



HAL
open science

Cancer de la prostate et COVID-19: rôle des androgènes dans l'infection virale au SARS-CoV-2 et le développement de la COVID-19

Aline Hantute-Ghesquier

► **To cite this version:**

Aline Hantute-Ghesquier. Cancer de la prostate et COVID-19: rôle des androgènes dans l'infection virale au SARS-CoV-2 et le développement de la COVID-19. Biologie moléculaire. Université de Lille, 2023. Français. NNT : 2023ULILS008 . tel-04155075

HAL Id: tel-04155075

<https://theses.hal.science/tel-04155075>

Submitted on 7 Jul 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE DE LILLE
ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE-SANTE DE LILLE – NORD DE FRANCE

THESE DE DOCTORAT

En vue de l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE

Discipline : Biologie Moléculaire et Structurale, Biochimie

**CANCER DE LA PROSTATE ET COVID-19 : RÔLE DES ANDROGENES DANS
L'INFECTION VIRALE AU SARS-COV-2 ET LE DEVELOPPEMENT DE LA
COVID-19**

Présentée et soutenue publiquement par

Aline HANTUTE-GHESQUIER

A Lille, le 6 Janvier 2023

Composition du jury :

Dr Jocelyn CERALINE	Rapporteur
Pr Gaëlle FROMONT-HANKARD	Rapporteur
Dr Yvan DE LAUNOIT	Examineur
Dr Anne OP DE BEECK	Examineur
Dr Vincent PREVOT	Examineur
Dr Yves ROUILLE	Membre invité
Dr Martine DUTERQUE-COQUILLAUD	Directrice de thèse

CNRS UMR9020, INSERM UMR1277, University of Lille, Oncolille, Lille, France
CANTHER: Cancer Heterogeneity, Plasticity and Resistance to Therapies

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier chaleureusement l'ensemble des personnes ayant contribué de près ou de loin à la réalisation et à la réussite de ce travail.

Merci aux membres du jury d'avoir spontanément accepté d'évaluer mon travail, au Docteur Yvan De Launoit d'avoir accepté de présider ce jury, au Professeur Gaëlle Fromont-Hankard et au Docteur Jocelyn Ceraline d'avoir accepté d'être rapporteurs, aux Docteurs Vincent Prevot et Anne Op De Beeck d'avoir accepté d'être examinateurs, et enfin au Docteur Yves Rouillé d'avoir accepté d'être membre invité et d'avoir accepté de participer à mes deux comités de suivi individuel.

Merci à nos collaborateurs, Antonino Bongiovani pour la microscopie, Sandrine Belouzard, Yves Rouillé et Adeline Danneels pour les infections virales et leur expertise sur le SARS-CoV-2. Merci au Dr François Trottein et à son équipe, notamment Lou Delval, Lucie Deruyter et Isabelle Wolowczuk, pour nos nombreuses collaborations sur le modèle du hamster.

Merci au Docteur Virginie Vlaeminck-Guillem, d'avoir accepté de participer à mes comités de suivi individuel. Vous avez apporté de nombreuses idées très intéressantes.

Merci à l'ensemble de l'équipe TARGET, notamment David Tulasne et toutes les personnes qui ont apporté leur conseil lors des réunions de laboratoire.

Merci à Anne-Claire Flourens, toujours soucieuse de bien faire et que tout aille pour le mieux pour tout le monde, et ce jusqu'au bout. Merci pour l'héritage histologie que tu m'as si bien transmis, j'espère avoir fait honneur. Je te souhaite de profiter de ta retraite bien méritée !

Merci à Nathalie Vanpouille, ton enthousiasme et ton optimisme à tout épreuve est un véritable exemple à suivre ! Tu as toujours une telle énergie ! Tu ne manques jamais d'idées et de conseils pour les manips. Et même si la COVID est passée par là, ta combativité n'en est que plus admirable. Tu es toujours prête à rendre service, à insuffler du courage et du dynamisme.

Merci à Elisa Carouge, à tous ces repas et ces autres moments partagés, j'ai trouvé en toi une personne de confiance, avec une sensibilité et une écoute toujours au

rendez-vous. Bon courage pour la fin de ta thèse, que tu finiras en beauté je n'en doute pas.

Merci à Anthony Turpin pour ta contribution à ce travail et nos échanges.

Merci à ma directrice de thèse, le Docteur Martine Duterque-Coquillaud, vous m'avez accueillie, sans a priori, vous m'avez ouvert la porte d'un laboratoire, dans lequel règne bienveillance et soutien, au moment où j'en avais sûrement le plus besoin. A mes yeux vous représentez une force tranquille, une personne en qui je peux avoir confiance et avec qui la communication est le maître mot. Vous m'avez accompagnée à chaque étape, avec confiance et sérénité. Merci pour votre investissement et pour tout ce que vous m'avez transmis, scientifiquement mais aussi humainement parlant.

A ma famille : Parents, frères et sœurs. Vous êtes un repère et un rempart. Toujours à l'écoute et de bons conseils, vous représentez une force insoupçonnée et je vous en serai toujours reconnaissante.

A Alexis, mon conjoint : Tu es d'un soutien sans faille, tu sais savourer les bons moments, m'épauler pour passer ceux plus difficiles, mais également bousculer la vie pour la rendre plus belle. Merci d'avoir fait croiser nos chemins au détour du hall du SN1 à l'Université.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	3
SOMMAIRE	5
RESUME	7
ABSTRACT	8
ABREVIATIONS.....	9
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX	11
INTRODUCTION	13
I. Avant-propos	15
II. Epidémiologie	17
A. Plan clinique	19
1. Les différentes formes de COVID-19.....	19
2. Traitements	21
3. Vaccins	22
B. Plan pathologique.....	23
C. Plan biologique.....	24
1. Mécanisme d'entrée et réplication du virus.....	24
2. Réponse à l'infection virale au SARS-CoV-2	27
III. Facteurs de risque	29
IV. Androgènes et COVID-19	33
A. Physiologie des androgènes	33
1. Synthèse des androgènes.....	33
2. Récepteur des androgènes	35
3. Rôle physiologique des androgènes.....	36
B. Rôle de TMPRSS2 dans la prostate.....	37
C. Implication de TMPRSS2 dans la COVID-19	38
1. TMPRSS2 comme cible thérapeutique.....	39
2. Régulation de TMPRSS2 par les androgènes dans le poumon	40
3. Hormones et COVID-19	41
D. Considération du cancer de la prostate.....	41
1. Cancer de la prostate	42

2.	Histoire naturelle du cancer de la prostate.....	43
3.	Stratégie thérapeutique	45
4.	Cancer de la prostate et COVID-19.....	48
E.	Hormonothérapie et COVID-19.....	51
V.	Modèle d'étude de l'infection au SARS-CoV-2.....	54
A.	<i>In vitro</i>	54
B.	<i>In vivo</i> : petit animal.....	56
	PROJET DE THESE	59
	RESULTATS	63
I.	Avant-propos	65
II.	Article en préparation	67
	DISCUSSION ET PERSPECTIVES	109
I.	Discussion	111
A.	Nouvelle lignée infectable et modulable par les androgènes	111
B.	<i>In vivo</i> , les androgènes participent au développement de la COVID-19 ..	112
C.	Chez l'homme, les traitements anti-androgéniques des patients atteints de cancer de la prostate métastatique sont associés à une moindre sévérité de la COVID-19.....	115
D.	Mise en perspective de nos résultats avec ceux publiés depuis 2020	115
E.	Identification de gènes potentiellement régulés par AR et exprimés après infection	120
II.	Perspectives	123
	ANNEXES	125
I.	Publications supplémentaires au cours de la thèse	127
A.	Publication n°1	127
B.	Publication n°2	150
C.	Publication n°3	152
II.	Curriculum vitae	154
	BIBLIOGRAPHIE	156

RESUME

La pandémie de COVID-19 compte plus de 600 millions de cas recensés dans le monde et a fait plus de 6 millions de morts (chiffres en septembre 2022). Il a été constaté que les hommes atteints par la COVID-19 ont plus de risques que les femmes d'être hospitalisés, admis en soins intensifs ou de décéder de la maladie. Les effets physiologiques des androgènes figurent parmi les facteurs qui pourraient contribuer à cette différence. En outre, on sait déjà que l'expression du gène *TMPRSS2*, qui code une protéase cruciale dans l'entrée du virus, est régulée par les androgènes dans la prostate. Ainsi, la possible régulation de *TMPRSS2* par les androgènes dans le poumon pourrait expliquer, au moins en partie, la sévérité accrue observée chez les hommes face au SARS-CoV-2.

Notre objectif est d'étudier l'effet de la modulation d'expression des gènes par les androgènes, en particulier *TMPRSS2*, sur l'infection au SARS-CoV-2 et la sévérité de la COVID-19.

Nous avons établi une lignée de cellules prostatiques hormono-dépendantes surexprimant stablement ACE2, la protéine indispensable à l'infection au SARS-CoV-2, pour pouvoir mesurer l'effet de la modulation hormonale du gène *TMPRSS2* sur différentes étapes de l'infection au SARS-CoV-2 *in vitro*. Les résultats démontrent une modulation du taux d'infection cellulaire de manière hormono-dépendante. Plus précisément, grâce à l'utilisation de pseudovirus, nous avons montré que cet effet a lieu lors de l'entrée du virus.

En parallèle, *in vivo*, pour étudier l'effet des androgènes sur l'infection au SARS-CoV-2 et la sévérité de la maladie au cours du temps, nous avons utilisé un modèle de hamster, pour lequel nous avons réalisé la suppression androgénique par castration. Nos résultats montrent une réponse inflammatoire pulmonaire plus précoce chez les hamsters castrés, évaluée à la fois par un diagnostic anatomo-pathologique, par le suivi de cytokines inflammatoires et par analyse transcriptomique. Ce décalage de cinétique en réponse à l'infection au SARS-CoV-2 révèle un effet des androgènes dans le poumon via un programme transcriptionnel modifié. Ces résultats ont été complétés par une analyse de la cohorte CACOVID.

L'ensemble de ces résultats témoigne d'un rôle des androgènes dans le processus d'infection au SARS-CoV-2 et notamment dans la cinétique d'évolution de la maladie.

ABSTRACT

The COVID-19 pandemic has more than 600 million reported cases worldwide and has resulted in more than 6 million deaths (as of September 2022). Men with COVID-19 have been found to be more likely than women to be hospitalized, admitted to intensive care, or die from the disease. Physiological effects of androgens are among the factors that may contribute to this difference. In addition, it is already known that the expression of the *TMPRSS2* gene, which encodes a protease that is crucial for virus entry, is regulated by androgens in the prostate. Thus, the possible regulation of *TMPRSS2* by androgens in the lung could explain, at least in part, the heightened severity observed in men with SARS-CoV-2.

Our objective is to study the effect of gene expression modulation by androgens on SARS-CoV-2 infection and COVID-19 severity.

We established a hormone-dependent prostate cell line stably overexpressing ACE2, the protein essential for SARS-CoV-2 infection, to be able to measure the effect of hormonal modulation of the *TMPRSS2* gene on different stages of SARS-CoV-2 infection *in vitro*. The results demonstrate a hormone-dependent modulation of the cellular infection rate. More precisely, using pseudoviruses, we showed that this effect takes place during virus entry.

In parallel, *in vivo*, in order to study the effect of androgens on SARS-CoV-2 infection and disease severity over time, we used a hamster model, for which we performed androgen suppression by castration. Our results show an earlier pulmonary inflammatory response in castrated hamsters, assessed by anatomo-pathological diagnosis, inflammatory cytokine monitoring and transcriptomic analysis. This kinetic shift in response to SARS-CoV-2 infection reveals an effect of androgens in the lung via an altered transcriptional program. In men, these results were supported by an analysis of the CACOVID cohort, which identifies patients with cancer, including prostate cancer treated or not with hormone therapy, who had been diagnosed with COVID-19.

Together, these results indicate a role for androgens in the SARS-CoV-2 infection process and in particular in the kinetics of disease progression.

ABREVIATIONS

ACE2 Angiotensin-Converting Enzyme

ACTH Adrenocorticotropic Hormone

AR Androgen receptor

ARDS Acute respiratory distress syndrome

ARE Androgen response element

ARN Acide ribonucléique

BIC Bicalutamide

COVID-19 Coronavirus disease 19

CRH Corticotropin-Releasing Hormone

CRP C-reactive protein

CXCL C-X-C Motif Chemokine Ligand

DAD Diffuse alveolar damage

DHEA Déhydroépiandrostérone

DHT Dihydrotestostérone

ETS Erg related gene

ER Estrogen receptor

FGA Fibrinogen Alpha Chain

HGF Hepatocyte growth factor

HSP Heat shock protein

IFN Interféron

ISG Interferon stimulated gene

IL Interleukine

LBD Ligand-binding domain

LH Luteinizing Hormone

LHRH Luteinizing Hormone-Releasing Hormone

MERS Middle East respiratory syndrome

NK Natural Killer

NLR NOD-like receptor

NSP Non-structural protein

OMS Organisation Mondiale de la Santé

PAMP Pathogen-associated molecular pattern

PRR Pattern Recognition Receptor

RBD Receptor binding domain

RLR Retinoic acid-inducible gene I-like receptors

SARS-CoV Severe acute respiratory syndrome coronavirus

SARS-CoV-2 Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2

SHBG Sex-Hormone Binding Globulin

TLR Toll-like receptor

TMPRSS2 Transmembrane protease serine 2

TNF Tumor necrosis factor

TNM Tumor, Nodes, Metastases

VOC Variant of concern

VOI Variant of interest

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1 : Gravité de la COVID-19 et les différents symptômes associés.	19
Figure 2 : Axes thérapeutiques contre la COVID-19.....	21
Figure 3 : Changements alvéolaires associés au syndrome de détresse respiratoire aiguë (ARDS) induit lors de la COVID-19.....	23
Figure 4 : Mécanisme d'entrée et réplication du virus.....	26
Figure 5 : Réponse immunitaire innée suite à l'infection au SARS-CoV-2.....	28
Figure 6 : Régulation hormonale de la production des androgènes.	33
Figure 7 : Structure de la protéine du récepteur des androgènes avec ses différents domaines.	35
Figure 8 : Voie canonique et non canonique de AR.	36
Figure 9 : Gène de fusion <i>TMPRSS2:ERG</i> dans le cancer de la prostate.....	38
Tableau 1 : Incidence, mortalité et prévalence à 5 ans des principaux cancers dans le monde chez les hommes.....	42
Tableau 2 : Incidence, mortalité et prévalence à 5 ans des principaux cancers en France métropolitaine chez les hommes	43
Figure 10 : Les stades du cancer de la prostate.....	44
Tableau 3 : Niveau de risque de progression du cancer de la prostate selon D'Amico	45
Tableau 4 : Possibilités thérapeutiques dans le cancer de la prostate.	45
Figure 11 : Mode d'action des hormonothérapies du cancer de la prostate.	48
Tableau 5 : Etudes prospectives sur l'impact de l'hormonothérapie sur la COVID-19 chez des patients avec un cancer de la prostate.....	50
Tableau 6 : Essais cliniques évaluant l'impact de l'hormonothérapie sur la COVID-19.	53
Figure 12 : Modèles d'étude du SARS-CoV-2 et de la COVID-19	54
Figure 13 : Schéma récapitulatif du suivi des cytokines et du phénotype au cours de l'infection chez les hamsters intacts et castrés.	114
Tableau 7 : Résultats de la revue de la littérature pour confrontation des résultats obtenus dans notre étude	118

INTRODUCTION

I. Avant-propos

Les virus sont responsables de 25 % des maladies infectieuses émergentes humaines. L'émergence est définie par l'apparition d'un nouveau pathogène dans un hôte donné, qui peut dans certains cas conduire à une épidémie, voire à une pandémie. Elle est notamment favorisée par la perturbation d'un ou plusieurs facteurs au sein d'un écosystème. Un virus peut infecter spécifiquement l'animal ou l'humain. Lors de l'émergence d'un nouveau virus chez l'Homme, l'hôte d'origine du virus est dans la grande majorité des cas de nature non humaine, ce sont les virus dits zoonotiques. La capacité de ces virus à infecter l'Homme nécessite généralement la transformation d'un virus infectant l'animal en un virus infectant l'humain. Cette transformation requiert un certain nombre d'adaptations qui sont permises par la plasticité des génomes viraux. L'infection d'un nouvel hôte reste cependant limitée par les barrières d'espèces qui sont constituées des différences entre l'hôte initial et le nouvel hôte. Une fois cette barrière franchie, le virus peut également acquérir de nouvelles propriétés afin de se maintenir dans le nouvel hôte. Ces propriétés sont notamment acquises lors du cycle de réplication du virus via des modifications de son génome.

Ainsi en 2019 est apparu un nouveau virus humain, le SARS-CoV-2, responsable de la COVID-19. L'origine du virus n'est pas certaine. Au moins deux hypothèses sont à ce jour encore valables : la zoonose naturelle avec la transmission via la chauve-souris et un hôte intermédiaire qui serait le réservoir du virus, ou la propagation accidentelle du virus à l'étude au laboratoire de Wuhan. Dans un premier temps localisé, le virus s'est largement répandu, donnant naissance à une pandémie.

La COVID-19 se développe sous de multiples formes et touchent les individus de manière différente. La majorité des personnes présenteront des formes légères à modérée de la maladie, alors que d'autres nécessiteront des soins, une hospitalisation ou une admission en soins intensifs. Cette hétérogénéité s'explique par la présence de facteurs de risque. Parmi les facteurs qui induisent une fragilité face à la COVID-19 figurent, entre autres, l'âge, l'obésité, le cancer et l'immunodépression. De manière surprenante, le sexe a également été montré comme facteur de risque puisque les hommes sont plus sévèrement atteints que les femmes.

C'est dans ce contexte que s'inscrit cette thèse, portant sur le rôle des hormones sexuelles mâles, les androgènes, dans la COVID-19. Plus précisément nous avons d'abord étudié la régulation de la protéase TMPRSS2, nécessaire à l'infection virale, par les androgènes, et son impact sur la COVID-19, cherchant ainsi à déterminer si les androgènes sont impliqués dans la sévérité de la maladie, et si cela engage la régulation de *TMPRSS2*. Ensuite nous avons élargi notre étude à d'autres gènes.

II. Epidémiologie

La COVID-19 est une maladie infectieuse causée par le virus SARS-CoV-2. Ce virus a émergé fin 2019 à Wuhan, en Chine. Son origine n'est pas encore connue, l'hypothèse la plus plausible étant une origine zoonotique. Le réservoir pourrait être la chauve-souris ou un hôte. En effet la séquence virale qui présente le plus de similarité avec celle du SARS-CoV-2 est celle d'un virus prélevé chez une chauve-souris RaTG13 à Yunnan. Cependant la séquence virale du virus prélevé chez cet animal présente une distance génétique d'environ 4 %, soit environ 1 150 mutations, par rapport à la séquence de référence du SARS-CoV-2, ce qui reflète des décennies de divergence évolutive (Holmes et al. 2021). L'origine du virus reste donc encore à déterminer.

Le SARS-CoV-2 fait partie du genre des *betacoronavirus* et possède donc un ARN simple brin, d'environ 30 kb enveloppé et de sens positif, contenant 15 gènes (Masters 2006; Zhu et al. 2020). Le génome viral code pour quatre protéines structurales : les protéines membranaires, protéines de la nucléocapside, de l'enveloppe, et la glycoprotéine spike ; des protéines non structurales composant le complexe de réplication et de transcription virale et des protéines accessoires (Chen et al. 2020b). Ce coronavirus est phylogénétiquement proche de 2 autres coronavirus, le SARS-CoV (Severe acute respiratory syndrome coronavirus) et le MERS (Middle East respiratory syndrome), responsables de maladies respiratoires sévères qui ont émergé en 2002 et 2012 respectivement (Tratner 2003; Shirato et al. 2013).

Rapidement, le virus SARS-CoV-2 s'est répandu à travers le monde, touchant plus d'un demi-milliard de personnes et causant la mort de plus de 6 millions d'entre elles au mois de juillet 2022 (source : Johns Hopkins University COVID-19 Dashboard). Du fait de cette expansion incontrôlable, la COVID-19 a été qualifiée de pandémie par l'organisation mondiale de la santé le 11 mars 2020.

Le SARS-CoV-2 se transmet par les minuscules gouttelettes respiratoires émises par une personne infectée. Ces gouttelettes sont expulsées par la bouche ou par le nez lorsqu'une personne respire, tousse, éternue ou parle. Ces particules peuvent entrer en contact avec les muqueuses d'une personne non infectée située à proximité, et ainsi la contaminer. De ce fait les espaces clos, mal ventilés ou bondés, constituent des lieux à fort risque de contamination.

De par sa forte transmissibilité, de nombreux variants du SARS-CoV-2 sont apparus. Ces variants émergent naturellement lors de la réplication du virus lors de laquelle des erreurs de copie du matériel génétique, des mutations, peuvent se produire. Généralement sans conséquence fonctionnelle, certaines de ces mutations peuvent à l'inverse apporter un avantage sélectif au virus, comme une augmentation de sa contagiosité, ou de sa virulence.

L'organisation mondiale de la santé a ainsi mis en place deux dénominations majeures des variants : les variants d'intérêt « variant of interest » (VOI) et les variants préoccupants « variant of concern » (VOC). Les VOI sont des variants présentant des marqueurs génétiques spécifiques, associés à des changements de liaison aux récepteurs de la cellule hôte, à une neutralisation réduite par les anticorps générés après infection ou vaccination antérieure, à une efficacité réduite des traitements, à de potentiels impact sur le diagnostic, la transmissibilité ou la gravité de la maladie. Les VOC quant à eux sont des variants qui ont montré une augmentation de la transmissibilité ou de la sévérité, une réduction significative de la neutralisation par les anticorps générés après infection ou vaccination, d'une efficacité réduite des traitements, ou d'échecs de détection diagnostique (CDC 2020; Andrews et al. 2022).

La classification des variants est donc très dynamique selon leur pourcentage de représentation au sein de la population, leur virulence, mais également leur vitesse de propagation.

Ainsi, la souche originelle découverte à Wuhan, a rapidement laissé place, en septembre 2020 au Royaume-Uni, au variant alpha (B.1.1.7) portant une mutation D614G sur la protéine spike, lui conférant une contagiosité supérieure (Frampton et al. 2021; Volz et al. 2021). Le variant Beta (B.1.351) découvert en Afrique du Sud en octobre 2020 est ensuite devenue la souche dominante (Tegally et al. 2021). Après une diminution du nombre de cas de COVID-19, le variant Delta (B.1.617.2) a créé une forte recrudescence mondiale de la maladie (Mlcochova et al. 2021). Enfin, le variant Omicron (B.1.1.529) a progressivement remplacé le variant Delta fin 2021. Il est plus contagieux, mais moins virulent à cause d'une moins bonne capacité de réplication (Meng et al. 2022). Le variant Omicron a depuis été sous-divisé en de nombreux lignages qui en ont émergés (Ou et al. 2022).

Pour notre projet nous avons décidé d'utiliser le variant alpha B1.1.7, variant prédominant au début de nos recherches, pour l'aspect *in vitro*, et la souche originelle pour les études *in vivo*.

A. Plan clinique

1. Les différentes formes de COVID-19

Les coronavirus forment une famille de virus dont certains peuvent infecter l'homme, entraînant le plus souvent des symptômes bénins de type rhume.

Après infection au SARS-CoV-2, la période d'incubation dure en moyenne 5 à 8 jours. Le risque de transmission du virus est maximal 2 à 3 jours avant l'apparition des symptômes. Ce risque diminue ensuite progressivement et devient limité à partir du septième jour de symptômes. Ces durées sont à reconsidérer en fonction de la lignée du virus. Par ailleurs, plus les symptômes sont sévères plus le risque de transmission du virus se prolonge.

Sur le plan clinique, la maladie se présente sous de multiples formes (Figure 1). Une grande majorité des personnes ayant contracté la COVID-19 seront asymptomatiques ou développeront une forme légère, avec des symptômes modérés (maux de tête, toux, fièvre, perte du goût, de l'odorat, etc.).

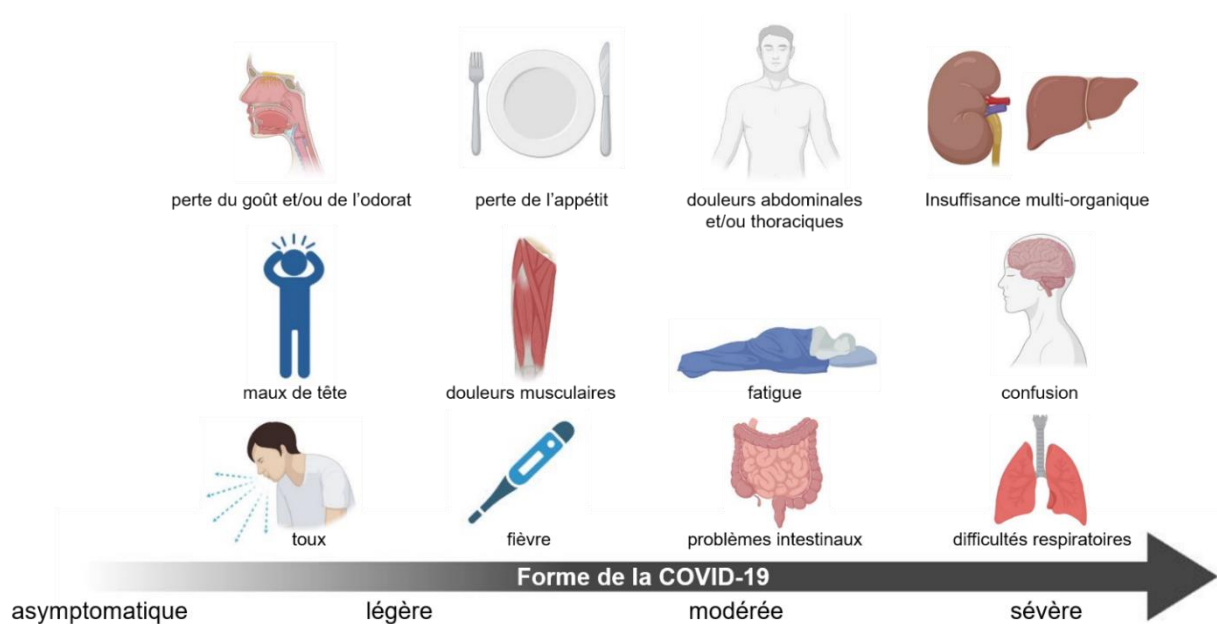


Figure 1 : Gravité de la COVID-19 et les différents symptômes associés.

Created in Biorender.com

Cependant, des formes sévères apparaissent, généralement une semaine après l'apparition des premiers symptômes (Figure 1).

Ces cas se traduisent par de l'essoufflement causé par une hypoxémie, et progressivement un syndrome de détresse respiratoire aiguë (ARDS) se développe. L'ARDS se caractérise par une hypoxémie sévère, des opacités radiographiques bilatérales par radiographie, une inflammation pulmonaire et une chute des échanges gazeux (Batah et Fabro 2021). En dehors de l'atteinte pulmonaire, les patients avec insuffisance respiratoire hypoxique présentent des signes d'hyper-inflammation systémique avec la libération de cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-1 (Interleukin-1), l'IL-6, l'IL-8 et le TNF (Tumor necrosis factor) et présentent des concentrations élevées de marqueurs inflammatoires dans le sang, notamment le D-dimère, la ferritine et la CRP (C-reactive protein). Par conséquent, des atteintes extra-pulmonaires apparaissent, notamment des symptômes gastro-intestinaux et des lésions amenant à des insuffisances cardiaques, rénales et hépatiques aiguës (Chen et al. 2020a; Huang et al. 2020a).

Ces formes nécessitent donc une prise en charge hospitalière lourde, notamment une admission en soins intensifs et une mise sous ventilation.

2. Traitements

La prise en charge de la COVID-19 est basée sur le degré de sévérité de la maladie mais également le risque de développer des formes sévères. Elle se fait selon 3 axes : thérapies anticoagulantes, immunomodulatrices et antivirales (Figure 2).

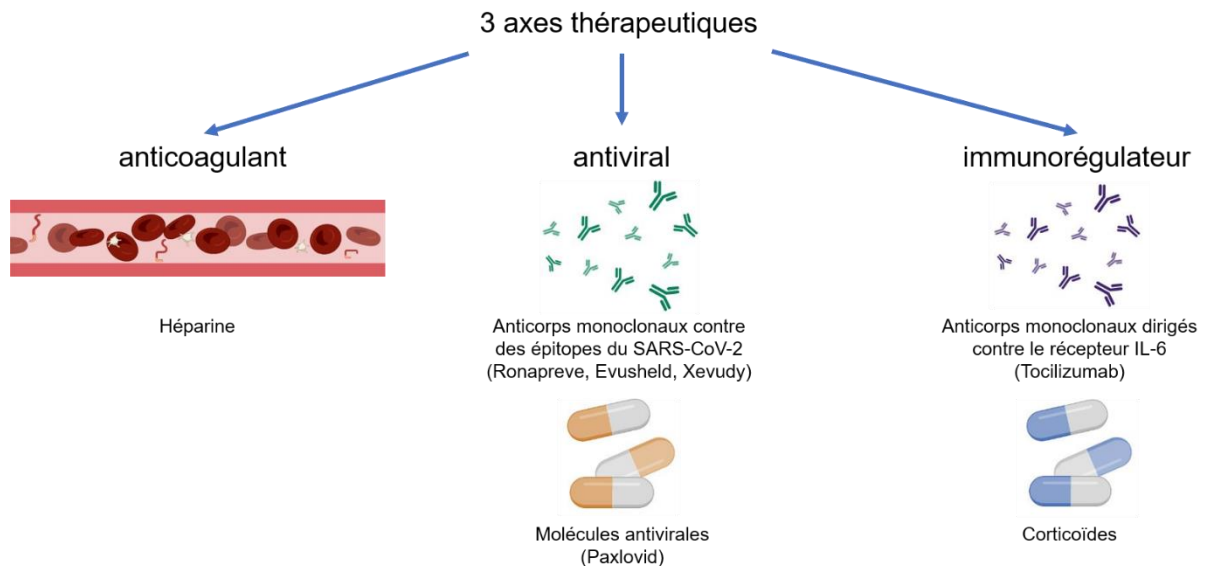


Figure 2 : Axes thérapeutiques contre la COVID-19.

Created in BioRender.com

De manière générale pour les patients hospitalisés, quel que soit leur degré de sévérité, l'héparine est administrée, à dose prophylactique ou thérapeutique, pour ses effets anti-coagulants (Figure 2). En effet, l'infection virale, via le choc cytokinique qu'elle induit, offre un terrain favorable à la formation de caillots et aux risques cardiovasculaires, l'héparine vient donc contrecarrer cet effet (REMAP-CAP Investigators et al. 2021; Spyropoulos et al. 2021).

La thérapie immunomodulatrice utilise des corticostéroïdes comme la dexaméthasone, aux effets anti-inflammatoires. Ils sont prescrits pour les personnes hospitalisées et sous oxygénation. Ce traitement peut être complété par du tocilizumab, un anticorps monoclonal humanisé et immunosuppresseur qui bloque l'action des récepteurs de l'interleukine 6 (Figure 2).

Enfin, les antiviraux sont largement utilisés chez les patients à risque de développer des formes sévères (Figure 2). A ce jour, seul le Paxlovid est autorisé en France. Il s'agit de l'association nirmatrelvir/ritonavir, qui agit en inhibant l'enzyme nécessaire à la réplication virale, la protéase 3C-like, il bloque donc la réplication du SARS-CoV-2.

Ce traitement permet de réduire de plus de 85% le risque de développer une forme grave (Hammond et al. 2022).

De nombreux anticorps monoclonaux ciblant le SARS-CoV-2 ont également été développés (Figure 2). L'apparition des différents variants en ont rendu certains obsolètes, ou dont l'usage est spécifique du variant contracté. Trois anticorps sont disponibles en France. Le RONAPREVE est l'association de 2 anticorps (casirivimab/imdevimab) qui doit être administré précocement chez les personnes touchées par le variant Delta. L'EVUSHELD associant le tixagévimab et le cilgavimab, est préconisé en tant que traitement préventif pour les personnes non répondantes aux vaccins et à fort risque de développer des formes sévères. Enfin, le XEVUDY (sotrovimab) est recommandé dans les 5 jours suivant l'apparition des premiers symptômes pour les adultes et adolescents à risque de développer une forme sévère et qui ne nécessitent pas une mise sous oxygénation (Mouffak et al. 2021).

3. Vaccins

La difficulté à contenir la propagation du virus a conduit à une situation sanitaire critique avec des hôpitaux saturés, et à la nécessité de développer rapidement des vaccins, classiquement utilisés pour lutter contre les infections virales.

Plusieurs types de vaccins ont ainsi été développés. Les vaccins traditionnels à virus entier inactivé ou atténué, ou contenant des sous-unités du virus ont été produits, c'est le cas des vaccins Sinovac et Novavax (Heath et al. 2021; Zhang et al. 2021). Ils vont mimer l'infection virale et directement activer le système immunitaire. Le vaccin peut également être basé sur l'utilisation d'un vecteur viral, son action repose sur l'injection d'un virus non pathogène, comme un adénovirus, contenant une séquence codant une protéine du SARS-CoV-2, généralement la protéine spike. La séquence ainsi introduite va être traduite dans les cellules de l'hôte et reconnue comme antigène par le système immunitaire activé (Lundstrom 2021). Deux vaccins majeurs de ce type ont été utilisés : Astra Zeneca et Johnson & Johnson (Shay et al. 2021; Voysey et al. 2021). Enfin, l'urgence sanitaire a conduit au développement d'un nouveau type de vaccin : les vaccins à ARN et ADN. Parmi eux on peut citer les vaccins Pfizer/BioNTech et Moderna, vaccins à ARN très largement utilisés en France et dans le monde. Dans ce cas, les séquences nucléiques injectées sont traduites, générant des protéines virales

reconnues par le système immunitaire qui va produire des anticorps contre ces antigènes (Li et al. 2022).

B. Plan pathologique

Les aspects cliniques sont la conséquence de nombreux dommages au niveau tissulaire. En effet, sur le plan histologique, le tissu pulmonaire présente de nombreuses altérations au sein de ses différentes structures (Figure 3).

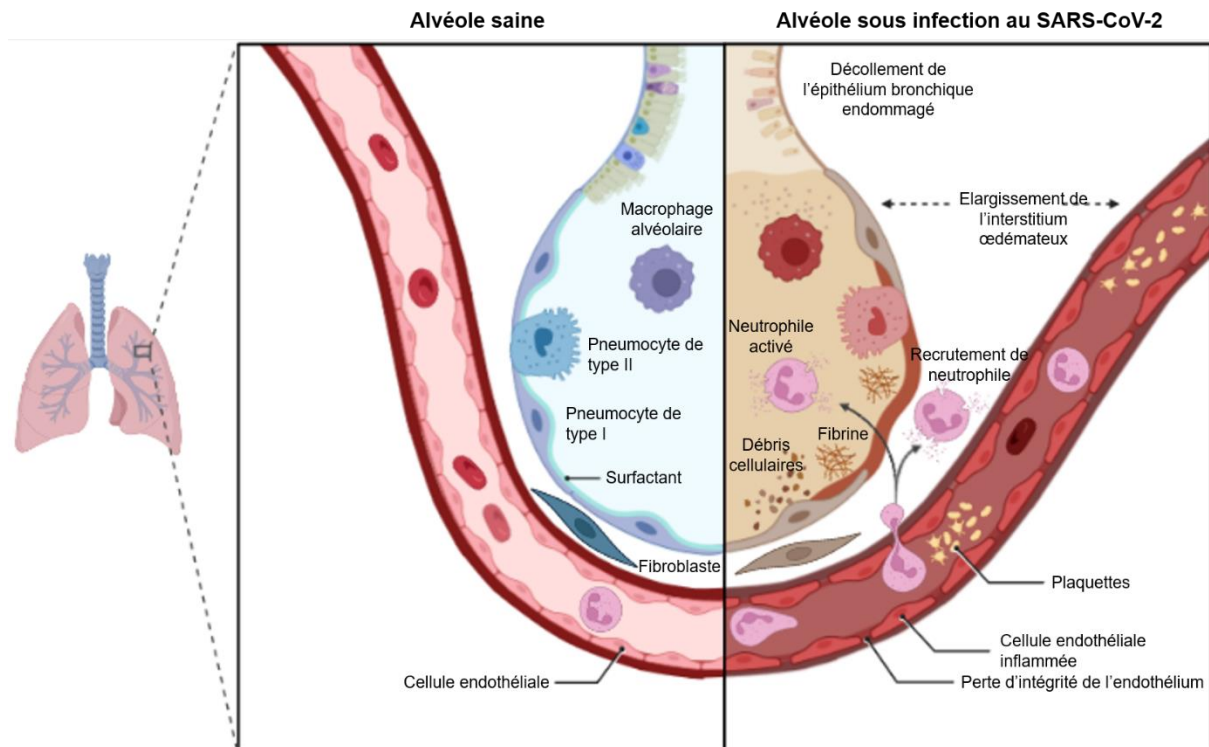


Figure 3 : Changements alvéolaires associés au syndrome de détresse respiratoire aiguë (ARDS) induit lors de la COVID-19.

Created in BioRender.com

Ces altérations étant communes à de précédents coronavirus pathogènes de l'homme, comme le MERS ou le SARS-CoV, des méthodes d'évaluation de ces dommages, basées sur de l'analyse immunohistologique, existaient déjà (Imai et al. 2020; Meyerholz et Beck 2020). D'un point de vue histologique, l'ARDS présente un profil connu, nommé DAD (Diffuse alveolar damage), retrouvé de manière majoritaire chez les personnes décédées de la COVID-19 (Batah et Fabro 2021) (Figure 3). Il se caractérise par une altération des parois endothéliales et alvéolaires induites, entre autres, par la mort des pneumocytes et l'hyperplasie des pneumocytes de type 2. Ces dommages vont avoir pour conséquence une fuite de liquide et de cellules avec formation d'œdème interstitiel et intra-alvéolaire, de membranes hyalines, d'une

thrombose microvasculaire et d'une congestion capillaire (Menter et al. 2020; Batah et Fabro 2021) (Figure 3).

La perte d'intégrité de l'épithélium alvéolaire, responsable de la phase exsudative, déclenche un déséquilibre entre l'activation de la coagulation et l'inhibition de la fibrinolyse (Sebag et al. 2011). Cette dernière va déclencher la formation de membranes hyaline, structures riches en fibrine issue des exsudats, qui diminue les capacités d'échanges gazeux au niveau des alvéoles. La fibrine est également retrouvée sous forme de thrombi dans les petits vaisseaux sanguins (Iba et al. 2020; Klok et al. 2020). Du fait de la coagulation accrue chez les formes graves de COVID-19, la sévérité de la pathologie est associée à une diminution du nombre de plaquettes, utilisées pour la coagulation (Lippi et al. 2020).

C. Plan biologique

1. Mécanisme d'entrée et réplication du virus

Le mécanisme d'infection au SARS-CoV-2 a rapidement été décrypté. Les précédentes recherches sur le SARS-CoV et le MERS, coronavirus phylogénétiquement proches du SARS-CoV-2 ont, en effet, permis de faire le lien avec ce nouveau virus.

Le tropisme du virus est largement conditionné par la glycoprotéine spike présente sous forme de trimère à la surface du virion. La protéine spike est formée de 2 sous-unités, la sous-unité S1 qui fixe le récepteur de la cellule hôte et une sous-unité S2 qui médie la fusion membranaire (Hulswit et al. 2016). Comme pour le SARS-CoV, le récepteur ACE2 (Angiotensin-Converting Enzyme 2) est indispensable à l'entrée du virus (Figure 4). La protéine virale spike, via son domaine RBD (receptor binding domain) vient lier le récepteur ACE2 de la cellule hôte (Hoffmann et al. 2020b). Une fois liée à ACE2, la protéine spike nécessite d'être clivée en 2 sites, S1/S2 et S2', pour permettre la fusion et donc l'entrée dans la cellule. Cette étape indispensable requiert la furine pour le clivage S1/S2 et la protéase à sérine TMPRSS2 (transmembrane protease serine 2), qui clive la protéine spike en S2' (Hoffmann et al. 2020a; Essalmani et al. 2022) (Figure 4). La dépendance à TMPRSS2 pour l'entrée virale est retrouvée pour le SARS-CoV et le MERS (Shirato et al. 2013; Hoffmann et al. 2020b).

D'autres protéines ont été montrées comme acteur de l'entrée virale. La protéine NRP1 (Neuropilin-1) ou encore les lectines de type C peuvent intervenir en tant que récepteur secondaire, et soutenir l'entrée virale (Cantuti-Castelvetri et al. 2020; Daly et al. 2020; Thépaut et al. 2021; Sung et al. 2022). Une seconde voie d'entrée du virus existe, dite voie endosomale, mais n'est pas majoritaire dans le poumon du fait de la faible expression des protéases de cette voie. Cette dernière engage l'endocytose dépendante des clathrines suivie du clivage en S2' par les cathepsines B ou L dans l'endolysosome tardif (Simmons et al. 2005; Bayati et al. 2021). De même, pour l'activation du processus d'internalisation du virus, d'autres protéases peuvent également être impliquées dans le clivage S2' telles que les métalloprotéases ADAM10 et 17 et la sérine protéase TMPRSS4 (Zang et al. 2020; Jocher et al. 2022).

Lors de l'infection virale, les premières cellules à être infectées sont les cellules des voies respiratoires hautes, notamment les cellules multiciliées du nasopharynx et de la trachée ou les cellules sustentaculaires de la muqueuse olfactive nasale (Hou et al. 2020; Ahn et al. 2021; Khan et al. 2021).

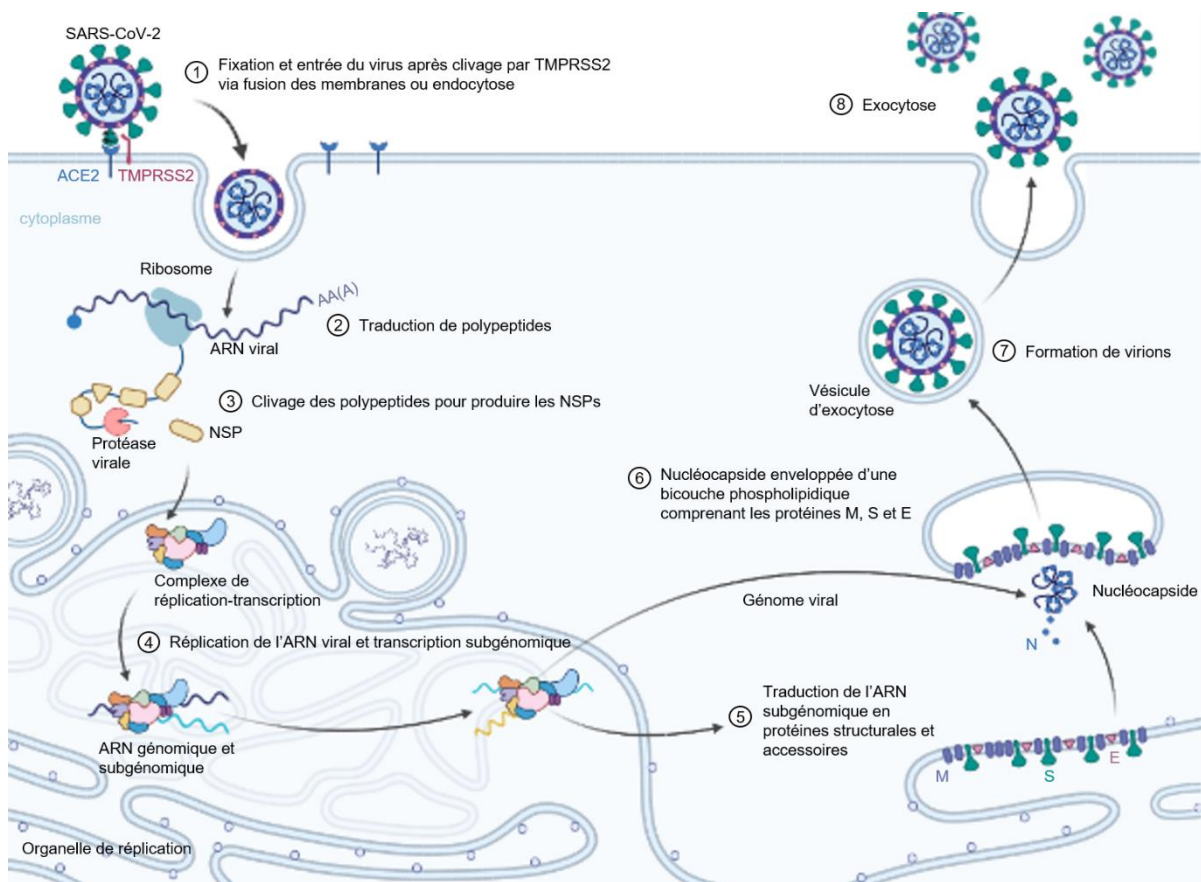


Figure 4 : Mécanisme d'entrée et répllication du virus.

NSP: Non-structural protein ; M, S et E: protéine membranaire, spike et de l'enveloppe respectivement.

Created in BioRender.com

Une fois relargué dans la cellule, l'ARN génomique viral est traduit par les ribosomes de la cellule hôte en 2 polyprotéines réplcasses pp1a et pp1ab. De ces polyprotéines sont générées, par clivage protéolytique, les 16 protéines NSPs (Non-structural proteins) qui s'assemblent en un complexe répllication-transcription et promeuvent la répllication virale (Masters 2006; Finkel et al. 2021) (Figure 4). Parmi les protéines de ce complexe, certaines remodelent les membranes cellulaires du réticulum endoplasmique en structures particulières à double membrane, appelées "organelles de répllication", dans laquelle se réalise la synthèse de l'ARN génomique (Snijder et al. 2020). Un ensemble d'ARN subgénomique est également produit dans ces organelles, leur traduction permet la synthèse des protéines structurales (Figure 4). Ainsi la production de nouveaux virions est possible, avec l'ARN génomique entouré de la nucléocapside, suivi d'une bicouche phospholipidique porteuse des protéines de membrane, de l'enveloppe et de la protéine spike. Les virions sont ensuite évacués de

la cellule par le trafic vésiculaire intracellulaire et implique notamment les lysosomes (Ghosh et al. 2020) (Figure 4).

2. Réponse à l'infection virale au SARS-CoV-2

a. Réponse immunitaire innée

Une fois dans l'hôte, le virion, notamment les protéines exprimées à sa surface (protéine spike, de l'enveloppe ou membranaire), est rapidement détecté par le système immunitaire (Figure 5). En effet, le virion sera reconnu en tant que motif PAMP (Pathogen-associated molecular pattern) par les récepteurs PRR (Pattern Recognition Receptor) exprimés par les cellules du système immunitaire innée (macrophages, monocytes, cellules dendritiques, neutrophiles, cellules natural killer et cellules lymphoïdes innées). Parmi les PRR qui répondent à l'infection au SARS-CoV-2 figurent les récepteurs TLR (Toll-like receptor, les NLR (NOD-like receptor) et les RLR (retinoic acid-inducible gene I-like receptor) (Figure 5). Cette reconnaissance entraîne l'activation des voies de signalisation de l'inflammation et plus spécifiquement la production de cytokines et chimiokines ainsi que l'induction de la mort des cellules infectées (Kanneganti 2020) (Figure 5). Dans le cas du TLR, le signal est transduit via 2 protéines adaptatrices possibles MyD88 et TRIF, qui activent les voies impliquant le facteur de transcription NF- κ B, les MAPK ou encore IRF3. A leur tour ces protéines entraînent l'activation transcriptionnelle de plusieurs cytokines pro-inflammatoires, dont le TNF, l'IL-6 et l'IL-1, d'interférons et ses gènes stimulés ainsi que la transcription de gènes codant pour d'autres récepteurs de l'immunité innée, comme le NLRP3 (Akira et Takeda 2004) (Figure 5). La voie des RLR, quant à elle, va induire la production d'interféron de type I et III, qui vont activer les récepteurs aux interférons de sorte à activer la transcription des gènes ISG (interferon stimulated genes) (Thorne et al. 2021). Les récepteurs NLR activés participent à la formation de l'inflammasome, qui

permet la production de forme active de l'IL-1 β et IL-18, ainsi que la gasdermine inductrice de la pyroptose (Christgen et Kanneganti 2020) (Figure 5).

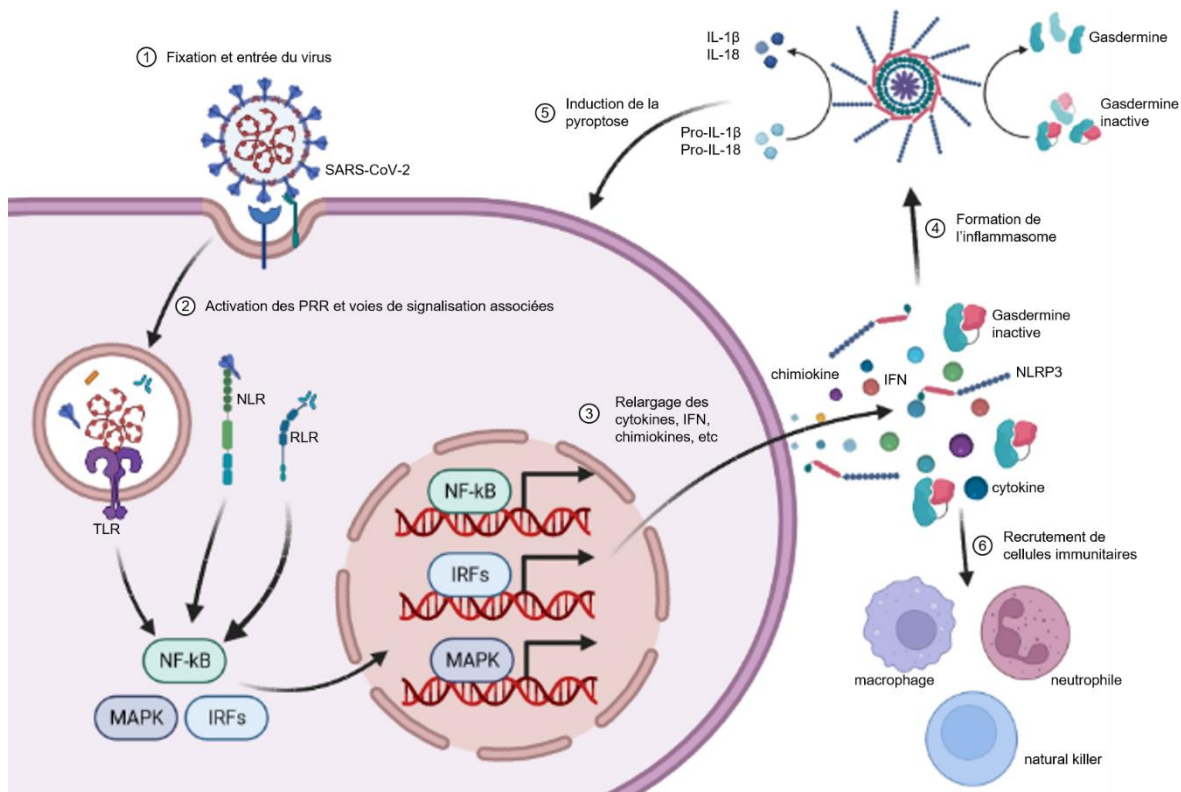


Figure 5 : Réponse immunitaire innée suite à l'infection au SARS-CoV-2.

PRR: pattern recognition receptor; TLR: Toll-like receptor; NLR: Nod-like receptor; RLR: retinoic acid-inducible gene I-like receptors; IFN: Interferon.

Created in BioRender.com

Tous ces acteurs constituent la première ligne de défense face à la COVID-19 et permettent entre autres de contenir l'infection en empêchant l'entrée du virus et sa réplication. Le niveau d'expression des cytokines pro-inflammatoires chez une personne atteinte par la COVID-19 est donc élevé. Ainsi, il arrive que la production des cytokines devienne anormalement élevée et incontrôlée et engendre un phénomène hyperinflammatoire notamment dans le poumon. Or une production trop élevée devient néfaste pour l'organisme et entraîne un choc cytokinique. Le choc cytokinique se définissant par une production excessive de cytokines médiée par la mort cellulaire inflammatoire dite PANoptose, et pouvant être mortelle. La PANoptose est induite quand il y a une synergie d'activation du facteur de transcription STAT1 et IRF1 par le TNF et l'IFN- γ qui conduit à l'activation de la caspase 8 et à la mort cellulaire. Un cercle vicieux se met alors en place avec des dégâts tissulaires importants qui amènent à la production de davantage de cytokines aux effets délétères en de telles quantités (Karki

et al. 2021). Ce phénomène constitue le mécanisme principal des formes sévères de COVID-19.

b. Réponse immunitaire adaptative

Une fois le système immunitaire inné activé, la réponse immunitaire adaptative va être enclenchée. Cette dernière est importante pour le contrôle de l'infection et l'élimination du pathogène. Sous l'action de l'IFN de type I, les cellules du système immunitaire innées vont maturer pour devenir des cellules présentatrices d'antigène, ici des peptides viraux du SARS-CoV-2. Ces cellules sont indispensables puisqu'elles vont activer la différenciation et la maturation des lymphocytes T CD4⁺, CD8⁺ et régulateurs naïfs via leur liaison avec le T-cell receptor. Les lymphocytes T CD4⁺ vont à leur tour recruter des cellules immunitaires innées et activer les lymphocytes B producteurs d'anticorps dirigés contre des épitopes du SARS-CoV-2. Ils vont également avoir une action antivirale directe via la production de cytokines et d'IFN γ et une activité cytotoxique. Les lymphocytes T CD8⁺ quant à eux ont la capacité de lyser les cellules infectées par le virus (Sette et Crotty 2021).

III. Facteurs de risque

Bien que tout le monde puisse être infecté par le SARS-CoV-2, certaines personnes présentent une susceptibilité plus importante et sont donc davantage prédisposées à développer des formes sévères.

Parmi les premières comorbidités qui ont été recensées figure l'obésité. Souvent, elle est associée à d'autres pathologies dites chroniques, qui elles-mêmes ont été décrites comme comorbidités de la COVID-19, comme le diabète. L'obésité, tout comme le diabète, entraîne une perturbation du système immunitaire dont une inflammation chronique à bas seuil (Maddaloni et Buzzetti 2020; Simonnet et al. 2020). Celle-ci se rajoute à la réponse inflammatoire face au virus qui, si elle est trop importante, peut être délétère, ce stade étant nommé choc cytokinique (Mehta et al. 2020; Tufan et al. 2020).

De manière générale, toute pathologie ou condition physique qui altère le système immunitaire sera source de susceptibilité à l'infection virale. Par définition, les personnes immunodéprimées sont à risque (Wu et McGoogan 2020). On peut

également citer le cancer, dont les personnes touchées présentent un système immunitaire affaibli et offre donc un environnement propice à la réplication du SARS-CoV-2 (Dai et al. 2020a; Liang et al. 2020).

Il en est de même pour les personnes souffrant de pathologies respiratoires, cardio-vasculaires ou encore d'hypertension. Le SARS-CoV-2 touchant majoritairement les poumons, ces personnes présentent un terrain plus à risque des symptômes sévères de la COVID-19 (Fang et al. 2020; Ko et al. 2021).

L'âge est également un facteur de risque important. Très rapidement une tendance s'est dessinée puis confirmée avec une augmentation des risques de développer des formes sévères avec l'âge. Cela se définit par un nombre d'hospitalisation, d'admission en soins intensifs et une mortalité qui augmentent chez les personnes âgées de plus de 60 ans et davantage chez les plus de 85 ans. A l'inverse, très peu de jeunes adultes (moins de 45 ans) sont admis en soins intensifs (Bialek et al. 2020).

Enfin, un autre facteur de risque, moins intuitif, a émergé avec l'augmentation des cas : le genre. De nombreux pays ont noté un risque accru de développer des formes sévères chez l'homme par rapport aux femmes (Fang et al. 2020; Ko et al. 2021). En France, parmi les personnes hospitalisées ou admises en soins intensifs, 58 et 73% respectivement sont des hommes, et en ce qui concerne la mortalité due à la COVID-19, 58% sont du sexe masculin (source : <https://globalhealth5050.org/the-sex-gender-and-covid-19-project/>). Beaucoup de discussions concernant l'origine de cette différence en ont émergé (Ambrosino et al. 2020; Gebhard et al. 2020; Jin et al. 2020; Amgalan et al. 2021). Parmi les points discutés figure la différence d'immunité entre les hommes et les femmes. En effet, la réponse inflammatoire est différente avec une production de cytokines distinctes, de même pour la régulation des cellules immunitaires. Ainsi, les hommes sont plus touchés par le cancer et par les maladies infectieuses, et sont moins réceptifs aux vaccins. A contrario, les femmes sont plus réceptives aux vaccins et sont donc plus sujettes aux effets secondaires, et présentent un système immunitaire plus efficace (Congy-Jolivet et al. 2022). Ce dernier point fait qu'elles sont davantage touchées par des maladies auto-immunes, pour exemple elles représentent 80% des patientes de maladies auto-immunes aux Etats-Unis (Klein et Flanagan 2016). Cela s'explique, en partie d'un point de vue génétique, puisque de nombreux gènes de la réponse immunitaire se trouve sur le chromosome X comme *TLR7*, *TLR8* and *IRAK1*. Or, des gènes, environ 15% chez l'humain, peuvent échapper

à l'inactivation du second chromosome X chez la femme, amenant ainsi à une duplication de certains gènes impliqués dans la voie de signalisation des TLR (Toll-like receptor) comme TLR-7. L'expression des gènes qui découlent de cette voie est plus importante lors d'une réponse antivirale chez la femme que chez l'homme (Congy-Jolivet et al. 2022). En outre, la présence d'éléments de réponse aux œstrogènes (ERE) et androgènes (ARE) dans les promoteurs de ces gènes de l'immunité innée suggère que les hormones sexuelles peuvent induire des réponses immunitaires distinctes (Hannah et al. 2008). Dans ce sens, les hormones femelles, les œstrogènes, ont été décrites comme immunoactivatrices et les hormones mâles, la testostérone, comme immunosuppressives (Klein et Flanagan 2016). Ainsi, face à l'infection virale les hommes semblent moins protégés. L'analyse comparative du séquençage de ce chromosome X chez des hommes atteints de forme sévère par rapport à des formes légères a permis de faire ressortir des variants pertes de fonction du gène TLR7 chez 1.8% de ces hommes. Ce gène participe à la production d'IFN (interféron) de type 1, de ce fait les personnes porteuses de ce variant présentent une déficience en IFN de type 1 et donc une moindre défense immunitaire face à l'infection au SARS-CoV-2 (Asano et al. 2021).

Des études ont par ailleurs mis en évidence d'autres défaillances dans la réponse immunitaire médiée par les IFN de type 1 (Hadjadj et al. 2020). L'une d'entre elle met en avant la présence d'autoanticorps anti-IFN de type 1 chez 10% des personnes en soins critiques dû au SARS-CoV-2. Ces auto-anticorps sont absents chez les personnes présentant une forme asymptomatique ou légère à moyenne de la maladie. De manière intéressante, 94% des personnes en soin critique et présentant ces auto-anticorps sont des hommes (Bastard et al. 2020). Dans les deux cas, la perturbation de la réponse immunitaire par les IFN de type 1 est un marqueur clé prédisposant au développement des formes graves de la COVID-19. Ce marqueur est majoritairement retrouvé chez les hommes. Cependant le nombre de cas que cela représente n'explique pas totalement la différence de sévérité de la pathologie entre les hommes et les femmes.

Une étude réalisée chez le model du hamster syrien doré a confirmé l'observation épidémiologique avec une sévérité de la COVID-19, en termes de symptômes et de lésions pulmonaires, plus sévère chez les mâles par rapport aux hamsters femelles (Yuan et al. 2021). Dans une autre étude, les auteurs ont été plus loin. Ils ont dans un

premier temps démontré une atteinte pulmonaire plus importante chez les hamsters mâles par rapport aux hamsters femelles. Cette sévérité ne diminue pas avec un traitement aux œstrogènes, plus précisément les œstradiols, chez les hamsters mâles. L'étude a cependant mis en avant que la différence de sévérité entre les deux sexes n'était pas liée à une différence de cinétique de réplication virale dans les voies respiratoires ni à une réponse cytokinique pulmonaire différente, mais à une réponse antivirale par les anticorps plus forte chez les hamsters femelles dans le plasma et le système respiratoire (Dhakal et al. 2021).

IV. Androgènes et COVID-19

La question du rôle des hormones sexuelles dans la COVID-19 a rapidement été soulevée (Ambrosino et al. 2020). En effet, une des différences majeures entre les hommes et les femmes est le type d'hormone qu'ils produisent et leur quantité. Ainsi chez les femmes, les hormones majoritaires sont l'œstrogène et la progestérone, et chez l'homme on retrouve principalement les androgènes.

A. Physiologie des androgènes

1. Synthèse des androgènes

Chez l'homme, les androgènes sont majoritairement produits par les testicules (80 à 90%) et de manière minoritaire par les glandes surrénales (10 à 20%). Chez les rongeurs, seuls les testicules contribuent à la production androgénique (van Weerden et al. 1992). Le système hypothalamo-hypophysaire contrôle la synthèse mais également la sécrétion des androgènes (Figure 6).

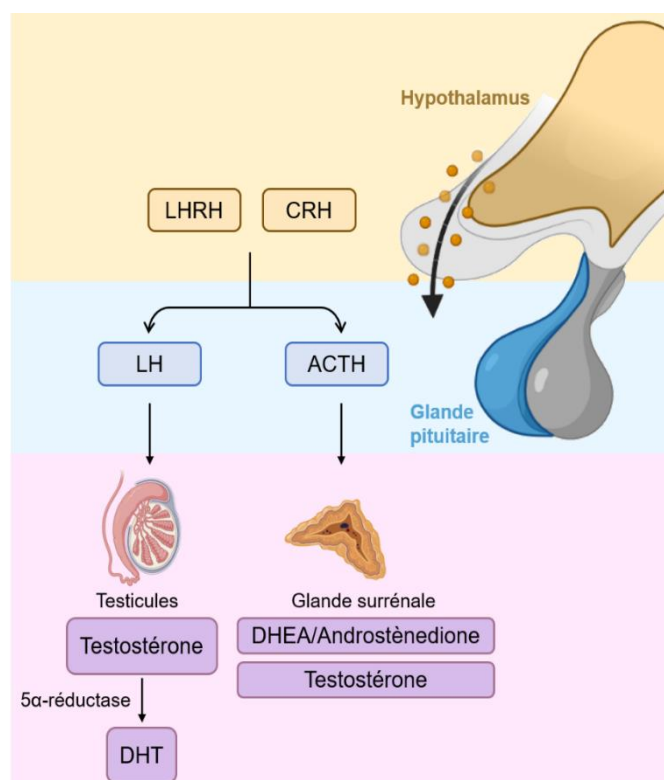


Figure 6 : Régulation hormonale de la production des androgènes.

LHRH: Luteinizing Hormone-Releasing Hormone; CRH: Corticotropin-Releasing Hormone; LH: Luteinizing Hormone; ACTH: Adrenocorticotropic Hormone; DHEA: Déhydroépiandrostérone; DHT: Dihydrotestostérone

Created in Biorender.com

La LHRH (Luteinizing Hormone-Releasing Hormone) et la CRH (Corticotropin-Releasing Hormone) synthétisées et activées dans l'hypothalamus entraînent respectivement, via leur récepteur, la sécrétion de LH (Luteinizing Hormone) et ACTH (Adrenocorticotropin Hormone) (Figure 6). La LH agit sur son récepteur dans les cellules de Leydig dans les testicules et active la sécrétion de testostérone. Dans les glandes surrénales, l'ACTH permet la production de testostérone, d'androstènedione et de DHEA (déhydroépiandrostérone) (Figure 6). Les deux dernières hormones ne sont que peu actives en tant que telles mais peuvent participer à la production de testostérone par leur transformation. Une fois sécrétée, la testostérone est majoritairement liée et séquestrée par les protéines SHBG (Sex-Hormone Binding Globulin) et albumine. Seule une minorité de la testostérone, environ 3%, est donc non liée et active. Bien qu'étant majoritaire, la testostérone n'est pas l'androgène le plus fonctionnellement actif. En effet, une fois diffusée dans le cytoplasme, la testostérone est convertie en DHT (dihydrotestostérone), par l'enzyme 5 α -réductase, qui possède une affinité cinq fois plus importante pour le récepteur des androgènes (AR) (Figure 6). Un rétrocontrôle négatif de la testostérone permet de réguler sa production (Handelsman 2000; McEwan et Brinkmann 2000).

Au cours de la vie, les sources et quantités d'androgènes varient chez l'homme. Avant la puberté, la principale source d'androgènes est la glande surrénale avec une faible quantité produite. La puberté masculine et les changements qui lui sont associés sont marqués par l'augmentation importante de la sécrétion testiculaire de testostérone. Cette dernière est environ 30 fois supérieure aux niveaux retrouvés chez les enfants prépubères et chez les femmes, chez qui la testostérone provient de sources extra-testiculaires. Enfin, en lien avec le vieillissement mais aussi avec des pathologies telles que l'obésité, une diminution progressive du taux de testostérone circulant est observée (Gray et al. 1991b). Ceci est attribuable à une altération de la régulation hypothalamique de la fonction testiculaire, ainsi qu'au dysfonctionnement des cellules de Leydig et à l'athérosclérose des vaisseaux testiculaires. Ainsi l'accumulation de défauts fonctionnels tout au long de l'axe hypothalamo-hypophyso-testiculaire entraîne une baisse de concentration de testostérone circulante au cours du vieillissement masculin (Gray et al. 1991a).

2. Récepteur des androgènes

L'effet des androgènes dépend du récepteur des androgènes, qui appartient à la superfamille des récepteurs nucléaires. Il agit en tant que facteur de transcription via des sites de reconnaissance spécifique, appelés éléments de réponse aux androgènes, ARE (Androgen response element), situés dans les séquences promotrices des gènes qu'il régule (Figure 7). Le gène humain codant pour AR est situé sur le chromosome X (Xq11-12). Il s'étend sur 90 kb et code pour 918 acides aminés. La protéine AR générée fait 110kDa et possède 4 motifs distincts, le domaine amino-terminal (NTD), le domaine de liaison à l'ADN (DBD) assurant la reconnaissance d'ARE, la région charnière qui contient le signal d'adressage au noyau et le domaine de fixation du ligand LBD (Ligand-binding domain) (Figure 7) (Dehm et Tindall 2007; Schreyer et al. 2017).



Figure 7 : Structure de la protéine du récepteur des androgènes avec ses différents domaines.

NTD: domaine amino-terminal; DBD: domaine de liaison à l'ADN; RC: région charnière; LBD: domaine de liaison du ligand.

Dans le cytoplasme AR est inactif, et sa stabilité est assurée par sa liaison à un complexe de protéines chaperonnes dont les protéines de réponse au choc thermique HSP (Heat shock protein). Parmi ces protéines, la HSP90 maintient AR dans un état conformationnel assurant une forte affinité pour son ligand, la DHT (Figure 8). Une fois lié aux androgènes via le LBD, AR change de conformation, se dissocie du complexe de protéines chaperonnes, est phosphorylé et forme un homodimère. Cela permet sa translocation au noyau dans lequel il se fixe sur les ARE de ses gènes cibles. Cette fixation est sous l'influence de nombreux corégulateurs transcriptionnels, environ 150 décrits qui, par exemple, modifient la structure de la chromatine et la rendent plus ou moins accessible (Figure 8) (Heemers et Tindall 2007).

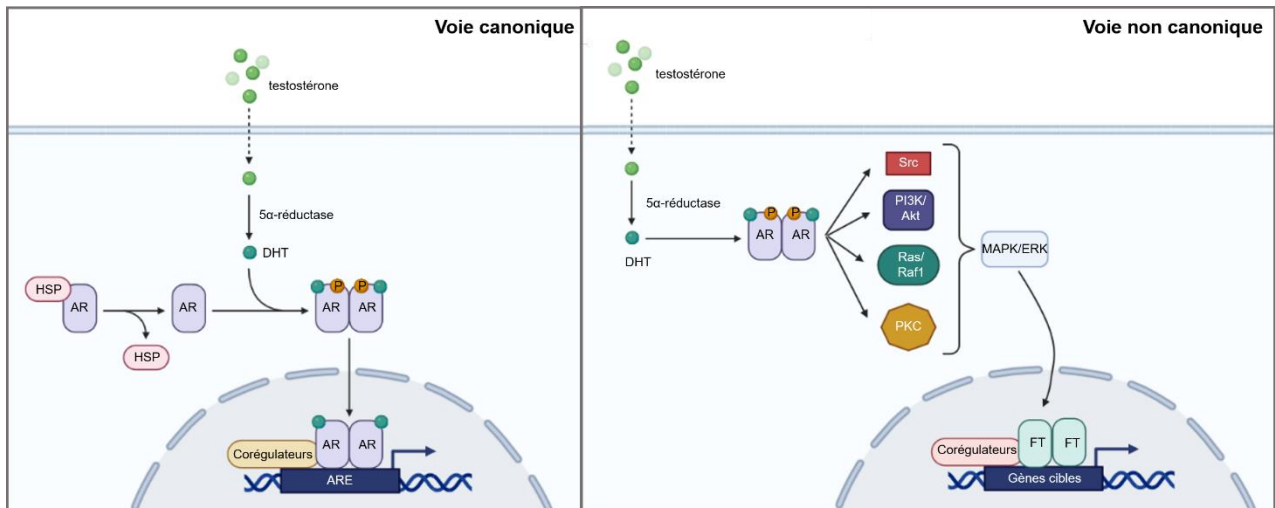


Figure 8 : Voie canonique et non canonique de AR.

DHT: Dihydrotestostérone; AR: Androgen receptor; ARE: Androgen Response Element ; FT: Facteur de transcription

Created in BioRender.com

Cette voie de signalisation de AR est appelée voie classique, canonique ou génomique (Figure 8). Un autre mécanisme d'action de AR existe, appelé voie non génomique. Dans cette dernière, après fixation du ligand, AR n'agit pas comme facteur de transcription, il reste dans le cytoplasme dans lequel il va activer des cascades de signalisation cytoplasmiques convergeant vers la voie des MAPK et l'activation de facteurs de transcription (Schreyer et al. 2017).

3. Rôle physiologique des androgènes

AR est exprimé de manière quasi ubiquitaire dans le corps humain. Son activation par les androgènes joue un rôle clé dans le développement et le maintien de la différenciation sexuelle masculine. Il est donc crucial pour le développement et le fonctionnement des organes reproducteurs masculins, tels que la prostate et l'épididyme. Outre son rôle principal dans la différenciation sexuelle, les androgènes influent également sur d'autres tissus et fonctions (De Gendt et Verhoeven 2012). En effet, il impacte également le métabolisme et des organes non reproducteurs, tels que les muscles, les os, les follicules pileux et le cerveau (Mooradian et al. 1987; Matsumoto et al. 2008). Cette action peut être dépendante du sexe et de la période de développement. Par exemple, les androgènes peuvent impacter la balance énergétique via son action sur les neurones et donc sur les messages qu'ils envoient. Ainsi, un excès de testostérone chez la femme au moment du développement prénatal prédispose au développement de l'obésité et au diabète de type 2 (Ehrmann et al.

1999; Cardoso et al. 2015). A l'inverse, chez les hommes, c'est une déficience en testostérone qui prédispose au développement de l'obésité et au diabète de type 2 (Ding et al. 2006; Escobar-Morreale et al. 2014). L'obésité liée à la déficience en testostérone chez les hommes concordent avec les résultats obtenus chez le rat dans lesquels cette déficience augmente les dépôts de tissus adipeux blancs (Harnichar et al. 2022). AR a également été mis en évidence dans le cancer, notamment le cancer de la prostate, mais également dans le cancer des glandes salivaires, tout deux pouvant être traités par une hormonothérapie (Pronzato et Rondini 2005; Locati et al. 2016; Dalin et al. 2017).

L'action de AR étant dépendante des co-régulateurs engagés, il agit de manière cellule et tissu-spécifique. Ainsi de nombreux gènes sont régulés par AR et codent pour des protéines impliquées dans la prolifération cellulaire et la survie ou participant aux voies de sécrétion, de la lipogenèse, de la synthèse du liquide séminal ou encore dans l'immunité (DePrimo et al. 2002; Bolton et al. 2007). Certains de ces gènes régulés par AR ont été caractérisés et définis comme marqueurs diagnostiques et/ou pronostiques dans le cadre du cancer de la prostate comme le PSA (Prostate specific antigen) (Seamonds et al. 1986).

B. Rôle de TMPRSS2 dans la prostate

Parmi les gènes régulés positivement par AR suite à l'activation par les androgènes, figure *TMPRSS2* (transmembrane protease serine 2). Cette protéine est une enzyme à activité sérine protéase fortement exprimée à la membrane des cellules épithéliales de prostate mais on la retrouve également dans le poumon, le cœur, le foie et le système digestif (Thunders et Delahunt 2020).

Son rôle physiologique n'est que peu décrit et connu mais TMPRSS2 semble participer à des cascades protéolytiques importantes pour la fonction physiologique normale de la prostate.

La protéine TMPRSS2 est davantage connue dans le contexte du cancer de la prostate. En effet, son expression est retrouvée de manière importante dans les cancers prostatiques de haut grade et dans les métastases. La protéase favorise le développement métastatique en clivant le pro-HGF (Hepatocyte growth factor) en HGF qui active la tyrosine kinase c-Met initiateur d'un phénotype invasif (Lucas et al. 2014).

Outre cette implication directe dans la carcinogenèse prostatique, le gène *TMPRSS2* a également été mis en exergue par la forte présence de gènes de fusion *TMPRSS2:ERG*, issus de remaniements chromosomiques (Figure 9).

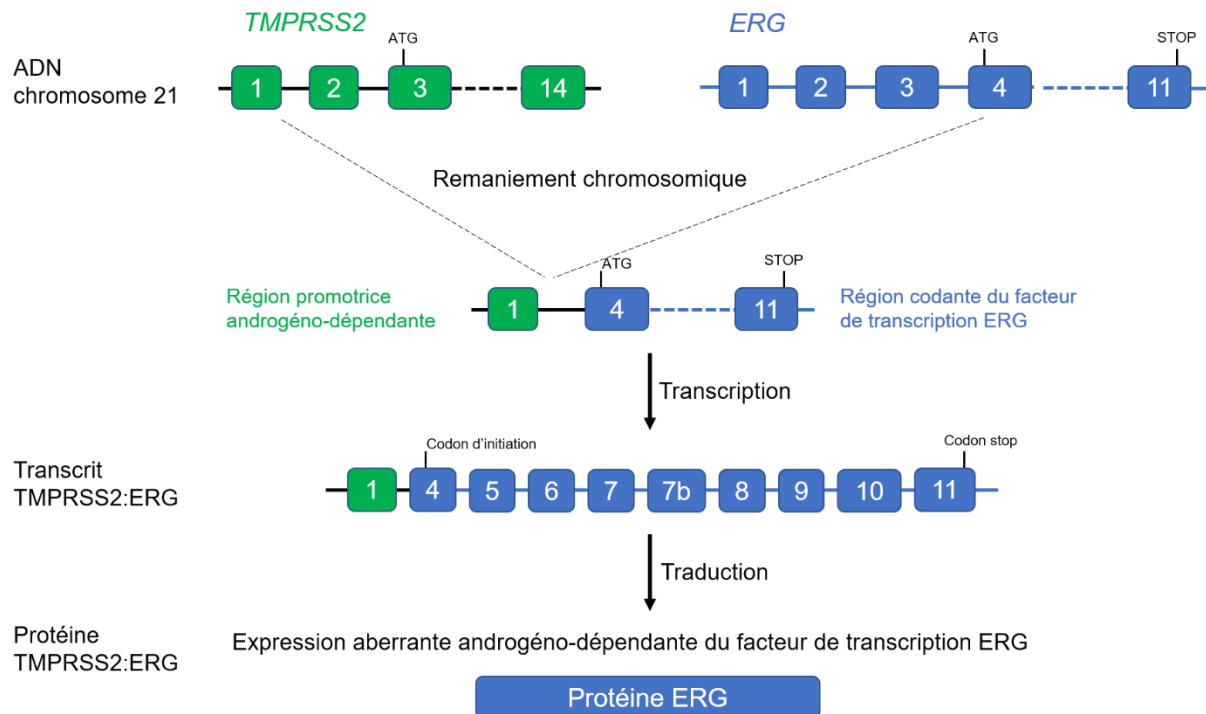


Figure 9 : Gène de fusion *TMPRSS2:ERG* dans le cancer de la prostate.

Cette fusion implique la partie promotrice hormono-dépendante de *TMPRSS2* et la partie codante des gènes de la famille des facteurs de transcription ETS, et notamment le gène *ERG* (ETS related gene) dans plus de 50% des cas (Tomlins et al. 2005). La région promotrice de *TMPRSS2* va induire l'expression aberrante des facteurs de transcription ETS (Figure 9). Ces derniers contrôlent de nombreux processus, notamment le cycle cellulaire, la différenciation, la prolifération, l'apoptose, etc. Cette fusion participe donc à l'initiation, à la progression tumorale et à la dissémination métastatique (Rubin et al. 2011).

C. Implication de *TMPRSS2* dans la COVID-19

En dehors de la prostate, la protéase *TMPRSS2* a été citée plusieurs fois dans le cadre de l'infection virale, en tant qu'activateur de l'entrée du virus. Plus précisément, c'est le cas pour le virus influenza et trois coronavirus : le SARS-CoV-1, le MERS et plus récemment le SARS-CoV-2 (Hsieh et Hsu 2007; Shirato et al. 2013; Hoffmann et al. 2020b). En effet, le clivage de la protéine virale spike est requis pour permettre la fusion du virus avec la cellule hôte.

Le constat étant que les hommes sont plus sévèrement atteints par la COVID-19, le lien a rapidement été fait avec la protéine TMPRSS2 androgéno-dépendante dans la prostate et responsable de l'entrée virale. La question sous-jacente étant la possible régulation de *TMPRSS2* par les androgènes dans le poumon, par conséquent une plus forte expression serait retrouvée chez l'homme et la capacité d'entrée du virus se verrait amplifiée. Cette hypothèse d'une implication des androgènes, via la régulation de *TMPRSS2*, dans la sévérité de la COVID-19 a rapidement émergé (Ambrosino et al. 2020; Kezele 2020; Lamy et al. 2020; Moradi et al. 2020; Pozzilli et Lenzi 2020).

1. TMPRSS2 comme cible thérapeutique

Etant donné le rôle majeur de TMPRSS2 dans l'entrée du SARS-CoV-2 dans la cellule hôte, son ciblage thérapeutique semble cohérent. Le camostat mésylate est un inhibiteur de sérine protéase. C'est un traitement approuvé au Japon et en Corée du Sud pour traiter notamment les pancréatites chroniques et les reflux œsophagiens post-opératoires. Cette molécule est donc facilement réorientable dans son utilisation puisqu'elle a déjà été documentée et testée en clinique. Les tests *in vitro* ont montré son efficacité dans l'inhibition de l'activation du SARS-CoV-2 dans différentes lignées et donc son activité antivirale (Hoffmann et al. 2020b). Des essais cliniques ont donc démarré afin de déterminer les bénéfices du camostat mésylate en tant que traitement de la COVID-19. Les premiers résultats prometteurs obtenus chez une petite cohorte n'ont pas été confirmés dans une plus large cohorte pour un même protocole (Hofmann-Winkler et al. 2020; Gunst et al. 2021). Une autre étude a montré un effet du camostat en tant que traitement précoce pour les formes modérées, dans lequel il permettrait une résolution accélérée des symptômes (Chupp et al. 2022). Par ailleurs, nombre d'essais cliniques sont encore en cours et peu de données sont disponibles en ce qui concerne l'efficacité du camostat dans le cadre de la COVID-19 chez l'homme (Références des essais cliniques disponibles sur la base de données www.clinicaltrials.gov: NCT04470544, NCT04524663, NCT04374019, NCT04455815, NCT04530617, NCT04521296, NCT04451083, NCT04583592).

Le nafamostat mesylate, un autre inhibiteur de sérine protéase, a également montré son efficacité *in vitro* contre l'entrée virale du SARS-CoV-2, et de manière plus importante que le camostat (Hoffmann et al. 2020d; Li et al. 2021b). Les résultats *in vivo* dans un modèle de souris prétraitée au nafamostat montrent également un effet antiviral important, suggérant son utilisation prophylactique ou précoce pour le

traitement de la COVID-19 (Li et al. 2021b). Des essais cliniques sont également en cours pour évaluer le potentiel thérapeutique chez l'homme (Références des essais cliniques disponibles sur la base de données www.clinicaltrials.gov: NCT04418128, NCT04352400, NCT04390594, NCT04628143, NCT04483960). Un des essais cliniques a conclu à l'absence de bénéfice du nafamostat en ce qui concerne le délai d'amélioration clinique, si ce n'est un délai médian d'amélioration clinique plus court dans un petit groupe de patients à haut risque nécessitant un traitement par oxygène (Zhuravel et al. 2021). Les résultats des autres essais cliniques sont donc nécessaires pour identifier clairement le potentiel thérapeutique du nafamostat.

2. Régulation de TMPRSS2 par les androgènes dans le poumon

Outre l'inhibition de son activité par des molécules inhibitrices, la connaissance de la régulation de *TMPRSS2* par les androgènes dans la prostate, ouvre la perspective qu'une telle régulation soit également valable dans le poumon. Ainsi *TMPRSS2* serait impacté au niveau transcriptionnel par la modulation hormonale.

La régulation de *TMPRSS2* par les androgènes dans le poumon n'était pas étudiée avant la pandémie de COVID-19. Depuis, plusieurs études ont adopté différentes approches pour répondre à la question. Tout d'abord, en interrogeant les bases de données concernant l'expression de *TMPRSS2* dans le poumon des hommes et des femmes. Les résultats obtenus ne montrent pas de différences homme / femme significatives si on considère le poumon entier, par contre si on considère uniquement l'épithélium bronchique cette expression est plus importante chez l'homme (Asselta et al. 2020). A l'inverse, en interrogeant d'autres bases de données, l'équipe de Baratchian et al. ne montre aucune différence d'expression de *TMPRSS2* entre les hommes et les femmes que ce soit en considérant le poumon entier ou des sous-tissus le constituant. Ils vont plus loin dans leur étude via l'observation de l'expression transcriptionnelle et protéique de *Tmprss2* chez la souris femelle ou mâle, mais également mâle traitée par l'enzalutamide, un inhibiteur du récepteur des androgènes. Aucune différence n'a été notée, ce qui va dans le sens d'une absence de régulation de *TMPRSS2* par les androgènes dans le poumon (Baratchian et al. 2021). Des résultats similaires sont obtenus dans une étude sur des organoïdes traités à l'enzalutamide et chez des souris castrées ou non et traitées à l'enzalutamide (Li et al. 2021a). Pour autant, une autre étude a mis en évidence la baisse d'expression de *Tmprss2* dans le poumon de souris traitée à l'enzalutamide. Ces résultats sont

retrouvés *in vitro* dans de multiples lignées pulmonaires qui montrent une hormonorégulation de *TMPRSS2* (Leach et al. 2021). L'équipe de Deng et al. a également montré une hormonorégulation de *TMPRSS2 in vivo* par un modèle de souris castrées et *in vitro* via différents agents pharmacologiques dans des lignées pulmonaires (Deng et al. 2021). Plus récemment, une étude basée sur la lignée pulmonaire Calu-3 a conclu à l'absence de régulation de *TMPRSS2* par les androgènes (Treppiedi et al. 2022).

Ainsi les données publiées sont contradictoires et ne permettent pas de définir clairement si le gène codant pour *TMPRSS2* est régulé par les androgènes dans le poumon.

3. Hormones et COVID-19

Bien que ces recherches n'aient fourni que peu de données concordantes sur l'effet des androgènes sur la COVID-19 passant par la modulation de *TMPRSS2*, elles ont quand même conduit à l'obtention de résultats quant à l'impact des androgènes sur la COVID-19.

De manière générale, les études se rejoignent sur le fait que les androgènes sont capables de moduler l'infection au SARS-CoV-2 dans des modèles *in vitro*. En effet, l'ajout de DHT augmente l'infection virale et à l'inverse des inhibiteurs de AR comme l'enzalutamide ou le bicalutamide, diminuent l'infection virale (Deng et al. 2021; Leach et al. 2021; Li et al. 2021a).

In vivo, très peu de recherches ont évalué l'impact des androgènes sur l'infection au SARS-CoV-2. Une étude s'est toutefois portée sur un modèle de souris transgénique exprimant ACE2 humain, indispensable à l'infection virale, castrées et traitées à l'enzalutamide. Après 3 jours d'infection au SARS-CoV-2, les souris des différents groupes ne présentent pas de différences significatives en ce qui concerne la charge virale, le score histopathologique et l'expression de cytokines inflammatoires dans le poumon (Li et al. 2021a).

D. Considération du cancer de la prostate

Considérer l'hormonothérapie ciblant les androgènes et sa signalisation en tant que traitement de la COVID-19 chez l'homme n'apparaît pas raisonnable. En effet, l'hypothèse d'une castration chimique avec ses effets secondaires (majoration de

l'andropause, risques cardio-vasculaires, etc.) présenterait un rapport bénéfice/risque défavorable puisque la majorité des cas de COVID-19 sont des formes légères à modérées sans nécessité d'hospitalisation.

Toutefois il est important de connaître le rôle des androgènes dans le développement de la COVID-19, d'un point de vue cognitif, mais également pour adapter la prise en charge des patients atteints de cancer de la prostate et de COVID-19.

1. Cancer de la prostate

Le cancer de la prostate correspond au développement de cellules cancéreuses dans la prostate. La principale forme diagnostiquée de cancer de la prostate, d'un point de vue histologique, est l'adénocarcinome. Il est donc d'origine épithéliale glandulaire et atteint particulièrement les cellules sécrétrices luminales qui produisent une partie du liquide séminal.

D'après l'étude GLOBOCAN 2020, réalisée par l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) qui estime l'incidence, la mortalité et la prévalence à 5 ans des cancers dans le monde en 2020, le cancer de la prostate est le deuxième cancer le plus fréquent chez les hommes dans le monde (source : globocan.iarc.fr) (Tableau 1). Avec environ 1,4 millions de cas de cancer de la prostate diagnostiqués dans le monde, il représente 14,1 % des cancers détectés chez les hommes. Il constitue cependant la cinquième cause de décès par cancer avec plus de 375 000 décès en 2020, soit 6,8% des décès d'homme par cancer (Tableau 1).

Tableau 1 : Incidence, mortalité et prévalence à 5 ans des principaux cancers dans le monde chez les hommes.

Adapté d'après (GLOBOCAN 2020, OMS)

Cancer	Incidence	Mortalité	Prévalence
Poumon	1 435 943	1 188 679	1 579 200
Prostate	1 414 259	375 304	4 956 901
Colon	1 065 960	515 637	2 850 679
Estomac	719 523	502 788	1 178 783
Foie	632 320	577 522	994 539

Incidence : nombre de nouveaux cas sur une période et une population donnée ; Prévalence : nombre de cas (anciens et nouveaux) sur une période et une population donnée.

En France métropolitaine, le cancer de la prostate représente le cancer le plus fréquent chez les hommes et son incidence est en augmentation (Tableau 2). Avec près de 66 000 hommes en 2020, il constitue un quart des cancers diagnostiqués chez l'homme, bien devant les cancers pulmonaires (12,3%) et colorectaux (9,9%). Il a causé la mort de 9 000 hommes, ce qui en fait la troisième cause de décès par cancer (Tableau 2).

Tableau 2 : Incidence, mortalité et prévalence à 5 ans des principaux cancers en France métropolitaine chez les hommes

Adapté d'après (GLOBOCAN 2020, OMS)

Cancer	Incidence	Mortalité	Prévalence
Prostate	66 070	9 060	258 722
Poumon	31 941	25 214	36 989
Colon	25 781	11 178	76 554
Vessie	13 321	6 039	43 753
Rein	9 667	3 238	28 233

Incidence : nombre de nouveaux cas sur une période et une population donnée ; Prévalence : nombre de cas (anciens et nouveaux) sur une période et une population donnée.

L'étiologie du cancer de la prostate n'est pas encore comprise. Cependant plusieurs facteurs de risque favorisent son développement. L'âge est le facteur de risque principal. En effet, l'incidence de ce cancer augmente progressivement avec l'âge, quasi nulle avant 50 ans, passé cet âge le risque augmente, avec un âge moyen de 68 ans au moment du diagnostic en 2018 d'après l'Institut National du Cancer. D'autres facteurs interviennent comme les antécédents familiaux, les caractéristiques ethnogéographiques, l'environnement ainsi que les habitudes alimentaires (Fournier et al. 2004).

2. Histoire naturelle du cancer de la prostate

Le cancer de la prostate est un cancer au développement lent, les cellules cancéreuses peuvent apparaître dès 50 ans mais les symptômes ne se manifesteront que beaucoup plus tard, et l'âge moyen des personnes au moment du décès est de 83 ans. Afin de détecter au plus tôt la maladie et ainsi augmenter les chances de réussite du traitement, le dépistage individuel est recommandé dès 50 ans selon l'Association Française d'Urologie. Ce dépistage repose sur le dosage sérique du PSA. Si le dosage présente une anomalie, le diagnostic doit être confirmé par des examens complémentaires.

De manière générale, dans un premier temps, le cancer de la prostate évolue de manière locale au sein de la capsule prostatique et des tissus proches tels que les vésicules séminales (Figure 10). Dans un second temps, la tumeur va devenir invasive et évoluer vers des stades métastatiques (Figure 10). Les métastases peuvent tout d'abord se développer dans des structures proches comme les ganglions lymphatiques (Figure 10). Cependant le site le plus fréquent de métastases chez les patients atteints de cancer de la prostate métastatique est l'os, avec une incidence de près de 90% (Huang et al. 2020c).

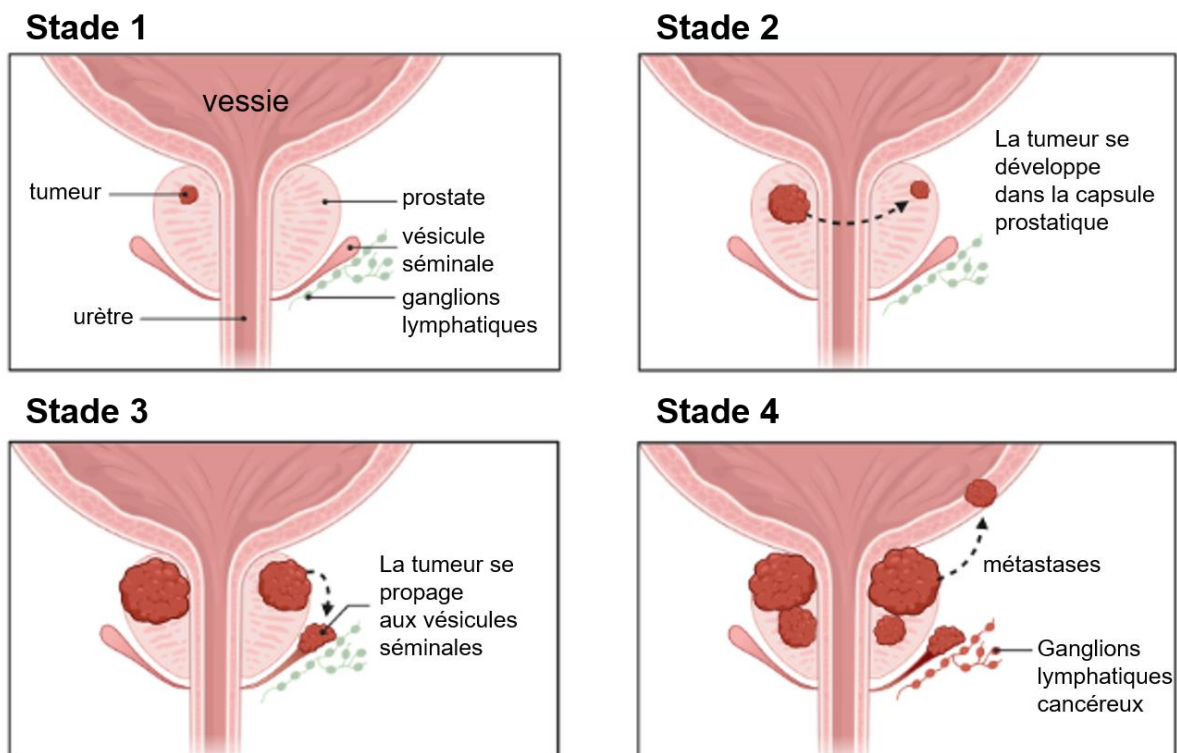


Figure 10 : Les stades du cancer de la prostate.

Created in BioRender.com

Les classifications reposent sur le degré de différenciation de la tumeur comme le score de Gleason ou encore sur la taille de la tumeur et l'atteinte des tissus environnants selon la classification TNM (Tumor, Nodes, Metastases) (Egevad 2008). La classification de D'Amico, quant à elle, s'intéresse aux risques de progression après traitement, et intègre le dosage du PSA, le score de Gleason et la classification TNM (Tableau 3). Elle permet donc d'orienter au mieux la prise en charge des patients (D'Amico et al. 1998).

Tableau 3 : Niveau de risque de progression du cancer de la prostate selon D'Amico

Risque de progression	PSA (ng/mL)	Score de Gleason	Stade TNM
Faible I	≤ 10	≤ 6	≤T2a
Intermédiaire II	10 - 20	7	T2b
Elevé III	≥ 20	≥ 7	≥T2c

3. Stratégie thérapeutique

La stratégie thérapeutique repose essentiellement sur la classification du cancer de la prostate, notamment son stade TNM et le groupe attribué par la classification de D'Amico. Le patient est également au cœur du choix du traitement, que ce soit en considérant ses caractéristiques telles que son âge et les comorbidités qu'il peut présenter, que les préférences exprimées par celui-ci suivant les bénéfices et risques de chaque traitement.

Les traitements du cancer de la prostate peuvent être regroupés en trois catégories : la surveillance active, les traitements curatifs et les traitements palliatifs (Tableau 4).

Tableau 4 : Possibilités thérapeutiques dans le cancer de la prostate.

	Stratégie thérapeutique	Indications
Tumeur localisée	Surveillance active	Espérance de vie > 10 ans Faible volume tumoral
	Prostatectomie + curage ganglionnaire si stade II	Espérance de vie > 10 ans Age ≤ 75 ans
	Radiothérapie + hormonothérapie	Espérance de vie > 10 ans Risque chirurgical important
Tumeur métastatique	Radiothérapie	Stratégie multimodale
	Hormonothérapie	
	Chimiothérapie	

Les cancers de la prostate localisés avec un faible score de Gleason et un faible risque de progression selon la classification de D'Amico évoluent lentement sans avoir

d'impact sur la survie du patient. Dans le cas d'une tumeur localisée, asymptomatique et à faible risque de progression chez un patient ayant une espérance de vie de plus de 10 ans, c'est la surveillance active qui est adoptée (Ploussard et al. 2022a) (Tableau 4). Cette dernière repose sur l'absence de traitement mais le patient bénéficie d'un suivi régulier avec un dosage du PSA tous les 6 mois et une biopsie à un an puis tous les 2 à 3 ans. Cette approche est basée sur le principe bénéfice/risque, ce qui implique d'éviter les effets secondaires imputables au traitement chez un patient asymptomatique et à faible risque de progression (Ploussard et al. 2022a).

Pour les patients de moins 75 ans, avec une espérance de vie de plus de 10 ans, et dont la tumeur est localisée ou localement avancée, la prostatectomie totale est une option préconisée (Ploussard et al. 2022a) (Tableau 4). Cette chirurgie consiste en l'ablation totale de la prostate et des vésicules séminales. Elle peut être accompagnée d'un curage ganglionnaire pelvien, c'est-à-dire le retrait de ces derniers en cas de risque intermédiaire de progression.

La radiothérapie externe est une option alternative à la chirurgie si les risques chirurgicaux sont trop importants. Ce traitement curatif consiste en l'irradiation, via la mise en place de radioéléments, de la loge prostatique et guidée par échographie.

Dans le cas des stades intermédiaires et à haut risque, la radiothérapie peut être accompagnée d'une hormonothérapie de courte durée sur 6 mois ou de longue durée sur 3 ans respectivement.

Pour les stades avancés et métastatiques du cancer de la prostate, des approches palliatives et multimodales sont adoptées. La première est l'hormonothérapie, qui a pour but d'annihiler l'effet des androgènes. En effet, ils sont essentiels d'un point de vue physiologie des cellules prostatiques, mais également pour la croissance des cellules cancéreuses prostatiques. L'hormonothérapie peut viser la synthèse des androgènes mais aussi leur action via, par exemple, un blocage de leur fixation à leur récepteur AR.

Deux modes de suppression androgénique existent : la castration chirurgicale par retrait des testicules ou la castration chimique par administration de molécules hormonothérapeutiques. La castration est définie par un taux de testostérone inférieur à 50 ng/dL.

Il existe différents types d'hormonothérapie selon la partie de l'axe hypothalamo-hypophysaire ciblée par le traitement (Figure 11).

- Agonistes de la LHRH

Les agonistes de la LHRH à longue durée d'action sont actuellement les principales formes de thérapie de déprivation androgénique. Cette stratégie repose sur un effet de rétrocontrôle négatif. En effet, les récepteurs hypophysaires pour la LHRH totalement saturés par les analogues synthétiques administrés deviennent alors insensibles aux stimulus endogènes. Ainsi, l'exposition chronique aux agonistes de la LHRH entraîne une régulation négative des récepteurs de la LHRH, supprimant la sécrétion de LH et de FSH et donc la production de testostérone (Cornford et al. 2021; Ploussard et al. 2022b) (Figure 11). Les analogues de la LHRH les plus fréquemment utilisés pour traiter le cancer de la prostate sont la triptoréline, la buséréline, la goséréline et le leuproréline.

- Antagonistes de la LHRH

A l'inverse, des antagonistes de la LHRH peuvent également être employés (Figure 11). Ils bloquent directement les récepteurs hypophysaires de la LHRH, et donc la production de LH puis de testostérone. L'antagoniste de la LHRH administré pour traiter le cancer de la prostate est le dégarélix et le rélugolix (Cornford et al. 2021; Ploussard et al. 2022b).

- Anti-androgènes

Ils sont classés en 2 sous-types selon leur structure chimique : stéroïdiens (acétate de cyprotérone) et non-stéroïdiens. Les molécules de ces deux classes entrent en compétition avec les androgènes au niveau des récepteurs (Figure 11). Cela conduit à un taux de testostérone inchangé ou légèrement élevé. Elles sont utilisées en complément des traitements par agonistes ou antagonistes de la LHRH.

Parmi elles, figure le bicalutamide, qui bloque AR. Cependant des mécanismes de résistance avec surexpression de AR se mettent en place. Pour y remédier des hormonothérapies dites de nouvelles générations ont émergé. On peut citer l'acétate d'abiratérone qui agit via le blocage de l'enzyme CYP17 indispensable à la synthèse des androgènes au niveau des testicules, des glandes surrénales mais également des tissus tumoraux. En effet, l'abiratérone catalyse la conversion de la prégnénolone et la

progestérone en précurseurs de la testostérone, la DHEA et l'androstènedione respectivement (Thakur et al. 2018). D'autres molécules fixent directement AR, mais en plus d'inhiber le récepteur, elles inhibent sa translocation au noyau et sa liaison à l'ADN. C'est le cas de l'enzalutamide et de l'apalutamide (Cornford et al. 2021; Ploussard et al. 2022b) (Figure 11).

La figure ci-dessous résume les différentes hormonothérapies et leur mode d'action.

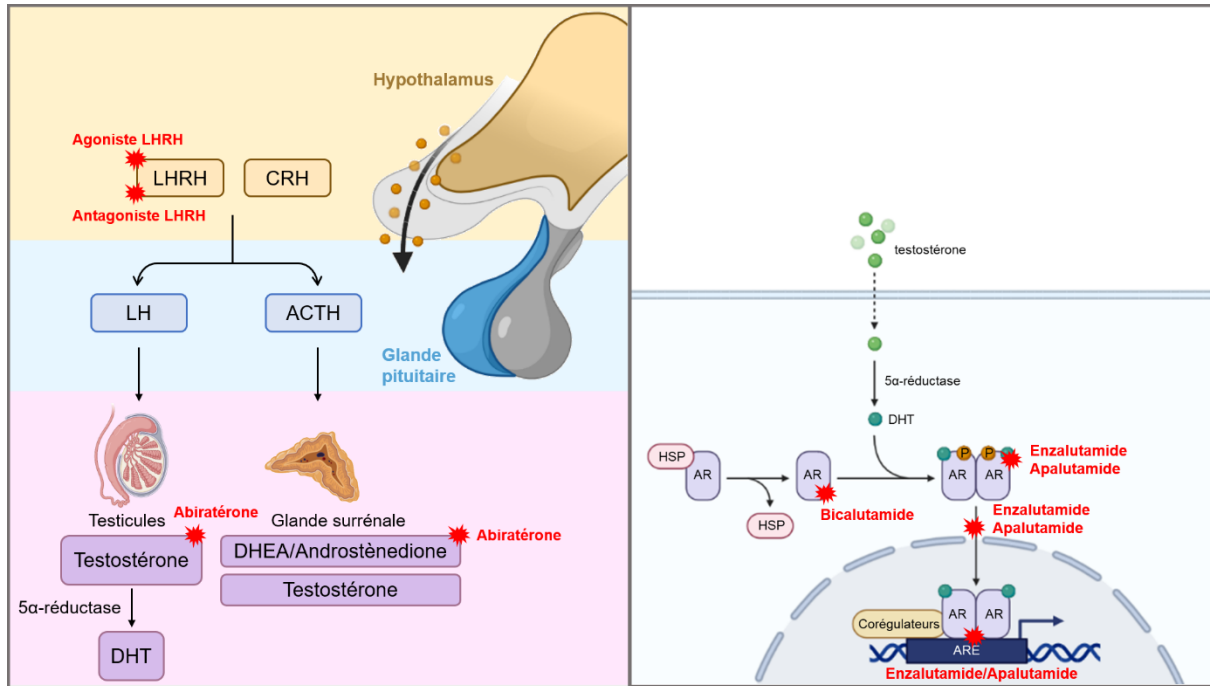


Figure 11 : Mode d'action des hormonothérapies du cancer de la prostate.

Created in BioRender.com

Inévitablement, l'hormonothérapie conduit au développement de tumeurs résistantes à la castration. Dans le cas des patients n'ayant jamais reçu de chimiothérapie, cette dernière prend le relai. Cette dernière utilise des molécules qui bloquent les mécanismes de division cellulaire, et plus spécifiquement la dépolymérisation des microtubules. Dans le cas du cancer de la prostate, c'est le docétaxel et le cabazitaxel qui sont utilisés (Ploussard et al. 2022b).

4. Cancer de la prostate et COVID-19

Etant donné la possible implication des androgènes dans la COVID-19, une attention toute particulière s'est portée sur les patients ayant un cancer de la prostate traité par hormonothérapie et qui ont contracté la COVID-19 (Chakravarty et al. 2020; Mjaess et al. 2020; Patel et al. 2020). Plusieurs cohortes ont donc été établies sur cette base, afin de voir si ces patients présentaient des différences de sévérité de la maladie par

rapport aux patients ayant un cancer de la prostate non traité par déprivation androgénique (Tableau 5). Les principaux paramètres étudiés sont notamment l'incidence et la sévérité. Ce dernier point est évalué via le taux d'hospitalisation, le besoin de supplémentation en oxygène, l'admission en soins intensifs ou encore le taux de mortalité. La première étude prospective, pionnière sur le sujet, est celle de Montopoli et al. qui a conclu que l'hormonothérapie protège partiellement d'une infection au SARS-CoV-2. Cependant cette étude n'était basée que sur quatre patients traités par hormonothérapie ayant contractée la COVID-19 (Montopoli et al. 2020). Dans le même temps, deux autres études ont conclu à des résultats contradictoires. L'étude de Patel et al. met en avant que la déprivation androgénique diminue le risque d'hospitalisation et le besoin de supplémentation en oxygène, et à l'inverse celle de Koskinen et al. conclut à l'absence de bénéfice quant à l'incidence et la sévérité de la COVID-19 (Koskinen et al. 2020; Patel et al. 2020). D'autres études prospectives ont été réalisées, certaines avec un nombre de personnes plus conséquent, de l'ordre de plusieurs centaines pour les patients sous hormonothérapies avec la COVID-19. A nouveau les conclusions de ces études ne sont pas concordantes. Certaines aboutissent à un bénéfice de l'hormonothérapie sur l'incidence et/ou la sévérité de la COVID-19 et d'autres à l'absence de lien entre le traitement et le développement de la maladie (Gedeborg et al. 2021; Kazan et al. 2021; Klein et al. 2021; Kwon et al. 2021; Lee et al. 2022; Shah et al. 2022; Welén et al. 2022). Le détail et les conclusions de ces études sont décrites dans le tableau 5.

A la vue de ces divergences entre les résultats, il est nécessaire d'approfondir les recherches, d'enrichir les cohortes et sans doute prendre en compte la durée de la déprivation androgénique au moment du dépistage de la COVID-19 ou encore le détail du schéma thérapeutique. Ce dernier point commence à être exploré puisque l'étude de Welén subdivise la population selon le traitement tel que l'anti-androgène unique, la castration chirurgicale, ou la combinaison de plusieurs molécules (Welén et al. 2022).

Tableau 5 : Etudes prospectives sur l'impact de l'hormonothérapie sur la COVID-19 chez des patients avec un cancer de la prostate.

Etude	Patients avec cancer de la prostate	Patients avec cancer de la prostate COVID-19 ⁺		Principaux résultats
		Sans hormonothérapie	Avec hormonothérapie	
(Montopoli et al. 2020)	42 434	114 / 118	4 / 118	L'hormonothérapie diminue l'incidence
(Patel et al. 2020)	NR	36 / 58	22 / 58	L'hormonothérapie diminue le risque d'hospitalisation et de supplémentation en oxygène
(Koskinen et al. 2020)	352	11 / 17	6 / 17	Absence de bénéfice de l'hormonothérapie sur l'incidence, et la sévérité
(Klein et al. 2021)	1779	85 / 102	17 / 102	Absence de bénéfice de l'hormonothérapie sur l'incidence, la sévérité et la mortalité
(Kwon et al. 2021)	5 211	79 / 97	18 / 97	Absence de bénéfice de l'hormonothérapie sur l'incidence et la mortalité
(Gedeborg et al. 2021)	22 497	203 / 459	256 / 459	Absence de bénéfice de l'hormonothérapie sur la mortalité
(Kazan et al. 2021)	365	30 / 43	13 / 43	Absence de bénéfice de l'hormonothérapie sur l'incidence et la sévérité
(Lee et al. 2022)	246 087	23 340 / 23 573	233 / 23 573	L'hormonothérapie diminue l'incidence mais pas la sévérité
(Shah et al. 2022)	NR	317 / 465	148 / 465	Absence de bénéfice de l'hormonothérapie sur la sévérité
(Welén et al. 2022)	NR	4980 / 5824	844 / 5824	Absence de bénéfice de l'hormonothérapie sur la sévérité

NR : Non renseigné

E. Hormonothérapie et COVID-19

En dehors du contexte du cancer de la prostate, des essais cliniques ont été réalisés dans le but d'évaluer l'hormonothérapie comme traitement de la COVID-19 en complément des soins standards (Tableau 6). Différentes classes de molécules ont été étudiées. Le dutastéride est un inhibiteur de l'enzyme 5 α -réductase responsable de la conversion de la testostérone en DHT, et permet donc de diminuer les taux circulants de DHT. Il est classiquement utilisé comme traitement des symptômes modérés à sévères de l'hypertrophie bénigne de la prostate. Dans le cadre de l'étude de Cadegiani et al., la molécule a montré un bénéfice sur les formes légères à modérées de COVID-19, avec notamment un rétablissement plus rapide par rapport au placebo en terme de symptômes mais également des paramètres biochimiques liés à l'inflammation (Cadegiani et al. 2021a). Le proxalutamide, un antiandrogène non stéroïdien, a été testé selon plusieurs modalités de traitements sur différents degrés de sévérité de la COVID-19, notamment par Cadegiani et ses collaborateurs. Que ce soit chez l'homme ou la femme, la molécule montre des effets assez impressionnants, quel que soit le degré de sévérité de la COVID-19 (Cadegiani et al. 2021b, 2021c; McCoy et al. 2021). Par exemple, 82% des personnes du groupe avec une forme légère ou modérée de COVID-19 traité présentent un test négatif au SARS-CoV-2 contre 31% dans le groupe placebo. De même ce groupe traité présente un temps moyen de rémission clinique de 4,2 jours contre 21,8 jours pour le groupe placebo (Cadegiani et al. 2021b). L'étude de McCoy et al. défend un taux d'hospitalisation diminué de 91% chez les personnes traitées au proxalutamide (McCoy et al. 2021). Cependant les résultats sont à considérer avec précaution. En effet, des manquements à l'éthique ont par la suite été dénoncés, et des irrégularités présumées dans l'essai clinique ont déclenché une enquête de la part de la commission nationale d'éthique de la recherche au Brésil. Le scandale sanitaire qui en résulte a impliqué la sphère politique notamment le président brésilien, Jair Bolsonaro, tenu pour principal responsable de la crise sanitaire au Brésil. L'article de McCoy a d'ailleurs été rétracté courant juin 2022. Afin de valider les résultats obtenus concernant le proxalutamide, l'industrie qui développe la molécule, Suzhou Kintor Pharmaceuticals Inc, a lancé un essai clinique de phase III chez des patients de plus de 18 ans et hospitalisés (NCT05009732). L'enzalutamide, inhibiteur compétitif de AR, et le dégarélix, agoniste de la LHRH, ont également été évalués dans le cadre de personnes hospitalisés et

n'ont montré aucun bénéfice sur le temps d'hospitalisation ou le besoin de ventilation artificielle (Nickols et al. 2022; Welén et al. 2022).

Une liste non exhaustive des principaux essais cliniques ayant abouti et employant l'hormonothérapie comme traitement de la COVID-19 est présentée dans le tableau 6.

Par ailleurs, le bicalutamide, un autre inhibiteur de AR, a également été suggéré mais les essais n'ont pas abouti ou n'ont pas débuté (Références des essais cliniques disponibles sur la base de données www.clinicaltrials.gov: NCT04509999, NCT04374279, NCT04652765).

En conclusion, en dehors des études de Cadegiani et ses collaborateurs dont fait partie McCoy, aucun des essais cliniques n'a abouti à un réel bénéfice de l'utilisation d'une hormonothérapie en complément des traitements standards de la COVID-19.

Tableau 6 : Essais cliniques évaluant l'impact de l'hormonothérapie sur la COVID-19.

Etude	Population	Molécule	Paramètres étudiés	Résultats
(Cadegiani et al. 2021a) NCT04729491	<ul style="list-style-type: none"> • Hommes > 18 ans • COVID-19 léger à modéré • 44 placebo • 43 dutastéride 	Dutastéride 500mg/jour pendant 30 jours	<ul style="list-style-type: none"> • Temps de guérison • Saturation en oxygène • Paramètres biochimiques liés à l'inflammation 	Dutastéride entraîne une guérison, un rétablissement de la saturation en oxygène et des paramètres biochimiques plus rapide
(Cadegiani et al. 2021b) CAAE 36703320.8.000 0.0023	<ul style="list-style-type: none"> • Hommes et femmes > 18 ans • COVID-19 léger à modéré • 65 placebo (28 H et 37 F) • 171 proxalutamide (100 H et 71 F) 	Proxalutamide 200 mg/jour pendant 15 jours ou jusqu'à rémission complète	<ul style="list-style-type: none"> • Pourcentage de test négatif à 7 jours • Temps pour avoir un test négatif 	Proxalutamide accélère l'élimination du virus et la guérison
*(McCoy et al. 2021) NCT04446429	<ul style="list-style-type: none"> • Hommes > 18 ans • COVID-19 modéré • 134 placebo • 134 proxalutamide 	Proxalutamide 200 mg/jour pendant 7 jours	<ul style="list-style-type: none"> • Taux d'hospitalisation à 30 jours 	Taux d'hospitalisation diminuée de 91% avec proxalutamide
(Cadegiani et al. 2021c) NCT04728802, NCT05126628	<ul style="list-style-type: none"> • Hommes et femmes > 18 ans • COVID-19 avec hospitalisation • 355 placebo (151 F et 204 H) • 423 proxalutamide (163 F et 260 H) 	Proxalutamide 200 mg/jour pendant 14 jours	<ul style="list-style-type: none"> • Taux d'hospitalisation à 14 et 28 jours • Taux de mortalité 	Proxalutamide augmente le taux de guérison, réduit le taux de mortalité et le temps d'hospitalisation
(Welén et al. 2022) NCT04475601	<ul style="list-style-type: none"> • Hommes et femmes > 50 ans • COVID-19 avec hospitalisation • 12 placebo (10 H et 2 F) • 30 enzalutamide (21 H et 9 F) 	Enzalutamide 160 mg/jour pendant 5 jours	<ul style="list-style-type: none"> • Temps d'hospitalisation • Temps sous ventilation mécanique 	Pas d'effets bénéfiques
(Nickols et al. 2022) NCT04397718	<ul style="list-style-type: none"> • Hommes • COVID-19 avec hospitalisation • 34 placebo • 62 dégarélix 	Dégarélix 240mg. une injection sous cutanée	<ul style="list-style-type: none"> • Taux de mortalité • Besoin hospitalisation continue et ventilation mécanique à 15 jours 	Pas d'effets bénéfiques

H : homme ; F : femme. *article en rétractation

V. Modèle d'étude de l'infection au SARS-CoV-2

La compréhension du mécanisme d'infection du SARS-CoV-2, comme toute étude biologique, repose sur l'utilisation de modèles d'étude (Figure 12). Dans un premier temps, les hypothèses et explorations se font sur des modèles cellulaires, plus ou moins complexes avec comme ligne de conduite d'utiliser des modèles les plus pertinents possibles et proches de la réalité. Dans ce sens, l'approfondissement se fait sur des modèles animaux permettant d'avoir un système intégré avec toutes les composantes d'un organisme complet. Outre l'aspect cognitif des recherches, les modèles, *in vitro* comme *in vivo*, sont indispensables pour les tests de potentielles molécules thérapeutiques et vaccins avant de passer chez l'homme.

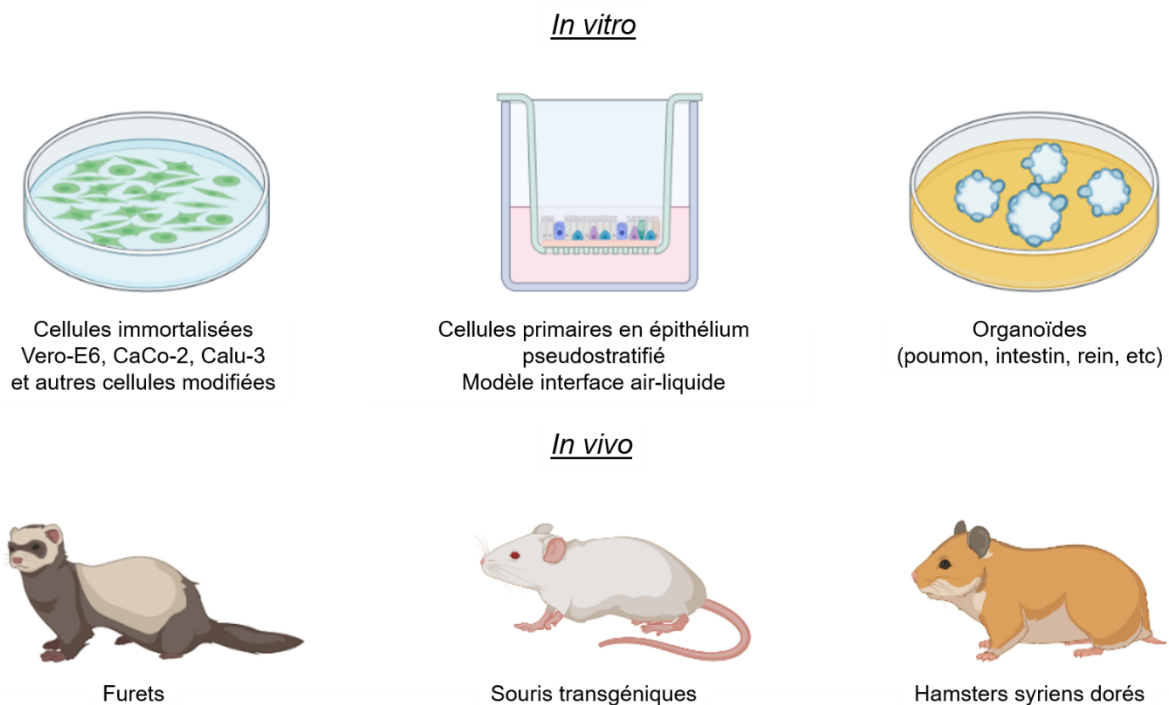


Figure 12 : Modèles d'étude du SARS-CoV-2 et de la COVID-19

Created in BioRender.com

A. *In vitro*

Malgré le caractère hautement infectable du SARS-CoV-2, très peu de lignées cellulaires sont sensibles au virus. En effet, le critère indispensable pour qu'une cellule s'infecte par le SARS-CoV-2 est qu'elle exprime le récepteur ACE2 de manière suffisante. Les lignées sont principalement utilisées pour décrypter les mécanismes de l'infection au SARS-CoV-2 et pour les évaluations précliniques de molécules

thérapeutiques. De manière surprenante, rares sont les lignées pulmonaires infectables.

Une des premières lignées largement utilisée est la lignée Vero-E6, cellules normales issues du rein du primate appelé singe vert ou vervet vert. Ces cellules sont principalement utilisées pour produire et isoler le SARS-CoV-2 en grande quantité. Une des limites de cette lignée, outre son origine, est sa faible expression de TMPRSS2, ce qui en fait un modèle peu pertinent quant à l'étude des mécanismes d'infection virale et des effets des potentielles molécules thérapeutiques (Matsuyama et al. 2020) (Figure 12).

Les cellules humaines d'adénocarcinome colorectal, les CaCo-2, et d'adénocarcinome pulmonaires, les Calu-3, sont également sensibles à l'infection au SARS-CoV-2. Elles expriment la protéase TMPRSS2 et offre donc un modèle plus proche de la réalité pour les études pré-cliniques (Hoffmann et al. 2020b) (Figure 12).

De par le faible nombre de cellules immortalisées infectables, de nombreux modèles cellulaires de surexpression de ACE2 et/ou TMPRSS2 ont été créés afin de répondre à des problématiques précises (Hoffmann et al. 2020b; Matsuyama et al. 2020; Leach et al. 2021; Li et al. 2021a). Il reste toutefois important de prendre en compte la lignée d'origine et les voies d'entrée du virus dans ces cellules. En effet, les résultats obtenus dans des systèmes cellulaires ne permettant qu'une seule des deux voies d'entrée du virus ne reflètent peut-être pas entièrement ce qu'il se passe chez l'homme (Criscuolo et al. 2022).

Ces modèles de culture cellulaire classiques en 2D sont complétés par des modèles plus pertinents impliquant des cellules primaires de l'épithélium des voies respiratoires différenciées en plusieurs sous-types (épithélium pseudostratifié). Dans ce cas, cela se fait grâce à la culture sur support avec interface air-liquide (Jiang et al. 2018). Pour aller plus loin, les organoïdes, permettant une structure tridimensionnelle plus proche d'un organe, sont également employés dans les recherches (Clevers 2020) (Figure 12).

Cependant, bien qu'apportant des informations cruciales à la compréhension du mécanisme d'infection au SARS-CoV-2, les modèles cellulaires présentent une limite majeure qu'est l'absence du microenvironnement spécifique à chaque tissu, en particulier l'absence de système immunitaire, élément décisif dans la COVID-19. Les

données ainsi obtenues en *in vitro* demandent à être confirmées et complétées dans un système intégré qu'est le modèle *in vivo*.

B. *In vivo* : petit animal

Modèle animal largement privilégié dans les études, la souris a dans un premier temps été mise de côté. En effet, elle n'est pas sensible au SARS-CoV-2 à cause de sa protéine Ace2, phylogénétiquement trop éloignée de la protéine ACE2 humaine, et qui ne fixe pas la protéine virale spike. Pour pallier à cette contrainte, un modèle de souris transgénique avec le gène *ACE2* humain a été développé (Bao et al. 2020; Rathnasinghe et al. 2020) (Figure 12). Ce modèle récapitule bien la pathologie et les signes cliniques observés chez l'homme au niveau pulmonaire tels que la perte de poids, une pneumonie interstitielle, et l'infiltration de cellules immunitaires. Cependant, du fait de l'expression non tissu-spécifique de ACE2, ces souris expriment de manière aberrante et non physiologique ACE2 dans certains organes (Bao et al. 2020). Le modèle a donc été amélioré via l'utilisation d'un promoteur spécifique des cellules épithéliales, le promoteur de la cytokératine 18, mais les souris présentent une forte neuroinvasion par le SARS-CoV-2 et peuvent mourir d'encéphalite (Oladunni et al. 2020; Kumari et al. 2021). Par la suite, le modèle a été optimisé via la transduction d'un vecteur viral délivrant l'ACE2 humain spécifiquement dans le poumon (Rathnasinghe et al. 2020). Des points restent encore à améliorer, comme la spécificité d'expression ou encore le taux d'infection.

Le furet constitue un modèle régulièrement utilisé pour étudier les infections respiratoires du fait d'une physiologie pulmonaire et d'une réponse pathologique proches de l'homme (Figure 12). Chez cet animal, les signes cliniques de l'infection au SARS-CoV-2 sont similaires à ceux observés chez l'humain avec entre autres une toux, potentiellement de la fièvre et une réduction de l'activité. Au niveau histologie du poumon, une légère bronchopneumonie avec infiltration de cellules immunitaires est notée (Ryan et al. 2021). Cela reflète donc une forme légère à modéré de la COVID-19.

Le hamster syrien doré constitue une alternative favorable aux autres modèles animaux (Figure 12). Le récepteur Ace2 du hamster présente une forte similarité avec ACE2 humain, et permet donc une infection significative. Après infection, les hamsters perdent du poids, ont une activité réduite et une augmentation de la fréquence

respiratoire (Chan et al. 2020b; Sia et al. 2020). Le virus est détecté dans les voies respiratoires hautes comme basses. Les signes histopathologiques dans le poumon sont nets avec la présence d'œdème, d'inflammation, de mort cellulaire et de DAD (Imai et al. 2020). Il constitue donc un modèle des formes légères à modérées de la COVID-19. Par ces avantages, le hamster est fortement utilisé pour les tests des molécules thérapeutiques, des vaccins et de l'utilité du masque, entre autres (Chan et al. 2020a; Kaptein et al. 2020; Tostanoski et al. 2020). Il permet également d'étudier ces différents aspects dans des contextes tels que l'obésité et le vieillissement sur de larges populations (Osterrieder et al. 2020; Port et al. 2021).

PROJET DE THESE

Depuis l'émergence de la pandémie de COVID-19 causée par le SARS-CoV-2, on constate que les hommes ont plus de risque de développer des formes sévères. En effet, pour une incidence semblable entre les hommes et les femmes, ils sont plus souvent hospitalisés, admis en soins intensifs et présentent une mortalité plus importante face à la maladie.

Parmi les facteurs possibles qui pourraient contribuer à cette différence, figurent les androgènes, les hormones mâles. L'identification de la protéine TMPRSS2, connue pour être régulée par les androgènes, dans l'une des deux premières étapes clés de l'infection virale par le SARS-CoV-2, a conduit à la possibilité d'un rôle joué par les androgènes, via AR, dans l'infection virale (Hoffmann et al. 2020b). Cette protéine est déjà connue pour être impliquée dans d'autres infections virales, mais également dans le cancer de la prostate dans lequel elle est surexprimée (Hsieh et Hsu 2007; Shirato et al. 2013; Thunders et Delahunt 2020).

L'urgence sanitaire a donné lieu à de nombreuses recherches et publications pour comprendre, anticiper et vaincre la maladie. Dans ce contexte de compréhension et de prise en charge de la maladie, la question d'une implication des androgènes dans la COVID-19 a rapidement émergé (Ambrosino et al. 2020; Kezele 2020; Lamy et al. 2020; Moradi et al. 2020; Pozzilli et Lenzi 2020). De manière toute particulière, cette compréhension est importante pour les patients ayant un cancer de la prostate à un stade avancé. Premièrement, du fait de leur cancer, ils sont plus vulnérables, deuxièmement, ils sont généralement traités par hormonothérapie (Dai et al. 2020a; Liang et al. 2020). Cette dernière peut donc potentiellement influencer davantage le niveau de vulnérabilité de ces patients face à la COVID-19. Il est donc nécessaire d'évaluer l'impact des thérapies hormonales sur le développement de la COVID-19 afin d'anticiper la prise en charge.

L'objectif de ma thèse était donc de déterminer le rôle des androgènes dans la COVID-19, en partant de l'hypothèse d'une régulation du gène *TMPRSS2* par les androgènes dans le poumon. Pour cela nous avons mis en place des approches *in vitro* et *in vivo*.

Dans un premier temps, en collaboration avec le docteur Sandrine Belouzard, nous avons éprouvé notre hypothèse sur des modèles *in vitro*. Les cellules cancéreuses prostatiques ont été notre modèle de référence puisqu'elles sont hormonodépendantes, c'est-à-dire qu'elles sont sensibles aux androgènes. Nous

avons sélectionné la lignée LNCaP, issue de métastases ganglionnaires du cancer de la prostate. Ces cellules ont été modifiées afin de les rendre infectables au SARS-CoV-2 via la surexpression de la protéine ACE2, indispensable à l'infection. Nous avons ainsi pu évaluer si la modulation de l'expression de *TMPRSS2*, par induction ou répression avec des androgènes ou anti-androgènes connus, avait un effet sur l'infection virale par le SARS-CoV-2. Cette méthodologie a ensuite été élargie à d'autres lignées infectables connues comme les Vero-E6 (rein primate), les Calu-3 (poumon) et les CaCo-2 (colon).

Des expérimentations animales ont également été menées sur des hamsters syriens dorés, naturellement infectables, grâce à notre collaboration avec l'équipe du docteur François Trottein (Sia et al. 2020). Nous avons évalué l'effet de la suppression androgénique, réalisée par castration, sur l'infection virale et notamment sur la sévérité de la COVID-19 chez ces animaux. Plusieurs paramètres ont été pris en compte : la charge virale, l'analyse histopathologique et l'expression de marqueurs inflammatoires.

Enfin nous avons considéré la question de l'impact de l'hormonothérapie des personnes ayant un cancer de la prostate et ayant contracté la COVID-19. Ainsi, à l'aide de la cohorte nationale multicentrique CACOV-19, constituée de patients positifs à la COVID-19 et atteints de cancer, dont le cancer de la prostate traité par hormonothérapie, nous avons évalué la sévérité de l'infection en fonction des traitements reçus par les patients.

RESULTATS

I. Avant-propos

La pandémie de COVID-19 a mis en évidence des disparités de sévérité de la maladie selon l'âge, l'obésité, la présence de comorbidité, ou encore le sexe (Bialek et al. 2020; Dai et al. 2020b; Fang et al. 2020; Maddaloni et Buzzetti 2020; Simonnet et al. 2020; Wu et McGoogan 2020). La plupart de ces facteurs de susceptibilité s'explique par un affaiblissement ou une altération du système immunitaire. En ce qui concerne l'influence du sexe sur la sévérité de la COVID-19, son origine reste indéterminée.

La découverte du rôle de *TMPRSS2* en tant que protéine indispensable à l'entrée du SARS-CoV-2 dans la cellule hôte a ouvert la voie à une potentielle implication des androgènes dans la sévérité de la COVID-19, en raison de l'androgéno-dépendance connue et décrite de *TMPRSS2* dans la prostate (Hoffmann et al. 2020b; Thunders et Delahunt 2020). Ainsi l'effet physiologique des hormones mâles et plus spécifiquement l'effet de la régulation de *TMPRSS2* par les androgènes sur le développement de la COVID-19 et sa sévérité a rapidement émergé en tant qu'explication potentielle à la différence de sévérité de la maladie entre les hommes et les femmes (Ambrosino et al. 2020; Kezele 2020; Lamy et al. 2020; Moradi et al. 2020; Pozzilli et Lenzi 2020). Selon cette hypothèse, on peut imaginer une expression pulmonaire de *TMPRSS2* supérieure chez l'homme, à l'origine d'une entrée virale accrue et donc d'une sévérité plus importante.

Les résultats présentés dans les pages suivantes correspondent à l'article original en anglais qui a pour objectif de répondre à cette problématique.

Nous avons sélectionné une lignée cellulaire hormonodépendante surexprimant de façon stable ACE2, la protéine nécessaire à l'infection par le SARS-CoV-2, afin de mesurer l'effet de la modulation hormonale du gène *TMPRSS2* sur l'infection par le SARS-CoV-2. Les résultats montrent que l'absence d'androgène diminue l'infection virale, et notamment l'entrée virale, via la perte d'expression de *TMPRSS2*. A l'inverse, la présence de testostérone augmente le taux d'infection virale.

In vivo, pour étudier l'effet des androgènes sur l'infection par le SARS-CoV-2 et la sévérité de la maladie au cours du temps, nous avons utilisé un modèle de hamster, pour lequel nous avons réalisé une suppression androgénique par castration. Nos

résultats montrent une réponse inflammatoire pulmonaire plus précoce chez les hamsters castrés par rapport aux hamsters non castrés, évaluée à la fois par un diagnostic pathologique et par le suivi des cytokines inflammatoires. Ce décalage de cinétique en réponse à l'infection par le SARS-CoV-2 révèle un effet des androgènes dans le poumon via un programme transcriptionnel altéré.

Enfin, chez les hommes, nous avons exploité la cohorte nationale multicentrique, CACOVID-19, établie par les groupes coopérateurs en oncologie lors de la première vague de COVID-19. Nous avons évalué le degré de sévérité de l'infection par le SARS-CoV-2 chez les patients atteints de cancers, en particulier de cancers androgéno-dépendants comme le cancer de la prostate, selon qu'ils étaient traités ou non par hormonothérapie. L'analyse des données suggère que la thérapie anti-androgénique est associée à une forme moins sévère de COVID-19.

Nos résultats indiquent un rôle des androgènes dans le processus d'infection par le SARS-CoV-2 et dans la cinétique de progression de la maladie. Notre étude suggère une adaptation de la prise en charge des patients atteints de cancer de la prostate sous traitement anti-androgénique.

II. Article en préparation

Title

Androgen lack modifies the kinetic of covid-19 lung inflammation

Authors/affiliations

Aline Hantute-Ghesquier¹, Anthony Turpin¹, Valentin Sencio², Jean-Michel Flaman³, Cyril Robil², Nathalie Vanpouille¹, Anne Flourens¹, Lucie Deruyter², Séverine Heumel², Adeline Danneels², Virginie Vlaeminck-Guillem^{3,4}, Jean Dubuisson², Yves Rouillé², Sandrine Belouzard², François Trottein², Martine Duterque-Coquillaud¹, on behalf of GCO" GCO-CACOVID.

¹. Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, UMR9020-U1277 - CANTHER - Cancer Heterogeneity Plasticity and Resistance to Therapies, F-59000 Lille, France

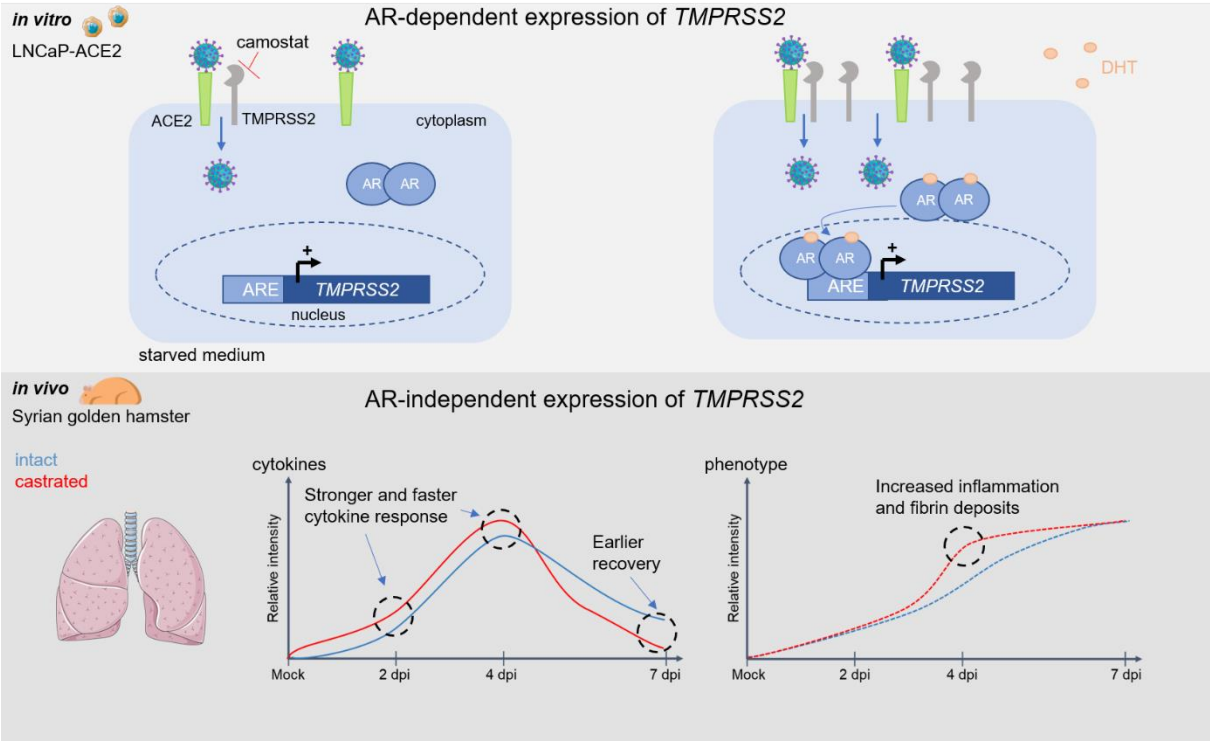
². Université Lille, CNRS, INSERM, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019-UMR 9017-CIIL-Center for Infection and Immunity of Lille, Lille, France.

³. Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, UMR INSERM U1052 - CNRS 5286, Université de Lyon, Centre Léon Bérard, Lyon, France

⁴. Service de Biochimie Biologie Moléculaire Sud, Centre Hospitalier Lyon Sud, Hospices Civils de Lyon, Pierre-Bénite, France.

Corresponding author: martine.duterque@cns.fr

Graphical abstract



Summary

Men with COVID-19 are more likely than women to be hospitalized, admitted to intensive care or die from the disease. Physiological effects of androgens are among the factors that may contribute to this difference. Indeed, it is already known that the expression of the *TMPRSS2* gene, which encodes a crucial protease for virus entry, is regulated by androgens in prostate. We first investigated the effect of gene expression modulation by androgens, in particular *TMPRSS2*, on SARS-CoV-2 infection *in vitro*. In a prostate cell model, stably overexpressing ACE2, the protein required for SARS-CoV-2 infection, we showed that the absence of androgen decreases viral infection, and particularly viral entry, via the loss of *TMPRSS2* expression. Conversely, testosterone increases the rate of viral infection. Second, to study, *in vivo*, the effect of androgens on SARS-CoV-2 infection and disease severity over time, we used a Syrian golden hamster model, for which we performed androgen suppression by castration. Our results showed an earlier pulmonary inflammatory response in castrated hamsters compared with controls. This kinetics shift, in response to SARS-CoV-2 infection, reveals an effect of androgens in the lungs, which corresponds to an altered transcriptional program. These results were supported by an ancillary case-control study from the GCO-CACOVID cohort which has included cancer patients with proved COVID-19 during the first epidemic wave in 2020. Together, our findings demonstrate a role for androgens in the SARS-CoV-2 infection process and in the kinetics of disease progression.

Introduction

Since the end of 2019, the world is facing the Covid-19 pandemic, a disease induced by a novel coronavirus, the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). Because of its high transmissibility, virus has gradually spread uncontrollably around the world, with more than 638,660,000 confirmed global cases in November 2022 (data updated daily by Johns Hopkins University) ¹. Several actions have been put in place to contain, limit and prevent infections. Vaccination has then been presented as the solution to contain the pandemic and has been set up from 2021.

The degree of severity of the disease varies depending on age, sex, but also on risk factors and comorbidities such as diabetes, obesity, other diseases ^{2,3}. Among the most commonly reported symptoms are fever, anosmia, severe fatigue, body aches, coughing and breathing difficulties ^{4,5}. Depending on the individual, they may be completely asymptomatic or develop a mild to moderate form, while others may have a severe form that leads to hospitalization or even admission to intensive care. The latter forms are more common in the elderly ⁶.

Although the male and female incidence is roughly the same, it has been shown, as cases have increased, that men are more prone to severe forms of Covid-19, with more hospitalization and intensive care admissions ^{7,8}. Thus, men are more susceptible to SARS-CoV-2 in terms of severity and mortality. Although the etiology is multifactorial, one possible explanation is the role of male hormones in the infectious process. A possible mechanism could involve androgens in gene regulation and particularly in the regulation of the protease *TMPRSS2* (Transmembrane protease serine 2). Indeed, two cellular proteins are required for the entry of the virus, ACE2, angiotensin-converting enzyme-2, to enter into the host cell, and *TMPRSS2*, which allows viral spike protein priming and thus efficient virus-receptor binding and viral entry ⁹. In prostate cancer cells, *TMPRSS2* is a well-known transcriptional target of the androgen receptor (AR) through multiple Androgen Responsive Elements (ARE) present in the regulatory region of the gene ¹⁰. Since AR has already been shown as active in lung, this suggests a potential upregulation of the AR-target genes, such as *TMPRSS2*, in men ¹¹.

To decipher the mechanisms of SARS-CoV-2 infection and for preclinical evaluation of therapeutic molecules, several cellular models have been developed. However,

despite the highly infectious nature of SARS-CoV-2 in human, very few cell lines are permissive to the virus *in vitro*. Indeed, infection required both ACE2 and TMPRSS2 expression in host cells. Surprisingly, whereas lungs are the main SARS-CoV-2 target, only few lung cell lines are able to be infected *in vitro*, thus other tissues or species cell lines are frequently used, such as monkey kidney (Vero-E6 cell line), human lung adenocarcinoma (Calu-3 cell line) ^{9,12}.

From 2020, to accelerate the testing of vaccines and therapeutic agents, several animal models for COVID-19 have been developed ¹³. The mouse model is not permissive to the SARS-CoV-2 infection due to the fact that mouse ACE2 is not able to bind the viral spike protein. Thus, only mice artificially expressing human ACE2 can be infected by SARS-CoV-2, but no mouse model recapitulates all aspects of COVID-19 in humans. By contrast, the Syrian golden hamster (*Mesocricetus auratus*) is a commonly used experimental animal model that has been recorded to support the replication of and SARS-CoV-2 ¹⁴. After experimental intranasal infection, hamsters exhibit mild to moderate disease with progressive body weight loss starting very early after infection, 1–2 days post infection (dpi). All animals inoculated by different SARS-CoV-2 show respiratory symptoms, including labored breathing. Two weeks after infection, hamsters typically recover.

Herein, we investigate the role of androgens in SARS-CoV-2 viral infection both *in vitro* in a transduced-ACE2 prostate cancer cell line and *in vivo* using castrated, compared with intact, Syrian golden hamster model. With this comprehensive approach, we have shown at what stage androgens are involved in SARS-CoV-2 viral infection response.

Results

Modulation of TMPRSS2 by AR impacts the rate of viral infection. To elucidate whether TMPRSS2 modulation by androgens could have a role in SARS-CoV-2 infection *in vitro*, we looked for cell lines able to both answer to androgen or anti-androgen and be able to be infected by the virus. We chose a series of cell lines including pulmonary and prostate cell lines and other cell lines used in SARS-CoV-2 infection studies ^{9,12}. Among them, we detected AR only in LNCaP, a prostate cancer cell line, known to be androgen-dependent (Fig. S1a). However, ACE2, required for infection, was undetected in LNCaP cells compared with Vero-E6, CaCo-2 and Calu-3, known to be able to be infected. Since AR and TMPRSS2 are highly expressed in

LNCaP, we decide to stably expressed ACE2 by transducing ACE2 lentivirus into these cells ¹⁵. After selection, the expression of ACE2 in LNCaP-ACE2 was validated at RNA and protein levels using RT-PCR and immunofluorescence respectively (Fig. 1a).

To confirm the androgen response of *TMPRSS2* expression, LNCaP-ACE2 cells were either cultured in normal and hormone deprived media, or stimulated by DHT (Dihydrotestosterone), the active form of the hormone, or treated by the anti-androgen bicalutamide (BIC). As expected, *TMPRSS2* expression, quantified by RT-PCR in Fig. 1b, showed a decrease transcript level in hormone deprived media, compared with normal conditions. Conversely, an addition of DHT significantly increased the level of *TMPRSS2* transcripts. This effect was abolished by addition of the anti-androgen BIC and partially restored by adding DHT (Fig. 1b). These results were confirmed at protein level using western blotting (Fig. 1c).

Next, we evaluated the infection rate of LNCaP-ACE2 cells and notably the level of infection compared with reference models of infection by SARS-CoV-2, such as Vero- E6 and Calu-3. We demonstrated that LNCaP-ACE2 was able to be infected by SARS-CoV-2 as Vero E6 and Calu-3 at a MOI of 0.02, and more than Calu-3 at a MOI of 0,1 (Fig. 1d). Based on these results, we now used the LNCaP-ACE2 cells to study whether the *TMPRSS2* modulation by androgens could impact the level of viral infection. We observed that, in absence of hormones using a depleted culture medium, the level of cell infection decreased of 60% compared with cells cultured in standard medium (Fig. 2a), while the addition of DHT restored and increased the basal infection level in standard culture condition. In order to prove that these results involved *TMPRSS2* expression modulation, we added the *TPMRSS2* specific inhibitor, the mesylate camostat ¹⁶. The combination of this drug and hormone depleted media or standard media did not present significative differences in level infection compared to level infection in hormone depleted media alone (Fig. 2a). Thus, it shown that *TMPRSS2* is completely repressed in hormone depleted media and that the observations made in this condition are due to the downregulation of *TMPRSS2*.

Finally, in order to avoid any compensation phenomenon, we added aloxistatin, also called E64d, an inhibitor of the cathepsin responsible for an alternative route of entry of the virus ^{17,18}. The use of E64d showed camostat similar effects on LNCaP-ACE2 infection, therefore lysosomal pathway is not involved and do not compensate the inhibition of *TPMRSS2* (Fig. 2a).

Taken together these results show that the androgens are able to increase infection level through *TMPRSS2* modulation in LNCaP-ACE2.

Modulation of *TMPRSS2* by androgens specifically impacts viral entry. To go further, we focused on androgen effect on viral entry step since *TMPRSS2* is described to allow the spike protein viral priming and so SARS-CoV-2 entry in host cells⁹. Using SARS-CoV-2 Spike protein pseudo-virus and luciferase-expressing lentivirus system to measure luciferase activity corresponding to the SARS-CoV-2 entry in LNCaP-ACE2, [Fig. 2b](#) showed a strong decrease of virus entry in hormone-deprived medium conditions. Addition of DHT to deprived medium restored virus entry at the same level than in standard cultured conditions. To complete these results, we combined standard and hormone-deprived conditions, camostat and E64d to compare virus entry in LNCaP-ACE2 cells. Once again, hormone deprived medium or *TMPRSS2* inhibition strongly attenuated virus entry ([Fig. 2c](#)). As a control, cellular entry driven by the glycoprotein of the pantropic vesicular stomatitis virus G protein (VSV-G) was unaffected by the treatments, showing that the effects of these drugs are specific for the SARS-CoV-2 cell entry mechanism ([Fig. 2c left panel](#)). Therefore, downregulation or direct inhibition of *TMPRSS2* clearly reduced viral entry.

In conclusion, the impact of androgens on viral infection occurs at the key step of viral entry.

There is no viral propagation in LNCaP-ACE2. One of the mechanisms of propagation of the virus is the formation of syncytia, which is defined as a cell resulting from the fusion of several cells. In the case of SARS-CoV-2 infection, this phenomenon involves an infected cell expressing the spike protein and a healthy cell expressing the ACE2 receptor. Once the two cells are linked, fusion of the two occurs via proteolytic activation of the spike protein by *TMPRSS2*, in the same way as in a classical virus/host cell infection¹⁹.

To determine if the modulation of *TMPRSS2* by androgens can also influence syncytia formation, we inoculated LNCaP-ACE2 cells and Calu-3, cells known to form syncytia, with SARS-CoV-2 virus and labeled the spike protein to observe syncytia ([Fig. S1b](#)). Compared with Calu-3 infected cells, none syncytia was formed and detected in infected LNCaP-ACE2 cells ([Fig. S1b](#)). Therefore, the increase rate of viral infection

observed in LNCaP-ACE2 treated with hormone is not due to propagation within the cell population.

Lack of androgens reduces the duration of infection *in vivo*. In order to study SARS-CoV-2 viral infection *in vivo*, we took advantage of the Syrian golden hamster model, a permissive animal model, which recapitulates hallmark features of the human disease, particularly in the lungs. To evaluate the effect of androgens on viral infection, androgenic suppression was obtained by animal castration. As described Fig. 3a, male hamsters, castrated or intact, were infected intranasally with a sublethal dose of a clinical SARS-CoV-2 isolate and aiming to study the different phases of the disease, hamsters were sacrificed at 2, 4 and 7 dpi. The effectiveness of castration was confirmed by measuring testosterone in the blood of the animals (Fig. 3b). Both castrated and intact hamsters experienced similar body weight loss at day 2 post-infection (dpi), weight loss peaked at 7 dpi (average of 13% of initial weight) and from day 7 onward, infected animals started to recover (not shown) (Fig. 3c).

To evaluate viral infection, viral RNA-dependent RNA polymerase levels were quantified by RT-PCR (Fig. 3d). Relative to mock hamsters, significant higher viral transcripts were detected at 2 dpi for both intact and castrated groups and only in intact group at 4 dpi. Infectious viral loads in the lungs of castrated hamsters were similar to the intact hamsters at 2 dpi and significantly lower than that of intact hamsters at 4 dpi (Fig. 3e, f). In addition, the spike viral protein detection in lung sections showed positive pulmonary cells in the 2 groups at 2 dpi, mainly bronchial epithelial cells, but only in intact group at 4 dpi (Fig. 3g). These results show an accelerate clearance of SARS-CoV-2 in lungs of castrated hamsters.

Androgen deprivation accelerates the clinical course of the SARS-CoV-2 viral infection. To assess lung histopathology changes of SARS-COV-2-infected hamster along with the period of disease, lungs have been collected and fixed just after hamster death, and included in paraffine. Phenotypic analyzes were performed to establish a score based on a dual histopathology score system ^{20,21}. Among the 9 parameters used to assess to the score (cellular death/necrosis, alveolar and/or perivascular edema, hyaline membrane or fibrin, inflammation, thrombi, congestion, hemorrhage, type II hyperplasia, and syncytia) and using H&S staining (Fig. 4a), analyzes showed the highest lung damages in castrated hamsters at 4 dpi. No substantial difference could be observed in the lungs at 2 and 7 dpi between castrated and intact hamsters,

suggesting that the androgen lack in castrated hamsters modifies the progression of the disease. More precisely, the histopathology score identified two main damages in the lungs. The first significant damage corresponded to an increased inflammation in castrated hamsters compared with the intact animals (Fig. 4b). Second, the hyaline membrane formation associated with fibrin deposit was higher in castrated hamsters than in intact animals (Fig. 4c). Since inflammation is known to cause capillary leakage and deposition of fibrin, associated with the formation of a hyaline membrane, these two damages, observed mainly at 4 dpi, are physiologically linked and could result in obstruction of gas exchange, leading to breathing difficulties, characteristic of COVID-19²². Therefore, in lungs, phenotypic analyzes revealed that castrated hamsters challenged with SARS-CoV-2 showed a more pronounced inflammation and fibrin deposit than intact hamsters at 4 dpi. This suggests a negative effect of the lack of androgens at 4 dpi. Surprisingly, at 7 dpi, both castrated and intact animals exhibited similar histopathological score, suggesting the lack of androgens induce a difference in clinical course of SARS-CoV-2 infection disease and recovery.

Castration induces a shift in inflammation kinetics. To understand the phenotypic differences observed in lungs between castrated and intact hamsters, we used lung RNA to perform RT-PCR experiments and follow a panel of genes involved in inflammation, such as cytokines (*Cxcl10*, *Ccl2*, *Ccl4*, *Mx1*), interleukins (*Il6*, *Il1β*) and interferon-stimulated genes (*Ifi27*, *Isg15*) but also epithelium and endothelium related genes (*Ocln*, *Zo-1*) to study the integrity of the lung tissue.

Compared with the lungs of intact hamsters challenged with SARS-CoV-2, we found, at 4 dpi, a significant increase in mRNA expression of *Ifny*, *Cxcl10*, *Ccl2*, *Ccl4*, *Il6*, and *Ifi27* at 2 or 4 dpi corroborating more inflammatory responses (Fig. 5a-f). Interestingly, at 7 dpi, we also observed a more significant reduction of some of them but also others cytokines like *Mx1*, *Isg15* and *Il1β* in castrated hamsters (Fig. 5a-d, g-i). These results suggest an earlier inflammation kinetic in lungs of infected castrated hamsters. This would allow them to fight the infection more effectively, resulting in a lower viral load and a faster viral clearance observed at 4 dpi. According to histopathological analysis, *Ocln* and *Zo-1*, epithelial related genes, showed a reduced expression in castrated hamsters compared to intact at 4 dpi (Fig. 6 a, b). Moreover, the percentage of Syrius Red labeling, a marker of fibrosis, tends to be lower in the lungs of hamsters castrated at 7 dpi, probably the difference would be significant at later times (Fig. S2).

***Tmprss2* is not an androgen-regulated gene in lungs of Syrian golden hamsters.**

The *TMPRSS2* gene expression, known to be highly regulated by AR particularly in prostate cancers, have been assumed to be the main cause of male COVID-19 severity. From 2020, several studies aimed to validate this hypothesis^{23–26}. However, using the Syrian golden hamster model, androgen deprived by castration, we did not observe any *Tmprss2* expression variation between lungs of castrated or intact hamsters challenged with SARS-CoV-2 virus. This result was obtained either at transcriptional level, using RT-PCR performed with lung RNA (Fig. 7a), or at protein level, using immunohistochemical (IHC) analyses (Fig. 7b). To complete this study, in addition to *Tmprss2*, we established *Ace2* and *Ar* protein expression in lungs of both castrated and intact hamsters, at 2, 4, 7 dpi or uninfected controls (Fig. 7c, d). Expression of *Tmprss2*, *Ace2* and *Ar* exhibited a similar pattern between castrated and intact animals, with a predominant expression in airways localized in bronchial or bronchiolar epithelial cells (Fig. 7b-d). However, following infection, a decrease in *Ace2* expression in the lungs was observed at 2 dpi, similarly to other previous already published studies^{27,28}. This *Ace2* expression was restored at 4 dpi in castrated hamsters compared with intact animals, which recovered *Ace2* expression later at 7 dpi (Fig. 7c). This late result was in line with the general kinetic modification of the clinical course of the disease observed in the androgen deprivation of the hamster model.

Castration results in a modification of inflammation related gene expression in lungs. To identify the molecular mechanisms involved and regulated by androgens during viral infection, we compared the transcriptome of infected lungs of castrated and uncastrated hamsters. Since the highest observed differences in lungs were at 4 dpi, we used lung RNA at this point of the disease course. Compared to intact hamsters, transcriptomic analysis highlighted the alteration of several classes of genes in castrated hamsters, 74 up-regulated and 94 down-regulated genes (Fig. 8a and S3). Among these genes, we identified several inflammation related genes which are overexpressed such as genes encoding cytokines *Cxcl2* and *Cxcl5*, inflammation receptors *Il1r2*, *Tnfrsf14*, *Nlrp3*, *Bdkrb1* and *Mefv* protein (Fig. 8b). According to histopathology observations, we also identified up-regulated genes related to coagulation and fibrosis such as *Fga* encoding genes and *Serpins* encoding genes (Fig. 8c). In parallel, genes belonging to innate immune response were identified in

castrated hamsters including genes coding for inflammation receptors Nlrp3 and Mefv protein, C-type lectins Clec5a and Clec4d (Fig. 8d). Then, we noticed the up-regulation of SARS-CoV-2 entry related genes *Siglec-1*, *Clec5a* and *Clec2e* (Fig. 8e). Indeed, recently Siglec-1 and C-type lectins have been shown to enhance SARS-CoV-2 viral infection via its function as attachment receptors which improve ACE2-mediated infection²⁹. This finding, in line with other published studies in human cells, strengthen our model. Moreover, in mild COVID-19, Siglec-1 expression on monocyte was shown to be correlated with type I interferon levels, key drivers of the infectious host immune response, which corroborates an earlier immune response in castrated hamsters^{30,31}. The transcriptional regulation of this series of genes by AR, via direct DNA binding or indirect regulation, remains to be elucidated.

Prostate and salivary glands are not permissive to SARS-CoV-2 in Syrian golden hamster model. To complete our study of the androgens effects on the disease severity in the hamster model, we wanted to study two organs known to express AR and to be regulated by androgens. First, we investigated the possible detection of the virus in prostate. Despite the expression of *Tmprss2*, none of the castrated and intact hamsters, challenged or not with the virus, showed virus detection, according to the absence of *Ace2* expression (Fig. S4 a-d). Second, the other organ known to express AR was the salivary glands. Moreover, same salivary gland tumors have been shown to be treated by androgen-deprivation therapies suggesting an active role of androgens and AR in this organ³²⁻³⁴. In the hamster model, we detected the two important SARS-CoV-2 receptors, *Ace2* and *Tmprss2*, and also *Ar* as expected (Fig. S5 a-c). Therefore, we didn't observe any change in *Ar*, *Tmprss2* and *Ace2* based on the castration status or the infection with SARS-CoV-2 and despite the presence of the SARS-CoV-2 receptors, we did not detect any spike viral protein in the salivary glands at 2, 4 and 7 dpi (Fig. S5d). Altogether, these results suggest that prostate and salivary glands are not permissive to the SARS-CoV-2 in the Syrian golden hamster model.

CACOVID. In order to evaluate the effects of anti-androgens on COVID-19 in human, we chose to perform a case-control study from the GCO-OO2 CACOVID-19 nationwide cohort, based on cases of metastatic prostate cancer undergoing hormone therapy³⁵. CACOVID is a large French retro-prospective cohort study data on patients with solid tumors and COVID-19 diagnosed between March 1 and June 11, 2020, during the "first wave" of SARS-CoV-2 dissemination, were collected in 153 French

centers, representative of the cancer care supply and of the epidemiology of COVID-19 occurrence in France at that time.

The primary endpoint was all-cause mortality and the severity of COVID-19, defined as admission to an intensive care unit (ICU) and/or mechanical ventilation and/or death, was one of the secondary endpoints.

Thus, from April 4 to June 11, 2020, 1289 patients were analyzed, including 41 prostate cancer patients of which 26 were metastatic. Among the patients included, digestive cancers were the most common type of cancer (36%), followed by thoracic (24%) and breast (13%) cancers and 59% of patients had a metastatic disease. It seemed relevant to us to take as controls men with metastatic colorectal cancers, whose prognosis and evolution seemed to be the closest to metastatic prostate cancers among the CACOV-19 patients, in a 2:1 case-control study. Only descriptive statistics could be performed because of the small cohort of metastatic prostate cancers and the difficulty in matching metastatic prostate cancer patients on ADT and metastatic colorectal cancer cases on age and comorbidities, and also because of missing data.

We identified 26 patients with PCa, actively receiving ADT at the time of COVID-19 diagnosis and 63 patients with colorectal cancer. The baseline characteristics are listed in [Table 1](#). The mean ages of prostate cancer patients on active ADT treatment (ADT) and colorectal cancer (noADT) were 75.15 years and 70.87 years, respectively. Compared with the noADT group, the ADT cohort seems to have higher rates of body mass index (BMI) ≥ 30 (26.1% vs 12.1%). Comorbidity scores are roughly the same with at least 90% of patients having a score above 4 (90% vs 94.5%, respectively for ADT and noADT). Concerning clinical outcome of COVID-19, listed in [Table 1](#), there is no differences in hospitalization rate (79.2% vs 77.2%), in oxygen therapy use (13% vs 14.5%) and in mortality (33.3% vs 33.9%), respectively for ADT and noADT. On the other hand, patients with prostate cancer on ADT appeared to have fewer admissions to intensive care (5.3% vs 15.9%), less need for mechanical ventilation (82.9% vs 96.4%), and less CT-significant pneumonia (39.1% vs 50.9%) in comparison to noADT patients.

All these results suggest a role for androgens in SARS-CoV-2 viral infection severity and are consistent with our findings in animals.

Materials and Methods

Cell culture, virus and treatments. Human prostate cancer cell lines LNCaP were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). LNCaP, A549, 16HBE, CaCo-2, Vero-E6 and Calu-3 cells were grown in appropriate media as recommended by ATCC supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), except for CaCo-2 for which it is 20% fetal bovine serum. Cells were sub-cultured every 3–4 days and maintained in a humidified incubator at 37°C and 5% CO₂. All cell lines were tested every 6 months for potential mycoplasma contamination with MycoAlert™ mycoplasma detection kit (Lonza, Basel, Switzerland). To activate androgen receptor, LNCaP cells were treated with 10nM DHT (5 α -Androstan-17 β -ol-3-one) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) after being starved in hormone with charcoal-stripped serum containing medium during 24h. The activity of androgen receptor was inhibited by 50 μ M of bicalutamide (BIC) (Sigma-Aldrich).

The hCoV-19_IPL_france strain of SARS-CoV-2 (NCBI MW575140) was propagated in Vero-E6 cells expressing TMPRSS2. Cell supernatant were collected 72h post-infection and frozen in small aliquots at -80°C. All experiments were conducted in a biosafety level 3 (BSL3) laboratory.

Lentiviral vectors expressing ACE2 were produced by co-transfection of HEK293T cells with pRLL.SFFV-ACE2-IRES-Puro, and plasmids encoding Gag-Pol and the glycoprotein of the vesicular stomatitis virus (VSV-G). Cells supernatants were collected 48h post-transfection, filtered and used to transduce LNCaP cells.

Transduction of cells with lenti-ACE2. Cells were seeded in 6-well plates before transduction. The next day, ACE2 lentivirus or control lentivirus were transduced into cells with polybrene. The culture medium supernatant was replaced with fresh medium 24 h post transduction. Puromycin selection was made 48h post transduction.

Infectivity assay. Vero-E6 cells, Calu-3 cells and LNCaP-ACE2 cells were seeded on glass-coverslips and inoculated at a MOI of 0.02 or 0.1. Twenty-four hours later cells were fixed in 4% paraformaldehyde in PBS and processed for immunofluorescence.

Pseudoparticles production and entry inhibition assay. Pseudoparticles pseudotyped with the SARS-CoV-2 spike protein or the VSV-G were produced as

described previously³⁶. Briefly, HEK293T cells were co-transfected with a plasmid encoding the envelope protein, a plasmid coding for Gag-Pol (pTG-Gagpol) and a plasmid coding for the minigenome (pTG-luc). Cells were incubated for 48h and cells supernatant were collected, filtered and stored at -80°C.

For pseudoparticles entry assay, cells were seeded in 48-well plates at initial count of 20 000 cells per well on day 0. On day 1, cells were cultured in hormone-starved medium or complete medium. On day 2, hormone-starved cells were stimulated or not with DHT (10nM). On day 3, cells were pre-treated with camostat mesylate (50 µM) (Sigma-Aldrich), aloxistatin (40 µM) (Sigma-Aldrich) or both for 1h. Then, cells were transduced with pseudoparticles in presence of the different compounds for 3h. Cells medium was replaced with fresh medium. The transduction efficiency (pseudovirus entry) was quantified 72h post-transduction by using the Luciferase assay system (Promega) according to the manufacturer's instructions. Luciferase activity were recorded in a Berthold luminometer.

For virus entry assay, cells were seeded in 24 well-plates and cultured on day 0 hormone-starved medium or complete medium. On day 2, hormone-starved cells were stimulated or not with DHT (10nM). On day 3 cells were treated with camostat or E64d as described above and infected at a MOI of 0.1 in presence of the different compounds. Twenty-four hours later, total RNA was extracted by using the Nucleospin RNA kit (Macherey Nagel, Düren, Germany) according to the manufacturer's instruction. Reverse transcription was performed by using the high capacity cDNA reverse transcription kit (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. SARS-CoV-2 genomes were quantified by qRT-PCR. The relative expression level of SARS-2 E (envelope) gene was calculated using the $-2\Delta\Delta CT$ method and normalized to that of the RPLP0 housekeeping gene.

Syncytia formation. For syncytia formation and observation, LnCap-ACE2 cells and Calu-3 cells were seeded on poly-D-lysine coated glass slide. Cells were inoculated with SARS-CoV-2 at a MOI of 0.01. Cells were fixed and processed for immunofluorescence.

Immunofluorescence. After fixation in ice cold methanol for 10 min, cells were washed three times with PBS + Glycine 100mM and then permeabilized in 0.1% Triton X-100 for 4 min at room temperature. Cells were then blocked in 1% BSA for 1 h at

room temperature. After blocking, cells were stained according to type of staining, as follows.

For ACE2, cells were incubated with diluted primary antibody (1:250 in 1% BSA ACE2 antibody [EPR4435(2)], ab108252, Abcam, Cambridge, UK). Cells were then washed three times in PBS-Tween 0.1%, and diluted (1:500 in 1% BSA) secondary antibody were added and incubated for 1h. Cells were then washed in PBS-Tween 0.1%. Nuclear staining was performed by Hoechst for 10min.

For virus labelling, after PFA fixation, cells were rinsed with PBS and permeabilized with 0.1% Triton-X100 in PBS for 5 min. Cells were rinsed 3 times with PBS and blocked with 5 % goat serum diluted in PBS for 30 min. Infected cells were labeled with an anti-dsRNA J2 monoclonal antibody (Sciscons) or an anti-spike monoclonal antibody (Biotem) diluted in blocking buffer. Cells were incubated for 30 min with primary antibodies then washed 3 times with PBS. Finally, cells were incubated with a mixture of cyanin-3- conjugated goat anti-mouse IgG secondary antibodies with 1 µg/ml DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) in blocking buffer for 25 min. Coverslip were rinsed with PBS and mounted on microscope slides in Mowiol 4-88-containing medium. Images were acquired on an EVOS M5000 imaging system.

For infectivity level calculation, the total number of cells was determined by counting the nuclei labeled with DAPI. Infected cells were defined as dsRNA positive cells.

RNA extraction and gene expression analysis. Total RNA was purified using the NucleoSpin RNA plus kit (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's instructions. For retrotranscription, 2 µg of total RNA was used to generate cDNA using the High Capacity RNA-to-cDNA kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Quantitative PCRs (qPCRs) were performed using the power SYBR-Green PCR Master kit (Applied Biosystems) on AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The relative expression levels of individual genes were calculated using the $-2\Delta\Delta CT$ method and normalized to that of the 18S or L32 housekeeping gene. Optimal primer specificity and efficiency were validated according to the Mx3005P qPCR system user's guide. The primers used in this study can be found in [table S1](#).

Western blotting. Cells proteins were extracted, separated in 10% SDS-Page. After migration, samples were transferred by electrophoresis to nitrocellulose. Membranes

were incubating with blocking buffer during 1 hour, then with primary antibody over the night. Membranes were incubated with secondary HRP-conjugated antibody for 1 hour. After washing, membranes were revealed using Clarity™ Western ECL substrate (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The antibodies used are TMPRSS2 (ab109131), ACE2 (ab108252), AR (cs5153) (Cell Signaling Technologies, Danvers, MA, USA) and GAPDH (sc32233) (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA).

Animals, virus and infection, ethics and biosafety statement. Male 8- to 10-week-old Syrian golden hamsters, castrated or not, were purchased from the Janvier Laboratory (Le Genest-St-Isle, France). 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 µl of DMEM containing (or not, in mock samples) 2×10^4 TCID₅₀ (50% tissue culture infectious dose) of SARS-CoV-2. For lungs, salivary glands and prostate preparation, animals were euthanized by i.p. injection of pentobarbital (140 mg per kg body weight) on day 2, 4, 7 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'Ethique en Experimentation Animale (CEEAA) 75. Nord Pas-de-Calais. The study was authorized by the "Education, Research and Innovation Ministry" under registration number APAFIS#25041-2020040917227851 v3.

Determination of viral load and median tissue culture infectious dose (TCID₅₀) assays. Infectious virus and viral RNA were determined by using the Reed & Muench Tissue Culture Infectious Dose 50 (TCID₅₀) assay and quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR). Titration of live infectious virus was performed as follows. Half of right lobes were homogenized in Lysing Matrix D tubes containing 1 ml of PBS using Mixer Mill MM 400 (Retsch) (15min – 15 Hz). After centrifugation at 11,000 rpm for 5 min, the clarified supernatant was harvested for live virus titration. Dilutions of the supernatant were done in DMEM with 1% penicillin/streptomycin and dilutions were transferred to Vero-E6 cells in 96-well plates for TCID₅₀ assay. Briefly, serial 10-fold dilutions of each sample were inoculated in a Vero E6 cell monolayer in

duplicate and cultured in DMEM supplemented with 2% fetal bovine serum (Invitrogen, Waltham, MA) and 1% penicillin/streptomycin and L-glutamine. The plates were observed for cytopathic effects for 5-6 days. One TCID₅₀ was interpreted as the amount of virus that caused cytopathic effects in 50% of inoculated wells. Virus titers were expressed as TCID₅₀. Quantitation of viral RNA in lung tissue was performed as follows. Briefly, half of the right lobe was homogenized in 1mL of RA1 buffer from the NucleoSpin RNA kit containing 20 mM of TCEP. Total RNAs in the tissue homogenate were extracted with NucleoSpin RNA from Macherey Nagel. RNA was eluted with 60µl of water.

Histopathology. Lung tissues were fixed in 4% PBS buffered formaldehyde for 7 days, rinsed in PBS, transferred in 70% ethanol and then processed into paraffin-embedded tissues blocks. The Sciempath Labo (Larçay, France) performed histological processing and analysis. The 3µm tissue sections were stained with haematoxylin and eosin (H&E) and whole mount tissues were scanned with a Nanozoomer (Hamatsu) and the morphological changes were assessed by a semi-quantitative score. For the scoring, a dual histopathology scoring system based on ^{20,21} was used to assess pulmonary changes in hamsters. Nine parameters were qualitatively assessed according to a score from 0 to 4: (1) cellular death/necrosis, (2) alveolar and/or perivascular edema, (3) hyaline membrane or fibrin, (4) inflammation, (5) thrombi, (6) congestion, (7) hemorrhage, (8) type II hyperplasia, and (9) syncytia. For each criteria, a score 0 = absent, 1 = 1-10% of lung section, 2 = 11-25% of lung section, 3 = 26-50% of lung section, and 4=>50% of lung section affected. To evaluate pulmonary fibrosis, the Sirius Red-stained areas on scanned sections were measured using ImageJ.

Immunohistochemistry. Immunohistochemistry of hamster tissue sections was performed using anti-ACE2 (ab108252) at 1/100, anti-TMPRSS2 (ab92323) at 1/200, anti-spike protein at 1/5000 (ab272505) and anti-AR at 1/100 (sc7305). Sections were incubated with secondary HRP-conjugated antibody. Counterstaining was performed using Mayer's hematoxylin (Merck, Darmstadt, Germany). Images were acquired using an Axio Scan.Z1 slide scanner and ZEN (Blue edition) 2012 software (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany).

Quantification of seric testosterone. Concentrations of testosterone in blood were quantified by ELISA (EU0400, FineTest, Wuhan, China) according to the manufacturer's instructions.

CACOVID-19 cohort. Retro-prospective multicenter French cohort set up by the French Cooperative Groups in solid cancers: ANOCEF-IGCNO (CNS tumors), ARCAGY-GINECO (gynecological and breast cancers), FFCD (digestive cancers), GERCOR (digestive and other solid cancers), GORTEC/intergroupe ORL (head and neck cancers (H&N), and IFCT (thoracic cancers). Data were collected from April 4 to June 11, 2020. 1289 patients were included. The primary endpoint was all-cause mortality and the severity of COVID-19 was one of the secondary endpoints.

Statistical analysis. Statistical analyses were performed using the GraphPad Prism software (San Diego, CA, USA). The statistical methods used in this study are indicated in the corresponding figure legends.

References

1. Dong, E., Du, H. & Gardner, L. An interactive web-based dashboard to track COVID-19 in real time. *The Lancet Infectious Diseases* **20**, 533–534 (2020).
2. Dai, M. *et al.* Patients with Cancer Appear More Vulnerable to SARS-CoV-2: A Multicenter Study during the COVID-19 Outbreak. *Cancer Discov* **10**, 783–791 (2020).
3. Radzikowska, U. *et al.* Distribution of ACE2, CD147, CD26 and other SARS-CoV-2 associated molecules in tissues and immune cells in health and in asthma, COPD, obesity, hypertension, and COVID-19 risk factors. *Allergy n/a*,.
4. Huang, C. *et al.* Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* **395**, 497–506 (2020).
5. Li, L. *et al.* COVID-19 patients' clinical characteristics, discharge rate, and fatality rate of meta-analysis. *J Med Virol* (2020) doi:10.1002/jmv.25757.
6. Wiersinga, W. J., Rhodes, A., Cheng, A. C., Peacock, S. J. & Prescott, H. C. Pathophysiology, Transmission, Diagnosis, and Treatment of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Review. *JAMA* **324**, 782–793 (2020).
7. Fang, X. *et al.* Epidemiological, comorbidity factors with severity and prognosis of COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *Aging (Albany NY)* **12**, 12493–12503 (2020).
8. Ko, J. Y. *et al.* Risk Factors for Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)-Associated Hospitalization: COVID-19-Associated Hospitalization Surveillance Network and Behavioral Risk Factor Surveillance System. *Clin Infect Dis* **72**, e695–e703 (2021).
9. 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.e8 (2020).
10. Wang, Q. *et al.* A hierarchical network of transcription factors governs androgen receptor-dependent prostate cancer growth. *Mol. Cell* **27**, 380–392 (2007).
11. Mikkonen, L., Pihlajamaa, P., Sahu, B., Zhang, F.-P. & Jänne, O. A. Androgen receptor and androgen-dependent gene expression in lung. *Mol. Cell. Endocrinol.* **317**, 14–24 (2010).
12. Matsuyama, S. *et al.* Enhanced isolation of SARS-CoV-2 by TMPRSS2-expressing cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **117**, 7001–7003 (2020).
13. Muñoz-Fontela, C. *et al.* Animal models for COVID-19. *Nature* **586**, 509–515 (2020).

14. Sia, S. F. *et al.* Pathogenesis and transmission of SARS-CoV-2 in golden hamsters. *Nature* (2020) doi:10.1038/s41586-020-2342-5.
15. Lin, B. *et al.* Prostate-localized and androgen-regulated expression of the membrane-bound serine protease TMPRSS2. *Cancer Res.* **59**, 4180–4184 (1999).
16. Kawase, M., Shirato, K., van der Hoek, L., Taguchi, F. & Matsuyama, S. Simultaneous Treatment of Human Bronchial Epithelial Cells with Serine and Cysteine Protease Inhibitors Prevents Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Entry. *J Virol* **86**, 6537–6545 (2012).
17. Simmons, G. *et al.* Inhibitors of cathepsin L prevent severe acute respiratory syndrome coronavirus entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 11876–11881 (2005).
18. Bayati, A., Kumar, R., Francis, V. & McPherson, P. S. SARS-CoV-2 infects cells after viral entry via clathrin-mediated endocytosis. *Journal of Biological Chemistry* **296**, (2021).
19. Buchrieser, J. *et al.* Syncytia formation by SARS-CoV-2-infected cells. *EMBO J* **39**, (2020).
20. Imai, M. *et al.* Syrian hamsters as a small animal model for SARS-CoV-2 infection and countermeasure development. *PNAS* **117**, 16587–16595 (2020).
21. Meyerholz, D. K. & Beck, A. P. Histopathologic Evaluation and Scoring of Viral Lung Infection. *Methods Mol Biol* **2099**, 205–220 (2020).
22. Carreiro, J. E. Chapter 13 - Pulmonology. in *An Osteopathic Approach to Children (Second Edition)* (ed. Carreiro, J. E.) 215–223 (Churchill Livingstone, 2009). doi:10.1016/B978-0-443-06738-9.00013-7.
23. Leach, D. A. *et al.* The antiandrogen enzalutamide downregulates TMPRSS2 and reduces cellular entry of SARS-CoV-2 in human lung cells. *Nat Commun* **12**, 4068 (2021).
24. Baratchian, M. *et al.* Androgen regulation of pulmonary AR, TMPRSS2 and ACE2 with implications for sex-discordant COVID-19 outcomes. *Sci Rep* **11**, 11130 (2021).
25. Deng, Q., Rasool, R. ur, Russell, R. M., Natesan, R. & Asangani, I. A. Targeting androgen regulation of TMPRSS2 and ACE2 as a therapeutic strategy to combat COVID-19. *iScience* 102254 (2021) doi:10.1016/j.isci.2021.102254.
26. Li, F. *et al.* Distinct mechanisms for TMPRSS2 expression explain organ-specific inhibition of SARS-CoV-2 infection by enzalutamide. *Nature Communications* **12**, 866 (2021).
27. Tostanoski, L. H. *et al.* Ad26 vaccine protects against SARS-CoV-2 severe clinical disease in hamsters. *Nat Med* (2020) doi:10.1038/s41591-020-1070-6.
28. Sencio, V. *et al.* Alteration of the gut microbiota following SARS-CoV-2 infection correlates with disease severity in hamsters. *Gut Microbes* **14**, 2018900.
29. Lempp, F. A. *et al.* Lectins enhance SARS-CoV-2 infection and influence neutralizing antibodies. *Nature* **598**, 342–347 (2021).
30. Bourgoin, P., Biéché, G., Ait Belkacem, I., Morange, P.-E. & Malergue, F. Role of the interferons in CD64 and CD169 expressions in whole blood: Relevance in the balance between viral- or bacterial-oriented immune responses. *Immun Inflamm Dis* **8**, 106–123 (2020).
31. Doehn, J.-M. *et al.* CD169/SIGLEC1 is expressed on circulating monocytes in COVID-19 and expression levels are associated with disease severity. *Infection* **49**, 757–762 (2021).
32. Laine, M. *et al.* Immunohistochemical demonstration of androgen receptors in human salivary glands. *Arch Oral Biol* **38**, 299–302 (1993).

33. Song, J. *et al.* Systematic Analysis of ACE2 and TMPRSS2 Expression in Salivary Glands Reveals Underlying Transmission Mechanism Caused by SARS-CoV-2. *J Med Virol* (2020) doi:10.1002/jmv.26045.
34. Usami, Y., Hirose, K., Okumura, M., Toyosawa, S. & Sakai, T. Brief communication: Immunohistochemical detection of ACE2 in human salivary gland. *Oral Sci Int* (2020) doi:10.1002/osi2.1085.
35. Lièvre, A. *et al.* Risk factors for Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) severity and mortality among solid cancer patients and impact of the disease on anticancer treatment: A French nationwide cohort study (GCO-002 CACOVID-19). *Eur J Cancer* **141**, 62–81 (2020).
36. Belouzard, S., Chu, V. C. & Whittaker, G. R. Activation of the SARS coronavirus spike protein via sequential proteolytic cleavage at two distinct sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 5871–5876 (2009).

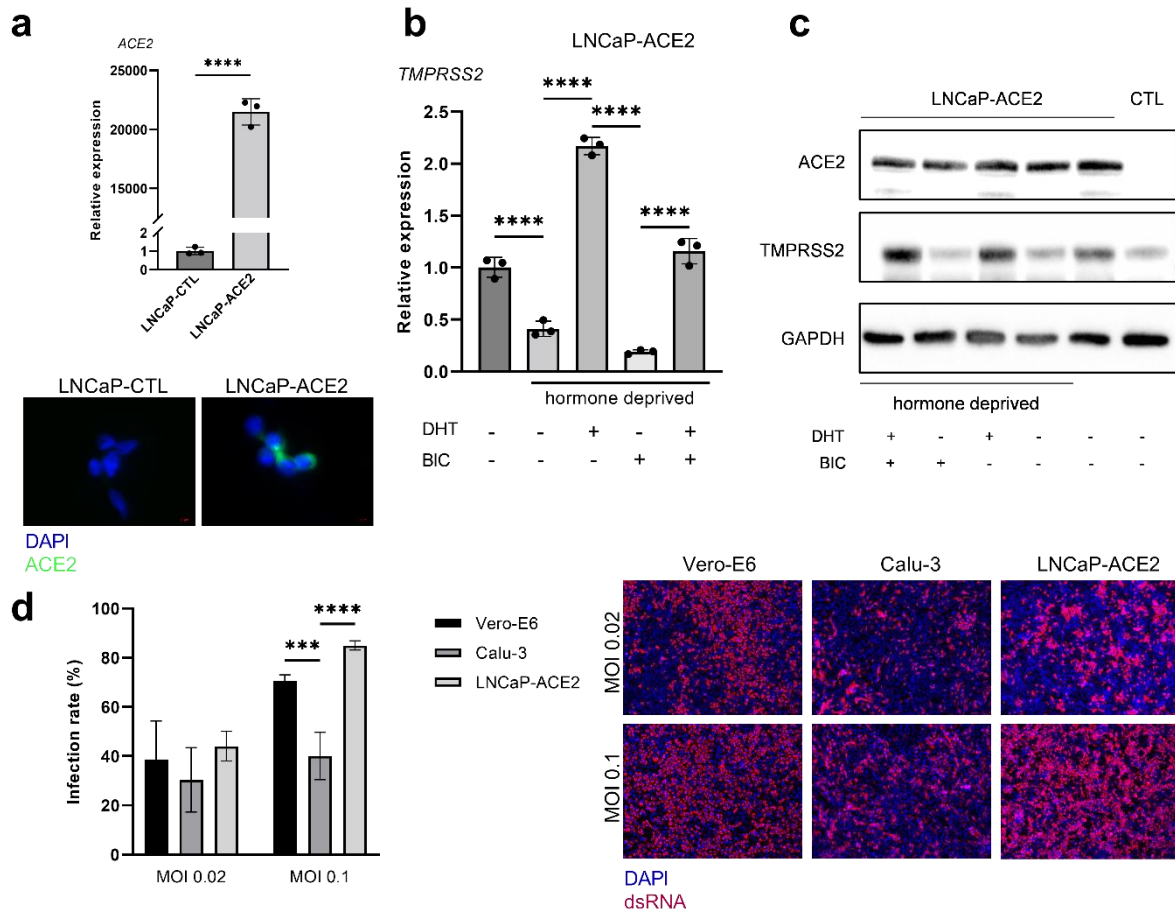


Fig.1 Overexpression of ACE2 in LNCaP-ACE2 cell lines. **a** Top, RT-PCR showing ACE2 expression in LNCaP infecting with control lentivirus (CTL) or with ACE2 lentivirus (LNCaP-ACE2). Errors bars indicate $n=3$, mean \pm s.d. Statistical significance was determined by unpaired t-test ($****P < 0.0001$). RT-PCR experiments were normalized to human *L32* genes and run in triplicate. Bottom, immunofluorescence of ACE2 protein in LNCaP-control and LNCaP-ACE2. **b** qRT-PCR analysis for *TMPRSS2* transcripts in LNCaP-ACE2, grown in the indicated conditions; Hormone deprived: phenol red free regular media with 10% charcoal striped serum, DHT: Dihydrotestosterone at 10nM, BIC: Bicalutamide 50 μ M. Statistical significance was determined by one-way ANOVA with a Tukey's multiple comparison test ($****P < 0.0001$). RT-PCR experiments were normalized to human *L32* genes and run in triplicate. **c** Immunoblot showing the expression of ACE2 and *TMPRSS2* in LNCaP-ACE2, grown in the indicated conditions; Hormone deprived: phenol red free regular media with 10% charcoal striped serum, DHT: Dihydrotestosterone at 10nM, BIC: Bicalutamide 50 μ M. GAPDH was used as the loading control. **d** Quantification by IF of SARS-CoV-2 viral infection in Vero-E6, Calu-3 and LNCaP-ACE2 cell lines inoculated with 2 doses of virus (MOI 0.02 and MOI 0.1) (left panel). Representative pictures of the immunofluorescence of dsRNA (right panel). Nuclei are stained with DAPI. Statistical significance was determined by one-way ANOVA with a Tukey's multiple comparison test ($***P < 0.001$, $****P < 0.0001$).

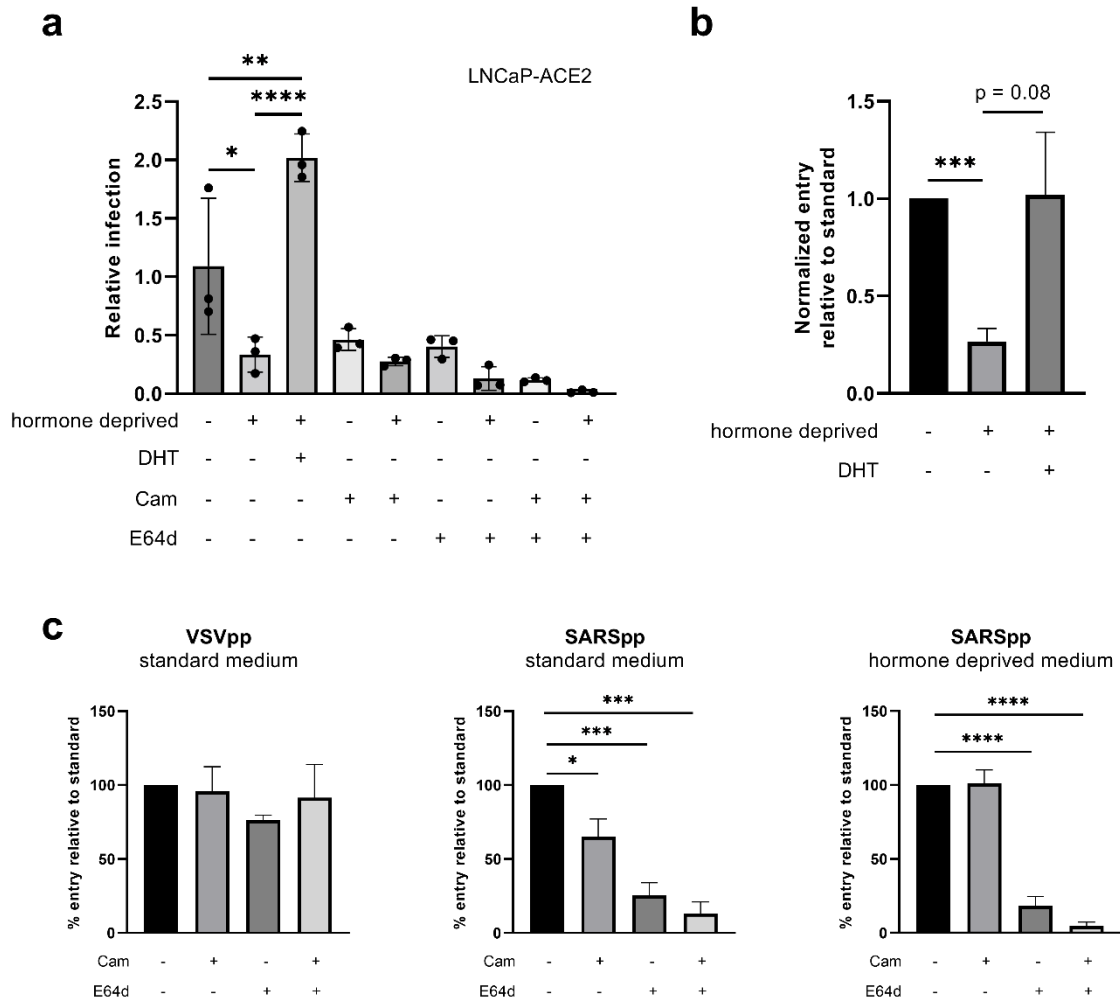


Fig.2 Androgen deprivation attenuates SARS-CoV-2 entry. **a** LNCaP-ACE2 cells grown in androgen-deprived serum-containing media for 2 days were pretreated with DHT (10 nM), camostat (50 μ M) or E64d (40 μ M) for 1 hour followed by inoculation with SARS-CoV-2; 24 h post-inoculation, the infection efficiency was measured by Taqman. Significant differences were determined using the Tukey's multiple comparison ANOVA test ($*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $****P < 0.0001$) **b,c** Androgen deprivation attenuates pseudotype entry. LNCaP-ACE2 cells grown in androgen-deprived serum-containing media for 2 days were pretreated with DHT (10 nM), camostat (50 μ M) or E64d (40 μ M) for 1 hour followed by inoculation with VSVG or SARS-CoV-2 Spike S pseudovirus for 3 h; 72 h post-inoculation, the pseudovirus entry efficiency was measured by means of nano-luciferase signal accompanying entry. Error bar indicates SEM ($n = 5$). Statistical significance was determined by Dunnett's multiple comparison ANOVA test ($*P < 0.05$, $***P < 0.001$, $****P < 0.0001$).

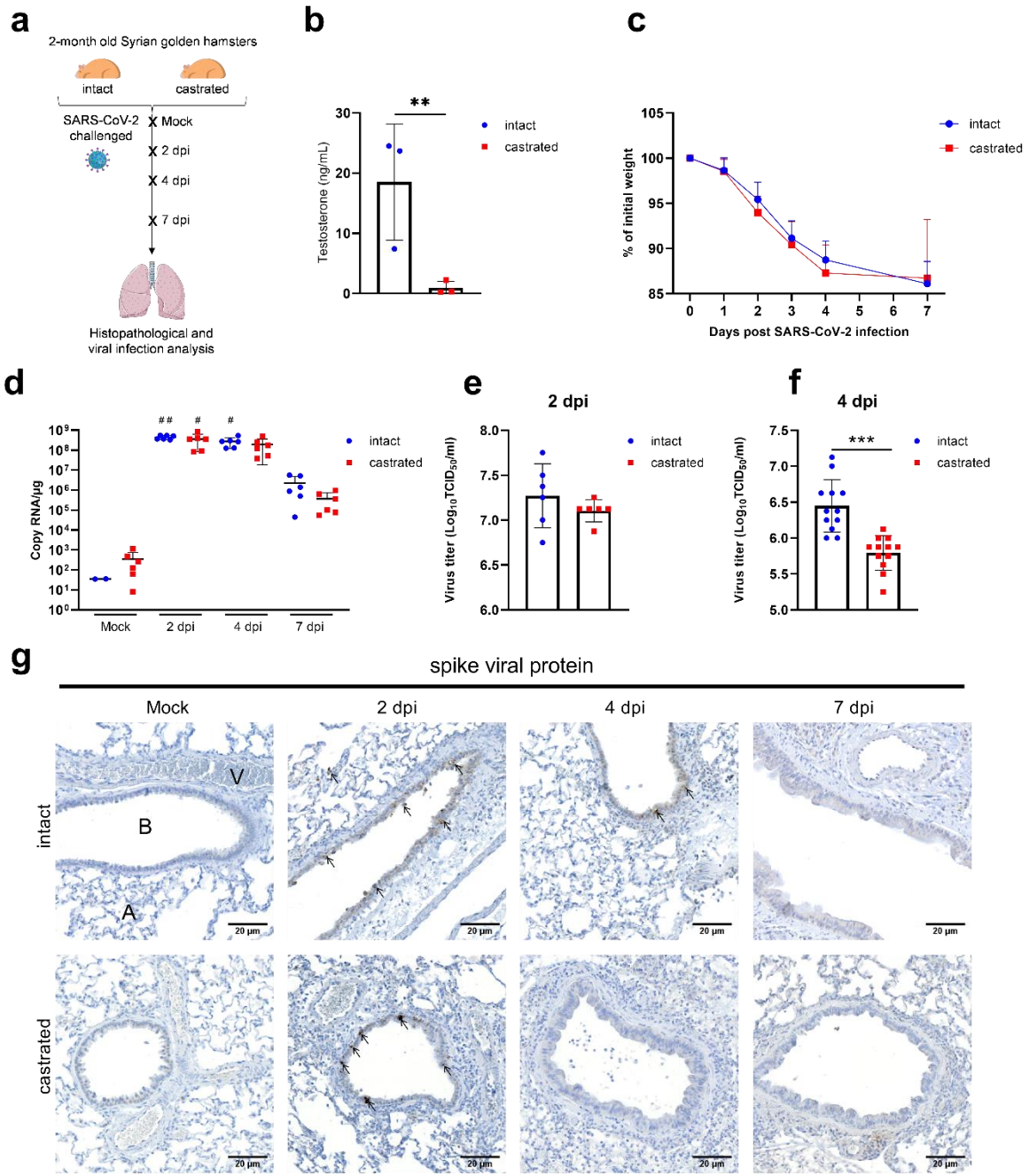


Fig.3 Lack of androgens reduces the duration of infection *in vivo*. **a** Experimental strategy to identify the role of androgens in mediating SARS-CoV-2 infection utilizing Syrian golden hamster models. **b** Testosterone measurement by ELISA in mock intact and castrated hamster sera. Statistical significance was determined by unpaired t-test (** $P < 0.01$). **c** The percentage of body weight post SARS-CoV-2 infection in initial body weight biologically independent hamster for intact group and castrated group. **d** Quantification of SARS-CoV-2 envelope E protein transcript levels in the lungs was quantified by RT-PCR. Data are expressed in copy number/ μg . Results are expressed as the mean \pm SD. Statistical significance with mock intact was determined by one-way ANOVA with a Kruskal-Wallis' multiple comparison test ($\#P < 0.05$, $\#\#P < 0.01$) **e, f** Determination of infectious viral loads in the lungs of intact and castrated hamsters on day 2 (2 dpi) (**e**) and day 4 (4 dpi) (**f**) post-infection (dpi). Data are expressed as the number of infectious virus particles per lung. Statistical significance was determined by unpaired t-test ($***P < 0.001$) **g** Spike viral protein IHC staining for lungs of intact and castrated hamsters mock or SARS-CoV-2 challenge at 2, 4 and 7 dpi. A: Alveoli, B: Bronchi, V: Blood vessel.

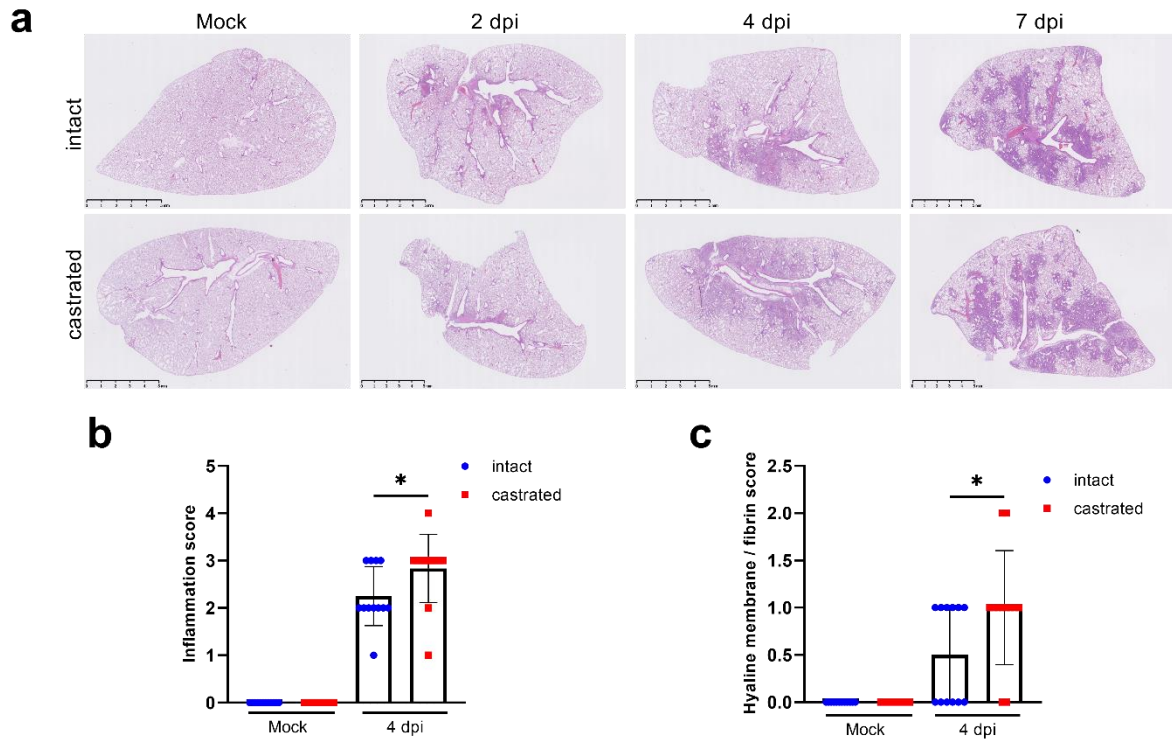


Fig.4 Histopathological examination of lung sections of mock and infected hamsters. a Representative images of lungs from mock and SARS-CoV-2-infected hamsters at 2, 4 and 7 dpi (hematoxylin and eosin staining). **b,c** Blinded sections were scored for levels of pathological severity. To evaluate comprehensive histological changes, lung tissue sections were scored for inflammation (**b**) and hyaline membrane/fibrin (**c**) criteria. Only mock and 4 dpi are shown. The following scoring system was used: 0: no pathological change; 1: 1-10% of lung section, 2: 11-25% of lung section; 3: 26-50% and 4: > 50% of lung section affected. Significant differences were determined using the Tukey's multiple comparison ANOVA test (* $P < 0.05$).

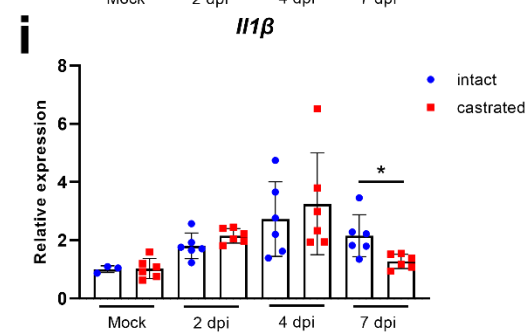
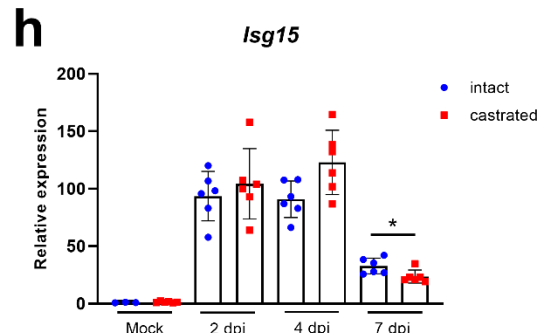
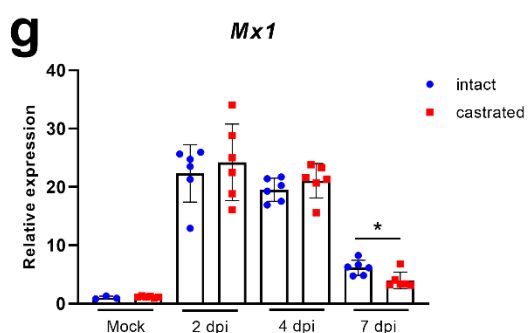
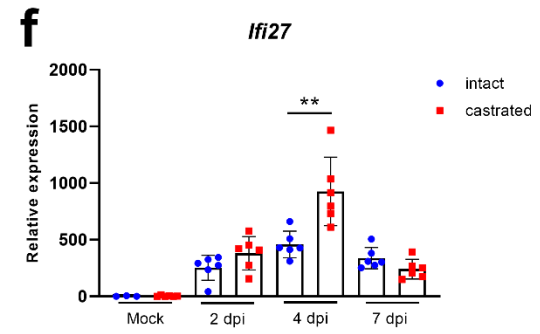
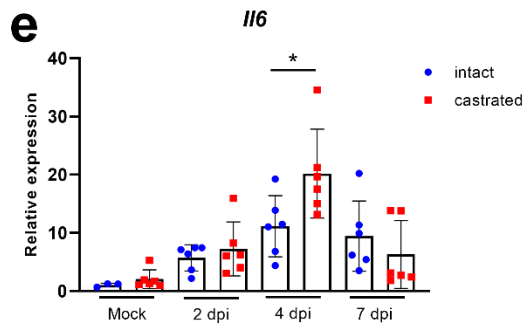
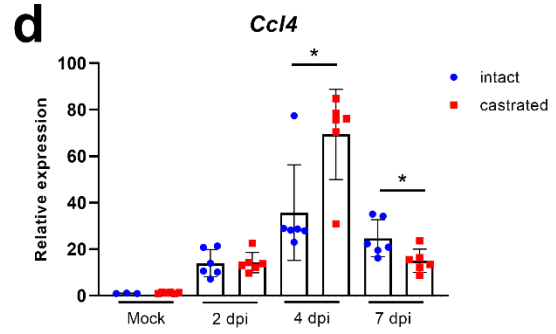
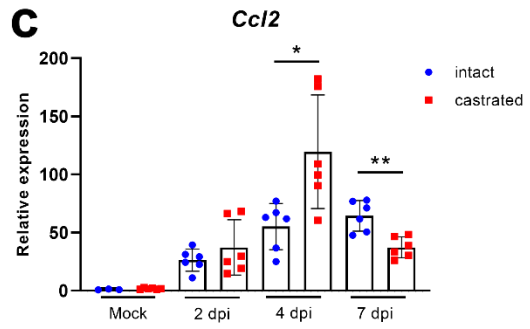
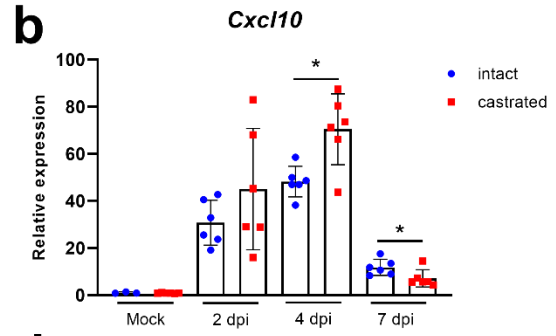
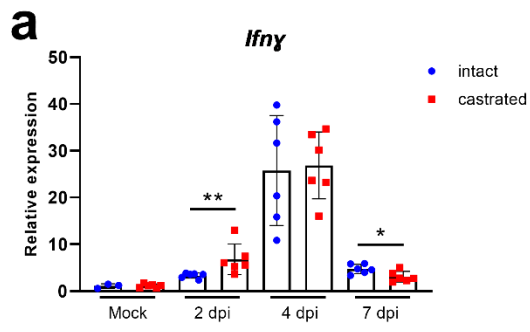


Fig.5 Kinetics of inflammation-related gene expression during SARS-CoV-2 infection. a-i qRT-PCR analyses on mRNA expression of *Ifny* (a), *Cxcl10* (b), *Ccl2* (c), *Ccl4* (d), *Il-6* (e), *Ifi27* (f), *Mx1* (g), *Isg15* (h) and *Il-1 β* (i) in the lungs of intact (blue) and castrated (red) hamsters mock or challenged by SARS-CoV-2 at 2, 4 and 7 dpi. Significant differences were determined using Mann-Whitney test (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$).

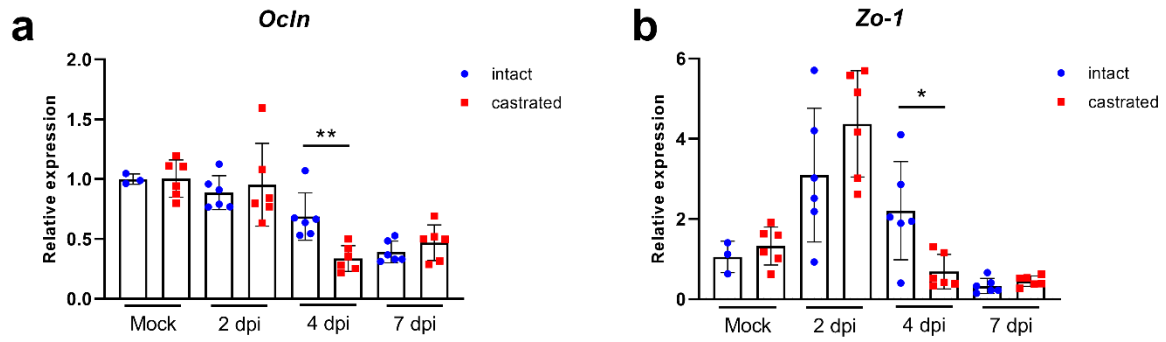


Fig.6 Kinetics of tissue integrity-related gene expression during SARS-CoV-2 infection. **a, b** qRT-PCR analyses on mRNA expression of *Ocln* (**a**), *Zo-1* (**b**), in the lungs of intact (blue) and castrated (red) hamsters mock or challenged by SARS-CoV-2 at 2, 4 and 7 dpi. Significant differences were determined using Mann-Whitney test (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$).

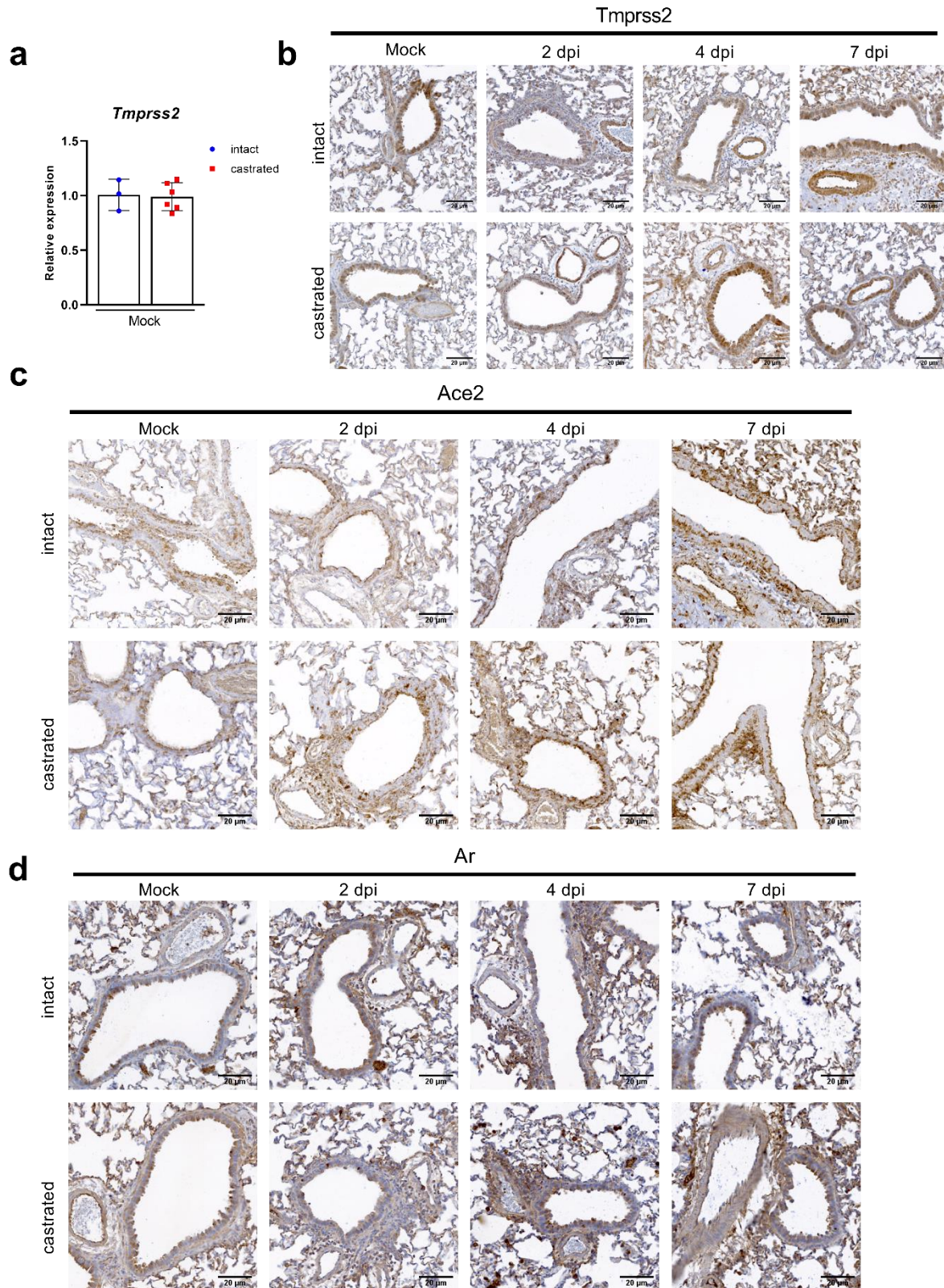
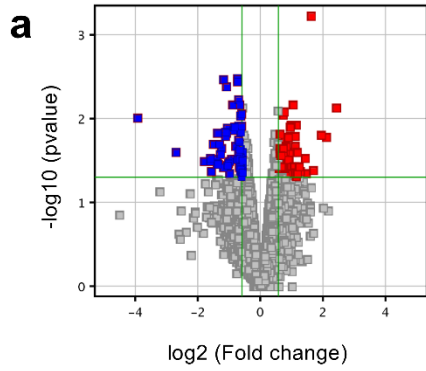


Fig.7 *Tmprss2* is not an androgen-regulated gene in lungs of Syrian golden hamsters. a qRT-PCR analyses on mRNA expression of *Tmprss2* in the lungs of intact and castrated mock hamsters. **b-d** *Tmprss2* (**b**), *Ace2* (**c**) and *Ar* (**d**) protein IHC staining for lungs of intact and castrated hamsters mock or SARS-CoV-2 challenged at 2, 4 and 7 dpi.



74 up-regulated genes

94 down-regulated genes

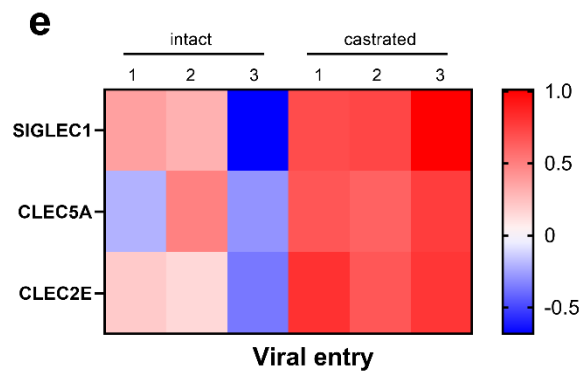
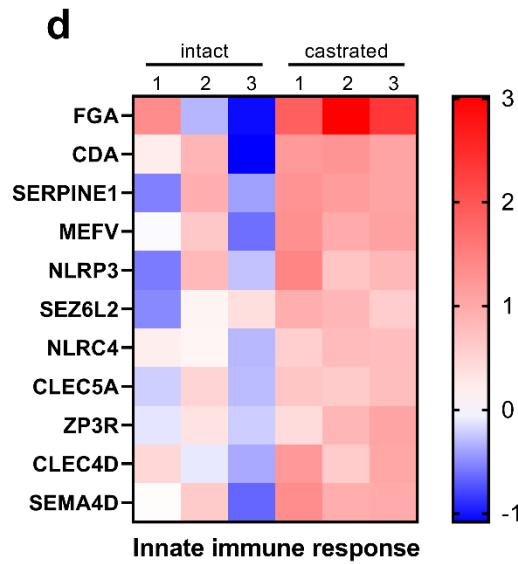
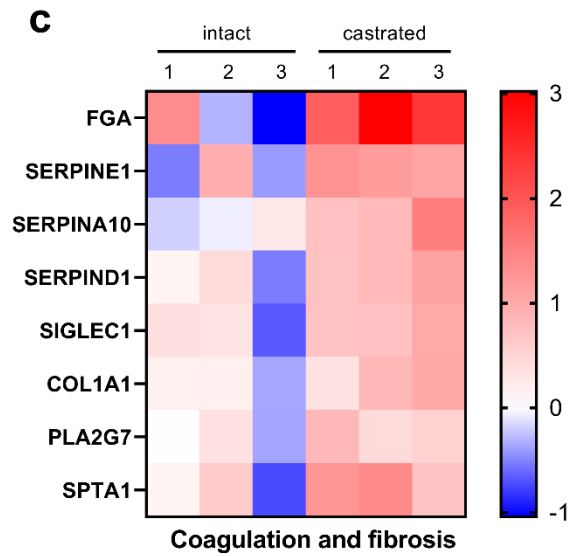
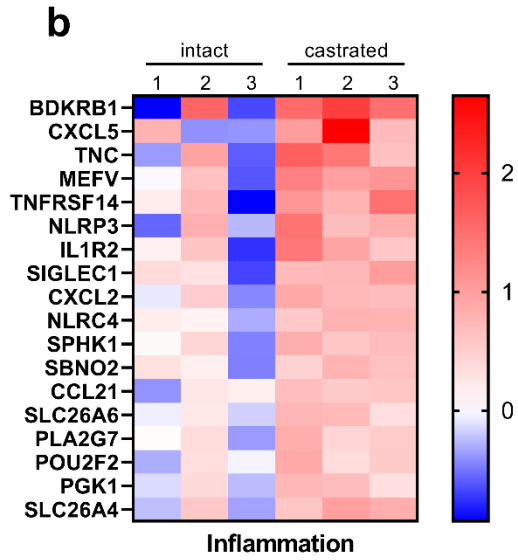


Fig.8 Castration results in a modification of inflammation related gene expression in lungs. **a** Volcano plot representation of transcriptomic data generated from whole lung tissues collected from intact hamsters and castrated hamsters challenged by SARS-CoV-2 at 4 dpi using hamster custom Agilent microarrays (n = 3). The x-axis represents the log₂ fold change of differentially expressed genes (DEG) comparing intact and castrated lungs, the y-axis the log₁₀ (FDR). Significant differentially expressed genes in castrated lungs with fold change > 1.5 and q-value < 0.01 are colored in red for up-regulated genes and in blue for down-regulated genes. **b-e** Heatmap showing significantly modulated genes related to “inflammation” (**b**), “coagulation and fibrosis” (**c**), “innate immune response” (**d**) and “viral entry” (**e**). Genes with the highest altered fold expression are shown. The log₂ expression range values are indicated by color scale.

		Prostate cancer (n=26)	Colorectal cancer (n=63)
Clinical characteristics before COVID-19 diagnosis			
Age	Mean (SD)	75.15 (8.07)	70.87 (11.93)
Obesity (BMI ≥ 30)	n	23	58
	Oui	6 (26.1%)	7 (12.1%)
	Non	17 (73.9%)	51 (87.9%)
ECOG-PS	n	20	59
	OMS 0-1	11 (55.0%)	36 (61.0%)
	OMS >1	9 (45.0%)	23 (39.0%)
Updated Charlson comorbidity index	n	20	55
	0-3	2 (10.0%)	3 (5.5%)
	>4	18 (90.0%)	52 (94.5%)
Clinical outcome and consequences of COVID-19			
Symptoms	No symptoms	2 (7.7%)	7 (11.1%)
	One or more symptoms	24 (92.3%)	56 (88.9%)
Admission to hospital	Yes	19 (79.2%)	44 (77.2%)
	No	5 (20.8%)	13 (22.8%)
	n	19	44
Admission to ICU	Yes	1 (5.3%)	7 (15.9%)
	No	18 (94.7%)	37 (84.1%)
	n	23	55
Oxygen therapy	Yes	3 (13.0%)	8 (14.5%)
	No	20 (87.0%)	47 (85.5%)
	n	23	55
Mechanical ventilation	Yes	19 (82.6%)	53 (96.4%)
	No	4 (17.4%)	2 (3.6%)
	n	24	59
Death	Yes	8 (33.3%)	20 (33.9%)
	No	16 (66.7%)	39 (66.1%)
	n	23	55
Pneumonia on CT-scan	Yes	9 (39.1%)	28 (50.9%)
	No	14 (60.9%)	27 (49.1%)
	n	23	55
	% affected lung parenchyma Mean (SD)	44.17 (24.38)	39.12 (20.48)

Table 1 Baseline patient characteristics and clinical outcomes of COVID-19 illness among prostate cancer patients receiving ADT compared with colorectal cancer patients. SD: standard deviation; ECOG-PS: Eastern Cooperative Oncology Group performance status; Updated Charlson comorbidity index: comorbidity index; ICU: intensive care unit; CT: computed tomography

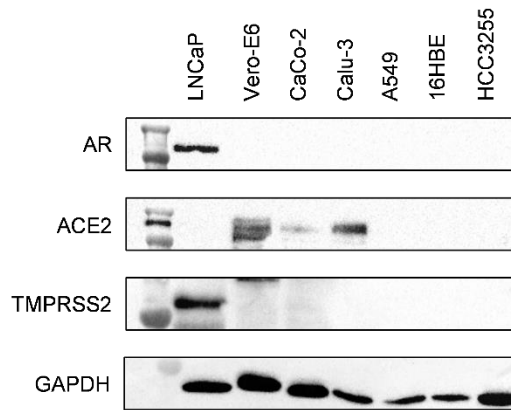
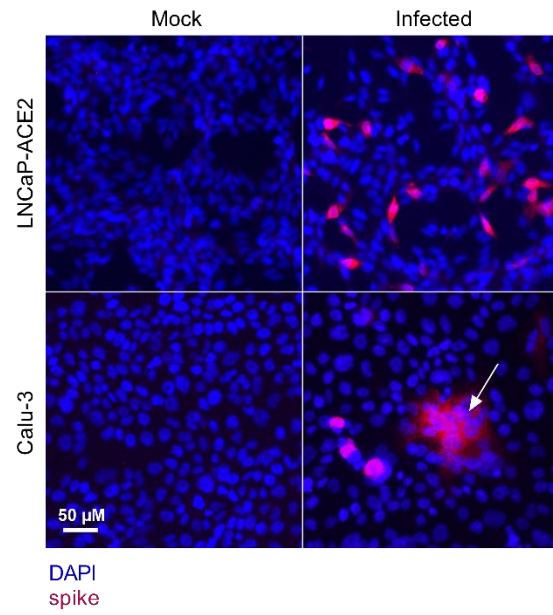
a**b**

Fig.S1 a Immunoblot showing the expression of ACE2, AR and TMPRSS2 in indicated cell lines. GAPDH was used as the loading control. **b** Immunofluorescence of spike viral protein in LNCaP-ACE2 and Calu-3 cells infected or not with SARS-CoV-2. Nuclei are stained with DAPI.

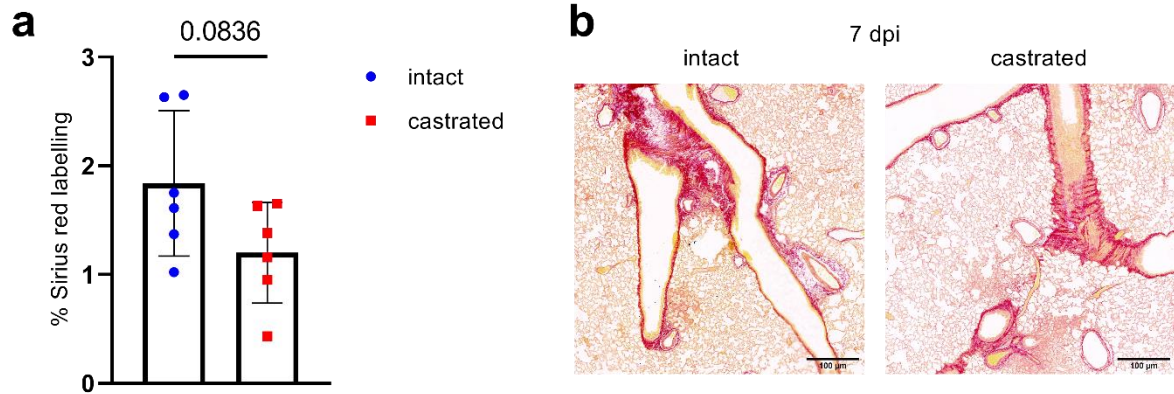


Fig.S2 Detection of fibrosis in the lungs following SARS-CoV-2 infection. a Percentage of Sirius Red labelling in the lungs of intact hamsters and castrated hamsters at 7 dpi. Statistical significance was determined by unpaired t-test ($*P < 0.05$) **b** Representative pictures of the Sirius Red labelling in lung.

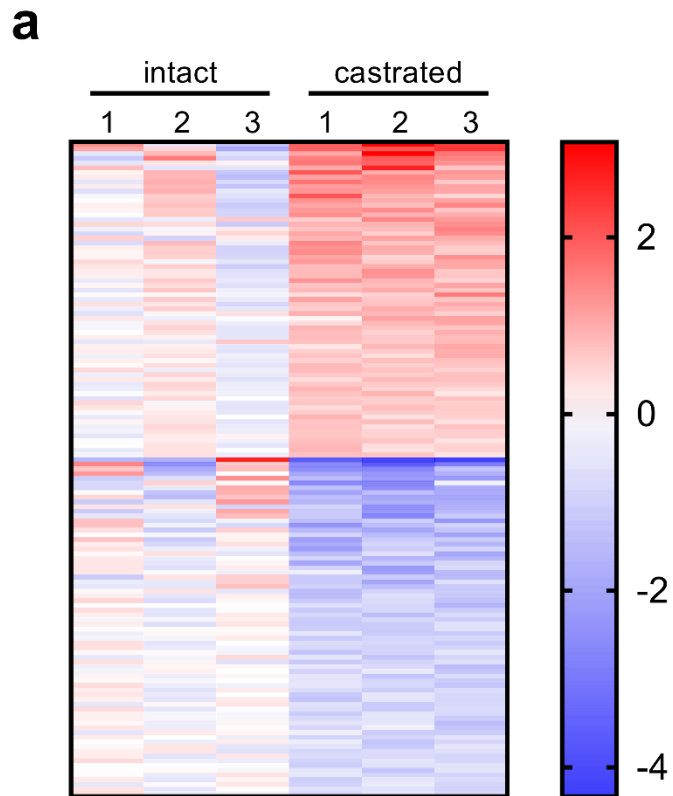


Fig.S3 Overall transcriptomic results. a Heatmap showing all significantly modulated genes between lungs of intact and castrated hamsters SARS-CoV-2 challenged at 4 dpi. The log₂ expression range values are indicated by color scale.

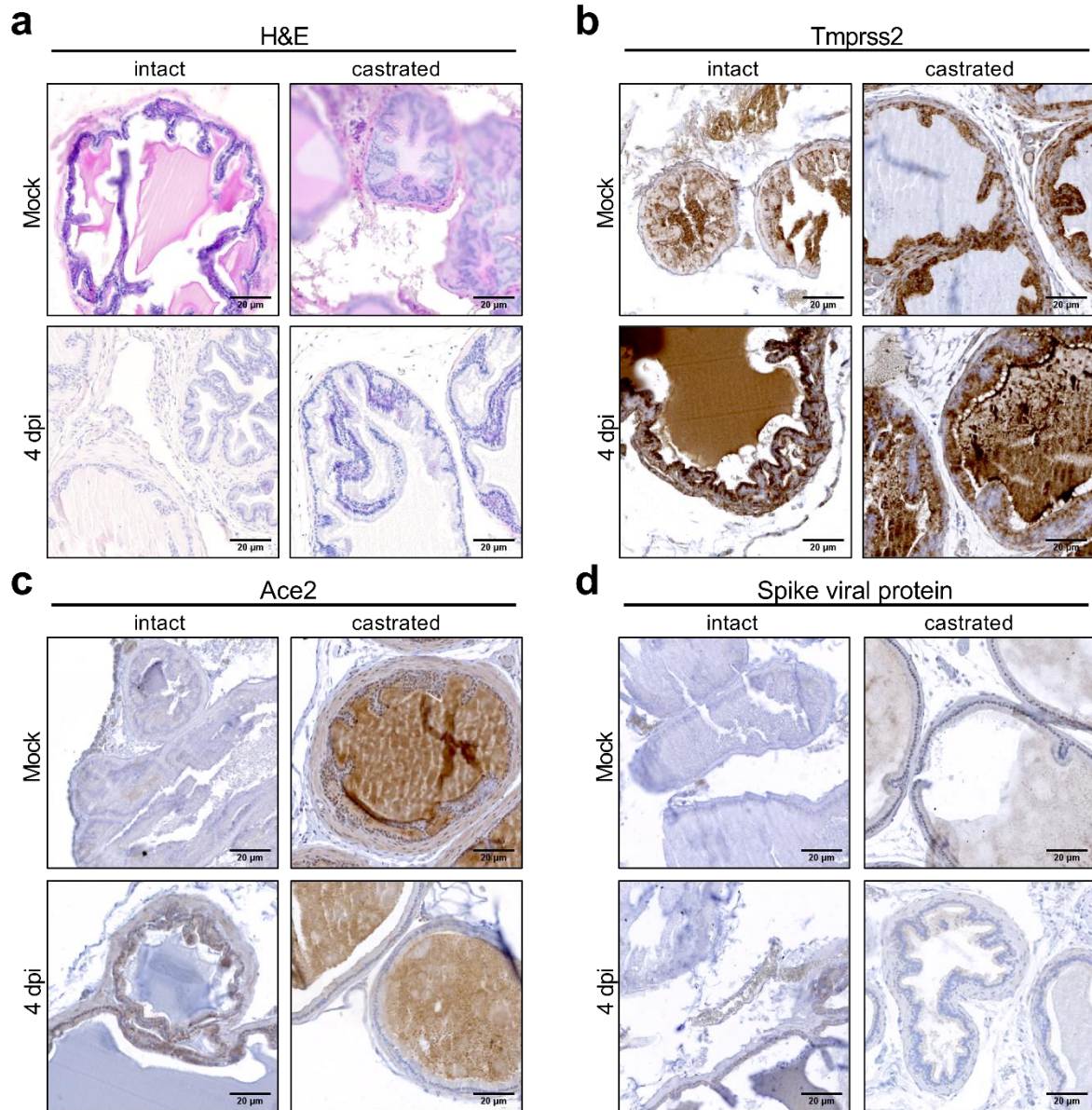


Fig.S4 Prostate is not permissive to SARS-CoV-2. a-d Hematoxylin eosin staining (H&E) (a), Tmprss2 (b) Ace2 (c) and Spike viral (d) protein IHC staining in prostate of intact and castrated hamsters mock or SARS-CoV-2 challenged at 4 dpi.

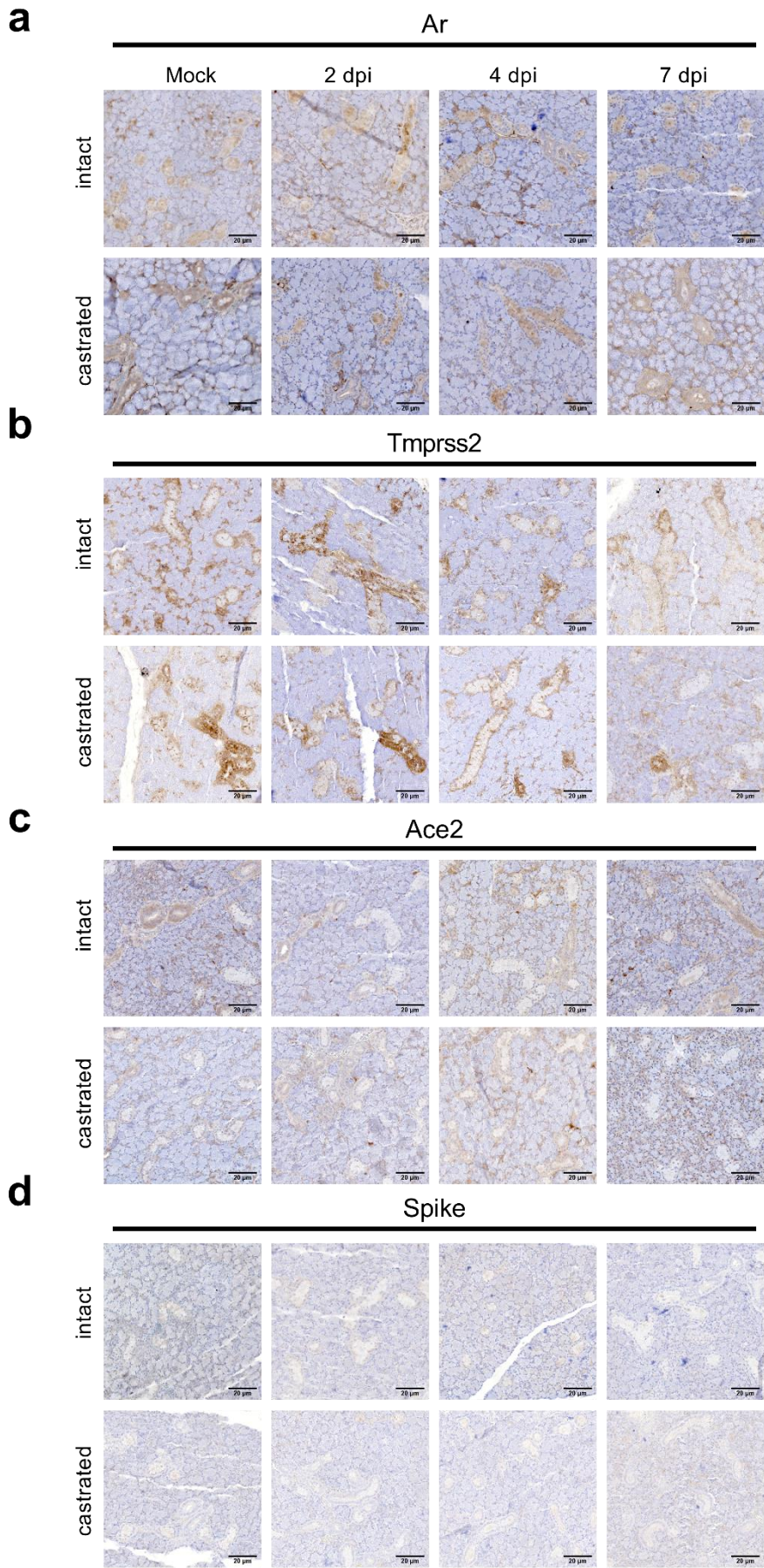


Fig.S5 Salivary gland is not permissive despite the expression of SARS-CoV-2 receptors. a-d Ar (a), Tmprss2 (b) Ace2 (c) and Spike viral (d) protein IHC staining in salivary glands of intact and castrated hamsters mock or SARS-CoV-2 challenged at 2, 4 and 7 dpi.

Primer sequence (5' -> 3')

	Gene name	Forward	Reverse
<i>in vitro</i>	<i>ACE2</i>	GGCTCTTCAGCAAAATGGGT	AGCCCAGAGCCTCTCATTGT
	<i>GAPDH</i>	CTCCTGGAAGATGGTGATGG	AAGGTCGGAGTCAACGGATT
	<i>L32</i>	CAAGGAGCTGGAAGTGCTGC	CAGCTCTTTCCACGATGGCT
	<i>PSA</i>	AGGTCCATGACCTTCACAGC	CACAGCCTGTTTCATCCTGA
	<i>TMPRSS2</i>	TGAAGTTTGGTCCGTAGAGGC	ACTCTGGAAGTTCATGGGCAG
<i>in vivo</i>	<i>Ace2</i>	CTGGGAAACTCCATGCTG	GAACGATCTCTCGCTTCATCT
	<i>B2m</i>	TGGCCGTGGTCTTTCTGATG	TGGAAGTGCACACATAGCA
	<i>Ccl2</i>	TGCTAACTTGACGCAAGCTCC	AAGTTCTTGAGTCTGCGGTGG
	<i>Ccl4</i>	CTCTGCCATGCTTTTGTGCC	ATCAGCCCATCTCACCACAG
	<i>Cxcl10</i>	TACGTCGGCCTATGGCTACT	TTGGGGACTCTTGCTCACTGG
	<i>Fga</i>	TGAGAGGGGACTTCGCCAAT	CCTGTTCAAGCTGCTTTTGTCT
	<i>γ-actin</i>	ACAGAGAGAAGATGACGCAGATAATG	GCCTGAATGGCCACGTACA
	<i>Ifi27</i>	TCGTTGCTGCTCCCGTAGTC	ATGGATCCCGCTGCAATTC
	<i>Ifny</i>	TGTTGCTCTGCCTCACTCAGG	AAGACGAGGTCCCCTCCATTC
	<i>Il1β</i>	GAAGTCAAACCAAGGTGGAGTTT	TCTGCTTGAGAGGTGCTGATGT
	<i>Il6</i>	CCATGAGGTCTACTCGGCAAA	GACCACAGTGAATGTCCACAGATC
	<i>Isg15</i>	CTGGTGCCCCTGACTAACTC	CTGTCATTCCGCACCAGGAT
	<i>Lilrb3</i>	GTCTCAAGGCAACGACATCAC	GGGGCTTCCTGAGGAGATCA
	<i>Mefv</i>	ATCCTCAGGGCCACTAACCA	GCTGGGAACTGGGTGTTGAT
	<i>Mx1</i>	GGTATCGTTACCAGGTGCC	GGTCTGGAACACTTGGGGAG
	<i>Nlrp3</i>	ATGCCAGTGTGGACCTAAGC	CTGGCACACGACAGTGAGAT
	<i>Ocln</i>	GTGGCTTCACACTTGCTTG	GCCACTTCCTGCATAAGGGT
	<i>SerpinE1</i>	CCGATGGCCACTACTACGAC	AGACTTGTGAAGTCGGCCTG
	<i>Siglec1</i>	CACTGGGGTCAACCTCTG	CTACAGTCGAGGATGCCCTG
	<i>Tmprss2</i>	GGGCTACGAGCTTTATGAAGC	GGACGAACAGGAGTCACTGTG
	<i>Tnfrsf14</i>	GAATGTCTGCCCTGGACCAA	ATGCCAACCTCGGTAAGTCTG
	<i>Zo1</i>	CTCCTGCCGCTCAAAGGA	CGCCGGAAGTAGCACCATTA

Table S1 Primers used in quantitative RT-PCR

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

I. Discussion

Le but principal de notre projet est d'évaluer l'impact et le degré d'importance des androgènes dans l'infection au SARS-CoV-2 et le développement de la COVID-19. Notre but est d'apporter une explication, même partielle, à la différence de sévérité de la COVID-19 observée entre les hommes et les femmes.

A. Nouvelle lignée infectable et modulable par les androgènes

Dans notre étude, nous avons choisi de créer la lignée cancéreuse prostatique LNCaP surexprimant de manière stable la protéine ACE2. Notre choix de modèle d'étude *in vitro* était contraint par 2 paramètres. D'une part, les cellules devaient être hormono-sensibles, et donc exprimer AR, afin de pouvoir répondre aux différents traitements hormonaux, d'autre part être infectables au SARS-CoV-2, ce qui requiert la protéine ACE2. Notre étude sur différentes lignées a montré que les protéines ACE2 et AR ne sont jamais co-exprimées. Les lignées cancéreuses, dont font parties les LNCaP, sont hormonodépendantes mais n'expriment pas ACE2, de ce fait elles ne sont pas infectables au SARS-CoV-2. En effet, les lignées connues pour être infectées par le virus et largement utilisées dans la littérature, les Vero-E6, les Calu-3 et les CaCo-2, n'expriment pas le récepteur des androgènes et sont donc hormono-indépendantes (Hoffmann et al. 2020b; Matsuyama et al. 2020). De manière surprenante et contre-intuitive, nous avons montré que peu de lignées pulmonaires expriment la protéine ACE2 et de ce fait ne sont pas infectables par le SARS-CoV-2. C'est dans ce contexte que nous avons choisi la lignée LNCaP, hormono-dépendante, et avons entrepris d'exprimer de manière stable la protéine ACE2 pour que cette étape ne soit pas limitante dans notre étude. Nous l'avons infectée avec un lentivirus codant pour la protéine ACE2. Afin d'obtenir plusieurs modèles d'étude, nous avons voulu appliquer cette démarche dans d'autres lignées hormono-dépendantes. Ainsi, les cellules VCaP ont été infectées avec le lentivirus ACE2. Malgré une forte détection du transcrit ACE2 par RTqPCR, la protéine n'est pas détectée, que ce soit en western blot ou en immunofluorescence, ce qui ne permet pas d'utiliser ce modèle. Par ailleurs, nous avons reproduit la même démarche dans la lignée PC3-AR (transmise par le Dr Virginie Vlaeminck-Guillem), lignée établie pour exprimer stablement AR, mais là encore la protéine ACE2 n'est pas détectée. C'est pourquoi nos résultats obtenus *in*

in vitro n'ont pu être validés dans une seconde lignée, constituant ainsi une limite à nos résultats.

Grâce au modèle cellulaire établi (LNCaP-ACE2), nous avons montré une implication de la modulation de *TMPRSS2* par les androgènes sur le taux d'infection au SARS-CoV-2 *in vitro* (test réalisé en collaboration avec le Dr Sandrine Belouzard). En effet, l'ajout d'androgènes augmente l'expression de *TMPRSS2* et aussi la capacité d'internalisation du virus conduisant à une infection virale plus importante.

Ainsi, nous confirmons le caractère indispensable de ACE2 et l'importance de *TMPRSS2* dans l'entrée du SARS-CoV-2 dans la cellule hôte (Hoffmann et al. 2020b; Essalmani et al. 2022). Par ailleurs, le modèle LNCaP-ACE2 constitue un nouveau modèle à infection modulable et, compte tenu de la rareté des modèles cellulaires infectables, pourrait représenter un intérêt pour la recherche pharmacologique dans le contexte du traitement de la COVID-19.

B. *In vivo*, les androgènes participent au développement de la COVID-19

L'étude de l'infection virale au SARS-CoV-2 *in vivo* a demandé le choix de nouveaux modèles animaux. Le choix s'est porté sur le hamster syrien doré. En effet, la souris exprime une protéine ACE2 trop différente de celle exprimée par l'homme et n'est pas reconnue par la protéine spike du virus. Pour pallier à ce point, des souris transgéniques ont été créées afin d'exprimer la protéine ACE2 humaine, de manière ubiquitaire ou spécifiquement dans le poumon. Ce modèle a cependant le désavantage de ne pas reproduire la maladie observée chez l'homme (Rathnasinghe et al. 2020).

Le hamster syrien doré, quant à lui, exprime une protéine ACE2 très similaire à la protéine humaine. Il s'infecte donc naturellement et développe une forme modérée à sévère selon la dose virale inoculée. Ce modèle, largement décrit dans la littérature, est privilégié dans le contexte d'étude du SARS-CoV-2 chez le petit animal (Chan et al. 2020b; Imai et al. 2020; Sia et al. 2020). Cependant, il présente également des limites et des inconvénients. En effet, les outils moléculaires sont moins développés que ceux destinés aux recherches sur la souris, ils nécessitent donc d'être adaptés au hamster puis validés. C'est par exemple le cas des oligonucléotides pour les RTqPCR et des anticorps pour l'immunohistochimie. Les connaissances sont également moins

importantes et les bases de données moins renseignées concernant le génome et le protéome.

Dans le cadre de notre étude nous avons collaboré avec l'équipe du Dr François Trottein qui a mis au point le modèle du hamster syrien doré. Nos recherches se sont intégrées dans une étude plus globale puisque leur équipe travaille sur l'impact de différents facteurs, comme le microbiote, l'âge ou encore le tissu gras, dans l'infection virale au SARS-CoV-2. Ainsi, nous avons pu profiter de l'expertise et des compétences de leur équipe sur le hamster mais également apporter à leurs projets notre propre expertise dans l'analyse histologique.

Ce modèle a donc été exploité dans des études réalisées par nos collaborateurs et auxquelles nous avons participé. Les publications supplémentaires, fruit de cette collaboration, nous ont permis d'évaluer d'autres critères de susceptibilité face à la COVID-19. L'âge fait partie des critères de susceptibilité les plus importants sans toutefois comprendre l'ensemble des mécanismes qui régissent cette observation (Bialek et al. 2020). Nous avons pu mettre en évidence que cette susceptibilité passait par des mécanismes de réparation des dommages induits par l'infection virale moins efficaces chez les individus âgés. D'une part les hamsters âgés infectés par le SARS-CoV-2 présentent une accumulation de cellules sénescents et persistantes dans le poumon (article 2 en révision résumé en annexe), d'autres part ces animaux montrent des dommages persistants spécifiques dans le tissu adipeux blanc (article 3 en révision résumé en annexe).

En ce qui concerne notre étude, nos résultats obtenus chez le hamster mettent également en lumière le rôle des androgènes dans l'infection au SARS-CoV-2, mais par un effet qui n'est pas dépendant de TMPRSS2. L'expression pulmonaire de TMPRSS2 n'est pas modifiée entre les animaux intacts et les animaux castrés. Toutefois nous avons mis en évidence une différence de cinétique d'infection et de réponse inflammatoire (Figure 13). Le virus est éliminé plus rapidement chez les hamsters sous suppression androgénique. Ce décalage de cinétique s'observe à l'échelle moléculaire par le dosage des cytokines mais également à l'échelle phénotypique visible par analyse histopathologique (Figure 13).

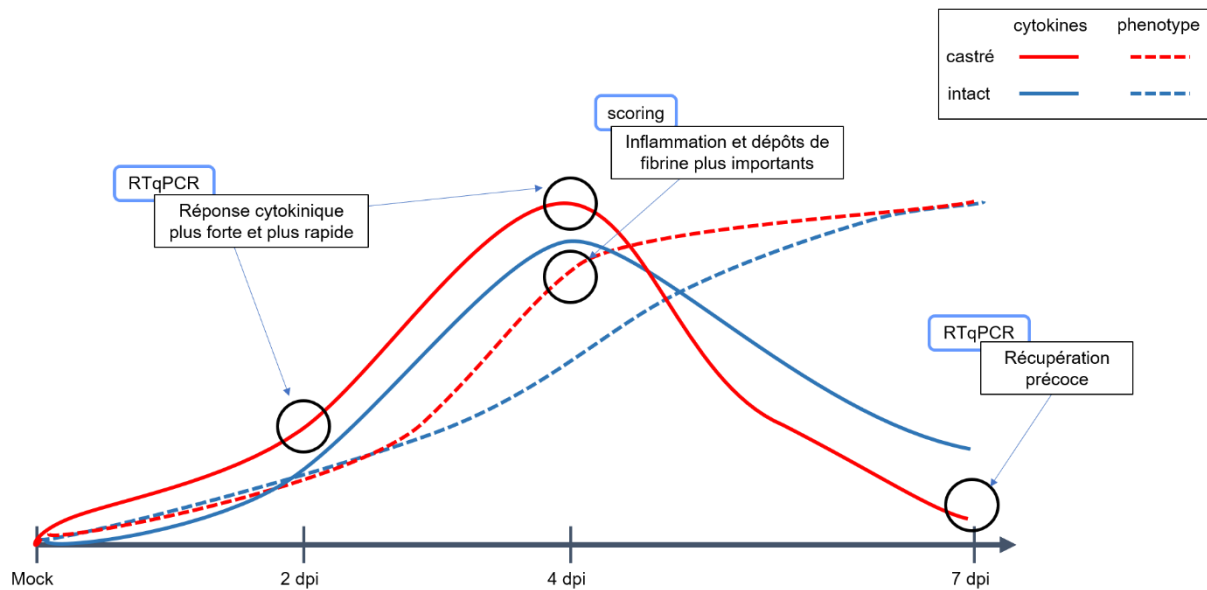


Figure 13 : Schéma récapitulatif du suivi des cytokines et du phénotype au cours de l'infection chez les hamsters intacts et castrés.

La clairance virale, ou tout au moins le contrôle de l'infection virale, dans les temps précoces de l'infection est réalisé par les cellules du système immunitaire inné. Parmi ces cellules, les cellules Natural Killer (NK) décrites pour être capables de lyser les cellules infectées et participent donc à l'élimination du virus au sein des tissus infectés (Vivier et al. 2008; Narni-Mancinelli et al. 2013). De multiples études ont montré que le récepteur des androgènes impacte l'activité des cellules NK via la régulation transcriptionnelle de gènes impliqués dans la modulation des cellules NK (Shi et al. 2016; Tang et al. 2020, 2022; Liu et al. 2022). Deux études montrent que l'activation par son hormone de AR induit la transcription du gène codant PD-L1 qui diminue l'activité des cellules NK (Liu et al. 2022; Tang et al. 2022). Une autre équipe montre la régulation positive par AR du gène codant pour la protéine LLT1 qui est un ligand inhibiteur des cellules NK (Tang et al. 2020). Enfin, un dernier mécanisme de régulation négative de l'activité des cellules NK par AR a été étudié. Dans ce dernier, AR inhibe directement la transcription du gène *IL12A* qui code une sous-unité de l'IL-12, activatrice des cellules NK. Dans toutes ces recherches, AR diminue l'activité des cellules NK. La diminution de l'activité de AR augmente donc les capacités cytotoxiques des cellules NK. Ces résultats corrént avec les nôtres étant donné que les hamsters castrés ont une clairance virale plus rapide. Les cellules NK chez ses animaux présentent probablement une activité supérieure à celle des animaux intacts. Pour le vérifier, nous pourrions réaliser un marquage immunohistochimique des cellules NK, en ciblant des marqueurs spécifiques de ces cellules comme NKp46.

C. Chez l'homme, les traitements anti-androgéniques des patients atteints de cancer de la prostate métastatique sont associés à une moindre sévérité de la COVID-19

Afin d'obtenir des données sur l'implication des androgènes dans le développement de la COVID-19 chez l'homme, en particulier atteint d'un cancer, nous avons exploité la cohorte nationale multicentrique CACOV-19, établie par les groupes coopérateurs en oncologie lors de la première vague de COVID-19. Cette cohorte a permis de collecter les données de nombreux patients atteints d'un cancer et touchés par la COVID-19. Dans notre étude, cette cohorte a eu un grand intérêt puisque parmi ces patients figurent des personnes atteintes d'un cancer de la prostate au stade métastatique et traitées par thérapie anti-androgénique. Nous avons ainsi pu évaluer le degré de sévérité de l'infection par le SARS-CoV-2 chez ces patients. Ces données ont été comparées avec celles de patients avec un cancer du côlon au stade métastatique puisque c'est un cancer au développement et au pronostic similaire. Les deux groupes ont donc un score de comorbidité similaire. Après appariement des groupes, les résultats indiquent que le groupe sous thérapie anti-androgénique nécessite moins d'admission en soins intensifs ou réanimation, de ventilation artificielle et présente moins de pneumopathie évocatrice au scanner. Ainsi, les données recueillies semblent montrer une moindre sévérité chez les patients avec un cancer de la prostate traité par hormonothérapie. Ces points concordent avec un aspect que l'on pourrait qualifier de protecteur de la thérapie anti-androgénique, au minima, il n'y a pas d'aggravation de la COVID-19 avec l'hormonothérapie. Les données fournies sont valables à un temps donné et ne permettent pas d'appréhender l'aspect cinétique que l'on a pu avoir chez le hamster. En effet, nous n'avons pas de données sur la durée d'hospitalisation, permettant d'établir une vitesse de récupération, ni sur les paramètres biologiques tels que des dosages cytokiniques. Bien que cette étude soit qualitative et non quantitative, elle apporte des données supplémentaires qui s'ajoutent à l'approche expérimentale réalisée chez le hamster et renforce nos résultats quant au rôle des androgènes dans le développement de la COVID-19.

D. Mise en perspective de nos résultats avec ceux publiés depuis 2020

Il est important de noter que, très rapidement après l'émergence du SARS-CoV-2, beaucoup d'études ont rapidement été publiées. En effet, une partie de la communauté

scientifique s'est concentrée sur la description du SARS-CoV-2 et le décryptage des mécanismes qui régissent l'infection à ce virus. Ces recherches étaient indispensables pour adapter la prise en charge et identifier des traitements, mais ont généré de nombreuses données de manière exceptionnellement rapide.

La problématique que nous avons posée a également été abordée par d'autres équipes, suivant une approche identique ou différente, et par l'utilisation de modèles distincts ou similaires. Nous avons choisi de confronter les résultats obtenus dans ces études avec les nôtres. La comparaison a été résumée dans le tableau 7.

Premièrement, en ce qui concerne les modèles cellulaires, toutes les études utilisent les LNCaP du fait de leur hormono-dépendance. Mais la plupart d'entre elles montrent une expression de la protéine ACE2 dans les LNCaP, ce que nous n'avons pas détecté, tout comme l'étude de Li et al. (Baratchian et al. 2021; Deng et al. 2021; Leach et al. 2021; Li et al. 2021a). Des résultats démontrent également la régulation de *ACE2*, en plus de *TMPRSS2*, par les androgènes dans les lignées prostatiques et pulmonaires (Baratchian et al. 2021; Deng et al. 2021; Leach et al. 2021). Que ce soit avec ou sans ajout d'un lentivirus codant ACE2, toutes les études concordent à mettre en évidence la modulation de l'infection par les androgènes dans la lignée LNCaP. Certaines obtiennent des résultats similaires dans des lignées pulmonaires comme les A549, alors que de notre côté nous n'y détectons pas AR (Deng et al. 2021; Leach et al. 2021). En ce qui concerne le modèle animal, toutes les études publiées utilisent la souris. Dans le cas des souris non infectables, les auteurs étudient uniquement l'hormonorégulation de *TMPRSS2* dans le poumon et non son impact sur l'infection au SARS-CoV-2 (Baratchian et al. 2021; Deng et al. 2021; Leach et al. 2021). Une seule étude repose sur un modèle de souris infectable grâce à la modification génétique par intégration d'un vecteur ACE2 (Li et al. 2021a). Les résultats obtenus dans toutes ces études sont assez hétérogènes, puisque une étude conclut à une régulation par les androgènes de *ACE2* et non de *TMPRSS2*, une autre conclut l'inverse, et une autre encore aucun des deux gènes (Baratchian et al. 2021; Deng et al. 2021; Leach et al. 2021; Li et al. 2021a). Nos résultats concordent avec l'étude de Li et al. puisque nous avons montré l'absence de différence d'expression pulmonaire de ACE2 et TMPRSS2 entre les hamsters castrés et intacts. Toutefois dans leur étude, la castration n'a aucun impact sur l'infection virale, en termes de niveau d'infection, d'expression de cytokines ou de phénotype. Cependant tous ces résultats sont obtenus à 3 jours post-infection

(Li et al. 2021a). Toute l'originalité de nos recherches repose sur le suivi de l'infection et du phénotype associé au cours du temps, entre 2 et 7 jours post-infection. Cette cinétique est cruciale pour véritablement comprendre le rôle des androgènes dans le développement de la COVID-19 et nous permet d'attirer l'attention sur la nécessité d'un suivi de l'évolution de la maladie et d'identifier des marqueurs précoces de sévérité de la COVID-19.

Tableau 7 : Résultats de la revue de la littérature pour confrontation des résultats obtenus dans notre étude

		Référence				
		Notre étude	(Leach et al. 2021)	(Baratchian et al. 2021)	(Deng et al. 2021)	(Li et al. 2021a)
<i>In vitro</i>						
Modèle		LNCaP-ACE2 (prostate) Vero-E6 (rein primate) CaCo-2 (colon) Calu-3 (poumon) A549 (poumon) 16HBE (poumon) H3255 (poumon)	LNCaP A549 H1944 (poumon) BEAS-2B (poumon)	LNCaP	LNCaP H460 (poumon)	LNCaP-ACE2 VCaP-ACE2 (prostate) Organoïdes pulmonaires humains A549 Calu-3 H1437 (poumon) H2126 (poumon)
Régulation par les androgènes	<i>TMPRSS2</i>	Oui : lignée prostatique	Oui	Oui	Oui	Oui : lignées prostatiques Non : lignées pulmonaires
	<i>ACE2</i>	Non	Non	Oui	Oui	Non
Effet des androgènes sur l'infection		Oui : lignée prostatique	Oui : A549		Oui	Oui : lignées prostatiques Non : lignées pulmonaires
<i>In vivo</i>						
Modèle		Hamsters mâles	Souris mâles	Souris mâles	Souris mâles	Souris mâles transgéniques ACE2
Condition		Castré Infection 2, 4 et 7dpi	Traitement enz 3 jours ou castré	Traitement enz 10 jours	Castré	Enz 10 jours ± castré Infection 3dpi
Régulation par les androgènes dans le poumon	<i>Tmprss2</i>	Non	Oui	Non	Oui	Non
	<i>Ace2</i>	Non	Non	Oui	Oui	
Effet des androgènes sur l'infection virale dans le poumon		Oui				Non

Enz = enzalutamide

Enfin, en ce qui concerne les études prospectives sur l'impact de l'hormonothérapie sur la COVID-19 chez des patients avec un cancer de la prostate résumées dans le tableau 5, ces études comparent les données de patients qui ont un cancer de la prostate avec ou sans hormonothérapie et qui sont positifs à la COVID-19 (Koskinen et al. 2020; Montopoli et al. 2020; Patel et al. 2020; Gedeborg et al. 2021; Kazan et al. 2021; Klein et al. 2021; Kwon et al. 2021; Lee et al. 2022; Shah et al. 2022; Welén et al. 2022) (Tableau 5). Par ailleurs, la plupart de ces cohortes évaluent l'incidence puisqu'elles comportent également un groupe de patients avec cancer de la prostate qui n'ont pas contracté la COVID-19 sur la durée de l'étude (Koskinen et al. 2020; Montopoli et al. 2020; Gedeborg et al. 2021; Kazan et al. 2021; Klein et al. 2021; Kwon et al. 2021; Lee et al. 2022). Notre étude de la cohorte CACOVID, quant à elle, compare les données de patients avec cancer de la prostate métastatique traités par hormonothérapie avec celles de patients avec cancer du côlon métastatique. Nous avons fait ce choix pour avoir des groupes présentant des comorbidités similaires. La cohorte ne comprend que des patients qui ont contracté la COVID-19, nous n'avons donc pas d'informations pour évaluer l'incidence. Cependant nous pouvons comparer nos résultats avec ceux des autres cohortes concernant la mortalité et la sévérité de la COVID-19 selon que les patients soient traités ou non par hormonothérapie pour leur cancer. Ainsi nous pouvons constater que nous avons des résultats similaires à l'étude de Patel *et al.*, puisqu'elle montre une diminution du risque d'hospitalisation et de la supplémentation en oxygène dans le groupe traité par hormonothérapie (Patel et al. 2020). Ces résultats rejoignent ceux obtenus dans notre étude de la cohorte CACOVID puisqu'elles indiquent un effet bénéfique de l'hormonothérapie. Toutes les autres cohortes figurant dans le tableau 5 concluent à l'absence d'effet de l'hormonothérapie sur la sévérité de la COVID-19 ou la mortalité (Koskinen et al. 2020; Kazan et al. 2021; Klein et al. 2021; Kwon et al. 2021; Shah et al. 2022; Welén et al. 2022) (Tableau 5). L'ensemble des résultats de ces différentes cohortes, CACOVID incluse, ne converge pas tous vers la conclusion d'une hormonothérapie aux effets bénéfiques dans le cadre de la COVID-19. Toutefois, comme stipulé précédemment, ces cohortes comparent les données de patients avec cancer de la prostate non traité par hormonothérapie avec des patients avec cancer de la prostate métastatique traité par hormonothérapie. Or le groupe de patients ayant un cancer au stade métastatique présente un score de comorbidité supérieur à celui du groupe contrôle constitué de patients avec un cancer de stade moins avancé et peut donc être d'avantage

susceptible à la COVID-19. Ce point est une explication possible à la divergence des résultats observée entre les différentes études prospectives.

E. Identification de gènes potentiellement régulés par AR et exprimés après infection

Nos recherches ont permis de mettre en évidence le rôle des androgènes dans l'infection virale au SARS-CoV-2 et notamment dans le développement de la COVID-19. En effet, nous avons montré un décalage de la cinétique d'infection et d'inflammation, avec une réponse antivirale précoce chez les animaux castrés. Toutefois, notre hypothèse de départ qui suggérait que la régulation de l'expression pulmonaire de *TMPRSS2* par les androgènes soit responsable de la différence de sévérité entre les hommes et les femmes a été infirmée. En effet, chez les hamsters castrés, l'expression de *TMPRSS2* dans le poumon est inchangée alors que le développement de la COVID-19 est impacté. Ainsi, *TMPRSS2* n'étant pas responsable de cet effet des androgènes, nous avons cherché d'autres gènes pouvant être impliqués.

Pour cela nous avons réalisé une analyse transcriptomique comparative entre l'ARN des poumons à 4 jours post-infection des hamsters castrés et celui des hamsters intacts. Nous avons ainsi pu identifier des groupes de gènes différentiellement exprimés entre les poumons des animaux castrés et intacts après infection. Ces gènes ont pu être classés en groupe de fonction. Parmi ces groupes, figurent des groupes de gènes liés à l'inflammation, à la coagulation et à la fibrose, à la réponse immunitaire innée et à l'entrée virale, surexprimés chez les animaux castrés. Plus précisément, parmi les gènes liés à l'inflammation, et surexprimés, figurent les gènes codant les cytokines *Cxcl2* (C-X-C Motif Chemokine Ligand 2) et *Cxcl5*, connues pour induire le recrutement de cellules immunitaires, les récepteurs de l'inflammation *Il1r2*, *Tnfrsf14*, *Nlrp3*, *Bdkrb1* et la protéine *Mefv* (Puneet et al. 2005; Diamond et Kanneganti 2022). Par ailleurs, de manière cohérente avec les observations histopathologiques, nous avons identifié de nombreux gènes, régulés à la hausse, liés à la coagulation et à la fibrose tels que les gènes codant pour *Fga* (Fibrinogen Alpha Chain) et les gènes codant les Serpins décrites comme régulatrices du phénomène de coagulation et de remodelage tissulaire (Law et al. 2006; RAU et al. 2007). En parallèle, des gènes surexprimés et impliqués dans la réponse immunitaire innée ont été identifiés chez les

hamsters castrés, notamment les gènes codant pour les récepteurs de l'inflammation Nlrp3 et la protéine Mefv, les lectines de type C Clec5a et Clec4d. Ces dernières ont été décrites comme permettant la production de cytokines pro-inflammatoires et l'amplification de la réponse immunitaire (Cheung et al. 2011; Graham et al. 2012). Cette observation est cohérente avec l'élimination plus rapide du virus chez les hamsters castrés, signe d'une réponse immunitaire cytotoxique précoce.

De manière intéressante nous avons également montré une surexpression de Siglec-1 dans les poumons des hamsters castrés infectés. Or, dans le cas de la COVID-19 légère à modérée, il a été démontré que l'expression de Siglec-1 à la surface des monocytes était corrélée aux niveaux d'expression d'interféron de type I, moteurs clés de la réponse immunitaire de l'hôte infectieux, ce qui corrobore une réponse immunitaire plus précoce chez les hamsters castrés (Bourgoin et al. 2020; Doehn et al. 2021). En plus de confirmer l'implication de Siglec-1 dans l'infection au SARS-CoV-2, notre étude suggère sa régulation, de manière directe ou indirecte, par les androgènes.

Les résultats de cette transcriptomique pourraient servir de base pour établir une signature relative à une réponse immunitaire précoce. Dans ce cas, les protéines codées par ces gènes sont d'autant plus intéressantes puisque certaines d'entre elles sont dosables, notamment les cytokines.

II. Perspectives

Ce projet de thèse propose une réponse à la différence de sévérité de la COVID-19 entre les hommes et les femmes. Plus précisément ce travail s'est concentré sur l'implication des androgènes dans l'infection au SARS-CoV-2, en partant du postulat d'une régulation de *TMPRSS2* par les androgènes dans le poumon. Nous avons pu montrer l'effective contribution des androgènes dans la COVID-19 avec une influence sur la cinétique d'infection, d'un point de vue réponse inflammatoire et phénotypique. Cependant, nous avons bien conscience que les androgènes ne contribuent qu'en partie à cette susceptibilité inégale.

En plus de *TMPRSS2* et *ACE2*, d'autres acteurs participent également à l'infection au SARS-CoV-2 et au mécanisme d'entrée de ce virus dans la cellule hôte. Parmi eux, on peut compter *NRP1* et les lectines de type-C qui servent de récepteurs secondaires au virus (Cantuti-Castelvetri et al. 2020; Daly et al. 2020; Thépaut et al. 2021; Sung et al. 2022). On ne peut exclure une expression différentielle de ces protéines entre les hommes et les femmes, ni une possible régulation de ces gènes par les androgènes. En effet, le gène codant la protéine *NRP1*, est déjà connu pour être régulé par les androgènes dans la prostate (Tse et al. 2017). L'étude de ces récepteurs dits secondaires pourrait potentiellement apporter des données supplémentaires justifiant la différence de sévérité de COVID-19 observée entre les genres.

D'autres études ont abordé la problématique d'un autre point de vue, davantage génétique. Nombre de ces recherches impliquent la voie de l'interféron de type 1, acteur majeur de la réponse antivirale. Des variants pertes de fonction du gène *TLR7*, présent sur le chromosome X et participant à la production d'IFN de type 1, ont été retrouvés chez près de 2% des hommes atteints de forme sévère (Asano et al. 2021). Une autre étude a révélé la présence d'auto-anticorps anti-IFN de type 1 chez 10% des personnes en soins critiques dû au SARS-CoV-2, majoritairement des hommes (Bastard et al. 2020). Par ailleurs, les gènes liés à la réponse immunitaire et présents sur le chromosome X peuvent se retrouver dupliqués chez la femme, et permettre une réponse immunitaire plus forte. Ainsi, il semble que les femmes présentent une meilleure réponse immunitaire que les hommes (Klein et Flanagan 2016; Congy-Jolivet et al. 2022).

Nous avons réalisé notre étude en faisant l'hypothèse d'un effet délétère des androgènes pour expliquer la différence de sévérité de la COVID-19 entre les hommes et les femmes. Cependant, il est possible que les hormones femelles, via le récepteur des estrogènes (ER), soient-elles aussi impliquées, avec un effet protecteur contre la COVID-19. *In vitro*, un traitement au 17 β -estradiol de la lignée Vero-E6 diminue l'entrée du SARS-CoV-2, ce qui montre un effet direct de cette hormone sur le mécanisme d'entrée du virus (Lemes et al. 2021). Cet effet est complété par la différence de réponse immunitaire antivirale qui apparaît plus efficace chez la femme (Villacres et al. 2004; Berghöfer et al. 2006; Klein et al. 2010). Des études de cohorte de femmes ont par ailleurs appuyé ces résultats dans le contexte de la COVID-19. En effet, elles ont montré que les femmes sous traitement hormonal substitutif, comprenant des estrogènes et de la progestérone dans le cadre de la ménopause, présentaient une moindre mortalité due à la COVID-19 que les femmes ménopausées donc avec des faibles taux hormonaux (Seeland et al. 2020; Dambha-Miller et al. 2022).

C'est donc une multitude de facteurs, différents entre les hommes et les femmes, qui, mis bout à bout, conduit à cette susceptibilité significativement inégale existante entre les hommes et les femmes face à la COVID-19. La multiplication de ces facteurs, dont certains ne sont pas encore connus, rend difficile l'établissement d'une réponse thérapeutique adéquate en l'état actuel des connaissances. Les autres paramètres impliqués restent donc à déterminer afin d'expliquer totalement la sévérité exacerbée observée chez les hommes atteints de COVID-19 et ainsi adopter une réponse thérapeutique ciblée. Ces connaissances sont d'autant plus importantes qu'elles suggèrent une vigilance particulière à avoir vis-à-vis des patients avec cancer de la prostate. En effet, le cancer constitue une première comorbidité face à la COVID-19, mais la thérapie choisie pourrait constituer un facteur de susceptibilité supplémentaire.

ANNEXES

I. Publications supplémentaires au cours de la thèse

A. Publication n°1

Cette article met en évidence le lien entre la modification de la composition du microbiote intestinal suite à l'infection au SARS-CoV-2 et la sévérité de la COVID-19 dans le modèle de hamster syrien doré. Pour cette étude, nous avons apporté notre expertise en détection de la protéine virale spike du SARS-CoV-2 en immunohistochimie.

Alteration of the gut microbiota following SARS-CoV-2 infection correlates with disease severity in hamsters

Valentin Sencio^{a,b,c,d,e}, Arnaud Machelart^{a,b,c,d,e}, Cyril Robil^{a,b,c,d,e}, Nicolas Benech^{f,g}, Eik Hoffmann^{a,b,c,d,e},
Chloé Galbert^{f,g}, Lucie Deryuter^{a,b,c,d,e}, Séverine Heumel^{a,b,c,d,e}, Aline Hantute-Ghesquier^{e,h}, Anne Flourens^{e,h},
Priscille Brodin^{a,b,c,d,e}, Fabrice Infanti^e, Virgile Richardⁱ, Jean Dubuisson^{a,b,c,d,e}, Corinne Grangette^{a,b,c,d,e},
Thierry Sulpiceⁱ, Isabelle Wolowczuk^{a,b,c,d,e}, Florence Pinet^k, Vincent Prévotⁱ, Sandrine Belouzard^{a,b,c,d,e},
François Briandⁱ, Martine Duterque-Coquillaud^{e,h}, Harry Sokol^{l,m}, and François Trottein^l

^aUniv. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019 - UMR 9017 - CIIL - Center for Infection and Immunity of Lille, F-59000 Lille, France; ^bCentre National de la Recherche Scientifique (CNRS), UMR 9017, F-59000 Lille, France; ^cInstitut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm) U1019, F-59000 Lille, France; ^dCentre Hospitalier Universitaire de Lille, F-59000 Lille, France; ^eInstitut Pasteur de Lille, F-59000 Lille, France; ^fSorbonne Université, Inserm, Centre de Recherche Saint-Antoine, CRSA, AP-HP, Saint Antoine Hospital, Gastroenterology department, F-75012 Paris, France; ^gParis Center for Microbiome Medicine, Fédération Hospitalo-Universitaire, F-75012 Paris, France; ^hUniv. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, UMR9020-U1277 - CANTHER - Cancer Heterogeneity Plasticity and Resistance to Therapies, F-59000 Lille, France; ⁱSciopathlabo, F-37270 Larçay, France; ^jPhysiogenex, 280 rue de l'Hers, F-31750 Escalquens, France; ^kUniv. Lille, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1167 - RID-AGE - Facteurs de risque et déterminants moléculaires des maladies liées au vieillissement, F-59000 Lille, France; ^lUniv. Lille, Inserm, CHU Lille, UMR-S1172, EGID and DISTALZ, F-59000 Lille, France; ^mInstitut National de la Recherche Agronomique (INRAE), UMR1319 Micalis & AgroParisTech, F-78350 Jouy en Josas, France

ABSTRACT

Mounting evidence suggests that the gut-to-lung axis is critical during respiratory viral infections. We herein hypothesized that disruption of gut homeostasis during severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) infection may associate with early disease outcomes. To address this question, we took advantage of the Syrian hamster model. Our data confirmed that this model recapitulates some hallmark features of the human disease in the lungs. We further showed that SARS-CoV-2 infection associated with mild intestinal inflammation, relative alteration in intestinal barrier property and liver inflammation and altered lipid metabolism. These changes occurred concomitantly with an alteration of the gut microbiota composition over the course of infection, notably characterized by a higher relative abundance of deleterious bacterial taxa such as Enterobacteriaceae and Desulfovibrionaceae. Conversely, several members of the Ruminococcaceae and Lachnospiraceae families, including bacteria known to produce the fermentative products short-chain fatty acids (SCFAs), had a reduced relative proportion compared to non-infected controls. Accordingly, infection led to a transient decrease in systemic SCFA amounts. SCFA supplementation during infection had no effect on clinical and inflammatory parameters. Lastly, a strong correlation between some gut microbiota taxa and clinical and inflammation indices of SARS-CoV-2 infection severity was evidenced. Collectively, alteration of the gut microbiota correlates with disease severity in hamsters making this experimental model valuable for the design of interventional, gut microbiota-targeted, approaches for the control of COVID-19.

Abbreviations: SARS-CoV-2, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2; COVID-19, coronavirus disease 2019; SCFAs, short-chain fatty acids; dpi, day post-infection; RT-PCR, reverse transcription polymerase chain reaction; IL, interleukin. ACE2, angiotensin converting enzyme 2; TMPRSS2, transmembrane serine protease 2.

ARTICLE HISTORY

Received 11 August 2021
Revised 29 September 2021
Accepted 29 November 2021

KEYWORDS


SARS-CoV-2; covid-19;
hamsters; gut microbiota;
markers of disease severity

Introduction

Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), the aetiological agent of coronavirus disease (COVID)-19, is the greatest global public health concern at present with over 200 million people infected (> 4 million deaths). Although most infected individuals are asymptomatic or

mildly symptomatic, up to 5% of patients develop severe disease requiring intensive care. This rate is more important in the elderly and in individuals with co-morbidities.^{1,2} COVID-19 has emerged as a multifaceted, multi-system and multi-organ disorder ranging from nonspecific flu-like symptoms, to pneumonia, acute respiratory distress syndrome,

CONTACT François Trottein  francois.trottein@pasteur-lille.fr  Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Professeur Calmette, Lille 59000

 Supplemental data for this article can be accessed [here](#).

© 2021 The Author(s). Published with license by Taylor & Francis Group, LLC.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

multiple organ failure and death.³ The gastrointestinal tract hosts a highly diverse and dynamic microbial ecosystem, composed mostly of anaerobic bacteria that is commonly referred to as the gut microbiota. The tightly regulated microbiota-host interplay influences many physiological functions such as digestion, metabolism, mucosal barrier integrity, organ functions and immune homeostasis.^{4,5} In particular, mounting evidence suggests the intricate relationship between the gut microbiome and pulmonary immunity, including in the context of respiratory infections (for reviews,^{6–9}). Prior findings have demonstrated that the gut microbiota is altered during respiratory viral infections such as influenza and that dysbiosis might impact on disease outcomes.^{8,10–14} Changes in the composition of the gut microbiota in patients experiencing COVID-19 have been reported.^{15–20} Patients with severe COVID-19 had significant alterations in fecal microbiomes characterized by enrichment of pathogenic bacteria and depletion of beneficial commensals. Although these clinical studies are informative and have identified bacterial taxa associated with SARS-CoV-2 infectivity and disease severity,^{15,18–20} they also have various limitations. Firstly, substantial inter-individual differences and demographic variables necessitate large cohorts to firmly conclude. Secondly, the disease phase at the time of sample collection was not always known and samples were not collected at baseline, before infection. Thirdly, the gut microbiota's composition is influenced by clinical management. Confounding factors, including medication (e.g. antibiotics) and the use of oxygen at high doses, might complicate the interpretation. It is therefore essential to develop complementary approaches and use experimental models to assess the consequences of SARS-CoV-2 infection on the gut microbiota composition and functionality. We have recently used a nonhuman primate model (the macaque) to address the question. This system recapitulates mild COVID-19 symptoms that have been observed in the majority of human cases. We reported temporal and moderate changes in gut microbiota composition and metabolic output in this model.²¹ For instance the production of the fermentation products short-chain fatty acids (SCFAs), which are instrumental in the control of immune and inflammatory responses,^{22,23} was

decreased. The analysis of the gut microbiota composition in an experimental system that mimics severe COVID-19 might be instrumental to better understand the role of the gut-to-lung axis in disease severity. Transgenic mouse expressing human angiotensin converting enzyme 2 (ACE2), the receptor for SARS-CoV-2,²⁴ under the control of the epithelial cell cytokeratin-18 promoter, represents a model of severe COVID-19.^{25,26} However, the artificial expression of human ACE2 does not faithfully recapitulate human ACE2 expression and animals suffer from severe SARS-CoV-2-induced encephalitis, a cause of death not observed in humans. In this experimental system, Cao and colleagues recently reported alterations in the composition of the gut microbiota during SARS-CoV-2 infection.¹⁹ In the present study, we took advantage of a Syrian hamster model recently described to simulate the clinical and pathological manifestations of COVID-19.^{27, 27–33} In this model, SARS-CoV-2 infection led to a progressive alteration of the gut microbiota composition characterized by a higher relative abundance of deleterious bacterial taxa such as Enterobacteriaceae and Desulfovibrionaceae, a reduced relative abundance of SCFA producers (Ruminococcaceae and Lachnospiraceae) and a diminished concentration of SCFAs in blood. However, SCFA supplementation had no effect on clinical parameters in this experimental model of COVID-19. Lastly, several bacterial taxa correlated with clinical and inflammation indices of SARS-CoV-2 infection severity. Collectively, SARS-CoV-2 infection altered the gut-to-lung axis in hamsters suggesting that this experimental model may be instrumental for interventional approaches that aim to target the gut microbiota for a better control of COVID-19.

Results

Sublethal SARS-CoV-2 infection causes severe lung disease in hamsters

Male hamsters were infected intranasally with a sublethal dose of a clinical SARS-CoV-2 isolate. Animals experienced body weight loss as early as day 2 post-infection (dpi) (Figure S1a). At 4 dpi, animals began to show ruffled fur and signs of respiratory disease including labored breathing.

Weight loss peaked at 7 dpi (average of 17% of initial weight) and from day 7 onward, infected animals started to recover. Infectious virus load in lung homogenates peaked at 2–4 dpi (Figure 1a, left panel). At 7 dpi, no virus was detected in the lungs. These data were confirmed by quantification of viral RNA-dependent RNA polymerase levels by quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) (Figure 1a, right panel). Trace amounts of viral RNA were detected at 7 dpi. Of note, infectious viruses were not detected in the intestine, liver and blood (not shown). Immunofluorescence assays indicated a focal distribution of the virus in bronchial and bronchiolar epithelia and to a lesser extent in alveoli (pneumocytes and alveolar macrophages) at 4 dpi (Figure 1b and not shown). These data were confirmed by immunohistochemistry using an antibody against the spike protein (Figure S2).

Analyses of gene expression in lungs indicated that infection induced a rapid and transient expression of transcripts encoding interferon (IFN)- β and IFN- λ and a more sustained expression of IFN stimulated genes (ISGs) such as *Isg15*, *Mx2* (interferon-induced GTP-binding protein), *Cxcl10* (C-X-C motif chemokine ligand 10), *Stat1* (signal transducer and activator of transcription 1), and *Ifi27* (IFN α inducible protein 27) (Figure 1c, left panel, Figure S1b). Transcripts encoding cytokines and chemokines such as IL-1 β (interleukin-1 β), IL-18, IL-6, IFN- γ , IL-10, CCL2 (C-C motif chemokine ligand 2), CCL4 and CCL7 were also up-regulated in the lungs during infection (Figure S1b). SARS-CoV-2 infection also led to a strongly reduced expression of epithelial genes, including *Ocln* (occludin) and *Zo1* (zonula occludens 1), and endothelial genes such as *Pecam1* (platelet endothelial cell adhesion molecule 1), *Vegfr1*

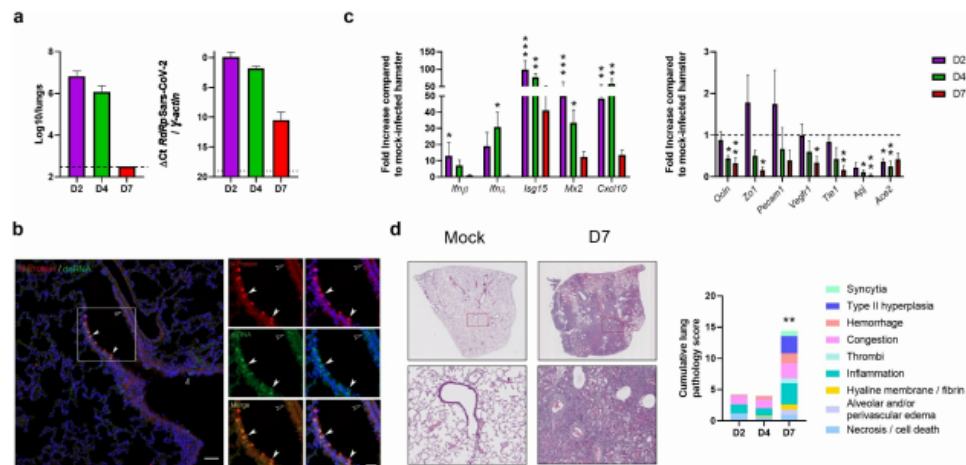


Figure 1. Establishment of a sublethal model of SARS-CoV-2 infection in hamsters. Hamsters were inoculated with 2×10^4 tissue culture infectious dose 50 (TCID₅₀) of the clinical SARS-CoV-2 isolate hCoV-19/France/IDF0372/2020. (a) Determination of infectious viral loads in the lungs on day 2 (D2), day 4 (D4) and day 7 (D7) post-infection (dpi). Data are expressed as the number of infectious virus particles per lung (left panel). Quantification of viral RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) transcript levels in the whole lungs was quantified by RT-PCR (right panel). Data are expressed as delta Ct values. The dashed line represents the detection threshold. Results are expressed as the mean \pm SD. (b) Co-staining for viral N protein (red) and dsRNA (green) in infected lung tissues using immunofluorescence assay (4 dpi). Arrows point to double-positive cells. Nuclei are stained with DAPI (blue). (c) mRNA copy numbers of genes were quantified by RT-PCR (lung). Data are expressed as mean fold increase \pm SD over average gene expression in mock-treated animals. (d) Histopathological examination of lung sections of mock-infected and infected hamsters. Left panels, Representative images of lungs from mock-infected and SARS-CoV-2-infected hamsters (hematoxylin and eosin staining) in left panels. Lower left panels, enlarged views of the area circled in red in upper left panels. Right panel, Blinded sections were scored for levels of pathological severity. To evaluate comprehensive histological changes, lung tissue sections were scored based on criteria indicated in the right panel. The following scoring system was used: 0, no pathological change; 1, affected area ($\leq 10\%$); 2, affected area ($< 50\%$, $> 10\%$); 3, affected area ($\geq 50\%$). The average sum of different parameters is shown. (a–d), A representative experiment out of two is shown ($n = 5$ /time point). Significant differences were determined using the Kruskal–Wallis ANOVA test (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$).

(vascular endothelial growth factor receptor 1), *Tie1* (tyrosine kinase with immunoglobulin like and EGF like domains 1) and *Apj* (apelin receptor) particularly at 7 dpi (Figure 1c, right panel). SARS-CoV-2 infection also associated with a rapid (2 dpi) and sustained (up to 7 dpi) reduced expression of transcripts encoding *Ace 2* (Figure 1c, right panel). In line with the finding on transcript levels, *Ace 2* protein expression in lung tissue was lowered during infection (Figure S3). Regarding other cellular compounds involved in human SARS-CoV-2 infection, transmembrane serine protease 2 (TMPRSS2)³⁴ and neuropilin-1³⁵ had also a reduced transcript expression during infection (Figure S1c). Regarding lung pathology, animals developed an acute bronchointerstitial pneumonia at 2 dpi with mild to moderate necrotizing bronchiolitis accompanied by congestion, discrete alveolar hemorrhages, and intra-alveolar and interstitial infiltration of neutrophils and macrophages (Figure 1d). More diffuse bronchointerstitial pneumonia was present at 4 dpi in addition to bronchiolar epithelial cell death/necrosis. Alveolar septal congestion, edema, protein rich fluid exudation, and patchy alveolar hemorrhage were more extensive than at 2 dpi. At 7 dpi, more than 75% of lung sections were affected with sub-acute bronchointerstitial pneumonia, which was characterized by extensive and marked hyperplasia of bronchiolar epithelial cells and type II alveolar pneumocytes, as well as, interstitial, perivascular and intra-alveolar mixed cell inflammation (Figure 1d). Infection was also associated with alveolar collapse and occasional hyaline membranes with some hemorrhages associated with micro-vasculitis and discrete thrombi. The presence of numerous intra-alveolar syncytia pneumocytes was also noticed. Consistent with other studies,^{27–33,36} these findings confirmed that SARS-CoV-2 causes severe pulmonary disease in Syrian hamsters following intranasal exposure.

Sublethal SARS-CoV-2 infection associates with gut and liver disorders

Clinical evidence suggests intestinal disorders during SARS-CoV-2 infection.^{37–41} Analysis of postmortem COVID-19 patients indicated histopathological

evidence of injury as well as presence of virus particles in the gut tissue. In our hamster infectious system, analyses of gene expression in the colon revealed an early and transient enhancement of IFN- λ and ISGs including *Stat1*, *Isg15*, and *Mx2*, (Figure 2a). This is in line with the presence of viral RNA (but not infectious virus) mostly at 2 dpi (Figure 2b). To a lower extent, genes involved in inflammation such as *Il6*, *Il12p40* and *Il17a* were also upregulated. Transcripts encoding mucin 4 (*Muc4*) were also upregulated. Unlike the lung tissue, SARS-CoV-2 infection was associated with enhanced colonic gene expression of *Ace2*. Lastly, transcripts encoding the antimicrobial peptides calgranulin A (S100A8), calgranulin B (S100A9), cationic antimicrobial peptide (Camp) and lipocalin 2 (*Lcn2*, also a marker of inflammation) were also increased in the colon of SARS-CoV-2-infected hamsters (Figure 2a, right panel). In contrast to human studies,^{37–41} histological analysis did not reveal intestinal damage and structural remodeling of the epithelium in hamsters (not shown). This is in agreement with other studies,^{27,30} but in contrast with another study.³⁶ The reason for this discrepancy is unclear. This might be explained by differences in the virus preparations and the dose used to inoculate animals. In our setting, the blood concentration of citrulline – a marker of the functional enterocyte mass and metabolic activity – was stable during infection (Figure 2c, left panel). We then measured the blood concentration of intestinal fatty-acid binding protein (iFABP), a systemic marker associated with gut inflammation and disrupted gut integrity. As depicted in Figure 2c (right panel), iFABP concentration was increased at 4 dpi, albeit not significantly ($P = 0.164$). Disruption in the intestinal epithelial barrier can result in the increased portal influx of bacteria or their products into the liver, where they can cause inflammation and injury. RT-PCR analyses revealed the upregulated expression of genes encoding inflammatory markers in the liver, including acute-phase proteins (*Lcn2*), cytokines (*Il1 β* , *Il18*, *Tnfa*, *Ifn γ*), and antimicrobial peptides (*Camp*, regenerating family member 3 gamma/*Reg3 γ* , *S100A8*) (Figure 2d). No viral RNA-dependent RNA polymerase transcript levels was detected in the liver by RT-PCR (Figure 2e). Changes in liver functions during infection may alter serum lipid and lipoprotein levels. Indeed, the levels of triglycerides and total cholesterol in blood were significantly reduced during infection

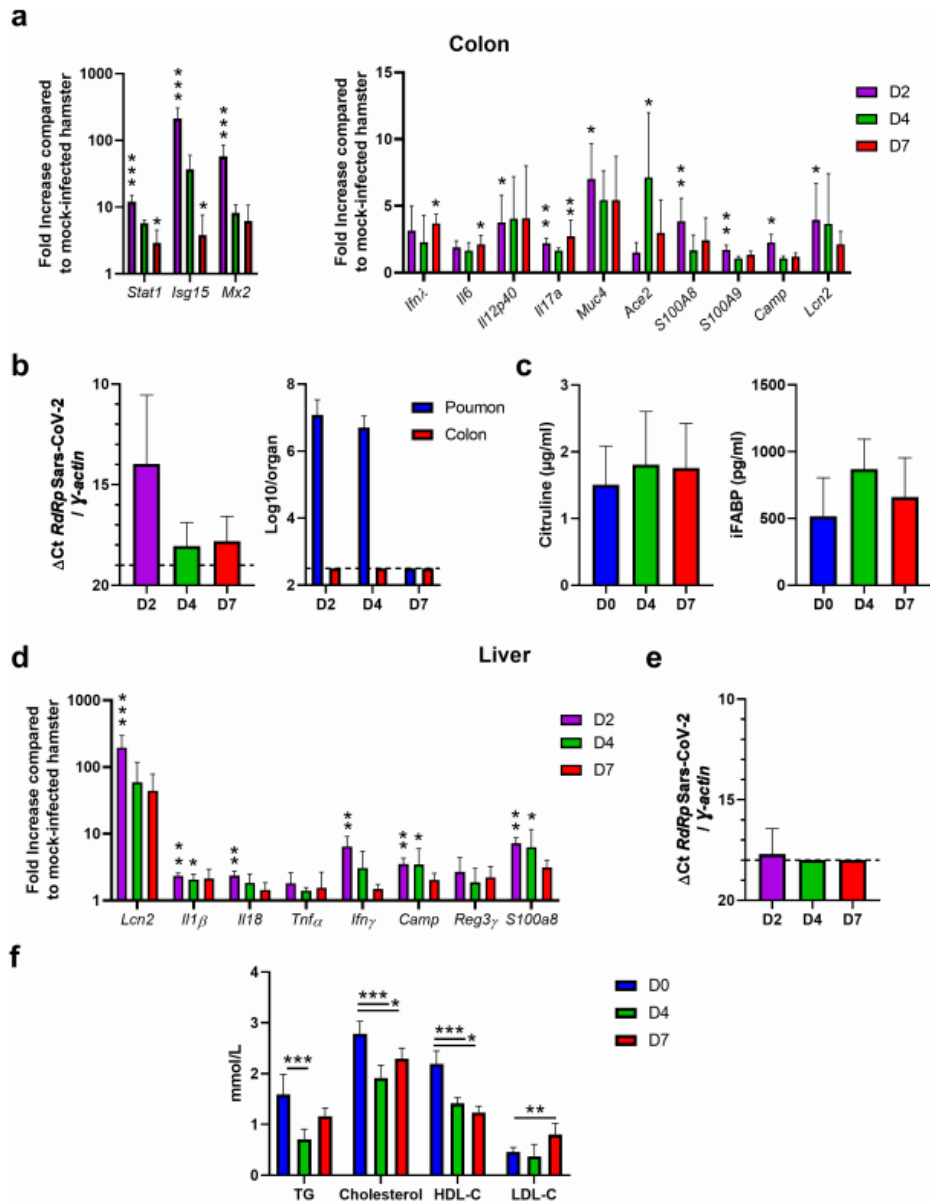


Figure 2. Analysis of gut disorders during SARS-CoV-2 infection. Hamsters were infected as described in Figure 1. (a) The colon of mock-infected and SARS-CoV-2-infected hamsters were collected at 2 (D2), 4 (D4) and 7 (D7) dpi. mRNA copy numbers of genes were quantified by RT-PCR. Data are expressed as fold increase over average gene expression in mock-treated animals. (b) *Left panel*, SARS-CoV-2 RNA in the colon was quantified by quantitative RT-PCR. Data are expressed as delta Ct values. *Right panel*, Determination of infectious viral loads in the colon. The number of infectious virus in the lung is depicted for comparison. Data are expressed as the number of infectious virus particles per organ. The dashed line represents the detection threshold. (c) Citrulline (*left panel*) and intestinal fatty-acid binding protein (iFABP) (*right panel*) concentrations in the blood of mock-infected and SARS-CoV-2-infected hamsters. (d) The livers of mock-infected and SARS-CoV-2-infected hamsters were collected at 2, 4 and 7 dpi. mRNA copy numbers of genes were

(Figure 2f). This was associated with a significant reduction in high-density lipoprotein cholesterol, the latter being negatively associated with COVID-19 severity in humans.^{42,43} In contrast, relative to mock-infected hamsters, low-density lipoprotein cholesterol levels were significantly higher at 7 dpi. Overall, SARS-CoV-2 infection in hamsters associated with a mild intestinal inflammation and a relative alteration in intestinal barrier property that may lead to liver inflammation and lipid metabolism changes.

Sub-lethal SARS-CoV-2 infection alters the composition of the gut microbiota in hamsters

We then turned to analyze the consequences of SARS-CoV-2 infection on the composition of the gut microbiota. To this end, feces samples were collected at 2 dpi, 4 dpi and 7 dpi and were analyzed using 16S rRNA gene amplicon sequencing. Mock-infected animals served as controls. In total, 569,430 sequence reads were analyzed with an average of 28,471 sequence reads per sample (min = 12,980; max = 36,165). Alpha diversity, assessed by the number of observed amplicon sequence variants, Chao1, and Shannon and Simpson indexes, was not statistically modified during the course of SARS-CoV-2 infection although a trend toward an enhancement of abundance and diversity of the bacterial community was observed (Figure 3a and Figure S4a). Beta diversity plots showed clustering by time points (Figure 3b and Figure S4b, left panel). Of interest, this analysis revealed a distinct shift in gut microbial composition in SARS-CoV-2-infected hamsters compared to mock-infected hamsters, in particular at 4 dpi and 7 dpi. Analysis of Jaccard (Figure 3c) and Bray Curtis (Figure S4b, right panel) distances between day 0 and the other time points showed a drift of the fecal microbiota following infection, peaking at 7 dpi. We next analyzed the composition of the gut microbiota at different taxonomic levels.

At the phylum level, the fecal microbiota of hamsters was dominated by bacteria from the Firmicutes phylum (Figure 3d). Among the other phyla,

Bacteroidota (Bacteroidetes), Desulfobacterota, Campilobacterota and, to a lesser extent, Elusimicrobiota were detected. The relative abundance of several phyla changed during infection. Notably, an increased abundance of Bacteroidota, Desulfobacterota, Elusimicrobiota, Proteobacteria, Campilobacterota and Actinobacteriota was noticed, at the expense of Firmicutes. In the latter phylum, the Ruminococcaceae (reduced) and Oscillospiraceae (increased) families were the most affected (Figure 3e). A significant impact of infection was also observed at lower taxonomic levels. Comparison of the microbiota composition between day 0 and the other time points using DESeq2 showed statistically significant differences at the family and genus levels (Figure 4a). Among families differentially affected, the most notable changes were Flavobacteriaceae, Desulfovibrionaceae, Peptococcaceae and Christensenellaceae, all enhanced relative abundances. At the genus level, infection was characterized by a marked increase in *Oscillospiraceae_UCG-007* (Clostridia class). To a lower extent, the Gammaproteobacteria class members *Helicobacter*, *Escherichia-Shigella* (Enterobacteriaceae family) and *Parasutirella* (Sutterellaceae family) had an enhanced relative proportion (Figure 4a). SCFAs, the main gut microbiota metabolites, play important functions in gut homeostasis.^{22,44-46} Of interest, a lower relative abundance of several SCFA-producing Firmicutes (Clostridia class, known to contain important butyrate-producing species) including *Ruminococcus*, *Lachnospiraceae_NK4A136*, and *Lachnospiraceae_UCG-001* was observed (Figures 4a and 4b). In addition, the acetate producing bacterium *Eubacterium siraeum* (Ruminococcaceae) was less frequent during infection. These data prompted us to quantify SCFA production during SARS-CoV-2 infection. The concentration of acetate (the predominant SCFA), propionate and butyrate in the serum tended to decrease at 2 dpi (Figure 4c). Differences became significant at 4 dpi except for acetate which returned to basal level.

quantified by RT-PCR. (e) Quantification of viral RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) transcript levels in the liver was quantified by RT-PCR. Data are expressed as delta Ct values. The dashed line represents the detection threshold. Results are expressed as the mean \pm SD. (f) Blood (serum) concentrations of triglycerides (TG), cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C). (a-f) Results are expressed as the mean \pm SD. A representative experiment out of two is shown (n = 5 to 8/time point). Significant differences were determined using the Kruskal-Wallis ANOVA test (*P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001).

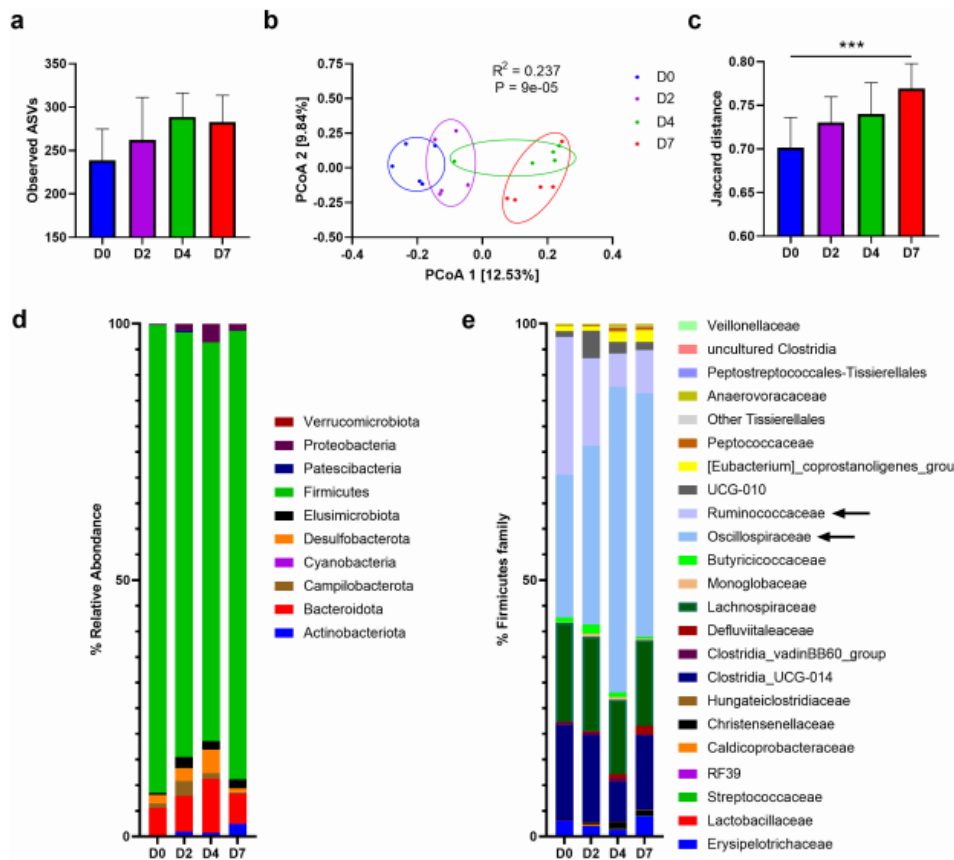


Figure 3. Changes over time of the gut microbiota's composition during SARS-CoV-2 infection. (a) Alpha diversity was estimated by the number of observed Amplicon sequence variants (ASVs). Results are expressed as the mean \pm SD. (b) Beta diversity was assessed by principal coordinate analysis (PcoA) of Jaccard index. PC1 and PC2 represent the top two principal coordinates that captured most of the diversity. The fraction of diversity captured by the coordinate is given as a percentage. Each sample is colored according to the time point (day 0 (D0): blue, day 2 (D2): violet, day 4 (D4): green, day 7 (D7): red). (c) Jaccard distance between indicated time point and day 0. For day 0, intra group distance is shown, for day 2, 4 and 7, distance to day 0 is shown. Results are expressed as the mean \pm SD. (d) and (e) Comparison of the taxonomic composition (phylum in (d) and Firmicutes in (e)) in the gut microbiota of mice in response to SARS-CoV-2 infection. Colored blocks indicate taxa with an average relative abundance. Arrows indicate the most affected families. Significant differences (control *versus* infection) are depicted by * ($P < 0.05$, Kruskal–Wallis ANOVA test). One of two independent experiment is shown ($n = 5$).

At 7 dpi, no significant differences were noted. Overall, SARS-CoV-2 infection in hamsters led to alteration of the gut microbiota composition characterized by an increase of deleterious taxa (Enterobacteriaceae and Desulfovibrionaceae) and a reduction of SCFA producers (Ruminococcaceae and Lachnospiraceae).

SCFA treatment during SARS-CoV-2 infection failed to improve disease outcomes in hamsters

Previous findings have indicated that SCFAs can improve pathological outcomes during respiratory viral infections including influenza (butyrate) and respiratory syncytial virus (acetate) infections.^{47–49}

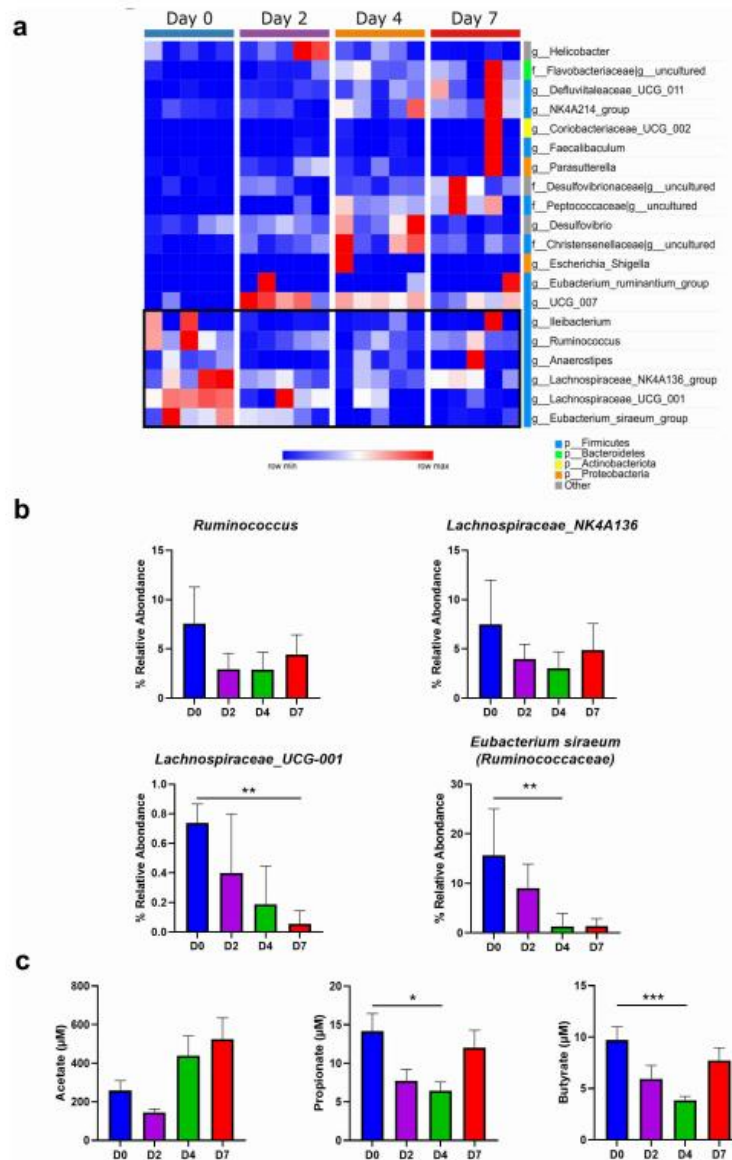


Figure 4. Changes in bacterial taxa during the course of SARS-CoV-2 infection. (a) DESeq analysis shows that the representation of the various bacterial taxa changed over the course of the infection. Only taxa with a statistically significant change compared to day 0 are shown ($P < 0.05$; $q < 0.15$). (b) Relative abundances of some taxa during the course of infection, including those involved in SCFA metabolism, are shown. ($n = 5$). Results are expressed as the mean \pm SD. (c) Blood concentrations in mock-infected and SARS-CoV-2-infected hamsters ($n = 6-12$, pool of three independent experiments). Data are expressed as the mean \pm SD of individual SCFAs. Significant differences were determined using the Kruskal-Wallis ANOVA test ($*P < 0.05$; $**P < 0.01$).

Mechanisms included reduced tissue damage⁴⁷ and enhanced anti-viral (ISG) response,^{48,49} respectively. In view of this literature and regarding the decrease of SCFAs in our experimental model, we evaluated the impact of SCFA treatment during SARS-CoV-2 infection. To this end, the hamster's drinking water was supplemented with SCFAs (a mix of acetate, propionate and butyrate) starting 5 days before SARS-CoV-2 infection (Figure 5a, left panel). The dose of SCFAs used in the present study was in accordance with that used in previously published studies.^{13,14,48,50–52} SCFA supplementation had no effect on weight loss and

viral load in the lungs (Figure S5a and Figure 5a, right panel). SCFA treatment also failed to modulate pulmonary transcript levels of ISGs (Mx1), inflammatory cytokines and chemokines (CXCL10, IL-6, IFN- γ) and epithelial (occluding, Clara cell 10-kDa protein/Cc10) and endothelial (APJ) markers (Figure 5b). Analysis of pathological scores showed no difference between vehicle-treated and SCFA-treated animals (Figure 5c). Hence, SCFA supplementation during SARS-CoV-2 infection failed to ameliorate pulmonary disease. SCFA treatment during experimental influenza infection can lower gut disorders.¹⁴

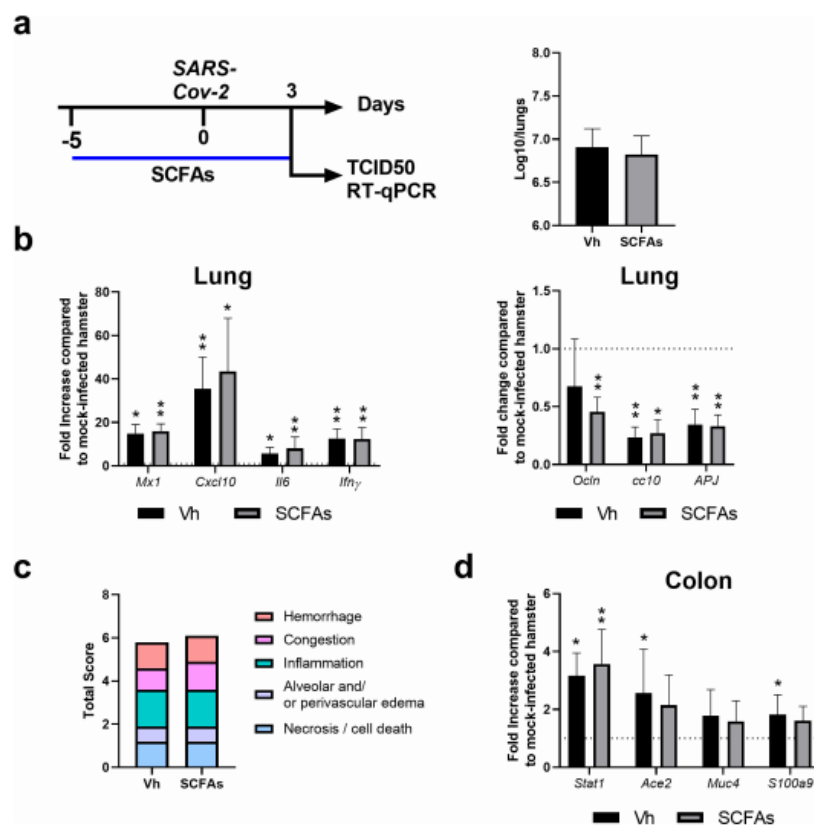


Figure 5. Effect of SCFA supplementation during SARS-CoV-2 infection. (a) *Left panel*, Scheme of the experimental design in which the effects of SCFAs were assessed in SARS-CoV-2-infected hamsters. Animals were treated with acetate (200 mM), propionate (50 mM) and butyrate (20 mM) in drinking water or with vehicle (Vh) five days before infection and during infection. Animals were sacrificed at 3 dpi. a) *Right panel*. Viral load in lungs was assessed by TCID50. (c) mRNA copy numbers of genes were quantified by RT-PCR. Data are expressed as fold increase over average gene expression in mock-treated animals. (d) The average sum of different pathological parameters is shown. (e) Gene expression was assessed in colon (7 dpi). One of two independent experiments is shown (n = 6). Results are expressed as the mean \pm SD (b, c and e). Significant differences were determined using the Mann-Whitney U test (* P < 0.05; ** P < 0.01).

Analysis of intestinal (Figure 5d) and liver (Figure 5b) gene expression indicated a lack of effect of SCFA treatment. Altogether, SCFA treatment had no impact on the acute phase of COVID-19 in hamsters.

Changes in gut microbiota composition correlate with COVID-19 severity

The level of inflammatory markers is associated with changes in gut microbiota composition in COVID-19 patients suggesting that dysbiosis might contribute to disease severity via modulation of host immune responses.^{17,53} To investigate this possibility in infected hamsters, we correlated the gut microbiota and clinical and inflammatory indices of SARS-CoV-2 infection severity. We observed a strong correlation between several gut microbiota taxa and clinical and inflammatory indices of SARS-CoV-2 infection severity (Figure 6). For instance, Christensenellaceae, Desulfovibrionaceae, Flavobacteriaceae and Peptococcaceae families positively correlated with lung histological scores and inflammatory cytokines whilst an inverse correlation was seen for Butyricicoccaceae and Ruminococcaceae. These bacterial taxa also

positively or negatively correlated with morbidity (weight loss) and ablated pulmonary epithelial and endothelial gene expression. At the genus level, the increased relative abundance of *Blautia*, *Defluviitaleaeaceae_UCG-011*, *Oscillospiraceae_NK4A214* and *Oscillospiraceae_UCG-005* and the reduced frequencies of *Eubacterium siraeum*, *Anaerostipes* and *Lachnospiraceae_UCG-001* correlated with pathological and inflammatory indices (Figure 6). It is noteworthy that several taxa positively correlated with viral load and ISG expression in lungs including *Lachnospiraceae_A2*, *Monoglobus*, *Parasutrella*, *Oscillospiraceae_UCG-007*, and *Elusimicrobium*. On the other hand, *Anaerostipes* and *Ruminococcus* negatively correlated with viral load and ISG expression in lungs. Collectively, changes in some gut microbiota taxa correlate with clinical and inflammatory indices of SARS-CoV-2 infection severity.

Discussion

Detailed description of microbial changes that occur during severe COVID-19 might provide important translational information on the understanding of pathological outcomes and might also

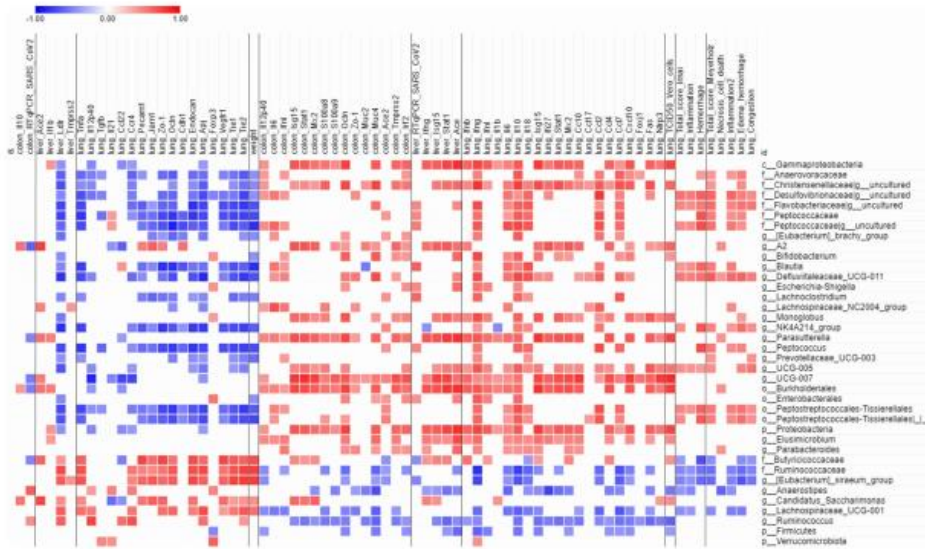


Figure 6. Correlations between bacterial taxa and infection-related variables. Only taxa differentially represented between mock-infected and SARS-CoV-2-infected hamsters (identified with LEfSe) were taken into account. Only significant correlations ($p < 0.05$ and $q < 0.25$ after correction for the false discovery rate, using the Benjamini-Hochberg procedure) are shown.

lead to the discovery of biomarkers of disease severity.^{53,54} The close pathological resemblance with humans makes Syrian hamster a valuable model for studying acute COVID-19. Importantly, the impact of SARS-CoV-2 infection on the gut microbiota composition is still unknown in this model. In the current study, we showed that SARS-CoV-2 infection led to disruption of the gut microbiota composition in hamsters and that several bacterial taxa correlated with markers of disease severity.

The current study confirmed and extended other studies describing the hamster model as an instrumental model for COVID-19.^{23,27–33,36} In this system, the viral load was controlled at 7 dpi and clinical signs including the body weight loss were maximal. Our data emphasized the dramatic lung pathology developing at this time point. Infection and lung pathology associated with an enhanced expression of numerous transcripts encoding ISGs and inflammatory markers and a dramatic reduction of epithelial and endothelial cell markers, in line with the reported epithelial and vascular endothelial damage in severe COVID-19 patients.^{55,56} To a lower extent and in line with several clinical reports, gut disorders also developed during SARS-CoV-2 infection in Syrian hamsters. This was characterized by altered gene expression and by moderate changes in barrier functions, as assessed by enhanced iFABP concentration in blood. The latter was combined with a pro-inflammatory profile in the liver, likely resulting from the portal translocation of bacterial components from the gut. As reported in humans,^{42,43} we also observed altered concentrations of triglycerides and cholesterol-transporting lipoproteins in blood. These alterations might be due to liver dysfunctions. Despite these changes, the intestine and the liver exhibited a normal histological appearance at 7 dpi (not shown). Mild-to-moderate gut disorders during SARS-CoV-2 infection associated with alteration of the gut microbiota composition in hamsters. One may question about the cause(s) of this alteration. Local viral replication might play a role in altered gut microbiota composition. However, in our setting, no infectious virus was detected in the gut. A fecal-oral route of SARS-CoV-2 transmission has been suggested in the hamster model.³⁰ It will be interesting to study the

impact of oral SARS-CoV-2 infection on the composition and activity of the gut microbiota. The enzymatic activity of Ace 2 is instrumental to maintain the gut's microbial ecology in part by promoting the synthesis of antimicrobial peptides.⁵⁷ Unlike in the lung compartment (decreased expression), transcripts for Ace2 and antimicrobial peptides increased in the gut during the course of infection, rather eliminating this potential cause. The release of inflammatory cytokines such as type I IFNs¹¹ and/or to the reduced food intake^{13,58} might play a part in gut microbiota composition during SARS-CoV-2 infection. Hypoxia (a feature of acute viral respiratory infection), alterations of the enteric nervous system and dysregulated local immune response might also play a role. Further investigation will be necessary to delineate the causes of altered composition of gut microbiota during experimental COVID-19 in hamsters. Regarding the putative role of gut dysbiosis in COVID-19 severity,^{15–18} this key question has a clear application in the clinics.

The gut-lung axis is becoming increasingly important in the context of viral respiratory infections.⁸ Alteration of gut microbiota functions due to acute viral respiratory infections has consequences on disease outcomes such as secondary bacterial infections.^{11,13,14,59} Hence, it is important to detail microbial changes that occur during severe COVID-19. Gut microbiota dysbalance has been described in COVID-19 patients. SARS-CoV-2 infection was associated with a lower relative abundance of bacterial species with known immunomodulatory potential such as *Bifidobacteria*, *Faecalibacterium prausnitzii* and *Eubacterium rectale*.¹⁷ Bacteria known to produce the SCFA butyrate such as several genera from the families Ruminococcaceae (i.e. *Ruminococcus bromii* and *Faecalibacterium prausnitzii*, a major butyrate producer in humans), Lachnospiraceae (*Fusicatenibacter*) and Eubacteriaceae (*Eubacterium hallii*) are also under-represented in COVID-19 patients.¹⁸ In contrast, SARS-CoV-2 infection is associated with a higher relative abundance of opportunistic bacteria including *Streptococcus infantis*, *Ruminococcus (gnavus and torques)*, *Bacteroides (dorei and vulgatus)*, *Clostridium*, *Collinsella aerofaciens*, and *Morganella morganii*, although the extent to which these differences are attributable to concomitant antibiotic treatment in the hospital setting

remains unclear.^{16–18,20} Enrichment of these bacteria might lead to local and systemic inflammation. Correlation analyses identified positive association between several bacterial taxa and COVID-19 severity.^{15,17–19} It is noteworthy that alterations of the composition of the gut microbiota in SARS-CoV-2-infected hamsters began as early as 2 dpi, more rapidly compared to influenza infection in mice.^{13,59} Beta diversity analysis revealed higher disruption of intestinal communities at 7 dpi. We did notice a higher relative abundance of potentially deleterious taxa such as members of Enterobacteriaceae and Desulfovibrionaceae families. At genus level, an enhanced frequency of *Escherichia-Shigella* was observed, in line with a human study.¹⁸ Other taxa were identified to be strongly affected during SARS-CoV-2 infection in hamsters, including members of the Lachnospiraceae and Ruminococcaceae families. This later observation is in line with Gu and colleagues's observation made in COVID-19 patients.¹⁸ The lower relative frequency of these SCFA producers during infection translated into a reduced production of SCFAs early after infection. To a higher extent, a drop of SCFAs was observed during influenza infection in the mouse model.^{13,14} SCFAs are key molecules mediating host-gut microbiota interplay. They exert important regulatory functions in the intestine including a role in antimicrobial responses and mucus secretion, intestinal permeability and activation of the mucosal immune system.^{45,46} They can also distally regulate pulmonary inflammation,^{51,60} including in the context of viral respiratory infections.^{47,48,61} Recently, we showed that the drop of SCFA during influenza participates in secondary bacterial infection, both in lungs (*Streptococcus*) and in the intestine (*Salmonella enterica* serovar Typhimurium).^{13,14} Here, we investigated whether the reduction of SCFAs is relevant for SARS-CoV-2 infection. Clearly, SCFA supplementation did not interfere with SARS-CoV-2 replication in lungs. This is in contrast with another study showing a positive role of acetate on pulmonary viral (respiratory syncytial virus) load.⁴⁸ In contrast, our current data are in line with a lack of butyrate and acetate's effect on influenza replication *in vivo*.^{13,47} It is also noteworthy that Pascoal and colleagues failed to detect interference effects of SCFAs on SARS-CoV-2 infection *in vitro*.⁶² The role of SCFAs in respiratory viral infections is complex and sometimes controversial. For example, whilst butyrate

enhanced viral replication (and reduced ISG expression) *in vitro*,⁶³ two independent studies reported that the abundance of butyrate producing bacteria strongly correlated with protection against viral respiratory tract infection.^{64,65} On the basis of these opposite findings, the consequences of butyrate, and in general SCFA, treatment on ISG expression and SARS-CoV-2 replication in our setting could not be predicted. Regarding the sometimes opposing function of SCFAs in viral replication, it would be interesting to test them individually in our setting. SCFA supplementation can lower lung inflammation and injury during respiratory infections. For instance, by inhibiting the activity of histone deacetylases or through binding to the G protein-coupled receptor 41, butyrate reduced pneumonia during *Klebsiella pneumoniae* and influenza virus infection.^{47,66,67} In our COVID-19 model, we failed to evidence positive effects of SCFA supplementation on lung pathology indicating that supplementing SCFAs during SARS-CoV-2 infection had no distal impact on early phase COVID-19 pneumonia. More surprisingly, SCFA treatment did not ameliorate gut inflammation, at least at the gene expression level. Whether SCFA supplementation during SARS-CoV-2 infection impacts on intestinal functions including digestion, metabolism, and mucosal barrier integrity, remains to be investigated in details. This question is of importance regarding the importance of gut disorders in COVID-19 outcomes.⁶⁸ Optimized dose-scheduling to maximize the potential effect of SCFAs and limit potential toxicities is needed in the hamster model to address this question.

Whether changes in intestinal microbiota composition associate with pathological markers was investigated in the current study. Correlation analyses revealed that clinical and inflammatory indices are closely related to several taxa of gut microbiota. Of interest, some of the specific bacterial associations with clinical and inflammatory indices mirrored those observed in humans. For instance, our data supported a relationship between high relative abundance of *Deftuviitaleaceae_UCG-011*, *Oscillospiraceae_NK4A214* and *Oscillospiraceae_UCG-005* and clinical and inflammatory indices. On the other hand, the reduced frequencies of the SCFA producers *Eubacterium siraeum* and *Lachnospiraceae_UCG-*

001 correlated with disease severity and inflammation. The reduced frequencies of *Eubacterium* and *Lachnospiraceae* species (respectively *Eubacterium rectale* and *Lachnospiraceae bacterium UGC_5_1_63FAA*) correlate with disease severity in severe COVID-19 patients.¹⁵ More generally, the negative correlation of SCFA producers (Ruminococcaceae and Lachnospiraceae) and inflammatory markers mirror the situation in humans and nonhuman primates.^{15,21} In our setting, the Gammaproteobacteria class (the genus *Parasutterella*) positively correlated with viral load and inflammatory cytokine expression in lungs. Of note, several studies have reported positive correlation between the relative frequencies of several Gammaproteobacteria members (e.g. *Enterobacter*, *Escherichia-Shigella*, *Enterococcus*) and disease severity.^{15,18,19} Further analyses will be required to establish a direct causal relationship between the alterations of gut microbiota and disease severity in this infectious model. Some limitations of this report are worth noting. In our conditions, SARS-CoV-2-infected hamsters had no infectious virus in the intestine and developed a mild intestinal inflammation without injury and overt gut barrier disruption. In severe COVID-19 patients, gut disorders (e.g. leaky gut) and altered gut microbiota are likely to be critical in disease severity including cytokine storm and organ dysfunction (for reviews,^{54,69,70}). Hence, the hamster model, at least in the conditions used in the current study, is less relevant when referred to gut disorders. It remains to be seen whether comorbidity models such as dyslipidemia-obesity and/or aging recapitulate these features. We have only assessed gut microbiota changes during early COVID-19. As long-lasting effects on microbiota composition have been described in COVID-19 patients,^{17,71} studying later time points will be necessary. In the same line, the potential effect of SCFA supplementation on long COVID-19 needs further investigation. Short-chain fatty acids are just one of many gut-derived metabolite classes that may have physiologic effects during COVID-19, and these include, among others, bile acids, aromatic amino acids, lactate, and succinate⁷² – none of which were studied

here. Despite these limitations, our study provides the first description of gut microbiota changes during experimental severe COVID-19 in hamsters. Manipulating the gut microbiota may provide a promising adjuvant therapy to medical procedures in COVID-19 patients.^{68,73,74} Our study does not preclude the use of prebiotics (microbiota-targeted dietary), probiotics (bacteria-based treatment) or gut microbiota derivatives for the management of acute COVID-19. The gut microbiota can indeed generate a plethora of metabolites that can remotely reinforce the antiviral functions of pulmonary immune cells, in part through ISG induction. These immune stimulatory sources include acetate, desaminotyrosine (degradation product of flavonoids) and indole derivatives (produced by tryptophan metabolism).^{48,75,76} Along with these antiviral effects, gut-derived bacteria and components might also reduce acute inflammation and organ failure, impact on long COVID-19 and favor resiliency. This warrants further investigation, in particular in at-risk populations such as the elderly and comorbid individuals, well-known to have disturbed gut microbiota.

Materials and methods

Animals, virus, infection, ethics and biosafety statement

Golden hamsters were purchased from Janvier Laboratory (Le Genest-Saint-Isle, France). Hamsters were fed a standard rodent chow (SAFE A04, Augy, France) and were given water *ad libitum*. The hCoV-19_IPL_France strain of SARS-CoV-2 was used in the current study. Regarding the original Wuhan strain, this strain contains the D614G spike mutation that appeared early in the pandemic and increases viral entry. The SARS-CoV-2 isolate was passed three times on Vero-81 cells (ATCC number CCL-81) expressing the human TMPRSS2. Cells were grown at 37°C with 5% CO₂ in Dulbecco's modified eagle medium (DMEM, Gibco) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS, Eurobio). Sequence data of the virus strain used in the current study are accessible in the National Center for Biotechnology

Information (NCBI accession number: MW575140) and Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data (GISAID accession number EPI_ISL_940555). The virus was propagated in Vero-E6 cells (ATCC number CRL-1586) expressing TMPRSS2 by inoculation at MOI 0.01. Cell supernatant medium was harvested at 72 h post-infection and stored frozen at -80°C in small aliquots (2×10^6 TCID₅₀/mL). All experiments were conducted in a biosafety level 3 laboratory (BSL3) laboratory. For infection, hamsters were anesthetized by intraperitoneal injection of ketamine (100 mg/kg), atropine (0.75 mg/kg) and valium (2.5 mg/kg) and then intranasally infected with 100 μl of DMEM containing (or not, for mock control animals) 2×10^4 TCID₅₀ (50% tissue culture infectious dose) of SARS-CoV-2. For tissue collection, animals were euthanized by intraperitoneal injection of euthasol (140 mg/kg). All experiments were performed within the BSL3 of the Institut Pasteur de Lille and complied with current national and institutional regulations and ethical guidelines (Institut Pasteur de Lille/B59-350,009). The protocols were approved by the institutional regional ethical committee 'Comité d'Ethique en Experimentation Animale (CEEAA) 75. The study was authorized by the "Education, Research and Innovation Ministry" under registration number APAFIS#25041-2,020,040,917,227,851 v3.

Determination of viral load and assessment of gene expression by quantitative RT-PCR

Infectious virus load and viral RNA were determined by using the Reed & Muench tissue culture infectious dose 50 (TCID₅₀) assay and quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR), respectively. For titration of live infectious virus, half of right lobes were homogenized in Lysing Matrix D tubes containing 1 ml of PBS using the Mixer Mill MM 400 device (Retsch) (15 min – 15 Hz). After centrifugation at 11,000 rpm for 5 min, the clarified supernatant was harvested for live virus titration. Dilutions of the supernatants were done in DMEM with 1% penicillin/streptomycin and dilutions were transferred to Vero-E6 cells in 96-well plates for TCID₅₀ assay. Briefly, serial 10-fold dilutions of each sample were inoculated in a Vero-E6 cell monolayer in duplicate and cultured in DMEM supplemented with 2% fetal bovine serum (Invitrogen,

Waltham, MA) and 1% penicillin/streptomycin and L-glutamine. The plates were observed for cytopathic effects for 5–6 days. Virus titers were expressed as TCID₅₀ corresponding to the amount of virus that caused cytopathic effects in 50% of inoculated wells. For viral RNA quantitation in lung tissue, half of the right lobe was homogenized in 1 ml of RA1 buffer (NucleoSpin RNA kit, Macherey Nagel) containing 20 mM of Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride (TCEP). Total RNAs in the tissue homogenate were extracted using the NucleoSpin RNA kit. RNA was reverse-transcribed with the High-Capacity cDNA Archive Kit (Life Technologies, USA). The resulting cDNA was amplified using SYBR Green-based real-time PCR and the QuantStudio™ 12 K Flex Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems™, USA) following manufacturers protocol. Relative quantification was performed using the gene coding RNA-dependent RNA polymerase (*RdRp*) and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*gapdh*). Analyses of gene expression in lungs, colon and liver were performed by classical procedures. Specific primers were designed using Primer Express software (Applied Biosystems, Villebon-sur-Yvette, France) and ordered to Eurofins Scientifics (Ebersberg, Germany). The list of primers is available in Table 1. Relative mRNA levels ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$) were determined by comparing (a) the PCR cycle thresholds (Ct) for the gene of interest and the house keeping gene (ΔCt) and (b) ΔCt values for treated and control groups ($\Delta\Delta\text{Ct}$). Data were normalized against expression of the *gapdh* gene and are expressed as a fold-increase over the mean gene expression level in mock-treated mice. Viral load is expressed as viral RNA normalized to *Gapdh* expression level (ΔCt).

Histopathology

Lung tissues were fixed in 4% PBS buffered formaldehyde for 7 days, rinsed in PBS, transferred in ethanol (70%) and then processed into paraffin-embedded tissues blocks. The subcontractor Sciempath Labo (Larçay, France) performed histological processing and analysis. Tissue sections (3 μm) were stained with hematoxylin and eosin (H&E) and whole mount tissues were scanned with a Nanozoomer (Hamatsu) and the morphological changes were assessed by a semi-quantitative score.

Table 1.

<i>y-actin</i>	Forward 5	-ACAGAGAGAAGATGACGCAGATAATG-3'	<i>Il1b</i>	Forward 5	-GAAGTCAAACCAAGGTGGAGTTT-3'
	Reverse 5	-GCCTGAATGGCCACGTACA-3'		Reverse 5	-TCTGCTTGAGAGGTGCTGATGT-3'
<i>RdRp SARS-CoV-2</i>	Forward 5	-GTGARATGGTCATGTGTGGCGG-3	<i>Il18</i>	Forward 5	-CCGCATAATCGTCAGGACA-3'
	Reverse 5	-CARATGTTAAASACACTATTAGCATA-3'		Reverse 5	-ACATGGCTTGGTAGACCACT-3'
<i>Ifnb</i>	Forward 5	-ACCCTAAGGAAGTCCAG-3'	<i>Il6</i>	Forward 5	-CCATGAGGTCTACTGGCAAA-3'
	Reverse 5	-CCAGCTGCCAGTAATAGCTC-3'		Reverse 5	-GACCACAGTGAATGCCACAGATC-3'
<i>Ifnl</i>	Forward 5	-CCACACAGATGCAAAGGATT-3'	<i>Ifng</i>	Forward 5	-TGTTGCTTGCCTCACTCAGG-3'
	Reverse 5	-CTTGAGCAGCCACTTCTTATG-3'		Reverse 5	-AAGCAGAGGTCCCTCCATTC-3'
<i>Isg15</i>	Forward 5	-CTGGTCCCTGACTAACTC-3'	<i>Ccl2</i>	Forward 5	-TGCTAACTGACGCAAGTCC-3'
	Reverse 5	-CTGTATTCCGCACCAAGGAT-3'		Reverse 5	-AAGTCTTGTAGTCTCGGTGG-3'
<i>Mx2</i>	Forward 5	-CCAGTAATGTGGACATTGCC-3'	<i>Ccl4</i>	Forward 5	-CTCTCCATGCTTTTGTGCC-3'
	Reverse 5	-CATCAACGACCTTGTCTCAGTA-3'		Reverse 5	-ATCAGCCCATCTCACCACAG-3'
<i>Cxcl10</i>	Forward 5	-TACGTCCGCTATGGCTACT-3'	<i>Il12p40</i>	Forward 5	-AATGCGAGGCGCAAATTAICT-3'
	Reverse 5	-TTGGGGACTCTTGTCACTGG-3'		Reverse 5	-CTGCTTGTGAGTGAACCTCAAG-3'
<i>Ocln</i>	Forward 5	-GTGGCTCCACACTTGTCTG-3'	<i>Il17a</i>	Forward 5	-GCTGTAGTGAAGGAGGGTT-3'
	Reverse 5	-GCCACTCTCTGATAAGGGT-3'		Reverse 5	-GAGGGCTTCTGGAACCTCAC-3'
<i>Zo1</i>	Forward 5	-CTCTGCCCTCAAAGGA-3'	<i>Muc4</i>	Forward 5	-GGAAAACGAAACCGCTCC-3'
	Reverse 5	-CGCGGAAGTAGCCACATTA-3'		Reverse 5	-AAAAATGGATGACCCGACCC-3'
<i>Pecam</i>	Forward 5	-CGCCATGTTGATAGTCCGC-3'	<i>S100a8</i>	Forward 5	-ACTGCTCAGCACTGAGTGC-3'
	Reverse 5	-CTTAGCTGGAAGGACGGT-3'		Reverse 5	-GCCAGGCCACCTTATCAT-3'
<i>Vegfr1</i>	Forward 5	-GCGATACTCGACTTCCCTG-3'	<i>S100a9</i>	Forward 5	-CAGAGCTAGCAAGGGACA-3'
	Reverse 5	-CACAACTTCTGCAACCGGG-3'		Reverse 5	-TGGTTCTATGCTCGCTCC-3'
<i>Tie1</i>	Forward 5	-CCGGATCCCTATGGCTGTC-3'	<i>Camp</i>	Forward 5	-AACATGGGGTAGTGAAGCGG-3'
	Reverse 5	-TTGATTGAGGCGCTTGTCC-3'		Reverse 5	-ATCTTCTTACCGCTGGG-3'
<i>Tie2</i>	Forward 5	-AGGAGTTTGGTCTGCAGT-3'	<i>Lcn2</i>	Forward 5	-CCAACGACCAATGACCCCT-3'
	Reverse 5	-CGTAGTCAGTCTGAGGCTCC-3'		Reverse 5	-TCACAACGTTGGTCCCTGAG-3'
<i>Apj</i>	Forward 5	-CCTAGCTCGACGATACC-3'	<i>Tnfa</i>	Forward 5	-TGAGCCATCGTCCAAATG-3'
	Reverse 5	-CCTGGTCTGTTTCCGTG-3'		Reverse 5	-AGCCCGTCTGCTGATCAC-3'
<i>Ace2</i>	Forward 5	-CTGGGAAAACCTCATGCTG-3'	<i>Reg3g</i>	Forward 5	-CCTGCGGAAAACCTCAGGAT-3'
	Reverse 5	-GAACGATCTCTCGCTCATCT-3'		Reverse 5	-GACAGGTTTGGACTGTGGGA-3'
<i>Stat1</i>	Forward 5	-TCCATGCGGTTGAACCTAC-3'	<i>Mx1</i>	Forward 5	-GGTATGTTGACAGGTGCC-3'
	Reverse 5	-TGTCAAGTCTCTGTCTCACT-3'		Reverse 5	-GCTCTGGAACACTTGGGGAG-3'
<i>Ifi27</i>	Forward 5	-TCGTGCTGCTCCGATGTC-3'	<i>Cc10</i>	Forward 5	-ACAAGCCCTCTGCAATCA-3'
	Reverse 5	-ATGGATCCCGTGCAATTC-3'		Reverse 5	-GGGGCTGTTATCAGGGAGTG-3'
<i>Il10</i>	Forward 5	-GGTTGCCAAACCTTATCAGAAATG-3'	<i>Ccl7</i>	Forward 5	-CTCTGCCATGCTTTGTGCC-3'
	Reverse 5	-TTCACCTGTTCCACGCTTG-3'		Reverse 5	-ATCAGCCCATCTCACCACAG-3'
<i>Tmprss2</i>	Forward 5	-GGGCTACGAGCTTATGAAGC-3'	<i>Nrp1</i>	Forward 5	-CTGGAAGAAAGGGCGTGTCT-3'
	Reverse 5	-GGACGAACAGGAGTCACTGTG-3'		Reverse 5	-CTTCATATCCGGGGTGTCTC-3'

For the scoring, a dual histopathology scoring system adapted from ^{28,77} was used to assess pulmonary changes in hamsters. A total of nine parameters was qualitatively assessed and ranked with a score from 0 to 4: (1) cellular death/necrosis, (2) alveolar and/or perivascular edema, (3) hyaline membrane or fibrin, (4) inflammation, (5) thrombi, (6) congestion, (7) hemorrhage, (8) type II hyperplasia, and (9) syncytia. For each criteria, a score 0 = absent, 1 = 1–10% of lung section, 2 = 11–25% of lung section, 3 = 26–50% of lung section, and 4 = >50% of lung section affected.

Immunofluorescence staining and immunohistochemistry

For identification and localization of SARS-CoV-2-N protein and dsRNA in tissues, immunolabeling was performed on deparaffinized and rehydrated tissue sections using rabbit anti-SARS-CoV nucleocapsid (N) protein (Novus Biologicals, Littleton, CO) and mouse anti-dsRNA antibodies

(SCICONS J2 Nordic-MUBio, Susteren, The Netherlands). Tissue sections were first treated with antigen unmasking solution (10 mM sodium citrate in TBS) for 30 min at 70°C. Then, sections were rinsed 4 times in 0.1 M PBS pH 7.4 and blocked for 1 hour 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. Sections were then washed three times in 0.1 M PBS and incubated at room temperature for 1 hour with Alexa Fluor-conjugated secondary antibodies (Molecular Probes, Invitrogen, San Diego, CA) in blocking solution. The sections were rinsed 3 times in 0.1 M PBS. Nuclei were then counterstained by incubating the sections for 1 minute in 4',6-diamidino-2-phenylindole (Sigma, 1:5000 in TBS). Finally, the sections were incubated with Autofluorescence Eliminator Reagent (Merck-Millipore, Molsheim, France) and mounted with Fluoromount™ (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO,

USA). Images were acquired using an Axio Imager Z2 Apotome microscope (Zeiss, Germany). Immunohistochemistry of hamster tissue sections was performed using anti-ACE2 or anti-SARS-CoV-2 spike protein (Abcam, Cambridge, UK). Sections were incubated with appropriate secondary HRP-conjugated antibody, washed and incubated with VECTASTAIN*Elite ABC-HRP kit (Vector laboratories) following manufacturer's instructions. Slides were washed three times in PBS and the 3,3'-diaminobenzidine (DAB) chromogen DAB Peroxidase (HRP) Substrate Kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA) was added on each slide. Counterstaining was performed using Mayer's hematoxylin (Merck, Darmstadt, Germany). Finally, slides were mounted with Dako mounting medium. Images were acquired using an Axio Scan.Z1 slide scanner and ZEN (Blue edition) 2012 software (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany).

Gut microbiota analysis

To study the impact of SARS-CoV-2 infection on gut microbiota, hamsters were intranasally infected and their feces were collected at 2 dpi, 4 dpi and 7 dpi. Feces from mock-infected hamsters served as controls. Fecal samples were stored at -80°C until further analyses. Microbial DNA was extracted from 200 mg of fecal samples as previously described.⁷⁸ Following microbial lysis with both mechanical and chemical steps, nucleic acids were precipitated in isopropanol for 10 minutes at room temperature, incubated for 15 minutes on ice and centrifuged for 30 minutes at 15,000 *g* and 4°C . Pellets were resuspended in 112 μl of phosphate buffer and 12 μl of potassium acetate. After RNase treatment and DNA precipitation, nucleic acids were recovered via centrifugation at 15,000 *g* and 4°C for 30 minutes. The DNA pellet was resuspended in 100 μl of TE buffer. The concentration of extracted DNA was determined using a DNA fluorometric intercalant (SYBR* Green, ThermoFisher Scientific (Waltham, MA)). Microbial diversity and composition were determined for each sample by targeting a portion of the ribosomal genes. A 16S rRNA gene fragment comprising V3 and V4 hypervariable regions (16S; 5'-TACGGRAGGCAGCAG-3'

and 5'-CTACCNGGGTATCTAAT-3') was amplified using an optimized and standardized 16S-amplicon-library preparation protocol (Metabio, GenoScreen, Lille, France). Briefly, 16S rRNA gene PCR was performed using 5 ng genomic DNA according to the manufacturer's protocol (Metabio) using 192 bar-coded primers (Metabio MiSeq Primers, GenoScreen) at final concentrations of 0.2 μM and an annealing temperature of 50°C for 30 cycles. The PCR products were purified using an Agencourt AMPure XP-PCR Purification system (Beckman Coulter), quantified according to the manufacturer's protocol, and multiplexed at equal concentrations. Sequencing was performed using a 250-bp paired-end sequencing protocol on an Illumina MiSeq platform (Illumina) at GenoScreen. Positive (artificial bacteria community comprising 17 different bacteria (ABCv2)) and negative (sterile water) control were also included. Following DNA extraction and sequencing, raw paired-end reads were processed in a data curation pipeline that includes a step of removal of low quality reads (Qiime2 2020.6). Remaining sequences were assigned to samples based on barcode matches, and barcode and primer sequences were then trimmed. The sequences were denoised using the DADA2 method, and reads were classified using Silva reference database (version 138). Alpha and beta diversity were computed using the phyloseq package (v1.24.2). Principal Coordinate analyses of the Bray Curtis distance and Jaccard index were performed to assess beta diversity. The number of observed species, Chao1, Shannon and Simpson indexes were calculated using rarefied data (depth = 7,500 sequences/sample) and used to characterize alpha diversity. Raw sequence data are accessible in the National Center for Biotechnology Information (project number PRJNA761913), biosample accession numbers SRX12130168 to SRX12130187. Differential analysis was performed using DESeq2 or the linear discriminant analysis effect size (LEfSe) pipeline. Spearman's correlations between bacterial taxa and SARS-CoV-2 infection parameters were analyzed. Correlations were considered significant when *P* values < 0.05 with *q* < 0.15 after correction for the false discovery rate, using the Benjamini-Hochberg procedure.

Measurement of SCFA concentrations and treatment with SCFAs

Concentrations of SCFAs in blood were determined by ProDigest (Gent, Belgium) after extraction with acetonitrile using GC-2014 gas chromatography with AOC-20i auto injector (Shimadzu, Hertogenbosch, the Netherlands) as described.⁷⁹ To assess the effects of SCFAs on SARS-CoV-2 infection, hamsters infected with SARS-CoV-2 were treated (drinking water) five days before infection and during infection with a combination of sodium acetate (200 mM), propionate (50 mM) and butyrate (20 mM) (Sigma Aldrich).

Quantification of blood factors

Quantification of triglycerides (TG), high-density lipoprotein (HDL) cholesterol, low-density lipoprotein (LDL) cholesterol in serum was performed using a Horiba Pentra 400 machine and related Pentra assay kits (Horiba France SAS, Longjumeau, France).

Statistical analyses

Results are expressed as the mean \pm standard deviation (SD) unless otherwise stated. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism v6 software. A Mann-Whitney *U* test was used to compare two groups unless otherwise stated. Comparisons of more than two groups with each other were analyzed with the One-way ANOVA Kruskal-Wallis test (nonparametric), followed by the Dunn's posttest. $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

Acknowledgments

We would like to thank Nicolas Vandenebeele and Robin Prath for their technical assistance in the BSL3 laboratory. Sophie Le Gonidec (Genotoul, Toulouse) is greatly acknowledged for technical support. Dr F Sebbane is greatly acknowledged for the loan of the BSL3 isolator. The authors greatly acknowledge the Lions club from Marcq-en-Baroeul (France) for the purchase of the BSL3 isolator. GenoScreen (Lille, France) is acknowledged for 16S rRNA gene amplicon sequencing and Téo Fournier for submitting raw sequence data in the National Center for Biotechnology Information. Celine Wahl

and Stéphanie Ferreira (GenoScreen) are acknowledged for stimulating discussions.

Author contributions

FT conceived and supervised the study. VS and FT designed the experiments. VS, AM, CR, and EH did the animal experiments. VS, CR, LD, SH, and SB performed the analyses. TS and FB supervised the lipid profile analysis and NB, CG and HS the gut microbiota's composition analysis. AHG, AF, VF and MDC supervised the immunofluorescence staining and immunohistochemistry analyses and VR the histological scorings. VS, PB, JD, CG, IW, FP, HS, and FT analyzed the data. VC, HS and FT designed the figures. FT drafted the manuscript. All the authors revised the manuscript and provided critical comments. MT and FT obtained funding.

Availability of data and material

Please contact author for data requests

Disclosure statement

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Funding

This work was supported in part by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm), the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the University of Lille, the Pasteur Institute of Lille, l'Agence Nationale de la Recherche (AAP générique 2017, ANR-17-CE15-0020-01, ACROBAT, FT) and the Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer (COVID202001321, MD). VS received salary support (PhD fellowship) by Lille University and by the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM, France). FT received salary support by CNRS.

ORCID

Harry Sokol  <http://orcid.org/0000-0002-2914-1822>

François Trottein  <http://orcid.org/0000-0003-3373-1814>

References

1. Grasselli G, Zangrillo A, Zanella A, Antonelli M, Cabrini L, Castelli A, Cereda D, Coluccello A, Foti G, Fumagalli R, et al. Baseline characteristics and outcomes of 1591 patients infected with SARS-CoV-2 admitted to ICUs of the Lombardy region, Italy. *JAMA*. 2020;323(16):1574–1581. doi:10.1001/jama.2020.5394.

2. Wiersinga WJ, Rhodes A, Cheng AC, Peacock SJ, Prescott HC. Pathophysiology, transmission, diagnosis, and treatment of coronavirus disease 2019 (COVID-19): a review. *JAMA*. 2020;324(8):782–793. doi:10.1001/jama.2020.12839.
3. Baud D, Qi X, Nielsen-Saines K, Musso D, Pomar L, Favre G. Real estimates of mortality following COVID-19 infection. *Lancet Infect Dis*. 2020;20(7):773. doi:10.1016/S1473-3099(20)30195-X.
4. Maslowski KM, Mackay CR. Diet, gut microbiota and immune responses. *Nat Immunol*. 2010;12:5–9. doi:10.1038/ni0111-5.
5. Thaiss CA, Zmora N, Levy M, Elinav E. The microbiome and innate immunity. *Nature*. 2016;535(7610):65–74. doi:10.1038/nature18847.
6. Samuelson DR, Welsh DA, Shellito JE. Regulation of lung immunity and host defense by the intestinal microbiota. *Front Microbiol*. 2015;6:1085–1098. doi:10.3389/fmicb.2015.01085.
7. McAleer JP, Kolls JK. Contributions of the intestinal microbiome in lung immunity. *Eur J Immunol*. 2018;48(1):39–49. doi:10.1002/eji.201646721.
8. Sencio V, Machado MG, Trottein F. The lung–gut axis during viral respiratory infections: the impact of gut dysbiosis on secondary disease outcomes. *Mucosal Immunol*. 2021;14(2):296–304. doi:10.1038/s41385-020-00361-8.
9. Dang AT, Marsland BJ. Microbes, metabolites, and the gut–lung axis. *Mucosal Immunol*. 2019;12(4):843–850. doi:10.1038/s41385-019-0160-6.
10. Wang J, Li F, Wei H, Lian Z-X, Sun R, Tian Z. Respiratory influenza virus infection induces intestinal immune injury via microbiota-mediated Th17 cell-dependent inflammation. *J Exp Med*. 2014;211(12):2397–2410. doi:10.1084/jem.20140625.
11. Deriu E, Boxx GM, He X, Pan C, Benavidez SD, Cen L, Rozengurt N, Shi W, Cheng G, Tsois RM. Influenza virus affects intestinal microbiota and secondary salmonella infection in the gut through type I interferons. *PLoS Pathog*. 2016;12(5):e1005572. doi:10.1371/journal.ppat.1005572.
12. Groves HT, Cuthbertson L, James P, Moffatt MF, Cox MJ, Tregoning JS. Respiratory disease following viral lung infection alters the murine Gut microbiota. *Front Immunol*. 2018;9:182–193. doi:10.3389/fimmu.2018.00182.
13. Sencio V, Barthelemy A, Tavares LP, Machado MG, Soulard D, Cuinat C, Queiroz-Junior CM, Noordine M-L, Salomé-Desnoullez S, Deryuter L, et al. Gut dysbiosis during influenza contributes to pulmonary pneumococcal superinfection through altered short-chain fatty acid production. *Cell Rep*. 2020;30(9):2934–2947.e6. doi:10.1016/j.celrep.2020.02.013.
14. Sencio V, Gallerand A, Machado MG, Deryuter L, Heumel S, Soulard D, Barthelemy J, Cuinat C, Vieira AT, Barthelemy A, et al. Influenza virus infection impairs the Gut's barrier properties and favors secondary enteric bacterial infection through reduced production of short-chain fatty acids. *Infect Immun*. 2021;89(9):e0073420. doi:10.1128/IAI.00734-20.
15. Zuo T, Zhang F, Lui GCY, Yeoh YK, Li AYL, Zhan H, Wan Y, Chung A, Cheung CP, Chen N, et al. Alterations in Gut microbiota of patients with COVID-19 during time of hospitalization. *Gastroenterology*. 2020;159(3):944–955.e8. doi:10.1053/j.gastro.2020.05.048.
16. Zuo T, Liu Q, Zhang F, Lui GC-Y, Tso EY, Yeoh YK, Chen Z, Boon SS, Chan FK, Chan PK, et al. Depicting SARS-CoV-2 faecal viral activity in association with gut microbiota composition in patients with COVID-19. *Gut*. 2021;70(2):276–284. doi:10.1136/gutjnl-2020-322294.
17. Yeoh YK, Zuo T, Lui GCY, Zhang F, Liu Q, Li AY, Chung AC, Cheung CP, Tso EY, Fung KS, et al. Gut microbiota composition reflects disease severity and dysfunctional immune responses in patients with COVID-19. *Gut*. 2021;70(4):698–706. doi:10.1136/gutjnl-2020-323020.
18. Gu S, Chen Y, Wu Z, Chen Y, Gao H, Lv L, Guo F, Zhang X, Luo R, Huang C, et al. Alterations of the Gut microbiota in patients with COVID-19 or H1N1 influenza. *Clin Infect Dis*. 2020;71(10):2669–2678. doi:10.1093/cid/ciaa709.
19. Cao J, Wang C, Zhang Y, Lei G, Xu K, Zhao N, Lu J, Meng F, Yu L, Yan J, et al. Integrated gut virome and bacteriome dynamics in COVID-19 patients. *Gut Microbes*. 2021;13(1):1887722–2. doi:10.1080/19490976.2021.1887722.
20. Tao W, Zhang G, Wang X, Guo M, Zeng W, Xu Z, Cao D, Pan A, Wang Y, Zhang K, et al. Analysis of the intestinal microbiota in COVID-19 patients and its correlation with the inflammatory factor IL-18. *Med Microcol*. 2020;5:100023. doi:10.1016/j.medmic.2020.100023.
21. Sokol H, Contreras V, Maisonnasse P, Desmons A, Delache B, Sencio V, Machelart A, Brisebarre A, Humbert L, Deryuter L, et al. SARS-CoV-2 infection in nonhuman primates alters the composition and functional activity of the gut microbiota. *Gut Microbes*. 2021;13(1):1–19. doi:10.1080/19490976.2021.1893113.
22. Koh A, De Vadder F, Kovatcheva-Datchary P, Bäckhed F. From dietary fiber to host physiology: short-chain fatty acids as key bacterial metabolites. *Cell*. 2016;165(6):1332–1345. doi:10.1016/j.cell.2016.05.041.
23. Sun M, Wu W, Liu Z, Cong Y. Microbiota metabolite short chain fatty acids, GPCR, and inflammatory bowel diseases. *J Gastroenterol*. 2017;52(1):1–8. doi:10.1007/s00535-016-1242-9.
24. Letko M, Marzi A, Munster V. Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. *Nat Microbiol*. 2020;5(4):562–569. doi:10.1038/s41564-020-0688-y.
25. Jiang R-D, Liu M-Q, Chen Y, Shan C, Zhou Y-W, Shen X-R, Li Q, Zhang L, Zhu Y, Si H-R, et al. Pathogenesis of SARS-CoV-2 in transgenic mice expressing human angiotensin-converting enzyme 2. *Cell*. 2020;182(1):50–58. doi:10.1016/j.cell.2020.05.027.

26. Winkler ES, Bailey AL, Kafai NM, Nair S, McCune BT, Yu J, Fox JM, Chen RE, Earnest JT, Keeler SP, et al. SARS-CoV-2 infection of human ACE2-transgenic mice causes severe lung inflammation and impaired function. *Nat Immunol.* 2020;21(11):1327–1335. doi:10.1038/s41590-020-0778-2.
27. Sia SF, Yan L-M, Chin AWH, Fung K, Choy K-T, Wong AYL, Kaewpreedee P, Perera RAPM, Poon LLM, Nicholls JM, et al. Pathogenesis and transmission of SARS-CoV-2 in golden hamsters. *Nature.* 2020;583(7818):834–838. doi:10.1038/s41586-020-2342-5.
28. Imai M, Iwatsuki-Horimoto K, Hatta M, Loeber S, Halfmann PJ, Nakajima N, Watanabe T, Ujie M, Takahashi K, Ito M, et al. Syrian hamsters as a small animal model for SARS-CoV-2 infection and countermeasure development. *PNAS.* 2020;117(28):16587–16595. doi:10.1073/pnas.2009799117.
29. Osterrieder N, Bertzbach LD, Dietert K, Abdelgawad A, Vladimirova D, Kunec D, Hoffmann D, Beer M, Gruber AD, Trimpert J. Age-dependent progression of SARS-CoV-2 infection in Syrian hamsters. *Viruses.* 2020;12(7):779–790. doi:10.3390/v12070779.
30. Lee ACY, Zhang AJ, Chan JFW, Li C, Fan Z, Liu F, Chen Y, Liang R, Sridhar S, Cai J-P, et al. Oral SARS-CoV-2 inoculation establishes subclinical respiratory infection with virus shedding in golden Syrian hamsters. *Cell Rep Med.* 2020;1(7):100121. doi:10.1016/j.xcrm.2020.100121.
31. Boudewijns R, Thibaut HJ, Kaptein SJF, Li R, Vergote V, Seldeslachts L, Van Weyenbergh J, De Keyser C, Bervoets L, Sharma S, et al. STAT2 signaling restricts viral dissemination but drives severe pneumonia in SARS-CoV-2 infected hamsters. *Nat Commun.* 2020;11(1):5838–5847. doi:10.1038/s41467-020-19684-y.
32. Driouich J-S, Cochín M, Lingas G, Moureau G, Touret F, Petit P-R, Piorkowski G, Barthélémy K, Laprie C, Coutard B, et al. Favipiravir antiviral efficacy against SARS-CoV-2 in a hamster model. *Nat Commun.* 2021;12(1):1735–1747. doi:10.1038/s41467-021-21992-w.
33. Selvaraj P, Lien CZ, Liu S, Stauff CB, Nunez IA, Hernandez M, Nimako E, Ortega MA, Starost MF, Dennis JU, et al. SARS-CoV-2 infection induces protective immunity and limits transmission in Syrian hamsters. *Life Sci Alliance.* 2021;4(4):e202000886. doi:10.26508/lsa.202000886.
34. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, Schiergens TS, Herrler G, Wu N-H, Nitsche A, 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. doi:10.1016/j.cell.2020.02.052.
35. Cantuti-Castelvetri L, Ojha R, Pedro LD, Djannatian M, Franz J, Kuivanen S, van der Meer F, Kallio K, Kaya T, Anastasina M, et al. Neuropilin-1 facilitates SARS-CoV-2 cell entry and infectivity. *Science.* 2020;370(6518):856–860. doi:10.1126/science.abd2985.
36. Chan JF-W, Zhang AJ, Yuan S, Poon VK-M, Chan CC-S, Lee AC-Y, Chan W-M, Fan Z, Tsoi H-W, Wen L, et al. Simulation of the clinical and pathological manifestations of coronavirus disease 2019 (COVID-19) in a golden Syrian hamster model: implications for disease pathogenesis and transmissibility. *Clin Infect Dis.* 2020;71:2428–2446. doi:10.1093/cid/ciaa644.
37. Pan L, Mu M, Yang P, Sun Y, Wang R, Yan J, Li P, Hu B, Wang J, Hu C, et al. Clinical characteristics of COVID-19 patients with digestive symptoms in Hubei, China: a descriptive, cross-sectional, multicenter study. *Am J Gastroenterol.* 2020;115(5):766–773. doi:10.14309/ajg.0000000000000620.
38. Nobel YR, Phipps M, Zucker J, Leibold B, Wang TC, Sobieszczek ME, Freedberg DE. Gastrointestinal symptoms and coronavirus disease 2019: a case-control study from the United States. *Gastroenterology.* 2020;159(1):373–375.e2. doi:10.1053/j.gastro.2020.04.017.
39. Cheung KS, Hung IFN, Chan PPY, Lung KC, Tso E, Liu R, Ng YY, Chu MY, Chung TWH, Tam AR, et al. Gastrointestinal manifestations of SARS-CoV-2 infection and virus load in fecal samples from a Hong Kong Cohort: systematic review and meta-analysis. *Gastroenterology.* 2020;159(1):81–95. doi:10.1053/j.gastro.2020.03.065.
40. Xiao F, Tang M, Zheng X, Liu Y, Li X, Shan H. Evidence for gastrointestinal infection of SARS-CoV-2. *Gastroenterology.* 2020;158(6):1831–1833. doi:10.1053/j.gastro.2020.02.055.
41. Deshmukh V, Motwani R, Kumar A, Kumari C, Raza K. Histopathological observations in COVID-19: a systematic review. *J Clin Pathol.* 2021;74(2):76–83. doi:10.1136/jclinpath-2020-206995.
42. Hu X, Chen D, Wu L, He G, Ye W. Declined serum high density lipoprotein cholesterol is associated with the severity of COVID-19 infection. *Clin Chim Acta.* 2020;510:105–110. doi:10.1016/j.cca.2020.07.015.
43. Wang G, Zhang Q, Zhao X, Dong H, Wu C, Wu F, Yu B, Lv J, Zhang S, Wu G, et al. Low high-density lipoprotein level is correlated with the severity of COVID-19 patients: an observational study. *Lipids Health Dis.* 2020;19(1):204–216. doi:10.1186/s12944-020-01382-9.
44. Maslowski KM, Vieira AT, Ng A, Kranich J, Sierro F, Yu D, Schilter HC, Rolph MS, Mackay F, Artis D, et al. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature.* 2009;461(7268):1282–1286. doi:10.1038/nature08530.
45. Corrêa-Oliveira R, Fachi JL, Vieira A, Sato FT, Vinolo MAR. Regulation of immune cell function by short-chain fatty acids. *Clin Transl Immunol.* 2016;5(4):e73. doi:10.1038/cti.2016.17.
46. Tan J, McKenzie C, Potamitis M, Thorburn AN, Mackay CR, Macia L. The role of short-chain fatty acids in health and disease. *Adv Immunol.* 2014;121:91–119.

47. Trompette A, Gollwitzer ES, Pattaroni C, Lopez-Mejia IC, Riva E, Pernot J, Ubags N, Fajas L, Nicod LP, Marsland BJ. Dietary fiber confers protection against flu by shaping Ly6c⁺ patrolling monocyte hematopoiesis and CD8⁺ T cell metabolism. *Immunity*. 2018;48(5):992–1005. doi:10.1016/j.immuni.2018.04.022.
48. Antunes KH, Fachi JL, de Paula R, Da Silva EF, Pral LP, Dos Santos AA, Dias GBM, Vargas JE, Puga R, Mayer FQ, et al. Microbiota-derived acetate protects against respiratory syncytial virus infection through a GPR43-type 1 interferon response. *Nat Commun*. 2019;10(1):3273–3289. doi:10.1038/s41467-019-11152-6.
49. Ji J, Sun Q, Nie D, Wang Q, Zhang H, Qin F, Wang Q, Lu S, Pang G, Lu Z. Probiotics protect against RSV infection by modulating the microbiota-alveolar-macrophage axis. *Acta Pharmacol Sin*. 2021;1–12. doi:10.1038/s41401-020-0366-x.
50. Tan J, McKenzie C, Vuillermin PJ, Govere G, Vinuesa CG, Mebius RE, Macia L, Mackay CR. Dietary fiber and bacterial SCFA enhance oral tolerance and protect against food allergy through diverse cellular pathways. *Cell Rep*. 2016;15(12):2809–2824. doi:10.1016/j.celrep.2016.05.047.
51. Trompette A, Gollwitzer ES, Yadava K, Sichelstiel AK, Sprenger N, Ngom-Bru C, Blanchard C, Junt T, Nicod LP, Harris NL, et al. Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis. *Nat Med*. 2014;20(2):159–166. doi:10.1038/nm.3444.
52. Macia L, Tan J, Vieira AT, Leach K, Stanley D, Luong S, Maruya M, Ian Mckenzie C, Hijikata A, Wong C, et al. Metabolite-sensing receptors GPR43 and GPR109A facilitate dietary fibre-induced gut homeostasis through regulation of the inflammasome. *Nat Commun*. 2015;6(1):6734–6748. doi:10.1038/ncomms7734.
53. Villapol S. Gastrointestinal symptoms associated with COVID-19: impact on the gut microbiome. *Transl Res*. 2020;226:57–69. doi:10.1016/j.trsl.2020.08.004.
54. Trottein F, Sokol H. Potential causes and consequences of gastrointestinal disorders during a SARS-CoV-2 infection. *Cell Rep*. 2020;32(3):107915–107921. doi:10.1016/j.celrep.2020.107915.
55. Batah SS, Fabro AT. Pulmonary pathology of ARDS in COVID-19: a pathological review for clinicians. *Respir Med*. 2021;176:106239–106245. doi:10.1016/j.rmed.2020.106239.
56. Ackermann M, Verleden SE, Kuehnel M, Haverich A, Welte T, Laenger F, Vanstapel A, Werlein C, Stark H, Tzankov A, et al. Pulmonary vascular endothelialitis, thrombosis, and angiogenesis in Covid-19. *NEJM*. 2020;383(2):120–128. doi:10.1056/NEJMoa2015432.
57. Hashimoto T, Perlot T, Rehman A, Trichereau J, Ishiguro H, Paolino M, Sigl V, Hanada T, Hanada R, Lipinski S, et al. ACE2 links amino acid malnutrition to microbial ecology and intestinal inflammation. *Nature*. 2012;487(7408):477–481. doi:10.1038/nature11228.
58. Groves HT, Higham SL, Moffatt MF, Cox MJ, Tregoning JS, Bomberger JM. Respiratory viral infection alters the gut microbiota by inducing inappetence. *mBio*. 2020;11(1):e03236–19. doi:10.1128/mBio.03236-19.
59. Yildiz S, Mazel-Sanchez B, Kandasamy M, Manicassamy B, Schmolke M. Influenza A virus infection impacts systemic microbiota dynamics and causes quantitative enteric dysbiosis. *Microbiome*. 2018;6(1):9–25. doi:10.1186/s40168-017-0386-z.
60. Thorburn AN, McKenzie CI, Shen S, Stanley D, Macia L, Mason LJ, Roberts LK, Wong CHY, Shim R, Robert R, et al. Evidence that asthma is a developmental origin disease influenced by maternal diet and bacterial metabolites. *Nat Commun*. 2015;6(1):7320. doi:10.1038/ncomms8320.
61. Machado MG, Sencio V, Trottein F, Bäuml AJ. Short-chain fatty acids as a potential treatment for infections: a closer look at the lungs. *Infect Immun*. 2021;89(9):e0018821. doi:10.1128/IAI.00188-21.
62. Pascoal LB, Rodrigues PB, Genaro LM, Gomes ABDSP, Toledo-Teixeira DA, Parise PL, Bispo-Dos-Santos K, Simeoni CL, Guimarães PV, Buscaratti LI, et al. Microbiota-derived short-chain fatty acids do not interfere with SARS-CoV-2 infection of human colonic samples. *Gut Microbes*. 2021;13(1):1–9. doi:10.1080/19490976.2021.1874740.
63. Chemudupati M, Kenney AD, Smith AC, Fillingner RJ, Zhang L, Zani A, Liu S-L, Anderson MZ, Sharma A, Yount JS. Butyrate reprograms expression of specific interferon-stimulated genes. *J Virol*. 2020;94(16):e00326–20. doi:10.1128/JVI.00326-20.
64. Haak BW, Littmann ER, Chaubard J-L, Pickard AJ, Fontana E, Adhi F, Gyaltshen Y, Ling L, Morjaria SM, Peled JU, et al. Impact of gut colonization with butyrate-producing microbiota on respiratory viral infection following allo-HCT. *Blood*. 2018;131(26):2978–2986. doi:10.1182/blood-2018-01-828996.
65. Lee JR, Huang J, Magruder M, Zhang LT, Gong C, Sholi AN, Albakry S, Edusei E, Muthukumar T, Lubetzky M, et al. Butyrate-producing gut bacteria and viral infections in kidney transplant recipients: a pilot study. *Transpl Infect Dis*. 2019;21(6):e13180. doi:10.1111/tid.13180.
66. Chakraborty K, Raundhal M, Chen BB, Morse C, Tyurina YY, Khare A, Oriss TB, Huff R, Lee JS, St Croix CM, et al. The mito-DAMP cardiolipin blocks IL-10 production causing persistent inflammation during bacterial pneumonia. *Nat Commun*. 2017;8(1):13944–13958. doi:10.1038/ncomms13944.
67. Galvão I, Tavares LP, Corrêa RO, Fachi JL, Rocha VM, Rungue M, Garcia CC, Cassali G, Ferreira CM, Martins FS, et al. The metabolic sensor GPR43 receptor

- plays a role in the control of klebsiella pneumoniae infection in the lung. *Front Immunol.* 2018;9:142–152. doi:10.3389/fimmu.2018.00142.
68. Shinde T, Hansbro PM, Sohal SS, Dingle P, Eri R, Stanley R. Microbiota modulating nutritional approaches to countering the effects of viral respiratory infections including SARS-CoV-2 through promoting metabolic and immune fitness with probiotics and plant bioactives. *Microorganisms.* 2020;8(6):921–940. doi:10.3390/microorganisms8060921.
69. Kim HS, Bello MGD. Do an altered gut microbiota and an associated leaky Gut affect COVID-19 severity? *mBio.* 2021;12(1):e03022–20. doi:10.1128/mBio.03022-20.
70. Vignesh R, Swathirajan CR, Tun ZH, Rameshkumar MR, Solomon SS, Balakrishnan P. Could perturbation of gut microbiota possibly exacerbate the severity of COVID-19 via cytokine storm? *Front Immunol.* 2021;11:3752–3758. doi:10.3389/fimmu.2020.607734.
71. Chen Y, Gu S, Chen Y, Lu H, Shi D, Guo J, Wu W-R, Yang Y, Li Y, Xu K-J, et al. Six-month follow-up of gut microbiota richness in patients with COVID-19. *Gut* 2022;71:222–225. [gutjnl-2021-324090](https://doi.org/10.1136/gutjnl-2021-324090).
72. Krishnan S, Alden N, Lee K. Pathways and functions of gut microbiota metabolism impacting host physiology. *Curr Opin Biotechnol.* 2015;36:137–145. doi:10.1016/j.copbio.2015.08.015.
73. Gautier T, David-Le Gall S, Sweidan A, Tamanai-Shacoori Z, Jolivet-Gougeon A, Loréal O, Bousarghin L. Next-generation probiotics and their metabolites in COVID-19. *Microorganisms.* 2021;9(5):941–953. doi:10.3390/microorganisms9050941.
74. Peng J, Zhang M, Yao G, Kwok L-Y, Zhang W. Probiotics as adjunctive treatment for patients contracted COVID-19: current understanding and future needs. *Front Nutr.* 2021;8:669808–669812. doi:10.3389/fnut.2021.669808.
75. Steed AL, Christophi GP, Kaiko GE, Sun L, Goodwin VM, Jain U, Esaulova E, Artyomov MN, Morales DJ, Holtzman MJ, et al. The microbial metabolite desaminotyrosine protects from influenza through type I interferon. *Science.* 2017;357(6350):498–502. doi:10.1126/science.aam5336.
76. Swimm A, Giver CR, DeFilipp Z, Rangaraju S, Sharma A, Ulezko Antonova A, Sonowal R, Capaldo C, Powell D, Qayed M, et al. Indoles derived from intestinal microbiota act via type I interferon signaling to limit graft-versus-host disease. *Blood.* 2018;132(23):2506–2519. doi:10.1182/blood-2018-03-838193.
77. Meyerholz DK, Beck AP. Histopathologic evaluation and scoring of viral lung infection. *Methods Mol Biol.* 2020;2099:205–220.
78. Lamas B, Richard ML, Leducq V, Pham H-P, Michel M-L, Da Costa G, Bridonneau C, Jegou S, Hoffmann TW, Natividad JM, et al. CARD9 impacts colitis by altering gut microbiota metabolism of tryptophan into aryl hydrocarbon receptor ligands. *Nat Med.* 2016;22(6):598–605. doi:10.1038/nm.4102.
79. De Weirdt R, Possemiers S, Vermeulen G, Moerdijk-Poortvliet TCW, Boschker HTS, Verstraete W, Van de Wiele T. Human faecal microbiota display variable patterns of glycerol metabolism. *FEMS Microbiol Ecol.* 2010;74(3):601–611. doi:10.1111/j.1574-6941.2010.00974.x.

B. Publication n°2

Article en révision dans Nature Aging depuis le 14 septembre 2022.

Cette publication propose d'étudier la prédisposition chez les personnes âgées à développer des formes sévères de COVID-19. Cette sévérité accrue, également observée dans le modèle du hamster syrien doré âgé, est montrée comme associée à une accumulation de cellules sénescents. L'administration d'un sénolytique chez les hamsters âgés réduit efficacement le nombre de cellules sénescents dans le poumon ainsi que la sévérité de la COVID-19.

Au cours de cette étude, nous avons contribué aux choix des multiples options pour répondre à diverses problématiques et en particulier apporté notre expertise en histologie. En plus de visualiser *in situ* l'infection virale et les mécanismes suspectés, nous avons mis au point la technique du co-marquage en fluorescence sur coupe de tissu, notamment pour répondre à l'éditeur.

Removal of senescent cells reduces the viral load and attenuates pulmonary and systemic inflammation in SARS-CoV-2-infected, aged hamsters

Valentin Sencio¹, Lou Delval^{1*}, Jean Michel Flaman^{2*}, Aline Hantute-Ghesquier^{3*}, Larissa Lipskai^{4*}, Cyril Robil¹, Arnaud Machelart¹, Adeline Danneels¹, Lucie Deryuter¹, Fabiola Silva Angulo¹, Séverine Heumel¹, Ozmen Çobanoğlu¹, Karine Séron¹, Anne-Sophie Lacoste^{5,7}, Jean-Michel Saliou⁵, Philippe Gosset¹, Martine Duterque-Coquillaud³, Sandrine Belouzard¹, David Bernard^{2*}, Serge Adnot^{4*} and François Trottein¹

¹Univ. Lille, CNRS, INSERM, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019 - UMR 9017 - CIIL - Center for Infection and Immunity of Lille, F-59000 Lille, France

²Univ. Lyon, CNRS, INSERM, U1052 - UMR 5286, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Centre Léon Bérard, F- 69373 Lyon, France

³Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, UMR9020-U1277, Institut Pasteur de Lille-CANTHER-Cancer Heterogeneity Plasticity and Resistance to Therapies, F-59000 Lille, France

⁴Univ. Paris Est Créteil, INSERM U955, IMRB, F-94010 Créteil, France and AP-HP, Hôpital Henri Mondor, Département de Physiologie-Explorations Fonctionnelles, and FHU Senec, F-94010, Créteil, France

⁵Univ. Lille, CNRS, INSERM, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, US 41 - UAR 2014 - PLBS- Platforms Lille in Biology & Health) - UMS 2014 - US41, F-59000 Lille, France

*Equal contributions

Abstract

Older age is one of the strongest risk factors for COVID-19 morbidity and mortality. Here, we sought to determine whether age-associated cellular senescence contributes to the severity of COVID-19 by studying the well-established golden hamster model of SARS-CoV-2-driven lung disease. We found that aged hamsters (22 months of age) accumulate senescent cells in the lungs and that the senolytic drug ABT-263 depletes these cells at baseline and during a SARS-CoV-2 infection. Relative to young hamsters (2 months of age), aged hamsters had a greater viral load during the acute phase of infection and displayed higher levels of fibrosis and worse body weight recovery during the post-acute phase. Interestingly, early treatment with ABT-263 was associated with a significantly lower pulmonary viral load and an amelioration of COVID-19-like lung disease in aged (but not young) animals. ABT-263 treatment of aged animals was also associated with lower pulmonary and systemic levels of senescence-associated secretory phenotype factors. We conclude that the removal of senescent cells via treatment with a senolytic reduces the pathologic severity of SARS-CoV-2 infection in aged hamsters. As several senolytics have recently moved into early-stage clinical trials, our present findings have clear clinical relevance.

C. Publication n°3

Article en révision dans Cell Death & Disease depuis le 10 octobre 2022.

Cet article a mis en évidence l'impact de l'infection au SARS-CoV-2, en fonction de l'âge, sur le tissu adipeux sous-cutané chez le hamster. En effet, il a été montré que chez les hamsters jeunes et âgés, l'infection virale atteint le tissu adipeux et conduit à la mort de certains adipocytes, et de manière plus importante chez le hamster âgé. Chez les animaux jeunes, le tissu gras retrouve son intégrité, contrairement aux animaux âgés chez qui les dommages persistent. Ces derniers ont par ailleurs été associés à une perturbation du métabolisme lipidique.

Ces résultats apportent des données cruciales pour comprendre la susceptibilité des personnes âgées face à la COVID-19 et souligne l'impact de l'infection au SARS-CoV-2 sur l'organisme entier et ses fonctions.

Pour cette étude, nous avons participé à la réflexion, à la mise au point et à la faisabilité des expériences pour montrer *in situ* les dommages liés à l'infection virale. Le choix de multiples marqueurs a permis de confirmer la nature des dommages au sein du tissu gras.

SARS-CoV-2 infection induces persistent adipose tissue damage in aged golden Syrian hamsters

Gemma Bogard^{1*}, Johanna Barthelemy^{1*}, Aline Hantute-Ghesquier², Valentin Sencio¹, Karin Séron¹, Cyril Robil¹, Anne Flourens², Florence Pinet³, Delphine Eberlé⁴, François Trottein¹, Martine Duterque-Coquillaud², and Isabelle Wolowczuk¹

¹Univ. Lille, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Centre Hospitalier Universitaire de Lille (CHU Lille), Institut Pasteur de Lille, U1019 – UMR9017 – Center for Infection and Immunity of Lille (CIIL), F-59000 Lille, France

²Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, UMR9020 – U1277 – CANTHER – Cancer Heterogeneity Plasticity and Resistance to Therapies, F-59000 Lille, France

³Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1167 - RID-AGE - Facteurs de risque et déterminants moléculaires des maladies liées au vieillissement, F-59000 Lille, France

⁴Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1011 - EGID, F-59000 Lille, France

*Equal contribution

Abstract

Coronavirus disease 2019 (COVID-19, caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2)), is primarily a respiratory illness. However, various extrapulmonary manifestations have been reported in patients with severe forms of COVID-19. Notably, SARS-CoV-2 was shown to directly trigger white adipose tissue (WAT) dysfunction, which in turn drives insulin resistance, dyslipidemia and other adverse outcomes in COVID-19 patients. Although advanced age is the greatest risk factor for COVID-19 severity, published data on the impact of SARS-CoV-2 infection on WAT in aged individuals are scarce. Here, we characterized the response of subcutaneous and visceral WAT depots to SARS-CoV-2 infection in young adult and aged golden hamsters. In both age groups, infection was associated with a decrease in adipocyte size in the two WAT depots; this effect was partly due to changes in tissue's lipid metabolism and persisted for longer in aged hamsters than in young adult hamsters. In contrast, only the subcutaneous WAT depot contained crown-like structures (CLSs) in which dead adipocytes were surrounded by SARS-CoV-2-infected macrophages. Importantly, older age predisposed to a unique manifestation of viral disease in the subcutaneous WAT depot during SARS-CoV-2 infection; the persistence of very large CLSs was indicative of an age-associated defect in the clearance of dead adipocytes by macrophages. It remains to be seen whether the WAT's abnormal response to SARS-CoV-2 infection contributes to the greater severity of COVID-19 observed in elderly patients.

II. Curriculum vitae

Aline HANTUTE-GHESQUIER

26/01/1996

39 avenue Foubert, 59110 La Madeleine
ghesquier.aline@gmail.com | 06 05 01 26 01



Expériences professionnelles

- Juin 2020 - Maintenant
Thèse en biologie - Cancer de la prostate et Covid-19 : rôle des androgènes dans la régulation de l'expression de *TMPRSS2*, protéase majeure dans l'infection par le SARS-CoV-2, sous la direction du Dr Martine DUTERQUE-COQUILLAUD, UMR9020 CNRS - U1277 Inserm « TARGET », Oncolille, Lille (59).
- Juin 2019 - Mai 2020
Stage en laboratoire - Rôle du canal calcique TRPV6 dans la migration et invasion des cellules cancéreuses prostatiques, sous la tutelle du Dr V'yacheslav LEHEN'KYI, INSERM U1003 « Physiologie cellulaire », Villeneuve d'Ascq (59).
- Mai 2018 (2 semaines)
Stage en laboratoire - Etude de l'extravasation de cellules cancéreuses via un système microfluidique, sous la tutelle du Dr Chann LAGADEC, CNRS U908, Villeneuve d'Ascq (59).
- Janvier 2018 - Février 2018
Stage en laboratoire - Mécanisme de la fonction pro-apoptotique du récepteur MET, sous la tutelle du Dr David TULASNE, CNRS U8161, Lille (59).
- Juin 2017 - Août 2017
Stage en laboratoire - Rôle des protéines partenaires des canaux calciques dans le cancer de la prostate, sous la tutelle du Dr Loïc LEMONNIER, INSERM U1003 « physiologie cellulaire », Villeneuve d'Ascq (59).

Formations



2019 - Maintenant
**Doctorat en Biologie -
Université de Lille**

2017 - 2019
**Master Biologie Santé -
Université de Lille**

Mention Bien
Financement doctoral:
Université de Lille (3 ans),
classement 19/78
Master 2 : Parcours : « Oncologie
clinique et fondamentale ».
Master 1 : Parcours physiologie
et neurosciences intégrées.
Moyenne: 15.54/20
Classement: 2/46

2014 - 2017
**Licence Biologie Cellulaire et
Physiologie - Université de
Lille 1 et Paris Diderot**
Mention Bien

Compétences



Culture cellulaire et traitements
Techniques de biologies
cellulaire et moléculaire :
western blot, RT-qPCR
Immunohistochimie
Immunofluorescence

Logiciels bureautiques : Word,
Excel et Powerpoint
ImageJ et GraphPad Prism

Anglais

Publications



- Alteration of the gut microbiota following SARS-CoV-2 infection correlates with disease severity in hamsters. **Gut Microbes, 2022.** Sencio 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, Belouzard S, Briand F, Duterque-Coquillaud M, Sokol H, Trottein F.
- Monoclonal Antibodies Targeting Ion Channels and Their Therapeutic Potential. **Frontiers in Pharmacology, 2019.** Haustrate A, Hantute-Ghesquier A, Prevorskaya N, Lehen'kyi V.
- TRPM Family Channels in Cancer. **Pharmaceuticals, 2018.** Hantute-Ghesquier A, Haustrate A, Prevorskaya N, Lehen'kyi V.

En cours:

- En révision dans **Nature Aging:**

Removal of senescent cells reduces the viral load and attenuates pulmonary and systemic inflammation in SARS-CoV-2-infected, aged hamsters. Sencio V, Delval L*, Flaman JM*, Hantute-Ghesquier A*, Lipskaia L*, Robil C, Machelart A, Danneels A, Deruyter L, Silva Angulo F, Heumel S, Cobanoglu O, Seron K, Lacoste AS, Saliou JM, Gosset P, Duterque-Coquillaud M, Belouzard S, Bernard D, Adnot S, Trottein F.

*deuxième co-auteur

- En révision dans **Cell Death and Disease:**

SARS-CoV-2 infection induces persistent adipose tissue damage in aged golden Syrian hamsters. Bogard G*, Barthelemy J*, Hantute-Ghesquier A, Sencio V, Seron K, Robil C, Flourens A, Pinet F, Eberle D, Trottein F, Duterque-Coquillaud M, Wolowczuk I.

*Deuxième co-auteur

- En preparation:

Androgen lack accelerates covid-19 lung inflammation. Premier auteur.

Communications



- Journée scientifique de l'ARTP, Novembre 2022, Paris. Poster
- 1st ONCOLille Days, Novembre 2022, Lille. Poster
- Journées scientifiques Cancéropôle Nord Ouest, Mai 2022, Deauville. Communication orale
- Journées scientifiques Cancéropôle Nord Ouest, Octobre 2021, Deauville. Poster
- 1^{ère} journée de recherche : Signalisations Oncogéniques et canaux ioniques du Cancéropôle Nord-Ouest, Novembre 2018, Amiens. Poster
- Journée scientifique de l'ARTP, Novembre 2018, Paris. Poster
- 29th Ion Channel Meeting, 7th SFICT Workshop, Septembre 2018, Sète. Poster

BIBLIOGRAPHIE

- Ahn JH, Kim J, Hong SP, Choi SY, Yang MJ, Ju YS, et al. Nasal ciliated cells are primary targets for SARS-CoV-2 replication in the early stage of COVID-19. *J Clin Invest* [Internet]. 1 juill 2021 [cité 11 mai 2022];131(13). Disponible sur: <https://www.jci.org/articles/view/148517>
- Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. juill 2004;4(7):499-511.
- Ambrosino I, Barbagelata E, Ortona E, Ruggieri A, Massiah G, Giannico OV, et al. Gender differences in patients with COVID-19: a narrative review. *Monaldi Archives for Chest Disease* [Internet]. 25 mai 2020 [cité 21 juin 2020];90(2). Disponible sur: <https://www.monaldi-archives.org/index.php/macd/article/view/1389>
- Amgalan A, Malinowski AK, Othman M. COVID-19 and Sex-/Gender-Specific Differences: Understanding the Discrimination. *Semin Thromb Hemost*. juin 2021;47(04):341-7.
- Andrews N, Stowe J, Kirsebom F, Toffa S, Rickeard T, Gallagher E, et al. Covid-19 Vaccine Effectiveness against the Omicron (B.1.1.529) Variant. *N Engl J Med*. 21 avr 2022;386(16):1532-46.
- Asano T, Boisson B, Onodi F, Matuozzo D, Moncada-Velez M, Renkilaraj MRLM, et al. X-linked recessive TLR7 deficiency in ~1% of men under 60 years old with life-threatening COVID-19. *Science Immunology* [Internet]. 19 août 2021 [cité 24 août 2021];6(62). Disponible sur: <https://immunology.sciencemag.org/content/6/62/eabl4348>
- Asselta R, Paraboschi EM, Mantovani A, Duga S. ACE2 and TMPRSS2 variants and expression as candidates to sex and country differences in COVID-19 severity in Italy. *Aging (Albany NY)*. 5 juin 2020;12.
- Bao L, Deng W, Huang B, Gao H, Liu J, Ren L, et al. The pathogenicity of SARS-CoV-2 in hACE2 transgenic mice. *Nature*. juill 2020;583(7818):830-3.
- Baratchian M, McManus JM, Berk MP, Nakamura F, Mukhopadhyay S, Xu W, et al. Androgen regulation of pulmonary AR, TMPRSS2 and ACE2 with implications for sex-discordant COVID-19 outcomes. *Sci Rep*. 27 mai 2021;11(1):11130.
- Bastard P, Rosen LB, Zhang Q, Michailidis E, Hoffmann HH, Zhang Y, et al. Autoantibodies against type I IFNs in patients with life-threatening COVID-19. *Science* [Internet]. 23 oct 2020 [cité 24 août 2021];370(6515). Disponible sur: <https://science.sciencemag.org/content/370/6515/eabd4585>
- Batah SS, Fabro AT. Pulmonary pathology of ARDS in COVID-19: A pathological review for clinicians. *Respir Med*. janv 2021;176:106239.

- Bayati A, Kumar R, Francis V, McPherson PS. SARS-CoV-2 infects cells after viral entry via clathrin-mediated endocytosis. *Journal of Biological Chemistry* [Internet]. 1 janv 2021 [cité 10 mai 2022];296. Disponible sur: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(21\)00075-2/abstract](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(21)00075-2/abstract)
- Berghöfer B, Frommer T, Haley G, Fink L, Bein G, Hackstein H. TLR7 ligands induce higher IFN-alpha production in females. *J Immunol*. 15 août 2006;177(4):2088-96.
- Bialek S, Boundy E, Bowen V, Chow N, Cohn A, Dowling N, et al. Severe Outcomes Among Patients with Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) — United States, February 12–March 16, 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 27 mars 2020;69(12):343-6.
- Bolton EC, So AY, Chaivorapol C, Haqq CM, Li H, Yamamoto KR. Cell- and gene-specific regulation of primary target genes by the androgen receptor. *Genes Dev*. 15 août 2007;21(16):2005-17.
- Bourgoin P, Biéché G, Ait Belkacem I, Morange PE, Malergue F. Role of the interferons in CD64 and CD169 expressions in whole blood: Relevance in the balance between viral- or bacterial-oriented immune responses. *Immun Inflamm Dis*. mars 2020;8(1):106-23.
- Cadegiani FA, McCoy J, Gustavo Wambier C, Goren A. Early Antiandrogen Therapy With Dutasteride Reduces Viral Shedding, Inflammatory Responses, and Time-to-Remission in Males With COVID-19: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Interventional Trial (EAT-DUTA AndroCoV Trial - Biochemical). *Cureus*. 1 févr 2021a;13(2):e13047.
- Cadegiani FA, McCoy J, Gustavo Wambier C, Vaño-Galván S, Shapiro J, Tosti A, et al. Proxalutamide Significantly Accelerates Viral Clearance and Reduces Time to Clinical Remission in Patients with Mild to Moderate COVID-19: Results from a Randomized, Double-Blinded, Placebo-Controlled Trial. *Cureus* [Internet]. 22 févr 2021b [cité 21 avr 2022]; Disponible sur: <https://www.cureus.com/articles/52299-proxalutamide-significantly-accelerates-viral-clearance-and-reduces-time-to-clinical-remission-in-patients-with-mild-to-moderate-covid-19-results-from-a-randomized-double-blinded-placebo-controlled-trial>
- Cadegiani FA, Zimmerman RA, Fonseca DN, Correia MN, Muller MP, Bet DL, et al. Final Results of a Randomized, Placebo-Controlled, Two-Arm, Parallel Clinical Trial of Proxalutamide for Hospitalized COVID-19 Patients: A Multiregional, Joint Analysis of the Proxa-Rescue AndroCoV Trial. *Cureus* [Internet]. 25 déc 2021c [cité 10 juin 2022]; Disponible sur: <https://www.cureus.com/articles/80171-final-results-of-a-randomized-placebo-controlled-two-arm-parallel-clinical-trial-of-proxalutamide-for-hospitalized-covid-19-patients-a-multiregional-joint-analysis-of-the-proxa-rescue-androcov-trial>
- Cantuti-Castelvetri L, Ojha R, Pedro LD, Djannatian M, Franz J, Kuivanen S, et al. Neuropilin-1 facilitates SARS-CoV-2 cell entry and infectivity. *Science*. 13 nov 2020;370(6518):856-60.

- Cardoso RC, Puttabyatappa M, Padmanabhan V. Steroidogenic vs. metabolic programming of reproductive neuroendocrine, ovarian, and metabolic dysfunctions. *Neuroendocrinology*. 2015;102(3):226-37.
- CDC. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) [Internet]. Centers for Disease Control and Prevention. 2020 [cité 10 mai 2022]. Disponible sur: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/variants/variant-classifications.html>
- Chakravarty D, Nair SS, Hammouda N, Ratnani P, Gharib Y, Wagaskar V, et al. Sex differences in SARS-CoV-2 infection rates and the potential link to prostate cancer. *Communications Biology*. 8 juill 2020;3(1):1-12.
- Chan JFW, Yuan S, Zhang AJ, Poon VKM, Chan CCS, Lee ACY, et al. Surgical mask partition reduces the risk of non-contact transmission in a golden Syrian hamster model for Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Clin Infect Dis*. 30 mai 2020a;:ciaa644.
- Chan JFW, Zhang AJ, Yuan S, Poon VKM, Chan CCS, Lee ACY, et al. Simulation of the clinical and pathological manifestations of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in golden Syrian hamster model: implications for disease pathogenesis and transmissibility. *Clin Infect Dis* [Internet]. 26 mars 2020b [cité 17 juin 2020]; Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7184405/>
- Chen N, Zhou M, Dong X, Qu J, Gong F, Han Y, et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *The Lancet*. 15 févr 2020a;395(10223):507-13.
- Chen Y, Liu Q, Guo D. Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis. *J Med Virol*. avr 2020b;92(4):418-23.
- Cheung R, Shen F, Phillips JH, McGeachy MJ, Cua DJ, Heyworth PG, et al. Activation of MDL-1 (CLEC5A) on immature myeloid cells triggers lethal shock in mice. *J Clin Invest*. 1 nov 2011;121(11):4446-61.
- Christgen S, Kanneganti TD. Inflammasomes and the fine line between defense and disease. *Curr Opin Immunol*. févr 2020;62:39-44.
- Chupp G, Spichler-Moffarah A, Søgaard OS, Esserman D, Dziura J, Danzig L, et al. A Phase 2 Randomized, Double-Blind, Placebo-controlled Trial of Oral Camostat Mesylate for Early Treatment of COVID-19 Outpatients Showed Shorter Illness Course and Attenuation of Loss of Smell and Taste [Internet]. *Infectious Diseases (except HIV/AIDS)*; 2022 janv. Disponible sur: <http://medrxiv.org/lookup/doi/10.1101/2022.01.28.22270035>
- Clevers H. COVID-19: organoids go viral. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 1 juin 2020;1-2.
- Congy-Jolivet N, Cenac C, Dellacasagrande J, Puissant-Lubrano B, Apoil PA, Guedj K, et al. Monocytes are the main source of STING-mediated IFN- α production. *eBioMedicine* [Internet]. 1 juin 2022 [cité 22 juill 2022];80. Disponible sur:

[https://www.thelancet.com/journals/ebiom/article/PIIS2352-3964\(22\)00228-6/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/ebiom/article/PIIS2352-3964(22)00228-6/fulltext)

- Cornford P, van den Bergh RCN, Briers E, Van den Broeck T, Cumberbatch MG, De Santis M, et al. EAU-EANM-ESTRO-ESUR-SIOG Guidelines on Prostate Cancer. Part II-2020 Update: Treatment of Relapsing and Metastatic Prostate Cancer. *Eur Urol.* févr 2021;79(2):263-82.
- Criscuolo E, Giuliani B, Ferrari D, Ferrarese R, Diotti RA, Clementi M, et al. Proper Selection of In Vitro Cell Model Affects the Characterization of the Neutralizing Antibody Response against SARS-CoV-2. *Viruses.* 7 juin 2022;14(6):1232.
- Dai M, Liu D, Liu M, Zhou F, Li G, Chen Z, et al. Patients with Cancer Appear More Vulnerable to SARS-CoV-2: A Multicenter Study during the COVID-19 Outbreak. *Cancer Discov.* 2020a;10(6):783-91.
- Dai M, Liu D, Liu M, Zhou F, Li G, Chen Z, et al. Patients with Cancer Appear More Vulnerable to SARS-CoV-2: A Multicenter Study during the COVID-19 Outbreak. *Cancer Discov.* 2020b;10:783-91.
- Dalin MG, Watson PA, Ho AL, Morris LGT. Androgen Receptor Signaling in Salivary Gland Cancer. *Cancers (Basel).* 8 févr 2017;9(2):E17.
- Daly JL, Simonetti B, Klein K, Chen KE, Williamson MK, Antón-Plágaro C, et al. Neuropilin-1 is a host factor for SARS-CoV-2 infection. *Science.* 13 nov 2020;370(6518):861-5.
- Dambha-Miller H, Hinton W, Wilcox CR, Joy M, Feher M, de Lusignan S. Mortality in COVID-19 among women on hormone replacement therapy: a retrospective cohort study. *Family Practice.* 17 mai 2022;cmac041.
- D'Amico AV, Whittington R, Malkowicz SB, Schultz D, Blank K, Broderick GA, et al. Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer. *JAMA.* 16 sept 1998;280(11):969-74.
- De Gendt K, Verhoeven G. Tissue- and cell-specific functions of the androgen receptor revealed through conditional knockout models in mice. *Mol Cell Endocrinol.* 16 avr 2012;352(1-2):13-25.
- Dehm SM, Tindall DJ. Androgen receptor structural and functional elements: role and regulation in prostate cancer. *Mol Endocrinol.* déc 2007;21(12):2855-63.
- Deng Q, Rasool R ur, Russell RM, Natesan R, Asangani IA. Targeting androgen regulation of TMPRSS2 and ACE2 as a therapeutic strategy to combat COVID-19. *iScience.* mars 2021;102254.
- DePrimo SE, Diehn M, Nelson JB, Reiter RE, Matese J, Fero M, et al. Transcriptional programs activated by exposure of human prostate cancer cells to androgen. *Genome Biology.* 14 juin 2002;3(7):research0032.1.

- Dhakal S, Ruiz-Bedoya CA, Zhou R, Creisher PS, Villano JS, Littlefield K, et al. Sex Differences in Lung Imaging and SARS-CoV-2 Antibody Responses in a COVID-19 Golden Syrian Hamster Model. *mBio* [Internet]. août 2021 [cité 17 juin 2022];12(4). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8406232/>
- Diamond MS, Kanneganti TD. Innate immunity: the first line of defense against SARS-CoV-2. *Nat Immunol.* févr 2022;23(2):165-76.
- Ding EL, Song Y, Malik VS, Liu S. Sex differences of endogenous sex hormones and risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *JAMA.* 15 mars 2006;295(11):1288-99.
- Doehn JM, Tabeling C, Biesen R, Saccomanno J, Madlung E, Pappe E, et al. CD169/SIGLEC1 is expressed on circulating monocytes in COVID-19 and expression levels are associated with disease severity. *Infection.* 2021;49(4):757-62.
- Egevad L. Recent trends in Gleason grading of prostate cancer: I. Pattern interpretation. *Anal Quant Cytol Histol.* août 2008;30(4):190-8.
- Ehrmann DA, Barnes RB, Rosenfield RL, Cavaghan MK, Imperial J. Prevalence of impaired glucose tolerance and diabetes in women with polycystic ovary syndrome. *Diabetes Care.* janv 1999;22(1):141-6.
- Escobar-Morreale HF, Alvarez-Blasco F, Botella-Carretero JI, Luque-Ramírez M. The striking similarities in the metabolic associations of female androgen excess and male androgen deficiency. *Hum Reprod.* 10 oct 2014;29(10):2083-91.
- Essalmani R, Jain J, Susan-Resiga D, Andréo U, Evagelidis A, Derbali RM, et al. Distinctive Roles of Furin and TMPRSS2 in SARS-CoV-2 Infectivity. *Journal of Virology.* 28 mars 2022;96(8):e00128-22.
- Fang X, Li S, Yu H, Wang P, Zhang Y, Chen Z, et al. Epidemiological, comorbidity factors with severity and prognosis of COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *Aging (Albany NY).* 13 juill 2020;12(13):12493-503.
- Finkel Y, Mizrahi O, Nachshon A, Weingarten-Gabbay S, Morgenstern D, Yahalom-Ronen Y, et al. The coding capacity of SARS-CoV-2. *Nature.* janv 2021;589(7840):125-30.
- Fournier G, Valeri A, Mangin P, Cussenot O. [Prostate cancer. Epidemiology. Risk factors. Pathology]. *Ann Urol (Paris).* oct 2004;38(5):187-206.
- Frampton D, Rampling T, Cross A, Bailey H, Heaney J, Byott M, et al. Genomic characteristics and clinical effect of the emergent SARS-CoV-2 B.1.1.7 lineage in London, UK: a whole-genome sequencing and hospital-based cohort study. *The Lancet Infectious Diseases.* 1 sept 2021;21(9):1246-56.
- Gebhard C, Regitz-Zagrosek V, Neuhauser HK, Morgan R, Klein SL. Impact of sex and gender on COVID-19 outcomes in Europe. *Biol Sex Differ* [Internet]. 25 mai

2020 [cité 16 juin 2020];11. Disponible sur:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7247289/>

- Gedeborg R, Lindhagen L, Loeb S, Styrke J, Garmo H, Stattin P. Androgen deprivation therapy, comorbidity, cancer stage and mortality from COVID-19 in men with prostate cancer. *Scand J Urol*. 23 déc 2021;1-8.
- Ghosh S, Dellibovi-Ragheb TA, Kerviel A, Pak E, Qiu Q, Fisher M, et al. β -Coronaviruses Use Lysosomes for Egress Instead of the Biosynthetic Secretory Pathway. *Cell*. 10 déc 2020;183(6):1520-1535.e14.
- Graham LM, Gupta V, Schafer G, Reid DM, Kimberg M, Dennehy KM, et al. The C-type Lectin Receptor CLECSF8 (CLEC4D) Is Expressed by Myeloid Cells and Triggers Cellular Activation through Syk Kinase. *J Biol Chem*. 27 juill 2012;287(31):25964-74.
- Gray A, Berlin JA, McKinlay JB, Longcope C. An examination of research design effects on the association of testosterone and male aging: Results of a meta-analysis. *Journal of Clinical Epidemiology*. janv 1991a;44(7):671-84.
- Gray A, Feldman HA, McKinlay JB, Longcope C. Age, disease, and changing sex hormone levels in middle-aged men: results of the Massachusetts Male Aging Study. *J Clin Endocrinol Metab*. nov 1991b;73(5):1016-25.
- Gunst JD, Staerke NB, Pahus MH, Kristensen LH, Bodilsen J, Lohse N, et al. Efficacy of the TMPRSS2 inhibitor camostat mesilate in patients hospitalized with Covid-19-a double-blind randomized controlled trial. *EClinicalMedicine*. 22 avr 2021;35:100849.
- Hadjadj J, Yatim N, Barnabei L, Corneau A, Boussier J, Smith N, et al. Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients. *Science*. 7 août 2020;369(6504):718-24.
- Hammond J, Leister-Tebbe H, Gardner A, Abreu P, Bao W, Wisemandle W, et al. Oral Nirmatrelvir for High-Risk, Nonhospitalized Adults with Covid-19. *N Engl J Med*. 14 avr 2022;386(15):1397-408.
- Handelsman DJ. Androgen Physiology, Pharmacology, Use and Misuse. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, Chrousos G, de Herder WW, Dhatariya K, et al., éditeurs. *Endotext* [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000 [cité 20 mai 2022]. Disponible sur:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279000/>
- Hannah MF, Bajic VB, Klein SL. Sex differences in the recognition of and innate antiviral responses to Seoul virus in Norway rats. *Brain Behav Immun*. mai 2008;22(4):503-16.
- Harnichar AE, Zubiría MG, Giordano AP, Miguel I, Rey MA, Spinedi E, et al. Inhibitory effect of androgens on white adipose tissue thermogenic capacity. *Mol Cell Endocrinol*. 1 mars 2022;543:111542.

- Heath PT, Galiza EP, Baxter DN, Boffito M, Browne D, Burns F, et al. Safety and Efficacy of NVX-CoV2373 Covid-19 Vaccine. *N Engl J Med.* 23 sept 2021;385(13):1172-83.
- Heemers HV, Tindall DJ. Androgen receptor (AR) coregulators: a diversity of functions converging on and regulating the AR transcriptional complex. *Endocr Rev.* déc 2007;28(7):778-808.
- Hoffmann M, Kleine-Weber H, Pöhlmann S. A Multibasic Cleavage Site in the Spike Protein of SARS-CoV-2 Is Essential for Infection of Human Lung Cells. *Molecular Cell.* 21 mai 2020a;78(4):779-784.e5.
- Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell.* 2020b;181:271-280 8.
- Hoffmann M, Schroeder S, Kleine-Weber H, Müller MA, Drosten C, Pöhlmann S. Nafamostat Mesylate Blocks Activation of SARS-CoV-2: New Treatment Option for COVID-19. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 21 mai 2020d;64(6):e00754-20.
- Hofmann-Winkler H, Moerer O, Alt-Epping S, Bräuer A, Büttner B, Müller M, et al. Camostat Mesylate May Reduce Severity of Coronavirus Disease 2019 Sepsis: A First Observation. *Critical Care Explorations.* nov 2020;2(11):e0284.
- Holmes EC, Goldstein SA, Rasmussen AL, Robertson DL, Crits-Christoph A, Wertheim JO, et al. The origins of SARS-CoV-2: A critical review. *Cell.* 16 sept 2021;184(19):4848-56.
- Hou YJ, Okuda K, Edwards CE, Martinez DR, Asakura T, Dinnon KH, et al. SARS-CoV-2 Reverse Genetics Reveals a Variable Infection Gradient in the Respiratory Tract. *Cell.* 23 juill 2020;182(2):429-446.e14.
- Hsieh HP, Hsu JTA. Strategies of development of antiviral agents directed against influenza virus replication. *Curr Pharm Des.* 2007;13(34):3531-42.
- Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet.* 15 2020a;395(10223):497-506.
- Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet.* 15 2020b;395(10223):497-506.
- Huang JF, Shen J, Li X, Rengan R, Silvestris N, Wang M, et al. Incidence of patients with bone metastases at diagnosis of solid tumors in adults: a large population-based study. *Ann Transl Med.* avr 2020c;8(7):482.
- Hulswit RJG, de Haan CAM, Bosch BJ. Chapter Two - Coronavirus Spike Protein and Tropism Changes. In: Ziebuhr J, éditeur. *Advances in Virus Research* [Internet]. Academic Press; 2016 [cité 10 mai 2022]. p. 29-57. (Coronaviruses; vol. 96).

- Iba T, Levy JH, Levi M, Thachil J. Coagulopathy in COVID-19. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2020;18(9):2103-9.
- Imai M, Iwatsuki-Horimoto K, Hatta M, Loeber S, Halfmann PJ, Nakajima N, et al. Syrian hamsters as a small animal model for SARS-CoV-2 infection and countermeasure development. *PNAS*. 14 juill 2020;117(28):16587-95.
- Jiang D, Schaefer N, Chu HW. Air-Liquid Interface Culture of Human and Mouse Airway Epithelial Cells. *Methods Mol Biol*. 2018;1809:91-109.
- Jin JM, Bai P, He W, Wu F, Liu XF, Han DM, et al. Gender Differences in Patients With COVID-19: Focus on Severity and Mortality. *Front Public Health* [Internet]. 29 avr 2020 [cité 16 juin 2020];8. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7201103/>
- Jocher G, Grass V, Tschirner SK, Riepler L, Breimann S, Kaya T, et al. ADAM10 and ADAM17 promote SARS-CoV-2 cell entry and spike protein-mediated lung cell fusion. *EMBO Rep*. 8 mai 2022;e54305.
- Kanneganti TD. Intracellular innate immune receptors: Life inside the cell. *Immunol Rev*. sept 2020;297(1):5-12.
- Kaptein SJF, Jacobs S, Langendries L, Seldeslachts L, ter Horst S, Liesenborghs L, et al. Favipiravir at high doses has potent antiviral activity in SARS-CoV-2-infected hamsters, whereas hydroxychloroquine lacks activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 27 oct 2020;117(43):26955-65.
- Karki R, Sharma BR, Tuladhar S, Williams EP, Zalduondo L, Samir P, et al. Synergism of TNF- α and IFN- γ Triggers Inflammatory Cell Death, Tissue Damage, and Mortality in SARS-CoV-2 Infection and Cytokine Shock Syndromes. *Cell*. 7 janv 2021;184(1):149-168.e17.
- Kazan Ö, Çulpan M, Efiloğlu Ö, Atiş G, Yildirim A. The clinical impact of androgen deprivation therapy on SARS-CoV-2 infection rates and disease severity. *Turk J Urol*. nov 2021;47(6):495-500.
- Kezele TG. Androgen-driven COVID-19 infection – is testosterone an enemy or a friend? *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation* [Internet]. 29 juin 2020 [cité 6 août 2020];41(2). Disponible sur: <https://www.degruyter.com/view/journals/hmbci/41/2/article-20200027.xml>
- Khan M, Yoo SJ, Clijsters M, Backaert W, Vanstapel A, Speleman K, et al. Visualizing in deceased COVID-19 patients how SARS-CoV-2 attacks the respiratory and olfactory mucosae but spares the olfactory bulb. *Cell*. 24 nov 2021;184(24):5932-5949.e15.
- Klein EA, Li J, Milinovich A, Schold JD, Sharifi N, Kattan MW, et al. Androgen Deprivation Therapy in Men with Prostate Cancer Does Not Affect Risk of Infection with SARS-CoV-2. *J Urol*. févr 2021;205(2):441-3.

- Klein SL, Flanagan KL. Sex differences in immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2016;16(10):626-38.
- Klein SL, Jedlicka A, Pekosz A. The Xs and Y of immune responses to viral vaccines. *Lancet Infect Dis*. mai 2010;10(5):338-49.
- Klok FA, Kruip MJHA, Meer NJM van der, Arbous MS, Gommers D, Kant KM, et al. Confirmation of the high cumulative incidence of thrombotic complications in critically ill ICU patients with COVID-19: An updated analysis. *Thrombosis Research*. 1 juill 2020;191:148-50.
- Ko JY, Danielson ML, Town M, Derado G, Greenlund KJ, Kirley PD, et al. Risk Factors for Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)-Associated Hospitalization: COVID-19-Associated Hospitalization Surveillance Network and Behavioral Risk Factor Surveillance System. *Clin Infect Dis*. 1 juin 2021;72(11):e695-703.
- Koskinen M, Carpen O, Honkanen V, Seppänen MRJ, Miettinen PJ, Tuominen JA, et al. Androgen deprivation and SARS-CoV-2 in men with prostate cancer. *Ann Oncol*. oct 2020;31(10):1417-8.
- Kumari P, Rothan HA, Natekar JP, Stone S, Pathak H, Strate PG, et al. Neuroinvasion and Encephalitis Following Intranasal Inoculation of SARS-CoV-2 in K18-hACE2 Mice. *Viruses*. 19 janv 2021;13(1):132.
- Kwon DH, Vashisht R, Borno HT, Aggarwal RR, Small EJ, Butte AJ, et al. Androgen-deprivation therapy and SARS-CoV-2 in men with prostate cancer: findings from the University of California Health System registry. *Ann Oncol*. mai 2021;32(5):678-9.
- Lamy PJ, Rébillard X, Vacherot F, de la Taille A. Androgenic hormones and the excess male mortality observed in COVID-19 patients: new convergent data. *World J Urol [Internet]*. 2 juin 2020 [cité 21 juin 2020]; Disponible sur: <https://doi.org/10.1007/s00345-020-03284-y>
- Law RH, Zhang Q, McGowan S, Buckle AM, Silverman GA, Wong W, et al. An overview of the serpin superfamily. *Genome Biology*. 30 mai 2006;7(5):216.
- Leach DA, Mohr A, Giotis ES, Cil E, Isac AM, Yates LL, et al. The antiandrogen enzalutamide downregulates TMPRSS2 and reduces cellular entry of SARS-CoV-2 in human lung cells. *Nat Commun*. 1 juill 2021;12(1):4068.
- Lee KM, Heberer K, Gao A, Becker DJ, Loeb S, Makarov DV, et al. A Population-Level Analysis of the Protective Effects of Androgen Deprivation Therapy Against COVID-19 Disease Incidence and Severity. *Front Med (Lausanne)*. 2022;9:774773.
- Lemes RMR, Costa AJ, Bartolomeo CS, Bassani TB, Nishino MS, Pereira GJ da S, et al. 17 β -estradiol reduces SARS-CoV-2 infection in vitro. *Physiological Reports*. 2021;9(2):e14707.

- Li F, Han M, Dai P, Xu W, He J, Tao X, et al. Distinct mechanisms for TMPRSS2 expression explain organ-specific inhibition of SARS-CoV-2 infection by enzalutamide. *Nature Communications*. 8 févr 2021a;12(1):866.
- Li K, Meyerholz DK, Bartlett JA, McCray PB. The TMPRSS2 Inhibitor Nafamostat Reduces SARS-CoV-2 Pulmonary Infection in Mouse Models of COVID-19. *mBio*. 31 août 2021b;12(4):e0097021.
- Li M, Wang H, Tian L, Pang Z, Yang Q, Huang T, et al. COVID-19 vaccine development: milestones, lessons and prospects. *Sig Transduct Target Ther*. 3 mai 2022;7(1):1-32.
- Liang W, Guan W, Chen R, Wang W, Li J, Xu K, et al. Cancer patients in SARS-CoV-2 infection: a nationwide analysis in China. *Lancet Oncol*. mars 2020;21(3):335-7.
- Lippi G, Plebani M, Henry BM. Thrombocytopenia is associated with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19) infections: A meta-analysis. *Clinica Chimica Acta*. 1 juill 2020;506:145-8.
- Liu Q, You B, Meng J, Huang CP, Dong G, Wang R, et al. Targeting the androgen receptor to enhance NK cell killing efficacy in bladder cancer by modulating ADAR2/circ_0001005/PD-L1 signaling. *Cancer Gene Ther*. 1 août 2022;1-13.
- Locati LD, Perrone F, Cortelazzi B, Lo Vullo S, Bossi P, Dagrada G, et al. Clinical activity of androgen deprivation therapy in patients with metastatic/relapsed androgen receptor-positive salivary gland cancers. *Head Neck*. mai 2016;38(5):724-31.
- Lucas JM, Heinlein C, Kim T, Hernandez SA, Malik MS, True LD, et al. The Androgen-Regulated Protease TMPRSS2 Activates a Proteolytic Cascade Involving Components of the Tumor Microenvironment and Promotes Prostate Cancer Metastasis. *Cancer Discovery*. 2 nov 2014;4(11):1310-25.
- Lundstrom K. Viral Vectors for COVID-19 Vaccine Development. *Viruses*. 19 févr 2021;13(2):317.
- Maddaloni E, Buzzetti R. Covid-19 and diabetes mellitus: unveiling the interaction of two pandemics. *Diabetes Metab Res Rev*. 31 mars 2020;e33213321.
- Masters PS. The Molecular Biology of Coronaviruses. *Adv Virus Res*. 2006;66:193-292.
- Matsumoto T, Shiina H, Kawano H, Sato T, Kato S. Androgen receptor functions in male and female physiology. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. avr 2008;109(3-5):236-41.
- Matsuyama S, Nao N, Shirato K, Kawase M, Saito S, Takayama I, et al. Enhanced isolation of SARS-CoV-2 by TMPRSS2-expressing cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 31 mars 2020;117(13):7001-3.

- McCoy J, Goren A, Cadejani FA, Vaño-Galván S, Kovacevic M, Situm M, et al. Proxalutamide Reduces the Rate of Hospitalization for COVID-19 Male Outpatients: A Randomized Double-Blinded Placebo-Controlled Trial. *Front Med (Lausanne)*. 2021;8:668698.
- McEwan IJ, Brinkmann AO. Androgen Physiology: Receptor and Metabolic Disorders. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, Chrousos G, de Herder WW, Dhatariya K, et al., éditeurs. *Endotext* [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000 [cité 20 mai 2022]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279028/>
- Mehta P, McAuley DF, Brown M, Sanchez E, Tattersall RS, Manson JJ. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *The Lancet*. 28 mars 2020;395(10229):1033-4.
- Meng B, Ferreira IATM, Abdullahi A, Goonawardane N, Saito A, Kimura I, et al. SARS-CoV-2 Omicron spike mediated immune escape and tropism shift [Internet]. *bioRxiv*; 2022 janv p. 2021.12.17.473248. Disponible sur: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.12.17.473248v3>
- Menter T, Haslbauer JD, Nienhold R, Savic S, Hopfer H, Deigendesch N, et al. 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*. août 2020;77(2):198-209.
- Meyerholz DK, Beck AP. Histopathologic Evaluation and Scoring of Viral Lung Infection. *Methods Mol Biol*. 2020;2099:205-20.
- Mjaess G, Karam A, Aoun F, Albisinni S, Roumeguère T. COVID-19 and the male susceptibility: the role of ACE2, TMPRSS2 and the androgen receptor. *Progrès en Urologie* [Internet]. 22 mai 2020 [cité 6 juill 2020]; Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S116670872030186X>
- Mlcochova P, Kemp SA, Dhar MS, Papa G, Meng B, Ferreira IATM, et al. SARS-CoV-2 B.1.617.2 Delta variant replication and immune evasion. *Nature*. nov 2021;599(7883):114-9.
- Montopoli M, Zumerle S, Vettor R, Rugge M, Zorzi M, Catapano CV, et al. Androgen-deprivation therapies for prostate cancer and risk of infection by SARS-CoV-2: a population-based study (N = 4532). *Ann Oncol* [Internet]. 6 mai 2020 [cité 16 juin 2020]; Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7202813/>
- Mooradian AD, Morley JE, Korenman SG. Biological actions of androgens. *Endocr Rev*. févr 1987;8(1):1-28.
- Moradi F, Enjezab B, Ghadiri-Anari A. The role of androgens in COVID-19. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*. 1 nov 2020;14(6):2003-6.
- Mouffak S, Shubbar Q, Saleh E, El-Awady R. Recent advances in management of COVID-19: A review. *Biomed Pharmacother*. nov 2021;143:112107.

- Narni-Mancinelli É, Ugolini S, Vivier É. Les cellules natural killer - Adaptation et mémoire dans le système immunitaire inné. *Med Sci (Paris)*. 1 avr 2013;29(4):389-95.
- Nickols NG, Mi Z, DeMatt E, Biswas K, Clise CE, Huggins JT, et al. Effect of Androgen Suppression on Clinical Outcomes in Hospitalized Men With COVID-19: The HITCH Randomized Clinical Trial. *JAMA Netw Open*. 1 avr 2022;5(4):e227852.
- Oladunni FS, Park JG, Pino PA, Gonzalez O, Akhter A, Allué-Guardia A, et al. Lethality of SARS-CoV-2 infection in K18 human angiotensin-converting enzyme 2 transgenic mice. *Nat Commun*. 30 nov 2020;11(1):6122.
- Osterrieder N, Bertzbach LD, Dietert K, Abdelgawad A, Vladimirova D, Kunec D, et al. Age-Dependent Progression of SARS-CoV-2 Infection in Syrian Hamsters. *Viruses*. 20 juill 2020;12(7):779.
- Ou J, Lan W, Wu X, Zhao T, Duan B, Yang P, et al. Tracking SARS-CoV-2 Omicron diverse spike gene mutations identifies multiple inter-variant recombination events. *Sig Transduct Target Ther*. 26 avr 2022;7(1):1-9.
- Patel VG, Zhong X, Liaw B, Tremblay D, Tsao CK, Galsky MD, et al. Does androgen deprivation therapy protect against severe complications from COVID-19? *Annals of Oncology*. 1 oct 2020;31(10):1419-20.
- Ploussard G, Fiard G, Barret E, Brureau L, Créhange G, Dariane C, et al. French AFU Cancer Committee Guidelines - Update 2022-2024: prostate cancer - Diagnosis and management of localised disease. *Prog Urol*. nov 2022a;32(15):1275-372.
- Ploussard G, Roubaud G, Barret E, Beauval JB, Brureau L, Créhange G, et al. French AFU Cancer Committee Guidelines - Update 2022-2024: prostate cancer - Management of metastatic disease and castration resistance. *Progrès en Urologie*. 1 nov 2022b;32(15):1373-419.
- Port JR, Adney DR, Schwarz B, Schulz JE, Sturdevant DE, Smith BJ, et al. High-Fat High-Sugar Diet-Induced Changes in the Lipid Metabolism Are Associated with Mildly Increased COVID-19 Severity and Delayed Recovery in the Syrian Hamster. *Viruses*. 14 déc 2021;13(12):2506.
- Pozzilli P, Lenzi A. Commentary: Testosterone, a key hormone in the context of COVID-19 pandemic. *Metab Clin Exp*. 2020;108:154252.
- Pronzato P, Rondini M. Hormonotherapy of advanced prostate cancer. *Ann Oncol*. mai 2005;16 Suppl 4:iv80-84.
- Puneet P, Moochhala S, Bhatia M. Chemokines in acute respiratory distress syndrome. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. janv 2005;288(1):L3-15.
- Rathnasinghe R, Strohmeier S, Amanat F, Gillespie VL, Krammer F, García-Sastre A, et al. Comparison of transgenic and adenovirus hACE2 mouse models for SARS-CoV-2 infection. *Emerging Microbes & Infections*. 1 janv 2020;9(1):2433-45.

- RAU JC, BEAULIEU LM, HUNTINGTON JA, CHURCH FC. Serpins in thrombosis, hemostasis and fibrinolysis. *J Thromb Haemost.* juill 2007;5(Suppl 1):102-15.
- REMAP-CAP Investigators, ACTIV-4a Investigators, ATTACC Investigators, Goligher EC, Bradbury CA, McVerry BJ, et al. Therapeutic Anticoagulation with Heparin in Critically Ill Patients with Covid-19. *N Engl J Med.* 26 août 2021;385(9):777-89.
- Rubin MA, Maher CA, Chinnaiyan AM. Common gene rearrangements in prostate cancer. *J Clin Oncol.* 20 sept 2011;29(27):3659-68.
- Ryan KA, Bewley KR, Fotheringham SA, Slack GS, Brown P, Hall Y, et al. Dose-dependent response to infection with SARS-CoV-2 in the ferret model and evidence of protective immunity. *Nat Commun.* 4 janv 2021;12(1):81.
- Schreyer E, Barthélémy P, Cottard F, Ould Madi-Berthélémy P, Schaff-Wendling F, Kurtz JE, et al. Variants du récepteur des androgènes dans le cancer de la prostate. *Med Sci (Paris).* août 2017;33(8-9):758-64.
- Seamonds B, Yang N, Anderson K, Whitaker B, Shaw LM, Bollinger JR. Evaluation of prostate-specific antigen and prostatic acid phosphatase as prostate cancer markers. *Urology.* déc 1986;28(6):472-9.
- Sebag SC, Bastarache JA, Ware LB. Therapeutic Modulation of Coagulation and Fibrinolysis in Acute Lung Injury and the Acute Respiratory Distress Syndrome. *Curr Pharm Biotechnol.* sept 2011;12(9):1481-96.
- Seeland U, Coluzzi F, Simmaco M, Mura C, Bourne PE, Heiland M, et al. Evidence for treatment with estradiol for women with SARS-CoV-2 infection. *BMC Med.* 25 nov 2020;18(1):369.
- Sette A, Crotty S. Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. *Cell.* 18 févr 2021;184(4):861-80.
- Shah NJ, Patel VG, Zhong X, Pina L, Hawley JE, Lin E, et al. The Impact of Androgen Deprivation Therapy on COVID-19 Illness in Men With Prostate Cancer. *JNCI Cancer Spectr.* 2 mai 2022;6(3):pkac035.
- Shay DK, Gee J, Su JR, Myers TR, Marquez P, Liu R, et al. Safety Monitoring of the Janssen (Johnson & Johnson) COVID-19 Vaccine - United States, March-April 2021. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 7 mai 2021;70(18):680-4.
- Shi L, Lin H, Li G, Jin RA, Xu J, Sun Y, et al. Targeting Androgen Receptor (AR)→IL12A Signal Enhances Efficacy of Sorafenib Plus NK Cells-Immunotherapy to Better Suppress HCC Progression. *Mol Cancer Ther.* avr 2016;15(4):731-42.
- Shirato K, Kawase M, Matsuyama S. Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Infection Mediated by the Transmembrane Serine Protease TMPRSS2. *J Virol.* déc 2013;87(23):12552-61.

- Sia SF, Yan LM, Chin AWH, Fung K, Choy KT, Wong AYL, et al. Pathogenesis and transmission of SARS-CoV-2 in golden hamsters. *Nature*. 14 mai 2020;
- Simmons G, Gosalia DN, Rennekamp AJ, Reeves JD, Diamond SL, Bates P. Inhibitors of cathepsin L prevent severe acute respiratory syndrome coronavirus entry. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 16 août 2005;102(33):11876-81.
- Simonnet A, Chetboun M, Poissy J, Raverdy V, Noulette J, Duhamel A, et al. High Prevalence of Obesity in Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 (SARS-CoV-2) Requiring Invasive Mechanical Ventilation. *Obesity (Silver Spring)*. juill 2020;28(7):1195-9.
- Snijder EJ, Limpens RWAL, Wilde AH de, Jong AWM de, Zevenhoven-Dobbe JC, Maier HJ, et al. A unifying structural and functional model of the coronavirus replication organelle: Tracking down RNA synthesis. *PLOS Biology*. 8 juin 2020;18(6):e3000715.
- Spyropoulos AC, Goldin M, Giannis D, Diab W, Wang J, Khanijo S, et al. Efficacy and Safety of Therapeutic-Dose Heparin vs Standard Prophylactic or Intermediate-Dose Heparins for Thromboprophylaxis in High-risk Hospitalized Patients With COVID-19: The HEP-COVID Randomized Clinical Trial. *JAMA Intern Med*. 1 déc 2021;181(12):1612-20.
- Sung PS, Yang SP, Peng YC, Sun CP, Tao MH, Hsieh SL. CLEC5A and TLR2 are critical in SARS-CoV-2-induced NET formation and lung inflammation. *J Biomed Sci*. 11 juill 2022;29(1):52.
- Tang M, Gao S, Zhang L, Liu B, Li J, Wang Z, et al. Docetaxel suppresses immunotherapy efficacy of natural killer cells toward castration-resistant prostate cancer cells via altering androgen receptor-lectin-like transcript 1 signals. *The Prostate*. 2020;80(10):742-52.
- Tang M, Sun Y, Huang CP, Chen L, Liu B, You B, et al. High dose androgen suppresses natural killer cytotoxicity of castration-resistant prostate cancer cells via altering AR/circFKBP5/miRNA-513a-5p/PD-L1 signals. *Cell Death Dis*. 29 août 2022;13(8):1-12.
- Tegally H, Wilkinson E, Giovanetti M, Iranzadeh A, Fonseca V, Giandhari J, et al. Detection of a SARS-CoV-2 variant of concern in South Africa. *Nature*. avr 2021;592(7854):438-43.
- Thakur A, Roy A, Ghosh A, Chhabra M, Banerjee S. Abiraterone acetate in the treatment of prostate cancer. *Biomed Pharmacother*. mai 2018;101:211-8.
- Thépaut M, Luczkowiak J, Vivès C, Labiod N, Bally I, Lasala F, et al. DC/L-SIGN recognition of spike glycoprotein promotes SARS-CoV-2 trans-infection and can be inhibited by a glycomimetic antagonist. *PLOS Pathogens*. 20 mai 2021;17(5):e1009576.
- Thorne LG, Reuschl AK, Zuliani-Alvarez L, Whelan MVX, Turner J, Noursadeghi M, et al. SARS-CoV-2 sensing by RIG-I and MDA5 links epithelial infection to macrophage inflammation. *EMBO J*. 2 août 2021;40(15):e107826.

- Thunders M, Delahunt B. Gene of the month: TMPRSS2 (transmembrane serine protease 2). *J Clin Pathol*. 1 sept 2020;
- Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, Dhanasekaran SM, Mehra R, Sun XW, et al. Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science*. 28 oct 2005;310(5748):644-8.
- Tostanoski LH, Wegmann F, Martinot AJ, Loos C, McMahan K, Mercado NB, et al. Ad26 vaccine protects against SARS-CoV-2 severe clinical disease in hamsters. *Nat Med*. 3 sept 2020;
- Tratner I. SRAS : 1. Le virus. *Med Sci (Paris)*. 1 août 2003;19(8-9):885-91.
- Treppiedi D, Marra G, Di Muro G, Catalano R, Mangili F, Esposito E, et al. TMPRSS2 Expression and Activity Modulation by Sex-Related Hormones in Lung Calu-3 Cells: Impact on Gender-Specific SARS-CoV-2 Infection. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022;13:862789.
- Tse BWC, Volpert M, Ratther E, Stylianou N, Nouri M, McGowan K, et al. Neuropilin-1 is upregulated in the adaptive response of prostate tumors to androgen-targeted therapies and is prognostic of metastatic progression and patient mortality. *Oncogene*. 15 juin 2017;36(24):3417-27.
- Tufan A, Avanoğlu Güler A, Matucci-Cerinic M. COVID-19, immune system response, hyperinflammation and repurposing antirheumatic drugs. *Turk J Med Sci*. 21 avr 2020;50(SI-1):620-32.
- Villacres MC, Longmate J, Auge C, Diamond DJ. Predominant type 1 CMV-specific memory T-helper response in humans: evidence for gender differences in cytokine secretion. *Hum Immunol*. mai 2004;65(5):476-85.
- Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol*. mai 2008;9(5):503-10.
- Volz E, Mishra S, Chand M, Barrett JC, Johnson R, Geidelberg L, et al. Assessing transmissibility of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England. *Nature*. mai 2021;593(7858):266-9.
- Voysey M, Clemens SAC, Madhi SA, Weckx LY, Folegatti PM, Aley PK, et al. Safety and efficacy of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine (AZD1222) against SARS-CoV-2: an interim analysis of four randomised controlled trials in Brazil, South Africa, and the UK. *Lancet*. 9 janv 2021;397(10269):99-111.
- van Weerden WM, Bierings HG, van Steenbrugge GJ, de Jong FH, Schröder FH. Adrenal glands of mouse and rat do not synthesize androgens. *Life Sci*. 1992;50(12):857-61.
- Welén K, Rosendal E, Gisslén M, Lenman A, Freyhult E, Fonseca-Rodríguez O, et al. A Phase 2 Trial of the Effect of Antiandrogen Therapy on COVID-19 Outcome: No Evidence of Benefit, Supported by Epidemiology and In Vitro Data. *European Urology*. 1 mars 2022;81(3):285-93.

- Wu Z, McGoogan JM. Characteristics of and Important Lessons From the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China: Summary of a Report of 72 314 Cases From the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *JAMA*. 7 avr 2020;323(13):1239-42.
- Yuan L, Zhu H, Zhou M, Ma J, Chen R, Chen Y, et al. Gender associates with both susceptibility to infection and pathogenesis of SARS-CoV-2 in Syrian hamster. *Signal Transduct Target Ther*. 31 mars 2021;6(1):136.
- Zang R, Gomez Castro MF, McCune BT, Zeng Q, Rothlauf PW, Sonnek NM, et al. TMPRSS2 and TMPRSS4 promote SARS-CoV-2 infection of human small intestinal enterocytes. *Sci Immunol*. 13 mai 2020;5(47):eabc3582.
- Zhang Y, Zeng G, Pan H, Li C, Hu Y, Chu K, et al. Safety, tolerability, and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine in healthy adults aged 18-59 years: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1/2 clinical trial. *Lancet Infect Dis*. févr 2021;21(2):181-92.
- Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med*. 20 2020;382(8):727-33.
- Zhuravel SV, Khmel'nitskiy OK, Burlaka OO, Gritsan AI, Goloshchekin BM, Kim S, et al. Nafamostat in hospitalized patients with moderate to severe COVID-19 pneumonia: a randomised Phase II clinical trial. *EClinicalMedicine*. nov 2021;41:101169.