2008). Circadian Phase-Shifting Effects of Repeated Ramelteon Administration in Healthy Adults. *Journal of Clinical Sleep Medicine: JCSM: Official Publication of the American Academy of Sleep Medicine*, 4(5), 456. <https://doi.org/10.5664/jcsm.27282>
- Richter, A. G., Shields, A. M., Karim, A., Birch, D., Faustini, S. E., Steadman, L., Ward, K., Plant, T., Reynolds, G., Veenith, T., Cunningham, A. F., Drayson, M. T., & Wraith, D. C. (2021). Establishing the prevalence of common tissue-specific autoantibodies following severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 infection. *Clinical and Experimental Immunology*, 205(2), 99–105. <https://doi.org/10.1111/CEI.13623>
- Rizvi, Z. A., Dalal, R., Sadhu, S., Binayke, A., Dandotiya, J., Kumar, Y., Shrivastava, T., Gupta, S. K., Aggarwal, S., Tripathy, M. R., Rathore, D. K., Yadav, A. K., Medigeshi, G. R., Pandey, A. K., Samal, S., Asthana, S., & Awasthi, A. (2022). Golden Syrian hamster as a model to study cardiovascular complications associated with SARS-CoV-2 infection. *ELife*, 11. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.73522>
- Robinot, R., Hubert, M., de Melo, G. D., Lazarini, F., Bruel, T., Smith, N., Levallois, S., Larrous, F., Fernandes, J., Gellenoncourt, S., Rigaud, S., Gorgette, O., Thouvenot, C., Trébeau, C., Mallet, A., Duménil, G., Gobaa, S., Eournay, R., Lledo, P. M., ... Chakrabarti, L. A. (2021). SARS-CoV-2 infection induces the dedifferentiation of multiciliated cells and impairs mucociliary clearance. *Nature Communications*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/S41467-021-24521-X>
- Rockx, B., Kuiken, T., Herfst, S., Bestebroer, T., Lamers, M. M., Munnink, B. B. O., De Meulder, D., Van Amerongen, G., Van Den Brand, J., Okba, N. M. A., Schipper, D., Van Run, P., Leijten, L., Sikkema, R., Verschoor, E., Verstrepen, B., Bogers, W., Langermans, J., Langermans, J., ... Haagmans, B. L. (2020). Comparative pathogenesis of COVID-19, MERS, and SARS in a nonhuman primate model. *Science (New York, N.Y.)*, 368(6494), 1012–1015. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.ABB7314>
- Rodríguez-Rubio, M., Figueira, J. C., Acuña-Castroviejo, D., Borobia, A. M., Escames, G., & De La Oliva, P. (2020). A phase II, single-center, double-blind, randomized placebo-controlled trial to explore the efficacy and safety of intravenous melatonin in patients with COVID-19 admitted to the intensive care unit (MelCOVID study): a structured summary of a study protocol for a randomized controlled trial. *Trials*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/S13063-020-04632-4>
- Rogers, J. P., Watson, C. J., Badenoch, J., Cross, B., Butler, M., Song, J., Hafeez, D., Morrin, H., Rengasamy, E. R., Thomas, L., Ralovska, S., Smakowski, A., Sundaram, R. D., Hunt, C. K., Lim, M. F., Aniwattanapong, D., Singh, V., Hussain, Z., Chakraborty, S., ... Rooney, A. G. (2021). Neurology and neuropsychiatry of COVID-19: a systematic review and meta-analysis of the early literature reveals frequent CNS manifestations and key emerging narratives. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 92(9), 932–941. <https://doi.org/10.1136/JNNP-2021-326405>
- Romero-Sánchez, C. M., Díaz-Maroto, I., Fernández-Díaz, E., Sánchez-Larsen, Á., Layos-Romero, A., García-García, J., González, E., Redondo-Peñas, I., Perona-Moratalla, A. B., Del Valle-Pérez, J. A., Gracia-Gil, J., Rojas-Bartolomé, L., Feria-Vilar, I., Monteagudo, M., Palao, M., Palazón-García, E., Alcahut-Rodríguez, C., Sopelana-Garay, D., Moreno, Y., ... Segura, T. (2020). Neurologic manifestations in hospitalized patients with COVID-19. *Neurology*, 95(8), e1060–e1070. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000009937>
- Rosenberg, R., Johansson, M. A., Powers, A. M., & Miller, B. R. (2013). Search strategy has influenced the discovery rate of human viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(34), 13961–13964. [https://doi.org/10.1073/PNAS.1307243110/SUPPL\\_FILE/PNAS.201307243SI.PDF](https://doi.org/10.1073/PNAS.1307243110/SUPPL_FILE/PNAS.201307243SI.PDF)
- Rosenke, K., Meade-White, K., Letko, M., Clancy, C., Hansen, F., Liu, Y., Okumura, A., Tang-Huau, T. L., Li, R., Saturday, G., Feldmann, F., Scott, D., Wang, Z., Munster, V., Jarvis, M. A., & Feldmann, H.

- (2020). Defining the Syrian hamster as a highly susceptible preclinical model for SARS-CoV-2 infection. *Emerging Microbes & Infections*, 9(1), 2673–2684. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1858177>
- Rosser, E. C., Piper, C. J. M., Matei, D. E., Blair, P. A., Rendeiro, A. F., Orford, M., Alber, D. G., Krausgruber, T., Catalan, D., Klein, N., Manson, J. J., Drozdov, I., Bock, C., Wedderburn, L. R., Eaton, S., & Mauri, C. (2020). Microbiota-Derived Metabolites Suppress Arthritis by Amplifying Aryl-Hydrocarbon Receptor Activation in Regulatory B Cells. *Cell Metabolism*, 31(4), 837–851.e10. <https://doi.org/10.1016/J.CMET.2020.03.003>
- Ruan, Q., Yang, K., Wang, W., Jiang, L., & Song, J. (2020). Clinical predictors of mortality due to COVID-19 based on an analysis of data of 150 patients from Wuhan, China. *Intensive Care Medicine*, 46(5), 846–848. <https://doi.org/10.1007/S00134-020-05991-X>
- Rubin, R. (2020). As Their Numbers Grow, COVID-19 “Long Haulers” Stump Experts. *JAMA*, 324(14), 1381–1383. <https://doi.org/10.1001/JAMA.2020.17709>
- Saloner, B., Parish, K., Julie Ward, M. A., Grace DiLaura, R., & Sharon Dolovich, J. (2020). Persistent Symptoms in Patients After Acute COVID-19. *JAMA*, 324(6), 603–605. <https://doi.org/10.1001/JAMA.2020.12603>
- Salonia, A., Pontillo, M., Capogrosso, P., Gregori, S., Carenzi, C., Ferrara, A. M., Rowe, I., Boeri, L., Larcher, A., Ramirez, G. A., Tresoldi, C., Locatelli, M., Cavalli, G., Dagna, L., Castagna, A., Zangrillo, A., Tresoldi, M., Landoni, G., Rovere-Querini, P., ... Montorsi, F. (2022). Testosterone in males with COVID-19: A 7-month cohort study. *Andrology*, 10(1), 34–41. <https://doi.org/10.1111/ANDR.13097>
- Santos, R. A. S., Sampaio, W. O., Alzamora, A. C., Motta-Santos, D., Alenina, N., Bader, M., & Campagnole-Santo, M. J. (2018). The ACE2/Angiotensin-(1-7)/MAS Axis of the Renin-Angiotensin System: Focus on Angiotensin-(1-7). *Physiological Reviews*, 98(1), 505–553. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00023.2016>
- Sauve, F., Nampoothiri, S., Clarke, S. A., Fernandois, D., Ferreira Coêlho, C. F., Dewisme, J., Mills, E. G., Ternier, G., Cotellessa, L., Iglesias-Garcia, C., Mueller-Fielitz, H., Lebouvier, T., Perbet, R., Florent, V., Baroncini, M., Sharif, A., Ereño-Orbea, J., Mercado-Gómez, M., Palazon, A., ... Prevot, V. (2023). Long-COVID cognitive impairments and reproductive hormone deficits in men may stem from GnRH neuronal death. *EBioMedicine*, 96. <https://doi.org/10.1016/J.EBIOM.2023.104784>
- Schaeffer, S., & Iadecola, C. (2021). Revisiting the neurovascular unit. *Nature Neuroscience*, 24(9), 1198–1209. <https://doi.org/10.1038/S41593-021-00904-7>
- Schippers, K. J., & Nichols, S. A. (2014). Deep, dark secrets of melatonin in animal evolution. *Cell*, 159(1), 9–10. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.004>
- Schulte-Schrepping, J., Reusch, N., Paclik, D., Baßler, K., Schlickeiser, S., Zhang, B., Krämer, B., Krammer, T., Brumhard, S., Bonaguro, L., De Domenico, E., Wendisch, D., Grasshoff, M., Kapellos, T. S., Beckstette, M., Pecht, T., Saglam, A., Dietrich, O., Mei, H. E., ... Ziebuhr, J. (2020). Severe COVID-19 Is Marked by a Dysregulated Myeloid Cell Compartment. *Cell*, 182(6), 1419–1440.e23. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2020.08.001>
- Schulz, M., & Engelhardt, B. (2005). The circumventricular organs participate in the immunopathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cerebrospinal Fluid Research*, 2(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/1743-8454-2-8/FIGURES/9>
- Schwanzel-Fukuda, M., & Pfaff, D. W. (1989). Origin of luteinizing hormone-releasing hormone neurons. *Nature* 1989 338:6211, 338(6211), 161–164. <https://doi.org/10.1038/338161A0>

- Sekulic, M., Harper, H., Nezami, B. G., Shen, D. L., Sekulic, S. P., Koeth, A. T., Harding, C. V., Gilmore, H., & Sadri, N. (2020). Molecular Detection of SARS-CoV-2 Infection in FFPE Samples and Histopathologic Findings in Fatal SARS-CoV-2 Cases. *American Journal of Clinical Pathology*, *154*(2), 190–200. <https://doi.org/10.1093/AJCP/AQAA091>
- Scenio, V., Machelart, A., Robil, C., Benech, N., Hoffmann, E., Galbert, C., Deryuter, L., Heumel, S., Hantute-Ghesquier, A., Flourens, A., Brodin, P., Infanti, F., Richard, V., Dubuisson, J., Grangette, C., Sulpice, T., Wolowczuk, I., Pinet, F., Prévot, V., ... Trottein, F. (2022). Alteration of the gut microbiota following SARS-CoV-2 infection correlates with disease severity in hamsters. *Gut Microbes*, *14*(1). <https://doi.org/10.1080/19490976.2021.2018900>
- Shafiee, A., Aghajanian, S., Athar, M. M. T., & Gargari, O. K. (2022). Epstein–Barr virus and COVID-19. *Journal of Medical Virology*, *94*(9), 4040. <https://doi.org/10.1002/JMV.27823>
- Shaw, B. H., Stiles, L. E., Bourne, K., Green, E. A., Shibao, C. A., Okamoto, L. E., Garland, E. M., Gamboa, A., Diedrich, A., Raj, V., Sheldon, R. S., Biaggioni, I., Robertson, D., & Raj, S. R. (2019). The face of postural tachycardia syndrome – insights from a large cross-sectional online community-based survey. *Journal of Internal Medicine*, *286*(4), 438–448. <https://doi.org/10.1111/JOIM.12895>
- Shcherbak, S. G., Anisenkova, A. Y., Mosenko, S. V., Glotov, O. S., Chernov, A. N., Apalko, S. V., Urazov, S. P., Garbuzov, E. Y., Khobotnikov, D. N., Klitsenko, O. A., Minina, E. M., & Asaulenko, Z. P. (2021). Basic Predictive Risk Factors for Cytokine Storms in COVID-19 Patients. *Frontiers in Immunology*, *12*, 745515. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.745515/BIBTEX>
- Shneider, A., Kudriavtsev, A., & Vakhrusheva, A. (2020). Can melatonin reduce the severity of COVID-19 pandemic? *International Reviews of Immunology*, *39*(4), 153–162. <https://doi.org/10.1080/08830185.2020.1756284>
- Sia, S. F., Yan, L. M., Chin, A. W. H., Fung, K., Choy, K. T., Wong, A. Y. L., Kaewpreedee, P., Perera, R. A. P. M., Poon, L. L. M., Nicholls, J. M., Peiris, M., & Yen, H. L. (2020). Pathogenesis and transmission of SARS-CoV-2 in golden hamsters. *Nature*, *583*(7818), 834–838. <https://doi.org/10.1038/S41586-020-2342-5>
- Singh, D. K., Singh, B., Ganatra, S. R., Gazi, M., Cole, J., Thippeshappa, R., Alfson, K. J., Clemmons, E., Gonzalez, O., Escobedo, R., Lee, T. H., Chatterjee, A., Goetz-Gazi, Y., Sharan, R., Gough, M., Alvarez, C., Blakley, A., Ferdin, J., Bartley, C., ... Kaushal, D. (2021). Responses to acute infection with SARS-CoV-2 in the lungs of rhesus macaques, baboons and marmosets. *Nature Microbiology*, *6*(1), 73–86. <https://doi.org/10.1038/S41564-020-00841-4>
- Skendros, P., Mitsios, A., Chrysanthopoulou, A., Mastellos, D. C., Metallidis, S., Rafailidis, P., Ntinopoulou, M., Sertaridou, E., Tsironidou, V., Tsigalou, C., Tektonidou, M., Konstantinidis, T., Papagoras, C., Mitroulis, I., Germanidis, G., Lambris, J. D., & Ritis, K. (2020). Complement and tissue factor-enriched neutrophil extracellular traps are key drivers in COVID-19 immunothrombosis. *The Journal of Clinical Investigation*, *130*(11), 6151–6157. <https://doi.org/10.1172/JCI141374>
- Smith, J. T., Dungan, H. M., Stoll, E. A., Gottsch, M. L., Braun, R. E., Eacker, S. M., Clifton, D. K., & Steiner, R. A. (2005). Differential regulation of KiSS-1 mRNA expression by sex steroids in the brain of the male mouse. *Endocrinology*, *146*(7), 2976–2984. <https://doi.org/10.1210/EN.2005-0323>
- Snijder, E. J., Meer, Y. van der, Zevenhoven-Dobbe, J., Onderwater, J. J. M., Meulen, J. van der, Koerten, H. K., & Mommaas, A. M. (2006). Ultrastructure and Origin of Membrane Vesicles Associated with the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Replication Complex. *Journal of Virology*, *80*(12), 5927. <https://doi.org/10.1128/JVI.02501-05>

- Soh, J. H., Chan, H. M., & Ying, J. Y. (2020). Strategies for developing sensitive and specific nanoparticle-based lateral flow assays as point-of-care diagnostic device. *Nano Today*, *30*, 100831. <https://doi.org/10.1016/J.NANTOD.2019.100831>
- Solomon, I. H., Normandin, E., Bhattacharyya, S., Mukerji, S. S., Keller, K., Ali, A. S., Adams, G., Hornick, J. L., Padera, R. F., & Sabeti, P. (2020). Neuropathological Features of Covid-19. *New England Journal of Medicine*, *383*(10), 989–992. [https://doi.org/10.1056/NEJMC2019373/SUPPL\\_FILE/NEJMC2019373\\_DISCLOSURES.PDF](https://doi.org/10.1056/NEJMC2019373/SUPPL_FILE/NEJMC2019373_DISCLOSURES.PDF)
- Song, E., Zhang, C., Israelow, B., Lu-Culligan, A., Prado, A. V., Skriabine, S., Lu, P., Weizman, O. El, Liu, F., Dai, Y., Szigeti-Buck, K., Yasumoto, Y., Wang, G., Castaldi, C., Heltke, J., Ng, E., Wheeler, J., Alfajaro, M. M., Levavasseur, E., ... Iwasaki, A. (2021). Neuroinvasion of SARS-CoV-2 in human and mouse brain. *The Journal of Experimental Medicine*, *218*(3). <https://doi.org/10.1084/JEM.20202135>
- Sørensen, A. I. V., Spiliopoulos, L., Bager, P., Nielsen, N. M., Hansen, J. V., Koch, A., Meder, I. K., Ethelberg, S., & Hviid, A. (2022). A nationwide questionnaire study of post-acute symptoms and health problems after SARS-CoV-2 infection in Denmark. *Nature Communications* *2022 13:1*, *13*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31897-x>
- Soriano, J. B., Murthy, S., Marshall, J. C., Relan, P., & Diaz, J. V. (2022). A clinical case definition of post-COVID-19 condition by a Delphi consensus. *The Lancet. Infectious Diseases*, *22*(4), e102–e107. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(21\)00703-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(21)00703-9)
- Spergel, D. J., Krüth, U., Hanley, D. F., Sprengel, R., & Seeburg, P. H. (1999). GABA- and glutamate-activated channels in green fluorescent protein-tagged gonadotropin-releasing hormone neurons in transgenic mice. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *19*(6), 2037–2050. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-06-02037.1999>
- Spinicci, M., Graziani, L., Tilli, M., Nkurunziza, J., Vellere, I., Borchi, B., Mencarini, J., Campolmi, I., Gori, L., Giovannoni, L., Amato, C., Livi, L., Rasero, L., Fattirolli, F., Marcucci, R., Giusti, B., Olivetto, I., Tomassetti, S., Lavorini, F., ... Bartoloni, A. (2022). Infection with SARS-CoV-2 Variants Is Associated with Different Long COVID Phenotypes. *Viruses*, *14*(11). <https://doi.org/10.3390/V14112367>
- Spratt, D. I., Cox, P., Orav, J., Moloney, J., & Bigo, T. (1993). Reproductive axis suppression in acute illness is related to disease severity. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *76*(6), 1548–1554. <https://doi.org/10.1210/JCEM.76.6.8501163>
- Steardo, L., Steardo, L., & Scuderi, C. (2022). Astrocytes and the Psychiatric Sequelae of COVID-19: What We Learned from the Pandemic. *Neurochemical Research* *2022 48:4*, *48*(4), 1015–1025. <https://doi.org/10.1007/S11064-022-03709-7>
- Steardo, L., Steardo, L., Verkhatsky, A., & Scuderi, C. (2021). Post-COVID-19 neuropsychiatric syndrome: Is maladaptive glial recovery to blame? *Acta Physiologica (Oxford, England)*, *233*(2). <https://doi.org/10.1111/APHA.13717>
- Stein, S. R., Ramelli, S. C., Grazioli, A., Chung, J. Y., Singh, M., Yinda, C. K., Winkler, C. W., Sun, J., Dickey, J. M., Ylaya, K., Ko, S. H., Platt, A. P., Burbelo, P. D., Quezado, M., Pittaluga, S., Purcell, M., Munster, V. J., Belinky, F., Ramos-Benitez, M. J., ... Chertow, D. S. (2022). SARS-CoV-2 infection and persistence in the human body and brain at autopsy. *Nature*, *612*(7941), 758–763. <https://doi.org/10.1038/S41586-022-05542-Y>
- Steyn, F. J., Wan, Y., Clarkson, J., Veldhuis, J. D., Herbison, A. E., & Chen, C. (2013). Development of a methodology for and assessment of pulsatile luteinizing hormone secretion in juvenile and adult male mice. *Endocrinology*, *154*(12), 4939–4945. <https://doi.org/10.1210/EN.2013-1502>

- Strain, W. D., Sherwood, O., Banerjee, A., Van der Togt, V., Hishmeh, L., & Rossman, J. (2022). The Impact of COVID Vaccination on Symptoms of Long COVID: An International Survey of People with Lived Experience of Long COVID. *Vaccines*, *10*(5). <https://doi.org/10.3390/VACCINES10050652>
- Stratman, A. N., Malotte, K. M., Mahan, R. D., Davis, M. J., & Davis, G. E. (2009). Pericyte recruitment during vasculogenic tube assembly stimulates endothelial basement membrane matrix formation. *Blood*, *114*(24), 5091–5101. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2009-05-222364>
- Sun, J., Zhuang, Z., Zheng, J., Li, K., Wong, R. L. Y., Liu, D., Huang, J., He, J., Zhu, A., Zhao, J., Li, X., Xi, Y., Chen, R., Alshukairi, A. N., Chen, Z., Zhang, Z., Chen, C., Huang, X., Li, F., ... Zhao, J. (2020). Generation of a Broadly Useful Model for COVID-19 Pathogenesis, Vaccination, and Treatment. *Cell*, *182*(3), 734–743.e5. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2020.06.010>
- Sun, S. H., Chen, Q., Gu, H. J., Yang, G., Wang, Y. X., Huang, X. Y., Liu, S. S., Zhang, N. N., Li, X. F., Xiong, R., Guo, Y., Deng, Y. Q., Huang, W. J., Liu, Q., Liu, Q. M., Shen, Y. L., Zhou, Y., Yang, X., Zhao, T. Y., ... Wang, Y. C. (2020). A Mouse Model of SARS-CoV-2 Infection and Pathogenesis. *Cell Host and Microbe*, *28*(1), 124–133.e4. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.05.020>
- Su, Y., Yuan, D., Chen, D. G., Ng, R. H., Wang, K., Choi, J., Li, S., Hong, S., Zhang, R., Xie, J., Kornilov, S. A., Scherler, K., Pavlovitch-Bedzyk, A. J., Dong, S., Lausted, C., Lee, I., Fallen, S., Dai, C. L., Baloni, P., ... Heath, J. R. (2022). Multiple early factors anticipate post-acute COVID-19 sequelae. *Cell*, *185*(5), 881–895.e20. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2022.01.014/ATTACHMENT/A9DD3624-454F-43DF-BAC6-50782B7A4E9F/MMC7.XLSX>
- Swank, Z., Senussi, Y., Manickas-Hill, Z., Yu, X. G., Li, J. Z., Alter, G., & Walt, D. R. (2023). Persistent Circulating Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Spike Is Associated With Post-acute Coronavirus Disease 2019 Sequelae. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, *76*(3), E487–E490. <https://doi.org/10.1093/CID/CIAC722>
- Tan, D., Reiter, R., Manchester, L., Yan, M., El-Sawi, M., Sainz, R., Mayo, J., Kohen, R., Allegra, M., & Hardelan, R. (2002). Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, *2*(2), 181–197. <https://doi.org/10.2174/1568026023394443>
- Tang, M., Park, S. H., Petri, S., Yu, H., Rueda, C. B., Dale Abel, E., Kim, C. Y., Hillman, E. M. C., Li, F., Lee, Y., Ding, L., Jagadish, S., Frankel, W. N., de Vivo, D. C., & Monani, U. R. (2021). An early endothelial cell-specific requirement for Glut1 is revealed in Glut1 deficiency syndrome model mice. *JCI Insight*, *6*(3). <https://doi.org/10.1172/JCI.INSIGHT.145789>
- Taquet, M., Sillett, R., Zhu, L., Mendel, J., Camplisson, I., Dercon, Q., & Harrison, P. J. (2022). Neurological and psychiatric risk trajectories after SARS-CoV-2 infection: an analysis of 2-year retrospective cohort studies including 1 284 437 patients. *The Lancet. Psychiatry*, *9*(10), 815–827. [https://doi.org/10.1016/S2215-0366\(22\)00260-7](https://doi.org/10.1016/S2215-0366(22)00260-7)
- Temmam, S., Montagutelli, X., Herate, C., Donati, F., Regnault, B., Attia, M., Baquero Salazar, E., Chretien, D., Conquet, L., Jouvion, G., Pipoli Da Fonseca, J., Cokelaer, T., Amara, F., Relouzat, F., Naninck, T., Lemaitre, J., Derreudre-Bosquet, N., Pascal, Q., Bonomi, M., ... Eloit, M. (2023). SARS-CoV-2-related bat virus behavior in human-relevant models sheds light on the origin of COVID-19. *EMBO Reports*, *24*(4). <https://doi.org/10.15252/EMBR.202256055>
- Thakur, K. T., Miller, E. H., Glendinning, M. D., Al-Dalahmah, O., Banu, M. A., Boehme, A. K., Boubour, A. L., Bruce, S. S., Chong, A. M., Claassen, J., Faust, P. L., Hargus, G., Hickman, R. A., Jambawalikar, S., Khandji, A. G., Kim, C. Y., Klein, R. S., Lignelli-Dipple, A., Lin, C. C., ... Canoll, P. (2021). COVID-19 neuropathology at Columbia University Irving Medical Center/New York Presbyterian

Hospital. *Brain: A Journal of Neurology*, 144(9), 2696–2708. <https://doi.org/10.1093/BRAIN/AWAB148>

- Tran, V.-T., Perrodeau, E., Saldanha, J., Pane, I., & Ravaud, P. (2023). Efficacy of first dose of covid-19 vaccine versus no vaccination on symptoms of patients with long covid: target trial emulation based on ComPaRe e-cohort. *BMJ Medicine*, 2(1), e000229. <https://doi.org/10.1136/BMJMED-2022-000229>
- Urano, E., Okamura, T., Ono, C., Ueno, S., Nagata, S., Kamada, H., Higuchi, M., Furukawa, M., Kamitani, W., Matsuura, Y., Kawaoka, Y., & Yasutomi, Y. (2021). COVID-19 cynomolgus macaque model reflecting human COVID-19 pathological conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(43), e2104847118. [https://doi.org/10.1073/PNAS.2104847118/SUPPL\\_FILE/PNAS.2104847118.SAPP.PDF](https://doi.org/10.1073/PNAS.2104847118/SUPPL_FILE/PNAS.2104847118.SAPP.PDF)
- Urata, Y., Honma, S., Goto, S., Todoroki, S., Iida, T., Cho, S., Honma, K., & Kondo, T. (1999). Melatonin induces gamma-glutamylcysteine synthetase mediated by activator protein-1 in human vascular endothelial cells. *Free Radical Biology & Medicine*, 27(7–8), 838–847. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(99\)00131-8](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(99)00131-8)
- Valdez, A. R., Hancock, E. E., Adebayo, S., Kiernicki, D. J., Proskauer, D., Attewell, J. R., Bateman, L., DeMaria, A., Lapp, C. W., Rowe, P. C., & Proskauer, C. (2019). Estimating Prevalence, Demographics, and Costs of ME/CFS Using Large Scale Medical Claims Data and Machine Learning. *Frontiers in Pediatrics*, 6(JAN). <https://doi.org/10.3389/FPED.2018.00412>
- Vanacker, C., Trova, S., Shruti, S., Casoni, F., Messina, A., Croizier, S., Malone, S., Ternier, G., Hanchate, N. K., Rasika, S., Bouret, S. G., Ciofi, P., Giacobini, P., & Prevot, V. (2020). Neuropeptide Y expression in GnRH neurons regulates prepubertal weight gain and sexual attraction. *The EMBO Journal*, 39(19). <https://doi.org/10.15252/EMBJ.2020104633>
- Verkhatsky, A., & Nedergaard, M. (2018). Physiology of astroglia. *Physiological Reviews*, 98(1), 239–389. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00042.2016/ASSET/IMAGES/LARGE/Z9J0041728140034.JPEG>
- Verma, A. K., Zheng, J., Meyerholz, D. K., & Perlman, S. (2022). SARS-CoV-2 infection of sustentacular cells disrupts olfactory signaling pathways. *JCI Insight*, 7(24). <https://doi.org/10.1172/JCI.INSIGHT.160277>
- Villadiego, J., García-Arriaza, J., Ramírez-Lorca, R., García-Swinburn, R., Cabello-Rivera, D., Rosales-Nieves, A. E., Álvarez-Vergara, M. I., Cala-Fernández, F., García-Roldán, E., López-Ogáyar, J. L., Zamora, C., Astorgano, D., Albericio, G., Pérez, P., Muñoz-Cabello, A. M., Pascual, A., Esteban, M., López-Barneo, J., & Toledo-Aral, J. J. (2023). Full protection from SARS-CoV-2 brain infection and damage in susceptible transgenic mice conferred by MVA-CoV2-S vaccine candidate. *Nature Neuroscience* 2023 26:2, 26(2), 226–238. <https://doi.org/10.1038/s41593-022-01242-y>
- Von Bartheld, C. S., Butowt, R., & Hagen, M. M. (2020). Prevalence of Chemosensory Dysfunction in COVID-19 Patients: A Systematic Review and Meta-analysis Reveals Significant Ethnic Differences. *ACS Chemical Neuroscience*, 11(19), 2944. <https://doi.org/10.1021/ACSCHEMNEURO.0C00460>
- Von Bartheld, C. S., Hagen, M. M., & Butowt, R. (2021). The D614G Virus Mutation Enhances Anosmia in COVID-19 Patients: Evidence from a Systematic Review and Meta-analysis of Studies from South Asia. *ACS Chemical Neuroscience*, 12(19), 3535–3549. [https://doi.org/10.1021/ACSCHEMNEURO.1C00542/SUPPL\\_FILE/CN1C00542\\_SI\\_003.PDF](https://doi.org/10.1021/ACSCHEMNEURO.1C00542/SUPPL_FILE/CN1C00542_SI_003.PDF)
- Wälchli, T., Bisschop, J., Carmeliet, P., Zadeh, G., Monnier, P. P., De Bock, K., & Radovanovic, I. (2023). Shaping the brain vasculature in development and disease in the single-cell era. *Nature Reviews Neuroscience* 2023 24:5, 24(5), 271–298. <https://doi.org/10.1038/s41583-023-00684-y>

- Wallukat, G., Hohberger, B., Wenzel, K., Fürst, J., Schulze-Rothe, S., Wallukat, A., Hönicke, A. S., & Müller, J. (2021). Functional autoantibodies against G-protein coupled receptors in patients with persistent Long-COVID-19 symptoms. *Journal of Translational Autoimmunity*, 4. <https://doi.org/10.1016/J.JTAUTO.2021.100100>
- Wanga, V., Gerdes, M. E., Shi, D. S., Choudhary, R., Dulski, T. M., Hsu, S., Idubor, O. I., Webber, B. J., Wendel, A. M., Agathis, N. T., Anderson, K., Boyles, T., Chiu, S. K., Click, E. S., Da Silva, J., Dupont, H., Evans, M., Gold, J. A. W., Haston, J., ... Siegel, D. A. (2021). Characteristics and Clinical Outcomes of Children and Adolescents Aged. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, 70(5152), 1766–1772. <https://doi.org/10.15585/MMWR.MM705152A3>
- Wang, F., Nie, J., Wang, H., Zhao, Q., Xiong, Y., Deng, L., Song, S., Ma, Z., Mo, P., & Zhang, Y. (2020). Characteristics of Peripheral Lymphocyte Subset Alteration in COVID-19 Pneumonia. *The Journal of Infectious Diseases*, 221(11), 1762–1769. <https://doi.org/10.1093/INFDIS/JIAA150>
- Wang, K., Chen, W., Zhang, Z., Deng, Y., Lian, J. Q., Du, P., Wei, D., Zhang, Y., Sun, X. X., Gong, L., Yang, X., He, L., Zhang, L., Yang, Z., Geng, J. J., Chen, R., Zhang, H., Wang, B., Zhu, Y. M., ... Chen, Z. N. (2020). CD147-spike protein is a novel route for SARS-CoV-2 infection to host cells. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/S41392-020-00426-X>
- Waseem, M., Tabassum, H., & Parvez, S. (2016). Neuroprotective effects of melatonin as evidenced by abrogation of oxaliplatin induced behavioral alterations, mitochondrial dysfunction and neurotoxicity in rat brain. *Mitochondrion*, 30, 168–176. <https://doi.org/10.1016/J.MITO.2016.08.001>
- Weaver, D. R., & Reppert, S. M. (1996). The Mella melatonin receptor gene is expressed in human suprachiasmatic nuclei. *Neuroreport*, 8(1), 109–112. <https://doi.org/10.1097/00001756-199612200-00022>
- Wenzel, J., Lampe, J., Müller-Fielitz, H., Schuster, R., Zille, M., Müller, K., Krohn, M., Körbelin, J., Zhang, L., Özorhan, Ü., Neve, V., Wagner, J. U. G., Bojkova, D., Shumliakivska, M., Jiang, Y., Fähnrich, A., Ott, F., Sencio, V., Robil, C., ... Schwaninger, M. (2021). The SARS-CoV-2 main protease Mpro causes microvascular brain pathology by cleaving NEMO in brain endothelial cells. *Nature Neuroscience*, 24(11), 1522–1533. <https://doi.org/10.1038/s41593-021-00926-1>
- Westblade, L. F., Simon, M. S., & Satlin, M. J. (2021). Bacterial Coinfections in Coronavirus Disease 2019. *Trends in Microbiology*, 29(10), 930–941. <https://doi.org/10.1016/J.TIM.2021.03.018>
- Whitaker, M., Elliott, J., Chadeau-Hyam, M., Riley, S., Darzi, A., Cooke, G., Ward, H., & Elliott, P. (2022). Persistent COVID-19 symptoms in a community study of 606,434 people in England. *Nature Communications*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/S41467-022-29521-Z>
- Winkler, E. S., Bailey, A. L., Kafai, N. M., Nair, S., McCune, B. T., Yu, J., Fox, J. M., Chen, R. E., Earnest, J. T., Keeler, S. P., Ritter, J. H., Kang, L. I., Dort, S., Robichaud, A., Head, R., Holtzman, M. J., & Diamond, M. S. (2020). SARS-CoV-2 infection of human ACE2-transgenic mice causes severe lung inflammation and impaired function. *Nature Immunology* 2020 21:11, 21(11), 1327–1335. <https://doi.org/10.1038/s41590-020-0778-2>
- Wong, A. K. H., Woodhouse, I., Schneider, F., Kulpa, D. A., Silvestri, G., & Maier, C. L. (2021). Broad auto-reactive IgM responses are common in critically ill patients, including those with COVID-19. *Cell Reports. Medicine*, 2(6). <https://doi.org/10.1016/J.XCRM.2021.100321>
- Woolley, B. (2021). The COVID-19 conundrum: Where both the virus and treatment contribute to delirium. *Geriatric Nursing (New York, N.Y.)*, 42(4), 955–958. <https://doi.org/10.1016/J.GERINURSE.2021.04.018>

- Woolsey, C., Borisevich, V., Prasad, A. N., Agans, K. N., Deer, D. J., Dobias, N. S., Heymann, J. C., Foster, S. L., Levine, C. B., Medina, L., Melody, K., Geisbert, J. B., Fenton, K. A., Geisbert, T. W., & Cross, R. W. (2021). Establishment of an African green monkey model for COVID-19 and protection against re-infection. *Nature Immunology*, 22(1), 86–98. <https://doi.org/10.1038/S41590-020-00835-8>
- Woo, P. C. Y., Lau, S. K. P., Chu, C., Chan, K., Tsoi, H., Huang, Y., Wong, B. H. L., Poon, R. W. S., Cai, J. J., Luk, W., Poon, L. L. M., Wong, S. S. Y., Guan, Y., Peiris, J. S. M., & Yuen, K. (2005). Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. *Journal of Virology*, 79(2), 884–895. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.2.884-895.2005>
- Wray, S., Grant, P., & Gainer, H. (1989a). Evidence that cells expressing luteinizing hormone-releasing hormone mRNA in the mouse are derived from progenitor cells in the olfactory placode. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(20), 8132–8136. <https://doi.org/10.1073/PNAS.86.20.8132>
- Wray, S., Grant, P., & Gainer, H. (1989b). Evidence that cells expressing luteinizing hormone-releasing hormone mRNA in the mouse are derived from progenitor cells in the olfactory placode. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(20), 8132–8136. <https://doi.org/10.1073/PNAS.86.20.8132>
- Wu, F., Zhao, S., Yu, B., Chen, Y. M., Wang, W., Song, Z. G., Hu, Y., Tao, Z. W., Tian, J. H., Pei, Y. Y., Yuan, M. L., Zhang, Y. L., Dai, F. H., Liu, Y., Wang, Q. M., Zheng, J. J., Xu, L., Holmes, E. C., & Zhang, Y. Z. (2020). A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*, 579(7798), 265–269. <https://doi.org/10.1038/S41586-020-2008-3>
- Wu, P., Chen, D., Ding, W., Wu, P., Hou, H., Bai, Y., Zhou, Y., Li, K., Xiang, S., Liu, P., Ju, J., Guo, E., Liu, J., Yang, B., Fan, J., He, L., Sun, Z., Feng, L., Wang, J., ... Chen, G. (2021). The trans-omics landscape of COVID-19. *Nature Communications* 2021 12:1, 12(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24482-1>
- Wu, Y., Guo, C., Tang, L., Hong, Z., Zhou, J., Dong, X., Yin, H., Xiao, Q., Tang, Y., Qu, X., Kuang, L., Fang, X., Mishra, N., Lu, J., Shan, H., Jiang, G., & Huang, X. (2020). Prolonged presence of SARS-CoV-2 viral RNA in faecal samples. *The Lancet. Gastroenterology & Hepatology*, 5(5), 434–435. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(20\)30083-2](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(20)30083-2)
- Wu, Z., Yang, L., Ren, X., Zhang, J., Yang, F., Zhang, S., & Jin, Q. (2016). ORF8-Related Genetic Evidence for Chinese Horseshoe Bats as the Source of Human Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus. *The Journal of Infectious Diseases*, 213(4), 579–583. <https://doi.org/10.1093/INFDIS/JIV476>
- Xiao, B. G., Diab, A., Zhu, J., Van Der Meide, P., & Link, H. (1998). Astrocytes induce hyporesponses of myelin basic protein-reactive T and B cell function. *Journal of Neuroimmunology*, 89(1–2), 113–121. [https://doi.org/10.1016/S0165-5728\(98\)00123-4](https://doi.org/10.1016/S0165-5728(98)00123-4)
- Xie, Y., Xu, E., Bowe, B., & Al-Aly, Z. (2022). Long-term cardiovascular outcomes of COVID-19. *Nature Medicine* 2022 28:3, 28(3), 583–590. <https://doi.org/10.1038/s41591-022-01689-3>
- Xie, Z., Chen, F., Li, W. A., Geng, X., Li, C., Meng, X., Feng, Y., Liu, W., & Yu, F. (2017). A review of sleep disorders and melatonin. *Neurological Research*, 39(6), 559–565. <https://doi.org/10.1080/01616412.2017.1315864>
- Xu, E., Xie, Y., & Al-Aly, Z. (2022). Long-term neurologic outcomes of COVID-19. *Nature Medicine* 2022 28:11, 28(11), 2406–2415. <https://doi.org/10.1038/s41591-022-02001-z>

- Xu, P., Wang, J., Hong, F., Wang, S., Jin, X., Xue, T., Jia, L., & Zhai, Y. (2017). Melatonin prevents obesity through modulation of gut microbiota in mice. *Journal of Pineal Research*, 62(4). <https://doi.org/10.1111/JPI.12399>
- Yamamoto, Y., Otsuka, Y., Sunada, N., Tokumasu, K., Nakano, Y., Honda, H., Sakurada, Y., Hagiya, H., Hanayama, Y., & Otsuka, F. (2022). Detection of Male Hypogonadism in Patients with Post COVID-19 Condition. *Journal of Clinical Medicine*, 11(7), 11. <https://doi.org/10.3390/JCM11071955>
- Yang, L., Xie, X., Tu, Z., Fu, J., Xu, D., & Zhou, Y. (2021). The signal pathways and treatment of cytokine storm in COVID-19. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/S41392-021-00679-0>
- Yang, X.-H., Deng, W., Tong, Z., Liu, Y.-X., Zhang, L.-F., Zhu, H., Gao, H., Huang, L., Liu, Y.-L., Ma, C.-M., Xu, Y.-F., Ding, M.-X., Deng, H.-K., & Qin, C. (2007). Mice transgenic for human angiotensin-converting enzyme 2 provide a model for SARS coronavirus infection. *Ingentaconnect.ComX Yang, W Deng, Z Tong, Y Liu, L Zhang, H Zhu, H Gao, L Huang, Y Liu, C Ma, Y Xu, M Ding Comparative Medicine*, 2007•ingentaconnect.Com. <https://www.ingentaconnect.com/content/aalas/cm/2007/00000057/00000005/art00003>
- Yang, X., Yu, Y., Xu, J., Shu, H., Xia, J., Liu, H., Wu, Y., Zhang, L., Yu, Z., Fang, M., Yu, T., Wang, Y., Pan, S., Zou, X., Yuan, S., & Shang, Y. (2020). Clinical course and outcomes of critically ill patients with SARS-CoV-2 pneumonia in Wuhan, China: a single-centered, retrospective, observational study. *The Lancet. Respiratory Medicine*, 8(5), 475–481. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(20\)30079-5](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30079-5)
- Yinda, C. K., Port, J. R., Bushmaker, T., Owusu, I. O., Purushotham, J. N., Avanzato, V. A., Fischer, R. J., Schulz, J. E., Holbrook, M. G., Hebner, M. J., Rosenke, R., Thomas, T., Marzi, A., Best, S. M., de Wit, E., Shaia, C., van Doremalen, N., & Munster, V. J. (2021). K18-hACE2 mice develop respiratory disease resembling severe COVID-19. *PLoS Pathogens*, 17(1). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1009195>
- Yin, X., Riva, L., Pu, Y., Martin-Sancho, L., Kanamune, J., Yamamoto, Y., Sakai, K., Gotoh, S., Miorin, L., De Jesus, P. D., Yang, C. C., Herbert, K. M., Yoh, S., Hultquist, J. F., García-Sastre, A., & Chanda, S. K. (2021). MDA5 Governs the Innate Immune Response to SARS-CoV-2 in Lung Epithelial Cells. *Cell Reports*, 34(2). <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2020.108628>
- Yuan, K., Gong, Y. M., Liu, L., Sun, Y. K., Tian, S. S., Wang, Y. J., Zhong, Y., Zhang, A. Y., Su, S. Z., Liu, X. X., Zhang, Y. X., Lin, X., Shi, L., Yan, W., Fazel, S., Vitiello, M. V., Bryant, R. A., Zhou, X. Y., Ran, M. S., ... Lu, L. (2021). Prevalence of posttraumatic stress disorder after infectious disease pandemics in the twenty-first century, including COVID-19: a meta-analysis and systematic review. *Molecular Psychiatry* 2021 26:9, 26(9), 4982–4998. <https://doi.org/10.1038/s41380-021-01036-x>
- Yüce, M., Filiztekin, E., & Özkaya, K. G. (2021). COVID-19 diagnosis -A review of current methods. *Biosensors & Bioelectronics*, 172. <https://doi.org/10.1016/J.BIOS.2020.112752>
- Yu, H., Dickson, E. J., Jung, S. R., Koh, D. S., & Hille, B. (2016). High membrane permeability for melatonin. *Journal of General Physiology*, 147(1), 63–76. <https://doi.org/10.1085/JGP.201511526>
- Zandi, M., Soltani, S., & Hosseini, P. (2021). Role of hemagglutinin esterase in replication of SARS-CoV-2. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 25(10), 1. <https://doi.org/10.1080/14728222.2021.1999417>
- Zee, P. C., Wang-Weigand, S., Wright, K. P., Peng, X., & Roth, T. (2010). Effects of ramelteon on insomnia symptoms induced by rapid, eastward travel. *Sleep Medicine*, 11(6), 525–533. <https://doi.org/10.1016/J.SLEEP.2010.03.010>
- Zeng, N., Zhao, Y. M., Yan, W., Li, C., Lu, Q. D., Liu, L., Ni, S. Y., Mei, H., Yuan, K., Shi, L., Li, P., Fan, T. T., Yuan, J. L., Vitiello, M. V., Kosten, T., Kondratiuk, A. L., Sun, H. Q., Tang, X. D., Liu, M. Y.,

- ... Lu, L. (2022). A systematic review and meta-analysis of long term physical and mental sequelae of COVID-19 pandemic: call for research priority and action. *Molecular Psychiatry* 2022 28:1,28(1),423–433. <https://doi.org/10.1038/s41380-022-01614-7>
- Zhai, M., Li, B., Duan, W., Jing, L., Zhang, B., Zhang, M., Yu, L., Liu, Z., Yu, B., Ren, K., Gao, E., Yang, Y., Liang, H., Jin, Z., & Yu, S. (2017). Melatonin ameliorates myocardial ischemia reperfusion injury through SIRT3-dependent regulation of oxidative stress and apoptosis. *Journal of Pineal Research*, 63(2). <https://doi.org/10.1111/JPI.12419>
- Zhang, A. J., Lee, A. C. Y., Chu, H., Chan, J. F. W., Fan, Z., Li, C., Liu, F., Chen, Y., Yuan, S., Poon, V. K. M., Chan, C. C. S., Cai, J. P., Wu, K. L. K., Sridhar, S., Chan, Y. S., & Yuen, K. Y. (2021). Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Infects and Damages the Mature and Immature Olfactory Sensory Neurons of Hamsters. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 73(2), E503–E512. <https://doi.org/10.1093/CID/CIAA995>
- Zhao, D., Yu, Y., Shen, Y., Liu, Q., Zhao, Z., Sharma, R., & Reiter, R. J. (2019). Melatonin synthesis and function: Evolutionary history in animals and plants. *Frontiers in Endocrinology*, 10(APR), 441357. <https://doi.org/10.3389/FENDO.2019.00249/BIBTEX>
- Zhdanova, I. V., Wurtman, R. J., Morabito, C., Piotrowska, V. R., & Lynch, H. J. (1996). Effects of low oral doses of melatonin, given 2-4 hours before habitual bedtime, on sleep in normal young humans. *Sleep*, 19(5), 423–431. <https://doi.org/10.1093/SLEEP/19.5.423>
- Zheng, J., Wong, L. Y. R., Li, K., Verma, A. K., Ortiz, M. E., Wohlford-Lenane, C., Leidinger, M. R., Knudson, C. M., Meyerholz, D. K., McCray, P. B., & Perlman, S. (2021). COVID-19 treatments and pathogenesis including anosmia in K18-hACE2 mice. *Nature*, 589(7843), 603–607. <https://doi.org/10.1038/S41586-020-2943-Z>
- Zheng, M., Karki, R., Williams, E. P., Yang, D., Fitzpatrick, E., Vogel, P., Jonsson, C. B., & Kanneganti, T. D. (2021). TLR2 senses the SARS-CoV-2 envelope protein to produce inflammatory cytokines. *Nature Immunology* 2021 22:7, 22(7), 829–838. <https://doi.org/10.1038/s41590-021-00937-x>
- Zhou, B., Thao, T. T. N., Hoffmann, D., Taddeo, A., Ebert, N., Labroussaa, F., Pohlmann, A., King, J., Steiner, S., Kelly, J. N., Portmann, J., Halwe, N. J., Ulrich, L., Trüeb, B. S., Fan, X., Hoffmann, B., Wang, L., Thomann, L., Lin, X., ... Beer, M. (2021). SARS-CoV-2 spike D614G change enhances replication and transmission. *Nature*, 592(7852), 122–127. <https://doi.org/10.1038/S41586-021-03361-1>
- Zhou, Y., Hou, Y., Shen, J., Huang, Y., Martin, W., & Cheng, F. (2020). Network-based drug repurposing for novel coronavirus 2019-nCoV/SARS-CoV-2. *Cell Discovery*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/S41421-020-0153-3>
- Zhu, N., Zhang, D., Wang, W., Li, X., Yang, B., Song, J., Zhao, X., Huang, B., Shi, W., Lu, R., Niu, P., Zhan, F., Ma, X., Wang, D., Xu, W., Wu, G., Gao, G. F., & Tan, W. (2020). A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *The New England Journal of Medicine*, 382(8), 727–733. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA2001017>
- Zimmermann, R. C., McDougale, C. J., Schumacher, M., Olcese, J., Mason, J. W., Heninger, G. R., & Price, L. H. (1993). Effects of acute tryptophan depletion on nocturnal melatonin secretion in humans. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 76(5), 1160–1164. <https://doi.org/10.1210/JCEM.76.5.8496306>
- Zollner, A., Koch, R., Jukic, A., Pfister, A., Meyer, M., Rössler, A., Kimpel, J., Adolph, T. E., & Tilg, H. (2022). Postacute COVID-19 is Characterized by Gut Viral Antigen Persistence in Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology*, 163(2), 495. <https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2022.04.037>

- Zonneville, J., Safina, A., Truskinovsky, A. M., Arteaga, C. L., & Bakin, A. V. (2018). TGF- $\beta$  signaling promotes tumor vasculature by enhancing the pericyte-endothelium association. *BMC Cancer*, *18*(1). <https://doi.org/10.1186/S12885-018-4587-Z>
- Zuo, T., Zhang, F., Lui, G. C. Y., Yeoh, Y. K., Li, A. Y. L., Zhan, H., Wan, Y., Chung, A. C. K., Cheung, C. P., Chen, N., Lai, C. K. C., Chen, Z., Tso, E. Y. K., Fung, K. S. C., Chan, V., Ling, L., Joynt, G., Hui, D. S. C., Chan, F. K. L., ... Ng, S. C. (2020). Alterations in Gut Microbiota of Patients With COVID-19 During Time of Hospitalization. *Gastroenterology*, *159*(3), 944-955.e8. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.05.048>
- Zupin, L., Pascolo, L., Zito, G., Ricci, G., & Crovella, S. (2020). SARS-CoV-2 and the next generations: which impact on reproductive tissues? *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, *37*(10), 2399–2403. <https://doi.org/10.1007/S10815-020-01917-0/FIGURES/1>

# **ANNEXE 1**



OPEN

# The SARS-CoV-2 main protease M<sup>pro</sup> causes microvascular brain pathology by cleaving NEMO in brain endothelial cells

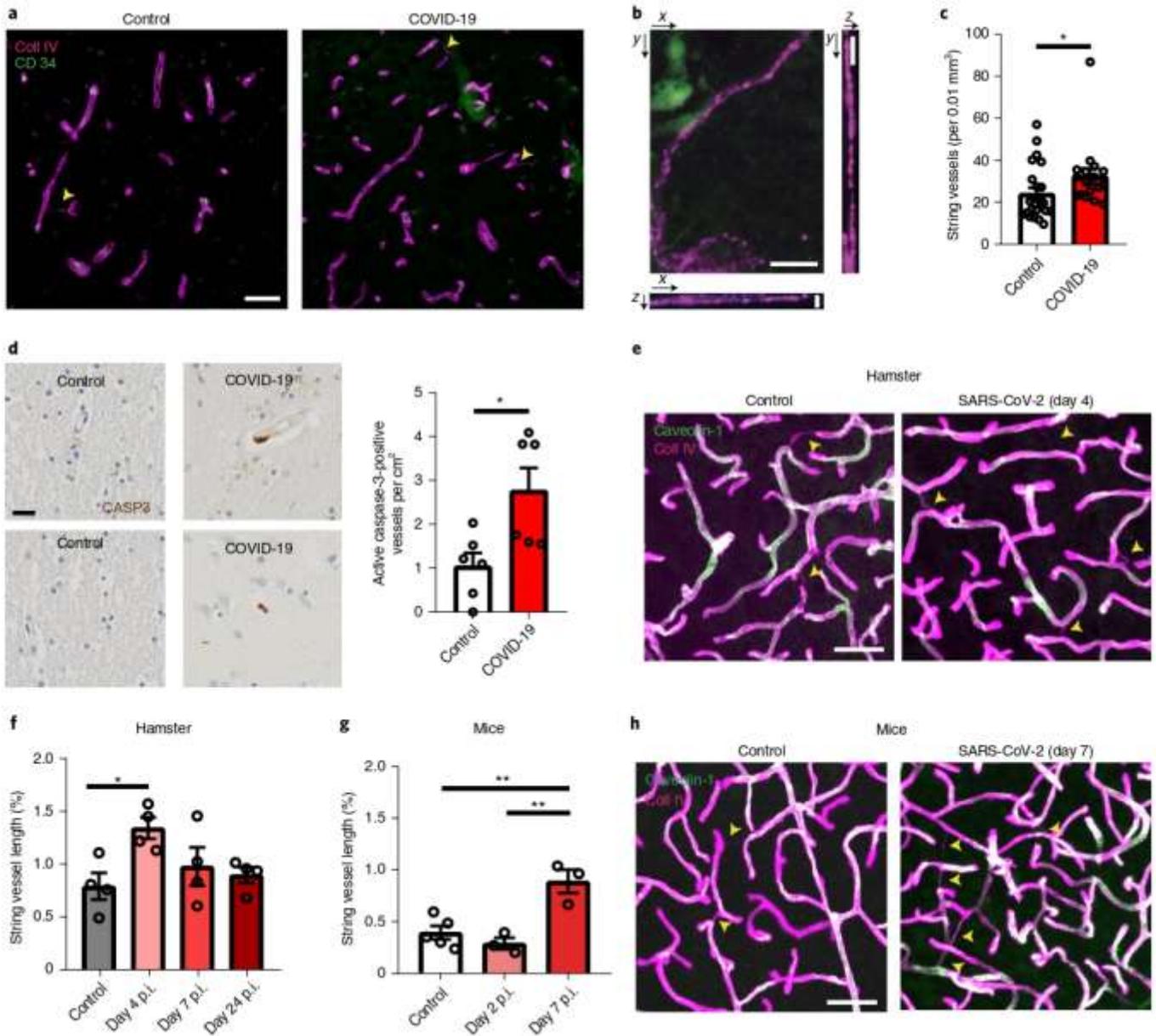
Jan Wenzel<sup>1,2,24</sup>, Josephine Lampe<sup>1,2,24</sup>, Helge Müller-Fielitz<sup>1,24</sup>, Raphael Schuster<sup>1</sup>, Marietta Zille<sup>1,2</sup>, Kristin Müller<sup>1</sup>, Markus Krohn<sup>1,2</sup>, Jakob Körbelin<sup>3</sup>, Linlin Zhang<sup>4,5</sup>, Ümit Özorhan<sup>1,2</sup>, Vanessa Neve<sup>1</sup>, Julian U. G. Wagner<sup>2,6</sup>, Denisa Bojkova<sup>7</sup>, Mariana Shumliakivska<sup>6</sup>, Yun Jiang<sup>1</sup>, Anke Fähnrich<sup>8,9</sup>, Fabian Ott<sup>8,9</sup>, Valentin Sencio<sup>10</sup>, Cyril Robil<sup>10</sup>, Susanne Pfefferle<sup>11</sup>, Florent Sauve<sup>12</sup>, Caio Fernando Ferreira Coêlho<sup>12</sup>, Jonas Franz<sup>13,14,15</sup>, Frauke Spiecker<sup>1</sup>, Beate Lembrich<sup>1</sup>, Sonja Binder<sup>1</sup>, Nina Feller<sup>1,2</sup>, Peter König<sup>16,17</sup>, Hauke Busch<sup>8,9</sup>, Ludovic Collin<sup>18</sup>, Roberto Villaseñor<sup>18</sup>, Olaf Jöhren<sup>1</sup>, Hermann C. Altmepfen<sup>19</sup>, Manolis Pasparakis<sup>20</sup>, Stefanie Dimmeler<sup>2,6</sup>, Jindrich Cinatl<sup>7</sup>, Klaus Püschel<sup>21</sup>, Matija Zelic<sup>22</sup>, Dimitry Ofengeim<sup>22</sup>, Christine Stadelmann<sup>13</sup>, François Trottein<sup>10</sup>, Ruben Nogueiras<sup>23</sup>, Rolf Hilgenfeld<sup>4,5</sup>, Markus Glatzel<sup>19</sup>, Vincent Prevot<sup>12</sup> and Markus Schwaninger<sup>1,2</sup>✉

**Coronavirus disease 2019 (COVID-19) can damage cerebral small vessels and cause neurological symptoms. Here we describe structural changes in cerebral small vessels of patients with COVID-19 and elucidate potential mechanisms underlying the vascular pathology. In brains of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2)-infected individuals and animal models, we found an increased number of empty basement membrane tubes, so-called string vessels representing remnants of lost capillaries. We obtained evidence that brain endothelial cells are infected and that the main protease of SARS-CoV-2 (M<sup>pro</sup>) cleaves NEMO, the essential modulator of nuclear factor- $\kappa$ B. By ablating NEMO, M<sup>pro</sup> induces the death of human brain endothelial cells and the occurrence of string vessels in mice. Deletion of receptor-interacting protein kinase (RIPK) 3, a mediator of regulated cell death, blocks the vessel rarefaction and disruption of the blood-brain barrier due to NEMO ablation. Importantly, a pharmacological inhibitor of RIPK signaling prevented the M<sup>pro</sup>-induced microvascular pathology. Our data suggest RIPK as a potential therapeutic target to treat the neuropathology of COVID-19.**

In December 2019, the newly discovered SARS-CoV-2 virus emerged and was identified as the causative agent of COVID-19. Within a few months, COVID-19 developed into a pandemic with millions of people infected worldwide and a high death load. Symptoms typically originate from the respiratory tract; however, in many patients, other organ systems are involved, causing symptoms

that are not secondary to respiratory failure or the severe systemic inflammation due to pneumonia. A considerable proportion of patients, up to 84% of those with severe COVID-19, show neurological signs and symptoms including anosmia, epileptic seizures, strokes, loss of consciousness and confusion<sup>1–3</sup>. Typically, COVID-19 can present with the clinical picture of encephalopathy<sup>2</sup>. Beyond

<sup>1</sup>Institute for Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology, Center of Brain, Behavior and Metabolism (CBBM), University of Lübeck, Lübeck, Germany. <sup>2</sup>DZHK (German Research Centre for Cardiovascular Research), Hamburg-Lübeck-Kiel and Frankfurt, Germany. <sup>3</sup>Department of Oncology, Hematology & Bone Marrow Transplantation, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany. <sup>4</sup>Institute of Molecular Medicine, University of Lübeck, Lübeck, Germany. <sup>5</sup>German Center for Infection Research (DZIF), partner site Hamburg-Lübeck-Borstel-Riems, Lübeck, Germany. <sup>6</sup>Institute for Cardiovascular Regeneration, Cardiopulmonary Institute (CPI), University Frankfurt, Frankfurt, Germany. <sup>7</sup>Institute of Medical Virology, University Frankfurt, Frankfurt, Germany. <sup>8</sup>Institute of Experimental Dermatology, University of Lübeck, Lübeck, Germany. <sup>9</sup>Institute for Cardiogenetics, University of Lübeck, Lübeck, Germany. <sup>10</sup>Centre d'Infection et d'Immunité de Lille, Inserm U1019, CNRS UMR 9017, University of Lille, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, Lille, France. <sup>11</sup>Institute of Medical Microbiology, Virology and Hygiene, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany. <sup>12</sup>Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, Laboratory of Development and Plasticity of the Neuroendocrine Brain, Lille Neuroscience & Cognition, UMR-51172, DISTALZ, EGID, Lille, France. <sup>13</sup>Institute of Neuropathology, University Medical Center, Göttingen, Germany. <sup>14</sup>Campus Institute for Dynamics of Biological Networks, University of Göttingen, Göttingen, Germany. <sup>15</sup>Max Planck Institute for Experimental Medicine, Göttingen, Germany. <sup>16</sup>Airway Research Center North, Member of the German Center for Lung Research (DZL), Lübeck, Germany. <sup>17</sup>Institute of Anatomy, University of Lübeck, Lübeck, Germany. <sup>18</sup>Roche Pharma Research and Early Development (pRED), Roche Innovation Center, Basel, Switzerland. <sup>19</sup>Institute of Neuropathology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany. <sup>20</sup>Institute for Genetics, University of Cologne, Cologne, Germany. <sup>21</sup>Institute of Legal Medicine, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany. <sup>22</sup>Rare and Neurologic Diseases Research, Sanofi, Framingham, MA, USA. <sup>23</sup>Department of Physiology, CIMUS, University of Santiago de Compostela-Instituto de Investigación Sanitaria, Santiago de Compostela, Spain. <sup>24</sup>These authors contributed equally: Jan Wenzel, Josephine Lampe, Helge Müller-Fielitz. ✉e-mail: markus.schwanger@uni-luebeck.de



**Fig. 1 | SARS-CoV-2 infection is associated with increased string vessels in the brain. a–c.** In the brains of SARS-CoV-2-infected patients, empty basement membrane tubes, also known as string vessels (arrowheads), were increased in the frontal cortex. Sections were stained for the basement membrane marker collagen IV (coll IV) and the endothelial marker CD34. Representative images in **a** and **b** were obtained from the dataset in **c**. **a**, Scale bar, 50  $\mu$ m. **b**, Magnified maximal projection of a z-stack of a string vessel with orthogonal views to exclude that these are partial sections of capillaries. Scale bars, 3  $\mu$ m. **c**, Quantification of string vessels per image volume.  $N = 23$  control patients,  $N = 17$  COVID-19 patients. **d**, Immunostaining revealed a higher number of active caspase-3-positive vessels in cortical sections of SARS-CoV-2-infected patients ( $N = 6$ ) than in controls ( $N = 6$ ). Representative images and quantification are shown. Scale bar, 20  $\mu$ m. **e, f**, SARS-CoV-2-infected hamsters developed an increased number of string vessels as shown by co-staining for coll IV and the endothelial marker caveolin-1. **e**, Representative images of coll IV and caveolin-1 in the cortex of hamsters 4 d post infection (p.i.) with SARS-CoV-2 and of uninfected hamsters. Scale bar, 50  $\mu$ m. **f**, Quantification of string vessel lengths as a percentage of total vessel length in SARS-CoV-2-infected hamsters at 4, 7 and 24 d p.i. and in uninfected controls ( $N = 4$  hamsters per group). **g, h**, SARS-CoV-2-infected K18-hACE2 mice developed an increase in string vessels as shown by co-staining for coll IV and caveolin-1. **g**, Quantification of string vessel lengths as a percentage of total vessel length in SARS-CoV-2-infected K18-hACE2 mice 2 d p.i. ( $N = 3$  mice) and 7 d p.i. ( $N = 3$  mice) and in uninfected controls ( $N = 5$  mice). **h**, Representative images of coll IV and caveolin-1 in the cortex of K18-hACE2 mice 7 d p.i. and of uninfected K18-hACE2 animals. Scale bar, 50  $\mu$ m. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ . Means  $\pm$  s.e.m. are shown.  $N$  denotes the number of patients or animals. Detailed information on the exact test statistics, sidedness and values is provided in Supplementary Table 5.

4 weeks after onset, the post-acute COVID-19 syndrome includes cognitive impairment and a range of psychiatric symptoms and may affect up to 76% of patients<sup>1</sup>. Although a direct infection of the brain remains a matter of debate, SARS-CoV-2 viral genomes were

detected in the brain and cerebrospinal fluid (CSF) of some patients, supporting the notion that SARS-CoV-2 gains access to the brain<sup>3,5,6</sup>. Viral RNA has been found in blood and virus-like particles or viral proteins in brain endothelial cells<sup>5,7–10</sup>, suggesting that SARS-CoV-2

reaches the brain by a hematogenous route. In line with a vascular infection, endothelial cells in other organs have been identified as targets of SARS-CoV-2 infection<sup>11,12</sup>. In patients with COVID-19, magnetic resonance imaging detected lesions that are compatible with a cerebral small-vessel disease and with a disruption of the blood–brain barrier (BBB)<sup>13–15</sup>. Autopsy studies have confirmed this interpretation<sup>16–19</sup>. However, the microvascular pathology and the underlying mechanisms in COVID-19 are still unclear.

In brains of SARS-CoV-2-infected patients, as well as mouse and hamster models, we found an increase in empty vascular basement membrane tubes, so-called string vessels, reflecting microvascular pathology. The SARS-CoV-2 genome encodes two viral proteases that are responsible for processing the viral polyproteins into the individual components of the replication and transcription complexes. We found that one of them, SARS-CoV-2 M<sup>pro</sup> (also called Nsp5 or 3CL<sup>pro</sup>)<sup>20</sup>, cleaves the host protein nuclear factor (NF)- $\kappa$ B essential modulator (NEMO). NEMO is involved in signaling cascades that regulate the transcription of numerous genes, including the antiviral type I interferons and other immune genes<sup>21</sup>. Beyond gene regulation, NEMO modulates cell survival and prevents apoptosis and necroptosis<sup>22</sup>. The ablation of NEMO in brain endothelial cells induced microvascular pathology in mice that was reminiscent of what we observed in brains of patients with COVID-19. Of note, the widespread death of endothelial cells, rarefaction of capillaries, disruption of the BBB and neuroinflammation due to NEMO ablation were prevented by deleting receptor-interacting protein kinase 3 (*Ripk3*), a protein kinase that is essential for regulated cell death. Importantly, a pharmacological inhibitor of RIPK signaling prevented the microvascular pathology induced by M<sup>pro</sup>. These data suggest a potential therapeutic option to interfere with the neurological consequences of COVID-19.

## Results

**Microvascular brain pathology in SARS-CoV-2 infection.** In patients with COVID-19, magnetic resonance imaging and neuropathological studies have reported parenchymal lesions that are compatible with a small-vessel disease<sup>13,15–18</sup>. To search for the underlying microvascular pathology, we stained sections of the frontal cortex for the endothelial cell marker CD34 and the basement membrane component collagen IV. We noted an increase in thin collagen IV-positive strings lacking CD34 staining (Fig. 1a,b). These so-called string vessels were interpreted as remnants of capillaries after endothelial cells have died<sup>23</sup>. Super-resolution microscopy showed that string vessels are tube-like structures with a typical diameter of 0.5–1  $\mu$ m (Extended Data Fig. 1). To test the association of string vessels with COVID-19, we investigated 17 SARS-CoV-2-infected patients and 23 control patients with similar age and sex distribution (Supplementary Table 1 and 2 and Extended Data Fig. 2). Counting

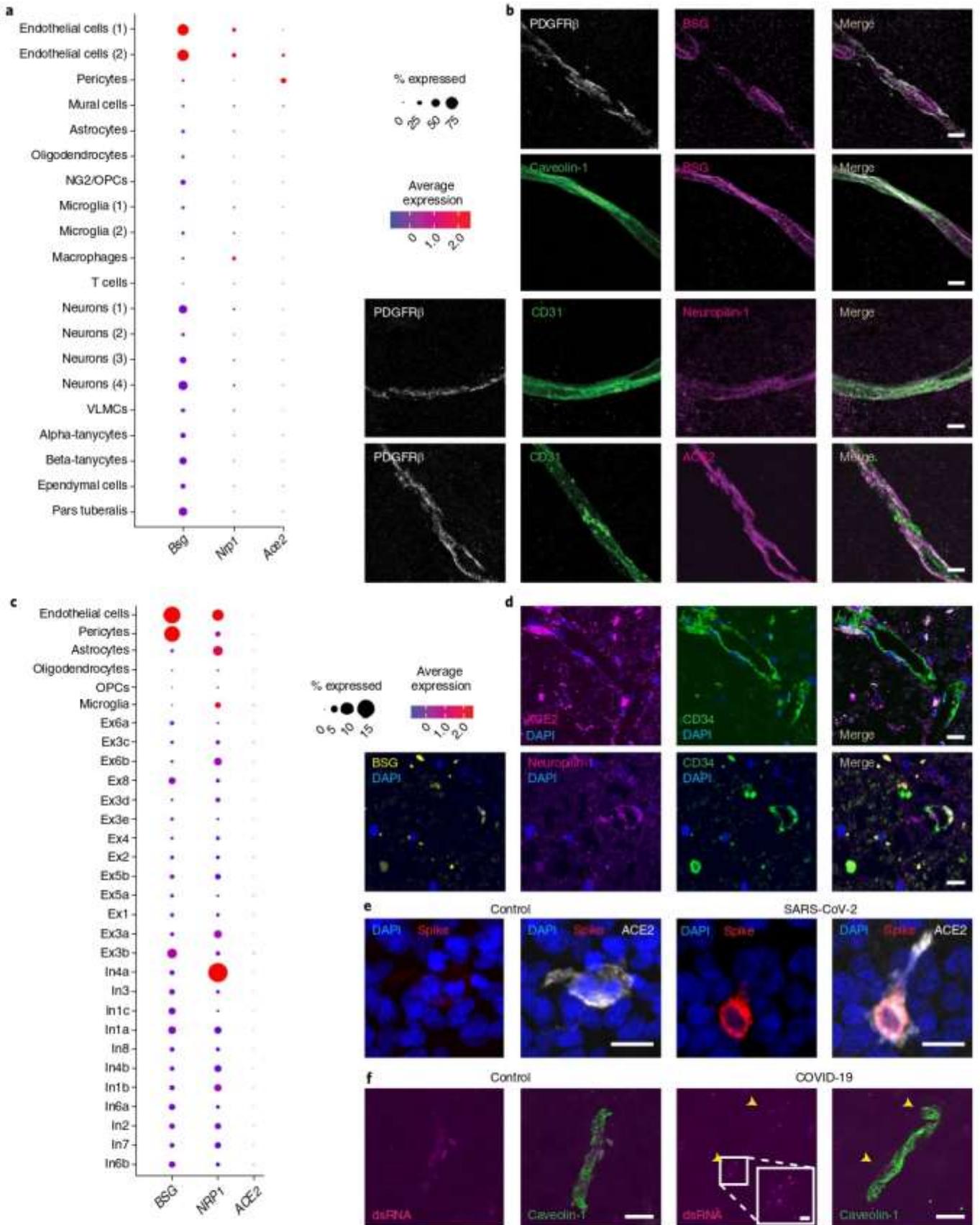
revealed a significant increase in string vessels in patients with SARS-CoV-2 (Fig. 1c). The difference persisted when we stratified the two groups according to comorbidities or sex (Extended Data Fig. 2b–d). Because of pneumonia, more SARS-CoV-2-infected patients were ventilated than controls (Supplementary Table 2). However, neither ventilation nor intensive care unit (ICU) treatment as indicators of severe respiratory disease affected string vessels in control patients (Extended Data Fig. 2h,i), arguing against the possibility that string vessels could be caused by systemic hypoxia. In support, we did not find morphological signs of a global hypoxic–ischemic encephalopathy in any of the patients (Extended Data Fig. 2j). In line with the notion that string vessels are formed when endothelial cells die, we observed cells that stained for the apoptosis marker active caspase-3 in brain microvessels. These cells were rare in brain sections of the frontal cortex but significantly more frequent in SARS-CoV-2-infected patients than in controls (Fig. 1d).

To exclude unknown confounding factors that may have occurred in the retrospective clinical study, we sought to reproduce the findings in two animal models of SARS-CoV-2 infection. In hamsters infected with SARS-CoV-2, the length of string vessels increased on day 4 after infection (Fig. 1e,f and Supplementary Fig. 1a). Interestingly, the increase was transient and normalized at later time points. A similar finding was observed in K18-hACE2 mice, which express the human angiotensin-converting enzyme 2 (hACE2) receptor, under the control of the keratin 18 promoter. In this model, SARS-CoV-2 infection induced the formation of string vessels in a time-dependent manner (Fig. 1g,h and Supplementary Fig. 1b). In summary, the data show that SARS-CoV-2 infection induces a microvascular pathology in the brain in the form of string vessels.

## Evidence that SARS-CoV-2 can infect brain endothelial cells.

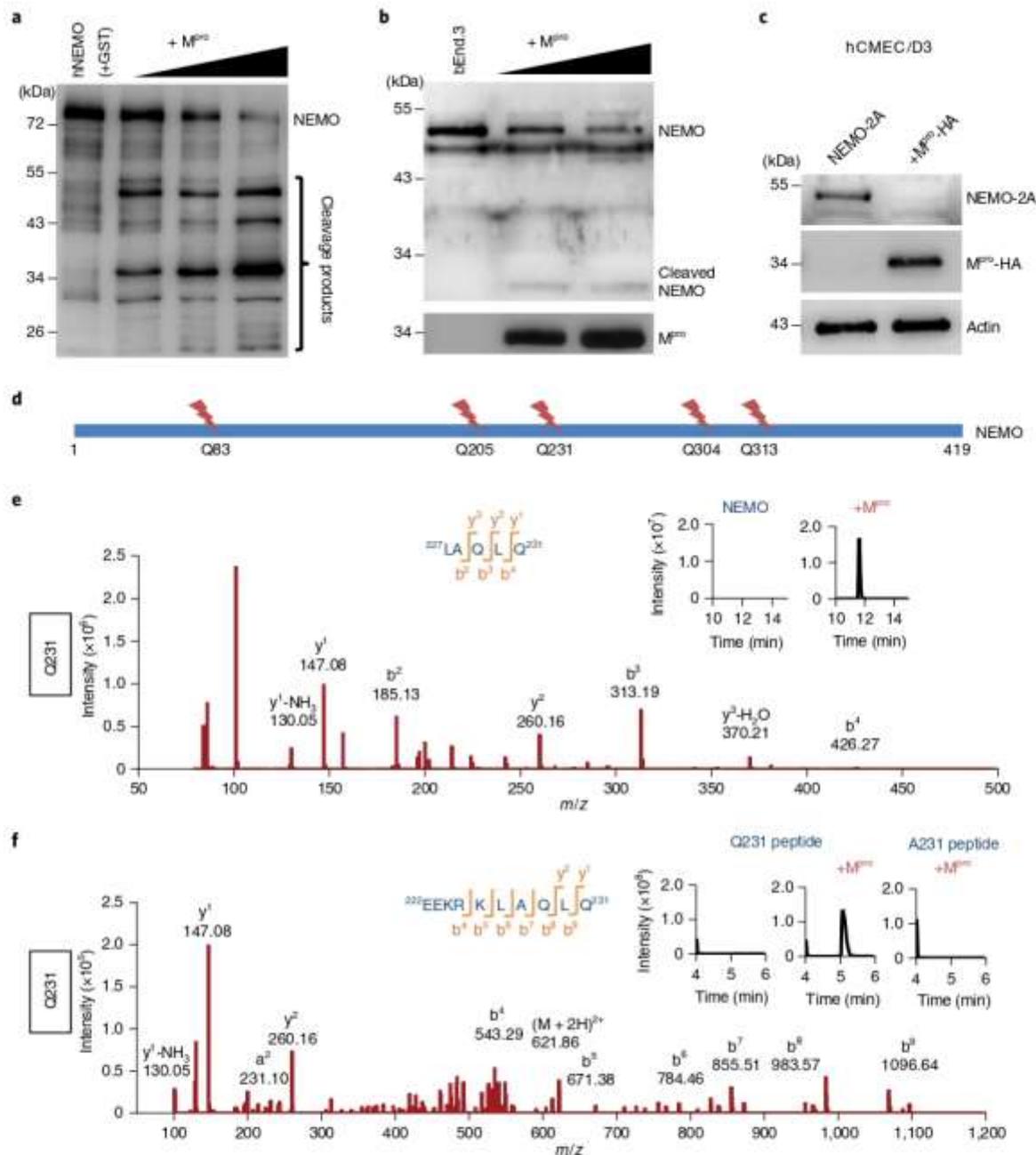
To approach the question of whether SARS-CoV-2 can infect brain endothelial cells, we determined the expression of membrane receptors and enzymes that are known to facilitate the entry of SARS-CoV-2 in host cells, namely ACE2, neuropilin-1 (*Nrp1*), and possibly basigin (*Bsg*), *Cd209a*, *Cd209b*, *Cd209c*, *Cd209d* and *Tmprss2* (refs. 24,25–27). When analyzing isolated mouse brain cells by single-cell RNA sequencing (scRNA-seq), we identified 20 cell clusters, including two endothelial clusters (Extended Data Fig. 3a,b). Some cells in the endothelial cell cluster 2 expressed *Ace2*, albeit at a lower level than pericytes (Fig. 2a). Imaging confirmed that ACE2 was expressed in mouse cerebral microvessels, but co-staining of endothelial and pericytic markers and high-resolution microscopy demonstrated that ACE2 was mainly localized in pericytes (Fig. 2b). In contrast, we observed high levels of *Nrp1* and *Bsg* expression in mouse endothelial cells by scRNA-seq and immunostaining (Fig. 2a,b) but no *Cd209a*, *Cd209b*, *Cd209c*, *Cd209d* or *Tmprss2* (Extended Data Fig. 3c–e).

**Fig. 2 | Brain endothelial cells express SARS-CoV-2 receptors in mice and humans.** **a**, RNA-seq in single mouse brain cells characterized the cell-type-specific expression of the SARS-CoV-2 receptors *Ace2*, *Bsg* and *Nrp1*. Colors represent mean gene expression, and diameters denote the percentage of positive cells in the 20 cell clusters. Uniform manifold approximation and projection (UMAP) plot and dot plot for marker genes are shown in Extended Data Fig. 3. **b**, Representative images of mouse brain co-stained for ACE2, BSG, NRP1, the endothelial markers CD31 or caveolin-1 and the pericyte marker PDGFR $\beta$ . BSG and NRP1 were co-localized with caveolin-1 or CD31, respectively, but not with PDGFR $\beta$ . The staining was reproduced in at least six mice for each marker. Noteworthy, in the scRNA-seq analysis, the number of *Ace2* mRNA-positive cells was low and did not fully reflect the number of ACE2-positive cells identified by immunostainings. In immunostainings, almost all pericytes and tanycytes<sup>27</sup> were positive for ACE2, in contrast to the scRNA-seq data. Scale bars, 5  $\mu$ m. VLMCs, vascular and leptomenigeal cells; OPCs, oligodendrocyte progenitor cells. **c**, Cell-type-specific expression of ACE2, BSG and NRP1 in a previously published single nuclear RNA-seq profile of human brain<sup>28</sup>. Gene expression of ACE2, BSG and NRP1 is shown as dot plots for all 30 clusters. UMAP plot and dot plot for marker genes is shown in Extended Data Fig. 4. **d**, Representative images of the human frontal cortex co-stained for ACE2, BSG and NRP1 with the endothelial marker CD34 confirmed the cell-type-specific localization of the receptors in the vascular unit. ACE2, BSG and NRP1 were co-localized with the endothelial protein CD34. Images were obtained from a dataset of three patients (three sections per patient). Scale bars, 5  $\mu$ m. **e**, Human brain endothelial hCMEC/D3 cells were transfected with human ACE2 and were incubated with SARS-CoV-2 (multiplicity of infection (MOI) of 1). Twenty-four hours after exposure to the virus, the spike glycoprotein was detected in several ACE2-positive cells indicating infection. The experiment was performed three times. Scale bars, 5  $\mu$ m. **f**, dsRNA was found in caveolin-1-positive endothelial cells in the cortex of two of four patients with COVID-19 but not in three uninfected controls. Scale bar, 20  $\mu$ m and 2  $\mu$ m (inset).



To evaluate the expression of *NRP1*, *BSG* and *ACE2* in human brain endothelial cells, we analyzed a published single-nuclei RNA-seq dataset that allowed the identification of endothelial and

pericyte cell clusters<sup>28</sup> (Extended Data Fig. 4a,b). In line with the mouse data, *BSG* and *NRP1* were highly expressed in endothelial cells (Fig. 2c). In this study, *ACE2* was below the detection limit in



**Fig. 3 | M<sup>pro</sup> cleaves NEMO.** **a**, SARS-CoV-2 M<sup>pro</sup> in increasing concentrations (0, 5, 10 and 25 μM; 120 min) degraded full-length human NEMO (fused to GST) while several cleavage products emerged (representative of at least six experiments at different conditions). The full immunoblots are shown in Extended Data Fig. 6. **b**, Mouse NEMO in bEnd.3 cell extracts was cleaved to a short fragment after incubation with increasing concentrations of M<sup>pro</sup> (0, 5 and 10 μM) for 120 min (representative of three experiments). **c**, In human brain endothelial hCMEC/D3 cells, M<sup>pro</sup>-HA degraded NEMO-2A. After transfecting the cells with pCAG-NEMO-2A-GFP ± pCAG-M<sup>pro</sup>-HA, immunoblots of cell lysates were performed (representative of at least nine experiments). **d**, Tryptic digestion and tandem mass spectrometry (MS/MS) analysis identified five M<sup>pro</sup> cleavage sites in human NEMO as illustrated in the schematic. For the protein sequence, see Supplementary Fig. 2k. **e**, M<sup>pro</sup> cleaved human NEMO at Q231. An extracted ion chromatogram of the tryptic peptide <sup>227</sup>LAQLQ<sup>231</sup> (m/z, 572.3414<sup>+</sup>; retention time (RT), 11.6 min) derived from NEMO after incubation with M<sup>pro</sup> (5 μM, inset) and the MS/MS spectrum that was used for peptide identification are shown. The experiment was performed once. **f**, A synthetic peptide corresponding to the human NEMO sequence confirmed that Q231 is an M<sup>pro</sup> cleavage site. Total ion chromatograms after incubation of the synthetic peptide h-NEMO<sub>222-241</sub> (EKKRKLQ<sub>222-241</sub>) in the presence or absence of M<sup>pro</sup> (2.5 μM, inset) are shown. In the presence of M<sup>pro</sup>, the proteolysis product <sup>222</sup>EKKRKLQ<sup>231</sup> (m/z, 414.9109<sup>+</sup>; RT, 5.1 min) was detected. The mutant peptide h-NEMO-Q231A<sub>222-241</sub> (EKKRKLQ<sub>222-241</sub>) was not cleaved by M<sup>pro</sup> (inset). The MS/MS spectrum of the peptide <sup>222</sup>EKKRKLQ<sup>231</sup> is shown (representative of five experiments with the synthetic peptide h-NEMO<sub>222-241</sub> and four experiments with the mutant peptide h-NEMO-Q231A<sub>222-241</sub>).

all neural cell clusters, although other studies have reported ACE2 expression in the human brain<sup>25,26</sup>. Immunofluorescence staining confirmed the presence of BSG and NRP1 in brain endothelial

cells, while only a few cells were positive for ACE2 (Fig. 2d). Because brain endothelial cells express NRP1, BSG and low levels of ACE2 as potential receptors for SARS-CoV-2, we asked whether

the cells are susceptible to a SARS-CoV-2 infection. Because endothelial expression of *ACE2* decreases in vitro due to the lack of blood flow<sup>31</sup>, we transfected cultured brain endothelial hCMEC/D3 cells with an expression plasmid of *ACE2* and added SARS-CoV-2. In *ACE2*-positive cells, but not *ACE2*-negative cells, the spike protein was found in a perinuclear localization as reported for pulmonary endothelial cells (Fig. 2c)<sup>32</sup>. In accordance with the concept that SARS-CoV-2 can infect brain endothelial cells<sup>33–35</sup>, we detected double-stranded RNA (dsRNA) in endothelial cells (Fig. 2f) and the S gene of SARS-CoV-2 encoding the spike protein in cerebral vessels (Extended Data Fig. 4c) of a patient with COVID-19. Together, these data show that brain endothelial cells express receptors for SARS-CoV-2 and are susceptible to an infection.

**M<sup>pro</sup> cleaves NEMO.** SARS-CoV-2 manipulates host cells to promote its survival and propagation. We hypothesized that it might be a successful evolutionary strategy for SARS-CoV-2 to cleave NEMO as an essential component of the antiviral immune response<sup>21</sup>. Indeed, NEMO was degraded in infected Vero E6 and hCMEC/D3 cells before the cells died (Extended Data Fig. 5a,b). Moreover, immunoblots of NEMO in brain lysates of SARS-CoV-2-infected and control patients indicated that NEMO was cleaved in some of the infected patients (Extended Data Fig. 5c).

The SARS-CoV-2 genome encodes two proteases, M<sup>pro</sup> and the papain-like protease<sup>20</sup>. Purified M<sup>pro</sup> cleaved recombinant human NEMO as well as human and mouse NEMO in extracts of brain endothelial or HEK293T cells in a dose-dependent and time-dependent manner (Fig. 3a,b and Extended Data Figs. 6 and 7a,b). Importantly, M<sup>pro</sup> cleaved NEMO also in intact brain endothelial cells (Fig. 3c and Extended Data Fig. 7c). When coexpressed with NEMO-2A-GFP that self-processes to NEMO-2A and green fluorescent protein (GFP), HA-tagged M<sup>pro</sup> completely neutralized NEMO-2A in human hCMEC/D3 cells.

In vitro, M<sup>pro</sup> produced several NEMO fragments (Fig. 3a and Extended Data Fig. 6). Tryptic digestion of M<sup>pro</sup>-treated NEMO followed by mass spectrometry of the generated peptides showed that cleavage occurred at Q83, Q205, Q231, Q304 and Q313 (Fig. 3d,e and Supplementary Fig. 2a–j). The cleavage sites that we identified (Supplementary Fig. 2k) resemble other known recognition sequences of M<sup>pro</sup> (ref. 20). We verified the cleavage at Q231 by using synthetic peptides as substrates corresponding to both the human and mouse NEMO sequence (Fig. 3f and Supplementary Fig. 3a–c). With the human NEMO sequence at Q231, the apparent catalytic efficiency (about 43 M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>) was in the range that has been reported for the cleavage site between Nsp4 and Nsp5 (Supplementary Fig. 3d)<sup>33</sup>. In keeping with the central role of Q in the recognition sequence, the mutation p.Gln231Ala in the human NEMO sequence prevented cleavage by M<sup>pro</sup> at this site (Fig. 3f).

NEMO is an essential component of the canonical pathway leading to the activation of NF-κB by inflammatory factors such as interleukin (IL)-1β. Supporting the functional relevance of NEMO cleavage, M<sup>pro</sup> blocked NF-κB activation. When expressed in human brain endothelial hCMEC/D3 cells, M<sup>pro</sup> prevented the nuclear translocation of the NF-κB subunit p65, reflecting its activation in response to IL-1β (Fig. 4a). M<sup>pro</sup> also abolished the stimulation of NF-κB-mediated gene transcription by IL-1β, which we investigated in hCMEC/D3 cells and mouse brain endothelial bEnd.3 cells using luciferase reporter gene assays (Fig. 4b, c). Thus, we obtained unequivocal evidence that M<sup>pro</sup> cleaves and thereby inactivates NEMO.

**M<sup>pro</sup>-induced damage mimics microvascular pathology.** As NEMO is required for the integrity of some but not all cell types<sup>32</sup>, the question arose whether the M<sup>pro</sup>-mediated cleavage of NEMO compromises endothelial survival. To test whether M<sup>pro</sup> induces endothelial cell death, we transfected hCMEC/D3 cells with a plasmid encoding M<sup>pro</sup>-HA and treated the cells with tumor necrosis factor (TNF) to model the elevated TNF serum concentrations in patients with COVID-19 (ref. 34). M<sup>pro</sup>-expressing cells were more often positive for the cell death marker TUNEL, especially when exposed to TNF (Fig. 4d,e), demonstrating that M<sup>pro</sup> promotes endothelial cell death. To test whether protease activity and NEMO cleavage are required for the toxic effects of M<sup>pro</sup>, we mutated the amino acid Cys145 in the catalytic site to alanine (p.Cys145Ala-M<sup>pro</sup>)<sup>33</sup>. This mutation abrogates the protease activity<sup>33</sup>. As expected, p.Cys145Ala-M<sup>pro</sup> did not cleave NEMO-2A when coexpressed with NEMO-2A-GFP (Fig. 4f). In these experiments, levels of the HA-tagged p.Cys145Ala-M<sup>pro</sup> were higher than those of M<sup>pro</sup>, probably reflecting a better cell viability with the mutated protease. In support of this concept, the number of GFP-positive hCMEC/D3 cells dropped when M<sup>pro</sup>-HA but not p.Cys145Ala-M<sup>pro</sup>-HA were co-transfected (Fig. 4g). In contrast to M<sup>pro</sup>, p.Cys145Ala-M<sup>pro</sup> did not inhibit NF-κB activation by IL-1β (Fig. 4h). These data show that NEMO cleavage and cell toxicity by M<sup>pro</sup> depend on its protease activity.

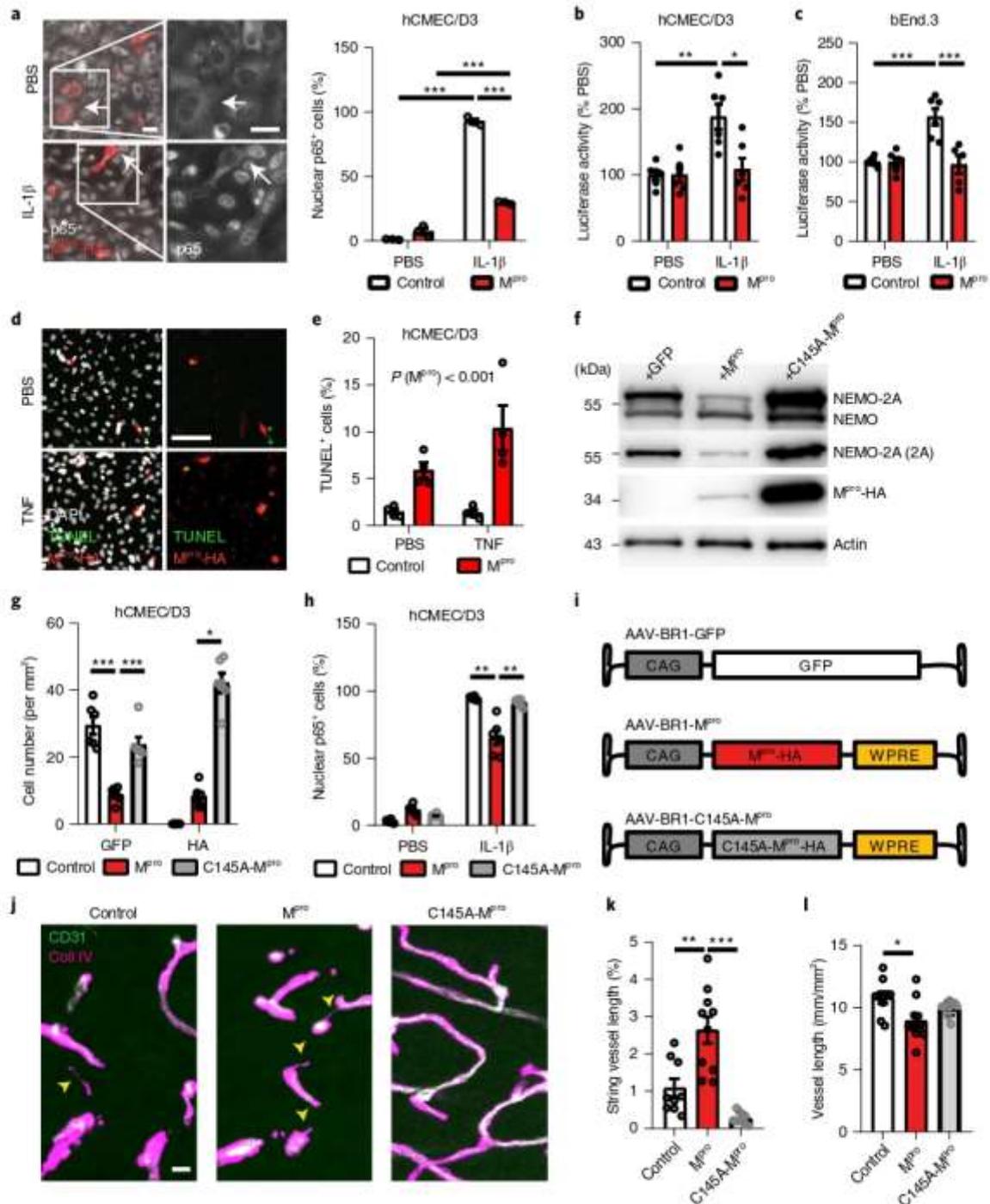
To explore the function of M<sup>pro</sup> in vivo, we used the adeno-associated viral vector AAV-BR1, which selectively targets brain endothelial cells when injected intravenously<sup>36</sup> (Fig. 4i). After administering AAV-BR1 vectors encoding GFP or HA-tagged proteins, the accumulation of genomic particles in the brain was similar between the vector groups, and about 10–20% of cerebral capillaries expressed GFP or the HA epitope, while different anti-M<sup>pro</sup> antibodies did not detect the tagged protein (Fig. 4i and Supplementary Fig. 4). When mice received AAV-BR1-M<sup>pro</sup> 2 weeks before, we observed an increased number of string vessels and a decreased vascular density in their brains (Fig. 4j–l). The inactive p.Cys145Ala-M<sup>pro</sup> had no effect on string vessels or vascular density. In line with a

**Fig. 4 | M<sup>pro</sup> inactivates NEMO and induces brain endothelial cell loss mimicking COVID-19-associated brain pathology.** **a**, M<sup>pro</sup>-HA inhibited the nuclear translocation of the NF-κB subunit p65 in hCMEC/D3 cells stimulated with IL-1β (0.25 μg ml<sup>-1</sup>) for 30 min. Cells (N = 3 wells per group; representative of three independent experiments) were transfected with a control plasmid (Bluescript) or pCAG-M<sup>pro</sup>-HA. Scale bar, 25 μm. **b, c**, M<sup>pro</sup>-HA blocked the activation of NF-κB by IL-1β (0.25 μg ml<sup>-1</sup>) in human (**b**) and mouse (**c**) brain endothelial cells. Cells were transfected with pNF-κB-Luc plus a control plasmid or pCAG-M<sup>pro</sup>-HA, N = 5–6 wells per group. **d, e**, M<sup>pro</sup>-HA induced death of hCMEC/D3 cells, especially after exposure to TNF (100 ng ml<sup>-1</sup>; 4.5 h). Cells (N = 12 wells per group) were transfected with a control plasmid or pCAG-M<sup>pro</sup>-HA. Scale bar, 100 μm. **f**, In hCMEC/D3 cells, M<sup>pro</sup> degraded NEMO-2A, whereas the inactive variant p.Cys145Ala-M<sup>pro</sup> did not. After transfecting the cells with pCAG-NEMO-2A-GFP plus pCAG-GFP as control, pCAG-M<sup>pro</sup>-HA or pCAG-p.Cys145Ala-M<sup>pro</sup>-HA, immunoblots of cell lysates were performed (representative of at least six experiments). **g**, More hCMEC/D3 cells survived after expressing the inactive variant p.Cys145Ala-M<sup>pro</sup>-HA than after expressing M<sup>pro</sup>-HA. All cells were transfected with pCAG-GFP in parallel. The numbers of GFP<sup>+</sup> or HA<sup>+</sup> cells are depicted (N = 6 wells per group). **h**, In contrast to M<sup>pro</sup>, p.Cys145Ala-M<sup>pro</sup> did not inhibit the nuclear translocation of the NF-κB subunit p65 when hCMEC/D3 cells were stimulated with IL-1β (0.25 μg ml<sup>-1</sup>) for 30 min. Cells were transfected with control plasmid, pCAG-M<sup>pro</sup>-HA or pCAG-p.Cys145Ala-M<sup>pro</sup>-HA (N = 6 wells per group). **i**, Schematic of AAV-BR1 vectors to transduce brain endothelial cells in vivo. WPRE, woodchuck hepatitis posttranscriptional regulatory element. **j**, AAV-BR1-M<sup>pro</sup> but not AAV-BR1-p.Cys145Ala-M<sup>pro</sup> led to the formation of string vessels (arrowheads) in the brain of mice. Representative images were taken in the cortex. Scale bar, 20 μm. **k**, Quantification of string vessel length as a percentage of total vessel length (N = 9–10 mice per group). **l**, Total vessel length was reduced after mice received AAV-BR1-M<sup>pro</sup> but not AAV-BR1-p.Cys145Ala-M<sup>pro</sup> (N = 9–10 mice per group). \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001. Means ± s.e.m. are shown. Detailed information on the exact test statistics, sidedness and values is provided in Supplementary Table 5.

detrimental effect of  $M^{fl}$  on endothelial cell survival, there were less HA-positive vessels after expression of  $M^{fl}$ -HA in comparison to p.Cys145Ala- $M^{fl}$ -HA (Supplementary Fig. 4c).  $M^{fl}$ -induced string vessels were indistinguishable from those that had occurred in SARS-CoV-2-infected patients.

**Capillaries are at risk from ablating NEMO.** To test whether NEMO ablation could be responsible for the vascular pathology observed with endothelial  $M^{fl}$  expression, we used a mouse model of inducible *Ikbkg* (*Nemo*) deletion in brain endothelial cells (*Nemo*<sup>bcKO</sup>)<sup>37</sup>. Similar to the  $M^{fl}$ -mediated cleavage of NEMO, its genetic ablation led to numerous string vessels in the brain

(Fig. 5a,b). STED microscopy showed that string vessels are tube-like structures with a similar morphology in humans, hamsters and *Nemo*<sup>bcKO</sup> or K18-hACE2 mice (Fig. 5b and Extended Data Fig. 1a–c). They were deficient of endothelial cells. Our interpretation of string vessels as a sign of endothelial demise is based on the following observations. NEMO deletion induced endothelial cell death as detected by the TUNEL reaction or by staining for active caspase-3 (Fig. 5c–e). Most of them were observed in higher-order capillaries (Fig. 5f and Extended Data Fig. 8), suggesting that capillaries are particularly susceptible to NEMO deficiency. Consequently, small-diameter vessels were predominantly lost and mice developed patchy hypoxia in the brain (Fig. 5g,h) but not in



peripheral organs (Supplementary Fig. 5a,b). Finally, *Nemo* deletion led to a significant vessel rarefaction in the brain (Fig. 6a) and to a BBB disruption (Fig. 6c,f and Supplementary Fig. 5c).

The loss of endothelial cells induced by NEMO deficiency also affected other cell types in the neurovascular unit. While the overall coverage of vessels by pericytes was slightly lowered (Fig. 5i), the number of microglia increased and they exhibited an activated morphology (Fig. 5j). The astrogliosis marker glial fibrillary acidic protein (GFAP) was strongly upregulated, indicating an inflammatory response (Fig. 5k).

**NEMO ablation induces vascular pathology via RIPK signaling.** Microglia orchestrate the neuroinflammatory response in the brain, including the activation of astrocytes<sup>39</sup>. Therefore, we tested their role in the microvascular pathology induced by NEMO deficiency. However, ablating microglia by administering the CSF-1R antagonist PLX5622 did neither prevent the formation of string vessels nor prevent the activation of astrocytes (Supplementary Fig. 6).

To develop alternative therapeutic options, we considered previous reports that NEMO blocks apoptosis or necroptosis in epithelial cells<sup>22</sup>. In *Nemo*<sup>hKO</sup> mice, we inactivated the Fas-associated death domain protein (FADD), a component of apoptosis signaling and RIPK3, a kinase central for both necroptosis and apoptosis (Extended Data Fig. 9a). FADD deficiency did not ameliorate the consequences of *Nemo* deletion but enhanced the damage (Extended Data Fig. 9b–f). FADD not only mediates apoptosis but also inhibits necroptosis, explaining the detrimental effect of FADD deletion<sup>39,40</sup>.

In contrast, RIPK3 deficiency, which by itself did not affect the cerebral microvasculature, prevented the formation of string vessels and the rarefaction of cerebral vessels due to *Nemo* deletion (Fig. 6a). Probably as a response to the vessel rarefaction, NEMO deficiency stimulated endothelial proliferation indicating angiogenesis, which has been described in patients with COVID-19 previously<sup>11</sup>. Notably, *Ripk3* deletion abrogated endothelial proliferation (Fig. 6a). *Ripk3* deletion also normalized survival, brain weight and body weight of mice with a NEMO deficiency in brain endothelial cells and reduced the extravasation of IgG and albumin into the parenchyma, showing that disruption of the BBB was mitigated (Fig. 6b,c and Extended Data Fig. 9c–f). Consequentially, *Nemo* deletion did not activate microglia or astrocytes in the absence of RIPK3 (Fig. 6d).

To explore the mechanisms of BBB protection by RIPK3 deficiency, we quantified the levels of the tight junction protein occludin. NEMO deficiency led to interruptions and the disintegration of occludin-positive tight junctions, which was prevented by RIPK3 deficiency (Fig. 6e). In addition to endothelial tight junctions, the BBB is characterized by a low rate of transcytosis in cerebral capillaries. The increased IgG extravasation in *Nemo*<sup>hKO</sup> mice was associated with a lower number of IgG-filled vesicles in brain endothelial

cells (Fig. 6f). Super-resolution imaging confirmed the decrease of IgG-loaded vesicles, although the density of all vesicles that were detected by transmission electron microscopy was not reduced (Supplementary Fig. 7b,c). We have observed a similar reduction of IgG-filled vesicles despite increased overall IgG extravasation in *Pdgfr<sup>β</sup>Ret<sup>Ret</sup>* mice, indicating that the detected population of IgG-filled vesicles limit IgG permeation across the BBB<sup>41</sup>. RIPK3 deficiency did not counteract the effect of NEMO ablation on IgG transcytosis (Fig. 6f). Therefore, we conclude that RIPK3 deficiency improves the BBB tightness of *Nemo*<sup>hKO</sup> mice mainly by preventing endothelial cell death and rescuing tight junctions.

Importantly, the M<sup>PM</sup>-induced string vessel formation also depended on the presence of RIPK3 (Fig. 7a,b), suggesting that inhibitors of RIPK signaling may protect against the microvascular pathology induced by M<sup>PM</sup>. Although RIPK3 inhibitors block necroptosis, they may induce apoptotic cell death, limiting their translational potential<sup>42</sup>. Therefore, we turned to a small-molecule inhibitor of the upstream kinase RIPK1 that activates RIPK3. The RIPK1 inhibitor abrogated M<sup>PM</sup>-induced string vessel formation (Fig. 7c,d) and normalized body weight gain that was impaired by M<sup>PM</sup> expression in brain endothelial cells (Extended Data Fig. 10). Overall, these data indicate that inhibitors of RIPK signaling may prevent cerebral microvascular pathology in COVID-19.

## Discussion

In many patients with COVID-19, neurological and psychiatric symptoms occur during the acute disease and determine the post-acute syndrome<sup>4</sup>. Here, we show microvascular pathology in the brains of SARS-CoV-2-infected patients that likely explains signs and symptoms, although systemic effects, including respiratory failure and cytokine release, may contribute to CNS symptoms. Furthermore, we propose a mechanism by which SARS-CoV-2 infection compromises brain endothelial function, damages the BBB and reduces CNS perfusion.

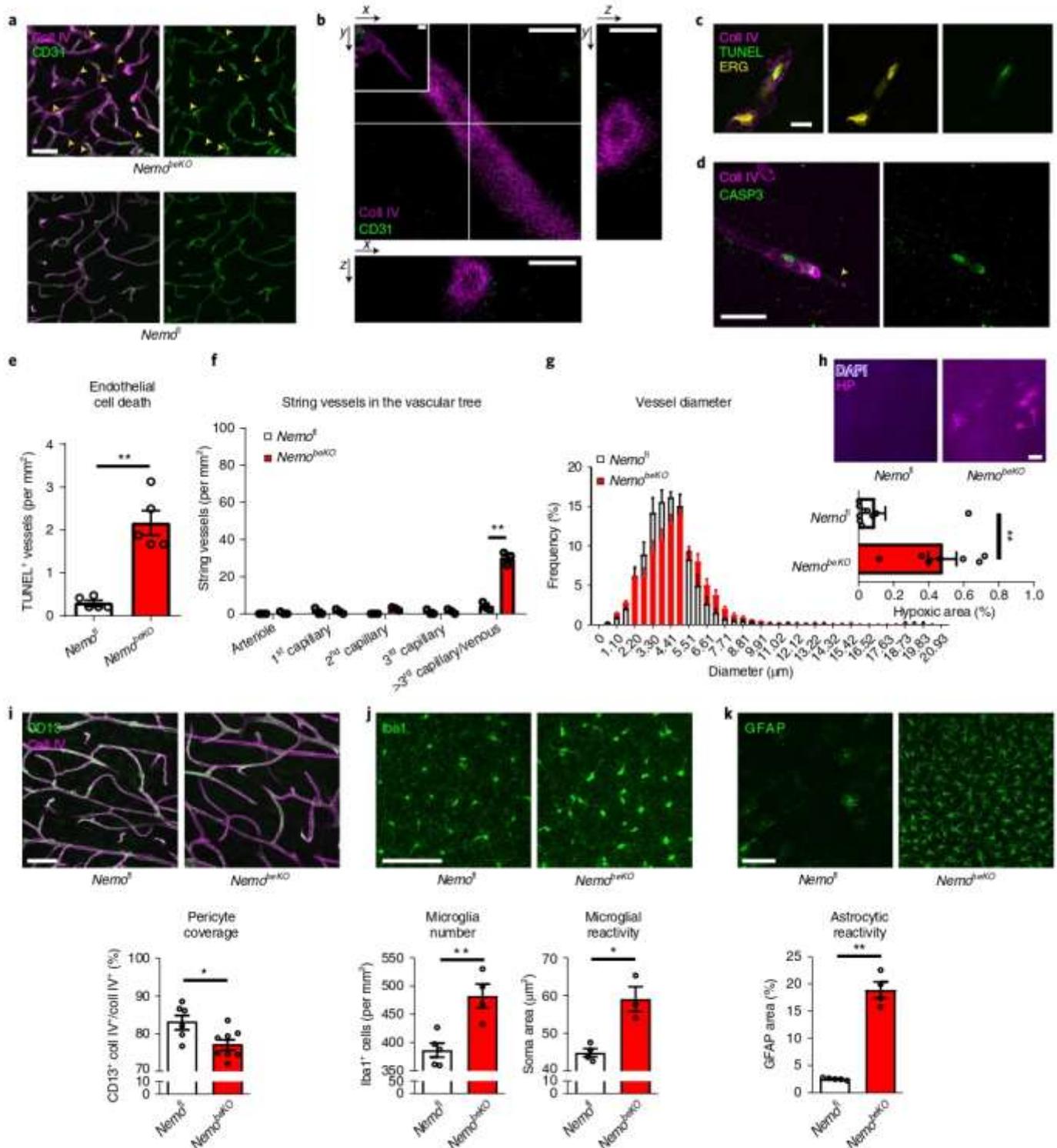
In the brains of SARS-CoV-2-infected patients, we found an increase in string vessels. This finding was confirmed in two animal models of SARS-CoV-2 infection. String vessels are empty basement membrane tubes that often contain pericyte processes. In our view, string vessels are similar or, at least in part, identical to tunneling nanotubes that have been implicated in regulating cerebrovascular coupling<sup>43</sup>. Irrespective of such a function, the association of string vessels with endothelial cell death, BBB disruption and brain ischemia is strong<sup>23,44</sup>, especially because blocking cell death prevented string vessel formation and other changes (Figs. 6 and 7). Therefore, from a technical perspective, string vessels provide a straightforward quantitative measure of capillary damage that allowed a careful statistical comparison between SARS-CoV-2-infected patients and controls. We propose that death of brain endothelial cells in COVID-19 is secondary to their SARS-CoV-2 infection. Although

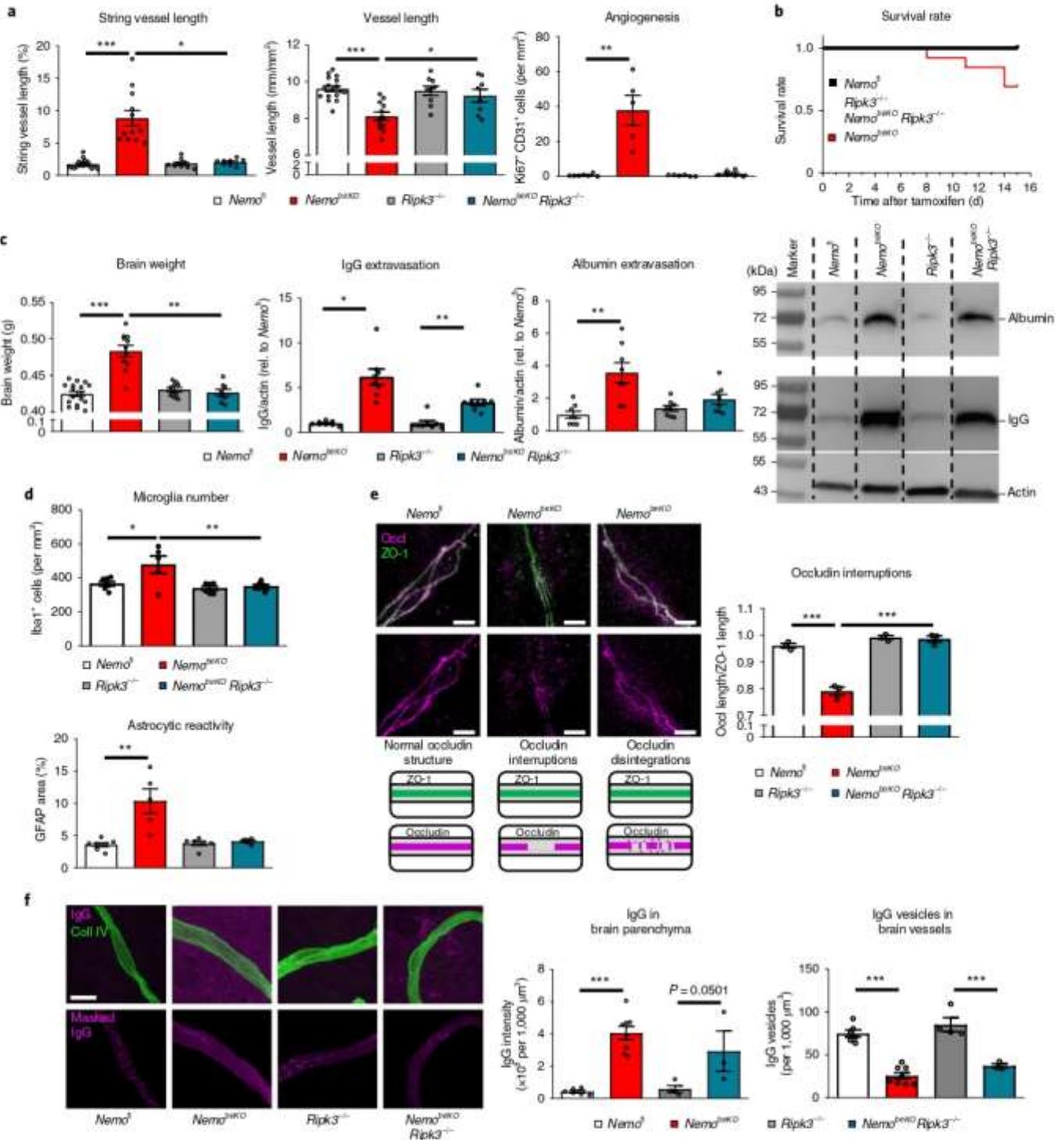
**Fig. 5 | Brain endothelial loss of NEMO induces string vessel formation and influences the neurovascular unit.** **a**, Cerebral microvasculature of *Nemo*<sup>hKO</sup> mice deficient of NEMO in brain endothelial cells and *Nemo*<sup>f</sup> controls. Arrowheads indicate string vessels. Confocal images are representative of five *Nemo*<sup>f</sup> and five *Nemo*<sup>hKO</sup> mice (six sections per animal) 28 d after tamoxifen treatment. Scale bar, 50 μm. **b**, STED microscopy showed that string vessels are thin tubes with a typical diameter of 0.5–1 μm. The image is representative of three *Nemo*<sup>hKO</sup> mice. Scale bars, 1 μm. **c,d**, String vessels (arrowhead) were often adjacent to dying, TUNEL<sup>+</sup> or active caspase-3<sup>+</sup> endothelial cells in *Nemo*<sup>hKO</sup> mice. ERG co-staining indicated TUNEL<sup>+</sup> nuclei in the endothelium. Representative images in **c** were obtained from the dataset in **e**. Images in **d** are representative of two *Nemo*<sup>hKO</sup> mice. Scale bar, 20 μm. **e**, Increased numbers of TUNEL<sup>+</sup> cells localized in collagen IV-stained microvessels of *Nemo*<sup>hKO</sup> mice (*N* = 5 mice per genotype). **f**, More string vessels were present in higher branch orders of the vascular tree in the cortices of *Nemo*<sup>hKO</sup> mice (*N* = 3 mice per genotype). Branch orders were defined by α-SMA staining of arterioles (Extended Data Fig. 8a). **g**, *Nemo*<sup>hKO</sup> mice (*N* = 3 mice per genotype) preferentially lost vessels with small diameters. The diameters of collagen IV<sup>+</sup> vessels are shown as a histogram. **h**, *Nemo*<sup>hKO</sup> mice (*N* = 7) demonstrated patchy cerebral hypoxia detected by the hypoxia probe (HP) in contrast to *Nemo*<sup>f</sup> controls (*N* = 10). **i**, Pericyte coverage of vessels was reduced in *Nemo*<sup>hKO</sup> mice (*N* = 8) compared to *Nemo*<sup>f</sup> controls (*N* = 6). Scale bar, 50 μm. **j**, *Nemo*<sup>hKO</sup> mice (*N* = 3–4) showed an increased number of activated microglia cells as shown by increased Iba1<sup>+</sup> soma area in comparison to that of *Nemo*<sup>f</sup> controls (*N* = 4–5). Scale bar, 100 μm. **k**, *Nemo*<sup>hKO</sup> mice (*N* = 4) demonstrated astrogliosis as shown by an increased GFAP<sup>+</sup> area in the cortex compared to that of *Nemo*<sup>f</sup> controls (*N* = 5). Scale bar, 100 μm. \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01. Means ± s.e.m. are shown. Detailed information on the exact test statistics, sidedness and values is provided in Supplementary Table 5.

several groups have provided converging evidence for endothelial infection<sup>3,23,43</sup>, others have questioned this, mainly based on doubts as to whether endothelial cells express ACE2 (refs. 29,31). The jury is still open whether ACE2-positive endothelial cells represent a special endothelial subpopulation or a contamination with pericytes. While ACE2 seems to be essential for SARS-CoV-2 infection, soluble ACE2 may substitute for its lack of expression in certain cell types<sup>44</sup>, suggesting a way how SARS-CoV-2 may infect brain endothelial cells even if they do not express ACE2. The presence of NRP1

and possibly BSG in brain endothelial cells facilitates SARS-CoV-2 cell entry and infectivity<sup>45,27,47</sup>.

How could SARS-CoV-2 infection induce the death of brain endothelial cells? Our data demonstrate that M<sup>pro</sup> of SARS-CoV-2 cleaves host cell NEMO with high efficiency. In infected cells, M<sup>pro</sup> is located in the cytosol and nucleus, where NEMO is also present<sup>48,49</sup>. Cleavage by M<sup>pro</sup> inactivated NEMO. This may benefit the virus by preventing the induction of antiviral type I interferons that depends on NEMO<sup>51</sup>. Indeed, levels of type I interferons are low or absent



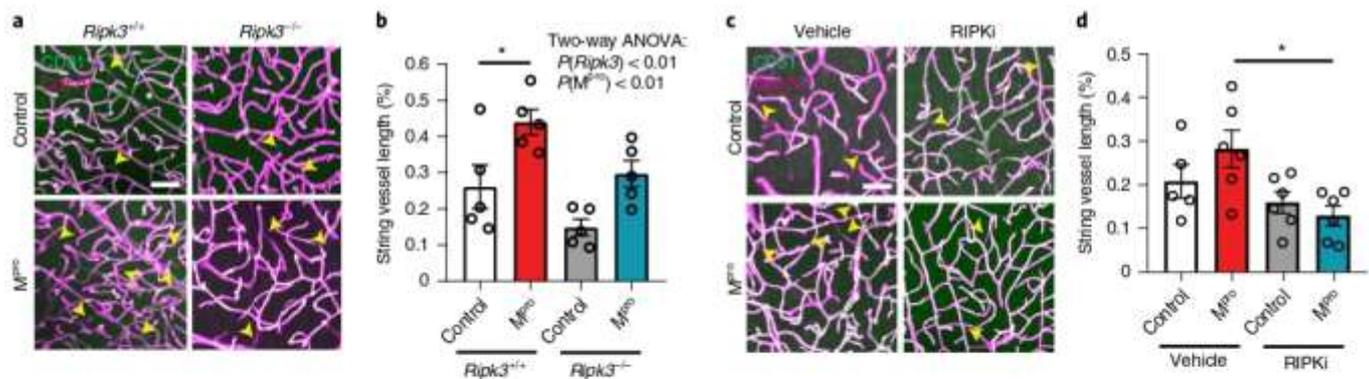


in the peripheral blood of patients with COVID-19 (refs. 34,35). Cleaving NEMO is also a strategy used by other viruses<sup>31–33</sup>. However, the tropism of SARS-CoV-2 is likely to limit NEMO inactivation to specific cell types. Accordingly, some NF- $\kappa$ B-dependent cytokines, such as TNF and IL-6, are highly upregulated, indicating that the cells of origin have escaped NEMO inactivation<sup>34</sup>. In addition to its central role in immunity, NEMO supports the survival of some but not all cell types<sup>25</sup>. While neurons, glia and endothelial cells of peripheral vessels seem to resist NEMO deficiency or are even protected by it against inflammatory stimuli<sup>34,35</sup>, the survival of other cells, including brain endothelial cells, is supported by

NEMO. Our data suggest that, in COVID-19, brain endothelial cells are at disproportionate risk when being infected by SARS-CoV-2 because of their dependence on NEMO activity for survival.

Cleavage of NEMO by M<sup>Pr</sup> mimics the genetic disease *incontinentia pigmenti* that is caused by inactivating mutations in the NEMO (*IKBKG*) gene. In the latter condition, patients suffer from a mix of neurological symptoms, such as encephalopathy, stroke and seizures that resemble neurological manifestations of COVID-19 (ref. 36). The absence of NEMO in mice induced a loss of endothelial cells and microvascular pathology. Subsequently, patchy hypoxia developed in the brain and the BBB became leaky. In parenchymal

**Fig. 6 | RIPK3 mediates microvascular pathology induced by NEMO ablation.** **a**, *Ripk3* deletion prevented vascular pathology of *Nemo*<sup>hKO</sup> mice, that is, string vessel formation and rarefaction of vessels ( $N=17$  *Nemo*<sup>f</sup>, 12 *Nemo*<sup>hKO</sup>, 9 *Ripk3*<sup>-/-</sup> and 8 *Nemo*<sup>hKO</sup>*Ripk3*<sup>-/-</sup> mice), as well as endothelial proliferation (Ki67<sup>+</sup> endothelial cells;  $N=7$  *Nemo*<sup>f</sup>, 5 *Nemo*<sup>hKO</sup>, 6 *Ripk3*<sup>-/-</sup> and 6 *Nemo*<sup>hKO</sup>*Ripk3*<sup>-/-</sup> mice). **b**, *Ripk3* deletion normalized the survival of *Nemo*<sup>hKO</sup> animals ( $N=13$ ) that was significantly reduced in comparison to control mice ( $N=17$ ; log-rank Mantel-Cox test,  $P=0.015$ ). In contrast, all *Nemo*<sup>hKO</sup>*Ripk3*<sup>-/-</sup> mice ( $N=8$ ) survived. **c**, *Ripk3* deletion largely attenuated the disruption of the BBB in *Nemo*<sup>hKO</sup> mice. Brain weight reflects brain edema ( $N=17$  *Nemo*<sup>f</sup>, 11 *Nemo*<sup>hKO</sup>, 10 *Ripk3*<sup>-/-</sup> and 8 *Nemo*<sup>hKO</sup>*Ripk3*<sup>-/-</sup> mice). IgG and albumin extravasation were determined by immunoblots of brain tissue ( $N=8$  mice per genotype). **d**, RIPK3 ablation abolished glial activation. *Nemo*<sup>hKO</sup> but not *Nemo*<sup>hKO</sup>*Ripk3*<sup>-/-</sup> mice showed a higher number of Iba1<sup>+</sup> microglia/macrophages and an increased area of GFAP<sup>+</sup> astrocytes ( $N=7$  *Nemo*<sup>f</sup>, 5 *Nemo*<sup>hKO</sup>, 6 *Ripk3*<sup>-/-</sup> and 6 *Nemo*<sup>hKO</sup>*Ripk3*<sup>-/-</sup> mice). **e**, Immunostainings of ZO-1 and occludin obtained by expansion microscopy in *Nemo*<sup>f</sup> and *Nemo*<sup>hKO</sup> mice, representative of a dataset of three animals for each genotype. Scale bar, 10  $\mu\text{m}$  (corresponding to approximately a 2.5- $\mu\text{m}$  initial size). We classified tight junction structures as occludin interruptions or disintegrations shown as blurring of the occludin structure (middle). **f**, *Nemo*<sup>hKO</sup>*Ripk3*<sup>-/-</sup> mice showed less IgG extravasation than *Nemo*<sup>hKO</sup> mice and a similar decrease in the number of IgG vesicles in brain endothelial cells as *Nemo*<sup>hKO</sup> mice. Scale bar, 10  $\mu\text{m}$ . IgG extravasation was measured in IgG immunostainings as fluorescence intensity outside the vasculature normalized for parenchymal volume, and IgG vesicles were quantified inside vessels and normalized for the vessel volume ( $N=6$  *Nemo*<sup>f</sup>, 8 *Nemo*<sup>hKO</sup>, 4 *Ripk3*<sup>-/-</sup> and 3 *Nemo*<sup>hKO</sup>*Ripk3*<sup>-/-</sup> mice). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ . Means  $\pm$  s.e.m. are shown. Detailed information on the exact test statistics, sidedness and values is provided in Supplementary Table 5.



cells, a prominent upregulation of GFAP indicated the activation of astrocytes, in line with the finding that GFAP concentrations are elevated in the blood of patients with COVID-19 (ref. 27). An increased BBB permeability and astrocyte activation may cause epileptic seizures in patients with COVID-19 as in *incontinentia pigmenti*<sup>26,28</sup>. MPM-mediated damage of brain endothelial cells suggests that inhibitors of MPM may prevent neurological complications of the SARS-CoV-2 infection<sup>29</sup>. Another therapeutic approach may arise from the observation that deletion of *Ripk3* or inhibition of RIPK1 profoundly improved the microvascular pathology. RIPK1 inhibitors are available and have already entered clinical testing<sup>30,31</sup> suggesting potential therapeutic options for COVID-19 as well as for *incontinentia pigmenti*.

data and code availability are available at <https://doi.org/10.1038/s41593-021-00926-1>.

Received: 12 November 2020; Accepted: 24 August 2021; Published online: 21 October 2021

**Online content**  
Any methods, additional references, Nature Research reporting summaries, source data, extended data, supplementary information, acknowledgements, peer review information; details of author contributions and competing interests; and statements of

References

- Helms, J. et al. Neurologic features in severe SARS-CoV-2 infection. *N. Engl. J. Med.* **382**, 2268–2270 (2020).
- Paterson, R. W. et al. The emerging spectrum of COVID-19 neurology: clinical, radiological and laboratory findings. *Brain* **143**, 3104–3120 (2020).
- Iadecola, C., Anrather, J. & Kamel, H. Effects of COVID-19 on the nervous system. *Cell* **183**, 16–27 (2020).
- Nalbandian, A. et al. Post-acute COVID-19 syndrome. *Nat. Med.* **27**, 601–615 (2021).
- Paniz-Mondolfi, A. et al. Central nervous system involvement by severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2). *J. Med. Virol.* **92**, 699–702 (2020).
- Puelles, V. G. et al. Multiorgan and renal tropism of SARS-CoV-2. *N. Engl. J. Med.* **383**, 590–592 (2020).
- Andersson, M. I. et al. SARS-CoV-2 RNA detected in blood samples from patients with COVID-19 is not associated with infectious virus. *Wellcome Open Res.* **5**, 181 (2020).

8. Cantuti-Castelvetri, L. et al. Neuropilin-1 facilitates SARS-CoV-2 cell entry and infectivity. *Science* **370**, 856–860 (2020).
9. Meinhardt, J. et al. Olfactory transmucosal SARS-CoV-2 invasion as a port of central nervous system entry in individuals with COVID-19. *Nat. Neurosci.* **24**, 168–175 (2021).
10. Song, E. et al. Neuroinvasion of SARS-CoV-2 in human and mouse brain. *J. Exp. Med.* **218**, e20202135 (2021).
11. Ackermann, M. et al. Pulmonary vascular endothelialitis, thrombosis, and angiogenesis in COVID-19. *N. Engl. J. Med.* **383**, 120–128 (2020).
12. Varga, Z. et al. Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19. *Lancet* **395**, 1417–1418 (2020).
13. Radmanesh, A. et al. COVID-19-associated diffuse leukoencephalopathy and microhemorrhages. *Radiology* **297**, E223–E227 (2020).
14. Conte, G. et al. COVID-19-associated PRES-like encephalopathy with perivascular gadolinium enhancement. *AINR Am. J. Neuroradiol.* **41**, 2206–2208 (2020).
15. Conklin, J. et al. Susceptibility-weighted imaging reveals cerebral microvascular injury in severe COVID-19. *J. Neurol. Sci.* **421**, 117308 (2021).
16. Jaunmuktane, Z. et al. Microvascular injury and hypoxic damage: emerging neuropathological signatures in COVID-19. *Acta Neuropathol.* **140**, 397–400 (2020).
17. Reichard, R. R. et al. Neuropathology of COVID-19: a spectrum of vascular and acute disseminated encephalomyelitis (ADEM)-like pathology. *Acta Neuropathol.* **140**, 1–6 (2020).
18. Korallnik, I. J. & Tyler, K. L. COVID-19: a global threat to the nervous system. *Ann. Neurol.* **88**, 1–11 (2020).
19. Matschke, J. et al. Neuropathology of patients with COVID-19 in Germany: a postmortem case series. *Lancet Neurol.* **19**, 919–929 (2020).
20. Zhang, L. et al. Crystal structure of SARS-CoV-2 main protease provides a basis for design of improved alpha-ketoamide inhibitors. *Science* **368**, 409–412 (2020).
21. Wu, J. & Chen, Z. J. Innate immune sensing and signaling of cytosolic nucleic acids. *Annu. Rev. Immunol.* **32**, 461–488 (2014).
22. Kondylis, V., Kumari, S., Vlantis, K. & Pasparakis, M. The interplay of IKK, NF- $\kappa$ B and RIPK1 signaling in the regulation of cell death, tissue homeostasis and inflammation. *Immunol. Rev.* **277**, 113–127 (2017).
23. Brown, W. R. A review of string vessels or collapsed, empty basement membrane tubes. *J. Alzheimers Dis.* **21**, 725–739 (2010).
24. Shilts, J., Crozier, T. W. M., Greenwood, E. J. D., Lehner, P. J. & Wright, G. J. No evidence for basigin/CD147 as a direct SARS-CoV-2 spike binding receptor. *Sci. Rep.* **11**, 413 (2021).
25. Hamming, I. et al. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. *J. Pathol.* **203**, 631–637 (2004).
26. Hoffmann, M. et al. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell* **181**, 271–280 (2020).
27. Wang, K. et al. CD147-spike protein is a novel route for SARS-CoV-2 infection to host cells. *Signal Transduct. Target Ther.* **5**, 283 (2020).
28. Lake, B. B. et al. Integrative single-cell analysis of transcriptional and epigenetic states in the human adult brain. *Nat. Biotechnol.* **36**, 70–80 (2018).
29. He, L. et al. Pericyte-specific vascular expression of SARS-CoV-2 receptor ACE2—implications for microvascular inflammation and hypercoagulopathy in COVID-19. Preprint at *bioRxiv* <https://doi.org/10.1101/2020.05.11.088500> (2020).
30. Kaneko, N. et al. Flow-mediated susceptibility and molecular response of cerebral endothelia to SARS-CoV-2 infection. *Stroke* **52**, 260–270 (2021).
31. McCracken, I. R. et al. Lack of evidence of angiotensin-converting enzyme 2 expression and replicative infection by SARS-CoV-2 in human endothelial cells. *Circulation* **143**, 865–868 (2021).
32. Conde, I. N., Schutt, W. R., Gorbunova, E. E. & Mackow, E. R. Recombinant ACE2 expression is required for SARS-CoV-2 to infect primary human endothelial cells and induce inflammatory and procoagulative responses. *mBio* **11**, e03185–03120 (2020).
33. Krichel, B., Falke, S., Hilgenfeld, R., Redecke, L. & Uetrecht, C. Processing of the SARS-CoV pp1a/ab nsp7-10 region. *Biochem. J.* **477**, 1009–1019 (2020).
34. Hadjadj, J. et al. Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients. *Science* **369**, 718–724 (2020).
35. Gordon, D. E. et al. A SARS-CoV-2 protein interaction map reveals targets for drug repurposing. *Nature* **583**, 459–468 (2020).
36. Körbelin, J. et al. A brain microvasculature endothelial cell-specific viral vector with the potential to treat neurovascular and neurological diseases. *EMBO Mol. Med.* **8**, 609–625 (2016).
37. Ridder, D. A. et al. Brain endothelial TAK1 and NEMO safeguard the neurovascular unit. *J. Exp. Med.* **212**, 1529–1549 (2015).
38. Rothhammer, V. et al. Microglial control of astrocytes in response to microbial metabolites. *Nature* **557**, 724–728 (2018).
39. Welz, P. S. et al. FADD prevents RIP3-mediated epithelial cell necrosis and chronic intestinal inflammation. *Nature* **477**, 330–334 (2011).
40. Mifflin, L., Ofengeim, D. & Yuan, J. Receptor-interacting protein kinase 1 (RIPK1) as a therapeutic target. *Nat. Rev. Drug Discov.* **19**, 553–571 (2020).
41. Villaseñor, R. et al. Trafficking of endogenous immunoglobulins by endothelial cells at the blood–brain barrier. *Sci. Rep.* **6**, 25658 (2016).
42. Martens, S., Hofmans, S., Declercq, W., Augustyns, K. & Vandenberghe, P. Inhibitors targeting RIPK1/RIPK3: old and new drugs. *Trends Pharmacol. Sci.* **41**, 209–224 (2020).
43. Alarcon-Martinez, L. et al. Interpericyte tunnelling nanotubes regulate neurovascular coupling. *Nature* **585**, 91–95 (2020).
44. Gao, X. et al. Reduction of neuronal activity mediated by blood-vessel regression in the brain. Preprint at *bioRxiv* <https://doi.org/10.1101/2020.09.15.262782> (2020).
45. Colmenero, I. et al. SARS-CoV-2 endothelial infection causes COVID-19 chilblains: histopathological, immunohistochemical and ultrastructural study of seven paediatric cases. *Br. J. Dermatol.* **183**, 729–737 (2020).
46. Yeung, M. L. et al. Soluble ACE2-mediated cell entry of SARS-CoV-2 via interaction with proteins related to the renin–angiotensin system. *Cell* **184**, 2212–2228 (2021).
47. Daly, J. L. et al. Neuropilin-1 is a host factor for SARS-CoV-2 infection. *Science* **370**, 861–865 (2020).
48. Zhang, J. et al. A systemic and molecular study of subcellular localization of SARS-CoV-2 proteins. *Signal Transduct. Target Ther.* **5**, 269 (2020).
49. Miyamoto, S. Nuclear initiated NF- $\kappa$ B signaling: NEMO and ATM take center stage. *Cell Res.* **21**, 116–130 (2011).
50. Arunachalam, P. S. et al. Systems biological assessment of immunity to mild versus severe COVID-19 infection in humans. *Science* **369**, 1210–1220 (2020).
51. Wang, D. et al. Porcine epidemic diarrhoea virus 3C-like protease regulates its interferon antagonism by cleaving NEMO. *J. Virol.* **90**, 2090–2101 (2016).
52. Zhu, X. et al. Porcine deltacoronavirus nsp5 inhibits interferon-beta production through the cleavage of NEMO. *Virology* **502**, 33–38 (2017).
53. Chen, S. et al. Feline infectious peritonitis virus Nsp5 inhibits type I interferon production by cleaving NEMO at multiple sites. *Viruses* **12**, 43 (2019).
54. Gareus, R. et al. Endothelial cell-specific NF- $\kappa$ B inhibition protects mice from atherosclerosis. *Cell Metab.* **8**, 372–383 (2008).
55. van Loo, G. et al. Inhibition of transcription factor NF- $\kappa$ B in the central nervous system ameliorates autoimmune encephalomyelitis in mice. *Nat. Immunol.* **7**, 954–961 (2006).
56. Meuwissen, M. E. & Mancini, G. M. Neurological findings in *incontinentia pigmenti*, a review. *Eur. J. Med. Genet.* **55**, 323–331 (2012).
57. Kanberg, N. et al. Neurochemical evidence of astrocytic and neuronal injury commonly found in COVID-19. *Neurology* **95**, e1754–e1759 (2020).
58. Senatorov, V. V. Jr. et al. Blood–brain barrier dysfunction in aging induces hyperactivation of TGF $\beta$  signaling and chronic yet reversible neural dysfunction. *Sci. Transl. Med.* **11**, eaaw8283 (2019).
59. Nampoothiri, S. et al. The hypothalamus as a hub for SARS-CoV-2 brain infection and pathogenesis. Preprint at *bioRxiv* <https://doi.org/10.1101/2020.06.08.139329> (2020).

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2021

## Methods

**Patients.** The clinical details of SARS-CoV-2-infected and control patients are summarized in Supplementary Table 1. SARS-CoV-2 infection was diagnosed by RT-PCR from pharyngeal swabs. The results of a systematic neurological examination were not available. Patients were autopsied at the University Medical Center Hamburg-Eppendorf or at the University Medical Center Göttingen. SARS-CoV-2-infected patients had partially been included in previous studies<sup>48,49</sup>. The study was approved by the local ethics committees in Hamburg and Göttingen (Hamburg approval no. PV7311; Göttingen approval no. 42/8/20). Control participants were matched to SARS-CoV-2-infected patients according to age and sex. Comorbidities did not differ between the groups, but more SARS-CoV-2-infected patients were ventilated than controls (Supplementary Table 2). Brains were fixed in buffered 4% formaldehyde, examined macroscopically and underwent routine neuropathological workup that did not show morphological signs of a global hypoxic-ischemic encephalopathy in any case (Extended Data Fig. 2). We analyzed 3–12- $\mu$ m-thick paraffin-embedded sections of the frontal lobe. The section thickness did not differ between groups (Supplementary Table 2). String vessel measurements were normalized to image volume.

For immunoblotting, frozen tissue samples of medulla oblongata from patients deceased with/from COVID-19 or controls were homogenized in cold RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% Na-deoxycholate and 0.1% SDS) supplemented with protease and phosphatase inhibitor (Complete mini EDTA-free, PhosSTOP, Roche). Samples were incubated on ice for 30 min and centrifuged at 12,000g at 4°C for 10 min. The resulting supernatant was mixed with Laemmli sample buffer and denatured for 10 min at 96°C.

**Animals. Transgenic mouse models.** Mice were housed in individually ventilated Green Line cages (Tecniplast) under a 12-h light–dark cycle and fed an autoclaved pelleted mouse diet ad libitum. We performed all studies in accordance with the German Animal Welfare Act and the corresponding regulations. Experimental procedures were approved by the local animal ethics committee (Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume, Kiel, Germany). All mouse lines were established on a C57BL/6 background. In all experiments, adult littermate mice at the age of 6 to 24 weeks were used that were matched by age and sex between experimental groups. Unless stated otherwise, male and female mice were used.

For brain endothelial knockout of *Ikbkg* (*Nemo*) and *Fadd*, mice with the respective *loxP*-flanked alleles<sup>50,51</sup> were crossed with the BAC-transgenic *Slo1c1*-CreER<sup>2</sup> strain<sup>52</sup>, which expresses the tamoxifen-inducible CreER<sup>2</sup> recombinase under the control of the mouse *Slo1c1* regulatory sequences in brain endothelial cells and epithelial cells of the choroid plexus. *Ripk3*<sup>−/−</sup> mice have been reported previously<sup>53</sup>. Tamoxifen (dissolved in 90% Miglyol 812 with 10% ethanol, 50 mg per kg body weight, intraperitoneally (i.p.), twice per day for five consecutive days; Sigma-Aldrich) was injected to induce recombination. After receiving tamoxifen, *Nemo*<sup>fl/fl</sup>; *Slo1c1*-CreER<sup>2</sup> mice were indicated as *Nemo*<sup>fl/Δ</sup>, while control littermates lacking the Cre recombinase but receiving tamoxifen injection were termed *Nemo*<sup>fl/fl</sup>. If not mentioned otherwise, mice were perfused 14 d after receiving the first dose of tamoxifen.

For microglia depletion, mice were fed the CSF-1R inhibitor PLX5622-containing (1,200 ppm) AIN-76A rodent diet (D111004041) 14 d before the start of tamoxifen injection. Controls received a control diet (OpenSource Diets, D10001i). Mice received pimonidazole HCl (100 mg ml<sup>−1</sup> in 0.9% NaCl; Hypoxyprobe) 1 h before perfusion (i.p., 60  $\mu$ g per gram of body weight).

For RIPK inhibition, a specific RIPK1 inhibitor (GSK547, RA15777187)<sup>54,55</sup> was suspended in 0.6% methyl cellulose and mice were treated with 60 mg per kg body weight every 12 h by oral gavage. For control treatment we used methyl cellulose. Treatment started 1 d before injection of viral vectors and was stopped at the day of perfusion 2 weeks after viral injection.

**SARS-CoV-2 infection.** Male 8- to 10-week-old golden Syrian hamsters and K18-hACE2-expressing C57BL/6 mice (B6.Cg-Tg(K18-hACE2)2PrImn/J) were purchased from the Janvier Laboratory (Le Genest-St-Isle, France) and the Jackson Laboratory, respectively. The BetaCoV/France/IDF0372/2020 strain of SARS-CoV-2 was supplied by the French National Reference Center for Respiratory Viruses hosted by the Institut Pasteur (Paris, France). Hamsters were anesthetized by i.p. injection of ketamine (100 mg per kg body weight), atropine (0.75 mg per kg body weight) and diazepam (2.5 mg per kg body weight) and intranasally infected with 100  $\mu$ l of DMEM containing (or not, in mock samples)  $2 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub> (50% tissue culture infectious dose) of SARS-CoV-2. Male 8- to 10-week-old mice were anesthetized by i.p. injection of ketamine (100 mg per kg body weight) and xylazine (10 mg per kg body weight) and intranasally infected with 50  $\mu$ l of DMEM containing  $5 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub> of SARS-CoV-2. For brain preparation, animals were euthanized by i.p. injection of pentobarbital (140 mg per kg body weight) on day 2, 4, 7 or 24 after infection.

All experiments were performed within the biosafety level 3 suite on the Institut Pasteur de Lille campus and complied with current national and institutional regulations and ethical guidelines (Institut Pasteur de Lille/B59-350009). The protocols were approved by the institutional ethical committee (Comité d'Éthique en Experimentation Animale 75, Nord Pas-de-Calais, France)

and authorized by the 'Education, Research and Innovation Ministry' (APAFIS no. 25041-2020040917227851; APAFIS no. 25517-2020052608325772 v3).

**Plasmid construction and AAV vector production.** Plasmids (pCAG-M<sup>fl</sup>-HA and pCAG-p.Cys145Ala-M<sup>fl</sup>-HA; Vectorbuilder) contained inverted terminal repeats of AAV2, the 1,733-bp-long CAG promoter<sup>56</sup>, a Kozak sequence with an ATG followed by the native SARS-CoV-2 sequence encoding M<sup>fl</sup> (gene ID: 43740578) or a mutated M<sup>fl</sup> (codon of Cys145 (TGT) changed to Ala145 (GCT)). The 3'-end was labeled with a HA tag and a TAA codon followed by WPRE and the bovine growth hormone polyadenylation signal. We produced AAV vectors by triple transfection of HEK293T cells or Sf9 insect cells as described before<sup>56,57,58</sup>.

Genomic titers were determined by quantitative PCR against CAG (forward primer: 5'-AACGCCAATAGGGACTTTTC-3'; reverse primer: 5'-GTAGGAAAGTCCATAAGGTCA-3'). Vectors were injected into the tail veins of mice (1.8 or  $3.3 \times 10^{11}$  genomic particles per mouse, 100  $\mu$ l). Except in the experiment using *Ripk3*<sup>−/−</sup> mice (Fig. 7a,b), for which we used male and female mice, only male C57BL/6 mice were used for vector injection. Mice were perfused under deep anesthesia with PBS and paraformaldehyde (PFA, 2% or 4%) 2 weeks after administering the vector. Total DNA of a sagittal brain section (50- $\mu$ m thick) was extracted using the DNeasy tissue kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. We quantified DNA with a spectral photometer (Nanodrop ND-2000C, Peqlab) as described previously<sup>59</sup>.

**Cell culture and transfection. hCMEC/D3 and bEnd.3 cells.** The human brain endothelial cell line hCMEC/D3 (Merck SCC066, RRID: CVCL\_U985) and the mouse brain endothelial cell line bEnd.3 (American Type Culture Collection (ATCC), CRL-2299, RRID: CVCL\_0170) were cultivated as described previously<sup>30,31</sup>. We used 24-well plates for luciferase assays, 48-well or 96-well plates or chamber slides for immunocytochemistry and 6-well or 12-well plates for immunoblotting.

After withdrawing heparin (hCMEC/D3) or penicillin–streptomycin (bEnd.3) from the medium, we transfected the cells using Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific) and the following plasmids: pNF- $\kappa$ B-Luciferase (200 ng per well; Stratagene), pCAG-hACE2-TMPRSS2 (100 ng per well on 8-well chamber slides; 2,500 ng per well on 6-well plates, InvivoGen), pCAG-GFP, pCAG-p.Cys145Ala-M<sup>fl</sup>-HA or pCAG-M<sup>fl</sup>-HA (400 ng per well on 24-well and 48-well plates; 1,000 ng per well on 12-well plates), pCAG-NEMO-2A-eGFP (1,000 ng per well on 12-well plates)<sup>60</sup> and pRL-SV40 (40 ng per well). The DNA was filled up with pBluescript to equal amounts per well. One day after lipofection, we treated the cells with IL-1 $\beta$  (0.25  $\mu$ g ml<sup>−1</sup>; PeproTech) and measured luciferase activity using the Dual Luciferase Reporter Assay (Promega) after 6 h. Immunocytochemistry of p65 or the TUNEL reaction was performed after stimulating cells for 30 min with IL-1 $\beta$  (0.25  $\mu$ g ml<sup>−1</sup>) or for 4.5 h with TNF (100 ng ml<sup>−1</sup>), 2–3 d after transfection. For immunoblotting, we lysed cells 2–3 d after transfection.

For infection of hCMEC/D3 cells, SARS-CoV-2 virus was isolated and propagated in Caco2 cells as previously described<sup>61,62</sup>. To infect endothelial cells, the viral stock was diluted to the desired MOI in culture medium supplemented with 1% FCS and incubated for 2 h with the cells 24 h after transfection. Twenty-four hours after infection, endothelial cells were fixed in 4% PFA for 10 min or lysed for immunoblotting in lysis buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 20 mM NaF, 150 mM NaCl, 10 mM NaPPi and 1% Triton X-100).

**Vero E6 cells.** Vero E6 cells (ATCC CRL-1008) cultivated in DMEM containing 3% FCS, 1% penicillin–streptomycin, 2 mM L-glutamine, 1% sodium pyruvate and 1% non-essential amino acids (all Gibco/Thermo Fisher) were seeded in 6-well plates and infected with SARS-CoV-2 isolate HH-1 at a MOI of 1 (ref. 63). At the indicated time points after infection, cells were centrifuged (2,000 r.p.m., 5 min) and lysed in SDS inactivation buffer (6% SDS, 150 mM Tris, pH 6.8, 30% glycerol, 100 mM dithiothreitol (DTT) and bromophenol blue).

**Single-cell RNA sequencing.** Two 10-week-old male C57BL/6 mice were killed by decapitation. The hypothalamic region was microdissected and digested with the Papain Dissociation System (Worthington, LK003150) at 37°C. After triturating, the cell suspension was centrifuged at 700g for 5 min at room temperature, and the supernatant removed. We resuspended the cell pellet (500  $\mu$ l EBSS, 56  $\mu$ l reconstituted albumin–ovomucoid inhibitor solution and 28  $\mu$ l DNase, Papain Dissociation System) and passed it through a 40- $\mu$ m cell strainer. After another centrifugation step (700g for 5 min at room temperature), we resuspended the cell pellet in HBSS containing 5% glucose and stored it on ice.

Single-cell capture was achieved by random distribution of the single-cell suspension across >200,000 microwells through a limited dilution approach with the BD Rhapsody system. Cells were sorted as described by the manufacturer (BD Rhapsody cartridge reagent kit, 633731). In total, 20,448 viable cells were captured. Upon cDNA synthesis (BD Rhapsody cDNA kit; 633773), each cDNA molecule was tagged on the 5' end with a molecular index and cell label indicating its cell of origin<sup>64</sup>. Whole-transcriptome libraries were prepared with half of the beads using the BD Resolve single-cell whole-transcriptome amplification workflow (BD targeted and AbSeq Amplification Kit, 633774) with a random primer

were taken using a STED microscope, custom made by Abberior Instruments. All images were produced using the same setting.

For all analyses, we imaged four fields from two sections per individual unless stated otherwise.

**Non-fluorescence histological staining on human samples.** Histological hematoxylin and eosin staining and Nissl staining were performed as described before<sup>10</sup>. For active caspase-3 staining, deparaffinized tissue sections were treated for antigen retrieval as described above and subsequently with 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> before blocking with PBS containing 10% FCS. Primary antibodies were applied overnight and visualized using the EnVision+ System for rabbit and mouse (Dako). We briefly counterstained sections with hemalaun. To evaluate the number of active caspase-3-positive cells, sections were scanned (magnification of  $\times 200$ ) using the Virtual Slide Microscope VS120. Image visualization and manual analysis were performed using Omero Server software (5.6.3)<sup>11</sup>.

**Super-resolution microscopy.** We used stimulated emission depletion (STED) imaging and expansion microscopy. For STED, 640- and 561-nm diode excitation lasers, a 775-nm STED laser, all pulsed at 40 MHz, and a  $\times 100$  1.4-NA Olympus UPlanSApo were utilized. A spatial light modulator (Hamamatsu) was used to produce either a doughnut-shaped (two-dimensional (2D) STED) or a top-hat (three-dimensional (3D) STED) phase mask, shaping different depletion beams without changing the optical setup. To reduce photobleaching at an optimal signal-to-noise ratio, we used DyMIN adaptive illumination.

For expansion microscopy, after immunofluorescence staining, gelation, digestion and expansion were performed as described previously<sup>12</sup>. Notably, we extended incubation time in monomer solution to 45 min and gelation time to 2.5 h, and digestion was performed overnight. Images were taken with an HC PL APO CS2  $\times 40/1.10$  water objective. Expansion microscopy was used for qualitative representation of occludin and ZO-1 morphology.

**Quantitative analysis of immunostainings.** To analyze IgG transcytosis, z-stacks were taken with an HCX PL APO CS  $\times 63/1.4$  oil objective for confocal microscopy or a  $\times 100$  1.4-NA Olympus UPlanSApo for STED microscopy. Deconvolution was performed for confocal images by Huygens Software (Scientific Volume Imaging). IgG vesicle quantification was performed using Imapris 9.3.0 (Bitplane) as described before<sup>13</sup>. The 3D vasculature mask was smoothed under surface details (1.0  $\mu$ m confocal/0.4  $\mu$ m for STED), and spots were identified with an estimated diameter of 0.5  $\mu$ m. IgG<sup>+</sup> vesicles and IgG extravasation were quantified on 10–15 images on one section for each animal (confocal) or three images for each animal (STED).

String vessels and their localization in the vascular tree, vessel length, vessel diameter, occludin interruptions and GFAP<sup>+</sup> astrocytes were analyzed using ImageJ. Mouse and hamster string vessels were analyzed as before<sup>14</sup>.

For vascular tree analysis, string vessels were counted manually and tracked in tile scans of the cortex, hippocampus and hypothalamus (one section per animal). As the starting point of the vascular tree, we chose  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup> vessels, indicating arterioles. The number of string vessels was normalized to the total area of the image.

Because CD34 staining was unreliable in human brain sections, human string vessels were identified as collagen IV<sup>+</sup> positive tubes of  $<4 \mu$ m in apparent outer diameter in images produced by confocal laser scanning microscopy. Because the theoretical minimal diameter for a functional capillary is 2.7  $\mu$ m and more than 90% of brain capillaries in aged humans have an inner diameter of  $>3.5 \mu$ m, we expect this threshold to be selective for string vessels<sup>15,16</sup>.

Vessel diameter was measured by using the DiameterJ plugin for ImageJ. For the TUNEL analysis, collagen IV<sup>+</sup> and TUNEL<sup>+</sup> vessels were counted and normalized to the total image area.

GFAP-positive astrocytes were quantified as the percentage of the GFAP<sup>+</sup> area relative to the total area of the image. Quantifications were obtained from 4–6 images per animal (one section per animal). Images were taken from the cortex if not stated otherwise.

Pericyte coverage was analyzed using MotionTracking software (MPI-CBG, v8). In general, the CD13<sup>+</sup> area inside the collagen IV<sup>+</sup> vessels was normalized to the total collagen IV<sup>+</sup> area. For measuring occludin interruptions, the lengths of occludin and ZO-1 tight junctions were traced manually by using the Simple Neurite Tracer plugin (ImageJ). Then, occludin length was normalized to ZO-1 length for 15 images per animal (one section per animal).

For the soma size measurement of Iba1<sup>+</sup> cells, confocal imaging was obtained with 25 steps and a step size of 0.99  $\mu$ m. Maximal-intensity z-stacks were generated using ImageJ. A threshold was applied (Li autothreshold), converted to a mask and speckles and outliers removed. Then, all the processes were removed from the soma and the soma area was measured for 15 microglia per sample.

**Electron microscopy.** For electron microscopy, mice were perfused with heparinized Ringer's solution and with freshly prepared PFA and glutaraldehyde (2.5% glutaraldehyde and 2% PFA in PBS). Until further processing, brains were postfixated in Monti-Graziadei solution (2% glutaraldehyde, 0.6% PFA, 0.03% calcium chloride in 0.06 M sodium cacodylate buffer, pH 7.35) for at least 48 h at 4°C. After further fixation in 1% osmium tetroxide in 0.1 M cacodylate buffer

for 2 h, samples (approximately 1 mm<sup>3</sup>) were dehydrated in an ascending series of ethanol and incubated in propylene oxide followed by a 1:1 mixture of propylene oxide and araldite (Sigma-Aldrich) and subsequently embedded in araldite. Ultrathin sections were cut at approximately 80 nm and were transferred to copper grids. Sections were contrasted in a contrasting system for ultrathin sections using uranyl acetate ready-to-use solution, followed by lead citrate ready-to-use solution (all Leica Microsystems). Images of vessels smaller than 10  $\mu$ m were taken by an electron microscope (Jeol JEM 1011). After putting images of a vessel into a collage by using Inkscape 1.0.1 (RRID: SCR\_014479), vesicles in the range of 30–200 nm were manually counted from three capillaries for each animal, and luminal membrane length was measured using ImageJ.

**Statistics and reproducibility.** No statistical methods were used to predetermine sample sizes, but our sample sizes are similar to those reported in previous publications<sup>17,18</sup>. Data were analyzed using Prism 8 (GraphPad) and SPSS 25 (IBM). Significance was considered when  $P < 0.05$ . Depending on the dataset and experimental design, different statistical methods were used as indicated in Supplementary Table 5. Parametric statistics (for example, t-test and ANOVA) were only applied if assumptions were met, that is, datasets were examined for Gaussian distribution using the D'Agostino–Pearson test, aided by visual inspection of the data and homogeneity of variances by Brown–Forsythe, Levene's or F-test (depending on the statistical method used). If assumptions for parametric procedures were not met or could not be reliably assumed due to small sample size, non-parametric methods were used as indicated. Two-tailed tests were applied if not indicated otherwise. Greenhouse–Geisser correction was used in ANOVA statistics if the sphericity assumption was violated (Mauchly test). No data points were excluded. Cell culture studies were performed at least three times in independent experiments with at least three replicates per condition and per experiment unless stated otherwise. Animal experiments were repeated as stated by the N number. Animals were randomly allocated to diet or treatment groups as long as age-matched, sex-matched and littermate conditions were fulfilled. All analyses were performed blinded without the knowledge of the genotype, treatment or infection status if not needed for subsequent processing.

**Reporting Summary.** Further information on research design is available in the Nature Research Reporting Summary linked to this article.

## Data availability

The data that support the findings of this study are available from the authors on reasonable request. RNA-seq data are available at the GEO under accession GSE180984. Source data are provided with this paper.

## References

- Schmidt-Supprian, M. et al. NEMO/IKK $\gamma$ -deficient mice model *incontinentia pigmenti*. *Mol. Cell* **5**, 981–992 (2000).
- Luedde, T. et al. Deletion of NEMO/IKK $\gamma$  in liver parenchymal cells causes steatohepatitis and hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell* **11**, 119–132 (2007).
- Ridder, D. A. et al. TAK1 in brain endothelial cells mediates fever and lethargy. *J. Exp. Med.* **208**, 2615–2623 (2011).
- Newton, K., Sun, X. & Dixit, V. M. Kinase RIP3 is dispensable for normal NF- $\kappa$ Bs, signaling by the B cell and T cell receptors, tumor necrosis factor receptor 1, and Toll-like receptors 2 and 4. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 1464–1469 (2004).
- Zelic, M. et al. RIPK1 activation mediates neuroinflammation and disease progression in multiple sclerosis. *Cell Rep.* **35**, 109112 (2021).
- Wang, W. et al. RIP1 kinase drives macrophage-mediated adaptive immune tolerance in pancreatic cancer. *Cancer Cell* **34**, 757–774 (2018).
- Qin, J. Y. et al. Systematic comparison of constitutive promoters and the doxycycline-inducible promoter. *PLoS ONE* **5**, e10611 (2010).
- Dogbevia, G. K. et al. Gene therapy decreases seizures in a model of *incontinentia pigmenti*. *Ann. Neurol.* **82**, 93–104 (2017).
- Korte, J., Mienert, J., Hennigs, J. K. & Korbelin, J. Inactivation of adeno-associated viral vectors by oxidant-based disinfectants. *Hum. Gene Ther.* **32**, 771–781 (2021).
- Dogbevia, G., Grasshoff, H., Othman, A., Penno, A. & Schwabinger, M. Brain endothelial specific gene therapy improves experimental Sandhoff disease. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **40**, 1338–1350 (2020).
- Bojkova, D. et al. Proteomics of SARS-CoV-2-infected host cells reveals therapy targets. *Nature* **583**, 469–472 (2020).
- Hoehl, S. et al. Evidence of SARS-CoV-2 infection in returning travelers from Wuhan, China. *N. Engl. J. Med.* **382**, 1278–1280 (2020).
- Pfefferle, S. et al. Complete genome sequence of a SARS-CoV-2 strain isolated in northern Germany. *Microbiol. Resour. Annot.* **9**, e00520–20 (2020).
- Fan, H. C., Fu, G. K. & Fodor, S. P. Expression profiling. Combinatorial labeling of single cells for gene expression cytometry. *Science* **347**, 1258367 (2015).
- Munawar, A. et al. Elapid snake venom analyses show the specificity of the peptide composition at the level of genera *Naja* and *Notechis*. *Toxins* **6**, 850–868 (2014).

were taken using a STED microscope, custom made by Abberior Instruments. All images were produced using the same setting.

For all analyses, we imaged four fields from two sections per individual unless stated otherwise.

**Non-fluorescence histological staining on human samples.** Histological hematoxylin and eosin staining and Nissl staining were performed as described before<sup>30</sup>. For active caspase-3 staining, deparaffinized tissue sections were treated for antigen retrieval as described above and subsequently with 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> before blocking with PBS containing 10% FCS. Primary antibodies were applied overnight and visualized using the EnVision+ System for rabbit and mouse (Dako). We briefly counterstained sections with hemalaun. To evaluate the number of active caspase-3-positive cells, sections were scanned (magnification of  $\times 200$ ) using the Virtual Slide Microscope VS120. Image visualization and manual analysis were performed using Omero Server software (5.6.3)<sup>31</sup>.

**Super-resolution microscopy.** We used stimulated emission depletion (STED) imaging and expansion microscopy. For STED, 640- and 561-nm diode excitation lasers, a 775-nm STED laser, all pulsed at 40 MHz, and a  $\times 100$  1.4-NA Olympus UPlanSApo were utilized. A spatial light modulator (Hamamatsu) was used to produce either a doughnut-shaped (two-dimensional (2D) STED) or a top-hat (three-dimensional (3D) STED) phase mask, shaping different depletion beams without changing the optical setup. To reduce photobleaching at an optimal signal-to-noise ratio, we used DyMIN adaptive illumination.

For expansion microscopy, after immunofluorescence staining, gelation, digestion and expansion were performed as described previously<sup>7</sup>. Notably, we extended incubation time in monomer solution to 45 min and gelation time to 2.5 h, and digestion was performed overnight. Images were taken with an HC PL APO CS2  $\times 40/1.10$  water objective. Expansion microscopy was used for qualitative representation of occludin and ZO-1 morphology.

**Quantitative analysis of immunostainings.** To analyze IgG transcytosis,  $z$ -stacks were taken with an HCX PL APO CS  $\times 63/1.4$  oil objective for confocal microscopy or a  $\times 100$  1.4-NA Olympus UPlanSApo for STED microscopy. Deconvolution was performed for confocal images by Huygens Software (Scientific Volume Imaging). IgG vesicle quantification was performed using Imaris 9.3.0 (Bitplane) as described before<sup>41</sup>. The 3D vasculature mask was smoothed under surface details (1.0  $\mu$ m confocal/0.4  $\mu$ m for STED), and spots were identified with an estimated diameter of 0.5  $\mu$ m. IgG<sup>+</sup> vesicles and IgG extravasation were quantified on 10–15 images on one section for each animal (confocal) or three images for each animal (STED).

String vessels and their localization in the vascular tree, vessel length, vessel diameter, occludin interruptions and GFAP<sup>+</sup> astrocytes were analyzed using ImageJ. Mouse and hamster string vessels were analyzed as before<sup>7</sup>.

For vascular tree analysis, string vessels were counted manually and tracked in tile scans of the cortex, hippocampus and hypothalamus (one section per animal). As the starting point of the vascular tree, we chose  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup> vessels, indicating arterioles. The number of string vessels was normalized to the total area of the image.

Because CD34 staining was unreliable in human brain sections, human string vessels were identified as collagen IV-positive tubes of  $<4 \mu$ m in apparent outer diameter in images produced by confocal laser scanning microscopy. Because the theoretical minimal diameter for a functional capillary is 2.7  $\mu$ m and more than 90% of brain capillaries in aged humans have an inner diameter of  $>3.5 \mu$ m, we expect this threshold to be selective for string vessels<sup>37,39</sup>.

Vessel diameter was measured by using the DiameterJ plugin for ImageJ. For the TUNEL analysis, collagen IV<sup>+</sup> and TUNEL<sup>+</sup> vessels were counted and normalized to the total image area.

GFAP-positive astrocytes were quantified as the percentage of the GFAP<sup>+</sup> area relative to the total area of the image. Quantifications were obtained from 4–6 images per animal (one section per animal). Images were taken from the cortex if not stated otherwise.

Pericyte coverage was analyzed using MotionTracking software (MPI-CBG, v8). In general, the CD13<sup>+</sup> area inside the collagen IV<sup>+</sup> vessels was normalized to the total collagen IV<sup>+</sup> area. For measuring occludin interruptions, the lengths of occludin and ZO-1 tight junctions were traced manually by using the Simple Neurite Tracer plugin (ImageJ). Then, occludin length was normalized to ZO-1 length for 15 images per animal (one section per animal).

For the soma size measurement of Iba1<sup>+</sup> cells, confocal imaging was obtained with 25 steps and a step size of 0.99  $\mu$ m. Maximal-intensity  $z$ -stacks were generated using ImageJ. A threshold was applied (Li autothreshold), converted to a mask and speckles and outliers removed. Then, all the processes were removed from the soma and the soma area was measured for 15 microglia per sample.

**Electron microscopy.** For electron microscopy, mice were perfused with heparinized Ringer's solution and with freshly prepared PFA and glutaraldehyde (2.5% glutaraldehyde and 2% PFA in PBS). Until further processing, brains were postfixed in Monti-Graziadei solution (2% glutaraldehyde, 0.6% PFA, 0.03% calcium chloride in 0.06 M sodium cacodylate buffer, pH 7.35) for at least 48 h at 4°C. After further fixation in 1% osmium tetroxide in 0.1 M cacodylate buffer

for 2 h, samples (approximately 1 mm<sup>3</sup>) were dehydrated in an ascending series of ethanol and incubated in propylene oxide followed by a 1:1 mixture of propylene oxide and araldite (Sigma-Aldrich) and subsequently embedded in araldite.

Ultrathin sections were cut at approximately 80 nm and were transferred to copper grids. Sections were contrasted in a contrasting system for ultrathin sections using uranyl acetate ready-to-use solution, followed by lead citrate ready-to-use solution (all Leica Microsystems). Images of vessels smaller than 10  $\mu$ m were taken by an electron microscope (Jeol JEM 1011). After putting images of a vessel into a collage by using Inkscape 1.0.1 (RRID: SCR\_014479), vesicles in the range of 30–200 nm were manually counted from three capillaries for each animal, and luminal membrane length was measured using ImageJ.

**Statistics and reproducibility.** No statistical methods were used to predetermine sample sizes, but our sample sizes are similar to those reported in previous publications<sup>34,48</sup>. Data were analyzed using Prism 8 (GraphPad) and SPSS 25 (IBM). Significance was considered when  $P < 0.05$ . Depending on the dataset and experimental design, different statistical methods were used as indicated in Supplementary Table 5. Parametric statistics (for example,  $t$ -test and ANOVA) were only applied if assumptions were met, that is, datasets were examined for Gaussian distribution using the D'Agostino–Pearson test, aided by visual inspection of the data and homogeneity of variances by Brown–Forsythe, Levene's or  $F$ -test (depending on the statistical method used). If assumptions for parametric procedures were not met or could not be reliably assumed due to small sample size, non-parametric methods were used as indicated. Two-tailed tests were applied if not indicated otherwise. Greenhouse–Geisser correction was used in ANOVA statistics if the sphericity assumption was violated (Mauchly test). No data points were excluded. Cell culture studies were performed at least three times in independent experiments with at least three replicates per condition and per experiment unless stated otherwise. Animal experiments were repeated as stated by the  $N$  number. Animals were randomly allocated to diet or treatment groups as long as age-matched, sex-matched and littermate conditions were fulfilled. All analyses were performed blinded without the knowledge of the genotype, treatment or infection status if not needed for subsequent processing.

**Reporting Summary.** Further information on research design is available in the Nature Research Reporting Summary linked to this article.

## Data availability

The data that support the findings of this study are available from the authors on reasonable request. RNA-seq data are available at the GEO under accession GSE180984. Source data are provided with this paper.

## References

- Schmidt-Supprian, M. et al. NEMO/IKK $\gamma$ -deficient mice model *incontinencia pigmenti*. *Mol. Cell* **5**, 981–992 (2000).
- Luedde, T. et al. Deletion of NEMO/IKK $\gamma$  in liver parenchymal cells causes steatohepatitis and hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell* **11**, 119–132 (2007).
- Ridder, D. A. et al. TAK1 in brain endothelial cells mediates fever and lethargy. *J. Exp. Med.* **208**, 2615–2623 (2011).
- Newton, K., Sun, X. & Dixit, V. M. Kinase RIP3 is dispensable for normal NF- $\kappa$ Bs signaling by the B cell and T cell receptors, tumor necrosis factor receptor 1, and Toll-like receptors 2 and 4. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 1464–1469 (2004).
- Zelic, M. et al. RIPK1 activation mediates neuroinflammation and disease progression in multiple sclerosis. *Cell Rep.* **35**, 109112 (2021).
- Wang, W. et al. RIP1 kinase drives macrophage-mediated adaptive immune tolerance in pancreatic cancer. *Cancer Cell* **34**, 757–774 (2018).
- Qin, J. Y. et al. Systematic comparison of constitutive promoters and the doxycycline-inducible promoter. *PLoS ONE* **5**, e10611 (2010).
- Dogbevia, G. K. et al. Gene therapy decreases seizures in a model of *incontinencia pigmenti*. *Ann. Neurol.* **82**, 93–104 (2017).
- Korte, J., Mienert, J., Hennigs, J. K. & Korbelt, J. Inactivation of adeno-associated viral vectors by oxidant-based disinfectants. *Hum. Gene Ther.* **32**, 771–781 (2021).
- Dogbevia, G., Grasshoff, H., Othman, A., Penno, A. & Schwanninger, M. Brain endothelial specific gene therapy improves experimental Sandhoff disease. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **40**, 1338–1350 (2020).
- Bojkova, D. et al. Proteomics of SARS-CoV-2-infected host cells reveals therapy targets. *Nature* **583**, 469–472 (2020).
- Hoehl, S. et al. Evidence of SARS-CoV-2 infection in returning travelers from Wuhan, China. *N. Engl. J. Med.* **382**, 1278–1280 (2020).
- Pfeiferle, S. et al. Complete genome sequence of a SARS-CoV-2 strain isolated in northern Germany. *Microbiol. Resour. Announc.* **9**, e00520-20 (2020).
- Fan, H. C., Fu, G. K. & Fodor, S. P. Expression profiling. Combinatorial labeling of single cells for gene expression cytometry. *Science* **347**, 1258367 (2015).
- Munawar, A. et al. Elapid snake venom analyses show the specificity of the peptide composition at the level of genera *Naja* and *Notechis*. *Toxins* **6**, 850–868 (2014).

75. Cox, J. & Mann, M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat. Biotechnol.* **26**, 1367–1372 (2008).
76. Allan, C. et al. OMERO: flexible, model-driven data management for experimental biology. *Nat. Methods* **9**, 245–253 (2012).
77. Chozinski, T. J. et al. Expansion microscopy with conventional antibodies and fluorescent proteins. *Nat. Methods* **13**, 485–488 (2016).
78. Gaeltgens, P. Flow of blood through narrow capillaries: rheological mechanisms determining capillary hematocrit and apparent viscosity. *Biorheology* **17**, 183–189 (1980).
79. Hunziker, O., AbdelAl, S. & Schulz, U. The aging human cerebral cortex: a stereological characterization of changes in the capillary net. *J. Gerontol.* **34**, 345–350 (1979).
80. Jiang, Y. et al. Cerebral angiogenesis ameliorates pathological disorders in Nemo-deficient mice with small-vessel disease. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **41**, 219–235 (2021).

### Acknowledgements

We thank W. Brandt, I. Stöling, V. Hüther, A. Wohltmann, K. Schulz, R. Müller and H. Orün for expert technical help and G. Hüttmann, Lübeck, for support with STED microscopy. PLX5266 was kindly provided by Plexikon and RIPKi was provided by Sanofi. This work was supported by grants from the European Research Council (Synergy grant no. 2019-WATCH-810331 to V.P., R.N. and M. Schwaninger), the Deutsche Forschungsgemeinschaft (SCHW 416/5-3 to M. Schwaninger; WE 6456/1-1 to J.W.; STA 1389/5-1 to C.S.; INST 392/135-1 to M. Schwaninger and P.K.; SFB 1403 (project no. 414786233) to M.P.; SFB 877 to M.G.; SFB TRR 296/1 to H.M.-E. and M. Schwaninger; SFB TRR 274 to C.S. and J.F.; and EXC 22167/390884018 to H.B.), the Marie Skłodowska-Curie European Union's Horizon 2020 research and innovation program (no. 813294 (ENTRAIN) to J.W. and M. Schwaninger), the research consortium DEFEAT PANDEMICs—National Network University Medicine funded by the Federal Ministry of Education and Research (to M.G. and C.S.), Incontinentia Pigmenti France (to M. Schwaninger), and a Roche RISE fellowship (2017–2018; to J.L.).

Work in the laboratory of R.H. was supported by the European Commission through its SCORE program (grant agreement no. 101003627). H.B., A.F. and E.O. acknowledge computational support from the OMICS compute cluster at the University of Lübeck.

### Author contributions

J.L., J.W., H.M.-E. and M. Schwaninger designed the study. J.L., J.W., H.M.-E., K.M., R.S., M. Zille, M.K., Y.J., U.Ö., J.U.G.W., D.B., M. Shumljakivska, V.N., A.F., E.O., V.S., C.R., S.P., F. Sauve, C.C., E. Spiecker, B.L., S.B., N.E., J.K., P.K., H.B., H.C.A., F.T. and O.J. performed experiments and analyzed the data. L.Z., J.F., L.C., R.V., O.J., M.P., S.D., J.C., F.T., M. Zelic, D.O., C.S., K.P., R.H., M.G., R.N. and V.P. provided tools, samples and conceptual support. J.L., J.W., H.M.-E., R.N., V.P. and M. Schwaninger drafted the article. All authors revised the manuscript for important intellectual content.

### Funding

Open access funding provided by Universität zu Lübeck.

### Competing interests

L.C. and R.V. are under paid employment by Hoffman La Roche. M. Zelic and D.O. are under paid employment by Sanofi. M.K. worked as a part-time consultant of Immunogenetics AG. All other authors declare no competing interests.

### Additional information

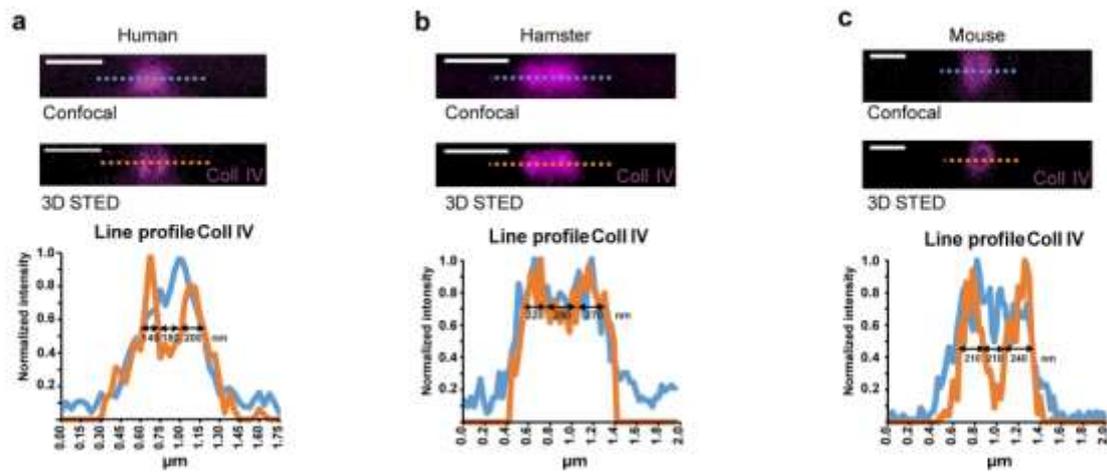
**Extended data** is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41593-021-00926-1>.

**Supplementary information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41593-021-00926-1>.

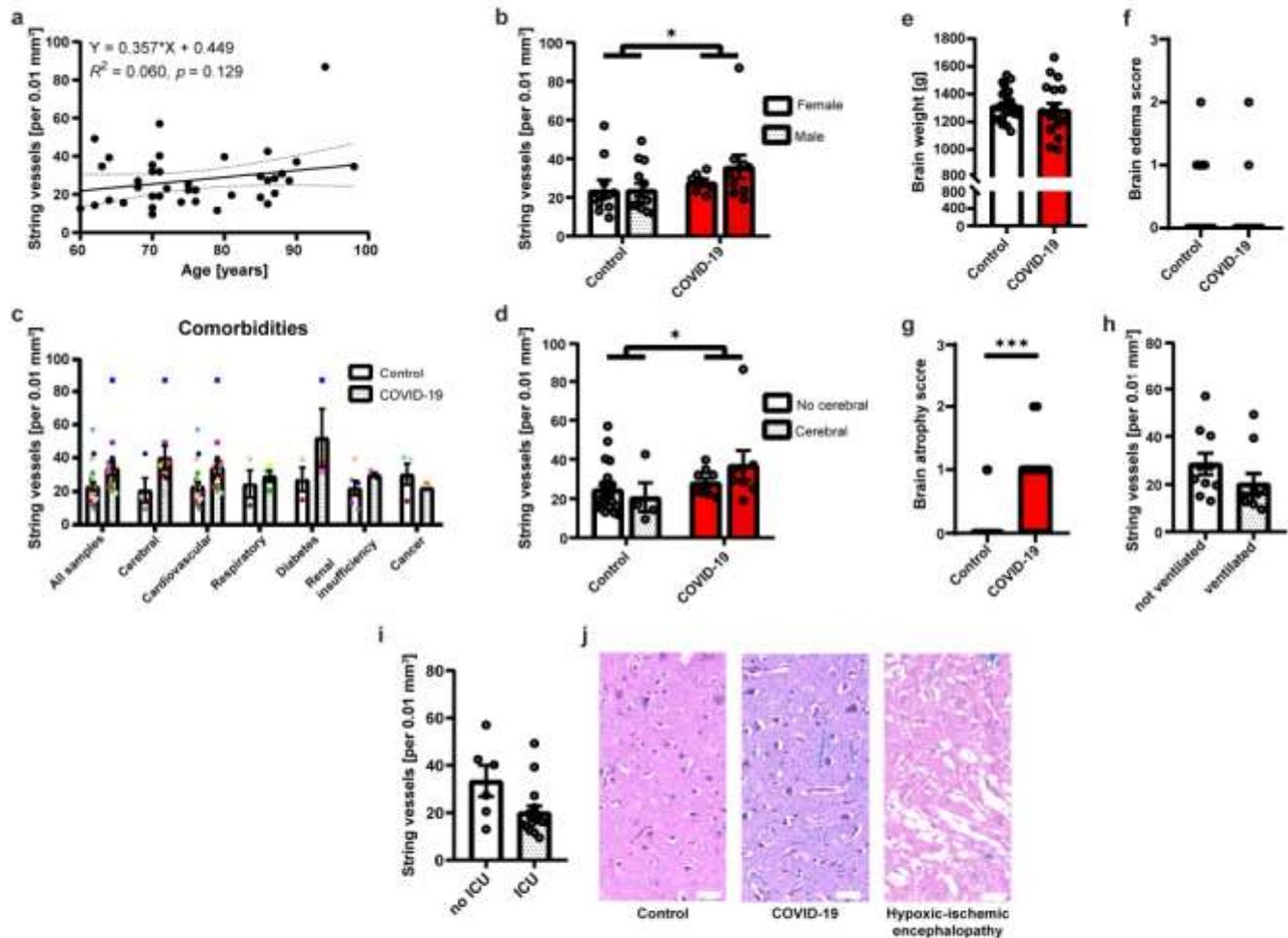
**Correspondence and requests for materials** should be addressed to Markus Schwaninger.

**Peer review information** *Nature Neuroscience* thanks Juan de la Torre and the other, anonymous, reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work.

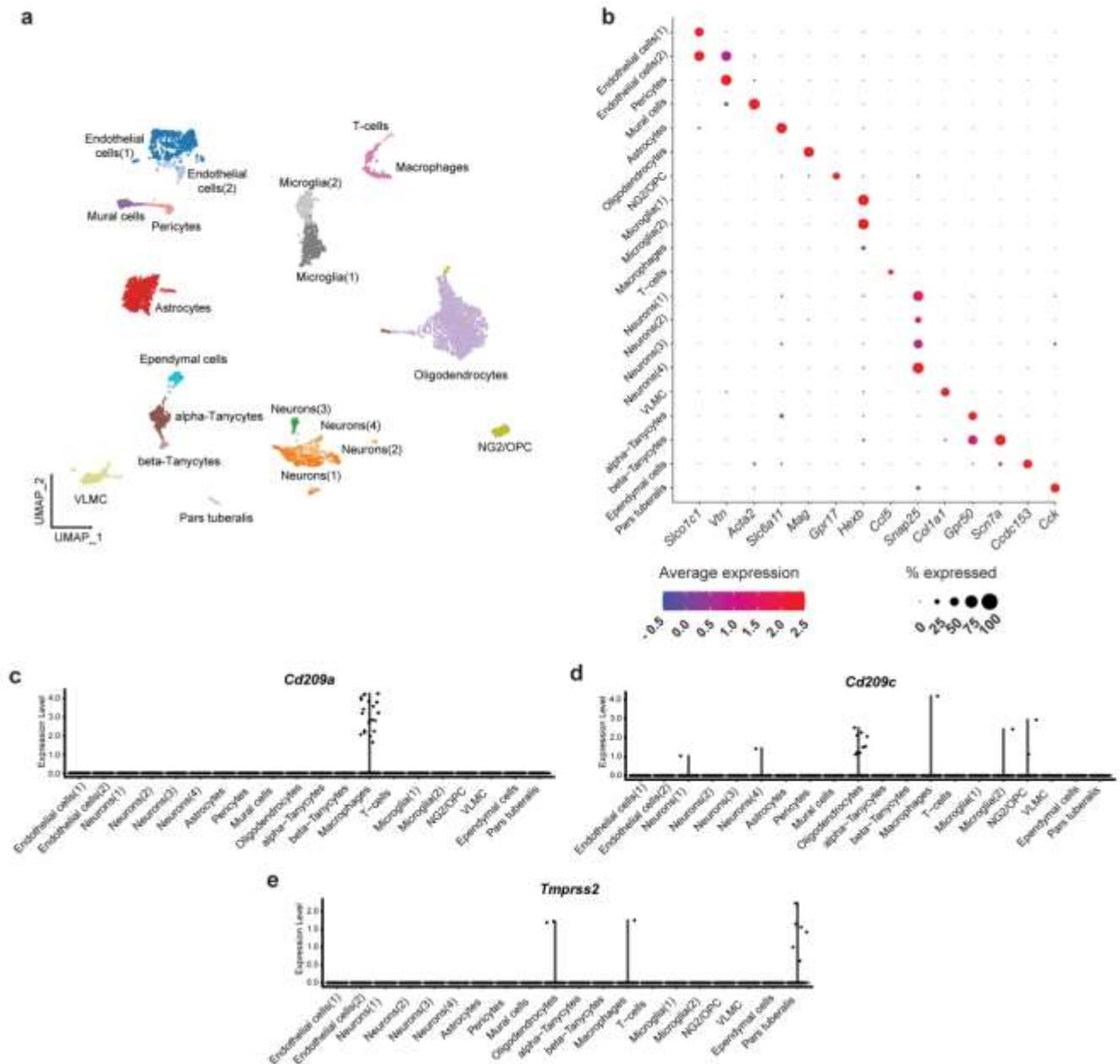
**Reprints and permissions information** is available at [www.nature.com/reprints](http://www.nature.com/reprints).



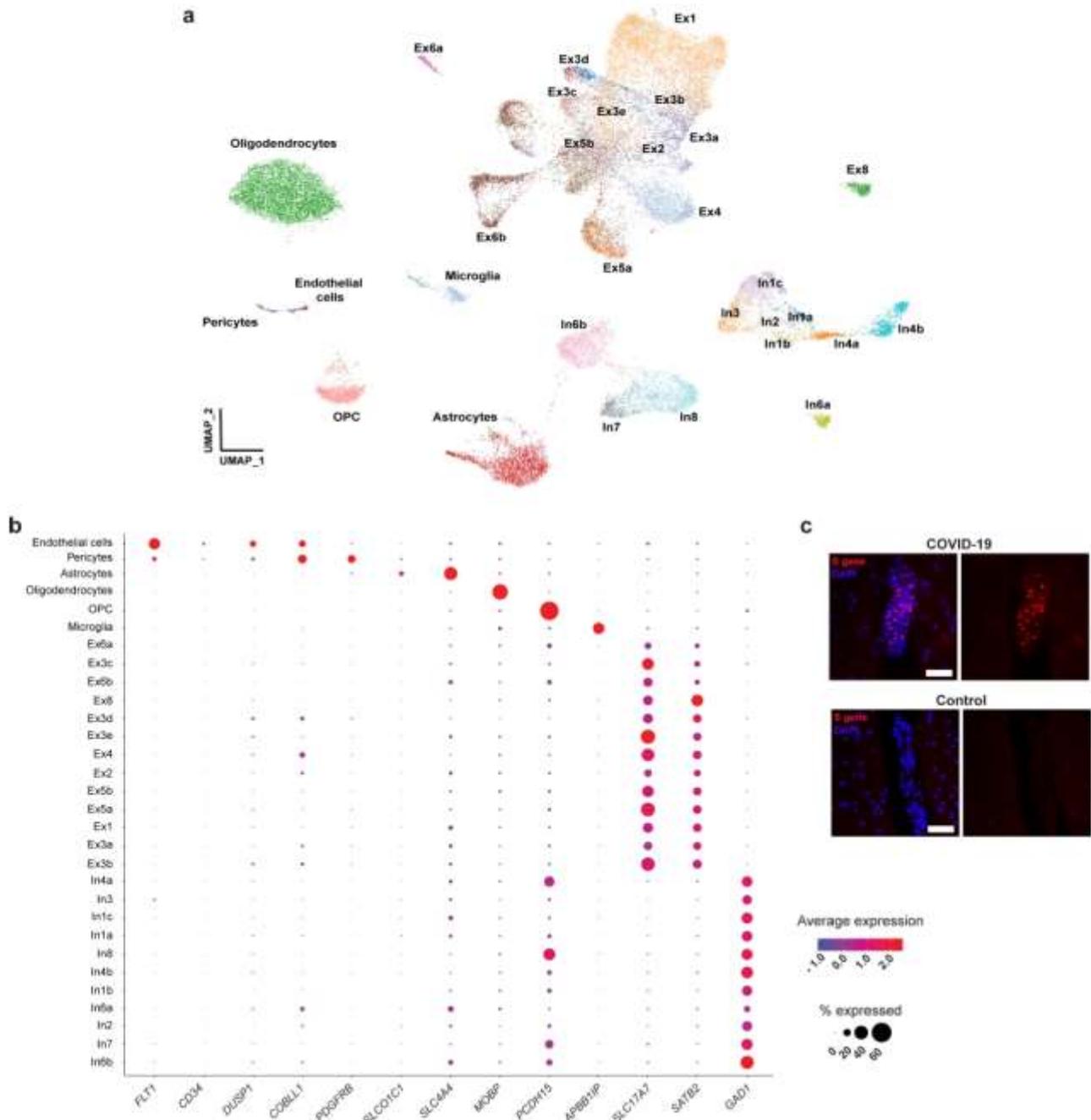
**Extended Data Fig. 1 | String vessels have a tube-like structure.** **a, b, c,** Super-resolution imaging of human (**a**), hamster (**b**) and mouse string vessels (**c**). In confocal mode with the pinhole closed to 0.4 AU, the string vessels appeared as solid collagen tubes. However, STED microscopy demonstrated a tube-like structure of string vessels in humans, hamsters and mice. In all species, the apparent diameter of string vessels was about 500 – 1,000 nm with the collagen walls having a similar thickness. Images are representative for at least 3 experiments per species. Scale bar, 1  $\mu\text{m}$ .



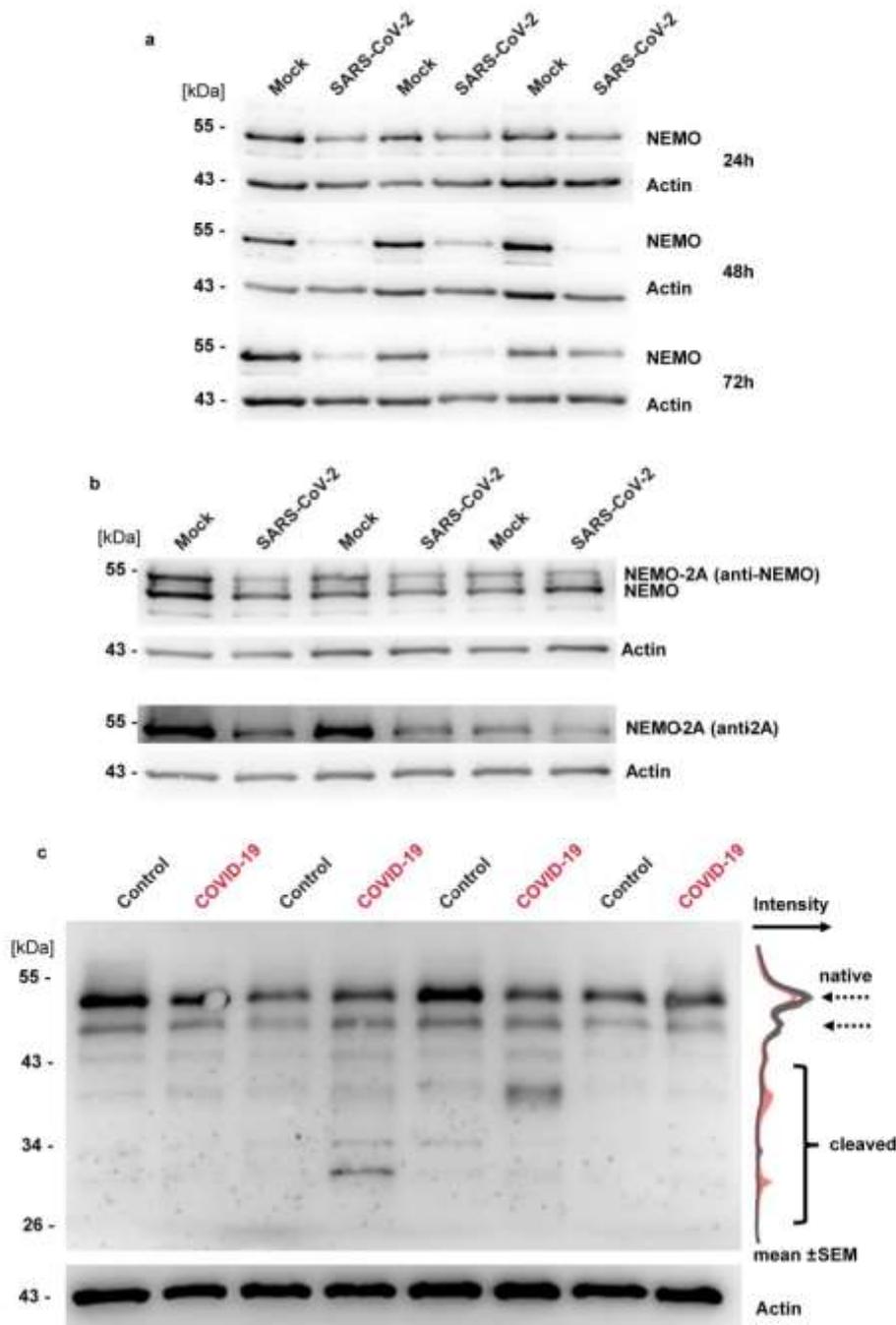
**Extended Data Fig. 2 | Characteristics of the COVID-19 and control patients.** **a**, Age did not affect the number of string vessels per volume of the image.  $N=40$  patients. **b**, String vessels were increased in SARS-CoV-2-infected patients independent of sex.  $N=10$  female and 13 male control,  $N=7$  female and 10 male COVID-19 patients. **c**, Comorbidities were equally distributed across control and COVID-19 patients. For characteristics of the patients, refer to Fig. 1c and Supplementary Tables 1-2.  $N=23$  control,  $N=17$  COVID-19 patients. **d**, String vessels were increased in SARS-CoV-2-infected patients independent of cerebral comorbidities.  $N=19$  control patients without and 4 with cerebral comorbidity,  $N=9$  COVID-19 patients without and 8 with cerebral comorbidity. **e**, Brain weight was not different between COVID-19 and control patients.  $N=23$  control,  $N=17$  COVID-19 patients. Medians are shown. **f**, Brain edema score was not different between COVID-19 and control patients.  $N=23$  control,  $N=17$  COVID-19 patients. Medians are shown. **g**, Brain atrophy score was increased in COVID-19 compared to control patients.  $N=23$  control,  $N=17$  COVID-19 patients. Medians are shown. **h**, String vessels of control patients with or without ventilation are shown.  $N=10$  patients per group. **i**, String vessels of control patients who were treated in an intensive care unit (ICU) or not are shown.  $N=6$  no ICU,  $N=16$  ICU. **j**, None of the COVID-19 or control patients showed evidence for a hypoxic-ischemic encephalopathy, also known as 'respirator brain'. Characteristic morphological features of eosinophilic neurons, laminar changes in the cerebral cortex or loss of neurons were not detectable. Representative images of a combined HE and Nissl staining of brain sections from a control and COVID-19 patient as well as a brain section from a patient with hypoxic-ischemic encephalopathy are depicted. Scale bar, 50  $\mu\text{m}$ . Means  $\pm$  s.e.m. are shown if not stated otherwise. \*  $p < 0.05$  \*\*\*  $p < 0.001$ . Detailed information about the exact test statistics, sidedness and values are provided in Supplementary Table 5.



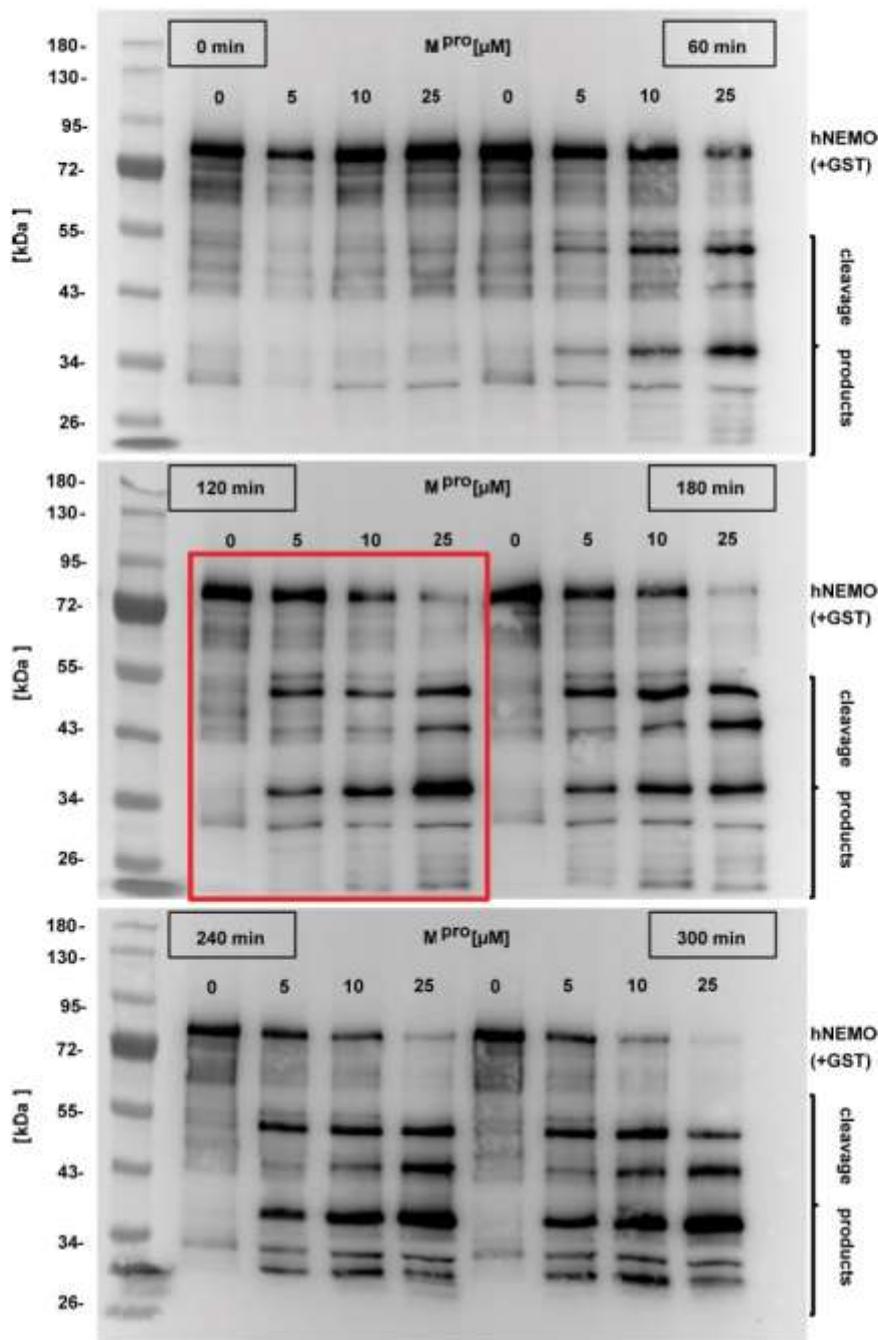
**Extended Data Fig. 3 | Clustering of mouse brain cells according to single-cell RNA sequencing.** **a**, UMAP plot of 5,611 mouse brain cells. Clusters were annotated according to marker genes for the specific cell types. **b**, Dot plots of marker genes used for annotation. Gene expression for all 20 clusters is shown as dot plot with the color representing mean gene expression and the diameters showing the percentage of positive cells in the clusters. **c-e**, mRNA expression patterns of the putative SARS-CoV-2 entry factors *Cd209a* (**c**), *Cd209c* (**d**), and *Tmprss2* (**e**). There were no *Cd209b*- or *Cd209d*-expressing cells. VLMC, vascular and leptomeningeal cells; OPC, oligodendrocyte progenitor cells.



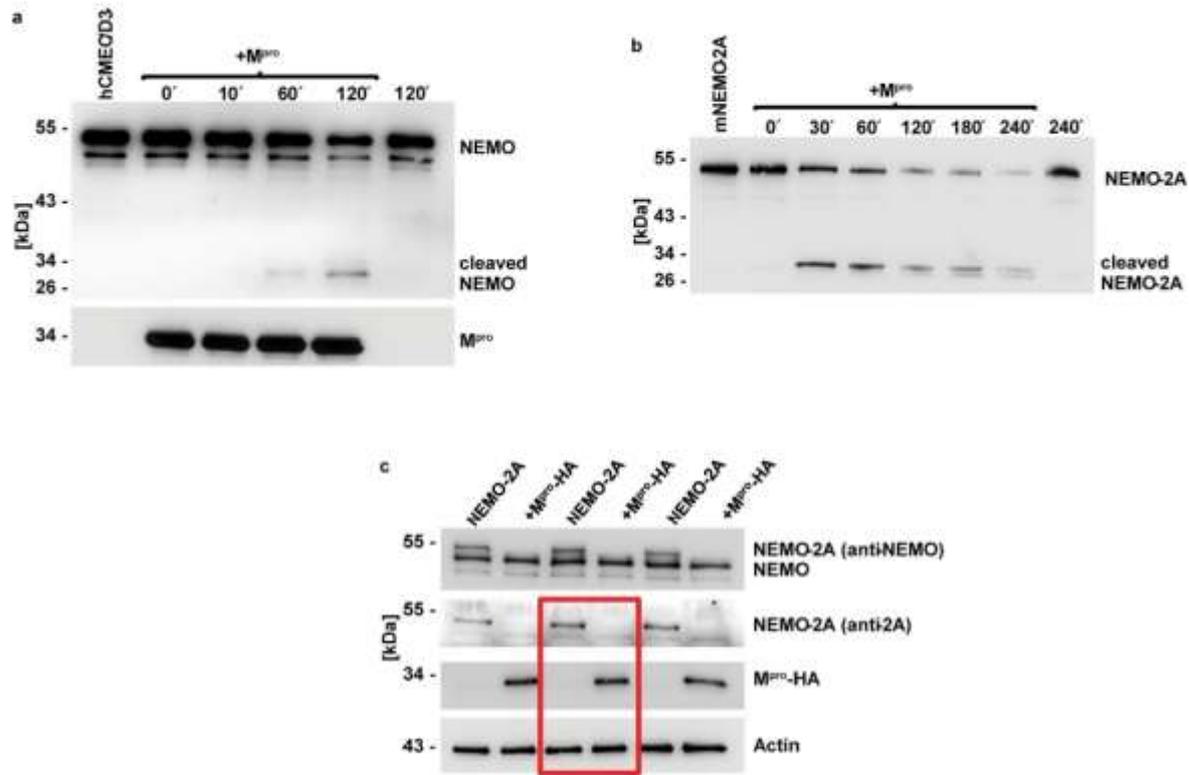
**Extended Data Fig. 4 | Clustering of human brain cells according to single nuclear RNA sequencing. a**, UMAP plot of 35,289 human brain cells. Clusters were annotated according to marker genes for the specific cell types. The dataset has been published (Lake, B.B., et al. Integrative single-cell analysis of transcriptional and epigenetic states in the human adult brain. *Nat Biotechnol* 36, 70–80 (2018)). **b**, Dot plots of marker genes used for annotation. Gene expression for all 30 clusters is shown as dot plot with the color representing mean gene expression and the diameters showing the percentage of positive cells in the clusters. Ex, excitatory neuronal subtypes; In, inhibitory neuronal subtypes. **c**, The SARS-CoV-2 S gene encoding the spike protein was found in vascular cells in the cortex of a COVID-19 patient (exemplary for at least 3 vessels) but not in an uninfected control subject by in situ hybridization. Scale bar, 50  $\mu$ m.



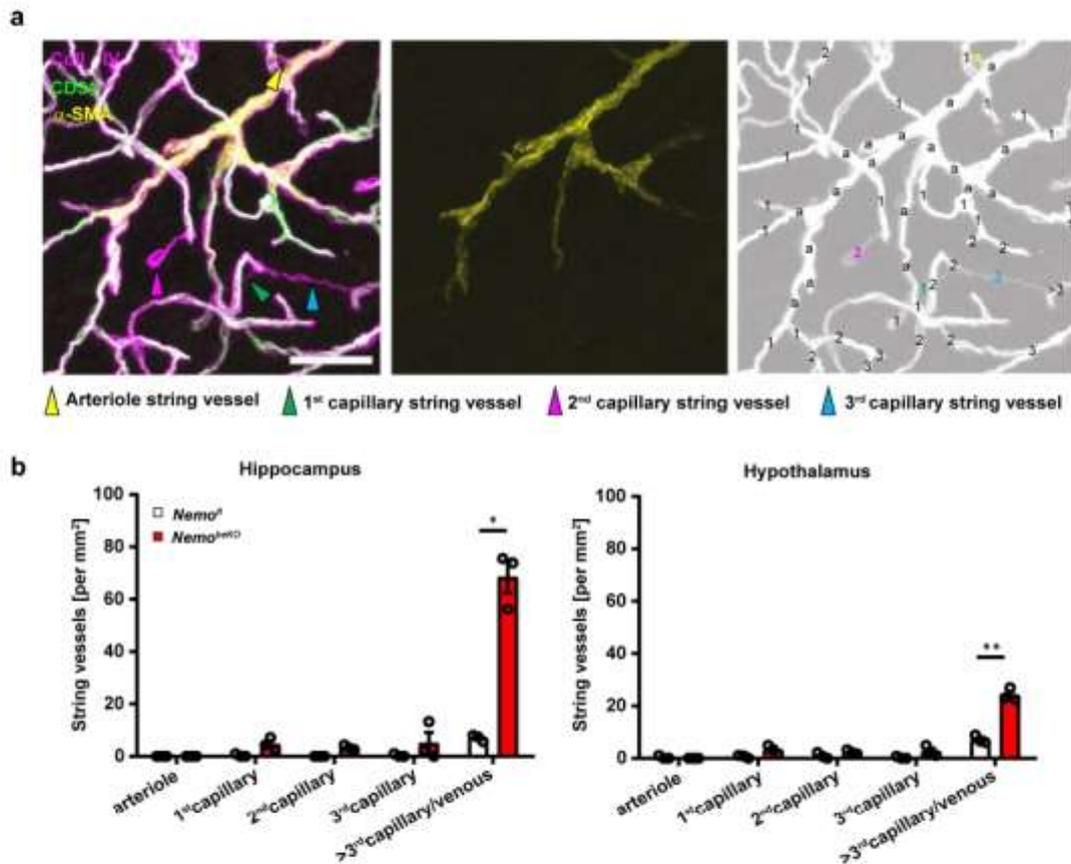
**Extended Data Fig. 5 | SARS-CoV-2 induces NEMO cleavage.** **a**, SARS-CoV-2 (MOI: 1) or mock-infected Vero E6 cells were harvested at the indicated time points. Cell lysates were immunoblotted for NEMO.  $N = 3$  experiments. **b**, Human brain endothelial hCMEC/D3 cells were transfected with plasmids encoding for NEMO-2A and for human ACE2 plus TMPRSS2. Twenty-four hours after transfection, cells were incubated with SARS-CoV-2 for 2 hours (MOI: 1) and harvested after additional 24 hours. Only transfected cells expressing human ACE2 as well as 2A-tagged NEMO were susceptible to SARS-CoV-2 infection (Fig. 2e). Accordingly, 2A-tagged NEMO but not untagged NEMO was degraded. Upper panel, immunoblot using anti-NEMO; lower panel, immunoblot using anti-2A antibodies.  $N = 3$  experiments. **c**, Lysates of the medulla oblongata of SARS-CoV-2-infected and control patients were immunoblotted for NEMO. Samples were matched according to post-mortem intervals (PMI): lanes 1 and 2: 1 day PMI; lanes 3 and 4: 2–3 days PMI; lanes 5 and 6: 4–5 days PMI; lanes 7 and 8: 4–5 days PMI. Histogram intensities of each lane were measured and depicted as means  $\pm$  s.e.m., showing a decrease of the native forms of NEMO and an increase in cleaved NEMO in the tissue of SARS-CoV-2-infected patients (red profile) in comparison to control subjects (black profile).  $N = 4$  patients in each group.



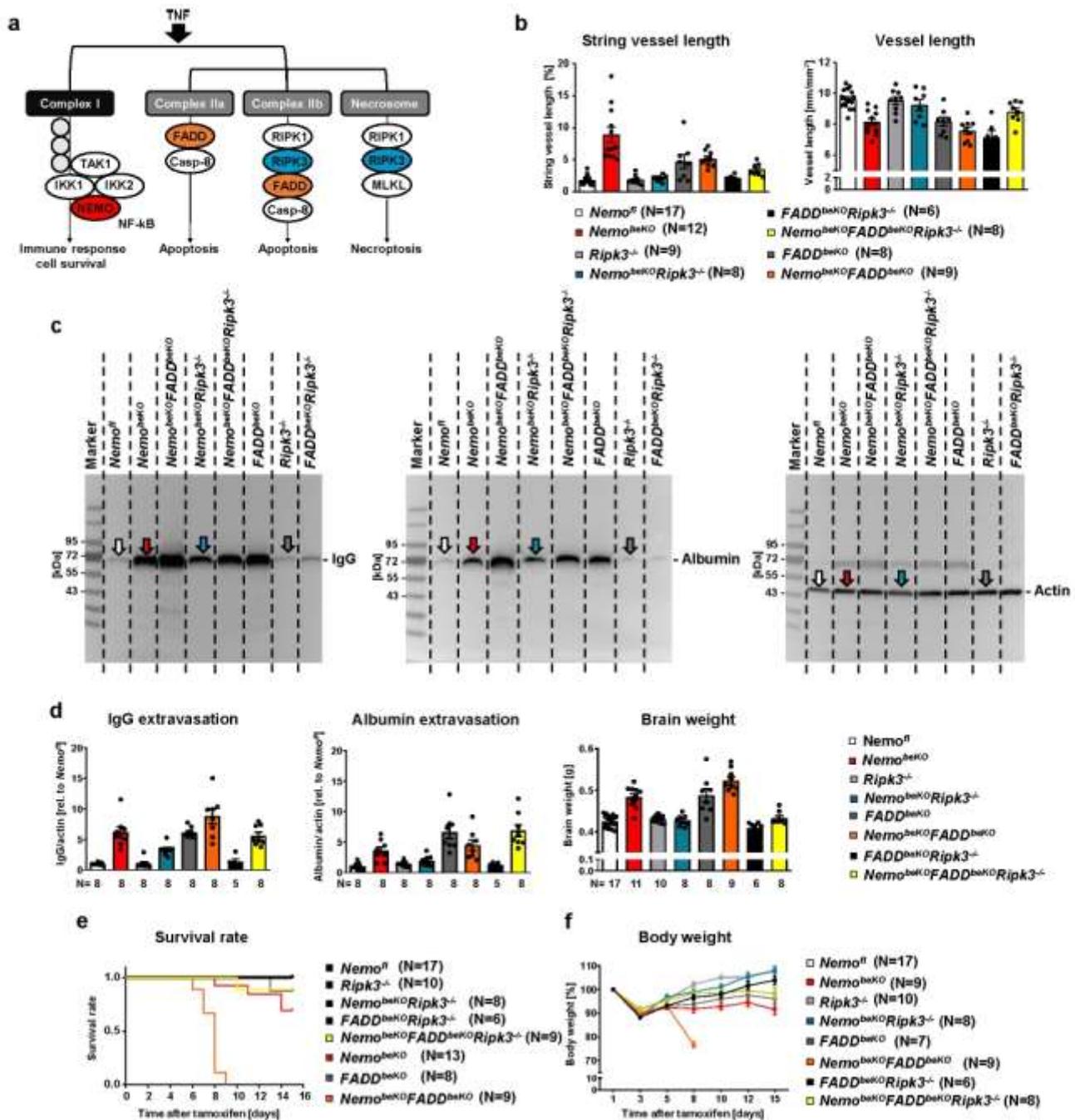
**Extended Data Fig. 6 | Time dependence of NEMO cleavage by M<sup>pro</sup>.** Cleavage of human NEMO by SARS-CoV-2 M<sup>pro</sup> (0, 5, 10, 25 μM) depended on the incubation time. NEMO (with GST tag) or the cleavage products were detected by immunoblotting (representative for at least 6 experiments at different conditions). The red-boxed part of the blot is shown in Fig. 3a.



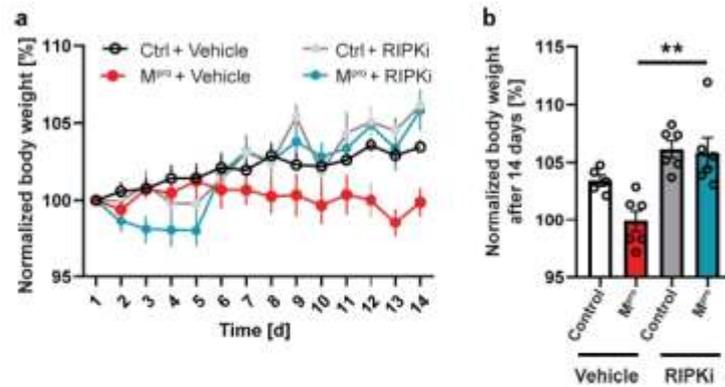
**Extended Data Fig. 7 | Cleavage of NEMO in cell extracts.** **a**, Cell lysates of the human brain endothelial cell line hCMEC/D3 were incubated with M<sup>pro</sup> (25 μM) for different durations and blotted against NEMO and M<sup>pro</sup> (representative for at least 3 experiments at different conditions). **b**, HEK293T cells were transfected with a plasmid encoding for the mouse NEMO linked to GFP via a 2A sequence. After cell lysis, M<sup>pro</sup> (25 μM) was added and incubated for the indicated durations. Antibodies against the 2A linker were used to identify NEMO and its cleavage products (representative for 2 experiments). **c**, hCMEC/D3 cells were transfected with the same plasmid as described in **b** (pNEMO-2A-GFP) and additionally with an empty control plasmid or a plasmid containing the HA-tagged form of the SARS-CoV-2 M<sup>pro</sup> protease. After 2 days, cells were lysed and blotted against NEMO, 2A, M<sup>pro</sup>, and actin (representative for at least 9 experiments). The red-boxed part of the blots is shown in Fig. 3c.



**Extended Data Fig. 8 | String vessels occur in the deeper part of the vascular tree. a**, String vessels were tracked in confocal 3D scans of the cortex after staining against CD31, collagen IV and smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) (left). Since  $\alpha$ -SMA is expressed in arteries and arterioles (middle), the branching order can be determined (right). String vessels positive for  $\alpha$ -SMA are defined as arteriole string vessels, adjacent string vessels as 1<sup>st</sup> capillary string vessels, etc. (right). The image was obtained by cropping a section from a *Nemo*<sup>+/KO</sup> tilescan from the dataset used for quantification in (b) ( $N = 3$  animals). Scale bar, 50  $\mu$ m. **b**, Tracking of string vessels in the hippocampus and hypothalamus of *Nemo*<sup>+/KO</sup> mice revealed that more string vessels were present in higher branch orders of the vascular tree in *Nemo*<sup>+/KO</sup> mice.  $N = 3$  animals. Means  $\pm$  s.e.m. are shown, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ . Detailed information about the exact test statistics, sidedness and values are provided in Supplementary Table 5.



**Extended Data Fig. 9 | Modulation of apoptosis and necroptosis pathways in mice with NEMO deficient brain endothelial cells.** **a**, Scheme showing the role of RIPK3 and FADD in cell death caused by NEMO deficiency. TNF leads to the activation of several adaptor proteins and kinases, such as TAK1. Activation of the I $\kappa$ B kinase complex triggers the translocation of NF- $\kappa$ B into the nucleus and the expression of target genes. NEMO is the regulatory subunit of the I $\kappa$ B kinase complex and is essential for NF- $\kappa$ B pathway activation. In the absence of NEMO, TNF leads to the formation of complex IIa, complex IIb, and the necrosome and induces apoptosis or necroptosis. According to current concepts (Kondylis, V., Kumari, S., Vliantis, K. & Pasparakis, M. The interplay of IKK, NF- $\kappa$ B and RIPK1 signaling in the regulation of cell death, tissue homeostasis and inflammation. *Immunol Rev* 277, 113-127 (2017)), apoptosis is mediated by FADD and RIPK3, while necroptosis depends on RIPK3. **b**, Deletion of *Fadd* in brain endothelial cells (*FADD $\Delta$ EKO*) led to the formation of string vessels and reduced vessel lengths. The results obtained in *Nemo<sup>fl/fl</sup>*, *Nemo $\Delta$ EKO*, *Ripk3<sup>-/-</sup>*, and *Nemo $\Delta$ EKO/Ripk3<sup>-/-</sup>* mice are also included in Fig. 6 of the main article. **c**, Representative immunoblots showing the extravasation of IgG and albumin into the brain tissue. In total, 9 blots were analyzed with one replicate per animal. **d**, Quantification of the immunoblots normalized for actin levels demonstrated a disruption of the BBB in *FADD*-deficient mice as shown by the extravasation of IgG and albumin. Brain weights hint at higher water content in *FADD* deficient mice. **e**, *Nemo $\Delta$ EKO/FADD $\Delta$ EKO* mice died within 9 days after tamoxifen injection while *RIPK3* deficiency prevented the death of *Nemo $\Delta$ EKO* mice. **f**, *Ripk3* deletion normalized the body weight of mice with brain endothelial NEMO deficiency, while *FADD* deficiency worsened body weight loss. Only mice that survived until the end of the experiment were analyzed. Means  $\pm$  s.e.m. are shown. Detailed information of group sizes are indicated in the individual figure.



**Extended Data Fig. 10 | RIPK inhibition normalizes body weight gain in AAV-BR1-M<sup>fl/fl</sup>-injected mice.** **a**, RIPKi treatment normalized the body weight gain in AAV-BR1-M<sup>fl/fl</sup>-injected mice (N=5 Ctrl + Vehicle mice, 6 M<sup>fl/fl</sup> + Vehicle mice, 6 Ctrl + RIPKi mice, 6 M<sup>fl/fl</sup> + RIPKi mice). **b**, In AAV-BR1-M<sup>fl/fl</sup>-injected mice, the cumulative body weight gain over 14 days was normalized by RIPKi treatment (N=5 Ctrl + Vehicle mice, 6 M<sup>fl/fl</sup> + Vehicle mice, 6 Ctrl + RIPKi mice, 6 M<sup>fl/fl</sup> + RIPKi mice). Means  $\pm$  s.e.m. are shown, \*\*  $P < 0.01$ . Detailed information about the exact test statistics, sidedness and values are provided in Supplementary Table 5.

## Reporting Summary

Nature Research wishes to improve the reproducibility of the work that we publish. This form provides structure for consistency and transparency in reporting. For further information on Nature Research policies, see our [Editorial Policies](#) and the [Editorial Policy Checklist](#).

### Statistics

For all statistical analyses, confirm that the following items are present in the figure legend, table legend, main text, or Methods section.

- |                                     |  |
|-------------------------------------|--|
| n/a                                 | Confirmed  |
| <input type="checkbox"/>            | <input checked="" type="checkbox"/> The exact sample size ( $n$ ) for each experimental group/condition, given as a discrete number and unit of measurement  |
| <input type="checkbox"/>            | <input checked="" type="checkbox"/> A statement on whether measurements were taken from distinct samples or whether the same sample was measured repeatedly  |
| <input type="checkbox"/>            | <input checked="" type="checkbox"/> The statistical test(s) used AND whether they are one- or two-sided<br><i>Only common tests should be described solely by name; describe more complex techniques in the Methods section.</i>   |
| <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> A description of all covariates tested  |
| <input type="checkbox"/>            | <input checked="" type="checkbox"/> A description of any assumptions or corrections, such as tests of normality and adjustment for multiple comparisons  |
| <input type="checkbox"/>            | <input checked="" type="checkbox"/> A full description of the statistical parameters including central tendency (e.g. means) or other basic estimates (e.g. regression coefficient) AND variation (e.g. standard deviation) or associated estimates of uncertainty (e.g. confidence intervals) |
| <input type="checkbox"/>            | <input checked="" type="checkbox"/> For null hypothesis testing, the test statistic (e.g. $F$ , $t$ , $r$ ) with confidence intervals, effect sizes, degrees of freedom and $P$ value noted<br><i>Give <math>P</math> values as exact values whenever suitable.</i>                            |
| <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> For Bayesian analysis, information on the choice of priors and Markov chain Monte Carlo settings  |
| <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> For hierarchical and complex designs, identification of the appropriate level for tests and full reporting of outcomes  |
| <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> Estimates of effect sizes (e.g. Cohen's $d$ , Pearson's $r$ ), indicating how they were calculated  |

*Our web collection on [statistics for biologists](#) contains articles on many of the points above.*

### Software and code

Policy information about [availability of computer code](#)

Data collection

Data analysis

For manuscripts utilizing custom algorithms or software that are central to the research but not yet described in published literature, software must be made available to editors and reviewers. We strongly encourage code deposition in a community repository (e.g. GitHub). See the Nature Research [guidelines for submitting code & software](#) for further information.

### Data

Policy information about [availability of data](#)

All manuscripts must include a [data availability statement](#). This statement should provide the following information, where applicable:

- Accession codes, unique identifiers, or web links for publicly available datasets
- A list of figures that have associated raw data
- A description of any restrictions on data availability

## Field-specific reporting

Please select the one below that is the best fit for your research. If you are not sure, read the appropriate sections before making your selection.

Life sciences     Behavioural & social sciences     Ecological, evolutionary & environmental sciences

For a reference copy of the document with all sections, see [nature.com/documents/nr-reporting-summary-flat.pdf](https://www.nature.com/documents/nr-reporting-summary-flat.pdf)

## Life sciences study design

All studies must disclose on these points even when the disclosure is negative.

Sample size	No statistical methods were used to predetermine sample sizes, but our sample sizes are similar to those reported in previous publications. For other analyses, the availability of patient material determined the sample size.
Data exclusions	No data were excluded.
Replication	All experiments and analyses, apart from the analyses of patients, were replicated at least three times if not stated otherwise.
Randomization	For treatment allocation, mice were randomized.
Blinding	Whenever possible experimenters were blinded for genotype and treatment.

## Reporting for specific materials, systems and methods

We require information from authors about some types of materials, experimental systems and methods used in many studies. Here, indicate whether each material, system or method listed is relevant to your study. If you are not sure if a list item applies to your research, read the appropriate section before selecting a response.

### Materials & experimental systems

n/a	Involvement in the study
<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/> Antibodies
<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/> Eukaryotic cell lines
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Palaeontology and archaeology
<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/> Animals and other organisms
<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/> Human research participants
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Clinical data
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Dual use research of concern

### Methods

n/a	Involvement in the study
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> ChIP-seq
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Flow cytometry
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> MRI-based neuroimaging

## Antibodies

Antibodies used	Details are presented in the Supplementary Table 3 and 4.
Validation	Data on the validation of primary antibodies is presented in the Supplementary Table 2.

## Eukaryotic cell lines

Policy information about [cell lines](#)

Cell line source(s)	bEnd.3 cells from ATCC (CRL-2299, RRID:CVCL_0170), hCMEC/D3 cells from Merck Millipore (SCC066, RRID: CVCL_U985).
Authentication	Morphology and gene expression
Mycoplasma contamination	Cells tested negative for mycoplasma contamination
Commonly misidentified lines (See <a href="#">ICLAC</a> register)	None

## Animals and other organisms

Policy information about [studies involving animals](#); [ARRIVE guidelines](#) recommended for reporting animal research

Laboratory animals	Details are reported in the section "Animals" of the manuscript.
--------------------	--

Wild animals	Not applicable
Field-collected samples	Not applicable
Ethics oversight	Details are reported in the section "Animals" of the manuscript.

Note that full information on the approval of the study protocol must also be provided in the manuscript.

## Human research participants

Policy information about [studies involving human research participants](#)

Population characteristics	Details are reported in Supplementary Table 1 and 2.
Recruitment	Consecutive patients.
Ethics oversight	The study was approved by the local ethics committee of the Hamburg Chamber of Physicians and the University of Göttingen.

Note that full information on the approval of the study protocol must also be provided in the manuscript.