



HAL
open science

Mécanismes des pertes de l'odorat associées à la COVID-19 sur le modèle hamster doré syrien

Clara Bourgon

► **To cite this version:**

Clara Bourgon. Mécanismes des pertes de l'odorat associées à la COVID-19 sur le modèle hamster doré syrien. Immunité innée. Université Paris-Saclay, 2023. Français. NNT : 2023UPASB083 . tel-04504473

HAL Id: tel-04504473

<https://pastel.hal.science/tel-04504473v1>

Submitted on 14 Mar 2024

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.

Mécanismes des pertes de l'odorat associées à la COVID-19 sur le modèle hamster doré syrien

Mechanisms of smell loss in COVID-19 using the Syrian golden hamster

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n° 581 Agriculture, Alimentation, Biologie, Environnement, Santé
(ABIES)

Spécialité de doctorat : Microbiologie
Graduate School : Biosphera. Référent : AgroParisTech

Thèse préparée dans l'UMR **VIM (Université Paris-Saclay, UVSQ, INRAE)** sous la
direction de **Nicolas MEUNIER, Directeur de recherche.**

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 14 décembre 2023, par

Clara BOURGON

Composition du Jury

Membres du jury avec voix délibérative

Sophie LE PODER

Professeure, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort

Présidente

Réjane RUA

Chargée de Recherche (HDR), INSERM (AMU)

Rapporteur & Examinatrice

Hirac GURDEN

Directeur de Recherche, CNRS (Université Paris Cité)

Rapporteur & Examineur

Xavier MONTAGUTELLI

Directeur de Recherche, Institut Pasteur (Université Paris-Saclay)

Examineur

Vincent PREVOT

Directeur de Recherche, INSERM (Université de Lille)

Examineur

Titre : Mécanismes des pertes de l'odorat associées à la COVID-19 sur le modèle hamster doré syrien

Mots clés : odorat, épithélium olfactif, neutrophiles, immunité innée, dommages épithéliaux, régénération.

Résumé : Pendant la pandémie de COVID-19, la prévalence des pertes de l'odorat a atteint près de 50 % des patients infectés par le SARS-CoV-2, ce qui est bien supérieur à celles observées dans les autres infections respiratoires. Cela soulève la question des mécanismes de ces pertes de l'odorat associés à la COVID-19. L'épithélium olfactif est le tissu responsable de la détection des odeurs. Il est composé principalement de neurones olfactifs entourés par des cellules sustentaculaires. Des cellules basales sont responsables de sa régénération. D'après d'autres travaux, les cellules sustentaculaires sont les principales cibles de l'infection par le SARS-CoV-2 dans l'épithélium olfactif. Leur infection est suivie par une desquamation massive du tissu corrélée avec les pertes olfactives.

La compréhension des mécanismes de cette desquamation de l'épithélium olfactif est donc cruciale pour connaître les origines de cette anosmie. Cette question a été abordée dans la première partie de ma thèse. Nous avons pu tout d'abord montrer que la présence de dommages dans l'épithélium olfactif est corrélée avec l'infiltration de cellules de l'immunité innée. Plus précisément, nous avons pu démontrer que les neutrophiles et les protéases qu'ils sécrètent jouent un rôle central dans la desquamation de l'épithélium olfactif.

Chez environ 10 % des patients atteints par la COVID-19, les pertes de l'odorat perdurent plus de 6 mois après le diagnostic. L'origine de ces anosmies longues est encore peu connue. On peut supposer que ces pertes de l'odorat à long terme sont associées à des altérations de la régénération de l'épithélium olfactif. Toutefois, d'autres études observent plutôt un dérèglement de l'expression des gènes exprimés par les neurones olfactifs. Dans la deuxième partie de ma thèse, je me suis donc focalisée sur le suivi de la régénération et des populations neuronales de l'épithélium olfactif suite à l'infection par le SARS-CoV-2. Nous avons montré que les populations neuronales sont fortement impactées par l'infection et que cet impact perdure bien après la résolution de l'infection dans la cavité nasale. De plus, la régénération de ces populations est perturbée avec de fortes disparités spatiales associées à une inflammation persistante.

Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus chez l'homme dans la littérature et devraient donc permettre d'envisager des pistes thérapeutiques pour les troubles olfactifs liés aux infections virales.

Title : Mechanisms of smell loss in COVID-19 using the Syrian golden hamster

Keywords : smell, olfactory epithelium, neutrophils, innate immunity, epithelial damage, regeneration.

Abstract : During the COVID-19 pandemic, the prevalence of smell loss reached almost 50% of patients infected with SARS-CoV-2, which is much higher than that observed in other respiratory infections. This raises the question of the mechanisms of smell loss associated with COVID-19. The olfactory epithelium is the tissue responsible for odor detection. It is composed mainly of olfactory neurons surrounded by sustentacular cells which are the main targets of SARS-CoV-2 infection. This infection is followed by massive desquamation of the tissue correlated with olfactory losses.

Understanding the mechanisms of desquamation of the olfactory epithelium is crucial for understanding the origin of anosmia. This question has been addressed in the first part of my thesis. We were first able to show a correlation between the presence of damage in the olfactory epithelium and the infiltration of innate immune cells. More precisely, neutrophils and the proteases that they secrete play a major role in the destruction of olfactory epithelium.

Olfactory loss lasts more than 6 months in around 10% of the patients infected with SARS-CoV-2. The origin of these long-term anosmia is still obscure. It can be assumed that long-term loss of smell is associated with impaired regeneration of the olfactory epithelium, however other studies observed instead a dysregulation of the expression of genes in olfactory neurons. In the second part of my thesis, I focused on the monitoring of regeneration and of neuronal populations in the olfactory epithelium after SARS-CoV-2 infection. We showed that neuronal populations are strongly impacted and that this impact persists even after the resolution of the infection in the nasal cavity. Moreover, the regeneration of these populations is disrupted with strong spatial disparities associated with persistent inflammation.

These results are consistent with literature data in humans and should therefore make it possible to consider therapeutic avenues for olfactory disorders linked to viral infections.

Remerciements

Je souhaiterais remercier chaleureusement les membres de ce jury de thèse : **Réjane Rua** et **Hirac Gurden** en tant que rapporteurs et **Sophie Le Poder**, **Vincent Prévot** et **Xavier Montagutelli** en tant qu'examineurs d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Je tiens également à remercier les membres du comité de suivi de thèse ayant suivi mes travaux, c'est-à-dire **Catherine Chapon**, **Sophie Le Poder**, **Fabrizio Mammano**, **Jérôme Estaquier** et **Ronan Le Goffic**, pour leurs conseils avisés.

Je voudrais également remercier le **DIM1Health** qui a financé ces travaux de thèse.

Je souhaiterais également remercier l'ensemble de **l'unité Virologie et Immunologie Moléculaires (VIM)** et **Sabine Riffault**, sa directrice pour leur accueil très chaleureux et pour m'avoir permis de réaliser ces travaux de thèse dans de bonnes conditions.

J'aimerais également remercier l'équipe **Coronavirus** dans son ensemble pour leur aide dans mes travaux de thèse et dans mes présentations et pour leur accueil chaleureux.

Je tiens tout particulièrement à remercier mon directeur de thèse, **Nicolas Meunier**. Un immense merci pour ces trois années de recherche qui m'ont énormément enrichie. Tu m'as permis de participer à de nombreux travaux de recherche et le milieu que tu entretiens dans l'équipe est extrêmement stimulant et agréable. Merci beaucoup pour les discussions scientifiques que nous avons entretenues et qui m'ont permis de m'ouvrir à un autre domaine que l'immunologie et la virologie, la neurologie sur lequel j'avais très peu de connaissances. Un grand merci aussi pour ta grande bienveillance dans ton encadrement qui m'a permis d'aborder cette thèse dans les meilleures conditions. J'espère que nous pourrons rester en contact.

J'aimerais aussi remercier particulièrement **Audrey Saint-Albin Deliot**, **Bruno da Costa** et **Ophélie Ando-Grard** pour leur aide précieuse dans la réalisation des expériences. J'aimerais surtout remercier **Audrey** de m'avoir formé aux différentes techniques d'histologie qui m'étaient inconnues avant de rentrer dans le laboratoire. J'aimerais remercier **Bruno da Costa** de m'avoir formé aux manipulations en L3. Nos discussions musique vont me manquer aussi. J'aimerais vous remercier également pour votre amitié et vos conseils. J'aimerais également remercier **Bertrand Bryche** et **Georges Saade** pour leurs conseils et leur aide dans mon intégration au laboratoire. J'aimerais aussi remercier **Bertrand Bryche** et **Laëtitia Merle Nguyen** pour leur aide dans la rédaction de scripts d'analyse sur ImageJ.

Je tiens aussi à remercier **Sophie Le Poder** et **Bernard Klonjowski** pour leur accueil dans l'animalerie A3 de Maisons-Alfort, ce qui nous a permis de réaliser l'ensemble des expériences qui ont été abordées dans ces 3 études. Un grand merci à **Sophie Le Poder** également pour m'avoir conviée à faire des titrages viraux dans le L3 de Maisons-Alfort. Merci infiniment de m'avoir appris le protocole des TCID₅₀.

J'aimerais également remercier nos collaborateurs de l'Université de Tours **Brice Korkmaz** et **Roxane Domain** pour nous avoir fourni les inhibiteurs de cathepsine et pour avoir effectué des mesures d'efficacité de ces inhibiteurs sur les hamsters que nous avons utilisé dans cette expérience.

Un grand merci à **Marie Galloux** pour nous avoir fourni des souris pour des expériences préliminaires avec le virus RSV.

J'aimerais aussi remercier **Vinciane Saint-Criq** de l'Unité Micalis avec laquelle l'équipe va collaborer par la suite pour faire des modèles d'épithélium olfactive à l'interface air-liquide et qui a accepté de s'associer avec nous sur ce projet. De plus, un grand merci à **Claudia Bevilacqua** pour la collaboration sur l'inflammation locale.

J'aimerais aussi remercier l'école doctorale et notamment mon référent Paul Larraufie pour son suivi de mes travaux de thèse.

Léna Kleij, Mélissa Bessonne, Soraya Dinant, Elise Bruder, Mantasha Khan, Joëlton Gomes, Hortense Decool, Lorène Gonnin, nous avons toutes partagées une thèse à la VIM. Je vous remercie de tout coeur pour votre amitié et votre soutien au cours de cette thèse. J'espère que nous pourrons rester en contact.

Alexandre Bouffier et **Paul Irtelli** : j'espère avoir pu vous être utile dans vos stages et je suis très contente de vous avoir rencontrés. Vous m'avez aussi appris beaucoup. Bonne chance pour ta thèse au plat pays Alexandre et j'espère que tu pourras avoir une thèse avec Nicolas l'année prochaine Paul.

J'aimerais enfin remercier ma famille pour le soutien qu'ils m'ont apporté tout au cours de cette aventure qu'est la thèse.

2.1.2.2.	Recrutement de ces cellules de la lignée hématopoïétique dans les tissus inflammés.	41
2.1.2.2.1.	Le mécanisme de recrutement des cellules immunitaires : la diapédèse.....	41
2.1.2.2.2.	Migration des neutrophiles dans le tissu et activation de leurs fonctions effectrices.	44
2.1.2.2.3.	Différenciation des monocytes en macrophage et polarisation en macrophages M1 ou M2.	45
2.1.3.	Maintien de l'inflammation, activité microbicide et initiation de la réponse immunitaire adaptative par les neutrophiles et les macrophages pro-inflammatoires.	46
2.2.	Inflammation, cellules immunitaires innées et dommages tissulaires.....	49
2.2.1.	Une libération de substances toxiques pour les cellules.....	50
2.2.2.	Une libération de protéases pouvant entraîner une désorganisation du tissu.	51
2.2.2.1.	Libération de métalloprotéases de matrice par les neutrophiles et les macrophages dans le milieu extracellulaire.	51
2.2.2.2.	Libération des serprocidines neutrophilaires (élastase, cathepsine G et protéinase 3) dans le milieu extracellulaire.....	52
3.	Cas particulier de l'anosmie associée à la COVID-19 : quels en sont les mécanismes.....	54
3.1.	Le SARS-CoV-2, présentation du virus et des modèles utilisés pour son étude	54
3.1.1.	Présentation du SARS-CoV-2.....	54
3.1.2.	Cycle viral du SARS-CoV-2.	57
3.1.3.	Modèles animaux utilisés pour l'étude de l'infection par le SARS-CoV-2.....	63
3.2.	Infection par le SARS-CoV-2 dans l'épithélium olfactif et origine de l'anosmie ?	68
3.2.1.	Tropisme du SARS-CoV-2 dans le système olfactif.	68
3.2.2.	Dommages à l'épithélium olfactif et origine de l'anosmie associée à la COVID-19.	71
Résultats	75
1.	Article 1 : la destruction de l'épithélium olfactif suite à l'infection par le SARS-CoV-2 est principalement causée par l'action des protéases neutrophilaires.	75
2.	Article 2 : La régénération de l'épithélium olfactif suite à l'infection par le SARS-CoV-2 est retardée et perturbée.	108
3.	Article 3 : Lien entre inflammation et régénération des population neuronales.	138
Discussion et perspectives.	167
1.	L'activité des neutrophiles est cruciale dans la desquamation de l'épithélium olfactif	167
2.	A propos des causes des pertes de l'odorat pendant l'infection aiguë.	170
3.	Des perturbations de la régénération de l'épithélium olfactif après l'infection par le SARS-CoV-2 : un lien avec le COVID long ?	172
Conclusion	179
Références.	182

Liste des abréviations

SARS-CoV-2 : Severe Acute Respiratory Syndrome-Coronavirus 2.

COVID-19 : Coronavirus Disease 2019.

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

VNO : Organe Voméronasal.

GPCR : Récepteurs couplés aux protéines G.

TAAR : Trace Amine-Associated Receptors.

AMPc : Adénosine Monophosphate cyclique.

CNGA2 : Cyclic Nucleotide Gated Channel Subunit Alpha 2.

CK5/CK14/CK18 : Cytokératine 5/ Cytokératine 14 / Cytokératine 18.

N-CAM : Neural Cell Adhesion Molecule.

LIF : Leukemia Inhibitory Factor.

GDF11 : Growth and Differentiation Factor 11

GAP43 : Growth Associated Protein 43

AC3 : Adénylate cyclase 3.

OMP : Olfactory Marker Protein.

GnRH : Gonadotrophin Release Hormone.

CX3CR1 : CX3C-motif Chemokine Receptor 1.

PRR : Pattern Recognition Receptor.

PAMP : Pathogen Associated Molecular Pattern.

DAMP : Damage Associated Molecular Pattern.

CSF1R : Colony Stimulating Factor 1 Receptor.

CD-- : Cluster of Differentiation --.

MMP : Métalloprotéase de matrice

ROS/RNS : Reactive Oxygen Species/ Reactive Nitrogen Species.

IL- : interleukine.

IFN : interféron

CXCL- : CXC-motif Chemokine Ligand-.

CCL- : CC-motif Chemokine Ligand-.

LFA-1 : Leucocyte Function-associated Antigen 1.

MAC-1 : Macrophage 1 antigen.

ICAM- : Intercellular Adhesion Molecule

VCAM-1 : Vascular Cell adhesion Molecule 1.

VLA-4 : Very Late Antigen 4.

PECAM-1 : Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule 1.

JAM : Junctional Adhesion Molecules.

ISG : Interferon Stimulated Genes

CMH I ou CMH II : Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe II

IRF5 : Interferon Regulating Factor 5

GM-CSF : Granulocyte-macrophage colony stimulating factor.

NET : Neutrophil Extracellular Traps.

TNF : Tumor Necrosis Factor

TGF : Transforming Growth Factor

EGF : Epidermal Growth Factor

ACE2 : Angiotensin-converting enzyme 2

TMPRSS2 : Transmembrane Serine Protease 2.

OR : Récepteur olfactif.

Contexte et objectifs.

Ma thèse s'inscrit dans le cadre de la pandémie de COVID-19 (*Coronavirus Disease 2019*), causée par le *Coronavirus* émergent SARS-CoV-2 (*Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2*)^{1,2}. Ce dernier est apparu en fin d'année 2019 à Wuhan, dans la province de Hubei en Chine et s'est propagé dès mars 2020 dans le monde entier, date à laquelle l'épidémie de COVID-19 a été déclarée pandémie par l'OMS³. Il a très rapidement constitué un enjeu de santé publique important, étant donné sa forte pathogénicité, sa haute transmissibilité et la présence de nombreux patients asymptomatiques. En effet, sur toute la pandémie, le taux de mortalité moyen était compris entre 1 et 2%⁴. De plus, le taux de reproduction des premières souches de SARS-CoV-2 (R0) (nombre de personnes contaminées par une seule personne infectée) est de l'ordre de 2.5⁵. Le taux de reproduction du virus a ensuite fortement augmenté atteignant 5 pour le variant Delta et 9.5 pour le variant Omicron^{6,7}. Ces données sont en accord avec une transmission très efficace et une propagation très rapide du virus chez l'Homme. Cette transmission est d'autant plus importante qu'elle est maximale avant même le début des symptômes, et donc avant l'isolement social lié à la maladie⁴. Enfin, environ 30 % des patients atteints par la COVID-19 présentent des formes entièrement asymptomatiques^{4,8,9}. Ces patients sont néanmoins capables de transmettre le virus à d'autres individus, même si cette capacité est moindre que celle des individus symptomatiques^{8,9}.

La COVID-19 est principalement une infection respiratoire avec comme principaux symptômes une fièvre, une toux, une dyspnée et une pneumonie, qui peut aller dans de rares cas graves jusqu'à la mort^{10,11}. Pourtant la COVID-19 n'est pas exclusivement respiratoire puisque de nombreux symptômes extra-pulmonaires ont également pu être observés. En effet, des symptômes digestifs et neurologiques sont relativement fréquents chez les patients infectés. Chez les patients atteints par la COVID-19, des nausées, des vomissements et des diarrhées ont pu être constatés¹². En ce qui concerne les symptômes neurologiques, une forte proportion de patients développent des pertes du goût et de l'odorat, des maux de tête, des fatigues et des pertes d'attention. Dans certains cas graves, les patients présentent des méningites, des encéphalites, des syndromes de Guillain-Barré, des altérations cognitives et des AVCs¹³. L'âge et certaines maladies préexistantes comme l'hypertension, le diabète et les maladies cardio-vasculaires ou rénales sont des facteurs de risque majeurs pour le développement d'une COVID-19 sévère¹⁴.

De plus, plus de 3 mois après le diagnostic et donc bien après la clairance virale, certains patients se plaignent de symptômes à long terme qui ont été décrits comme des COVID longs dans la littérature^{15,16}. Les symptômes systémiques et neurologiques sont majoritaires dans ces COVID longs avec notamment des fatigues, des maux de tête, des dyspnées, des bradycardies, des étourdissements,

des brouillards mentaux, des insomnies et des problèmes de mémorisation^{15,16}. Même si les pertes de l'odorat se résolvent en moyenne en 28 jours, certains patients présentent également des pertes de l'odorat (anosmies et hyposmies) à long terme¹⁶⁻¹⁸. Des distortions de l'odorat, définis précisément dans le paragraphe **1.2.**, comme la parosmie, sont également observées à moyen ou long terme après l'infection par le SARS-CoV-2¹⁸⁻²⁰. Ces observations font également des dysfonctionnements de l'odorat un symptôme fortement observé pendant le COVID long.

Au cours de ma thèse, je me suis intéressée uniquement aux pertes olfactives observées lors de l'infection par le SARS-CoV-2. Nous allons donc un peu plus développer les données étiologiques obtenues sur ce symptôme. Les pertes de l'odorat lors de l'infection de la COVID-19 sont très fréquentes (près de 50 % des cas de COVID-19)^{13,17,21,22}. Une étude de challenge viral réalisée par des Britanniques confirme cette prévalence importante de l'anosmie. Ces auteurs ont infecté 32 patients avec 10 particules virales. 16 d'entre eux ont développé une infection par le SARS-CoV-2. Parmi ces 16 personnes, 8 d'entre elles développent une anosmie¹⁷. Cette étude va même plus loin et montrent que parmi les 16 patients malades suivis, 15 d'entre eux subissent des dysfonctionnements de l'odorat sans qu'il y ait de perte totale de celui-ci¹⁷. Cela suggère que l'impact du SARS-CoV-2 sur la fonction olfactive des individus pourrait être beaucoup plus importante que ce qui est actuellement rapporté. Au moins un an après l'infection par le SARS-CoV-2, d'après une étude italienne, environ 7 % des patients continuent à se plaindre d'une anosmie^{18,23}. Dans la même étude, il a été également estimé qu'environ la moitié des patients atteints par la COVID-19 souffrent de dysfonctionnements de l'odorat plus d'un an après l'infection^{18,23}. De plus, un quart des patients atteints par la COVID-19 présentent des parosmies suite à une infection par la COVID-19^{19,20}. Ces parosmies seraient plutôt observées à moyen terme étant donné que leur donnée moyenne a été estimée à 2 mois¹⁹.

La prévalence de l'anosmie a également varié au cours de la pandémie en fonction des variants qui ont émergé au cours du temps. En effet, l'anosmie n'a été un des symptômes principaux de la COVID-19 qu'à partir de l'émergence du variant D614G (portant la mutation D614G sur la protéine Spike) en Mars 2020 (**Figure 1**)²². Les prévalences d'anosmie sont ensuite restées très élevées jusqu'à l'émergence du variant Omicron BA.1 en janvier 2022, où elle est retombée à 10 % (**Figure 1**)²¹. Ces prévalences, tant au moment de l'infection aiguë que tardivement, sont beaucoup plus élevées que ce qui était observé jusque-là dans les autres infections respiratoires²⁴. En outre, l'anosmie associée à la COVID-19 n'est que peu souvent associée à une rhinorrhée et à une obstruction nasale, contrairement à la plupart des autres infections respiratoires pouvant causer des pertes de l'odorat^{25,26}. Ces observations ont amené les chercheurs à penser que les mécanismes de l'anosmie observée chez les patients atteints par la COVID-19 sont différents de ceux observés dans le cadre d'autres infections respiratoires. De nombreux chercheurs ont émis l'hypothèse que les pertes de l'odorat seraient probablement causées par des

dommages périphériques ou centraux dans le système olfactif. Dans ce cadre, il est important de comprendre les mécanismes de cette anosmie, pour mieux comprendre la pathogenèse de la COVID-19 et pour trouver des traitements efficaces contre cette anosmie.

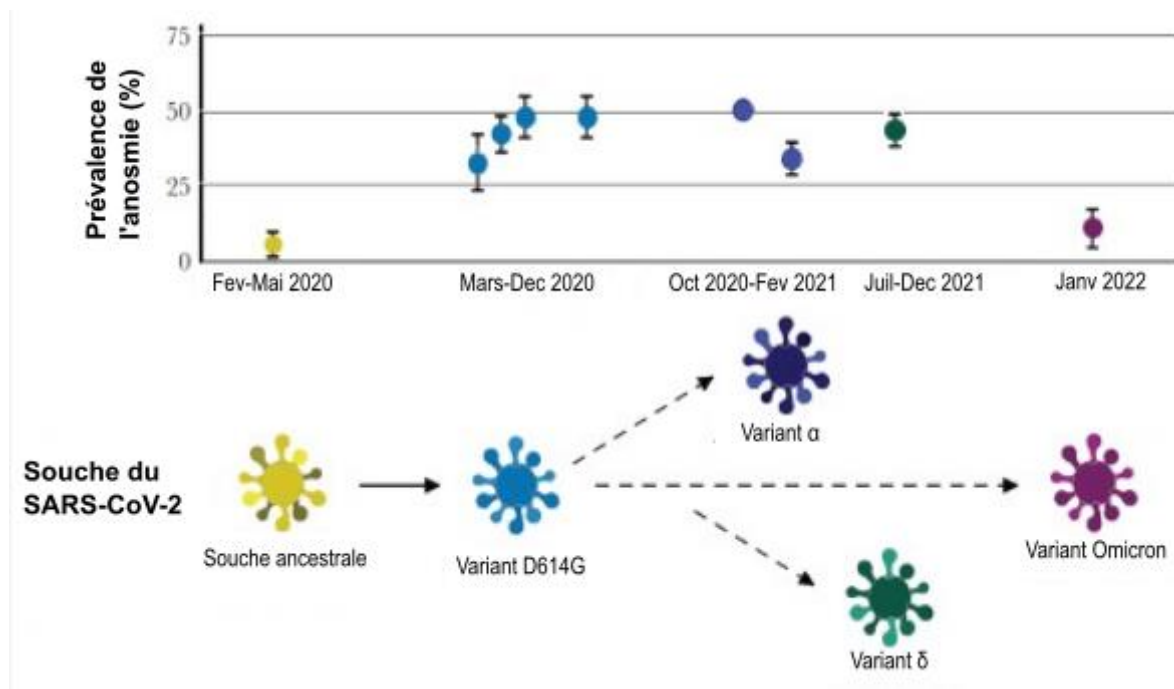


Figure 1 : Les fréquences d'anosmie ont évolué pendant la pandémie de COVID-19 tout en restant autour de 50 % des patients infectés pour la plupart des variants. L'émergence du variant D614G coïncide avec une forte augmentation de la fréquence de l'anosmie dans la population générale, allant jusqu'à 50 % des individus infectés alors que cette fréquence était de moins de 10 % dans la souche ancestrale. Jusqu'au variant Omicron, la prévalence des pertes de l'odorat reste très élevée. Après l'émergence du variant Omicron, une forte diminution de la prévalence de l'anosmie a été observée expliquées par des différences de tropisme qui seront explicitées dans le paragraphe 3.2.1. Inspirée de Butowt et al., Journal of Infectious Disease, 2022²¹.

Dans un premier temps, il a été supposé que le SARS-CoV-2 pourrait infecter les neurones olfactifs, passer par le rail olfactif et infecter des aires olfactives et non olfactives du système nerveux central, ce qui pourrait expliquer des distorsions de la perception des odeurs et les autres symptômes neurologiques et cognitifs²⁶. Pourtant, les données qui ont été amassées depuis ne vont pas dans le sens de cette hypothèse, étant donné que les cellules de soutien et les cellules des glandes de Bowman sont les principales cellules infectées par le SARS-CoV-2. Les neurones olfactifs, quant à eux, ne sont pas susceptibles à l'infection²⁷⁻²⁹. Ces données rendent donc improbable une invasion des composantes centrales du système olfactif par le SARS-CoV-2. Pourtant, des publications comme celle de Sauvé et co-auteurs suggèrent que d'autres aires cérébrales pourraient être infectées par le SARS-CoV-2. En effet, ces auteurs montrent que les neurones producteurs de GnRH dans l'hypothalamus expriment les récepteurs du SARS-CoV-2 et sont infectés par le SARS-CoV-2. Cette infection mènerait à une dérégulation de l'axe hypothalamo-hypophysaire³⁰. Ces résultats montrent que le SARS-CoV-2 pourrait

atteindre certaines structures cérébrales mais en passant probablement par d'autres voies que le nerf olfactif.

De plus, de nombreuses études, tant sur les modèles animaux que chez l'Homme, ont constaté des dommages importants au niveau de la structure de l'épithélium olfactif^{27,31,32}. Ces données nous ont orientés plutôt vers une perte de l'odorat liée à la perte de neurones olfactifs qui serait la conséquence de ces dommages tissulaires. Pour comprendre les mécanismes de la perte de l'odorat, il est donc essentiel de comprendre leur genèse. De même, des études menées chez l'Homme montrent que les perturbations de l'odorat à long terme seraient associées à une régénération altérée de l'épithélium olfactif³³. Ainsi, il serait important de comprendre également les cinétiques de régénération de l'épithélium olfactif après sa destruction par le SARS-CoV-2 et les facteurs qui pourraient l'inhiber. L'étude que nous vous proposons dans cette thèse abordera ces deux grandes questions.

Pour se faire, nous nous sommes tout d'abord intéressés aux causes principales de la desquamation de l'épithélium olfactif observée lors de l'infection par le SARS-CoV-2. En utilisant le modèle hamster Syrien, qui développe également des altérations de l'odorat suite à l'infection par le SARS-CoV-2, nous avons voulu départager deux grandes hypothèses abordées dans la littérature scientifique. Selon la première, les dommages épithéliaux seraient liés à la mort des cellules infectées et des cellules environnantes^{28,34}. Selon la deuxième, la desquamation observée serait liée à l'infiltration de cellules immunitaires pro-inflammatoires qui désorganiseraient le tissu. En effet, de nombreuses populations de cellules immunitaires comme les neutrophiles et les macrophages pro-inflammatoires sont associés avec des dommages tissulaires³⁵⁻³⁷. Nous avons aussi voulu aller plus loin en identifiant les principaux facteurs moléculaires impliqués dans cette desquamation de l'épithélium olfactif. Par ce biais, nous pourrions proposer un mécanisme expliquant la perte de l'odorat pendant la phase aiguë de l'infection.

Par la suite, nous avons étudié dans le même modèle animal les cinétiques de récupération de l'épithélium olfactif jusqu'à 17 jours post-infection. Pour se faire, nous avons étudié l'activité proliférative des cellules basales et la présence de plusieurs populations neuronales de l'épithélium olfactif entre jour 1 et jour 17 post-infection. Enfin, nous avons également étudié s'il y avait persistance de l'inflammation après la fin de l'infection productive par le SARS-CoV-2. En effet, dans des biopsies réalisées chez des patients humains avec des troubles de l'odorat à long terme suite à la COVID-19, des retards de régénération ont pu être observés et associés avec une infiltration importante de cellules immunitaires dans le tissu³³. De plus, dans un modèle souris, il a été montré qu'une inflammation persistante inhiberait l'activité proliférative des cellules basales de l'épithélium olfactif³⁸. Ces observations permettront de mieux comprendre les cinétiques de récupération de l'odorat après infection par la COVID-19. Cette

étude permettra également d'identifier si l'inflammation pourrait jouer un rôle de blocage dans cette récupération des fonctions olfactives après l'infection par le SARS-CoV-2.

Introduction

1. Odorat et pertes de l'odorat

1.1. L'odorat, de la détection des odorants dans l'épithélium olfactif à l'intégration dans le système nerveux central.

L'olfaction chez l'Homme et chez le primate a été longtemps considérée comme un sens moins important que les autres. En effet, la taille relative du bulbe olfactif chez l'homme et les primates est plus faible que chez beaucoup de mammifères dont les modèles rongeur^{39,40}. De plus, près de 60 % des récepteurs olfactifs codés dans le génome Humain seraient des pseudogènes^{39,40}. Pourtant, cette compréhension de l'odorat est actuellement remise en question. En effet, des travaux récents ont permis de montrer que les humains sont capables de discriminer plus de 1000 milliards d'odeurs plutôt que les 10000 supposées dans la littérature précédemment^{40,41}. De plus, l'Homme serait également capable de suivre des pistes olfactives efficacement^{40,42}.

Des pertes de l'odorat peuvent avoir de nombreuses conséquences sur la qualité de vie des patients²⁶. Ces conséquences ont été rappelées à la population générale par la pandémie de COVID-19 pendant laquelle des pertes olfactives ont touché près de 50 % des patients infectés par le SARS-CoV-2^{17,21,22}. En effet, les pertes olfactives peuvent être associées avec des perturbations du comportement alimentaire, des empoisonnements ou des états dépressifs²⁶. Les pertes olfactives sont aussi généralement associées avec un raccourcissement de l'espérance de vie^{26,43}.

Dans ce paragraphe d'introduction, nous décrivons la cavité nasale et le tissu responsable de la détection des odorants, l'épithélium olfactif. Nous décrivons également les fonctions de différents types cellulaires de la muqueuse olfactive. Nous décrivons également l'intégration du signal olfactif par le système nerveux central. Enfin, nous introduisons les principales causes de dysfonctionnements de l'odorat autres que ceux associés à la COVID-19 comme un âge avancé, les maladies neurodégénératives comme les maladies de Parkinson et d'Alzheimer et les anosmies associées à des infections virales et à d'autres agents exogènes. Enfin, nous développerons le concept de rail olfactif, une voie facilitant l'entrée de pathogènes et d'agents toxiques dans le système nerveux central, étant donné que les neurones olfactifs matures ne sont pas protégés par la barrière hémato-encéphalique.

1.1.1. Description générale de la cavité nasale.

La cavité nasale est un ensemble complexe d'organes impliqués dans diverses fonctions dont l'olfaction, l'humidification, le réchauffement et le filtrage de l'air inspiré^{39,44}. Elle s'étend des narines au nasopharynx et est divisée symétriquement par un septum cartilagineux⁴⁴. La cavité nasale est divisée en plusieurs séries de cornets cartilagineux supportant plusieurs types d'épithélium (épithélium squameux, épithélium respiratoire et épithélium olfactif). Ces cornets permettent en partie de réguler les flux d'air dans la cavité nasale et les cornets situés en avant de la cavité nasale permettent également d'arrêter les particules contenues dans l'air⁴⁴. La cavité nasale est séparée du système nerveux central par la lame criblée que les axones des neurones olfactifs constituant le nerf olfactif traversent pour atteindre le bulbe olfactif (**Figure 2**)^{39,45}.

Dans cette étude, nous nous intéresserons uniquement aux structures olfactives de la cavité nasale que nous allons développer ci-après. Chez les rongeurs, les structures olfactives sont divisées en 4 organes : la muqueuse olfactive principale, et 3 organes olfactifs accessoires comme l'organe voméronasal (VNO), l'organe septal de Maserà et le ganglion de Gruneberg^{39,44}. Ces organes olfactifs accessoires sont absents ou vestigiaux chez l'Homme^{39,44}.

Chez le rongeur, l'épithélium olfactif principal occupe les cornets olfactifs situés à l'extrémité caudale supérieure de la cavité nasale (**Figure 2**). De plus, il est séparé des autres parties de la cavité nasale par une partie osseuse nommée la lame transverse⁴⁴. En comparaison, chez l'Homme l'épithélium olfactif principal occupe les parties supérieures du septum et le toit des fosses nasales supérieures^{39,45}. L'épithélium olfactif principal occupe en fait environ 45 à 50 % de la cavité nasale chez les rongeurs contre 3 à 5 % chez l'Homme^{39,44}. De plus, si l'épithélium olfactif rongeur est un épithélium pluristratifié d'une dizaine de cellules d'épaisseur, l'épithélium olfactif humain est très hétérogène avec des patches d'épithélium respiratoire présents au milieu de ce dernier^{44,45}. Du fait de sa localisation en arrière de la cavité nasale, seulement 20 % et 3 % du flux d'air inspiré dans une respiration calme arrive dans les cornets olfactifs chez les rongeurs et chez l'Homme respectivement⁴⁴.

L'organe voméronasal (VNO) contient également des neurones olfactifs qui projettent dans un bulbe olfactif accessoire (**Figure 2**). Il est considéré comme vestigial chez l'Homme et le bulbe olfactif accessoire est totalement atrophié. Il forme généralement une structure sphérique au niveau du plancher de la cavité nasale et communique avec la cavité orale. Cet organe est impliqué dans la détection d'odorants peu volatils comme les phéromones. Il intervient dans le comportement territorial et sexuel des animaux^{44,46}.

L'organe septum de Maserà et le ganglion de Grueneberg sont deux autres organes olfactifs reliés au bulbe olfactif principal (**Figure 2**)³⁹. Les fonctions de ces deux organes olfactifs sont encore

largement inconnues. Pourtant, quelques hypothèses ont été rapportées quant à leur fonction dans la perception des odeurs. D'après Marshall et Maruniak, comme l'organe septal de Maseira est situé en avant de la cavité nasale et répond à des concentrations plus faibles d'odorants que l'épithélium olfactif principal, il pourrait jouer le rôle d'alerte⁴⁷.

Les neurones des ganglions de Grueneberg sont spécialisés dans la détection des signaux de danger⁴⁸. De plus, les ganglions de Grueneberg sont également sensibles à la température : ils sont activés par les températures froides⁴⁹. Les projections des neurones du ganglion de Grueneberg pourraient donc permettre des régulations liées à la température dans le bulbe olfactif⁴⁹.

Dans la suite de ce travail, nous ne nous intéresserons principalement à l'épithélium olfactif principal, bien que nous travaillions sur un modèle animal rongeur. En effet, les trois autres organes olfactifs sont vestigiaux chez l'Homme et les dommages épithéliaux massifs observés dans les modèles animaux ont été observés dans ce tissu.

Les odorants entrent dans la cavité nasale soit directement par inhalation ou par la voie rétronasale notamment lors de la mastication des aliments dans la cavité orale. Ces odorants provenant de la cavité orale interviennent dans la perception des saveurs des aliments. Pour l'instant, il n'est pas certain que les rongeurs puissent utiliser cette voie rétronasale (**Figure 2**)^{39,50}.

Enfin, la cavité nasale contient également d'autres organes avec des fonctions lymphoïdes et des fonctions sécrétoires. Chez les rongeurs, la glande de Steno aussi nommée sinus paranasal est impliqués dans la formation du mucus. Elle est apparemment absente chez l'Homme. La cavité nasale possède également son propre tissu lymphoïde : le NALT (Nasal Associated Lymphoid Tissue) chez les rongeurs qui se situe dans la partie ventrale et caudale de la cavité nasale, ou les anneaux de Waldeyer dans le nasopharynx chez les humains et les primates non humains⁴⁴.

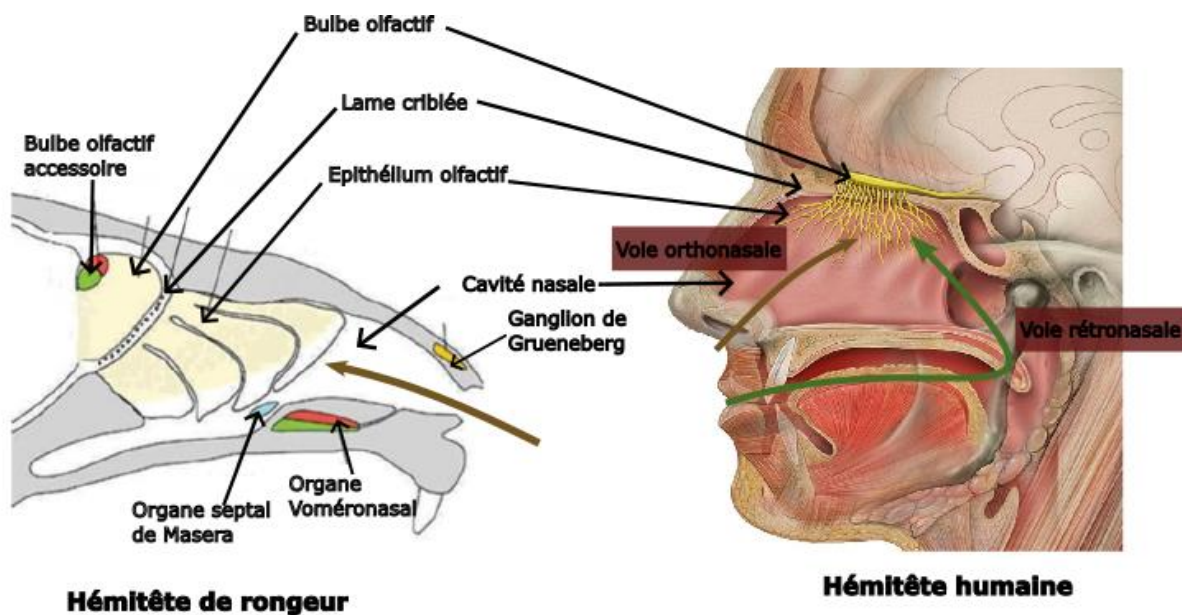


Figure 2 : Anatomie comparée des structures olfactives des cavités nasales chez les rongeurs et les Humains. L'épithélium olfactif est situé dans les fosses nasale dans la partie caudale supérieure de la cavité nasale chez les rongeurs et au niveau du septum supérieur et du toit des fosses nasales. Chez les rongeurs, 3 structures olfactives accessoires sont présentes : l'organe voméronasal, l'organe séptal de Masera et les ganglions de Grueneberg. Ces structures sont vestigiales ou absentes chez l'Homme. La cavité nasale est séparée du système nerveux central et du bulbe olfactif par la lame criblée. Les axones du nerf olfactif traversent cette lame criblée pour aller au bulbe olfactif. Les odorants rentrent dans la cavité nasale par inhalation (**voie directe**) ou par la voie rétronasale lors de la mastication des aliments. Inspirée de Brennan et Zufall, *Nature*, 2006⁵¹.

Dans la suite de ce texte, nous décrivons plus précisément la structure de l'épithélium olfactif principal et les fonctions des différentes cellules qui composent ce tissu. Nous aborderons également les traitements du signal olfactif délivré par l'épithélium olfactif dans la muqueuse olfactive par le système nerveux central, notamment au niveau du bulbe olfactif.

1.1.2. L'épithélium olfactif et son rôle dans le traitement des odeurs

L'épithélium olfactif principal est le principal tissu permettant la détection des odorants dans la cavité nasale et la transmission du signal olfactif vers le système nerveux central, ce qui constitue les premières étapes de la perception des odeurs. La muqueuse olfactive est constituée d'un épithélium olfactif et de la *lamina propria* sous-jacente³⁹. Cette dernière est composée d'un tissu conjonctif, de faisceaux d'axones, de vaisseaux sanguins et lymphatiques, de cellules immunitaires résidentes et de glandes productrices de mucus (les glandes de Bowman)³⁹. Nous reviendrons sur les cellules immunitaires présentes dans la *lamina propria* ultérieurement dans le paragraphe 2.1.1. L'épithélium olfactif est un épithélium pseudostratifié dont la structure générale est relativement conservée chez les Vertébrés^{39,52}. En contact avec la lame basale, les cellules basales permettent le renouvellement de tous les types cellulaires de l'épithélium olfactif^{39,52}. Les neurones olfactifs responsables de la détection des

odorants sont situés en position intermédiaire^{39,52}. En position apicale, les cellules sustentaculaires assurent un soutien important pour le fonctionnement des neurones olfactifs³⁹. Dans ce paragraphe, nous décrivons et reviendrons sur le rôle de ces différents types cellulaires dans la perception des odorants.

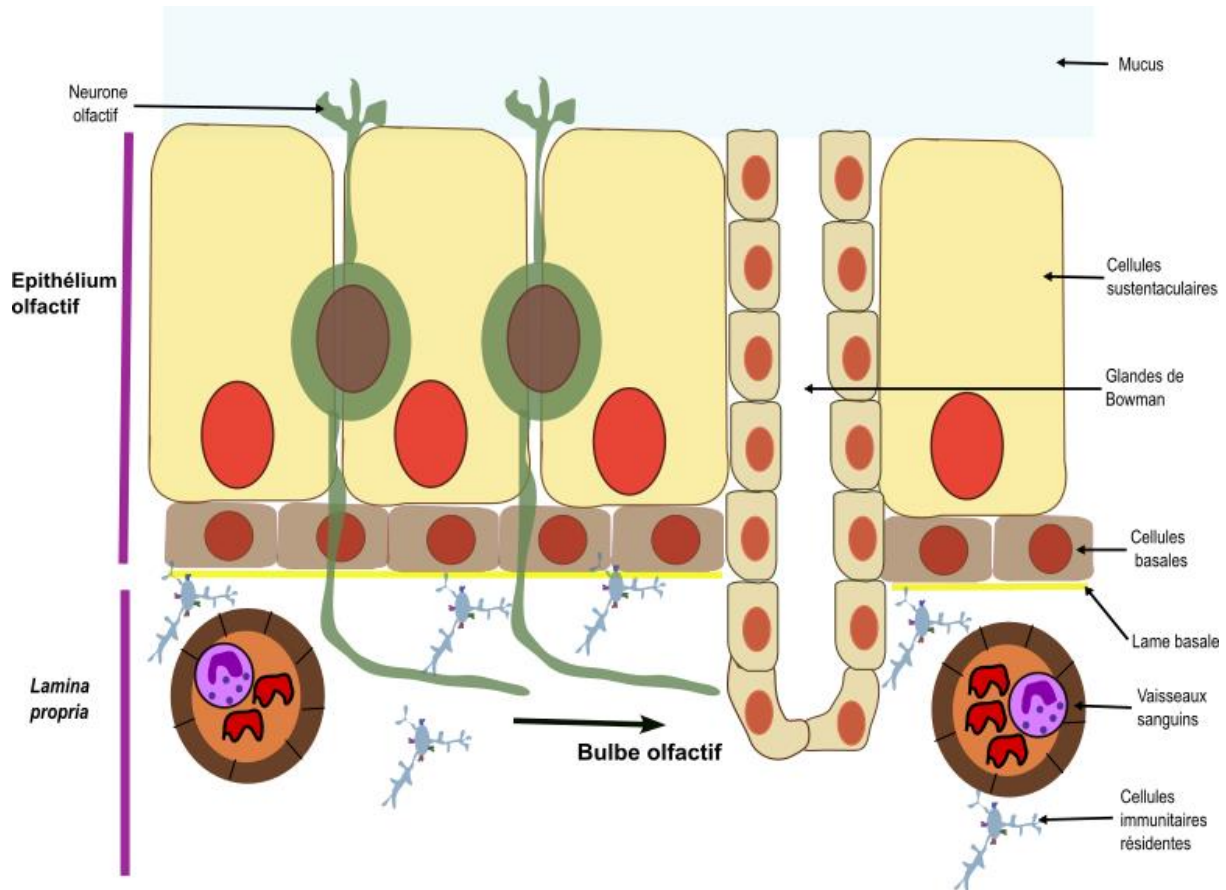


Figure 3 : Structure générale de la muqueuse olfactive. La muqueuse olfactive est constituée du neuroépithélium olfactif et de la lamina propria sous-jacente. L'épithélium olfactif est principalement constitué de neurones olfactifs responsables de la reconnaissance des odorants et de la transmission du signal olfactif vers le bulbe olfactif. Ces neurones sont entourés par des cellules sustentaculaires qui ont un rôle de soutien de leur activité. Les cellules basales, retrouvées dans la partie basale de l'épithélium olfactif sont les cellules souches permettant la régénération de tous les types cellulaires de l'épithélium olfactif. L'épithélium olfactif est séparé de la lamina propria par une lame basale. Cette lamina propria est constituée principalement d'un tissu conjonctif, de faisceaux d'axones des neurones olfactifs, de vaisseaux sanguins et lymphatiques et de cellules immunitaires résidentes. La muqueuse olfactive est aussi composée des conduits des glandes de Bowman qui permettent la production de mucus.

1.1.2.1. Neurones sensoriels olfactifs : détection des odorants et codage de l'information.

Les neurones sensoriels olfactifs, localisés dans la couche intermédiaire de l'épithélium olfactif, sont les cellules responsables de la détection des odorants dans la cavité nasale^{39,52}. Ce sont des cellules bipolaires étendant une dendrite unique vers la surface de l'épithélium olfactif^{39,45,52}. Leur terminaison apicale est formée d'un bouton dendritique duquel émergent jusqu'à 30 cils sur lesquels sont concentrés les récepteurs olfactifs et les éléments de la transduction olfactive^{45,52}. Ces protéines permettent de

transformer la présence d'un odorant dans la cavité nasale en signal nerveux. Les neurones olfactifs projettent aussi un unique axone vers le bulbe olfactif, qui est la première étape du traitement du signal olfactif dans le système nerveux central^{39,45,52}.

Dans ce paragraphe, nous aborderons la reconnaissance des molécules odorantes par les récepteurs olfactifs. Puis, nous détaillerons la voie de transduction permettant la transformation de ce signal chimique en signal nerveux.

Les odorants sont de petites molécules organiques et synthétiques volatiles présentant diverses fonctions chimiques qui entrent dans la cavité nasale soit par l'air inspiré (voie directe) soit par la cavité orale (voie rétronasale). Ces molécules sont reconnues par une combinaison de récepteurs olfactifs codés dans le génome de l'animal^{53,54}. En effet, les récepteurs olfactifs reconnaissent des grands déterminants chimiques présents sur les molécules odorantes⁵⁵. Des contraintes stériques modulent également la capacité des molécules odorantes à se lier aux récepteurs olfactifs⁵⁵.

Les récepteurs aux odorants forment une famille multigénique très large de récepteurs couplés aux protéines G (GPCR). En effet, environ 1000 récepteurs olfactifs fonctionnels sont codés par le génome murin et 400 par le génome humain^{52,56,57}. Ce très grand nombre de récepteurs olfactifs est fortement impliqué dans la reconnaissance et la discrimination d'un grand nombre de molécules, allant même jusqu'à la discrimination d'énantiomères ou de diverses concentrations du même odorant^{53,58}. Un odorant peut en effet se lier à un ou plusieurs récepteurs olfactifs^{53,54}. Réciproquement, un récepteur olfactif permettra la liaison de plusieurs molécules odorantes avec diverses affinités, selon les groupes chimiques reconnus par ces derniers⁵³⁻⁵⁵. Le traitement des odeurs se fait donc de manière combinatoire en fonction des récepteurs olfactifs liés par l'odorant⁵²⁻⁵⁴.

Chaque neurone sensoriel olfactif exprime un seul et unique récepteur olfactif^{52,54,59}. L'expression des récepteurs olfactifs au sein de chaque neurone olfactif est également mono-allélique^{52,59}. Ainsi, la présence d'un odorant dans la cavité nasale active les neurones exprimant les récepteurs olfactifs auxquels se lient les molécules odorantes⁵⁹. Donc, chaque odeur est associée à l'activation d'une combinaison de neurones olfactifs exprimant des récepteurs olfactifs liant spécifiquement les différents odorants contenus dans cette stimulation⁵⁹.

De plus, l'expression des récepteurs olfactifs est hautement régulée dans l'espace^{52,54,59,60}. En effet, l'expression d'un récepteur olfactif particulier est généralement limitée à une zone bien déterminée de l'épithélium^{54,59,60}. Dans ces zones, les neurones exprimant le même récepteur olfactif sont dispersés de manière aléatoire^{54,59,60}. L'épithélium olfactif serait donc divisé en plusieurs zones fonctionnelles reconnaissant toutes différents types d'odorants⁶⁰.

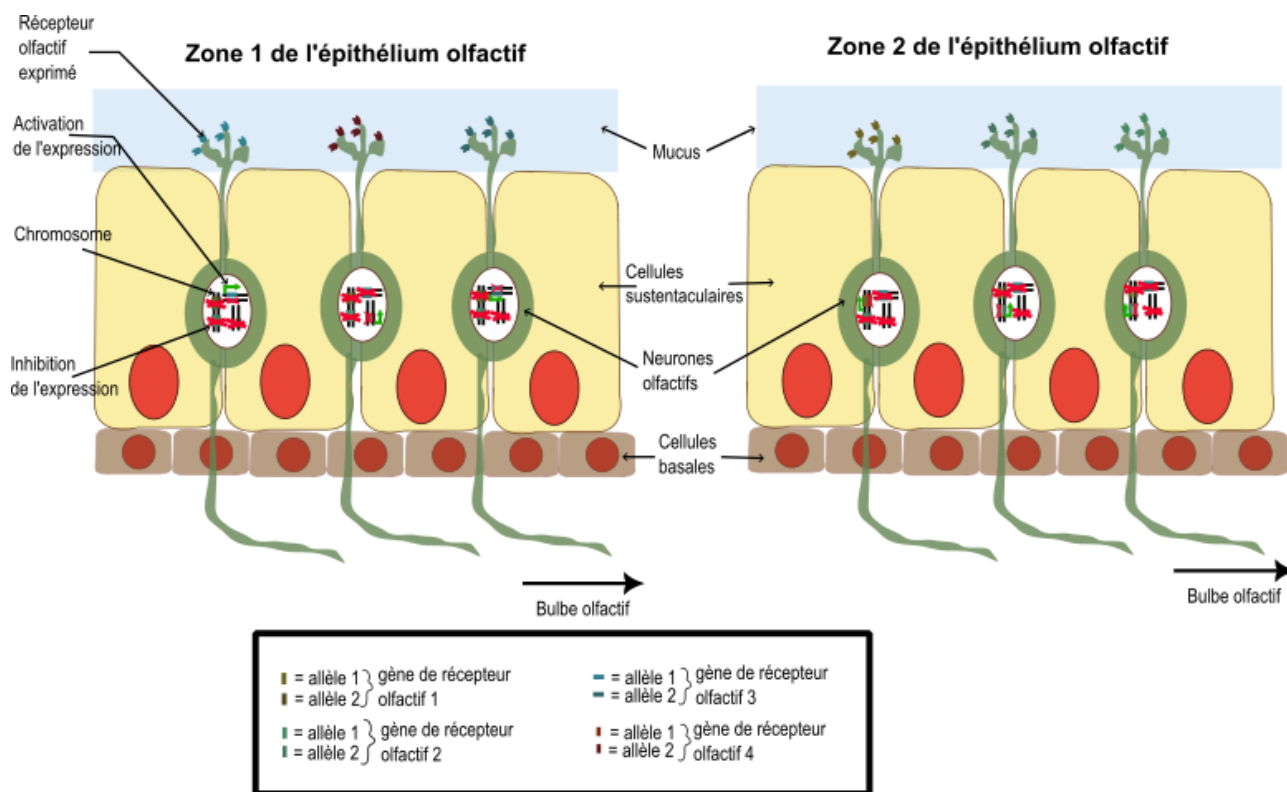


Figure 4 : Régulation de l'expression des récepteurs aux odorants dans l'épithélium olfactif. L'expression des récepteurs olfactifs par les neurones olfactifs est très régulée. Un neurone olfactif exprime un récepteur olfactif de manière monogénique et monoallélique. De plus, l'expression des récepteurs olfactifs est fortement régionalisée dans l'épithélium olfactif.

Des neurones olfactifs expriment également d'autres types de récepteurs comme les TAAR (*Trace Amine-Associated Receptors*) qui forment une autre petite famille multigénique de GPCR⁵². Cette famille contient 14 gènes chez la souris et 6 chez l'Homme⁵². Les TAARs reconnaissent des amines comme la β -phényléthylamine, la p-tyramine, la tryptamine, l'octopamine⁵². Ces odorants seraient importants pour le comportement olfactif notamment dans les interactions sociales entre congénères et la détection d'aliments avariés⁵². Leur fonctionnement est apparemment similaire à celui des récepteurs olfactifs⁵². Les neurones exprimant ces TAARs n'expriment aucun récepteur olfactif traditionnel⁵².

La liaison d'un ligand sur un récepteur olfactif entraîne l'activation d'une chaîne de transduction qui va permettre la conversion de l'information olfactive en variation de potentiel de membrane. Tout d'abord, le changement de conformation du récepteur olfactif après liaison de son ligand va permettre la liaison de la protéine G_{olf} . Cette liaison entraîne l'hydrolyse du GTP et la séparation de cette dernière en sous-unités $G_{\alpha_{olf}}$ et $G_{\beta\gamma}$. G_{olf} active ensuite l'adénylate cyclase 3 (ACIII), engendrant la formation d'AMP cyclique (AMP_c). Ce dernier entraînera l'ouverture de canaux dépendant des nucléotides cycliques comme CNGA2 permettant le passage d'ions Ca^{2+} et Na^+ vers le cytosol des neurones olfactifs. Cette

entrée de cations dans les neurones entraîne une première dépolarisation amplifiée par l'ouverture de canaux calcium dépendant permettant la sortie d'ions Cl^- vers le milieu extracellulaire. La plupart des acteurs de cette signalisation sont localisés dans les cils dendritiques des neurones olfactifs, assurant leur forte proximité et leur fonction. Cette séquence permet la formation d'un potentiel récepteur reflétant l'activation de la cellule neuronale par un odorant^{52,54,61,62}. Ce potentiel récepteur est traduit en train de potentiels d'action au niveau du corps cellulaire des neurones olfactifs. Ces derniers sont ensuite transmis par les axones des neurones olfactifs vers le bulbe olfactif. La combinaison des signaux produits par les différents neurones olfactifs induits par la reconnaissance d'un odorant constitue le message olfactif qui permettra l'identification de ce dernier⁶².

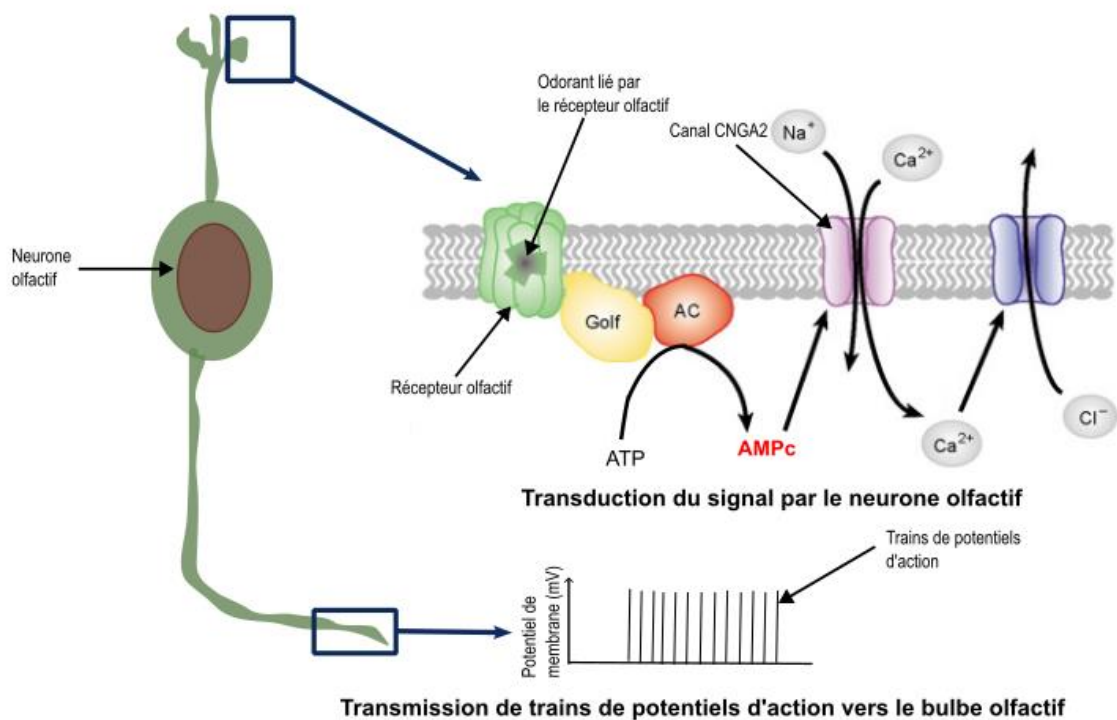


Figure 5 : Neurone olfactif, transformation du signal olfactif et transmission du signal vers le bulbe olfactif. Au niveau des cils des neurones olfactifs, l'interaction d'un odorant avec le récepteur olfactif induit l'hydrolyse du GTP par la protéine G associée au récepteur olfactif et la séparation des sous-unité $G_{\alpha\text{olf}}$ et $G_{\beta\gamma}$. La sous-unité $G_{\alpha\text{olf}}$ permet l'activation de l'adénylate cyclase qui hydrolyse l'ATP en AMPc. Ce composé permet l'ouverture de canaux perméables aux cations. La dépolarisation de la membrane obtenue grâce à cette entrée de cations dans la cellule induit ensuite l'ouverture de canaux calcium-dépendant perméables au chlore qui amplifient la dépolarisation. Ce traitement du signal permet la production d'un potentiel récepteur associé à la présence de l'odorant à la surface de l'épithélium olfactif. Inspirée de Korsching, Encyclopedia of Biological Chemistry, 2004⁶³.

1.1.2.2. Les cellules de soutien ou cellules sustentaculaires.

Les cellules sustentaculaires ou cellules de soutien sont de grandes cellules en colonne qui couvrent toute l'épaisseur de l'épithélium olfactif. Leurs noyaux sont situés dans la couche la plus apicale de ce dernier^{39,45,52}. Les cellules sustentaculaires établissent des contacts étroits tout le long des neurones olfactifs au sein de l'épithélium olfactif^{45,64}.

Les cellules sustentaculaires ont des caractéristiques de cellule épithéliale de par l'expression par ces dernières de marqueurs de cellule épithéliale comme la kératine 18 et la E-cadhérine²⁷. Toutefois, elles présentent de nombreuses fonctions qui les rapprochent de cellules gliales. Les cellules sustentaculaires, en entourant les dendrites et les axones des neurones olfactifs, permettent un isolement micro-électrique des neurones olfactifs, ce qui faciliterait la discrimination des odorants. Elles interviennent aussi pour optimiser la transmission du message olfactif dans la muqueuse olfactive. En effet, les cellules sustentaculaires montrent des fonctions similaires aux cellules de Schwann dans le système nerveux sur les axones des neurones olfactifs dans l'épithélium olfactif⁶⁴. Elles sont aussi impliquées dans le bon fonctionnement des neurones olfactifs en régulant les concentrations ioniques du mucus ou baignent les cils olfactifs des neurones⁶⁵. Les cellules sustentaculaires ont aussi la capacité d'internaliser des neurones olfactifs anormaux ou mourants^{52,66}. De plus, elles interviennent aussi dans la détoxification de l'environnement des neurones^{52,67}. Enfin, les cellules sustentaculaires sont aussi capables de moduler l'activité des neurones olfactifs comme les cellules gliales dans le système nerveux central. Elles produisent en effet de nombreux modulateurs de l'activité des neurones olfactifs comme les endocannabinoïdes, l'insuline, le neuropeptide Y ou l'ATP⁶⁸. Par exemple, l'ATP extracellulaire est impliqué dans une diminution des réponses des neurones olfactifs aux odorants. La libération d'ATP dans le milieu extracellulaire active des canaux perméables au chlore au niveau des cellules sustentaculaires qui participent à cette modulation^{68,69}. De plus, elles produisent du neuropeptide Y qui induisent la prolifération des cellules basales^{68,70}.

Ainsi, les cellules sustentaculaires ont un rôle fondamental dans le bon fonctionnement des neurones olfactifs en détoxifiant leur milieu, en régulant les concentrations ioniques dans l'environnement des neurones olfactifs et en isolant les neurones olfactifs. De plus, tout comme les cellules gliales du système nerveux central, elles sont capables de moduler les activités des neurones olfactifs.

1.1.2.3. Les cellules basales assurent la régénération de l'épithélium.

Contrairement aux neurones du système nerveux central, les neurones olfactifs ne survivent pas durant toute la vie de l'animal. En effet, étant en contact direct avec l'environnement, ils sont potentiellement soumis à des molécules toxiques mais aussi à la présence de pathogènes. Leur durée de vie est d'un mois à une année⁷¹⁻⁷³ et l'épithélium olfactif est un des seuls tissus nerveux capables de se régénérer⁷². Les cellules souches multipotentes responsables de cette régénération sont situées au contact de la lame basale et sont nommées cellules basales^{39,45,72}. La neurogenèse dans l'épithélium olfactif continue tout au cours de la vie de l'animal⁵².

Dans ce paragraphe, nous décrivons les phénotypes des cellules basales et les types cellulaires qu'elles sont capables de régénérer. Nous décrivons également la séquence de différenciation qui mène de la cellule basale vers un neurone olfactif mature et sa durée. Nous nous concentrerons dans cette partie sur le modèle rongeur uniquement car la régénération de l'épithélium humain est quelque peu différente, en raison des quelques divergences anatomiques entre l'Homme et les modèles rongeur³⁹.

1.1.2.3.1. Présentation des cellules basales et de leur activité.

Deux types de cellules basales ont été observés. Les cellules basales horizontales sont des cellules multipotentes capables de régénérer tous les types cellulaires de l'épithélium olfactif, que ce soit les lignages neuronaux ou les cellules non neuronales (cellules sustentaculaires et cellules microvillaires)^{39,52,74}. Au contraire, la plupart des cellules basales globulaires sont principalement des progéniteurs neuronaux^{39,52,75}.

Ces deux types cellulaires montrent de nombreuses différences que ce soit au niveau morphologique ou au niveau de leur fonctionnement. Les cellules basales horizontales sont situées au contact direct de la lame basale et présentent de petits corps cellulaires allongés^{39,52,74,75}. Les marqueurs caractéristiques qui leur sont associés sont les cytokératines 5 et 14 (CK5 et CK14)^{39,74}. Ces cellules sont généralement quiescentes, comme la plupart des cellules souches adultes, et elles proliféreraient principalement lors de lésions importantes de la muqueuse olfactive^{52,74,76}. Les cellules basales globulaires, quant à elles, sont situées juste au-dessus des cellules basales horizontales et présentent une morphologie arrondie^{39,52,74}. Les marqueurs principaux de ces cellules sont des marqueurs d'engagement dans la lignée neuronale comme les facteurs de transcription *Mash1*, *Neurogenin1* et *Ascl1* ou la protéine N-CAM^{52,74,75}. Contrairement aux cellules basales horizontales, les cellules basales globulaires prolifèrent très activement pour produire des cellules de la lignée neuronale^{52,77}.

La prolifération des cellules basales est hétérogène dans l'épithélium olfactif. En effet, elle est moins importante dans les régions dorsomédianes que dans les régions ventrolatérales^{73,78}. Ces différences dans les taux de division cellulaire correspondent à des différences dans les durées de vie des neurones olfactifs qui seraient notamment soumis à un stress plus important en ventrolatéral car plus proche de l'ouverture de la cavité nasale⁷³. Cette prolifération est également fortement régulée. Des facteurs de croissance produits tant par l'épithélium olfactif que par la *lamina propria* sous-jacente sont impliqués dans la régulation de l'activité des cellules basales, que ce soit dans un contexte physiologique ou dans un contexte de lésion de l'épithélium olfactif⁷⁹. Ainsi, la présence d'un très grand nombre de neurones olfactifs matures dans l'épithélium olfactif inhibe la prolifération des cellules basales^{79,80}. Les neurones olfactifs en cours de mort cellulaire produisent le facteur LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*) qui stimule la prolifération des cellules basales⁸¹. De nombreux autres facteurs régulant la prolifération des cellules basales ont été décrits provenant aussi bien de l'activité neuronale que des cellules non neuronales^{68,79}. Par exemple, le neuropeptide Y, produit par les cellules sustentaculaires en réponse à la présence d'ATP extracellulaire, induit la prolifération des cellules basales^{68,70}. Au contraire, le facteur GDF11 (*Growth and Differentiation Factor 11*), produit principalement par les neurones olfactifs, inhibe leur prolifération^{82,83}.

1.1.2.3.2. Des cellules basales vers les différents types cellulaires de l'épithélium olfactif.

Dans le processus de régénération des neurones olfactifs, les cellules basales sont engagées dans le lignage neuronal grâce à l'expression progressive des facteurs de transcription comme *Mash1*, *Ascl1* et *Neurogenin1*^{74,75}. Par la suite, les précurseurs neuronaux arrêtent de se diviser et se différencient en neurones olfactifs immatures puis en neurones olfactifs matures selon un processus stéréotypé. Nous détaillerons cette différenciation terminale dans ce paragraphe.

Cette dernière est marquée par l'expression progressive de marqueurs moléculaires. Un jour après le début de leur différenciation, les neurones expriment le marqueur GAP43 (*Growth Associated Protein 43*), qui est caractéristique des neurones olfactifs immatures. 3 jours plus tard, certains des composants de la chaîne de transduction olfactive commencent à être exprimés comme l'adénylate cyclase 3 (AC3). Enfin, dès 8 jours, les neurones commencent à exprimer la protéine OMP (*Olfactory Marker Protein*), le marqueur caractéristique des neurones olfactifs matures. Pendant cette maturation des neurones olfactifs, les cellules migrent vers la partie apicale de l'épithélium olfactif⁷⁸.

Cette différenciation est également associée à un changement morphologique des neurones sensoriels olfactifs. Les cellules basales sont non polarisées alors que les neurones olfactifs sont polarisés avec un axone et une dendrite. Dès 2 jours post différenciation, les neurones étendent des dendrites

vers la lumière de la cavité nasale et forment les premiers boutons dendritiques. Les axones, quant à eux, commencent à former des faisceaux dans la *lamina propria* dès 3 jours après le début de la différenciation, puis traverse la lame criblée entre 4 et 5 jours et enfin forment les premières synapses dans le bulbe olfactif dès 8 jours après la dernière division cellulaire⁷⁸. Il est encore inconnu si ces résultats sont transposables chez l'Humain.

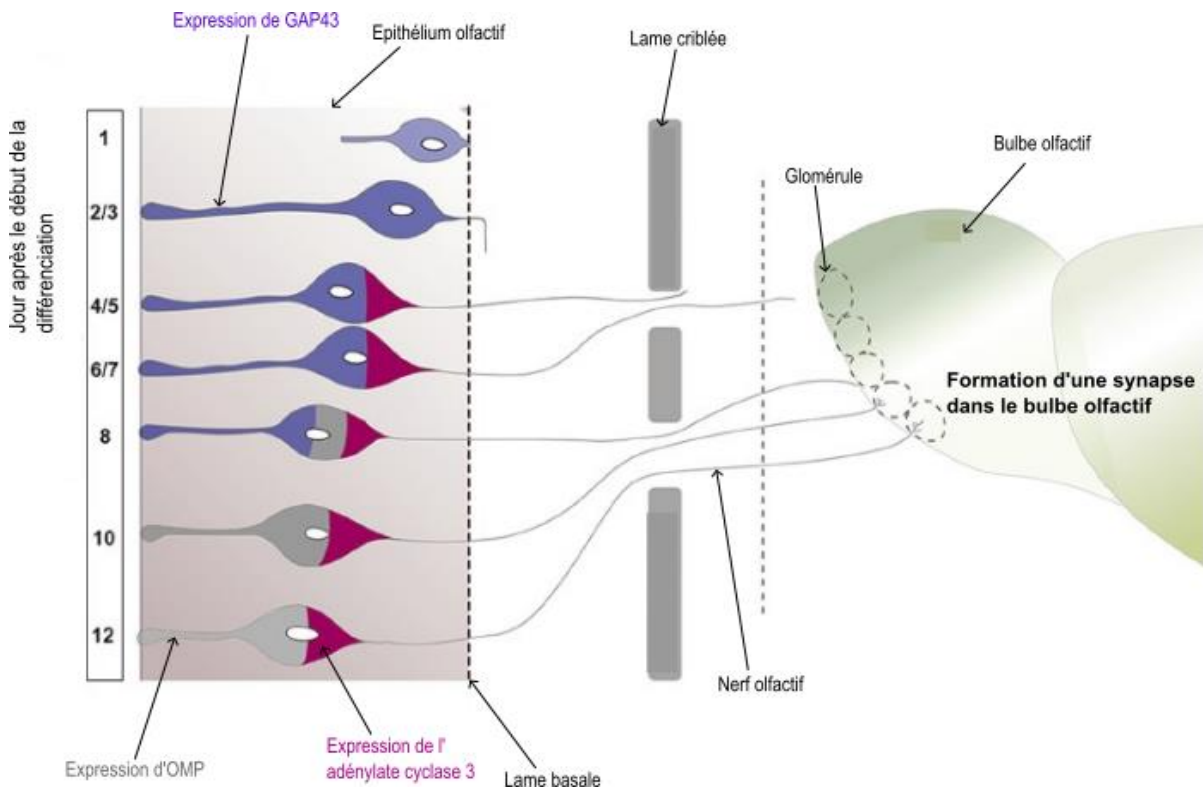


Figure 6 : La maturation des progéniteurs neuronaux permet la formation de neurones sensoriels olfactifs fonctionnels. Après engagement dans le lignage neuronal grâce à des facteurs de transcription comme *Mash1* ou *Neurogenin1*, la différenciation des neurones olfactifs se fait progressivement grâce à une expression séquentielle de facteurs de marqueurs moléculaires. Tout d'abord, les neurones expriment *GAP43*, un marqueur caractéristique des neurones olfactifs immatures. Par la suite, les neurones expriment *AC3*, un des constituants de la transduction olfactive. Enfin, lors de leur différenciation terminale en neurones olfactifs matures, les neurones commencent à exprimer le marqueur *OMP*. De plus, au cours de ce processus de différenciation, les neurones forment des dendrites et des axones qui feront synapse au niveau des glomérules du bulbe olfactif. Les dendrites sont formées rapidement dès 2 à 3 jours après le début de la différenciation. Les axones croient beaucoup plus progressivement et forment synapse dans le bulbe entre 8 et 10 jours après le début de la différenciation. Cette formation de la synapse au niveau des glomérules du bulbe olfactif est un préalable à la différenciation terminale en neurone olfactif mature. Inspirée de Liberia et al., *eNeuro*, 2019⁷⁸.

Le guidage des axones est un processus régulé étant donné que les neurones olfactifs exprimant le même récepteur olfactif convergent vers le même glomérule dans le bulbe olfactif (abordé dans le paragraphe 1.1.3)^{52,54,84}. En fait, les récepteurs olfactifs sont exprimés sur les axones des neurones sensoriels olfactifs et permettent leur convergence au niveau d'un même glomérule. En effet, des modifications de la séquence des récepteurs olfactifs perturbent la convergence des axones des neurones olfactifs exprimant un même récepteur⁸⁵. Un composant de la transduction olfactive, l'adénylate cyclase 3, est également impliquée dans cette convergence des axones vers le bulbe olfactif

notamment par le recrutement d'autres facteurs de guidage⁸⁶. Ce processus de guidage des axones est crucial dans la différenciation en neurone olfactif mature étant donné que cette dernière n'a lieu qu'après la formation de synapses entre ce dernier et des neurones du bulbe olfactif^{78,87}. Pourtant, les neurones olfactifs immatures formant des synapses au niveau du bulbe olfactif ne se différencient pas tous en neurones olfactifs matures immédiatement. Ces cellules sont capables de transmettre des informations olfactives pertinentes également et doivent être pris en compte dans l'intégration du signal olfactif⁸⁸.

Contrairement au lignage neuronal, le renouvellement des cellules sustentaculaires est encore relativement peu connu. Lors de lésions importantes de l'épithélium olfactif, les cellules basales horizontales se divisent activement et se différencient en cellules sustentaculaires⁸⁹. Cette régénération des cellules sustentaculaires serait rapide et aurait lieu en environ 4 jours⁸⁹. Dans un contexte de fonctionnement normal de l'épithélium olfactif, certaines cellules basales horizontales peuvent également se différencier directement en cellules sustentaculaires sans se diviser⁹⁰.

L'épithélium olfactif se régénère tout au cours de la vie selon un processus stéréotypé qui permet de conserver le répertoire de récepteurs olfactifs. Pourtant, dans certaines pathologies, la régénération est fortement perturbée. C'est notamment le cas lors d'une inflammation prolongée pendant laquelle les cellules basales stoppent leur prolifération et sécrètent des chimiokines attirant les cellules immunitaires, ce qui pourrait mener à des altérations à long terme de l'odorat³⁸.

1.1.3. Une intégration du signal olfactif par le système nerveux central

Les neurones olfactifs projettent un axone unique vers le bulbe olfactif, premier lieu de traitement du signal olfactif^{39,45,52}. Ces axones se regroupent tout d'abord en faisceaux dans la *lamina propria*^{45,78}. Ils ne sont pas myélinisés et sont entourés par des cellules engainantes^{39,52}. Formant le nerf olfactif, ils sortent ensuite de la cavité nasale par la lame criblée de l'os ethmoïde^{39,52}. Celle-ci contient de nombreuses lacunes permettant le passage du nerf olfactif vers la boîte crânienne et lui permettant d'atteindre le bulbe olfactif, la cible de ces axones³⁹. Suite au traitement primaire de l'information par le bulbe olfactif, cette dernière est ensuite transmise au cortex olfactif primaire (cortex piriforme) puis à d'autres aires corticales ainsi qu'à l'hypothalamus ou l'amygdale. Ces différentes aires cérébrales permettent l'identification consciente et la réaction émotionnelle aux odeurs rencontrées⁹¹. De plus, les interactions entre bulbe olfactif et hypothalamus contrôlent le comportement alimentaire^{92,93}.

Ici, dans un premier temps, nous aborderons le traitement du signal par le bulbe olfactif puis nous mentionnerons le rôle des autres aires cérébrales impliquées dans la perception des odeurs.

1.1.3.1. Première intégration par le bulbe olfactif

L'organisation du bulbe olfactif est également stéréotypée chez les Mammifères. En effet, dans ces espèces, le bulbe olfactif est composé de 5 couches concentriques qui sont caractérisées par la présence de populations neuronales spécifiques⁹⁴. La couche la plus externe ou couche glomérulaire est composée de structures sphériques, les glomérules qui sont délimités par les cellules périglomérulaires⁹⁴. Ensuite, la couche plexiforme externe et la couche mitrale abritent les cellules à panache et les cellules mitrales qui permettent la transmission du message olfactif à d'autres aires cérébrales⁹⁴. Elles sont suivies par une couche plexiforme interne et une couche granulaire contenant les interneurons granulaires⁹⁴.

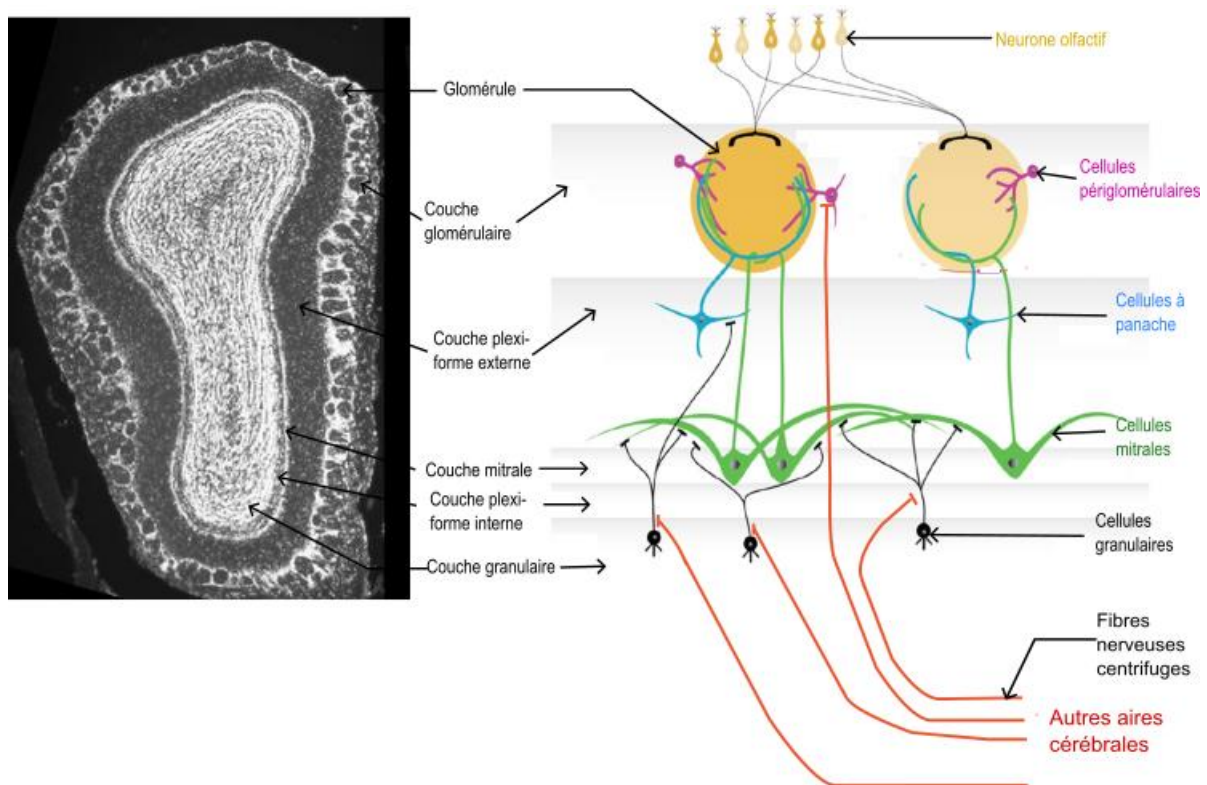


Figure 7 : Organisation générale du bulbe olfactif. Le bulbe olfactif est structuré en 5 zones principales, la couche glomérulaire, la couche plexiforme externe, la couche mitrale, la couche plexiforme interne et la couche granulaire. La zone glomérulaire est composée de structures sphériques nommées glomérules. Dans ces derniers, les axones provenant de neurones olfactifs exprimant le même récepteur olfactif convergent. Ces glomérules sont entourés par les cellules périglomérulaires, des interneurons inhibiteurs. Dans ces glomérules, les neurones olfactifs forment des synapses avec les cellules mitrales et les cellules à panache, dont les axones permettent la transmission du message olfactif vers d'autres aires cérébrales. Les corps cellulaires des cellules à panache et des cellules mitrales sont situés dans la couche plexiforme externe et dans la couche mitrale respectivement. L'activité des cellules mitrales et des cellules à panache est régulée par de nombreux circuits d'interneurons inhibiteurs dont font partie les cellules granulaires et les cellules périgranulaires. Des fibres nerveuses centrifuges issues d'autres aires cérébrales modulent également l'activité du bulbe olfactif en réponse à des odorants. Inspirée de Nagayama et al., *Frontiers in Neural Circuits*, 2014⁹⁴.

Les axones des neurones olfactifs exprimant le même récepteur convergent vers quelques glomérules du bulbe olfactif^{54,84,95,96}. Plus précisément, les axones convergeant vers un glomérule proviennent de neurones exprimant le même récepteur olfactif^{52,54,84}. Dans ces glomérules, les neurones olfactifs contactent les dendrites apicales des cellules mitrales et des cellules à panache qui projettent dans d'autres aires cérébrales et permettent donc l'intégration finale du signal olfactif^{54,95}. En fait, quelques dizaines de cellules mitrales et de cellules à panache projettent une dendrite unique vers un glomérule^{94,95}. Donc, une cellule mitrale ou une cellule à panache est activée par un signal provenant d'un seul récepteur olfactif, et la combinaison de cellules mitrales et de cellules à panache activées permettra l'identification des odeurs rencontrées. La transmission du message olfactif au niveau du bulbe olfactif repose sur des synapses entre les neurones olfactifs et ces cellules mitrales / cellules à panache.

De plus, tout comme l'épithélium olfactif, la zone glomérulaire du bulbe olfactif est organisée en plusieurs zones. En effet, les axones des neurones olfactifs provenant d'une zone de l'épithélium projettent dans une zone correspondante du bulbe olfactif. Par conséquent, des glomérules voisins représentent des récepteurs homologues et reconnaîtraient des ligands proches^{52,54,97}.

L'activité des cellules mitrales et des cellules à panache est hautement régulée par des circuits locaux du bulbe olfactif^{94,95}. Par exemple, les cellules mitrales et les cellules à panache étendent des dendrites latérales dans la couche plexiforme externe qui sont contactées par des interneurones comme les cellules granulaires ou les interneurones de la couche plexiforme externe. Lors de l'activation d'une cellule mitrale / cellule à panache, ces interneurones pourraient inhiber l'activité d'autres de ces cellules^{95,98}. La régulation de l'activité des cellules mitrales et des cellules à panache par ce circuit neuronal et d'autres permet aussi la production de signaux synchronisés lors de leur activation par un odorant⁹⁵. L'intensité des signaux produits par ces cellules est également contrôlée par ces boucles de régulation⁹⁵.

Des axones provenant d'autres aires du système nerveux central, impliquées ou non dans le traitement du signal provenant du bulbe olfactif, interviennent dans la régulation de l'activité bulbaire^{91,95,99}. Ces fibres centrifuges ciblent principalement les cellules granulaires et parfois les cellules périglomérulaires^{94,95,99}. Elles modulent ainsi la sensibilité des cellules mitrales et cellules à panache au signal olfactif afférent et jouent un rôle majeur dans la mémoire et l'apprentissage olfactif, dans la localisation des sources odorantes et dans leur discrimination fine⁹⁹. La régulation des neurones du bulbe olfactif par ces fibres centrifuges joue donc un rôle important dans l'adoption d'un comportement olfactif adapté et donc dans la survie de l'animal^{91,99}.

1.1.3.2. Une intégration plus complexe par le système nerveux central.

Les axones des cellules mitrales et cellules à panache du bulbe olfactif sont connectés avec des neurones appartenant à de nombreuses aires cérébrales. Ces dernières permettront la perception des odorants et l'adoption d'un comportement adapté par les individus face à ces stimuli olfactifs.

Les cellules mitrales et cellules à panache projettent en effet leurs axones dans des structures cérébrales comme le cortex piriforme ou le tubercule olfactif^{91,94,100}. Le cortex piriforme code l'identité des odorants mais aussi d'autres paramètres associés, ce qui est très important pour la perception des odeurs⁹¹. Le tubercule olfactif, quant à lui, est impliqué dans le codage de la valence des odorants et aurait donc un rôle dans des processus d'apprentissage¹⁰⁰.

Le cortex piriforme et le tubercule olfactif sont connectés à de nombreuses aires cérébrales comme le cortex orbitofrontal, le cortex insulaire, l'amygdale, le cortex entorhinal latéral et l'hypothalamus^{91,92,101}. Le cortex orbitofrontal est impliqué dans la perception consciente des odeurs. Il intervient aussi dans les processus de décision liés à l'environnement olfactif et de la valence d'une odeur⁹¹. Le cortex insulaire, dans lequel les informations gustatives et olfactives convergent, est un centre important dans le codage de la saveur¹⁰¹. Au contraire, l'amygdale et le cortex entorhinal latéral font partie du système limbique et interviennent dans la perception inconsciente et émotionnelle des odorants⁹¹. L'activité neuronale de l'amygdale est modulée par la valence et l'intensité des odeurs codées par le cortex piriforme. De plus, par des connexions réciproques avec le cortex piriforme, l'amygdale peut moduler l'activité de ce dernier dans le codage de l'odeur⁹¹. Le cortex entorhinal latéral serait impliqué dans des tâches de discrimination fine et de mémorisation des odeurs car il est connecté à l'hippocampe⁹¹. Les neurones du bulbe olfactif projettent aussi des axones vers les neurones à GnRH de l'hypothalamus⁹³. L'hypothalamus, en fonction du statut métabolique de l'organisme, régule ensuite l'olfaction en sécrétant un grand nombre d'hormones comme l'orexine A qui régule à la fois la perception olfactive et la prise alimentaire⁹².

Par conséquent, l'information olfactive collectée par les neurones sensoriels olfactifs est ensuite intégrée et interprétée par plusieurs circuits parallèles du système nerveux central. Ces derniers permettent l'identification fine et le traitement émotionnel de cette information, ce qui permettra à l'animal d'adopter un comportement adapté en leur présence.

1.2. Pertes de l'odorat et leurs causes.

En fait, avant le début de la pandémie de COVID-19, les dysfonctionnements de l'olfaction étaient déjà relativement fréquents dans la population générale. En effet, la prévalence de dysfonctionnements de l'odorat est comprise entre 1,4 % et 20 % chez les adultes¹⁰². Cette prévalence varie en fonction des méthodologies utilisées pour mesurer l'olfaction (questionnaire subjectif, tests d'identification UPSIT ou test d'identification et de seuil de détection Sniffing Stick Test)¹⁰². Elle varie également selon les populations étudiées dans les différentes études épidémiologiques¹⁰². Elles étaient pourtant négligées généralement car elles n'impliquent généralement pas un danger immédiat pour la vie bien qu'elles impactent considérablement la qualité de vie des patients.

Plusieurs types de dysfonctionnements olfactifs sont observés. Le terme anosmie désigne une perte complète de l'odorat. Le terme hyposmie désigne une forte diminution de la sensibilité des patients aux odorants. Les termes parosmie, fantosmie et cacosmie désignent des distorsions de l'odorat. La parosmie désigne également la perception d'une odeur différente de celle réellement présente dans l'environnement. L'odeur perçue est généralement désagréable. La fantosmie est la perception d'une odeur sans réelle stimulation olfactive dans la muqueuse nasale. Enfin, les cacosmies se définissent par la perception constante d'une odeur désagréable dans le nez¹⁰³.

Dans ce paragraphe, nous aborderons les différentes causes possibles des pertes de l'odorat et les mécanismes proposés pour les expliquer. Nous aborderons également la capacité de certains pathogènes à rentrer dans le système nerveux central en passant par le nerf olfactif.

1.2.1. Epidémiologie des pertes de l'odorat.

1.2.1.1. *Pertes de l'odorat associées à des agents exogènes.*

Dans un premier temps, avant même le début de la pandémie de COVID-19, les chercheurs savaient déjà que l'infection par des virus respiratoires était une des causes principales de perte d'odorat. Ces dysfonctionnements de l'odorat post-viraux pourraient représenter jusqu'à 40 % des pertes des pertes de l'odorat diagnostiqués^{26,104}. Les dysfonctionnements de l'olfaction observés après une infection virale sont très divers, avec des altérations quantitatives (anosmie, hyposmie) ou des distorsions de ce sens (parosmies, fantosmies). Ces pertes de l'odorat deviennent en général chroniques étant donné que seuls un tiers des patients récupèrent complètement leur sens de l'odorat bien qu'environ 85 % d'entre eux perçoivent une amélioration¹⁰⁴.

Pour l'instant, plusieurs virus ont été retrouvés dans les cavités nasales de patients présentant des pertes de l'odorat dont le virus Parainfluenza 3, des Rhinovirus, des Coronavirus et le virus d'Epstein

Barr^{104,105}. Il est également suspecté que l'infection par le virus Influenza causerait des pertes de l'odorat puisque la vaccination anti-grippale réduit le risque d'anosmie¹⁰⁶. De plus, il a été démontré sur des modèles animaux que le virus Influenza A était capable d'infecter les neurones olfactifs et pourrait donc être impliqué dans des dysfonctionnements de l'olfaction¹⁰⁷.

Les mécanismes à l'origine de ces pertes de l'odorat sont encore largement méconnus. Pour autant, 3 grands types de mécanismes ont été proposés par les chercheurs pour les expliquer. Certaines études suggèrent qu'une obstruction des voies nasales liée à l'infection virale ou à l'inflammation locale pourrait expliquer au moins en partie les pertes de l'odorat^{26,108}. D'autres suggèrent que les infections virales pourraient causer des destructions de l'épithélium olfactif avec une perte importante de neurones olfactifs. Après une infection virale, l'épithélium olfactif pourrait également être remplacé par un tissu cicatriciel non neuronal et donc une potentielle perte de l'odorat à long terme^{26,104,109}. Enfin, certains auteurs ont pu observer des altérations des structures centrales olfactives après une infection virale. Il semblerait notamment qu'une diminution de la taille du bulbe olfactif ou du métabolisme des aires cérébrales liées à l'olfaction soient observées chez des patients anosmiques suite à une infection virale^{26,104,110,111}.

D'autre part, d'autres agents exogènes peuvent également causer des pertes de l'odorat. Par exemple, des produits chimiques toxiques comme le méthimazole ou le 2,6-dichlorobenzonitrile sont également capables d'entraîner une desquamation complète de l'épithélium olfactif et donc des pertes de l'odorat¹¹².

1.2.1.2. Pertes de l'odorat associées à des maladies inflammatoires de la cavité nasale

Environ 20 % des dysfonctionnements de l'odorat pourraient être expliqués par des maladies inflammatoires chroniques comme les rhinosinusites allergiques et les rhinosinusites chroniques^{26,104}. Les mécanismes par lesquels ces maladies causent des dysfonctionnements de l'odorat sont encore peu connus¹⁰⁴. Pour autant, 2 grands types de mécanismes sont proposés dans la littérature scientifique. Les polypes formés lors d'une rhinosinusite chronique pourraient empêcher le passage des odorants dans certaines parties de la cavité nasale et donc leur détection par les neurones olfactifs. En effet, la présence de polypes est fortement corrélée avec ces pertes de l'olfaction^{104,113}. De plus, l'inflammation chronique caractéristique de ces pathologies pourrait être liée à une diminution des capacités de régénération de l'épithélium olfactif¹⁰⁴. En effet, d'après Chen et al., une inflammation chronique inhibe la prolifération des cellules basales de l'épithélium olfactif³⁸.

1.2.1.3. Pertes de l'odorat liées à l'âge et à des maladies neurodégénératives.

Avec l'âge, les capacités olfactives de l'Homme ont tendance à fortement diminuer. En effet, à l'âge de 80 ans, plus de la moitié des individus développent des déficits de l'olfaction^{114,115}. Les mécanismes en sont encore peu clairs. Pour autant, certaines études suggèrent que l'activité proliférative des cellules basales diminue chez les personnes âgées^{26,114,116}. Cela serait accompagné par une perte potentielle de neurones olfactifs^{114,116}. Enfin, les composants du système olfactif central sont également touchés lors du vieillissement. Par exemple, le nombre des glomérules diminue avec l'âge^{114,117}.

Les patients atteints par des maladies neurodégénératives comme les maladies d'Alzheimer ou de Parkinson souffrent également de dysfonctionnements de l'olfaction^{26,114}. En effet, plus de 85 % des patients atteints par ces maladies développent des dysfonctionnements de l'olfaction à un stade précoce^{26,114}. Des études suggèrent même que ces maladies neurodégénératives pourraient débiter dans le système olfactif étant donné que les fibres amyloïdes et les agrégats d' α -synucléine se forment dans le bulbe olfactif à des stades très précoces de ces maladies²⁶.

D'autres pathologies comme les traumatismes crâniens et les chirurgies de la cavité nasale ou de la base du crâne peuvent également causer dans des pertes de l'odorat mais ne seront pas abordées dans ce travail¹¹⁴.

1.2.2. Le rail olfactif, une potentielle voie de passage des agents pathogènes vers le système nerveux central.

Dans le système nerveux central, les neurones sont généralement protégés par la barrière hématoencéphalique qui est considérée comme imperméable aux agents pathogènes et aux substances toxiques¹¹⁸. Cette barrière hématoencéphalique est principalement composée de cellules endothéliales, des péricytes et des pieds des astrocytes, formant donc une barrière avec trois épaisseurs complètes de cellules (**Figure 8**)¹¹⁸. Les cellules endothéliales de la barrière hématoencéphalique présentent des jonctions serrées et des jonctions adhérentes, ce qui les rend très cohésives. Elles permettent en particulier de limiter le passage paracellulaire de molécules entre ces cellules^{118,119}. Les astrocytes sont des cellules gliales étendant des pieds qui couvrent la surface entière des capillaires sanguins du système nerveux central. Ces cellules participent au filtrage des molécules par cette barrière hématoencéphalique^{118,120}. Entre les couches formées par les cellules endothéliales et les astrocytes, les péricytes ont aussi un rôle dans l'imperméabilité de la barrière hématoencéphalique¹²¹.

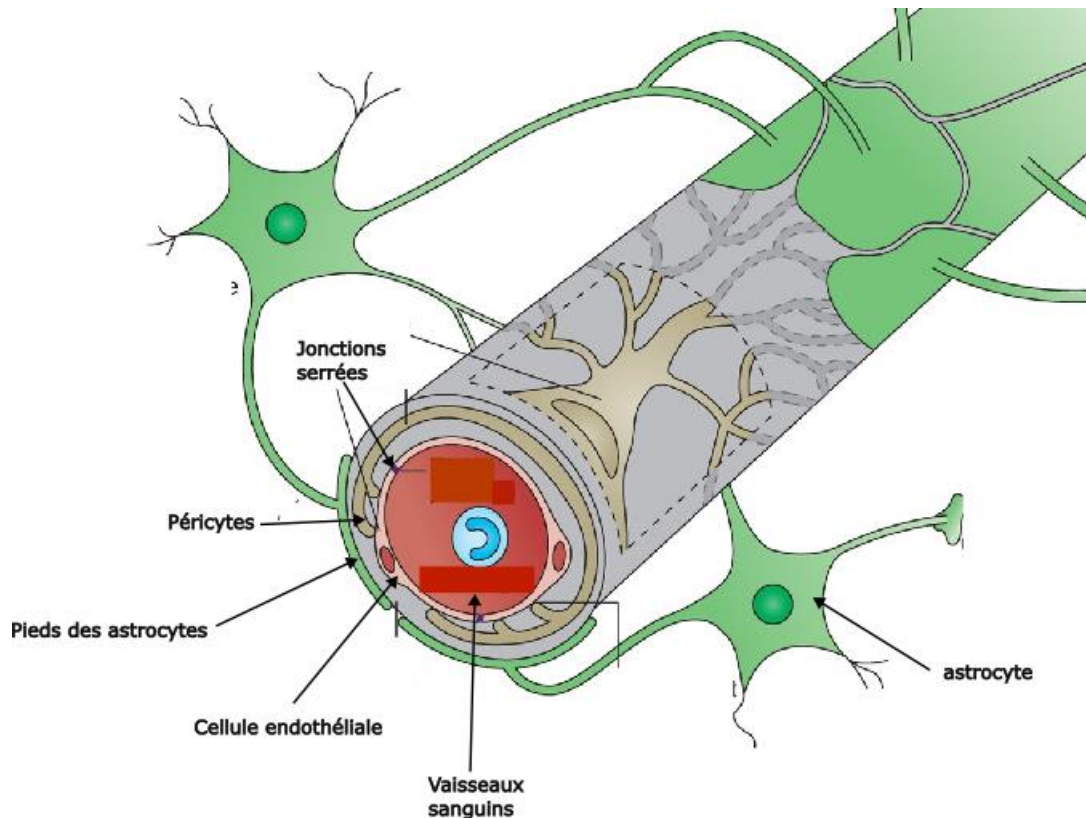


Figure 8 : Structure de la barrière hémato-encéphalique. La barrière encéphalique est composée de 3 couches cellulaires qui empêchent l'entrée de nombreuses molécules et des pathogènes dans le cerveau à partir de la circulation sanguine. Les cellules endothéliales dotées de jonctions serrées permettent de limiter la perméabilité des vaisseaux sanguins. Les péricytes, quant à eux, régulent le flux sanguin et la perméabilité de cette barrière. Enfin, les pieds des astrocytes, des cellules gliales couvrent entièrement les vaisseaux sanguins du système nerveux central et participent au filtrage des molécules qui entrent dans le cerveau. Adapté de Obermeier et al., Nature Medecine, 2013.

Les neurones olfactifs sont directement exposés à l'extérieur, ce qui est essentiel pour la détection des molécules odorantes rencontrées par l'individu. Ils sont donc également soumis à la présence de composés toxiques et d'agents pathogènes présents dans la cavité nasale, les rendant particulièrement vulnérables à des dommages ou à des infections. De plus, ces cellules projettent directement dans le bulbe olfactif^{39,97}. Cette voie vers le système nerveux central est donc peu protégée et peut permettre l'invasion de pathogènes dans ce dernier. Cette voie d'entrée des pathogènes vers le système nerveux central est généralement désignée par le terme 'rail olfactif' dans la littérature scientifique¹²².

Une grande diversité de virus seraient capables de passer dans le système nerveux central par ce 'rail olfactif' (**Table 1**)¹²². Le passage par ce 'rail olfactif' peut se faire de 2 manières distinctes : la voie paracellulaire et la voie transcellulaire. Dans la voie transcellulaire, les neurones olfactifs sont infectés par le virus et ce dernier est transporté de manière antérograde dans leurs axones. Les neurones olfactifs sont entourés par des cellules engainantes qui forment un conduit menant vers le bulbe olfactif. Le virus peut également potentiellement utiliser ces derniers pour entrer dans le système nerveux central soit en

infectant directement les cellules engainantes soit en passant directement par ces conduits en absence d'axones de neurones olfactifs à l'intérieur de ces derniers¹²².

Ainsi la muqueuse olfactive et le nerf olfactif pourrait permettre une invasion du système nerveux central par le virus de manière relativement plus aisée que par la voie hématogène qui suppose la traversée de la voie hémato-encéphalique.

Virus	Neurotropisme	Passage par la voie olfactive	Mécanisme	Référence
IAV Influenza A virus	Oui	Très fortement suspecté	Infection des neurones olfactifs (voie transcellulaire),	Modèle souris : Mori et al., Journal of General Virology, 2002. Aronsson et al., Viral Immunology, 2004. Humain : Van Riel et al., Journal of Infectious Disease, 2014.
HSV-1 Herpes Simplex Virus 1	Oui	Très fortement suspecté	Possible infection des neurones olfactifs (voie transcellulaire),	Modèles rongeurs : Mori et al., Journal of Neurovirology, 2005.
Nipah Virus	Oui	Oui	Infection des neurones olfactifs (voie transcellulaire) ?	Modèle hamster : Munster et al., Nature Scientific Reports, 2012
RSV Respiratory Syncithial Virus	Oui	Oui	Infection des neurones olfactifs (voie transcellulaire)	Modèle souris : Bryche et al., Journal of Neurochemistry, 2019

Table 1 : Quelques exemples de virus utilisant le 'rail olfactif' pour entrer dans le système nerveux central.

2. Réponse immunitaire innée à une infection virale, inflammation et potentiels dommages tissulaires associés.

2.1. Immunité innée, inflammation et rôle dans la clairance du virus.

2.1.1. Les macrophages résidents, des cellules en première ligne dans la défense contre les pathogènes.

Des cellules immunitaires dont principalement des macrophages résident dans la plupart des tissus sains. Ces cellules sont des senseurs importants pour la détection et la clairance de potentielles menaces et pour l'induction des réponses immunitaires¹²³⁻¹²⁶. Dans la muqueuse olfactive, la présence de macrophages résidents a été démontrée dès 2002 lorsque Mori et co-auteurs ont observé des cellules phagocytes présentant le marqueur Iba1 (marqueur de macrophage/microglie) dans ce tissu^{107,125,127,128}. Ici, nous nous intéresserons d'abord aux caractéristiques et aux origines putatives de ces macrophages résidents de la muqueuse olfactive puis à leurs fonctions dans la clairance des pathogènes et dans la résolution de l'inflammation.

2.1.1.1. Caractérisation et origine des cellules Iba1⁺ présentes dans la cavité nasale.

Tout d'abord, les macrophages résidents sont des cellules très hétérogènes dont le phénotype dépend de l'environnement tissulaire dans lequel ils évoluent, ce qui complique leur caractérisation^{123,124}. Tous les macrophages résidents partagent l'expression de certains gènes comme des PRR (*Pattern Recognition Receptors*), des récepteurs phagocytiques, CX₃CR1, CSF1R, CD64, FcγR1 ou F4/80^{124,129}. Pourtant, des facteurs libérés par le tissu (métabolites et cytokines par exemple) et le contact avec les cellules du tissu permettent une spécialisation des macrophages résidents¹²⁴. Par exemple, le phénotype des cellules de la microglie, les macrophages résidents du système nerveux central, est contrôlé par les neurones environnants. En effet, l'activité neuronale, les interactions entre protéines membranaires de la microglie et des neurones ainsi que la sécrétion de cytokines et de chimiokines par les neurones régulent l'activité des cellules de la microglie^{124,130}. De plus, les macrophages résidents forment trois grands types de populations avec des origines différentes¹²³⁻¹²⁵. Deux populations de macrophages résidents sont dérivés de tissus embryonnaires comme le sac vitellin et le foie fœtal. La troisième population de macrophages résidents est dérivée des monocytes de la moelle osseuse¹²³⁻¹²⁵. Cette

provenance des macrophages résidents, qui peut être unique (comme les microglies qui sont issues du sac vitellin¹³¹) ou mixte permet leur caractérisation¹²³⁻¹²⁵.

Les cellules Iba1⁺ décrites dans la cavité nasale sont encore à ce jour très mal caractérisées. En général, ces cellules sont assimilées avec les cellules de la microglie. En effet, la muqueuse olfactive est reliée directement au système nerveux central et plus particulièrement au bulbe olfactif par le nerf olfactif, comme abordé dans le paragraphe **1.2.2**. La proximité entre ces deux structures serait en faveur d'une origine commune des microglies du bulbe olfactif et des cellules immunitaires de la muqueuse olfactive. De plus, les cellules résidentes de ces deux structures expriment des marqueurs communs comme Iba1^{107,125,128,132}. Pourtant, ce marqueur n'est pas exclusif aux microglies, ce qui ne permet pas d'établir une correspondance entre les deux populations de macrophages résidents. Par exemple, dans leur étude de l'inflammation associée au SARS-CoV-2, Frere et co-auteurs ont montré l'existence d'une population de macrophages exprimant ce marqueur dans le poumon¹³³. Enfin, les morphologies des cellules Iba1⁺ de la cavité nasale et des microglies du bulbe olfactif sont comparables, que ce soit au repos ou à l'état activé. En effet, chez des animaux non infectés, au repos, les cellules Iba1⁺ de l'épithélium olfactif présentent de nombreuses ramifications²⁷. Par contre, en conditions inflammatoires (infection par le SARS-CoV-2), les mêmes auteurs ont montré que ces cellules prenaient une forme beaucoup plus arrondie²⁷. Il y a donc un changement morphologique important de ces cellules lors d'une inflammation. Les cellules de la microglie subissent un changement morphologique similaire lors de leur activation : au repos, elles sont en général fortement ramifiées alors qu'en conditions inflammatoires, elles prennent une forme amiboïde^{125,134}.

Toutefois, certaines des caractéristiques des cellules immunitaires Iba1⁺ de la muqueuse olfactive les distingueraient des populations de microglies. En effet, une étude de Vukovic et co-auteurs montre que les macrophages résidents de la cavité nasale sont au moins partiellement renouvelés grâce à des monocytes du système hématopoïétique¹³⁵. Ceci les exclurait *de facto* des cellules de la microglie puisque ces dernières sont supposées être intégralement en auto-renouvellement^{125,136}. Récemment, des études ont défini une nouvelle population de macrophages résidents du système nerveux périphérique¹³⁷. Ces dernières, tout comme les cellules Iba1⁺ de la cavité nasale, présentent des similarités avec les microglies du système nerveux central. En effet, les cellules de la microglie et les macrophages du système nerveux périphériques expriment un répertoire important de gènes en commun¹³⁷. L'environnement tissulaire, et notamment la présence de populations neuronales, pourrait être à l'origine de telles similarités entre ces différentes populations^{124,137}. Elles présenteraient également des changements morphologiques similaires à ceux observés sur les microglies lors de leur activation¹³⁸. L'origine de ces macrophages résidents du système nerveux périphérique est encore mal connue mais serait mixte, certains d'entre eux seraient renouvelés grâce aux monocytes de la moelle osseuse tandis

que d'autres seraient dérivés d'organes embryonnaires^{137,138}. Enfin, des études plus anciennes sur le nerf sciatique montrent que ces populations de macrophages résidents du système nerveux périphérique expriment Iba1, un marqueur retrouvé chez les macrophages résidents de la cavité nasale¹³⁸. Ces caractéristiques des macrophages résidents du système nerveux périphérique les rapprochent des cellules Iba1⁺ de la cavité nasale.

Enfin, quelle que soit leur provenance, les macrophages résidents sont généralement capables de proliférer dans les tissus¹²³. Pour autant, à ce jour, aucune étude n'a pu montrer que les cellules Iba1⁺ ont cette capacité à se diviser dans la muqueuse olfactive. Vukovic et co-auteurs, dans une étude de 2010, supposent que cette activité proliférative est fortement limitée¹³⁵. Toutefois, dans cette étude, les chercheurs utilisent des souris irradiées ayant été ensuite transplantées avec des cellules souches hématopoïétiques fluorescentes. L'irradiation des souris pourrait inhiber la prolifération des macrophages résidents de la muqueuse olfactive¹³⁵. La capacité de ces cellules à se diviser est donc encore largement inconnue.

Les données présentes actuellement dans la littérature ne permettent pas de caractériser de manière claire la population de macrophages résidents Iba1⁺ de la cavité nasale. Deux hypothèses ressortent pourtant de la littérature : elles pourraient être des microglies provenant du système nerveux central ou des macrophages résidents du système nerveux périphérique qui partagent également des caractéristiques avec les microglies.

2.1.1.2. Fonctions des macrophages résidents lors de la genèse et de la résolution d'une inflammation.

Les macrophages résidents remplissent de nombreuses fonctions dont certaines sont communes et d'autres sont spécifiques du tissu de résidence.

En effet, dans un tissu sain, ces cellules interviennent dans le maintien de l'homéostasie du tissu. Dans un premier temps, les macrophages sont impliqués dans la clairance des neurones olfactifs en dégénérescence^{107,135,139,140}. De plus, dans la muqueuse olfactive, les cellules Iba1⁺ auraient un rôle dans la survie et la régénération des neurones olfactifs notamment en sécrétant des facteurs de survie^{135,139,140}. Par exemple, le facteur LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*), en partie sécrété par les macrophages présents dans la muqueuse olfactive, stimule la prolifération des cellules basales et favorise la survie des neurones olfactifs en réponse à des lésions du nerf olfactif¹³⁹⁻¹⁴¹.

Les macrophages résidents expriment généralement un grand nombre de PRR (*Pattern Recognition Receptors*) qui permettent la reconnaissance de déterminants moléculaires exprimés par les

microorganismes (PAMP (*Pathogen Associated Molecular Pattern*)) ou de signaux de danger sécrétés par des cellules lésées (DAMP (*Damage Associated Molecular Pattern*))^{123,125,126}. Grâce à ces nombreux récepteurs, ces cellules sont impliquées dans la surveillance de la muqueuse olfactive et dans la détection de lésions ou de pathogènes invasifs potentiels^{123,125,126,135}. En contexte d'infection virale, cette reconnaissance entraîne l'activation de la phagocytose et la sécrétion de peptides anti-microbiens (LL-37) et de ROS (*Reactive Oxygen Species*)^{123,125,126}. Ces fonctions effectrices des macrophages seront développées dans le paragraphe **2.1.3.** de cette thèse. Ces fonctions anti-microbiennes leur permettent de limiter la propagation du virus (**Figure 9**)^{126,142}.

En cas d'infection virale, les macrophages produisent des cytokines et des chimiokines comme les interférons de type I, l'interféron- γ (IFN- γ), l'IL-1 β , le TNF- α , l'IL-6, CXCL2, CXCL10, CCL2 ou CCL8 qui sont impliquées dans le recrutement d'autres cellules immunitaires comme les neutrophiles, les monocytes et les lymphocytes^{123,125,126,135,143,144}. Par exemple, la chimiokine CXCL2 sécrétée par les macrophages résidents participe au recrutement des neutrophiles¹⁴³. De plus, certaines populations de macrophages résidents sécrètent également des chimiokines comme CCL8 impliquées dans le recrutement des monocytes inflammatoires Ly6C^{high} (décrits dans le paragraphe **2.1.2**)¹⁴⁴. Ces macrophages activés par les pathogènes et sécrétant des cytokines pro-inflammatoires sont considérés comme des macrophages M1 pro-inflammatoires que nous présenterons de manière plus exhaustive dans les paragraphes **2.1.2** et **2.1.3.** Ce phénotype inflammatoire des macrophages résidents et microglie permet ainsi d'alimenter l'inflammation en induisant une polarisation inflammatoire des macrophages résidents avoisinants (développé dans les paragraphes **2.1.2.1.** et **2.1.3.**) et une infiltration d'autres cellules immunitaires effectrices.

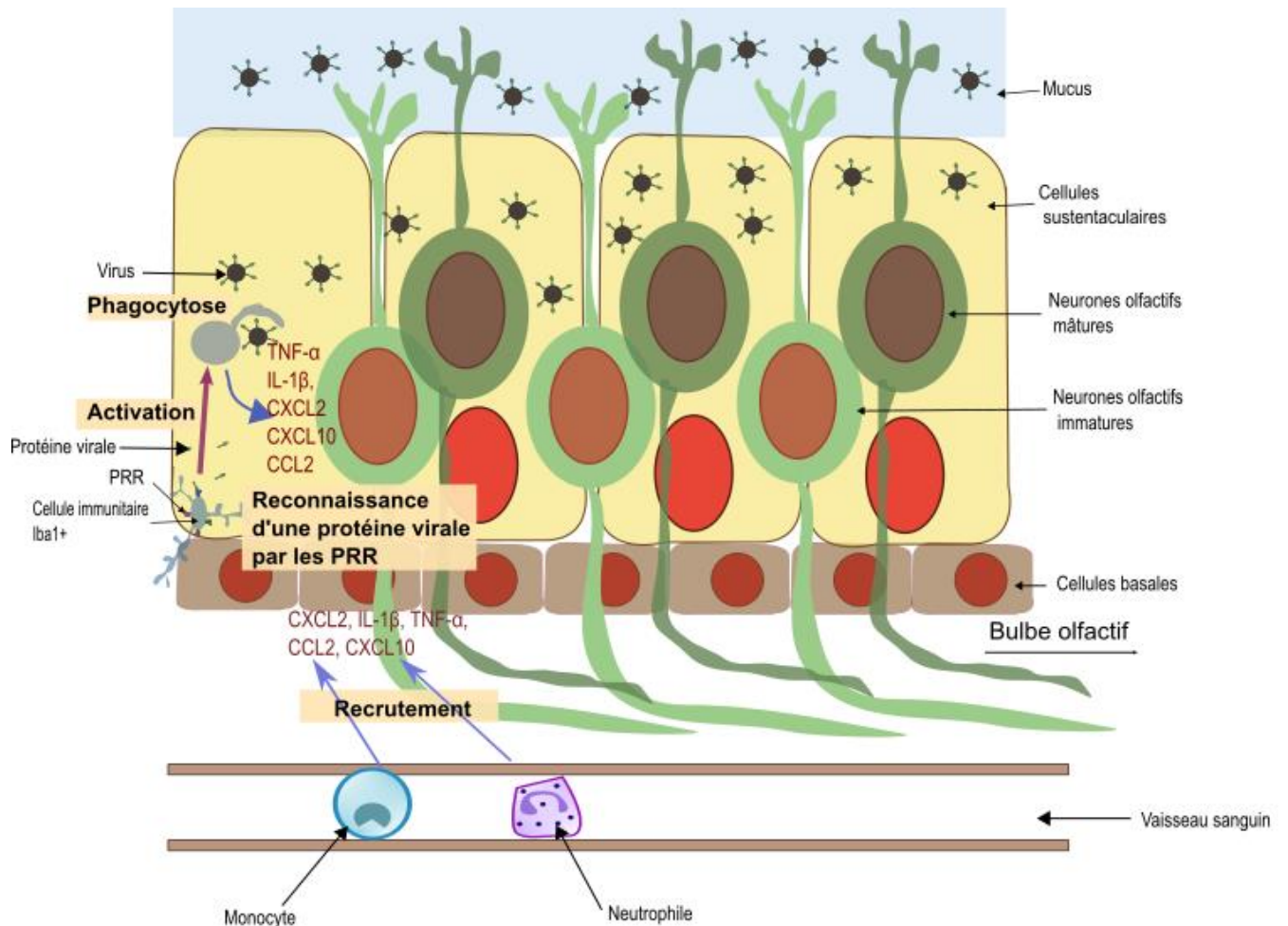


Figure 9 : Les macrophages résidents jouent un rôle crucial dans l'initiation de l'inflammation en contexte d'infection. Les macrophages résidents, dans notre contexte les cellules immunitaires Iba1⁺, expriment de nombreux récepteurs permettant de reconnaître des motifs stéréotypés présents dans les déterminants moléculaires essentiels des microorganismes pathogènes et des molécules associées aux dommages tissulaires. Lors de l'infection par un pathogène, ces macrophages reconnaissent ce dernier grâce à ces récepteurs. Alors, ils sont activés et commencent à éliminer les microorganismes grâce à la phagocytose, la sécrétion de peptides anti-microbiens et la sécrétion d'espèces réactives de l'oxygène. De plus, ces macrophages activés M1 sécrètent également des cytokines et des chimiokines pro-inflammatoires qui permettent le recrutement d'autres cellules immunitaires impliquées dans l'inflammation comme les neutrophiles et les monocytes.

De plus, en conditions inflammatoires, certaines populations de macrophages expriment des molécules du CMHII (*Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe II*) et des molécules de co-stimulation comme CD40^{125,145,146}. Cela pourrait les impliquer dans l'initiation des réponses immunitaires adaptatives, rôle qui est normalement dévolu aux cellules dendritiques. Par exemple, les cellules de la microglie, après activation, expriment les molécules de CMHI et CMHII et des molécules de co-stimulation¹⁴⁵. Ces observations sont associées avec une prolifération des lymphocytes T CD4⁺ et la sécrétion de certains facteurs de survie des lymphocytes¹⁴⁵.

Après la clairance du pathogène, les macrophages ont aussi un rôle important dans la résolution de l'inflammation et dans la réparation tissulaire (**Figure 10**). Au cours de l'inflammation, certains des neutrophiles recrutés rentrent en apoptose et sont phagocytés par les macrophages¹⁴⁷. Ces derniers

commencent alors à sécréter des cytokines anti-inflammatoires comme le TGF- β (*Transforming Growth Factor β*)^{139,140,147} et des facteurs de croissance impliqués dans la réparation tissulaire comme l'acide rétinoïque, LIF ou l'IGF-1 (*Insulin-like Growth Factor 1*)^{139,140,147}. L'IGF-1 favoriserait la prolifération des cellules basales de l'épithélium olfactif^{140,148}. Le TGF- β , quant à lui, serait impliqué dans la maturation des neurones olfactifs lors de la régénération de l'épithélium olfactif¹³⁹. Enfin, l'acide rétinoïque serait impliqué dans le maintien de la population de cellules souche basales et dans la régulation de la vitesse de la différenciation des progéniteurs neuronaux en neurones olfactifs matures^{140,149}. L'apoptose des neutrophiles pourrait être liée à la forte production de TNF- α dans le tissu inflammé^{147,150} mais pourrait aussi être stimulée par des médiateurs lipidiques anti-inflammatoires comme les lipoxines ou les résolvines^{147,151,152}.

De plus, les macrophages participent aussi à la résolution de l'inflammation en limitant le recrutement de neutrophiles dans le tissu¹⁴⁷. L'expression des chimiokines attirant les neutrophiles par les macrophages est fortement diminuée¹⁴⁷. Par exemple, la synthèse de CXCL8 est fortement inhibée par les lipoxines^{147,153}. De plus, des métalloprotéases sécrétées par les macrophages comme MMP12 clivent les chimiokines CXCL2 et CXCL8, responsables du recrutement des neutrophiles. Le clivage de ces chimiokines leur fait perdre leur activité chimiotactique^{147,154}. Ces macrophages avec des propriétés anti-inflammatoires et pro-régénératives sont désignés par le terme macrophage M2 dans la littérature et la suite de ce texte (cf. paragraphes **2.1.2.** et **2.1.3.**).

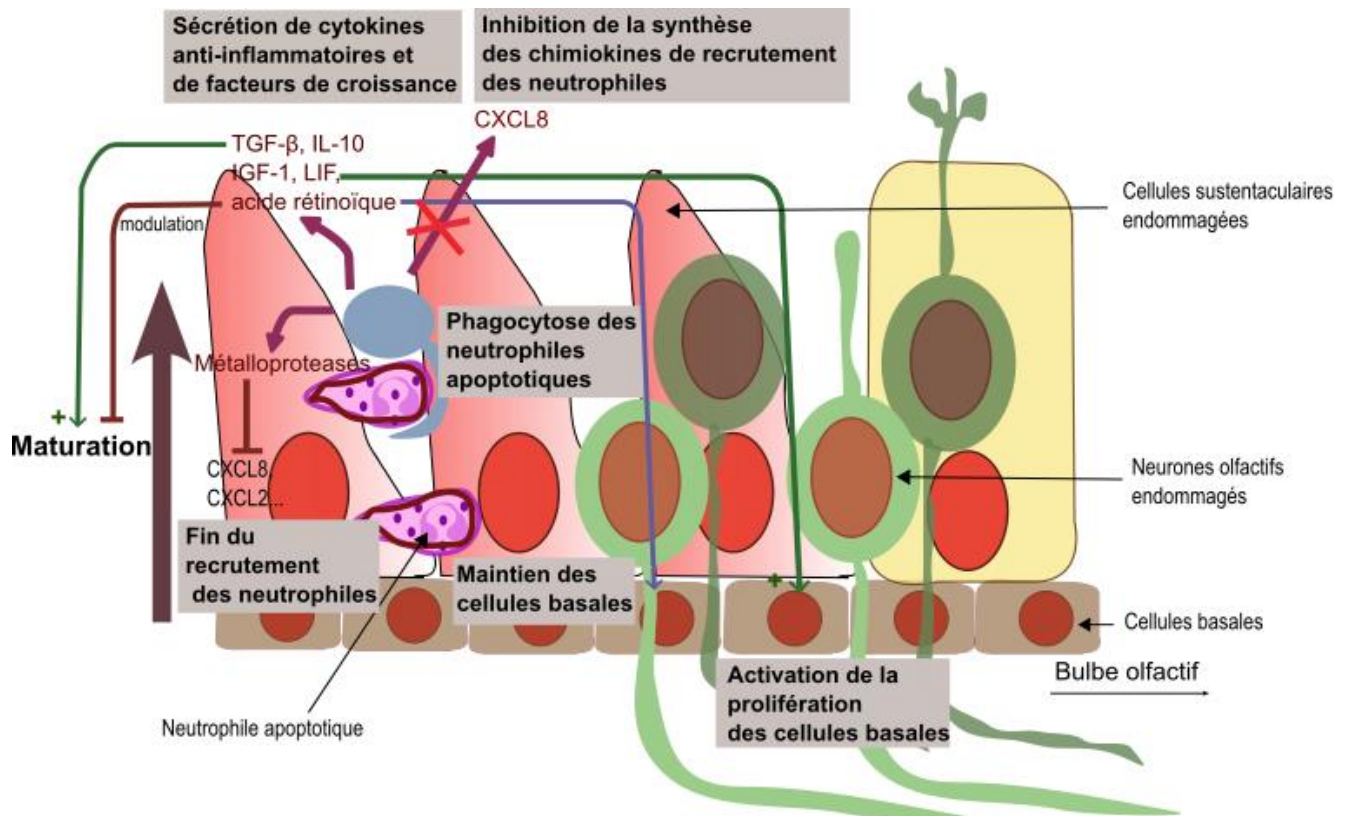


Figure 10 : Les macrophages jouent un rôle important dans la résolution de l'inflammation. Au cours de l'inflammation, les neutrophiles commencent à mourir par apoptose. Ces cellules apoptotiques sont phagocytées par les macrophages présents dans le tissu. Cette phagocytose entraîne la sécrétion par ces cellules de cytokines anti-inflammatoires et de facteurs de croissance impliqués dans la régénération du tissu et dans le maintien de son intégrité. La synthèse de chimiokines permettant le recrutement des neutrophiles est inhibée dans ces cellules. Enfin, ils sécrètent des métalloprotéases qui clivent ces chimiokines, inhibant donc totalement le recrutement d'autres cellules immunitaires pro-inflammatoires.

En conclusion, les macrophages résidents jouent un rôle très important dans la détection de lésions ou de pathogènes dans un tissu grâce à leurs nombreux récepteurs permettant de détecter les PAMPs ou les DAMPs dans leur environnement. En présence de pathogènes, les macrophages produisent des cytokines pro-inflammatoires menant au recrutement d'autres cellules immunitaires effectrices et participent à la clairance de ces derniers en les phagocytant et à la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative : ce sont des macrophages M1 considérés comme pro-inflammatoires. Après la clairance des pathogènes, les macrophages participent à la résolution de l'inflammation et à la régénération du tissu en sécrétant des facteurs de croissance et des molécules inflammatoires notamment : ce sont des macrophages M2 considérés comme anti-inflammatoires. Les macrophages sont des cellules extrêmement plastiques qui peuvent passer d'un phénotype M1 à un phénotype anti-inflammatoire M2 sous certains stimuli comme la présence de neutrophiles apoptotiques dans le tissu.

2.1.2. Recrutement des cellules myéloïdes de l'immunité innée aux sites d'inflammation ou d'infection.

Dans un contexte d'infection virale, en plus des macrophages résidents, des cellules de la lignée hématopoïétiques sont également recrutées au site d'infection et contribuent à l'inflammation, principalement les neutrophiles, les monocytes et les macrophages dérivés de monocytes pro-inflammatoires M1³⁶. Nous nous limiterons à ces trois populations puisqu'elles font partie des premières cellules recrutées au site d'inflammation et contribuent significativement à l'inflammation et aux dommages tissulaires collatéraux souvent observés^{36,155}.

2.1.2.1. Principales caractéristiques des neutrophiles, des monocytes et des macrophages.

Les neutrophiles sont des cellules de l'immunité innée très fortement impliquées dans la clairance des agents pathogènes et dans la genèse de l'inflammation. Ils sont caractérisés par un noyau plurilobé, ce qui explique leur dénomination comme cellules polynucléaires¹⁵⁶. Les neutrophiles sont également caractérisés par la présence de nombreuses granules sécrétoires dans leur cytoplasme. Ces dernières contiennent des protéases et des peptides anti-microbiens¹⁵⁶⁻¹⁵⁸. Les granules azurophiles ou granules primaires sont composées principalement de protéases nommées serprocidines (cathepsine G, élastase neutrophilaire et protéinase 3), de la myéloperoxydase (une enzyme redox qui convertit H₂O₂ en acide hypochloreux ou en acide hypoiodéux) et de défensines (peptides anti-microbiens¹⁵⁶⁻¹⁵⁸). Les granules secondaires contiennent des composés antimicrobiens comme les lactoferrines ou les lysozymes et des métalloprotéases (MMP8, MMP9 et MMP25 principalement)¹⁵⁶⁻¹⁵⁸.

La production et la différenciation des neutrophiles a lieu dans la moelle osseuse des os. Leur production est estimée à environ $5 \cdot 10^{10}$ de ces cellules par jour (soit environ 0.5% du nombre moyen de cellules de l'organisme et 0.1% du nombre d'hématies circulantes)¹⁵⁹⁻¹⁶¹. Dès le début des années 1980s, la durée de vie estimée des neutrophiles est considérée comme très courte. En effet, de nombreuses études estiment que leur durée de vie moyenne dans le sang est de moins de 20 heures, que ce soit chez l'Homme ou dans le modèle murin^{156,161-165}. Pourtant, une étude plus récente rallonge considérablement la durée de vie de ces cellules en estimant cette dernière à environ 5 jours¹⁶⁶. En effet, les neutrophiles ont des fonctions de régulation de l'immunité qui seraient incompatibles avec une durée de vie de quelques heures^{166,167}. Par exemple, les neutrophiles auraient un rôle dans l'induction des réponses anticorps T-indépendantes notamment en participant à l'induction des commutations de classe des immunoglobulines dans la zone marginale de la rate¹⁶⁸.

Les macrophages et leurs progéniteurs monocytes sont également recrutés précocement dans les tissus inflammés et participent à la défense contre les microorganismes pathogènes³⁶. En effet, dans un contexte infectieux, les monocytes/macrophages interviennent dans la genèse, l'entretien, la résolution de l'inflammation et dans la clairance des pathogènes^{155,169,170}. De plus, les monocytes/macrophages sont des cellules présentatrices de l'antigène et, aux côtés des cellules dendritiques, peuvent activer et orienter les réponses immunitaires adaptatives^{171,172}. Les monocytes/macrophages sont des cellules mononucléaires qui forment des populations hétérogènes et polyvalentes¹⁷³⁻¹⁷⁵. Malgré la très forte hétérogénéité de ces populations cellulaires, elles conservent toutes une activité de phagocytose^{36,174,175}. Chez l'Homme, les monocytes représentent environ 10 % des leucocytes circulants^{173,174}. Chez la souris, par contre, ils ne représentent que 2 à 4 % de ces derniers^{173,174}.

Actuellement, les macrophages sont subdivisés en deux populations principales : les macrophages M1 et les macrophages M2¹⁷³⁻¹⁷⁶. D'une part, les macrophages M1 interviennent dans la clairance des pathogènes invasifs dans les tissus. Ils produisent notamment des molécules toxiques comme des ROS (*Reactive Oxygen Species*) et du NO et sécrètent des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α , l'IL-1 β , l'IL-6, l'IL-12 ou l'IL-18^{155,173,174,177,178}. De plus, ces cellules expriment les marqueurs de surface comme CD68, et des molécules de costimulation comme CD80, CD86 et CD40^{155,175,177}. D'autre part, les macrophages M2 sont impliqués soit dans une inflammation alternative (intervenant notamment dans les infections parasitaires) soit dans la régénération des tissus^{170,173,174,177,178}. Ces cellules produisent notamment des polyamines et des enzymes de dégradation de la matrice extracellulaire qui favorisent la régénération et le remodelage des tissus^{170,173,174} et sécrètent des chimiokines comme l'IL-13, CCL17 et CCL18¹⁷⁵. De plus, ils expriment également des marqueurs de surface comme CD163, CD206, CD200R, MGL1 et MGL2^{170,175,177}.

Les monocytes sont également des cellules du sang relativement hétérogènes^{173,174,179,180}. Chez l'Homme, les monocytes sont subdivisés en 3 populations sur la base de l'expression de 2 marqueurs : CD14 et CD16. Tout d'abord, les monocytes classiques sont CD14⁺CD16⁻ ; les monocytes intermédiaires sont CD14⁺CD16⁺ et les monocytes non classiques sont CD14⁻CD16⁺^{173,174,179-181}. Les monocytes non classiques adhèrent aux parois des vaisseaux sanguins et ont un rôle de surveillance. Ils sont recrutés extrêmement rapidement dans les tissus inflammés ou infectés^{173,174,179,181,182}. De plus, les monocytes classiques sont accumulés fortement dans les tissus inflammés ou infectés où ils se différencient en macrophages et en cellules dendritiques pro-inflammatoires^{173,180,183}. Ils peuvent également être recrutés dans les ganglions lymphatiques où ils participent à la présentation de l'antigène et à l'initiation des réponses immunitaires adaptatives^{173,180}. Chez les rongeurs, c'est l'expression du marqueur Ly6C qui permet de diviser les monocytes en deux populations^{173,180,183}. Les monocytes Ly6C⁺ correspondraient

aux monocytes classiques chez l'Homme et les monocytes Ly6C⁻ correspondraient aux monocytes non classiques chez l'Homme^{173,180,183}.

2.1.2.2. Recrutement de ces cellules de la lignée hématopoïétique dans les tissus inflammés.

Les neutrophiles et monocytes de la lignée hématopoïétique sont produits dans la moelle osseuse et se retrouvent principalement dans la circulation sanguine. Ils sont recrutés localement dans les tissus inflammés en traversant l'endothélium vasculaire, c'est le processus de diapédèse.

2.1.2.2.1. Le mécanisme de recrutement des cellules immunitaires : la diapédèse.

La diapédèse est un processus ayant lieu en cinq étapes. Les deux premières sont le *tethering* et le *rolling* (**Figure 11**). L'interaction entre les L-sélectines ou les glycosylations de la protéine PSGL-1 (*P-selectin glycoprotein ligand 1*) présents à la surface des leucocytes et les E-, les P-sélectines exprimées par les cellules endothéliales sont à l'origine de ce premier attachement^{156,181,184-188}. L'expression des E-sélectines et des P-sélectines à la surface de l'endothélium est induite en conditions d'inflammation par divers facteurs comme l'histamine, les cystéinyl-leucotriènes, les thrombines, des cytokines (IL-4, IL-13, TNF- α et IL-1 β), les oxydants ou par la reconnaissance de PAMP (*Pathogen-associated molecular patterns*) par les PRR (*Pattern Recognition receptors*) présents à la surface de l'endothélium^{156,181,184,185,189-191}.

La troisième étape est une adhésion ferme et un arrêt du *rolling*. Cette dernière est initiée par deux interactions entre les L-sélectines et les P- ou E-sélectine mais aussi entre les chimiokines « décorant » l'endothélium et les récepteurs aux chimiokines présents sur les cellules immunitaires^{156,161,184,185}. En effet, les chimiokines sécrétées dans un tissu inflammé, chargées globalement positivement, sont séquestrées à la surface de l'endothélium grâce à des interactions avec les composants du glycocalix (glycosylations des protéines membranaires et des glycosaminoglycannes) qui sont chargés négativement^{156,161,185,192}. Ces chimiokines forment des gradients de concentration à la surface de l'endothélium vers le site d'inflammation^{156,161,185,192}. Par exemple, les neutrophiles sont particulièrement sensibles aux gradients de chimiokines de type ELR-CXC (des cytokines qui présentent un acide aminé entre les deux premières cystéines et qui contiennent un motif glutamate – leucine – arginine immédiatement avant le motif CXC)^{156,161,185}. Ces chimiokines regroupent CXCL8, exprimée chez l'Homme mais pas chez les rongeurs, ainsi que ses homologues CXCL1, CXCL2 et CXCL5^{156,161,185,193,194}. Elles sont reconnues par le récepteur CXCR2 présent à la membrane des neutrophiles^{156,161,185,194}. Les

monocytes classiques et intermédiaires, quant à eux, sont recrutés grâce aux chimiokines CCL2 et CCL7 reconnues par le récepteur CCR2^{36,173,179,180,195}.

En réponse à ces deux interactions, des intégrines présentes à la surface des cellules immunitaires comme LFA-1 (*Leukocyte function-associated antigen 1*) ($\alpha_L\beta_2$) ou MAC-1 (*Macrophage-1 antigen*) ($\alpha_M\beta_2$) sont activées et interagissent avec des ligands présents à la surface de l'endothélium comme ICAM-1 (*Intercellular Adhesion Molecule-1*), ICAM-2 ou VCAM-1 (*Vascular cell adhesion molecule-1*)^{156,161,184,185,196-198}. Dans le cas particulier des monocytes, l'interaction entre l'intégrine VLA-4 (*Very late antigen 4*) ($\alpha_4\beta_1$) exprimée par le monocyte et VCAM-1 présente à la surface de l'endothélium joue un rôle dans le processus d'adhésion ferme également^{181,187,199}.

Dans un quatrième temps, les cellules immunitaires ayant adhéré migrent à la surface de l'endothélium^{156,161,184,199,200}. Cette étape est nommée *crawling*. Ces cellules se déplacent généralement de manière perpendiculaire au flux sanguin, jusqu'à un site d'extravasation préférentiel, qui se trouvent au niveau des jonctions entre cellules endothéliales^{156,161,184,199}. Les principales molécules impliquées dans cette étape de *crawling* sont les β_2 intégrines comme LFA-1 ou MAC-1 présentes à la surface des cellules immunitaires et leurs ligands endothéliaux ICAM-1 et ICAM-2^{181,184,199,200}.

La dernière étape du processus de diapédèse est la migration des cellules immunitaires à travers la paroi de l'endothélium et la lame basale sous-jacente pour atteindre les tissus inflammés. Elle est nommée diapédèse au sens strict. Deux voies de diapédèse principales sont possibles : une voie transcellulaire et une voie paracellulaire. La voie paracellulaire permet le passage des cellules immunitaires par les jonctions intercellulaires présentes entre les cellules endothéliales^{156,161,184}. En revanche, la voie transcellulaire permet le passage des cellules immunitaires dans des vésicules à travers les cellules endothéliales^{156,161,184}. Dans le cas des neutrophiles et des monocytes, la voie paracellulaire est très largement privilégiée par rapport à la voie transcellulaire^{156,161,181,184,201,202}. Les principales molécules impliquées dans cette dernière étape sont PECAM-1 (*Platelet/endothelial cell adhesion molecule-1*), les membres de la famille JAM (*Junctional Adhesion Molecules*), CD155, CD99 et les molécules d'adhésion déjà abordées précédemment comme ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1, LFA-1, MAC-1 et VLA-4^{156,161,181,203,204}.

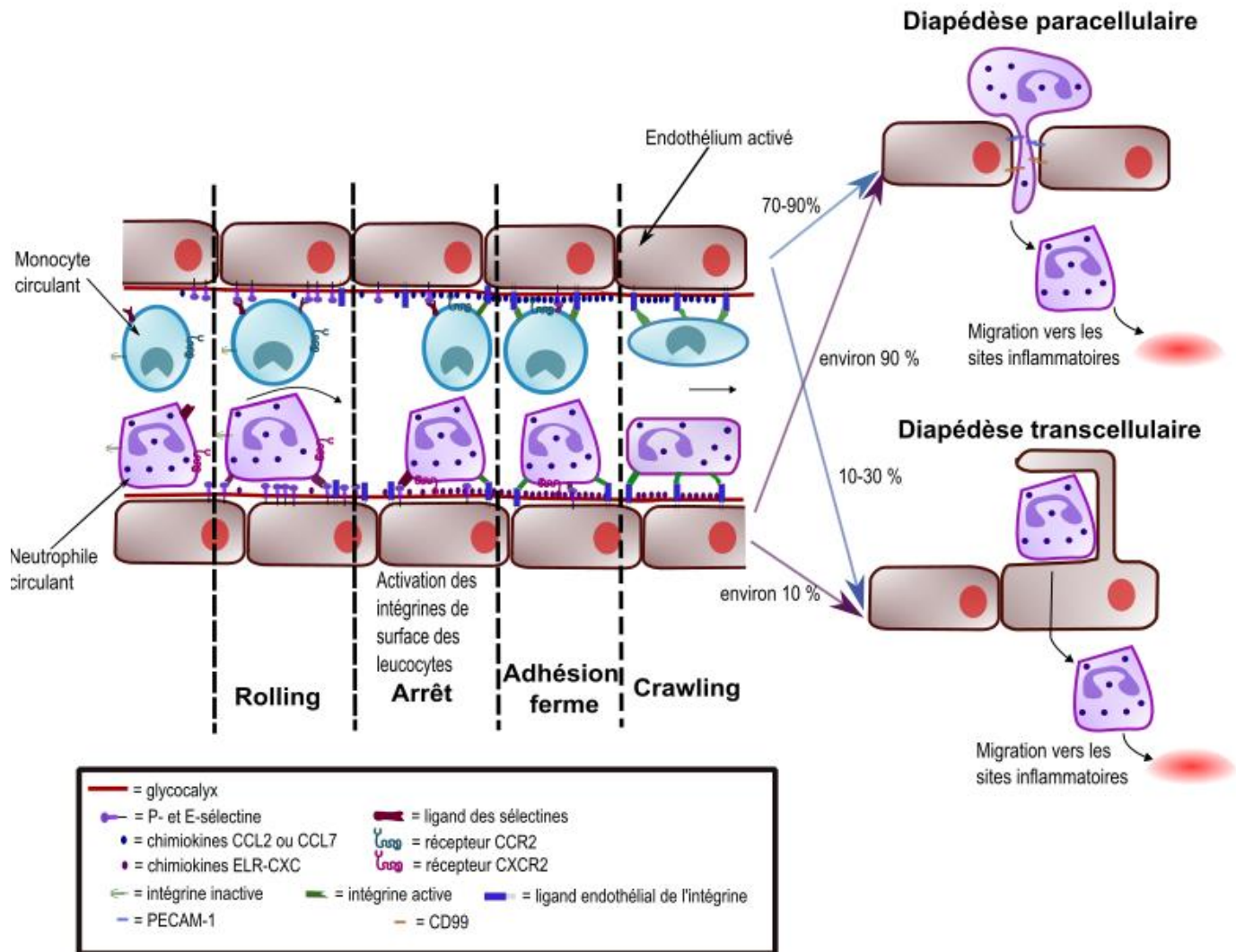


Figure 11 : le recrutement des neutrophiles de la circulation sanguine vers les tissus se fait selon un processus stéréotypé, la diapédèse. En rentrant dans la microcirculation d'un organe inflammé, les cellules immunitaires rencontrent un endothélium activé surexprimant des molécules d'adhésion comme les E- et les P-sélectines ou les ligands endothéliaux ICAM-1, ICAM-2 et VCAM-1. Dans un premier temps, les L-sélectines et les polysaccharides présents à la membrane des cellules immunitaires interagissent avec les P- et les E-sélectines, ce qui permet leur attachement réversible à l'endothélium. L'endothélium activé est décoré par des chimiokines. La reconnaissance des chimiokines par des GPCR présents à la surface des cellules immunitaires entraîne un changement de conformation des intégrines des leucocytes et leur permet d'interagir avec les ligands endothéliaux comme ICAM-1, ICAM-2 et VCAM-1. Ces trois interactions sont à l'origine d'un arrêt du mouvement des leucocytes et d'une adhésion irréversible de ces derniers à l'endothélium vasculaire activé. Par la suite, les leucocytes migrent perpendiculairement au flux sanguin vers un site de diapédèse préférentiel généralement au niveau de jonctions entre cellules endothéliales. Enfin, les monocytes traversent l'endothélium principalement par la voie paracellulaire en utilisant des molécules d'adhésion comme PECAM-1 et CD99. Inspirée de Liew & Kubes, *Physiological reviews*, 2019 et de Gerhardt & Ley, *Cardiovascular Results*, 2015^{161,181}.

2.1.2.2.2. Migration des neutrophiles dans le tissu et activation de leurs fonctions effectrices.

Après leur sortie de la circulation sanguine, les neutrophiles migrent à travers le tissu vers le site de dommage ou d'infection. Leurs fonctions effectrices sont également activées de manière à ce que les neutrophiles remplissent leurs activités anti-microbiennes sans causer des dommages tissulaires dans des tissus non infectés ou endommagés.

Après la diapédèse, les neutrophiles migrent de manière amoïboïde à travers le tissu vers les sites d'inflammation (*swarming*) (**Figure 12**)²⁰⁵. Cette migration est déterminée par plusieurs gradients consécutifs et hiérarchisés^{188,205}. Les gradients de N-formyl-méthionyl-peptides (fMLP) et de C5a sont les plus forts (nommés '*end-target*' dans la littérature) puisqu'ils surpassent tous les autres gradients (**Figure 12**)^{156,188,205,206}. Ces deux composés sont directement liés à la présence de dommages tissulaires ou de pathogènes. Les N-formyl-méthionyl-peptides (fMLP) sont directement issus de bactéries pathogènes invasives ou de la libération de peptides mitochondriaux lors de la mort cellulaire^{188,207}. De plus, les composés du complément, dont C5, sont déjà présents dans le tissu sain et sont un des premiers mécanismes de défense activés en présence de pathogènes ou de tissus anormaux, constituant donc un excellent détecteur extracellulaire d'une infection²⁰⁸. Les gradients de leucotriènes- β 4 et de chimiokines comme CXCL2 ou CXCL8 interviennent également dans ce guidage des neutrophiles à travers les tissus et sont considérés comme des gradients intermédiaires^{188,205}. Ces gradients forment un relai des molécules '*end-target*' et sont en partie sécrétés par les neutrophiles en migration eux-mêmes, comme c'est le cas pour les leucotriènes- β 4 et CXCL2^{188,205,206,209}.

La migration des neutrophiles est hautement régulée par d'autres facteurs. Par exemple, les morts cellulaires inflammatoires des neutrophiles comme la pyroptose, la nécroptose ou la nécrose l'amplifient, certainement grâce à la libération de facteurs cellulaires^{205,206}. Par contre, la détection de ROS (*Reactive oxygen species*) produits par les neutrophiles inhibe leur migration à travers ces gradients notamment en réduisant la production de leucotriènes β 4 et leur sensibilité aux N-formyl-méthionyl-peptides et aux leucotriènes β 4^{205,210,211}.

Dans les tissus inflammés et au contact de l'endothélium activé, les fonctions effectrices des neutrophiles (décrites dans la paragraphe **2.1.3**) sont activées (*priming*)^{156,160,212,213}. Cette activation permet d'empêcher une inflammation et des dommages tissulaires non ciblés. Ce processus d'activation implique des cytokines comme le TNF- α , l'IL-1 β , CXCL8 (IL8), les leucotriènes β 4, le GM-CSF ou l'IFN- γ et/ou la reconnaissance de PAMP comme le LPS (*Lipopolysaccharide*) ou de DAMPs (*Damage-associated Molecular Patterns*) comme l'ATP par les neutrophiles^{156,160,212-216}.

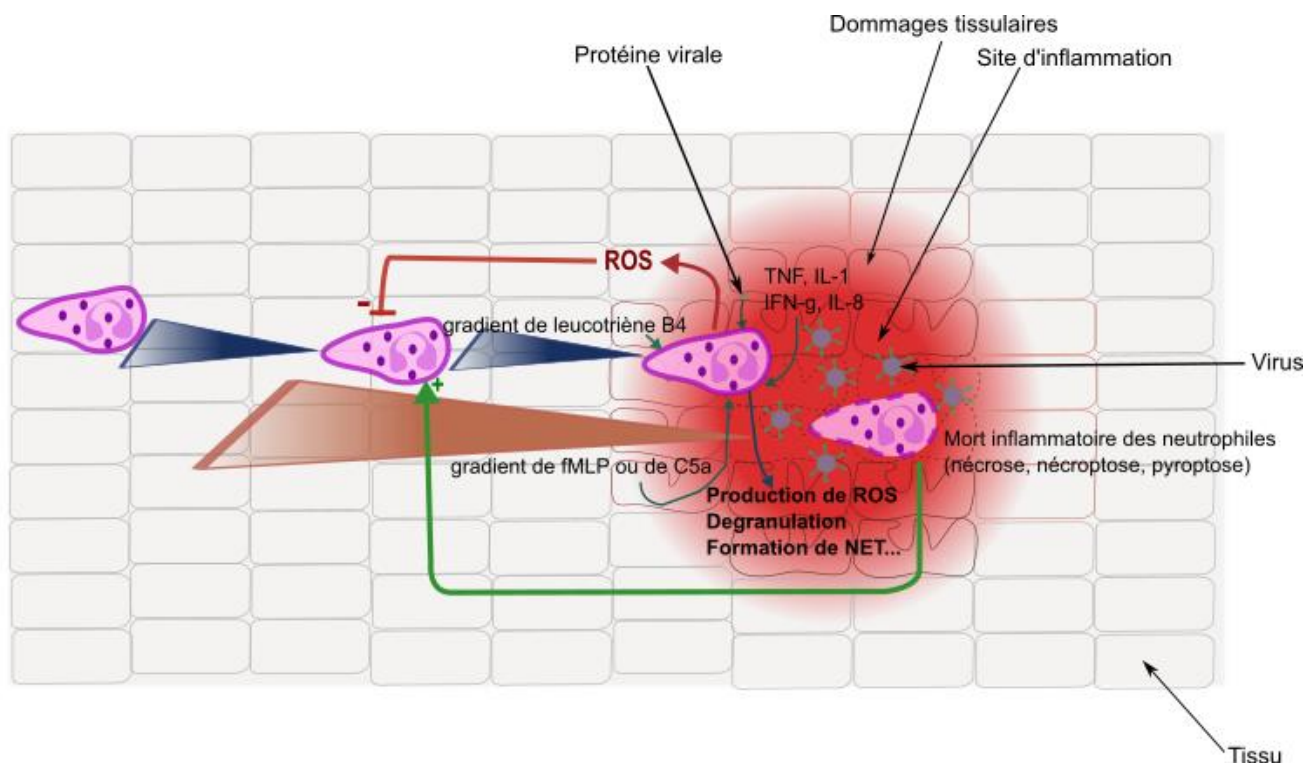


Figure 12 : La migration intratissulaire des neutrophiles et l'activation de leurs fonctions effectrices sont des processus hautement régulés. La migration des neutrophiles dans les tissus est régulée par plusieurs types de gradients : les gradients 'end-target' de fMLP ou de C5a produits directement sur le site d'inflammation et les gradients intermédiaires de CXCL2 et de leucotriènes β_4 . Ces gradients intermédiaires sont synthétisés par les cellules immunitaires présentes sur le site d'inflammation et parfois par les neutrophiles suivant les gradients 'end-target', comme c'est le cas pour les leucotriènes β_4 . Les morts inflammatoires des neutrophiles favorisent cette migration vers les sites d'inflammation tandis que la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) par les neutrophiles l'inhibe. Les fonctions effectrices des neutrophiles (production de ROS, dégranulation et formation de NET (Neutrophil extracellular traps)) sont activées par la reconnaissance de PAMPs issus de microorganismes pathogènes et par la présence de plusieurs marqueurs de l'inflammation comme les leucotriènes β_4 , le fMLP, C5a et les cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α , l'IL-1 β , l'IFN- γ et l'IL-8. Inspirée de Afonso et al, *Developmental Cell*, 2012²⁰⁹.

2.1.2.2.3. Différenciation des monocytes en macrophage et polarisation en macrophages M1 ou M2.

Dès leur arrivée dans les tissus inflammés, les monocytes se différencient en de nombreux types cellulaires, dont les macrophages inflammatoires^{183,217}. Cette différenciation est dépendante de la protéine IRF5 (*Interferon Regulating Factor 5*), dont l'expression pourrait être induite par le GM-CSF (*Granulocyte-macrophage colony stimulating Factor*) ou par la reconnaissance de PAMPs par les TLRs (*Toll Like Receptors*)²¹⁷⁻²¹⁹.

De plus, les macrophages sont des cellules fortement labiles dont le phénotype inflammatoire M1 ou anti-inflammatoire M2 est largement dépendant de leur environnement tissulaire^{174,176,178}. La polarisation M1 est fortement favorisée par la présence de cytokines pro-inflammatoires (IFN- γ , TNF- α) ou de PAMP (LPS, protéines virales...) dans le milieu extracellulaire^{173-175,177}. Au contraire, la polarisation M2 des macrophages est généralement favorisée par la présence de molécules anti-inflammatoires (IL-

10, TGF- β , glucocorticoïdes) ou d'IL-4, d'IL-13 dans le milieu cellulaire^{173,174,177}. La présence de protéines neutrophilaires dans le milieu extracellulaire comme les azurocidines et les lactoferrines induit la polarisation M1 tandis que la présence de neutrophiles apoptotiques favorise la polarisation M2 des macrophages^{155,178}.

La muqueuse olfactive, contrairement au système nerveux central, n'est pas protégée par une barrière hématoencéphalique, la rendant très accessible pour les cellules immunitaires. D'ailleurs, un grand nombre d'étude, dans un contexte infectieux, montrent la présence de neutrophiles et de macrophages dans ce tissu^{28,35,220,221}.

2.1.3. Maintien de l'inflammation, activité microbicide et initiation de la réponse immunitaire adaptative par les neutrophiles et les macrophages pro-inflammatoires.

Dans ce paragraphe, nous développerons les principales fonctions des neutrophiles et des macrophages pro-inflammatoires en contexte infectieux. Nous commencerons par la sécrétion de cytokines, de chimiokines et de facteurs impliqués dans le recrutement des cellules immunitaires. Nous nous intéresserons ensuite aux activités microbicides de ces deux types cellulaires en détaillant les grands acteurs impliqués. Enfin, nous aborderons les relations de ces cellules avec le système immunitaire adaptatif.

Une fois activés, les neutrophiles et les monocytes sécrètent des cytokines et chimiokines permettant le recrutement d'autres cellules immunitaires. Les neutrophiles produisent notamment les chimiokines CCL2, CCL7 et CXCL2, qui sont impliquées dans le recrutement des monocytes et des neutrophiles dans les tissus inflammés^{181,188}. Lors des processus de dégranulation, ils libèrent également de l'azurocidine et de la cathepsine G qui favorisent également le recrutement des monocytes et des neutrophiles^{155,222}. D'autres chimiokines permettent le recrutement d'autres cellules immunitaires. Par exemple, la sécrétion de CXCL12 par les neutrophiles participe au recrutement des lymphocytes T CD8⁺^{36,206,223}. Les macrophages pro-inflammatoires recrutés sécrètent également une grande variété de chimiokines. En particulier, ils produisent MCP-1 (*Monocyte Chemoattractant Protein 1*) et CXCL8 qui amplifient le recrutement des monocytes et des neutrophiles au site d'inflammation²²⁴. CXCL10, une chimiokine responsable du recrutement des lymphocytes T CD8⁺, est aussi sécrétée par les macrophages en contexte d'infection virale²²⁵. Les neutrophiles et les macrophages pro-inflammatoires produisent également des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6, le TNF- α et les membres de la famille de l'IL-1 qui participent à la mise en place d'un environnement inflammatoire et agissent sur les fonctions

effectrices des différentes cellules immunitaires^{36,226,227}. Par exemple, le TNF- α amplifierait la production de cytokines par les neutrophiles et les macrophages^{226,228}. Il est également impliqué dans la polarisation M1 et la survie des macrophages²²⁸. De plus, le TNF- α et l'IL-1 β sont impliqués dans l'activation de l'endothélium vasculaire et donc dans le recrutement d'autres cellules immunitaires, comme présenté dans le paragraphe **2.1.2**^{156,191}. L'IL-1 β est aussi un facteur impliqué dans la survie à moyen et long terme des neutrophiles et des monocytes²²⁹. De plus, les macrophages pro-inflammatoires sécrètent également la cytokine MIP-1 α qui permet le recrutement des cellules NK^{36,230}. L'IL-15 sécrétée par ces cellules est aussi impliquée dans l'augmentation de la capacité des cellules NK à tuer les cellules infectées par un virus notamment en augmentant l'expression de perforines et du récepteur activateur NKG2D paré ces cellules^{36,231}.

Nous allons maintenant aborder les fonctions de ces cellules dans la clairance des pathogènes. Les neutrophiles et les macrophages pro-inflammatoires sont capables de phagocyter et de digérer des pathogènes^{161,227,232}. Ces cellules sont également capables de phagocyter des cellules infectées par un virus, ce qui est nommé efférocytose^{36,233}. Ce phénomène a notamment été observé dans le cadre de l'infection par le SARS-CoV-2 dans les poumons²³⁴. Lors de la phagocytose, les macrophages et neutrophiles produisent des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (ROS et RNS respectivement) grâce à des enzymes comme la NADPH oxydase, l'enzyme iNOS ou la myéloperoxydase qui participent à l'inactivation des pathogènes dans le phagosome^{161,235-237}. Des protéases sont aussi utilisées pour cette digestion des pathogènes. Dans le cas des neutrophiles, les protéases des granules sont impliquées puisque le phagosome fusionne avec les granules primaires^{161,238}. Dans le cas des macrophages pro-inflammatoires, ce serait plutôt les protéases lysosomales qui seraient impliquées puisque le phagosome fusionne avec les lysosomes²³⁵.

Les neutrophiles et les macrophages pro-inflammatoires sécrètent également dans le milieu extracellulaire de nombreuses molécules toxiques qui participent à l'élimination des pathogènes^{157,161,235}. Certaines d'entre elles sont des radicaux libres de l'oxygène et de l'azote produites d'autres sont des protéases qui sont hautement microbicides^{157,161}. Les neutrophiles et macrophages synthétisent également des peptides antimicrobiens comme les lactoferrines ou les défensines^{157,235}.

Lors d'une stimulation par des déterminants microbiens ou viraux, les neutrophiles subissent une dégranulation. Différents types de granules sont présents dans ces cellules : les granules primaires ou azurophiles contiennent principalement des protéases comme l'élastase neutrophilaire, la cathepsine G et la protéinase 3 et la protéine MPO (*Myéloperoxydase*)^{157,161,232}. Cette dernière est impliquée dans la production de ROS puissants comme l'acide hypochloreux^{157,161,232,239}. Les granules primaires contiennent également des peptides anti-microbiens, les défensines^{157,161}. Ces composés sont tous hautement microbicides¹⁵⁷. Les granules secondaires contiennent des peptides anti-microbiens comme

les lactoferrines, les lipocalines, les lysozymes et LL37 qui agissent sur les pathogènes dans le milieu extracellulaire^{157,161}. Enfin, les granules tertiaires contiennent des métalloprotéases comme MMP8, MMP9 et MMP25 qui déstabilisent les matrices extracellulaires des tissus et facilitent le recrutement de cellules immunitaires dans le tissu^{157,161}. Certaines des molécules sécrétées lors de cette dégranulation peuvent également déstabiliser les tissus et entraîner des dommages tissulaires, ce qui sera discuté dans le paragraphe **2.2**.

Les macrophages pro-inflammatoires libèrent également de nombreuses protéases dans le milieu extracellulaire. Ils produisent notamment de nombreuses hydrolases comme des protéases, des lipases, des cathepsines, des ribonucléases, des phosphatases, des glycosidases et des lysozymes qui ont de nombreuses fonctions anti-microbiennes²³⁵.

En conditions fortement oxydantes, les neutrophiles subissent une désorganisation de leur enveloppe nucléaire et libèrent leur chromatine dans le cytosol où elle est décondensée grâce à la présence de groupement citrulline sur les histones. La chromatine est ensuite libérée dans le milieu extracellulaire^{161,240-243}. Ce processus de libération de l'ADN par les neutrophiles a été dénommé NETose dans la littérature scientifique. Les fibres de chromatine extracellulaires forment un réseau appelé NET (*Neutrophil Extracellular Trap*) et permettent une capture des pathogènes^{36,161,244,245}. Les NET sont également recouverts par des protéases neutrophilaires dont l'élastase et des molécules antimicrobiennes comme les histone B ou MPO, les impliquant directement dans la neutralisation des pathogènes et des virus^{36,161,242,245}.

Enfin, les macrophages pro-inflammatoires et les neutrophiles sont impliqués dans l'initiation et la régulation des réponses immunitaires adaptatives. Les neutrophiles et les macrophages pro-inflammatoires peuvent être considérées comme des cellules présentatrices de l'antigène car ils expriment tous deux les molécules de CMHII et des molécules de co-stimulation comme CD80/86. Les macrophages pro-inflammatoires comme les neutrophiles peuvent être recrutés dans les ganglions lymphatiques. Dans ces ganglions lymphatiques, ils peuvent présenter directement les antigènes aux lymphocytes T CD4⁺ ou les transférer aux cellules dendritiques^{36,161,227,246,247}. Les neutrophiles auraient tendance à orienter la réponse immunitaire adaptative vers une réponse Th1, c'est-à-dire vers des réponses cellulaires T CD8⁺ et l'initiation d'une réponse humorale avec des IgGs^{36,161,246}. L'activation des lymphocytes T CD4⁺ est aussi facilitée par la présence de NET qui abaissent leurs seuils d'activation^{161,248}. De plus, par la sécrétion des cytokines BAFF (*B-cell Activation Factor*) et APRIL (*A Proliferation-Inducing Ligand*), les neutrophiles sont également impliqués dans l'activation et la survie des lymphocytes B^{161,249}.

Dans le cadre de ma thèse, nous nous sommes intéressés aux réponses des neutrophiles et des macrophages dans l'épithélium olfactif infecté par le SARS-CoV-2. Dans ce paragraphe, nous avons

voulu comprendre les particularités de la réponse immunitaire associée à la COVID-19. En effet, les réponses interféron et inflammatoire sont inadaptées lors d'une infection par le SARS-CoV-2. Certaines protéines virales du SARS-CoV-2 inhibent les réponses interférons de type I et les études publiées montrent que les réponses interférons contre le virus sont retardées ou diminuées^{250,251}. Cette inhibition de la réponse interféron par le virus sera abordée plus précisément dans le paragraphe **3.1.1**. Dans le cadre d'une réponse antivirale, des inhibitions de la réponse interféron peuvent être à l'origine d'une hyperactivation des réponses inflammatoires. En effet, si les interférons de type I et de type III sont impliqués dans le recrutement de cellules immunitaires, ils limitent également la libération de particules virales par les cellules infectées et l'infection de nouvelles cellules grâce à l'induction de protéines antivirales nommées les ISG (*Interferon stimulated genes*). L'inhibition de cette réponse interféron par des protéines virales est à donc l'origine d'une présence importante des déterminants viraux dans le milieu extracellulaire²⁵². Les fonctions des neutrophiles et des macrophages pro-inflammatoires (sécrétion de cytokines et de chimiokines, phagocytose, dégranulation et NETose) sont dépendantes de la rencontre d'antigènes viraux^{36,123,161}. Dans le cadre d'une réponse interféron inhibée, la présence importante de déterminants viraux active très fortement cette activité inflammatoire des neutrophiles et des macrophages, menant donc à une hyperinflammation^{36,161,253}. Celle-ci a notamment pour conséquence une production excessive de cytokines par ces cellules, nommée aussi tempête cytokinique qui est observée dans les cas de COVID-19 sévères^{10,36,253,254}. Etant donné que l'hyperinflammation est au centre de la pathologie sévère de la COVID-19, elle a particulièrement été étudiée chez les humains et les modèles animaux. En particulier, de nombreuses études montrent la présence importante de neutrophiles et de NET dans les poumons infectés par le SARS-CoV-2 à la fois chez le modèle hamster et les humains²⁵⁴⁻²⁵⁶. Les macrophages pro-inflammatoires ont également été associés avec la tempête cytokinique observée dans les cas graves de COVID-19²⁵³.

2.2. Inflammation, cellules immunitaires innées et dommages tissulaires.

De nombreux travaux de recherche ont établi l'implication des neutrophiles et des macrophages pro-inflammatoires dans les dommages tissulaires observés lors des infections virales des voies aériennes. En 2014, Kanaya et al. ont démontré que les neutrophiles étaient responsables d'une desquamation de la muqueuse olfactive lors d'un traitement polyI:C en intranasal³⁵. Le poly I:C est un ARN double brin synthétique qui permet de mimer une infection virale car tous les virus à ARN produisent des intermédiaires double brin au cours de leur cycle de réplication²⁵⁷. De plus, le traitement poly I:C est capable de déclencher les réponses interférons de l'hôte observées lors d'une infection virale et des réponses inflammatoires avec notamment la sécrétion d'IL-6, d'IL-12 et de TNF- α ²⁵⁷. D'autres

exemples d'infections virales dans les voies respiratoires lient les macrophages pro-inflammatoires et les neutrophiles à des dommages tissulaires. Dans le cadre d'infections de cultures d'épithélium respiratoire à l'interface air-liquide par le virus respiratoire syncytial (RSV) ou le SARS-CoV-2, le recrutement de neutrophiles est associé à des dommages à l'épithélium respiratoire^{36,258,259}. Enfin, l'infiltration de macrophages pro-inflammatoires est également associée avec des dommages pulmonaires lors d'une infection par le virus Influenza^{36,37}. Par exemple, lors d'une infection pulmonaire par Influenza, Herold et al. ont démontré que l'expression de ligands comme TRAIL (*Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand*) par les macrophages pro-inflammatoires recrutés induit l'apoptose des cellules épithéliales alvéolaires et une perturbation de la barrière alvéolaire²⁶⁰.

Les cellules immunitaires impliquées dans l'inflammation sont cruciales pour la clairance des infections, comme présenté dans le paragraphe **2.1.3**. Pourtant, quand leur activité est dérégulée, elles peuvent engendrer des dommages cellulaires importants car elles sécrètent des composants potentiellement cytotoxiques comme les histones présentes dans les NET, des peroxydases comme la MPO ou encore des protéases (élastase neutrophilaire et des métalloprotéases impliquées dans la déstabilisation des tissus). Ces composantes pouvant causer des dommages tissulaires importants seront développées dans la suite de ce paragraphe.

2.2.1. Une libération de substances toxiques pour les cellules.

Les macrophages pro-inflammatoires et les neutrophiles produisent de grandes quantités d'éléments toxiques pour les cellules. Parmi ces substances toxiques, des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (ROS et RNS respectivement) sont émis lors des processus de phagocytose, de dégranulation et de NETose, comme abordé dans le paragraphe **2.1.3**^{161,235,261}. La production massive de ces oxydants induit un stress oxydatif dans le tissu et peut engendrer la mort de cellules et la déstabilisation du tissu. Les principaux ROS et RNS impliqués dans les dommages tissulaires sont le radical HO• (hydroxyle d'oxygène), HOCl (acide hypochloreux) et le composé ONOO⁻ (péroxydrite)^{153,262}. Les principales cibles de ces oxydants au niveau cellulaire sont les lipides, les protéines et l'ADN^{235,261,262}. L'oxydation de ces molécules peut mener à un fonctionnement altéré de la cellule voire à la mort cellulaire par apoptose ou nécrose^{235,262}. Par exemple, la présence de ROS et de RNS dans les cellules induit l'oxydation des cardiolipines de la membrane mitochondriale, ce qui diminue son affinité pour le cytochrome C. Ceci favoriserait la libération de ce dernier de la mitochondrie, ce qui induit l'apoptose^{261,263}. De la même manière, le stress oxydatif créé par ces ROS et RNS active l'activité peroxydase du cytochrome C, ce qui favorise l'apoptose induite par les ROS/RNS^{261,264}.

De plus, certaines des protéines présentes dans les NET sont aussi capables d'induire une mort cellulaire. Par exemple, les protéines histone B et MPO présentes dans les réseaux de NET sont très cytotoxiques^{161,242}.

Des cytokines sont également impliquées dans ces dommages tissulaires. Par exemple, le TNF- α est capable d'induire directement l'apoptose des cellules du tissu^{235,261}.

Dans un contexte de régulation de l'inflammation, une expression trop importante de cytokines anti-inflammatoires et de médiateurs de la réparation tissulaire peut également mener à une fibrose qui ne permettrait pas la régénération d'un tissu sain après l'inflammation¹⁴⁷. Par exemple, une production excessive de TGF- β , de VEGF et d'EGF, d'IL-13 ou d'IL-10 et de CCL17 peuvent mener à une fibrose^{147,235,265,266}.

2.2.2. Une libération de protéases pouvant entraîner une désorganisation du tissu.

Les neutrophiles et les macrophages pro-inflammatoires sécrètent également des métalloprotéases et des sérines protéases qui sont également fortement impliqués dans la genèse des dommages cellulaires liés à l'inflammation^{157,161,235}.

2.2.2.1. Libération de métalloprotéases de matrice par les neutrophiles et les macrophages dans le milieu extracellulaire.

Les neutrophiles sécrètent des métalloprotéases de matrice dans les tissus comme MMP8, MMP9 et MMP25^{157,235}. Ces protéases sont principalement contenues dans les granules tertiaires et sont synthétisées au cours du développement des neutrophiles dans la moelle osseuse²⁶⁷. Les macrophages produisent également une grande diversité de métalloprotéases dont MMP1, MMP2, MMP3 et MMP9²⁶⁸. Ces protéases actives peuvent être stockées dans des granules comme c'est le cas pour MMP8 et MMP9²⁶⁸. D'autres de ces protéases comme MMP1 et MMP2 sont synthétisées sous forme de proprotéines qui sont ensuite activées par d'autres protéases déjà présentes dans le tissu²⁶⁸. La stimulation des macrophages par des PAMPs et des DAMPs, la présence de chimiokines et de cytokines pro-inflammatoires dans l'environnement tissulaire et leur migration des vaisseaux sanguins vers les tissus induisent la production de métalloprotéases de matrice²⁶⁸. Ils sont capables de cliver les composants de la matrice extracellulaire comme l'élastine et le collagène, et peuvent donc être impliqués dans la déstabilisation des tissus^{161,235,268}.

2.2.2.2. Libération des serprocidines neutrophilaires (élastase, cathepsine G et protéinase 3) dans le milieu extracellulaire.

Les neutrophiles produisent également des sérine protéases aussi nommées serprocidines dont les principales sont l'élastase, la cathepsine G et la protéinase 3. Dans les neutrophiles au repos, ces protéases sont localisées dans les granules primaires. Ces protéines sont synthétisées pendant le développement des neutrophiles et sont enfermées dans les granules avant même la sortie de la moelle osseuse²⁶⁷. Ces protéines sont synthétisées comme des zymogènes, avec un peptide leader inhibant leur activité. Lors de leur entrée dans les granules, la cathepsine C ce peptide leader, les rendant actives²⁶⁹. En cas de rencontre avec un pathogène, les sérine protéases sont libérées lors de la dégranulation et lors de la formation de NET^{157,161}. Alors qu'elles permettent la désactivation, la mort et la digestion des microorganismes, elles sont également impliquées dans la destruction de la matrice extracellulaire et le remodelage des tissus²⁷⁰. En particulier, l'élastase neutrophilaire clive les composants de la matrice extracellulaire comme l'élastine, le collagène, la laminine et les protéoglycannes²⁷⁰.

Les sérines protéases des neutrophiles permettent également l'activation de certaines métalloprotéases cellulaires présentes dans la matrice extracellulaire comme MMP2, MMP3 et MMP9 qui elles aussi peuvent être impliquées dans une désorganisation des tissus, comme présenté dans le paragraphe **2.2.2.1**²⁷⁰.

3. Cas particulier de l'anosmie associée à la COVID-19 : quels en sont les mécanismes.

3.1. Le SARS-CoV-2, présentation du virus et des modèles utilisés pour son étude

3.1.1. Présentation du SARS-CoV-2.

Le SARS-CoV-2, agent étiologique de la COVID-19, a émergé à la fin de l'année 2019 dans la province de Wuhan en Chine^{1,2,271}. Il appartient à l'ordre des *Nidovirales*, à la famille des *Coronaviridae*, au genre des *Betacoronavirus* et à la même espèce que le SARS-CoV-1, virus avec lequel il présente 79.6 % d'identité de séquence^{1,2,271}.

L'origine du SARS-CoV-2 est encore largement inconnue. Deux grandes hypothèses ont été suggérées pour expliquer son émergence : la fuite du virus d'un laboratoire de Wuhan et une zoonose, c'est-à-dire la transmission du virus d'un animal vers l'humain²⁷². A ce jour, avec les données dont nous disposons, l'hypothèse de la fuite du virus d'un laboratoire est peu plausible²⁷². Même si l'origine animale du SARS-CoV-2 est probable, nos connaissances sur l'origine du virus sont encore lacunaires^{272,273}. En effet, de nombreux *Coronavirus* issus de chauve-souris et de pangolin présentent de fortes similarités avec le SARS-CoV-2²⁷²⁻²⁷⁵. Par exemple, le virus BatCoV-RATG13 isolé chez la chauve souris présente près de 96 % d'identité de séquence avec le SARS-CoV-2^{1,275}. De plus, il semblerait que des anticorps neutralisants ciblant certains de ces virus de chauve-souris neutraliseraient également le SARS-CoV-2²⁷⁴. Ces données vont dans le sens d'une émergence virale à partir d'un réservoir chauve-souris^{1,272,273}. Toutefois, tous les virus qui ont été trouvés jusqu'à maintenant sont encore relativement distants du SARS-CoV-2²⁷³. Par exemple, il est estimé que le SARS-CoV-2 et les virus apparentés isolés chez la chauve-souris auraient divergé il y a entre 30 et 50 ans²⁷⁶. Il est aussi probable que les recombinaisons aient un rôle important dans l'émergence du SARS-CoV-2. Par exemple, le RBD (*Receptor Binding Domain*) d'un Coronavirus isolé chez le pangolin est plus proche de celui du SARS-CoV-2 que ceux identifiés chez la chauve-souris^{273,276,277}. Enfin, la présence de 2 grands lignages A et B de SARS-CoV-2 dès le début de la pandémie suggère plusieurs événements de zoonose indépendants²⁷⁸. Donc, d'après les données dont nous disposons, l'émergence du SARS-CoV-2 pourrait être expliquée par un ou plusieurs événements de zoonose. L'évolution des souches de Coronavirus ayant mené à cette émergence est complexe et implique au moins un événement de recombinaison. Toutefois, il est fortement probable que le réservoir du virus soit la chauve-souris. Pour mieux comprendre l'évolution des souches de Coronavirus ayant mené à l'émergence du SARS-CoV-2, il serait nécessaire de continuer à collecter des données sur les

Coronavirus animaux en Asie de l'Est et du Sud-Est, ce qui permettrait éventuellement de trouver des Coronavirus plus proches du SARS-CoV-2.

Le génome du SARS-CoV-2 est une longue molécule d'ARN simple brin de polarité positive d'environ 29.9 kilobases^{1,2,271} (**Figure 13**). Ce génome contient 14 ORF (*Open Reading Frame*) codant 27 protéines^{2,271}. La première ORF du génome (ORF1a/1ab) représente environ 2/3 de la longueur du génome et code 16 protéines non structurales (nsp1 à 16)^{2,271}. Ces protéines sont responsables de la transcription et de la réplication virale mais aussi dans la formation des vésicules à double membrane abritant les acides nucléiques viraux²⁷⁹. Elles inhibent également l'expression des gènes de l'hôte en agissant surtout au niveau de la traduction et des modifications post-traductionnelles²⁷⁹. Le reste du génome code 4 protéines structurales et 9 protéines accessoires. En effet, le SARS-CoV-2 présente 3 protéines d'enveloppe : S, E et M et une protéine de nucléocapside (N)^{2,271}. Les protéines ORF3a, ORF3b, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8, ORF9b, ORF9c et ORF10 sont les protéines accessoires du SARS-CoV-2^{280,281}. La plupart de ces dernières inhibent les réponses interférons, empêchant ainsi la mise en place des premières réponses antivirales et la détection rapide et efficace de l'infection²⁸⁰⁻²⁸². Par exemple, ORF6 bloque la translocation nucléaire du facteur de transcription IRF3 phosphorylé, inhibant ainsi la production d'IFN- β ²⁸². ORF6 inhibe également la translocation du complexe STAT1-STAT2-IRF9 vers le noyau, ce qui inhibe les réponses aux interférons de type I²⁸². De plus, ORF3a, ORF7a et ORF7b inhibent la phosphorylation des protéines STAT-1 et STAT-2, ce qui participe également à l'inhibition des réponses à l'interféron²⁸². La présentation de l'antigène viral par les cellules infectées est également inhibée par la protéine accessoire ORF8 qui diminue l'expression des molécules de CMH1 en surface, ce qui empêche leur lyse par les lymphocytes T cytotoxiques^{280,281,283}. Par contre, certaines protéines accessoires activeraient les réponses inflammatoires de l'hôte^{280,281}. Par exemple, ORF3a active l'inflammasome NLRP3 dans la cellule infectée, permettant la production d'IL-1 β et causant potentiellement une hyperinflammation^{280,281,284}. ORF7a se lie au récepteur CD14 à la surface des monocytes, ce qui entraîne une augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par ces cellules et une diminution de leur capacité à présenter l'antigène^{280,281,285}. Enfin, l'ORF8, en inactivant l'IL-17RA, active la voie NF- κ B et entraîne la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, ce qui entretient l'environnement inflammatoire induit par l'infection^{280,286}.

Le virus SARS-CoV-2 est un virus enveloppé de forme quasi-sphérique d'approximativement 100 nm de diamètre^{1,271,287}. Des spicules formés par des trimères de protéine Spike sont observés à la surface de la particule virale, lui donnant la forme de couronne caractéristique des *Coronavirus*^{271,287}. Les protéines M et E sont aussi présentes à la surface de l'enveloppe du virus²⁷¹. A l'intérieur de cette enveloppe, le génome viral est contenu dans une nucléocapside de forme hélicoïdale, formée par la

protéine N^{271,287}. Ces protéines de nucléocapsides seraient alignées en sphère sous la surface de l'enveloppe²⁸⁷.

Le SARS-CoV-2, comme la plupart des virus respiratoires, est transmis principalement par les aérosols produits par les individus infectés^{288,289}. Il peut également être transmis par contact avec des surfaces souillées par le virus même si ce mode de transmission est beaucoup moins efficace que la transmission aérosol^{288,290}. La propagation du virus est généralement favorisée dans des milieux clos avec une forte densité d'individus.

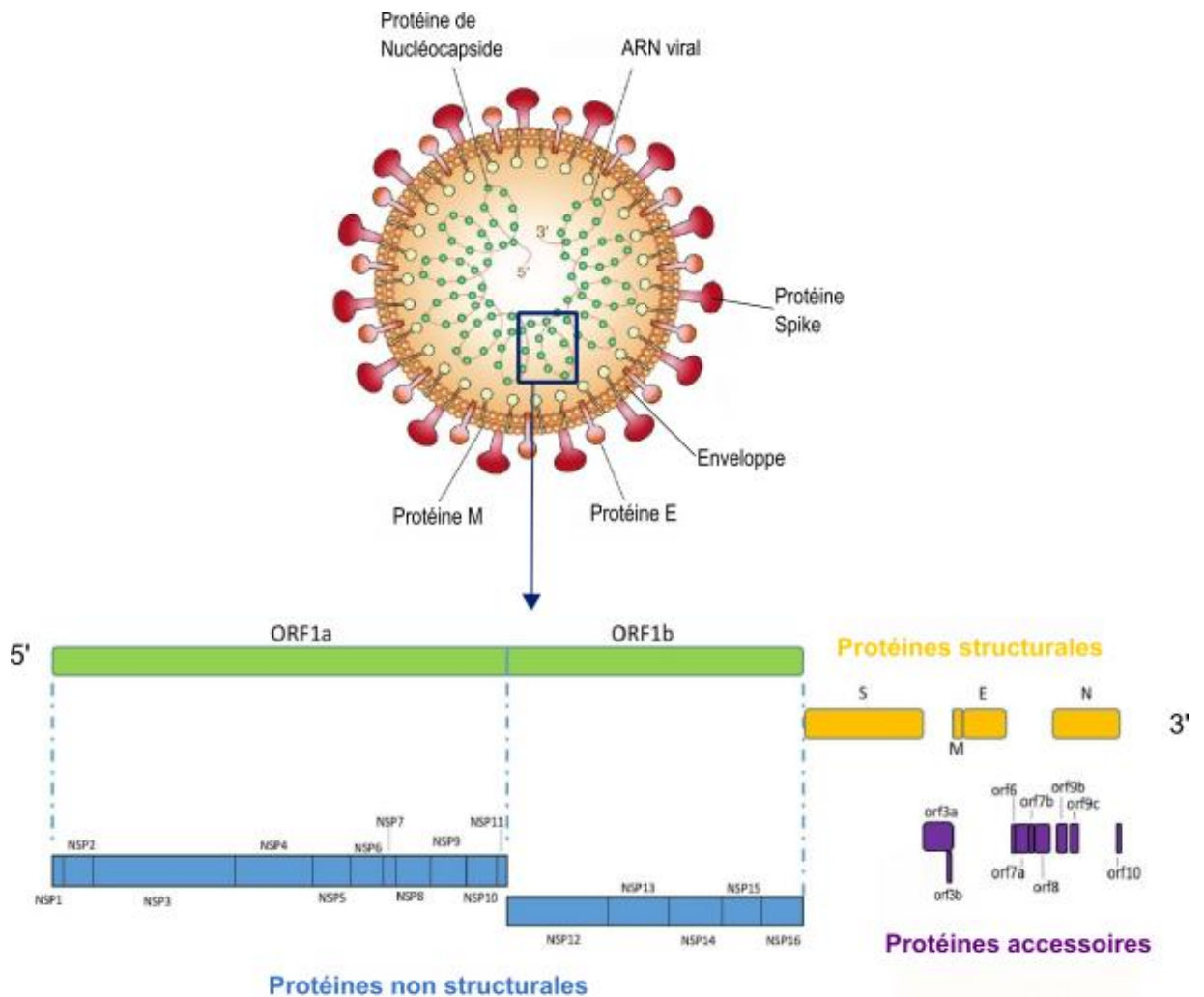


Figure 13 : Structure de la particule virale et du génome du SARS-CoV-2. Le SARS-CoV-2 est un virus enveloppé présentant 3 protéines membranaires à la surface de l'enveloppe virale : les protéines E, M et la protéine Spike (S). Cette dernière forme des spicules caractéristiques de la famille des Coronavirus. Cette enveloppe lipidique contient le génome viral d'environ 29.9 kilobases entouré par la protéine de nucléocapside N. Les 2 premiers tiers du génome codent 16 protéines non structurales en une ORF (ORF1a/1b) qui sont impliquées principalement dans la réplication et la transcription du génome viral et dans la formation des structures membranaires qui abritent cette réplication. Le dernier tiers du génome viral code les protéines structurales (S, E, M et N) et les protéines accessoires. Les protéines accessoires ont un rôle dans la modulation des réponses immunitaires et des fonctions cellulaires. Inspiré par Ortiz-Prado et al., *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2020 et par Redondo et al., *Frontiers in Immunology*, 2021^{271,280}.

Au cours de la pandémie, en raison de la circulation importante du virus, le génome du SARS-CoV-2 a fortement varié menant à l'émergence séquentielle de variants^{291,292}. Dans le cas de ce virus, 5 variants préoccupants ont émergé au cours du temps et sont devenus dominants localement ou mondialement²⁹². Dans un premier temps, en mars 2020, une mutation ponctuelle D614G a été observée sur la séquence de la protéine Spike du SARS-CoV-2. Celle-ci stabilise sa conformation ouverte et favorise le clivage du site furine, facilitant l'entrée dans la cellule hôte^{291,293}. Ce variant est devenu dominant dès juin 2020 en Europe^{291,292}. Cette souche montre une transmissibilité augmentée par rapport aux souches précédentes, ce qui explique son expansion^{291,292}.

D'autres variants plus fortement mutés sont ensuite apparus à partir de décembre 2020, comme les variants préoccupants α , β , γ , δ et enfin Omicron et ses dérivés plus récents^{291,292}. Ces mutations sont impliquées dans des caractéristiques intrinsèques au SARS-CoV-2 comme l'augmentation de l'affinité de la protéine Spike pour le récepteur ACE2^{291,292,294}. Elles sont également impliquées dans l'échappement aux réponses interférons et aux réponses anticorps^{291,292,295,296}. Ces variants ayant un avantage sélectif sur les variants précédents se sont propagés rapidement régionalement ou mondialement^{291,292}.

Dans cette étude, nous nous concentrerons sur un unique variant apparu précocement pendant la pandémie de COVID-19 : le variant D614G. Ces études ont en effet commencé en décembre 2020, date à laquelle la plupart des variants préoccupants n'avaient pas encore émergé, ce qui justifie en grande partie ce choix de départ. Pour les points suivants, nous les décrivons principalement sur les variants précoces et nous ferons quelques remarques si des changements ont été observés chez les variants plus récents.

3.1.2. Cycle viral du SARS-CoV-2.

Ici, nous décrivons le cycle de réplication du SARS-CoV-2 de l'entrée du virus dans la cellule hôte à la production des particules virales et à leur sortie de la cellule. Ce cycle est un processus stéréotypé dépendant du métabolisme de la cellule hôte et de ses structures. Ce cycle se divise en plusieurs étapes essentielles : l'entrée du virus dans la cellule, la production des ARN viraux et des protéines virales, l'assemblage des virions néosynthétisés et enfin la sortie des particules virales de la cellule infectée.

Dans le cas du SARS-CoV-2, l'entrée du virus dans la cellule hôte est conditionnée par l'interaction entre le RBD de la protéine Spike présente à la surface de l'enveloppe virale et son récepteur cellulaire ACE2 (*Angiotensin-Converting Enzyme 2*) (**Figure 14** et **Figure 16**)^{1,271,287,297,298}. D'autres récepteurs alternatifs ont été proposés comme CD147 ou TMEM106B (*Transmembrane protein 106B*)^{271,299,300}. D'autres facteurs cellulaires interagissant avec la protéine Spike favorisent l'entrée du virus

dans la cellule hôte. C'est le cas de la protéine NRP-1 (*neuropilin-1*)^{301,302} ou des polysaccharides présents dans le glycocalix (héparane sulfate et acides sialiques)^{303,304}. De plus, pour une entrée efficace du virus dans la cellule, la protéine Spike doit être clivée en deux sites séparés : le site S1-S2, site furine polybasique situé entre le domaine S1 (liaison au récepteur cellulaire) et le domaine S2 (contenant le peptide de fusion) et le site S2' dans le domaine S2^{292,305}. Ces deux clivages permettent l'exposition du peptide de fusion indispensable pour la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire^{292,305}. Le clivage du site S1-S2 se fait généralement par la furine^{297,306}. Le clivage du site S2' peut être effectuée par plusieurs enzymes lors de l'entrée dans la cellule : la protéase transmembranaire TMPRSS2 (*Transmembrane protease serine 2*), la furine^{298,306} ou la cathepsine L^{297,307}. En cas de clivage par TMPRSS2, il y a fusion entre l'enveloppe virale et la membrane plasmique tandis que pour la cathepsine L, la fusion se produit au niveau de la membrane endosomale^{297,306-308}. La voie d'entrée des premières souches de SARS-CoV-2 était dépendante de l'expression de TMPRSS2 par la cellule cible. Donc, la voie d'entrée préférentielle des premières souches du SARS-CoV-2 passe par TMPRSS2³⁰⁸. Quand TMPRSS2 n'est pas exprimée, ces premières souches de SARS-CoV-2 peuvent aussi entrer par la voie endosomale³⁰⁸. A partir de l'émergence du variant Omicron BA.1, la voie d'entrée du SARS-CoV-2 passerait préférentiellement par un clivage par la cathepsine L³⁰⁹.

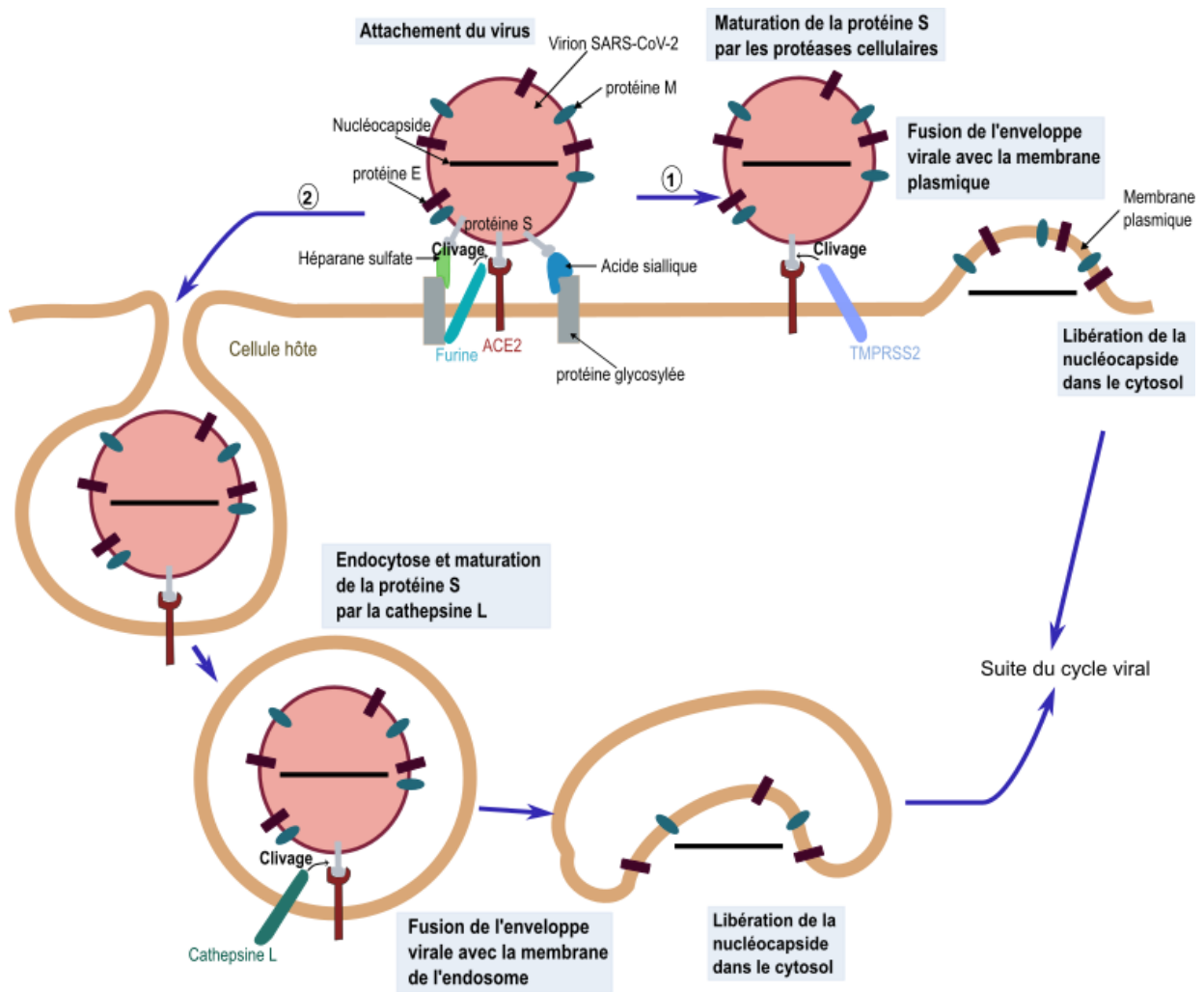


Figure 14 : L'entrée du SARS-CoV-2 dépend principalement de son récepteur ACE2 et de 3 protéases cellulaires (la furine, TMPRSS2 et/ou la cathepsine L). La protéine S du SARS-CoV-2, responsable de son entrée dans les cellules hôtes, est constituée de deux sous-unités principales : S1 qui permet l'attachement à la cellule hôte et S2 qui contient le peptide de fusion. Deux sites de clivage importants sont présents à la surface de cette protéine : un site entre les sous-unités S1 et S2 et un site situé dans la sous-unité S2. Le clivage de ces deux sites est nécessaire pour la fusion de l'enveloppe virale avec les membranes cellulaires. L'entrée du SARS-CoV-2 est dépendante de l'interaction entre la sous-unité S1 de la protéine S avec la protéine ACE2. La protéine S interagit également avec des polysaccharides présents dans les glycosylations des protéines comme l'héparane sulfate ou l'acide sialique, ce qui favorise l'entrée du virus. La protéine S subit également une maturation grâce au clivage des deux sites par des protéases cellulaires. En général, le site de clivage S1-S2 est clivé par la furine à la surface de la cellule ou dans la cellule productrice avant sortie du virion. Le site S2' peut être aussi clivé par la furine mais deux autres protéases peuvent aussi être impliquées : TMPRSS2 à la membrane plasmique et la cathepsine L dans les endosomes. Deux voies d'entrée sont donc possibles : une dans laquelle l'entrée du virus a lieu à la membrane plasmique et implique les protéases furine et TMPRSS2 ; l'autre dans laquelle l'entrée du virus a lieu à la membrane de l'endosome et implique les protéases furine et cathepsine L. Inspirée de Chitsike et Duerksen-Hughes, *Virology Journal*, 2021³¹⁰.

Après l'entrée du virus, l'ARN viral est relâché dans le cytosol et décapsidé. Le cycle viral continue ensuite avec la traduction des polyprotéines pp1a/pp1ab à partir du locus ORF1a/ORF1ab, permettant l'expression des composants du complexe ARN polymérase ARN-dépendante et donc la transcription et la réplication virale²⁷¹.

Lors de la transcription et de la réplication des *Coronavirus*, des ARN de polarité négative sont synthétisés par l'ARN polymérase ARN dépendante. Ces ARN peuvent couvrir toute la longueur du génome mais peuvent également être de taille plus faible (ARN subgénomiques) (**Figure 15** et **Figure 16**)^{271,311,312}. Ces ARN de polarité négative sont ensuite transcrits en ARN de polarité positive. Les ARN subgénomiques contiennent tous la séquence leader présente en 5' du génome viral et les séquences allant de la séquence TRS-B (*Transcription Regulating Sequence – Body*) délimitant un des gènes structuraux ou accessoires jusqu'à l'extrémité 3' du génome^{311,312}. Les 9 ARN subgénomiques sont impliqués dans la production des protéines structurales et accessoires^{271,311,312}. En revanche, les ARN couvrant toute la longueur du génome viral sont des intermédiaires de la réplication du génome viral^{271,311,312}. Pendant ces étapes du cycle viral, les ARN viraux sont protégés des systèmes de détection de l'hôte dans des vésicules à double membrane dérivées du réticulum endoplasmique^{297,313,314}.

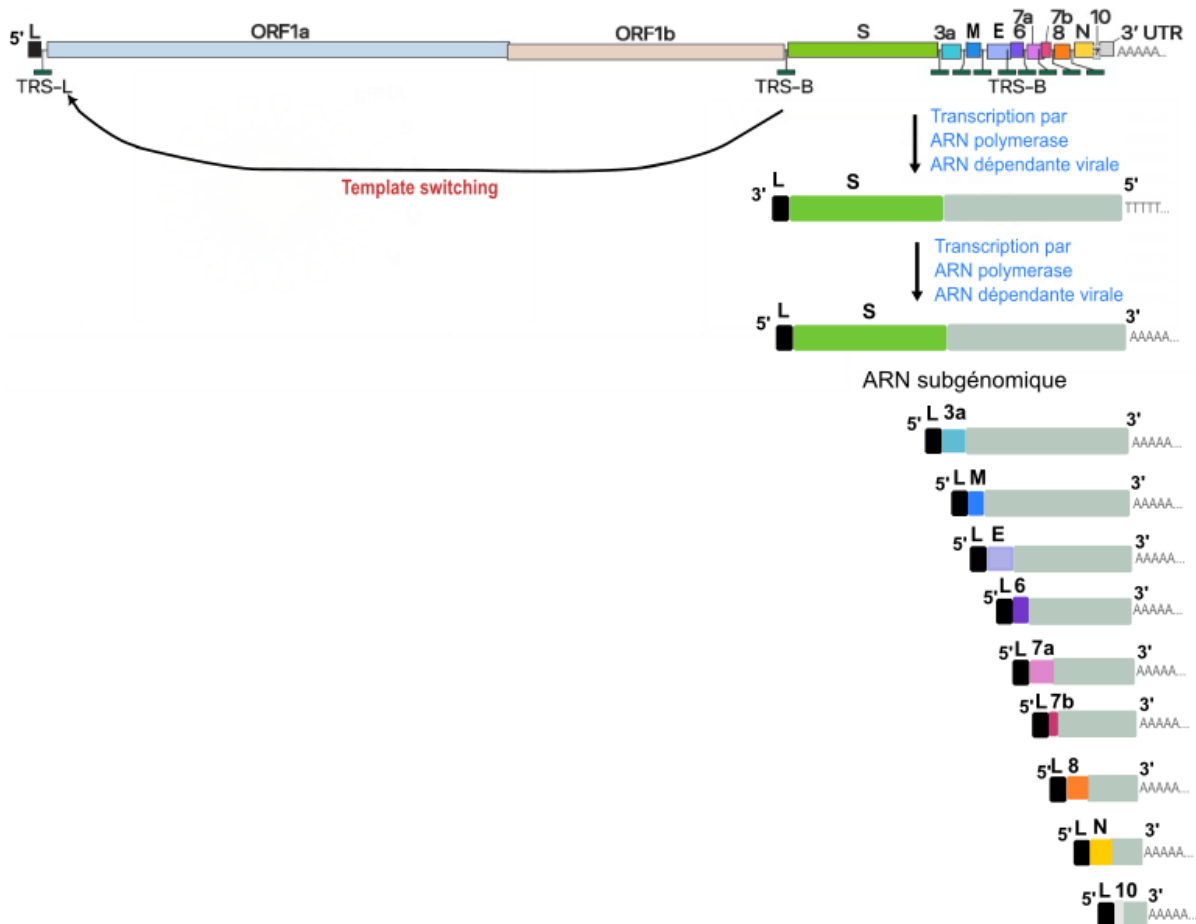


Figure 15 : Mécanismes de la transcription du génome du SARS-CoV-2. 9 ARN subgénomiques sont synthétisés lors de la transcription du génome viral qui débute aux séquences TRS-B délimitant les gènes viraux S, 3a, E, M, 6, 7a, 7b, 8, N et 10. A l'extrémité 5' de chacun des ARN subgénomiques se trouve le leader présent à l'extrémité 5' du génome. En fait, lors de la synthèse du brin d'ARN de polarité négative, l'ARN polymérase ARN-dépendante synthétise l'ARN jusqu'à une séquence TRS (*Transcription Regulating Sequence*) composée de 6 à 7 nucléotides communs entourés par des nucléotides plus variables. Après la transcription de cette TRS, l'ARN subgénomique synthétisé s'apparie avec la TRS-L présente en 3' du leader, ce qui est nommé le 'template switching'. Cela permet donc la transcription de la séquence leader en 5' de la séquence du gène transcrit. Les ARN de polarité négative ainsi obtenus sont à nouveau

*transcrits par la polymérase virale, synthétisant ainsi les ARN subgénomiques finaux. Inspirée par Kim et al., Cell, 2020*³¹².

Après synthèse des ARN génomiques et subgénomiques, ceux-ci sortent des vésicules à double membrane par des pores^{297,315}. Après leur sortie, les ARN subgénomiques sont traduits, ce qui permet l'expression des protéines structurales et accessoires^{297,311,312,316}. La sortie des ARN génomiques est suivie par leur encapsidation par la protéine de nucléocapside N^{271,315,317}. L'assemblage final des particules virales a lieu dans le compartiment ERGIC (*Endoplasmic Reticulum-Golgi Intermediate Compartment*). Il est initié par la protéine de membrane M^{271,297,317}. De plus, le bourgeonnement des virions dépend de la protéine E^{297,318}. Les virions sont ensuite transportés par la voie lysosomale et sont libérés des cellules par exocytose (**Figure 16**)^{271,297,313,317}.

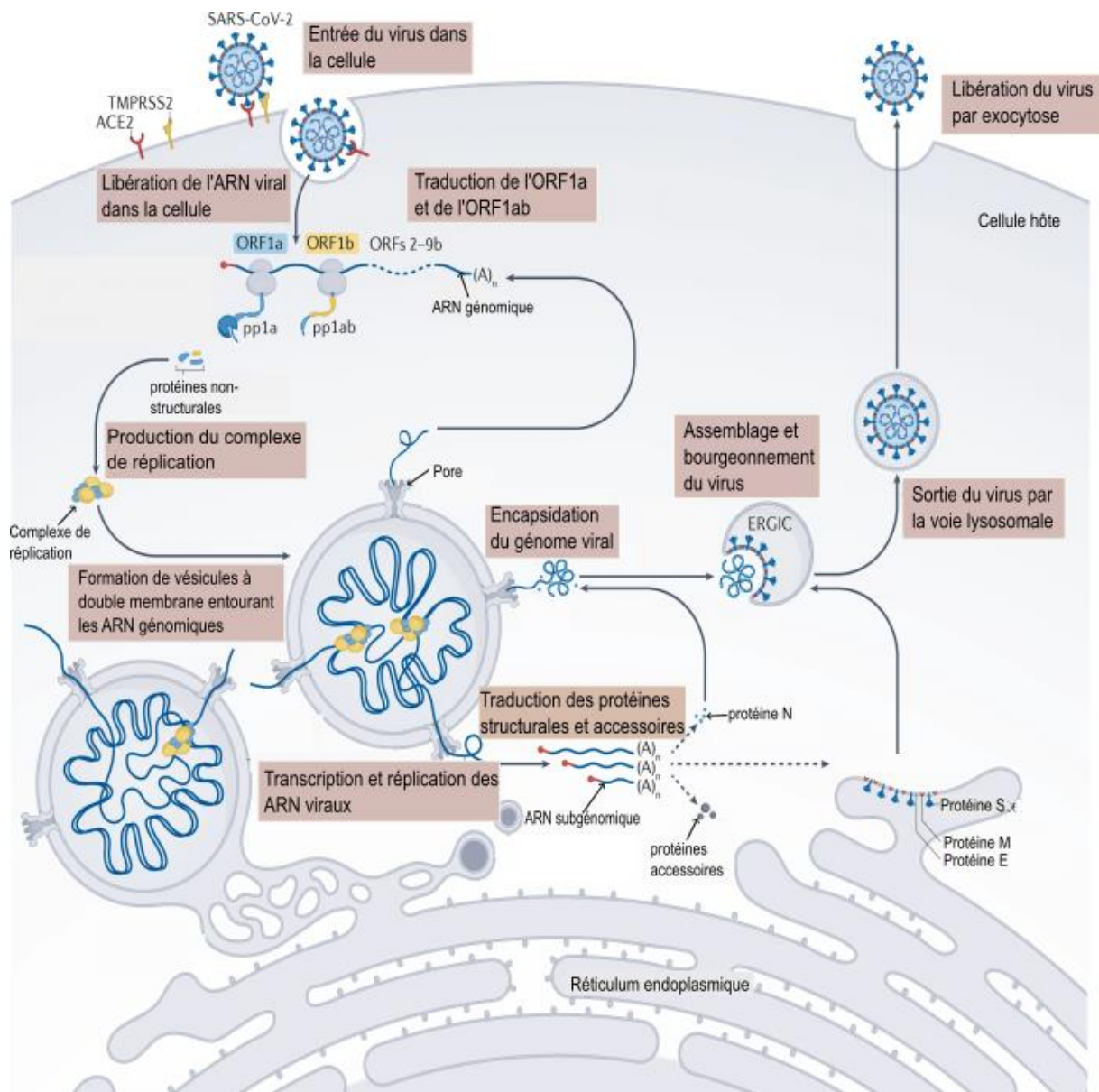


Figure 16: Cycle viral du SARS-CoV-2. L'infection de la cellule hôte par le SARS-CoV-2 est dépendante de l'expression du récepteur ACE2 à la surface des cellules hôtes. Après entrée du virus dans la cellule, les ARN génomiques sont décapsidés. ORF1a et ORF1ab sont ensuite traduites en deux polyprotéines pp1a et pp1ab qui sont clivées par des protéases virales. Les protéines non structurales obtenues forment le complexe de réplication et permettent la formation de vésicules à double membrane abritant la réplication et la transcription virale. Les ARN génomiques et subgénomiques obtenus sortent de ces vésicules à double membrane par des pores. Les ARN subgénomiques sont traduits dans le cytosol ou à la surface du réticulum endoplasmique et permettent la synthèse des protéines structurales et accessoires du virus. A la sortie des vésicules à double membrane, les ARN génomiques sont immédiatement encapsidés. L'assemblage et le bourgeonnement du virus ont lieu dans le compartiment ERGIC. Les virus sont ensuite transportés par la voie lysosomale vers la membrane plasmique et sont libérés dans le milieu extracellulaire par exocytose. Inspirée de Malone et al., *Nature Molecular Cell Biology*, 2021³¹⁹.

3.1.3. Modèles animaux utilisés pour l'étude de l'infection par le SARS-CoV-2.

La forte conservation de la protéine ACE2 chez les Vertébrés indique que le spectre d'hôtes du SARS-CoV-2 serait très large^{320,321}. En effet, les études de Damas et al. et de Liu et al. montrent que de nombreuses espèces de Mammifères seraient sensibles à l'infection par le SARS-CoV-2, en se basant sur les homologies de séquence observées dans les motifs de la protéine ACE2 interagissant avec la protéine S du SARS-CoV-2^{320,321}. Ces espèces regroupent des animaux de compagnie comme le chat (*Felis catus*)³²², des animaux de rente comme le mouton (*Ovis aries*), les bovins (*Bos taurus*), la chèvre (*Capra hircus*) ou le vison (*Mustela lutreola*)³²³ et des animaux sauvages comme les lions de mer (*Eumetopias jubatus*), les orques (*Orcinus orca*), les tigres (*Panthera tigris*), les lynx (*Lynx canadensis*) ou les primates de l'Ancien Monde^{320,321,324}. De plus, des modèles animaux déjà utilisés en laboratoire pour l'étude des infections respiratoires sont sensibles à l'infection par le SARS-CoV-2 : le hamster doré syrien (*Mesocricetus auratus*), le furet (*Mustela putorius furo*) et les macaques rhesus et cynomolgus (*Macaca mulatta* et *Macaca fascicularis*)^{10,320-322,324,325}. Toutefois, la souris (*Mus musculus*) n'est pas sensible à toutes les souches du virus^{10,320,321,325}. En effet, les souches ancestrales du SARS-CoV-2 comme la souche D614G n'infectent pas les souris WT³²⁶. Pourtant, depuis l'émergence de variants portant la mutation N501Y dans la protéine Spike comme le variant Alpha, le tropisme du virus s'est étendu à la souris³²⁶. La souris peut aussi être infectée par le variant Omicron BA.1 cependant le niveau d'infection reste modéré au niveau de la cavité nasale comparé à des modèles comme le hamster Syrien³²⁷. Dans ce paragraphe, les effets d'une infection par la souche D614G du SARS-CoV-2 chez le furet, le hamster syrien et les modèles primates seront abordés. Les différents modèles murins utilisés pour étudier l'infection par cette souche seront également présentés. Nous résumerons les avantages, les désavantages et les utilisations de ces modèles dans la **Table 2**.

Le furet est un excellent modèle pour la transmission et la pathogenèse des virus Influenza A^{328,329}. Les furets sont aussi sensibles à l'infection par le SARS-CoV-2^{320-322,325}. Chez ces animaux, la pathologie causée par le SARS-CoV-2 n'est généralement pas sévère étant donné que les voies respiratoires supérieures sont les principales cibles de l'infection³²⁵. L'âge de l'animal semble tout de même augmenter la sévérité de la maladie avec des symptômes plus forts et des charges virales plus importantes notamment³³⁰. Aucune perte de l'odorat n'a été démontrée avec des tests comportementaux chez le furet. Pourtant, de nombreuses études suggèrent que l'épithélium olfactif serait atteint par l'infection^{325,331,332}. Ces animaux peuvent également transmettre l'infection par le SARS-CoV-2 à leurs congénères, que ce soit par contact direct ou par l'air^{10,328,330}. Ces données en font un

excellent modèle de transmission de la maladie et un assez bon modèle pour la pathogenèse de l'infection par le SARS-CoV-2 dans les voies respiratoires supérieures.

Le hamster doré syrien est un modèle très utilisé dans l'étude de la pathogenèse de l'infection par le SARS-CoV-2. La protéine ACE2 du hamster doré est en effet capable d'interagir efficacement avec la protéine S du SARS-CoV-2 et permet donc l'entrée du virus^{10,320,321,325,333}. Généralement, dès 2 jours post-infection, les hamsters montrent une léthargie, une fourrure hérissée, une perte de poids, des atteintes respiratoires et une anosmie^{10,31,325,333,334}. Ces symptômes sont fortement similaires à ceux de la plupart des adultes humains atteints par la COVID-19³³³. L'âge, comme chez l'Homme, est un facteur de sévérité de l'infection dans cette espèce^{10,335}. L'infection par le SARS-CoV-2 est principalement localisée dans le tractus respiratoire (fosses nasales, trachée et poumons)^{10,288,333}. L'infection par le SARS-CoV-2 est associée avec une forte inflammation (niveaux de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires élevés et infiltration de cellules immunitaires dans les tissus infectés)^{10,27,220,336,337}. Des dommages tissulaires massifs sont également observés au cours de l'infection des hamsters syriens par le SARS-CoV-2, notamment dans la muqueuse olfactive et dans les poumons^{10,27,220,333,336}. Des tissus en dehors des voies respiratoires comme les reins, le cœur, les vaisseaux sanguins et les ganglions lymphatiques sont également endommagés au cours de l'infection, ce qui pourrait permettre d'étudier certaines manifestations extra-pulmonaires de la COVID-19 observées chez l'Homme^{10,255,338}. Enfin, le hamster syrien transmet efficacement la COVID-19 par contact direct ou par aérosol^{10,288}. En conclusion, la pathologie de l'infection par le SARS-CoV-2 chez les hamsters syriens est similaire à la COVID-19 humaine, ce qui en fait un très bon modèle pour l'étude de la pathogénicité du virus.

Deux modèles de primates non humains sont aussi utilisés dans l'étude de l'infection par le SARS-CoV-2 : les macaques rhésus et cynomolgus^{10,325}. Leurs protéines ACE2 sont hautement homologues à celle de l'Homme, ce qui les rend sensibles à l'infection par le SARS-CoV-2^{10,320,321,325}. Ces deux espèces présentent généralement peu de symptômes mais ceux-ci sont plus prononcés chez les macaques rhésus que chez les macaques cynomolgus^{10,324,325,339,340}. L'infection touche principalement les voies respiratoires et lors d'examens radiologiques de la poitrine, les opacités observables sur les poumons indiquent une pneumonie chez ces animaux^{10,324,339,340}. Dans ce modèle aussi, l'âge augmente la sévérité de la maladie observée^{340,341}. A ce jour, les études sur le modèle primate non humain se sont concentrées sur les poumons et le cerveau ; l'infection dans les fosses nasales et notamment dans l'épithélium olfactif n'a été que peu abordée³²⁵. Le développement d'une anosmie n'a donc pas pu être démontré chez le primate non humain³²⁵. Le modèle primate non humain est donc un bon modèle pour une COVID-19 peu sévère chez l'humain. L'étude de l'impact du SARS-CoV-2 sur les voies respiratoires supérieures de ces animaux sera pour autant difficile notamment à cause de considérations éthiques.

Les modèles animaux abordés précédemment sont sensibles à l'infection par le SARS-CoV-2. Au contraire, la souris ne peut pas être infectée par les souches ancestrales de SARS-CoV-2 comme la souche D614G sur laquelle porte ce travail³²⁶. Pourtant, dès le début de la pandémie, des modèles murins de l'infection ont été développés grâce à l'établissement de lignées murines humanisées pour la protéine ACE2 ou à l'adaptation de souches virales à la souris^{10,325}.

Lors de l'apparition du SARS-CoV, des souris exprimant la protéine ACE2 humaine (hACE2) sous le contrôle du promoteur du gène K18 (*kératine 18*) ont été développées^{10,325,342}. Ces souris devraient exprimer hACE2 dans les cellules épithéliales³⁴². En fait, la protéine ACE2 humaine est exprimée dans les poumons, l'intestin, le foie, la rate, le cœur et le cerveau de ces animaux³⁴². Ces souris sont sensibles aux infections par le SARS-CoV et le SARS-CoV-2³⁴²⁻³⁴⁶. Elles développent alors une pneumonie sévère accompagnée d'une neuroinvasion fatale^{10,325,344,346}. Une anosmie est également observée chez ces animaux^{10,325,343,345}. De plus, des lésions tissulaires ont été constatées dans l'épithélium olfactif de ces souris^{28,345}. Le couplage de l'anosmie à la présence de virus dans le système nerveux central suggérait également que le SARS-CoV-2 pourrait emprunter le 'rail olfactif' pour atteindre le système nerveux central³⁴⁴. Pourtant, les encéphalites virales observées chez ces souris, très rares chez les patients humains, pourraient aussi être liées à une expression ectopique de la protéine ACE2 humaine dans le cerveau de ces souris³⁴³. Plus récemment, des modèles de souris transgéniques exprimant hACE2 sous le contrôle du promoteur du gène ACE2 murin (mACE2) ont été développés, ce qui permettrait une expression plus physiologique de la protéine hACE2^{10,347,348}. Ces souris présentent en général une pathologie relativement modérée avec une perte de poids et une pneumonie^{10,347,348}. A ce jour, les études utilisant ces modèles se sont limitées à la pathologie pulmonaire ; l'impact du virus sur l'épithélium olfactif reste inconnu. Pourtant, les profils d'expression de la protéine hACE2 dans ces modèles de souris s'avèrent différents de ceux observés chez les humains, notamment dans les tissus nerveux³⁴⁸. La pathologie observée chez ces modèles pourrait donc ne pas être totalement fidèle à celle observée chez l'Homme, ce qui en fait des d'assez mauvais modèles pour étudier la pathogenèse du SARS-CoV-2 notamment au niveau des tissus nerveux comme l'épithélium olfactif. Pourtant, ils peuvent constituer d'excellents modèles pour le test et le screening de molécules antivirales et de vaccins.

D'autres modèles murins de l'infection par le SARS-CoV-2 ont été obtenus en adaptant le virus à l'hôte murin. Ces virus adaptés seront nommés par la suite 'virus murinisés'. Ils sont obtenus par génétique inverse en introduisant des mutations dans la séquence de la protéine S pour augmenter son affinité pour la protéine ACE2 murine et/ou par des passages successifs du virus dans des cellules ou des tissus murins^{10,325}. Dans ce paragraphe, nous allons discuter particulièrement de la souche MA30 utilisée par Verma et al. pour déterminer les effets de l'infection par le SARS-CoV-2 sur l'épithélium olfactif de souris³⁴⁹. Elle a été obtenue en introduisant 3 mutations dans la protéine S par génétique

inverse (Q498Y/P499T/N501Y) puis par 30 passages sur des poumons de souris^{349,350}. L'infection de souris par MA30 est à l'origine d'une pneumonie sévère sans neuroinvasion^{349,350}. Elles montrent également une perte de l'odorat³⁴⁹. L'épithélium olfactif est en effet atteint par l'infection et une infiltration de cellules immunitaires dominées par les lymphocytes et les macrophages y est observée³⁴⁹. Ces modèles murins pourraient donc permettre de mieux comprendre les pathologies pulmonaires relativement sévères chez l'Homme. Ils pourraient également apporter des données intéressantes sur les mécanismes des pertes de l'odorat chez l'Homme. Ces modèles murins pourraient par exemple être complémentaires au modèle hamster pour les mécanismes des pertes de l'odorat étant donné que les pathologies de l'infection dans ces 2 modèles sont très différentes. En effet, ces modèles murins ne présentent pas de desquamation importante de l'épithélium olfactif comme ce qui avait été observé dans le modèle hamster précédemment^{27,349}. Ces différences de pathologie pourraient aussi être liées aux potentielles différences intrinsèques entre les virus 'murinisés' et le variant D614G¹⁰, à des différences de réponse immunologique suite à l'infection par le SARS-CoV-2 entre les deux espèces^{337,349} ou à des différences méthodologiques entre ces deux études. En effet, la réponse immunitaire observée chez le hamster syrien dans notre étude est marquée par le recrutement très important de neutrophiles dans l'épithélium olfactif³³⁷ alors que cela est apparemment beaucoup moins le cas chez les souris infectées par le virus MA30³⁴⁹.






Avantages du modèle	Animal	Désavantages du modèle	Utilisation du modèle
<ul style="list-style-type: none"> Des symptômes proches de ceux observés chez l'Homme pendant l'infection (des atteintes respiratoires, une anosmie...), Une infection principalement dans le tractus respiratoire, Une inflammation importante induite par l'infection, Des manifestations extrapulmonaires de l'infection comme celles observées chez l'humain notamment au niveau des reins, du cœur... Transmission inter-individuelle de virus. 	<p>Hamster syrien (<i>Mesocricetus auratus</i>)</p> 	<ul style="list-style-type: none"> Manque d'outils pour l'étude de la pathogénèse (anticorps...), Annotation du génome relativement incomplète. 	<ul style="list-style-type: none"> Très bon modèle pour l'étude de la pathologie modérée suite à l'infection par le SARS-CoV-2. Un modèle pour l'étude des manifestations extrapulmonaires suite à l'infection par le SARS-CoV-2 ? Bon modèle pour l'étude des pertes de l'odorat associées à l'infection par le SARS-CoV-2. Bon modèle de transmission du SARS-CoV-2.
<ul style="list-style-type: none"> Développement d'une anosmie, Une pathologie pulmonaire sévère, Des outils moléculaires importants chez la souris (anticorps, outils de génétique moléculaire) et une très grande connaissance du génome murin, Existence de nombreuses lignées consanguines murines et de lignées transgéniques permettant d'étudier les mécanismes de nombreuses pathologies virales. 	<p>Souris (<i>Mus musculus</i>) génétiquement modifiées</p> 	<ul style="list-style-type: none"> Expression ectopique de la protéine ACE2 humaine chez ces animaux causant une pathogénèse altérée avec des encéphalites fatales par exemple. 	<ul style="list-style-type: none"> Bon modèle pour le test d'antiviraux et de vaccins contre le SARS-CoV-2. Modèle de pneumonie sévère suite à une infection par le SARS-CoV-2.
<ul style="list-style-type: none"> Développent une pneumonie relativement sévère et une anosmie, Beaucoup d'outils moléculaires chez la souris (anticorps, outils de génétique moléculaire) et une très bonne connaissance du génome murin, Existence de nombreuses lignées consanguines murines et de lignées transgéniques permettant d'étudier les mécanismes de nombreuses pathologies virales. 	<p>Souris (<i>Mus musculus</i>) infectées avec une souche SARS-CoV-2 adaptée à la souris</p> 	<ul style="list-style-type: none"> Différences entre les pathologies causées par les variants 'murinisés' et les variants ancestraux comme D614G qui ne peuvent pas infecter la souris, 	<ul style="list-style-type: none"> Bon modèle de pneumonie relativement sévère suite à l'infection par le SARS-CoV-2. Bon modèle pour l'étude des pertes de l'odorat associées à l'infection par le SARS-CoV-2 ? Un modèle qui serait différent et complémentaire du modèle hamster avec des mécanismes pathophysiologiques différents de la perte d'odorat. Approches mécanistiques grâce aux lignées transgéniques.
<ul style="list-style-type: none"> Génétiquement très proche de l'Homme, Une pneumonie reproduisant celle observée chez l'Homme le plus souvent avec des opacités dans les radiographies de poumon, Une infection principalement dans les voies respiratoires, Une collaboration avec l'équipe de Catherine Chapon qui pourrait nous permettre d'obtenir des échantillons de cavités nasales de macaque cynomolgus. 	<p>Macaque rhésus et cynomolgus (<i>Macaca mulatta</i> et <i>Macaca fascicularis</i>)</p> 	<ul style="list-style-type: none"> Les études sur les macaques se sont limitées au cerveau et aux poumons et l'impact du virus sur les voies respiratoires supérieures et l'épithélium olfactif n'a pas été étudié ; on ne sait pas s'ils développent une anosmie, Un modèle relativement peu disponible, Manque d'outils pour l'étude de la pathogénèse (anticorps, pas d'outils de génétique moléculaire...). 	<ul style="list-style-type: none"> Bon modèle de physiopathologie pour une pneumonie peu sévère suivant l'infection par le SARS-CoV-2. Modèle physiopathologique de l'infection par le SARS-CoV-2 dans les voies respiratoires supérieures à établir ?
<ul style="list-style-type: none"> Un modèle connu pour les infections respiratoires comme Influenza A donc un modèle très disponible, Transmission inter-individuelle de virus. 	<p>Furet (<i>Mustela putorius furo</i>)</p> 	<ul style="list-style-type: none"> Pas de preuve que ces animaux développent une anosmie. Le SARS-CoV-2 touche majoritairement les voies respiratoires supérieures et très peu les voies respiratoires inférieures, ce qui ne reproduit pas complètement la pathologie humaine. 	<ul style="list-style-type: none"> Bon modèle pour une infection bénigne des voies respiratoires supérieures par le SARS-CoV-2. Bon modèle de transmission du SARS-CoV-2.

Table 2 : Propriétés des modèles animaux utilisés pour l'étude de la pathogénèse du SARS-CoV-2. Les quatre modèles principaux utilisés pour l'étude de l'infection par le SARS-CoV-2 sont actuellement le hamster syrien, la souris, le macaque et le furet. Le hamster syrien reproduit plutôt bien une pneumonie modérée et l'anosmie observées chez l'Homme après infection par le SARS-CoV-2. Toutefois, peu d'outils sont à disposition pour l'étude de la physiopathologie du SARS-CoV-2 dans ce modèle (anticorps, connaissance du génome de *Mesocricetus auratus* approximative...), ce qui limite les approches mécanistiques. La souris n'est pas sensible aux souches ancestrales du SARS-CoV-2 comme la souche D614G mais des souris humanisées pour la protéine ACE2 ou des virus SARS-CoV-2 adaptés à la souris ont été développés pour étudier la physiopathologie de l'infection par le SARS-CoV-2 dans un modèle murin. Les souris humanisées pour la protéine ACE2 peuvent exprimer cette protéine de manière ectopique, ce qui pourrait leur faire développer une maladie extrêmement sévère qui ne reproduit pas la physiopathologie généralement observée chez l'Homme notamment au niveau du système nerveux central. Toutefois, ces modèles peuvent être utilisés pour tester des antiviraux et des vaccins. Les virus SARS-CoV-2 adaptés à la souris pourraient être de bons modèles physiopathologiques pour des pneumonies relativement sévères et des pertes de l'odorat. Au niveau de la physiologie de l'odorat, ce modèle serait complémentaire à celui du hamster étant donné que les 2 modèles semblent présenter des physiopathologies de l'infection par le SARS-CoV-2 dans les fosses nasales. Ces modèles utilisant des virus murinisés pourraient aussi permettre des études mécanistiques en utilisant une des nombreuses lignées de souris transgéniques. Toutefois, ils sont plus ou moins modifiés par rapport aux souches ancestrales de SARS-CoV-2, ce qui pourrait également causer des altérations de la physiopathologie du virus. Les macaques rhésus et les macaques cynomolgus présentent une pneumonie relativement peu sévère observée aussi chez l'humain atteint par la COVID-19. Très peu d'études ont été effectuées sur les effets de l'infection dans les voies respiratoires supérieures et plus particulièrement sur l'épithélium olfactif. Nous ne savons pas dans l'état actuel des connaissances si ces animaux développent une anosmie. Enfin, le furet est utilisé principalement comme un modèle d'une infection peu sévère par le SARS-CoV-2 touchant principalement les voies respiratoires supérieures. Le furet est également un excellent modèle de transmission inter-individuelle.

D'après les données présentées dans la littérature, les espèces modèles qui permettraient de reproduire et d'étudier la pathogénèse des variants ancestraux du SARS-CoV-2 comme le variant D614G seraient le hamster doré et les espèces de primates non humains. Dans notre étude sur les pertes de l'odorat induites par l'infection virale, nous utiliserons le modèle hamster. Dans notre collaboration avec

Catherine Chapon, du CEA de Fontenay-aux-Roses, nous avons reçu des biopsies de fosses nasales de macaque cynomolgus sacrifiés à 4 et 8 jours post-infection. Malheureusement, comme ces biopsies présentaient majoritairement de l'épithélium respiratoire, nous n'avons donc pas pu étudier les caractéristiques de l'infection de l'épithélium olfactif par le SARS-CoV-2 chez les primates non humains. Nous aimerions continuer cette collaboration pour étudier les causes d'une potentielle anosmie dans ce modèle.

3.2. Infection par le SARS-CoV-2 dans l'épithélium olfactif et origine de l'anosmie ?

3.2.1. Tropisme du SARS-CoV-2 dans le système olfactif.

Les types cellulaires permissifs à l'infection par le SARS-CoV-2 sont fortement dépendants de l'expression par les cellules des interactants cellulaires indispensables pour compléter le cycle viral. Parmi ceux-ci, le récepteur ACE2 et les protéases indispensables à l'entrée du virus (furine et TMPRSS2 et/ou cathepsine B/L) sont des déterminants cruciaux du tropisme du virus (**voir paragraphe 3.1.2**). Jusqu'au variant Omicron BA.1, la voie d'entrée principale passait par la membrane plasmique avec l'utilisation des protéases furine et TMPRSS2^{298,351}. En revanche, les nombreuses mutations présentes chez Omicron BA.1 entraînent une utilisation préférentielle de la voie endocytaire avec utilisation des protéases furine et cathepsine B/L³⁵². Dans cette étude, nous avons exclusivement utilisé la souche D614G, une des souches ancestrales du virus, dont ACE2 et TMPRSS2 sont des déterminants majeurs du tropisme. Dans ce paragraphe, nous décrivons le tropisme du virus, et plus particulièrement de la souche D614G, dans l'épithélium olfactif.

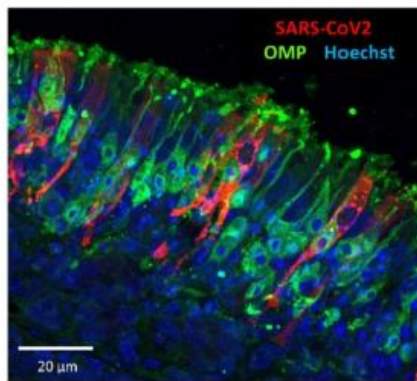
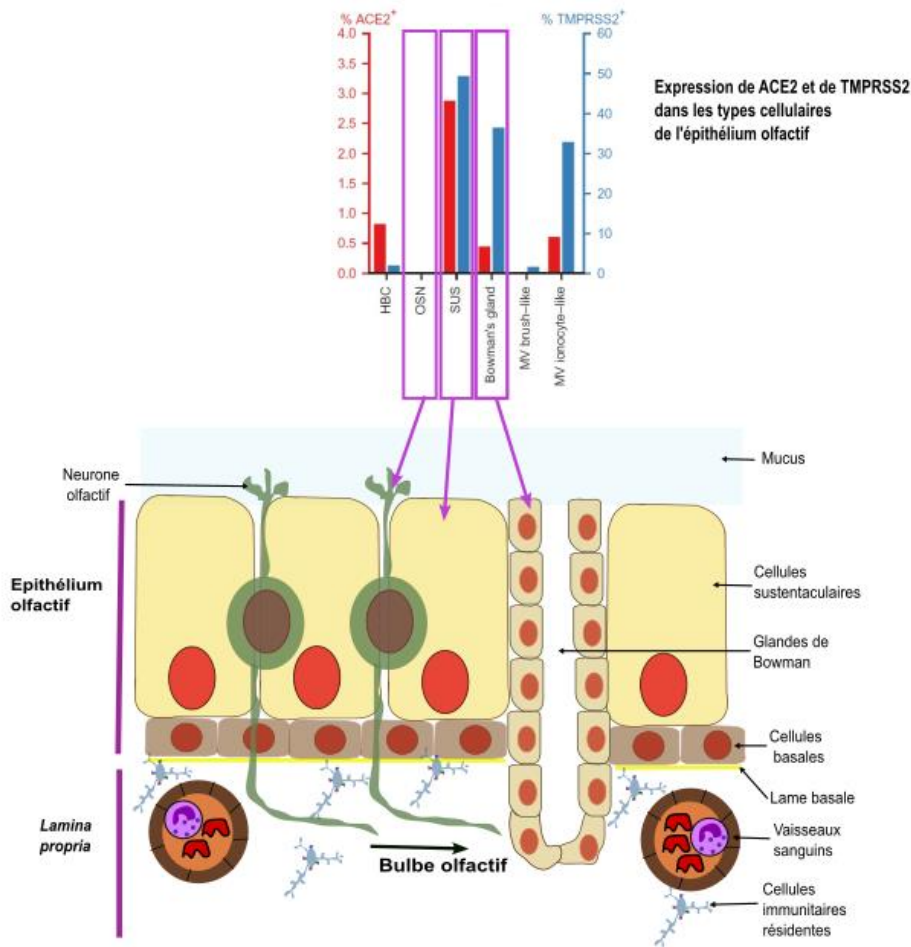
Etant donné la forte prévalence de pertes de l'odorat chez les patients atteints par la COVID-19, de nombreuses équipes se sont rapidement intéressées au tropisme du SARS-CoV-2 dans la cavité nasale et notamment dans l'épithélium olfactif en se focalisant sur l'expression d'ACE2 et de TMPRSS2. Ces études ont permis de montrer que ces protéines sont exprimées principalement par les cellules sustentaculaires, les glandes de Bowman et les cellules basales de l'épithélium olfactif^{353,354}. Au contraire, les neurones olfactifs et les neurones du bulbe olfactif expriment très peu les protéines ACE2 et TMPRSS2³⁵⁴. De ces observations, les auteurs ont conclu que les cellules sustentaculaires et les glandes de Bowman étaient les principaux types cellulaires permissifs à l'infection par le SARS-CoV-2 dans l'épithélium olfactif (**Figure 17**)^{353,354}.

De plus, des expériences de co-marquage des antigènes viraux avec des marqueurs de cellule sustentaculaire et de neurone olfactif dans le modèle hamster, dans les modèles murins et chez l'humain confirment que les cellules sustentaculaires sont les principales cellules infectées par le SARS-CoV2

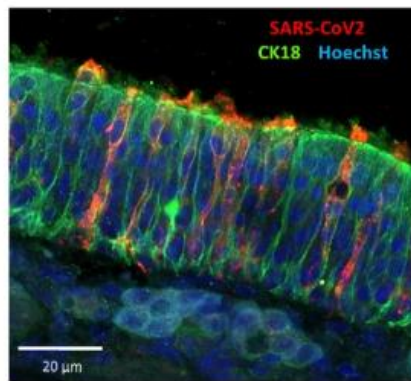
tandis que les neurones olfactifs ne le seraient pas^{27-29,349,355}. D'après Ye et al., les cellules sustentaculaires représentent plus de 50 % des cellules infectées par le SARS-CoV-2 dans l'épithélium olfactif, les glandes de Bowman environ 25 %²⁸ (**Figure 17**). Au contraire, quelques études iraient dans le sens d'une infection des neurones olfactifs^{334,355,356}. Les plus développées d'entre elles montrent pourtant que ces événements sont extrêmement rares³⁵⁵. Cette présence d'antigènes viraux dans les neurones olfactifs pourrait être expliquée par la capacité des neurones à phagocyter des particules dans la lumière de la cavité nasale plus qu'à une réelle infection^{349,357} ou par une autolyse des tissus lors des autopsies³⁵⁶. Enfin, certaines études observent la présence d'antigènes du SARS-CoV-2 au niveau des faisceaux d'axones. Cette présence a été interprétée de 2 manières différentes :

- Une infection des neurones olfactifs par le SARS-CoV-2,
- Un passage du SARS-CoV-2 par les canaux formés par les cellules engainantes laissés inoccupés par les pertes neuronales ayant lieu pendant l'infection^{220,355}.

En fait, ces observations pourraient être aussi expliquées par l'infection de fibroblastes entourant les faisceaux d'axones du nerf olfactif comme observé par Khan et al. chez l'Homme³⁵⁸. De plus, aucune infection n'est réellement observée dans les neurones du bulbe olfactif que ce soit chez l'Homme ou dans les modèles animaux^{220,355,358}.



Pas d'infection par le SARS-CoV-2 dans les neurones olfactifs



Une infection importante par le SARS-CoV-2 dans les cellules sustentaculaires

Figure 17 : Les cellules sustentaculaires et les cellules des glandes de Bowman sont les principales cibles de l'infection par le SARS-CoV-2 mais pas les neurones olfactifs. Les facteurs d'entrée principaux des souches ancestrales du SARS-CoV-2, comme la souche D614G, sont le récepteur principal ACE2 et la protéase permettant la maturation de la protéine S : TMPRSS2. L'expression de ces protéines par les cellules cibles est essentielle pour l'infection par le SARS-CoV-2. Dans l'épithélium olfactif, les cellules sustentaculaires et les cellules des glandes de Bowman présentent des niveaux d'expression élevés de ces 2 protéines. Par contre, les neurones olfactifs les expriment très peu. Des expériences en condition d'infection confirment l'infection par le SARS-CoV-2 des cellules sustentaculaires et confirme que les neurones olfactifs ne seraient pas infectés par le virus. Inspiré de Brann et al., Science Advances, 2020 et Bryche et al., Brain, Behaviour and Immunity, 2020^{27,354}.

Les mutations présentes dans la protéine S du variant Omicron BA.1 changent la voie d'entrée préférentielle du virus³⁵². Il semblerait que ces propriétés soient à l'origine d'un changement de tropisme. Le variant Omicron BA.1 infecterait moins l'épithélium olfactif et plus l'épithélium respiratoire nasal, ce qui pourrait expliquer que l'infection par ce variant cause moins de pertes de l'odorat que les variants précédents^{21,355}. Toutefois, le variant Omicron BA.1 causerait des hyposmies, or ces hyposmies sont moins facilement détectables par les tests olfactifs³⁵⁹. Cette infection moins importante serait due à l'expression particulièrement importante de TMPRSS2 dans les cellules sustentaculaires³⁶⁰.

En conclusion, les principales cellules infectées par le SARS-CoV-2 dans l'épithélium olfactif sont les cellules sustentaculaires et les cellules des glandes de Bowman. Au contraire, les neurones sensoriels olfactifs ne sont probablement pas infectés même si cette observation est encore contredite par quelques études. Il est également très peu probable que le virus SARS-CoV-2 parvienne au système nerveux central par le rail olfactif. Ainsi, il est peu probable que les pertes de l'odorat associées à la COVID-19 soient causées par une atteinte directe aux neurones olfactifs par le virus et/ou à un passage du virus dans les aires olfactives du système nerveux central par le rail olfactif.

3.2.2. Dommages à l'épithélium olfactif et origine de l'anosmie associée à la COVID-19.

D'après ce qui a été discuté précédemment, les pertes de l'odorat associées à la COVID-19 ne sont probablement pas dues à une infection des neurones olfactifs ou des altérations des structures centrales de l'olfaction par le virus. La perte de l'odorat observée lors de l'infection par le SARS-CoV-2 est donc liée à l'infection des cellules sustentaculaires et des glandes de Bowman au niveau de l'épithélium.

Des études sur des modèles animaux comme les hamsters syriens montrent des altérations importantes de la structure de l'épithélium olfactif suite à l'infection par le SARS-CoV-2²⁷. Une desquamation importante de ce tissu peut notamment être observée dans la cavité nasale des hamsters dès 2 jours post-infection²⁷. Quelques études sur des biopsies obtenues chez des patients montrent un amincissement important de l'épithélium olfactif, ce qui est cohérent avec une desquamation de ce dernier³². De plus, des études réalisées dans le modèle hamster ont démontré que les fonctions olfactives des hamsters sont anti-corrélées avec les dommages à l'épithélium olfactif³¹. D'après ces données, la perte de l'odorat associée à la COVID-19 serait causée par une perte massive de neurones olfactifs lors de la desquamation de l'épithélium suite à son infection par le virus.

En ce qui concerne les pertes d'odorat à long terme, l'analyse de biopsies de fosses nasales humaines suggèrent que les perturbations de l'odorat à long terme chez l'Homme seraient liées à une

régénération perturbée de l'épithélium olfactif et à une inflammation résiduelle importante dans le tissu³³. Sur les modèles animaux, très peu de données ont jusqu'à présent pu être accumulées sur les pertes de l'odorat à long terme. Sur le modèle hamster, les données accumulées jusqu'à présent seraient plutôt en accord avec une bonne récupération globale du sens de l'odorat³¹. Toutefois, certaines zones de l'épithélium semblent régénérer moins bien que d'autres et cette régénération altérée serait liée à des niveaux plus élevés d'inflammation³⁶¹.

Pour mieux comprendre les pertes de l'odorat à court et long terme, il serait fondamental de comprendre les mécanismes de la desquamation de l'épithélium olfactif observée suite à l'infection par le SARS-CoV-2 et les cinétiques de régénération de l'épithélium. Il serait aussi important d'étudier les niveaux d'inflammation résiduelle dans l'épithélium olfactif, ce qui pourrait être à l'origine d'altérations de sa régénération.

Dans une première partie, nous étudierons les mécanismes à l'origine de la desquamation de l'épithélium olfactif suite à l'infection par le SARS-CoV-2. Nos données nous ont permis de conclure que l'infiltration des macrophages résidents Iba1⁺, des macrophages pro-inflammatoires CD68⁺ et des neutrophiles est corrélée avec la genèse des dommages à l'épithélium olfactif. De plus, avec des inhibiteurs des fonctions des neutrophiles, nous avons pu montrer que les neutrophiles jouent un rôle principal dans l'établissement de ces dommages et donc dans la genèse des pertes de l'odorat associées à la COVID-19. Ces mécanismes diffèrent quelque peu des mécanismes suggérés par la littérature dans lesquels l'apoptose des cellules sustentaculaires infectées serait à l'origine de la déstabilisation du tissu^{28,34}.

Dans une deuxième partie de cette thèse, nous avons étudié les cinétiques de régénération de l'épithélium olfactif après infection par le SARS-CoV-2. Nous avons pu observer que la prolifération des cellules basales commence à environ 8 jours post-infection, indiquant que la régénération commence bien après la clairance de l'infection. De plus, nous avons pu observer des disparités régionales importantes dans la régénération de l'épithélium. Dans les zones ventrales de l'épithélium olfactif, la régénération se montre relativement efficace avec une apparition des premiers neurones matures à environ 17 jours post-infection. Dans les zones dorsales et dans les zones antérieures par contre, la régénération semble fortement perturbée. Ces disparités de régénération pourraient engendrer des dysfonctionnements de l'odorat à long terme comme des parosmies^{20,362}. Nous nous sommes demandés si cette régénération avait lieu dans un contexte d'inflammation résiduelle, ce qui pourrait expliquer des perturbations de la régénération de l'épithélium olfactif³⁸. En effet, à 17 jours post-infection, l'expression de certaines cytokines pro-inflammatoires est toujours supérieure au contrôle, indiquant qu'une inflammation résiduelle serait présente dans l'épithélium olfactif humain après son infection par le SARS-CoV-2.

Pour aller plus loin, nous avons voulu étudier plus précisément l'effet de l'inflammation sur la régénération de l'épithélium olfactif. Pour cela, nous avons utilisé un traitement anti-inflammatoire, la dexaméthasone³⁶³ et avons étudié son effet sur les populations neuronales à 11 jours post-infection. Une légère récupération des populations de neurones olfactifs matures peut être observée surtout dans les zones ventrales de l'épithélium olfactif. Ces résultats semblent confirmer que l'inflammation pourrait jouer un rôle important dans les perturbations de la régénération observées dans notre modèle après l'infection par le SARS-CoV-2.

Résultats

1. Article 1 : la destruction de l'épithélium olfactif suite à l'infection par le SARS-CoV-2 est principalement causée par l'action des protéases neutrophilaires.

Jusqu'à l'émergence du variant Omicron, près de 50 % des patients atteints par la COVID-19 se plaignaient d'une anosmie, c'est-à-dire d'une perte complète du sens de l'odorat^{17,21,22}. Cette forte proportion de pertes d'odorat en fait un important problème de santé publique étant donné qu'elles ont un fort impact sur la qualité de vie des patients²⁶. Comprendre les mécanismes de cette anosmie est donc crucial. Reyna et co-auteurs ont montré que les pertes de l'odorat sont corrélées avec la desquamation et les dommages de l'épithélium olfactif³¹. Comprendre les causes de ces dommages cellulaires est donc crucial pour expliquer les anosmies associées à la COVID-19. Le premier article que nous présentons visera à répondre à ces questions.

Deux hypothèses ont déjà été exposées dans la littérature. La première suggère que les cellules infectées par le SARS-CoV-2 meurent par apoptose et sont la cause de la déstabilisation du tissu^{28,34}. La deuxième suggère que l'infiltration de cellules immunitaires comme les macrophages pro-inflammatoires et les neutrophiles serait à l'origine de la désorganisation du tissu²⁷. En effet, ces cellules sont associées à des dommages tissulaires importants dans des contextes inflammatoires³⁵⁻³⁷. Dans la muqueuse olfactive, les neutrophiles ont déjà été impliqués dans des dommages à l'épithélium olfactif³⁵. Dans un premier temps, nous avons donc voulu savoir si les dommages tissulaires corrélaient avec une forte augmentation de l'apoptose ou avec l'infiltration de cellules immunitaires. Pour cela, des hamsters syriens dorés ont été infectés avec 5.10^3 TCID₅₀ de la souche D614G du SARS-CoV-2. En étudiant des coupes de cavité nasale, nous n'avons pas pu trouver d'augmentation des niveaux d'apoptose dans les zones infectées endommagées par rapport aux zones infectées non endommagées et aux zones non infectées. Par contre, l'infiltration massive de macrophages résidents, de neutrophiles et de macrophages pro-inflammatoires est fortement corrélée avec les dommages observés dans l'épithélium olfactif.

Dans la suite de ce travail, nous avons étudié plus précisément le rôle des neutrophiles dans l'établissement de ces dommages tissulaires à l'épithélium olfactif étant donné que ces cellules ont déjà été impliquées dans de tels dommages dans des conditions similaires³⁵. Pour cela, nous avons utilisé deux inhibiteurs des neutrophiles. Le premier, le cyclophosphamide, inhibe les divisions cellulaires des progéniteurs de neutrophiles dans la moelle osseuse et donc leur formation³⁶⁴. La seconde approche est basée sur l'utilisation d'inhibiteurs de la cathepsine C (collaboration avec **Brice Korkmaz de l'Université de Tours**). Ces inhibiteurs de cathepsine C permettent d'inhiber les fonctions des principales sérine

protéases neutrophilaires : l'élastase, la protéinase 3 et la cathepsine G³⁶⁵. Ces expériences nous ont permis de montrer que les neutrophiles et plus précisément les sérine protéase neutrophilaires sont fortement impliquées dans l'établissement de ces dommages.

De manière surprenante, en absence d'activité neutrophilaire, l'infection semblait moins importante que dans les animaux infectés non traités. Pourtant, les neutrophiles sont censés être impliqués dans la clairance virale (paragraphe **2.1.3 de l'introduction**). Cette augmentation de la charge virale chez les animaux non traités pourrait être liée à la libération de cellules infectées dans la lumière de la cavité nasale qui pourraient propager l'infection dans le reste de la cavité nasale.

Cette étude a été réalisée en collaboration avec Sophie Le Poder à Maisons-Alfort, qui nous a accueillis dans l'animalerie de niveau 3 de Maisons-Alfort.



Neutrophils play a major role in the destruction of the olfactory epithelium during SARS-CoV-2 infection in hamsters

Clara Bourgon¹ · Audrey St Albin¹ · Ophélie Ando-Grard¹ · Bruno Da Costa¹ · Roxane Domain² · Brice Korkmaz² · Bernard Klonjowski³ · Sophie Le Poder³ · Nicolas Meunier¹

Received: 8 June 2022 / Revised: 2 November 2022 / Accepted: 22 November 2022 / Published online: 3 December 2022
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature Switzerland AG 2022

Abstract

The loss of smell (anosmia) related to SARS-CoV-2 infection is one of the most common symptoms of COVID-19. Olfaction starts in the olfactory epithelium mainly composed of olfactory sensory neurons surrounded by supporting cells called sustentacular cells. It is now clear that the loss of smell is related to the massive infection by SARS-CoV-2 of the sustentacular cells in the olfactory epithelium leading to its desquamation. However, the molecular mechanism behind the destabilization of the olfactory epithelium is less clear. Using golden Syrian hamsters infected with an early circulating SARS-CoV-2 strain harboring the D614G mutation in the spike protein; we show here that rather than being related to a first wave of apoptosis as proposed in previous studies, the innate immune cells play a major role in the destruction of the olfactory epithelium. We observed that while apoptosis remains at a low level in the damaged area of the infected epithelium, the latter is invaded by Iba1⁺ cells, neutrophils and macrophages. By depleting the neutrophil population or blocking the activity of neutrophil elastase-like proteinases, we could reduce the damage induced by the SARS-CoV-2 infection. Surprisingly, the impairment of neutrophil activity led to a decrease in SARS-CoV-2 infection levels in the olfactory epithelium. Our results indicate a counterproductive role of neutrophils leading to the release of infected cells in the lumen of the nasal cavity and thereby enhanced spreading of the virus in the early phase of the SARS-CoV-2 infection.

Keywords Post-viral olfactory disorder (PVOD) · Pathophysiology · Innate immunity

Abbreviations

OE Olfactory epithelium
OSN Olfactory sensory neuron
MPO Myeloperoxidase

Introduction

Loss of smell (anosmia) is a major symptom of COVID-19 pandemic. With omicron's increased transmission, hundreds of thousands of people per day still get infected worldwide.

Despite omicron's reduced anosmia prevalence [1], loss of smell will likely affect millions more [2, 3] and 10% of anosmic patients might not recover their sense of smell 6 months after the disease onset [4, 5]. The full olfactory recovery could even take up to 1 year and some patients may never recover their sense of smell [6]. A recent study estimates that in the USA about 720,000 people actually suffer from chronic olfactory disorder related to COVID-19 [7]. The loss of smell negatively impacts life quality by disrupting feeding behavior potentially leading to malnutrition; and by exposing to food poisoning and to inhalation of dangerous chemicals [8]. In severe and persistent cases, anosmic patients could possibly suffer from chronic depression [9]. It is thus crucial to understand the cellular basis of anosmia.

Olfaction starts in the olfactory epithelium (OE) which contains olfactory sensory neurons (OSNs) surrounded by supporting cells called sustentacular cells. Both cell types are regenerated regularly due to multipotent basal cells [10]. Among these cells, only sustentacular cells express significantly angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) and transmembrane serine protease 2 (TMPRSS2) required for

✉ Nicolas Meunier
nicolas.meunier@inrae.fr

¹ Unité de Virologie et Immunologie Moléculaires (UR892), INRAE, Université Paris-Saclay, Jouy-en-Josas, France

² INSERM UMR-1100, "Research Center for Respiratory Diseases" and University of Tours, 37032 Tours, France

³ UMR 1161 Virologie, INRAE-ENVA-ANSES, École Nationale Vétérinaire d'Alfort, Maisons-Alfort, 94704 Paris, France

SARS-CoV-2 cellular entrance [11–13]. We and others observed in the golden Syrian hamster model that SARS-CoV-2 infects massively the sustentacular cells in the OE leading to its desquamation as well as olfactory neurons deciliation and death [14–16]. Although very rarely OSNs may be infected by SARS-CoV-2 [17], a recent study in humans confirms that anosmia arises primarily from infection of sustentacular cells of the OE followed by the disruption of OE integrity without OSN infection [18].

In this study, we focused on the early events following SARS-CoV-2 infection of the nasal cavity to explore the mechanism of the unusually extensive OE damage following SARS-CoV-2 infection. Several studies reported that most cells of the infected OE including OSNs undergo apoptosis [19–22]. A similar phenomenon has been reported during influenza infection [23] and has been considered for SARS-CoV-2 as a defense mechanism to limit a potential invasion of the central nervous system by pathogens using the olfactory route [24]. Alternatively, innate immune cells could trigger directly the desquamation of the OE through inflammation as observed in the lung [25]. Indeed, innate immune cells invade massively the SARS-CoV-2-infected OE [14]. Iba1 (ionized calcium-binding adapter molecule 1) is a marker of microglia/macrophages [26] which are the most studied innate immune cells in the nasal cavity [23]. In the central nervous system, Iba1⁺ microglial cells ensure viral clearance by phagocytizing viral particles and infected cells [27, 28] and can induce cell death as observed in the hippocampus using the Theiler's virus model of encephalitis [29]. As the OE is not protected by the blood–brain barrier, neutrophils and monocytes/macrophages classically recruited during the early event of inflammation could also be involved in the OE damage following SARS-CoV-2 infection [30, 31]. Neutrophils are well known for their ability to induce tissue damage, notably through the release of elastase-like proteinases [32, 33] as well as the production of reactive oxygen species (ROS) by the myeloperoxidase (MPO) and formation of toxic neutrophil extracellular traps [34, 35]. Macrophages are known for their ability to phagocyte pathogens, produce cytokines and activate other immune cells [36]. Although they are involved in the regeneration of the OE [37, 38], they can also lead to tissue damage during viral infections notably through NLRP3 (NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3) inflammasome activation and metalloproteinases activity [31].

In the current work, we observed that apoptosis remains at a low level in the infected areas of the OE while innate immune cells were systematically present in the damaged area of the OE. By manipulating neutrophil activity by two different complementary approaches, we show that they play a major role in the early events of OE destabilization following SARS-CoV-2 infection.

Material and methods

Study design

The study was performed to understand the cellular mechanisms leading to the SARS-CoV-2-induced damage in the OE using hamsters as an animal model. Hamsters experiments were planned in accordance with the principles of the 3Rs (replacement, reduction and refinement). Body weight and animal behavior were monitored before and during the experiments. Different parameters in the nasal cavity were measured by quantitative polymerase chain reaction (qPCR) and by immunohistochemistry. SARS-CoV-2 replication was measured *in vitro* to evaluate a potential inhibition by the drugs used to modulate neutrophils activity. Sample size for each experiment is indicated in figure legends. During analysis, all data points were included except because of technical failure to process the sample. Animals were randomized to the experimental groups. All analyses were performed blindly of the treatment.

SARS-CoV-2 isolates

In vivo experiments were carried out with SARS-CoV-2 strain BetaCoV/France/IDF/200107/2020, which was isolated by Dr. Paccoud from the La Pitié-Salpêtrière Hospital in France. This strain was kindly provided by the Urgent Response to Biological Threats (CIBU) hosted by Institut Pasteur (Paris, France), headed by Dr. Jean-Claude Manu-guerra. Cell culture experiments were performed with the SARS-CoV-2 strain France/IDF0372/2020 kindly provided by Sylvie van der Werf. Both strains have been isolated in the beginning of the pandemic in Europe in March 2020.

Animals

Fifty-six 8-week-old male hamsters were purchased from Janvier's breeding Center (Le Genest, St Isle, France). Animal experiments were carried out in the animal biosafety level 3 facility of the UMR Virologie (ENVA, Maisons-Alfort); approved by the ANSES/EnvA/UPEC Ethics Committee (CE2A16) and authorized by the French ministry of Research under the number APAFIS#25384-2020041515287655.

Infection was achieved by nasal instillation (40 µL in each nostril with 5.10^3 TCID₅₀ of SARS-CoV2 strain BetaCoV/France/IDF/200107/2020) on anesthetized animals under isoflurane. Such viral infection dose gives robust infection level in the nasal cavity [14, 39]. Seven mock-infected animals received only Dulbecco's minimal essential medium.

For neutrophil depletion experiments, hamsters were injected intraperitoneally with either PBS or 150 mg/kg

and 100 mg/kg of cyclophosphamide (CAS: 6055-19-2; PHR1404; Sigma-Aldrich), respectively, at 3 and 1 days before SARS-CoV-2 infection. Animals were sacrificed at 1 dpi (days post-infection) and at 2 dpi ($n=4$ in each group).

To inhibit neutrophil elastase-like proteases, we used a specific synthetic cathepsin C inhibitor (IcatC_{XPZ-01}; [40] diluted in 10% (2-Hydroxypropyl)- β -cyclodextrin (CAS: 128446-35-5; C0926; Sigma-Aldrich) suspended in citrate buffer 50 mM at pH 5 (vehicle) as described previously [41]. Hamsters were injected intraperitoneally twice a day with either vehicle ($n=4$) or IcatC_{XPZ-01} at 4.5 mg/kg for 10 days before infection by SARS-CoV-2 ($n=4$). Animals were sacrificed at 1 dpi.

For all experiments except IcatC_{XPZ-01} treatment, the head was divided sagittally into two halves, of which one was used for immunohistochemistry experiments. Nasal turbinates were extracted from the other half for qPCR analysis. Only histological analysis was performed on tissues from IcatC_{XPZ-01} treatment experiments.

Histology, immunohistochemistry and quantifications

The immunohistochemistry analysis of the olfactory mucosa tissue sections was performed as described previously in mice [43]. Briefly, the animal hemi-heads were fixed for 3 days at room temperature in 4% paraformaldehyde (PFA) and decalcified in Osteosoft (101728; Merck Millipore; Saint-Quentin Fallavier; France) for 3 weeks. Blocks were cryo-protected in 30% sucrose. Cryo-sectioning (12 μ m) was performed in coronal sections of the nasal cavity, perpendicular to the hard palate in order to examine the vomeronasal organ (VNO), olfactory epithelium (OE), Steno's gland and olfactory bulb. Sections were stored at -80 °C until use.

Non-specific staining was blocked by incubation with 2% bovine serum albumin (BSA) and 0.05% Tween. The sections were then incubated overnight with primary antibodies directed against SARS nucleocapsid protein (1/500; mouse monoclonal; clone 1C7C7; Sigma-Aldrich), ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba1) (1/500; rabbit monoclonal; clone EPR16588; Abcam), myeloperoxidase protein (MPO) (1/500; rabbit monoclonal; clone EPR20257; Abcam), CD68 (1/200; rabbit polyclonal; PA1518; Boster), cleaved caspase 3 (C3C) (1/200; rabbit polyclonal; #9661; Cell signaling), G_{olf} (1/300; rabbit polyclonal; C-18; Santa Cruz), Olfactory Marker Protein (OMP) (1/500; goat polyclonal; 544-10001; Wako) and CK18 (1:50; mouse polyclonal; MAB3234—RGE53, Sigma-Aldrich). Fluorescence staining was performed using goat anti-mouse-A555; goat anti-rabbit-A488 and donkey anti-goat-A546 (1/800; Molecular Probes A21422; A11056; A11008, respectively; Invitrogen).

Images were taken using a 1X71 Olympus microscope equipped with an Orca ER Hamamatsu cooled CCD camera (Hamamatsu Photonics France; Massy; France) or with a Zeiss LSM 700 confocal 187 microscope for cleaved caspase 3 co-staining with either OMP or CK18 experiment and MPO co-staining with Hoechst stained multi-lobal nuclei (MIMA2 Platform, INRAe). Whole section images were reconstructed from 3 images taken at $\times 50$ magnification using a Leica MZ10F Fluorescent binocular microscope. We used these images to display the level of infection revealed by TRITC fluorescence. As this binocular did not possess any UV filter to display Hoechst fluorescence, we used the FITC channel green autofluorescence to display the turbinates structures.

To assess olfactory epithelium damage, we scored the integrity of the OE from 1 to 9 based on Hoechst staining according to missing nuclei area, irregularity of the OE structure and increased distance between nuclei indicating loosening of the epithelium leading to desquamation (Supp. Fig. 1). To evaluate the correlation of apoptosis and innate immune cell presence with damage, OE areas were divided in two groups: undamaged areas (damage score equal to 1 or 2) and damaged areas (damage score between 5 and 9). Apoptosis level, infiltration of immune cells in the OE and its underlying lamina propria were quantified as the percentage of the area positive for C3C (cleaved caspase 3); Iba1 (macrophages/microglia), CD68 (activated bone-marrow-derived macrophages) and MPO (neutrophils). For each animal, the percentage of stained OE was averaged over 4 distinct areas in the beginning of olfactory turbinates at 1 dpi and in the medial part of the nasal cavity containing Steno's gland and NALT at 2 dpi.

In cyclophosphamide and in IcatC_{XPZ-01} experiments, we performed both IHC and classical hematoxylin and eosin (HE) staining as described previously [42]. We examined two independent sections of nasal turbinates (separated by 500 μ m) in the middle of the nasal cavity containing NALT and Steno's gland. For each section, we measured the total infected area of the OE, the area of desquamated cells in the lumen (based on Hoechst nuclear staining) and the percentage of infected desquamated cells in the lumen (based on N protein immunostaining). These experiments were designed to measure the global damage of the OE following SARS-CoV-2 infection when neutrophil action was impaired. At 2 dpi, the level of neutrophil infiltration was so high that complete quantification could not be achieved. Instead, we set a global score from 1 to 9 of ¹/OE damage based on the integrity of the OE and ²/neutrophil infiltration based on the overall presence of MPO signal in nasal mucosa and in nasal cavity lumen. We verified that our scoring system and total quantification gave similar results for MPO⁺ cells presence at 1 dpi where infection is restricted to the most ventro rostral part of the nasal turbinates.

All quantifications were made with ImageJ (Rasband, W.S., ImageJ, US National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997–2012) to threshold specific staining and performed blindly of the treatment.

RNA extraction and RT-qPCR analysis

Total RNA was extracted from frozen nasal turbinates using the Trizol-chloroforme method as described previously [43]. Oligo-dT first strand cDNA synthesis was performed from 5 µg total RNA with iScript Advance cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (BioRad; #1725038) following manufacturer's recommendations. qPCR was carried out using 125 ng of cDNA added to a 15 µL reaction mix. This reaction mix contained 10 µL iTaq Universal Sybr Green SuperMix (BioRad; #1725124), and primers at 500 nM (sequences in Supp Table 1). The reaction was performed with a thermocycler (Mastercycler ep Realplex, Eppendorf). Fluorescence during qPCR reaction was monitored and measured by Realplex Eppendorf software. A dissociation curve was plotted at the end of the forty amplification cycles of the qPCR to check the ability of these primers to amplify a single and specific PCR product.

Quantification of initial specific RNA concentration was done using the $\Delta\Delta C_t$ method. Standard controls of specificity and efficiency of the qPCR were performed. The mRNA expression of each gene was normalized with the expression level of G3PDH. A correction factor was applied to each primer pair according to their efficiency [44].

Measure of antiviral activity of cyclophosphamide and cathepsin C inhibitor against SARS-CoV-2 in cell culture

Vero E6 cells (CRL-1586, ATCC maintained at 37 °C; 5% CO₂) were seeded at 2.10⁴ cells per well in a 96-well plate in Dulbecco's Modified Eagle's Medium, 5% fetal bovine serum (FBS-12A, Capricorn Scientific, Clinisciences). For cyclophosphamide antiviral activity evaluation, cells were treated with 0.15 mg/mL (corresponding to the maximum dose potentially present in hamsters) or 0.45 mg/mL cyclophosphamide diluted in sterile PBS. For IcatC_{XPZ-01} antiviral activity evaluation, cells were treated with 4.5 µg/mL (corresponding to the maximum dose potentially present in hamsters) or 13.5 µg/mL IcatC_{XPZ-01} diluted in 10% dextrin, citrate buffer 50 mM, pH = 5. Cells were treated with PBS as control ($n = 6$ for each condition) and molecule cytotoxicity was tested as well without infection at the highest used concentration. All treatments were started one hour prior to infection with SARS-CoV-2 strain France/IDF0372/2020 at 5 × 10³ pfu per well diluted in DMEM, 10% fetal bovine serum. Loss of cell viability reflecting the efficiency of viral

infection was measured 3 days after infection by adding 100 µL Cell Titer-Glo reagent to each well (CellTiterGlo Luminescent Cell Viability Assay, Promega #G7571), according to the manufacturer's protocol. Cell luminescence of each well was then quantified using an Infinite M200Pro TECAN and normalized to the control condition.

Statistical analysis

All comparisons were made using Prism 5.0 (GraphPad). Statistical significance between groups was assessed using nonparametric Mann–Whitney tests. For correlation analyses, we used Spearman nonparametric test. Error bars indicate the SEM. Detailed information on statistical test used, sample size and P value are provided in the figure legends.

Results

Apoptosis occurs after cell desquamation following SARS-CoV-2 infection of the olfactory epithelium

We previously observed that as soon as two days following nasal instillation of SARS-CoV-2 in Syrian gold hamsters, the sustentacular cells of the OE were massively infected along with strong cellular loss and cellular debris filling the lumen of the nasal cavity [14]. In order to understand the events leading to this desquamation, we chose to focus on the early stages of infection at 1 and 2 dpi. To evaluate the importance of apoptosis in the damage of the OE following SARS-CoV-2 infection, we measured the level of cleaved caspase 3 signal in uninfected animals, and in infected zones of the OE that were either intact or damaged (Fig. 1). Basal level of apoptosis occurring in the OE was not increased in either zone at 1 or 2 dpi (Fig. 1D). However, we observed a strong cleaved caspase 3 signal co-localizing partly with desquamated cell in the lumen of the nasal cavity. The cleaved caspase 3 signal in the lumen of the nasal cavity was increased 5- and 14-fold compared to the OE at 1 and 2 dpi, respectively, which was statistically significant at 2 dpi (Mann–Whitney, $p = 0.0286$) and nearly significant at 1 dpi ($p = 0.0525$). In order to examine the potential OE origin of the C3C positive cells, we performed double staining with cleaved caspase 3 and CK18 or OMP (specific markers of sustentacular cells and OSN, respectively). We observed that most apoptotic cells co-stained with OMP but not with CK18, indicating that OSN but not sustentacular cells undergo Caspase 3 apoptosis once released in the lumen of the nasal cavity (Supp. Fig. 2).

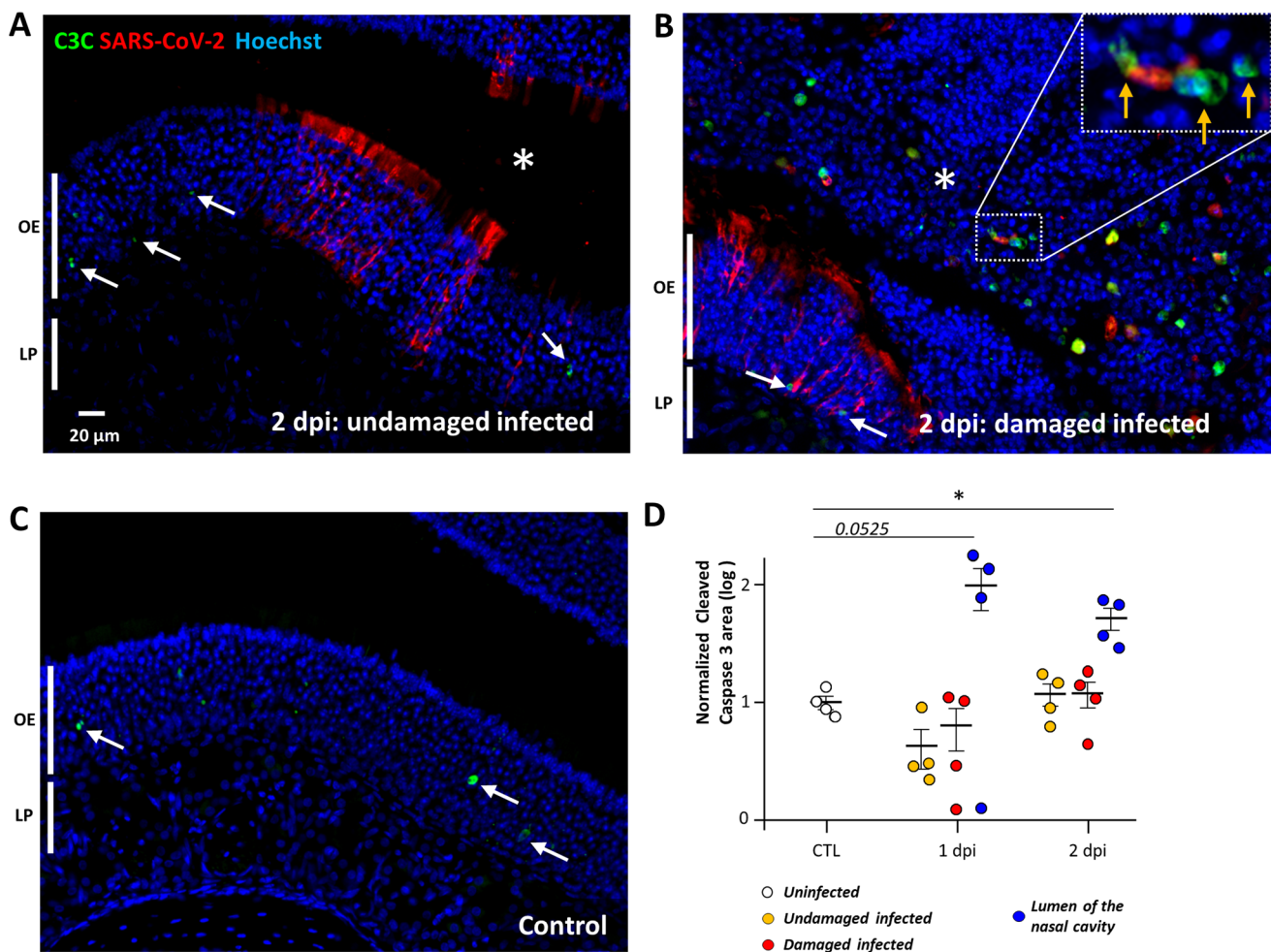


Fig. 1 Apoptosis occurs in desquamated cells in the lumen of the nasal cavity following SARS-CoV-2 infection but not in the olfactory epithelium. Representative images of an infected intact (**A**), infected damaged (**B**) area of the olfactory epithelium at 2 days post-infection (dpi) and in a control animal (**C**). Apoptotic cells in the olfactory epithelium are indicated by a white arrow (OE; olfactory epithelium/LP

lamina propria). The lumen of the nasal cavity is indicated by a white asterisk and is filled with cells, some of which colocalize in their nucleus cleaved caspase 3 signal (orange arrow). (**D**) Cleaved caspase 3 signal in the olfactory epithelium normalized to control (log₁₀, Mean ± SEM, $n=4$, $*p<0.01$ (Mann–Whitney test))

Damage of the infected olfactory epithelium is correlated with infiltration of innate immune cells

Since apoptosis does not significantly occur in the OE during the initial phase of infection, the desquamation of the infected OE may be related to immune cell infiltration [14, 15]. So far, the immune cells in the nasal cavity have been poorly characterized. Neutrophils and macrophages are known for their importance in clearing infected tissue [45], but only Iba1⁺ cells presence is well characterized in the OE [23]. Iba1⁺ cells are described as microglia/macrophages, but CD68 is more classically used as a marker of monocytes and macrophages [46]. Concerning neutrophils, the presence of neutrophil cytosol factor 2 (Ncf2; [47]) and myeloperoxidase (MPO) have been used successfully to characterize these cells in hamsters [48]. As MPO is only expressed

during neutrophil maturation in the bone marrow [49], we used Ncf2 as a marker of neutrophil presence by qPCR and MPO by immunohistochemistry.

We first evaluated at 1 dpi and 2 dpi by qPCR the expression of Iba1, CD68 and Ncf2 along with classical inflammatory markers (TNF α and IL6) and the presence of the virus (Supp. Fig. 3). At 1 dpi, SARS Nucleocapsid protein (SARS N) was already abundantly expressed in the OE at a similar level as at 2 dpi, and TNF α and IL6 transcripts increased gradually (Mann–Whitney, $p<0.05$). Iba1 and CD68 expression related to macrophage presence in the OE did not rise significantly at 1 dpi compared to control (Mann–Whitney, $p=0.164$ and 0.128 , respectively) but did at 2 dpi (Mann–Whitney, $p<0.05$). Concerning neutrophils, Ncf2 expression was strongly enhanced at 1 dpi and was still increasing at 2 dpi (Mann–Whitney, $p<0.05$). These

results suggest that neutrophils are already recruited at 1 dpi and that their recruitment continues at 2 dpi along with the arrival of Iba1⁺ and CD68⁺ cells.

We next focused on immunostaining to characterize the presence of Iba1⁺, CD68⁺ and MPO⁺ cells. In the OE of an uninfected hamster, Iba1⁺ cells were already present and mainly localized in the lamina propria while CD68 signal was absent (Fig. 2A), indicating that Iba1⁺ cells do not

express the classical CD68 marker of macrophages. This was confirmed in the infected areas of the OE where we observed a very different presence of Iba1⁺ and CD68⁺ cells. Iba1⁺ cells were massively present as soon as 1 dpi in the damaged parts of the infected OE as well as in the desquamated cells in the lumen of the nasal cavity. CD68⁺ cells were less abundant in the damaged part of the OE and mainly present in the desquamated cells filling the lumen of

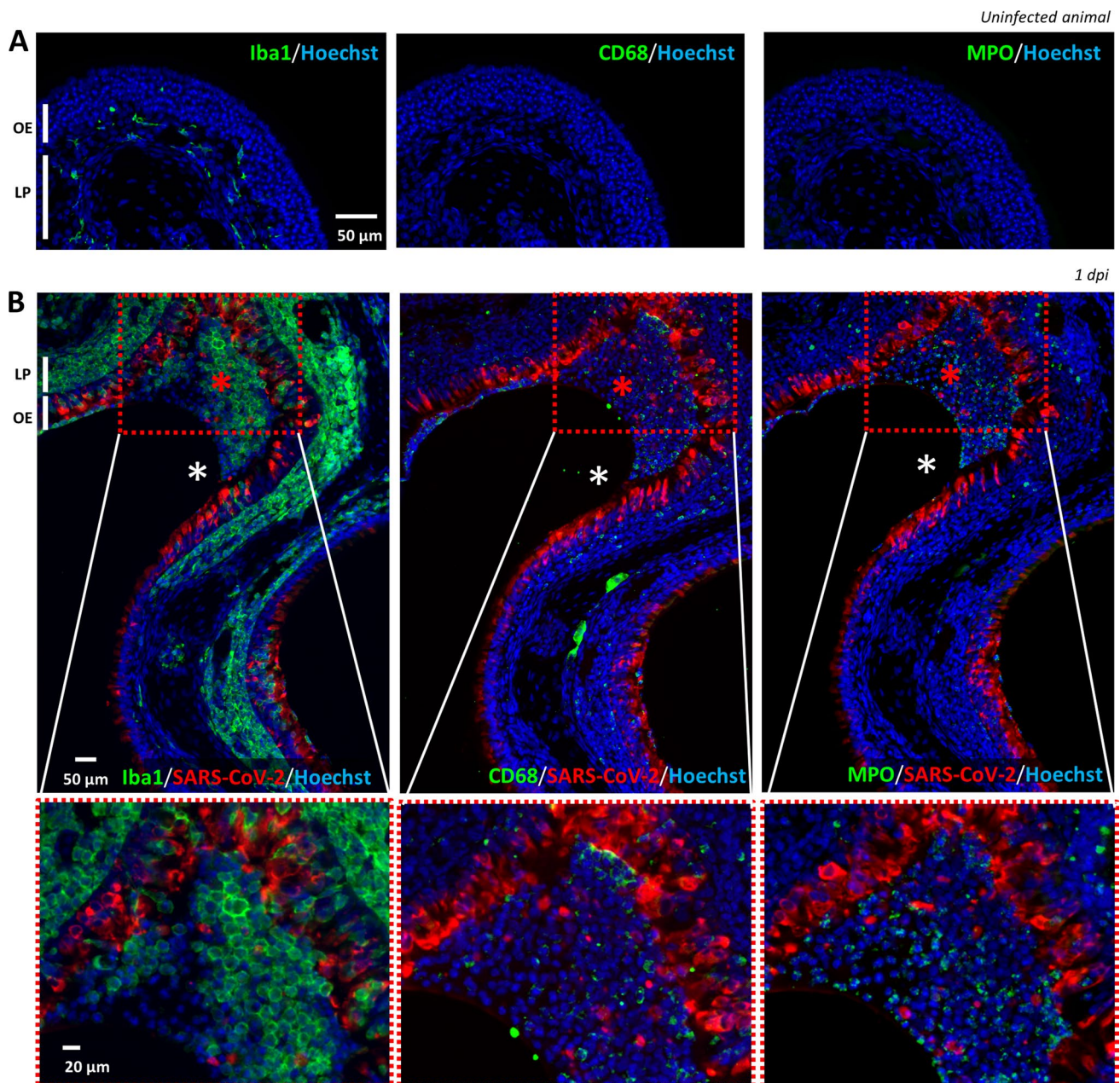


Fig. 2 Iba1⁺ (microglia/monocyte lineage), CD68⁺ (macrophages) and MPO⁺ (neutrophils) cells presence in the olfactory epithelium before and during SARS-CoV-2 infection. Immunostaining on successive slides of the olfactory epithelium from a non-infected (A) or 1 dpi hamster (B). Only Iba1⁺ cells are present in the uninfected olfac-

tory epithelium (OE) and in the lamina propria (LP). In the infected epithelium, Iba1⁺ cells are massively present in the OE while CD68⁺ and MPO cells are mostly present in the desquamated cells (red asterisk) in the lumen of the nasal cavity (white asterisk)

the nasal cavity (Fig. 2B). A double staining against Iba1 and CD68 of the desquamated cells in the lumen of the nasal cavity did not reveal any overlap of the two markers (Supp. Fig. 4), showing that Iba1⁺ cells do not express CD68 once they are located among the desquamated cells. Similar to CD68, MPO signal was absent in uninfected OE and appears during infection partly in the damaged OE and mainly in the lumen of the nasal cavity along with desquamated cells. The MPO⁺ cells possess typical multi-lobal nuclei characteristic of neutrophils (Supp. Fig. 5). Overall, these results show that Iba1⁺ cells are much more abundant in the infected OE than CD68⁺ macrophages and MPO⁺ neutrophils cells, both being mainly present in the desquamated cells filling the lumen of the SARS-CoV-2-infected nasal cavity.

If these innate immunity cells are involved in the desquamation of the OE, we should always observe their presence in the damaged infected area of the OE. To investigate their infiltration in the OE and its correlation with damage, we focused on three zones similarly as for apoptosis quantification: ¹/uninfected, infected ²/without or ³/with damage at 1 and 2 dpi. The infiltration level of Iba1⁺ cells in the OE was increased in the damaged infected zone but not in the undamaged one (Fig. 3). This difference was statistically significant at 2 dpi (Mann–Whitney, $p=0.0286$) and nearly significant at 1 dpi ($p=0.0525$). The infiltration of these cells was similarly increased in the lamina propria underneath the previous OE zones with a significant difference at 2 dpi ($p=0.0286$). We observed a significant correlation between the damage of the OE and their presence in both the OE and the underlying lamina propria (Spearman test, $p=0.0098$ and 0.0006 , respectively).

We similarly examined whether the presence of CD68⁺ macrophages and MPO⁺ neutrophils in the OE was associated with the damage of the OE after SARS-CoV-2 infection. Both CD68 and MPO signals were increased in the damaged infected zone but not in the undamaged one (Fig. 4). This difference was statistically significant in the infected damaged zones at 1 and 2 dpi for both markers compared to control and infected undamaged zones of the OE and lamina propria (Mann–Whitney, $p<0.05$). We observed a significant correlation between the damage of the OE and the presence of both CD68⁺ and MPO⁺ cells in the OE and the lamina propria (Spearman test, $p<0.001$).

Neutropenia reduces damage of the OE related to SARS-CoV-2 infection as well as OE infected area

Neutrophils are the main actors of damage to the olfactory epithelium during Poly(I:C)-induced inflammation [50]. We therefore evaluated whether a neutropenic treatment based on cyclophosphamide would reduce the damage induced by SARS-CoV-2 infection in the OE. Such treatment causes apoptosis of bone-marrow-derived cells and has previously

been used successfully on hamsters to induce neutropenia [48]. We first monitored in control animals how the treatment impacts circulating immune cells. Neutrophils population was decreased by ~tenfold, lymphocytes were also decreased by ~threefold, and monocytes by ~fivefold (Supp. Fig. 6A). Since cyclophosphamide can impact basal cell proliferation and thus OE structure, we examined its effect in uninfected animals and did not observe any evident damage on the OE structure (Supp Fig. 6B). We next examined the impact of this treatment on the expression of genes related to the innate immune system in the nasal turbinates during SARS-CoV-2 infection. At 1 dpi, the expression of Iba1 and CD68 was not statistically different between vehicle and cyclophosphamide treated animals but a decrease of Ncf2 expression reflecting a reduced presence of neutrophils almost reached significance (Mann–Whitney; $p=0.0571$; Fig. 5A). We observed a tendency of TNF α and IL6 expression reduction which did not reach significance either ($p=0.1143$). Despite the overall tendency of a decrease of innate immune system response at 1 dpi, the level of SARS-CoV-2 infection reflected by N protein expression was decreased and the difference almost reached significance ($p=0.0571$). At 2 dpi, the expression of all genes related to innate immune cell presence as well as TNF α was decreased ($p<0.05$). We examined histologically the neutrophil presence, damage, level of infection in the OE (Fig. 5B, C and Supp. Figs. 6C, 7). MPO signal was significantly decreased at 1 dpi in the OE of cyclophosphamide treated animals compared to control ($p<0.05$) (Fig. 5D₁). The damage in the OE was significantly decreased at 1 and 2 dpi ($p<0.01$ and $p<0.05$, respectively) (Fig. 5D₂ and Supp. Figs. 8, 9). The reduction tendency of the virus presence measured by the N protein expression was confirmed by immunostaining in the OE at 1 dpi only ($p<0.05$; Fig. 5D₃) and seems specific to the OE as the infection of the Steno's gland epithelium lining the maxillary sinus was similar in both conditions (Supp. Fig. 8). We hypothesize that this reduction could be linked to less infected desquamated cells released into the lumen of the nasal cavity following the OE damage induced by the neutrophils. We thus quantified the area of desquamated cells in the lumen which was significantly decreased at 1 dpi and almost reached significance at 2 dpi (Fig. 5D₄; $p<0.001$ and $p=0.0905$, respectively). In the desquamated cells of the lumen, the percentage of infected cells was significantly diminished at 1 dpi (Fig. 5D₅; $p<0.001$) but not at 2 dpi when infected desquamated cells were in the lumen of the nasal cavity in some treated animals (Supp Fig. 6C). Since the reduction of OE infected area of immunocompromised animal was unexpected, we verified that a dose three times higher than the maximum dose of cyclophosphamide potentially present in the hamsters during infection did not limit the virus replication in vitro (Supp. Fig. 10A, C).

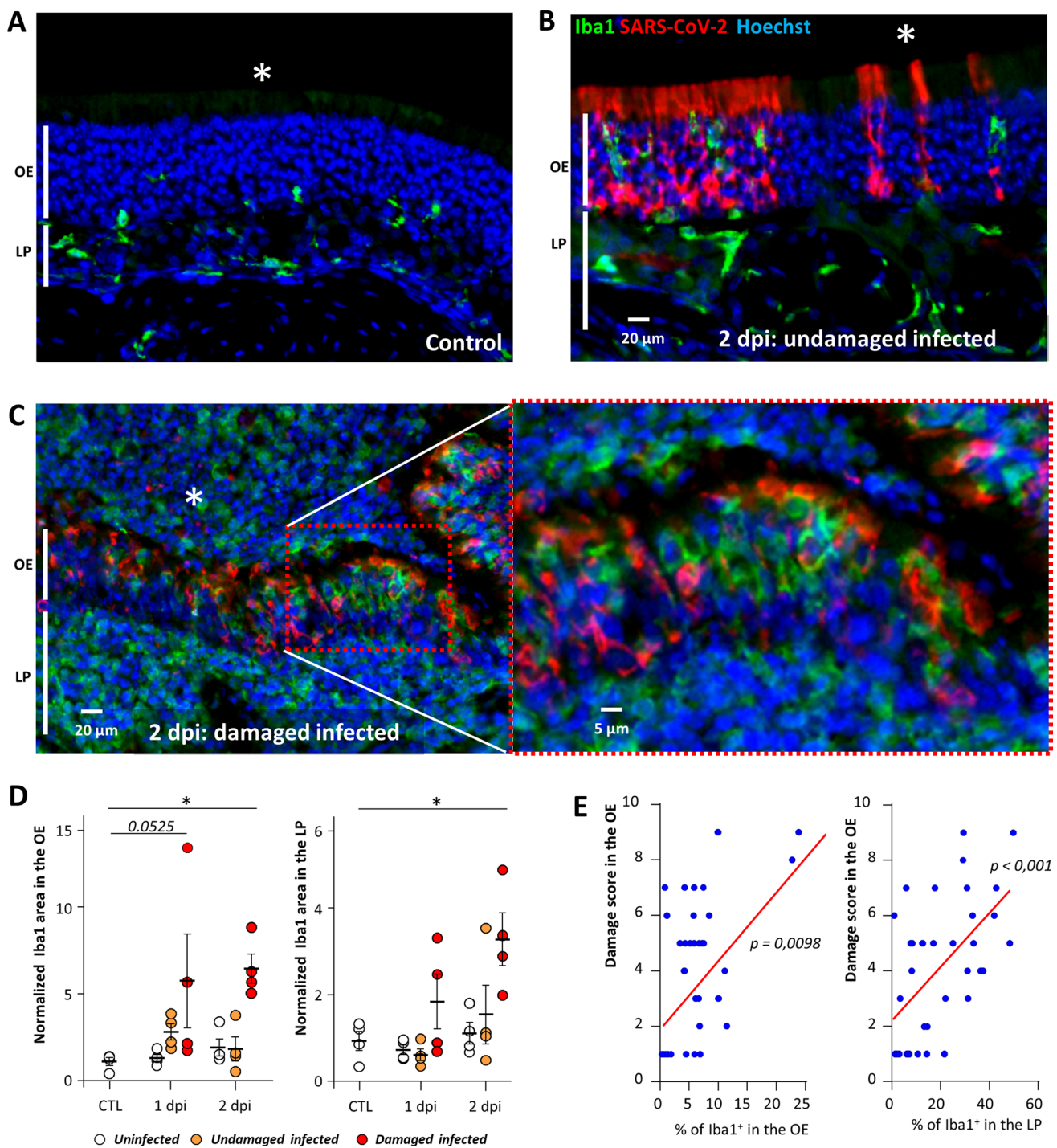


Fig. 3 Iba1⁺ cell infiltration increases with the damage in the OE. Representative images of the olfactory epithelium from an uninfected animal (A), infected but undamaged (B) and infected and damaged (C) area of the olfactory epithelium (OE) at 2 days post-infection (dpi). The lumen of the nasal cavity is indicated by a white asterisk. (D) Iba1⁺ signal in the olfactory epithelium (OE, left) and lamina

propria (LP, right) in control animals (CTL) or at 1 or 2 dpi (Mean normalized to control \pm SEM, $n = 4$, $*p < 0.01$ (Mann–Whitney test)). (E) Correlation between score damage of the olfactory epithelium and the percentage of Iba1⁺ signal in the olfactory epithelium (left panel) and the lamina propria (right panel). Spearman test p value

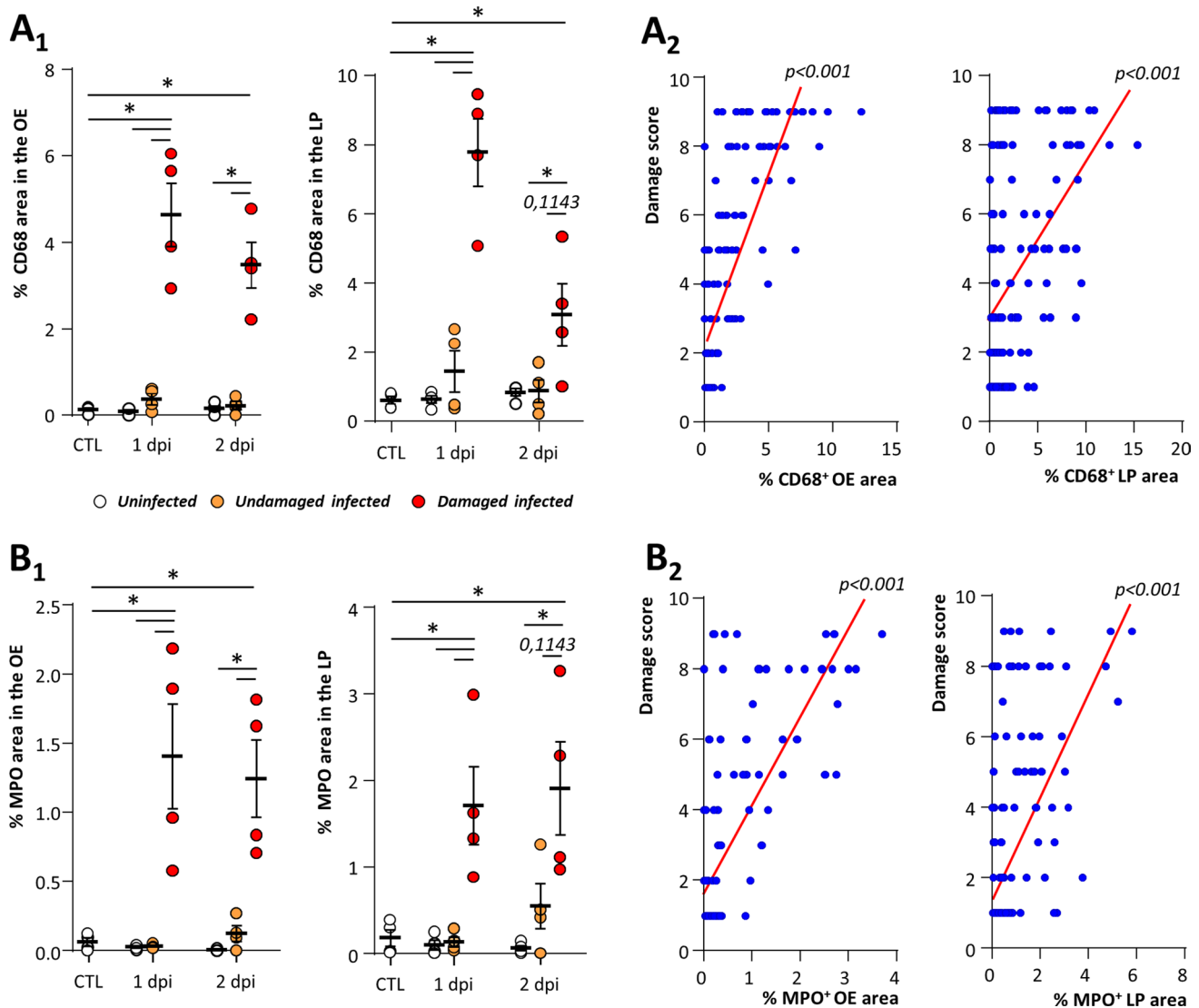


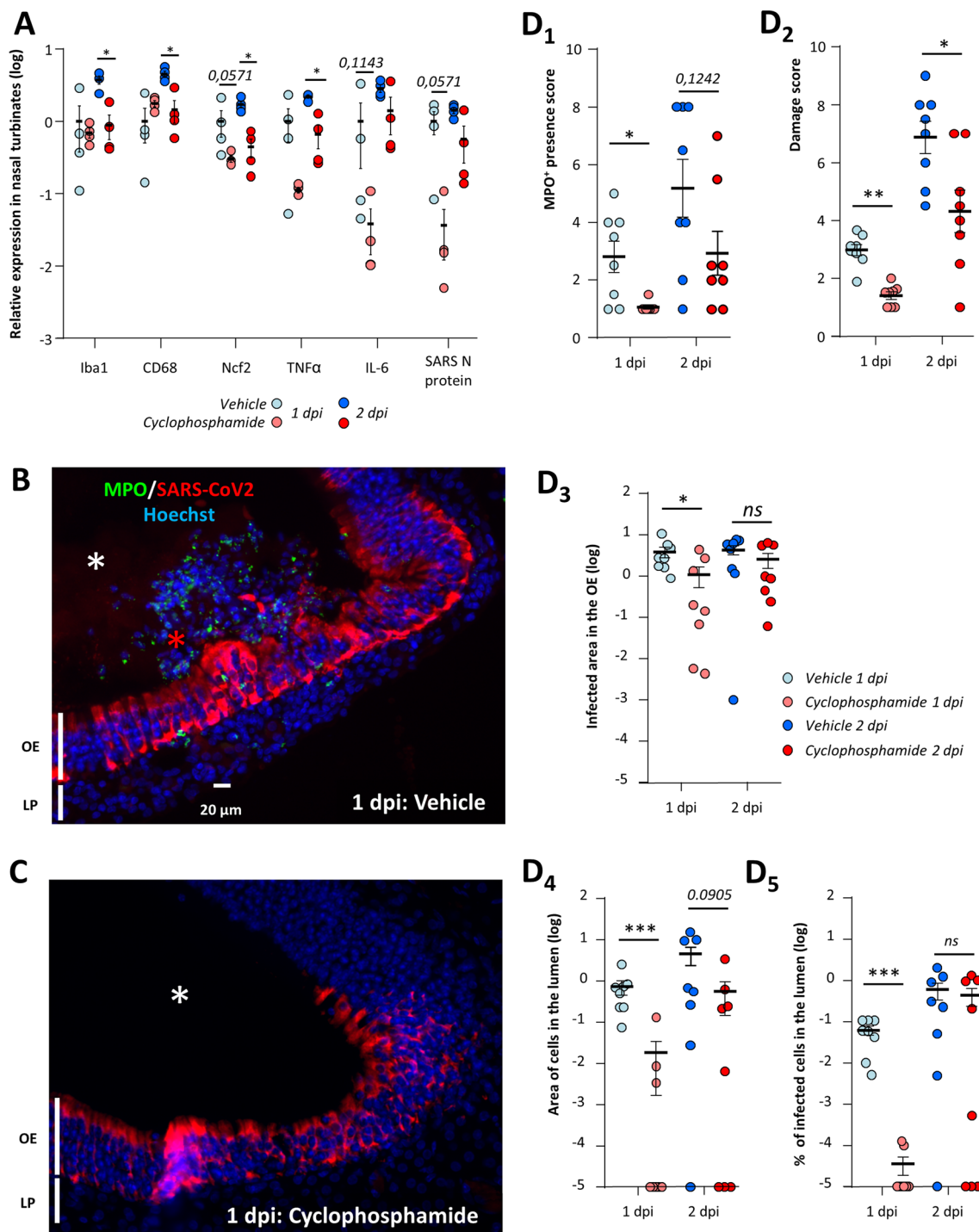
Fig. 4 CD68⁺ macrophage and MPO⁺ neutrophil cells are associated with damage of the olfactory epithelium during SARS-CoV-2 infection. CD68⁺ (**A₁**) and MPO⁺ (**B₁**) signal in the olfactory epithelium (OE, left) and lamina propria (LP, right) in either control animals (CTL) or at 1 or 2 days post-infection (dpi) (Mean normalized

to control \pm SEM, $n=4$, $*p<0.05$ (Mann–Whitney test)). Correlation between score damage and percentage of CD68⁺ (**A₁**) and MPO⁺ (**B₁**) signal in the olfactory epithelium (left panel) and the lamina propria (right panel). Spearman test p value

Inhibition of neutrophil proteinases reduces damage of the OE related to SARS-CoV-2 infection as well as infected OE area

In order to confirm our results on cyclophosphamide treatment which affects immune cells other than neutrophils, we treated animals with an inhibitor of cathepsin C (IcatC_{XPZ-01}) which is essential for the maturation of elastase-like proteinases of neutrophils. This inhibitor has been used successfully to almost completely eliminate the elastase-like activity of neutrophils in vivo [41]. We chose to focus on the histological impact of IcatC_{XPZ-01} treatment at 1 dpi as it gave the most significant results during cyclophosphamide treatment.

The inhibition of elastase-like proteinases of neutrophils gave similar results as cyclophosphamide with the exception of some limited neutrophil infiltration in the infected OE (Fig. 6A, B). Globally, the MPO⁺ neutrophil presence in the nasal turbinates and the damage in the infected area of the OE were significantly reduced compared to vehicle treated animals (Fig. 6C₁ and Supp. Figs. 11 and 12; Mann–Whitney; $p<0.01$). We also observed significantly less desquamated cells in the lumen of the nasal cavity which were also less infected (Fig. 6C₂; Mann–Whitney; $p<0.01$). Since we observed again that the inhibition of neutrophil action limited SARS-CoV-2 presence in the OE, we verified that a dose three times higher than the maximum



dose of IcatC_{XPZ-01} potentially present in the hamsters during infection did not impair the virus replication in vitro (Supp. Fig. 10B, C). We also observed that the reduction of SARS-CoV-2 infection by IcatC_{XPZ-01} was specific to the OE as the infection of Steno's gland epithelium was not affected in presence of cathepsin C inhibitor (Supp. Fig. 11).

Discussion

The anosmia induced by SARS-CoV-2 infection is now clearly linked to the infection of the olfactory epithelium with a main tropism for sustentacular cells [18, 51]. We and others have observed that following this infection, the OE undergoes massive damage leading to cell desquamation and

Fig. 5 Immunosuppression induced by cyclophosphamide reduces damage of the olfactory epithelium as well as OE infection area. **(A)** Expression of innate immune genes in the nasal turbinates with or without cyclophosphamide treatment at 1 and 2 days post-infection (dpi). Iba1, CD68 and Ncf2 are related to the presence of microglia/macrophages, monocytes/macrophages and neutrophils, respectively; TNF α and IL6 are two cytokines expressed during inflammation; SARS-CoV-2 N expression is related to the SARS-CoV-2 infection. Results represent the Mean \pm SEM relative to vehicle-treated hamsters ($n=4$, $*p<0.05$; Mann–Whitney test). Representative images of the infected olfactory epithelium immunostained for MPO (neutrophil marker) and SARS-CoV-2 N protein in **(B)** vehicle and **(C)** cyclophosphamide treated animal (olfactory epithelium (OE), lamina propria (LP)). In the vehicle condition, the lumen (white asterisk) is filled with desquamated cells (red asterisk) containing MPO signal. In the cyclophosphamide condition, MPO signal is absent and the lumen is mostly free of cellular debris. Quantification in the OE of **(D₁)** MPO $^+$ neutrophil presence **(D₂)** damage score **(D₃)** SARS-CoV-2-infected area and in the lumen of the nasal cavity of **(D₄)** desquamated cells area and **(D₅)** percentage of SARS-CoV-2-infected area in the desquamated cells (Mean \pm SEM, $n=8$ areas of the nasal cavity from 4 different animals, $*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$ (Mann–Whitney))

cellular debris filling the lumen of the nasal cavity [14, 21, 22], but the mechanism of this destruction is less clear.

Several studies reported an increase in apoptosis especially in olfactory sensory neurons [20–22] and assumed that it led to the destruction of the OE. Here, we first examined the apoptosis level based on cleaved caspase 3 level in the OE of uninfected animals and infected areas of the OE, either intact or damaged. If apoptosis initiates the desquamation process then it should increase in the damaged areas of the OE. However, we observed a similar level of apoptosis level in all these areas (Fig. 1D), which was consistent with the basal level of apoptosis that we previously measured in adult mice and rats OE [42, 52]. While the apoptosis in the infected damaged OE was low, we observed an increased level of apoptosis in cells present in the lumen of the nasal cavity. The discrepancy with previous studies may be due to different models as some were performed using transgenic mice expressing hACE2, but it should be noted that these studies did not perform any quantification and observed as well apoptosis staining in the lumen of the nasal cavity [22]. We observed that most apoptotic cells co-stained with OMP specifically expressed by mature OSNs but not CK18 specific of sustentacular cells (Supp Fig. 2B), indicating that the OSNs undergo C3C-linked apoptosis once released in the lumen of the nasal cavity. The induction of apoptosis by loss of cell contact is well described [53], a phenomenon known as anoikis [54] and observed in human airway epithelial cells during SARS-CoV-2 infection [55]. Desquamated cells in the OE may thus be sufficiently preserved to be able to enter apoptosis after the desquamation process is initiated following OE SARS-CoV-2 infection. The C3C-linked apoptosis may also be related to inflammation as well described for SARS-CoV-2 infection [56]. The remaining cells ongoing

apoptosis in the lumen may be immune cells as described during SARS-CoV-2 infection [57] and further experiments are required to identify them.

Since we previously observed that the infected area of the OE is infiltrated by immune cells [14], we next explored whether innate immune cells are involved in this process, especially macrophages and neutrophils known to be involved in damage of epithelial cells during acute inflammation [30, 31, 58]. If so, we should systematically observe their presence in the damaged area of the OE. We first characterized the presence of these cells in the infected OE (Fig. 2). We observed that CD68, a classical marker of macrophages [46], was expressed in a different population than Iba1 $^+$ cells previously described as a microglia/macrophages cellular population [26]. We observed a continuum of Iba1 $^+$ cells staining in the OE and in the olfactory bulb similarly as others [59], indicating that they may be more related to microglia than activated macrophages but they require further phenotyping. In the following, we will thus distinguish Iba1 $^+$ cells and macrophages as CD68 $^+$ cells to avoid confusion between these two cells types. Immunostaining revealed that at 1 dpi, some parts of the OE in the most rostral part of the nasal cavity were already significantly damaged. We observed that in the infected and damaged area of the OE, Iba1 $^+$ cells were mainly recruited while macrophages and neutrophils appeared in the zones desquamating toward the lumen of the nasal cavity. While our qPCR results indicate that neutrophils are recruited more abundantly at 1 dpi than Iba1 $^+$ cells and macrophages (Supp. Fig. 3), we observed that contrary to macrophages and neutrophils, Iba1 $^+$ cells are already present in the lamina propria of uninfected zones and are rapidly gathering in the infected part of the OE (Fig. 3). The basal presence of Iba1 $^+$ cells in the lamina propria could explain the apparent discrepancy between qPCR and immunohistochemistry results. Indeed, at the beginning of infection, the increase of Iba1 $^+$ cells could simply arise from infiltration of adjacent cells in the nasal turbinates, while macrophages and neutrophils may migrate from the blood following chemotaxis. We can thus hypothesize that Iba1 $^+$ cells are first infiltrating the SARS-CoV-2-infected OE. Similarly, Iba1 $^+$ microglia are recruited around infected cells of the central nervous system within hours [27], which is consistent with our observation in the OE. Further studies are required to decipher the origin and specific role of these three cells population during the early events of SARS-CoV-2 infection in the infected nasal turbinates.

Neutrophils are known to induce epithelial damage and an elegant study demonstrated their major role during Poly(I:C) (an artificial double-stranded RNA agonist of TLR3 receptor) nasal instillation leading to damage of the OE [50]. In order to evaluate the importance of the neutrophils in the damage induced by SARS-CoV-2, we first induced neutropenia based on cyclophosphamide treatment successfully used

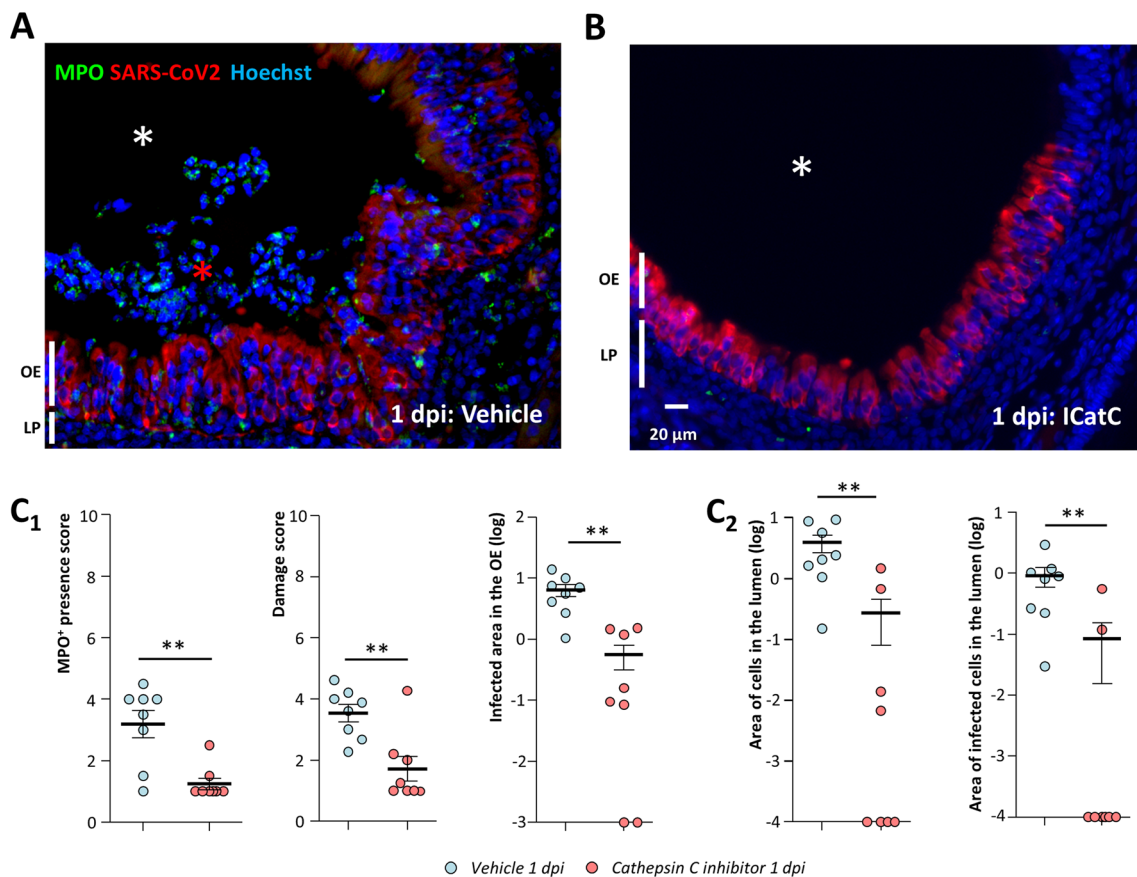


Fig. 6 Inhibition of neutrophil proteinases reduces damage of the olfactory epithelium as well as infected area. Representative images of the infected olfactory epithelium immunostained for MPO (neutrophil marker) and SARS-CoV-2 N protein in (A) vehicle and (B) cathepsin C inhibitor (IcatC_{XPZ-01}) treated animal (olfactory epithelium (OE), lamina propria (LP)). In the vehicle condition, the lumen (white asterisk) is filled with desquamated cells (red asterisk) containing MPO signal. Under cathepsin C inhibition, MPO signal is less

abundant and the lumen is mostly free of cellular debris. Quantification (C₁) in the OE of MPO⁺ neutrophil presence; damage score; SARS-CoV-2-infected area and (C₂) in the lumen of the nasal cavity of desquamated cell area and percentage of SARS-CoV-2-infected area in the desquamated cells (Mean ± SEM, $n=8$ areas of the nasal cavity from 4 different animals, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ (Mann–Whitney test))

in hamsters [48]. We confirmed that such treatment mainly affects neutrophils but also reduced to a lesser degree other leucocyte populations (Fig. 5A). As expected such treatment reduced neutrophil infiltration in infected areas of the OE and we observed that damage of the infected OE was significantly reduced as well (Fig. 5D₁, D₂). In order to confirm the role of neutrophils in the damage of the OE following SARS-CoV-2 infection, we treated hamsters with an inhibitor of cathepsin C (IcatC_{XPZ-01}) specifically reducing the neutrophil elastase-like proteinases activity [60]. We observed that similar to cyclophosphamide treatment, the damage of the OE was greatly reduced in this context (Fig. 6C₁). Surprisingly, the global infiltration of neutrophils was reduced as well, even though we observed that some neutrophils were still present in the most infected area of the OE. Since neutrophils are mainly present among the desquamated cells present in the lumen of the nasal cavity, the reduction in

neutrophil infiltration during IcatC_{XPZ-01} treatment may be linked to a decrease in the OE damage as elastase-like proteinase action increases inflammation [61]. It suggests that the damage of the OE initiated by neutrophils may participate in the increase in infiltration of neutrophils leading *in fine* to massive damage of the infected OE areas. Additionally, part of the damage of the OE could simply reflect the destruction of sustentacular cells by SARS-CoV-2 as the treatments on neutrophils that we used were not sufficient to completely eliminate neutrophils or their proteases activity. Overall, these results show that neutrophils have a major causative role in the destruction of the OE following SARS-CoV-2 infection by releasing elastase-like proteinases. Iba1⁺ cells and macrophages seem clearly to be involved as well as they are recruited during the event leading to the damage of the infected OE. Our results with histochemistry show that Iba1⁺ cells arrive earlier than neutrophils and macrophages.

Iba1⁺ cells could be involved in the initial events leading to the damage of the OE as well as phagocytosis. However, their importance in the OE damage should be much lower than neutrophils. Indeed, in the CP treatment which did not impact Iba1⁺ cell presence in the OE at 1 dpi, we still observed a ~threefold OE damage reduction with only partial inhibition of neutrophils. In the central nervous system, Iba1⁺ cells are essential to trigger innate immunity response [28]. We can thus hypothesize that Iba1⁺ cells may play a chemo-attractive role for macrophages and neutrophils in the infected area of the OE. Further experiments are required to decipher their precise importance in the event leading to OE damage following SARS-CoV-2 infection.

We observed that at 1 dpi, the level of SARS-CoV-2 infection was reduced in cyclophosphamide and IcatC_{XPZ-01}-treated hamsters (Figs. 5D₃ and 6C₁). Such a result was unexpected as neutrophils should effectively destroy infected cells and thus their action should reduce infection progression. We observed that these treatments did not impair SARS-CoV-2 replication in the Steno's gland epithelium and in vitro at a dose three times higher than the maximum dose potentially circulating in hamsters during infection (Supp. Fig. 10). As both treatments act on neutrophils, we thus hypothesize that neutrophils damage of the infected OE may have a counterproductive effect by releasing infected cells into the lumen of the nasal cavity. These infected cells could allow the virus to spread more easily in the OE as it was recently observed in human airway epithelial cells during SARS-CoV-2 infection [55]. This process

may also be enhanced by the recently demonstrated impairment of mucociliary clearance during SARS-CoV-2 infection [62]. Such a hypothesis is consistent with our results, showing that cyclophosphamide and IcatC_{XPZ-01} treatment significantly reduced the amount of infected desquamated cells filling the lumen of the nasal cavity (Figs. 5D₄, D₅ and 6C₂). The shedding of SARS-CoV-2 by release of damaged infected cells has been observed recently in vitro in respiratory epithelial cell culture where infection is enhanced in the presence of neutrophils [63]. In this preliminary study, SARS-CoV-2 alone did not significantly increase cytokine production but the neutrophil presence did, showing a major role of the neutrophils in the epithelial response to SARS-CoV-2 infection. In our study, at 2 dpi, the cyclophosphamide treatment inducing neutropenia was less effective than at 1 dpi to prevent OE damage related to SARS-CoV-2 infection (Fig. 5D₂). As the neutropenia was only partial, the remaining neutrophils may be more effectively recruited when infection progresses (Fig. 5D₁) showing the strong ability of SARS-CoV-2 infection in the OE to recruit innate immune cells.

Overall, our results show that the SARS-CoV-2 infection does not directly induce the massive damage of the OE but that neutrophils play a major role by releasing elastase-like proteinase in the infected OE. This probably leads to the destabilization of the OE structures and shedding of infected cells. In the early phase of the infection, the shedding of infected cells could enhance the virus spread in the OE (Fig. 7). We observed damaged areas of the OE as soon as 1

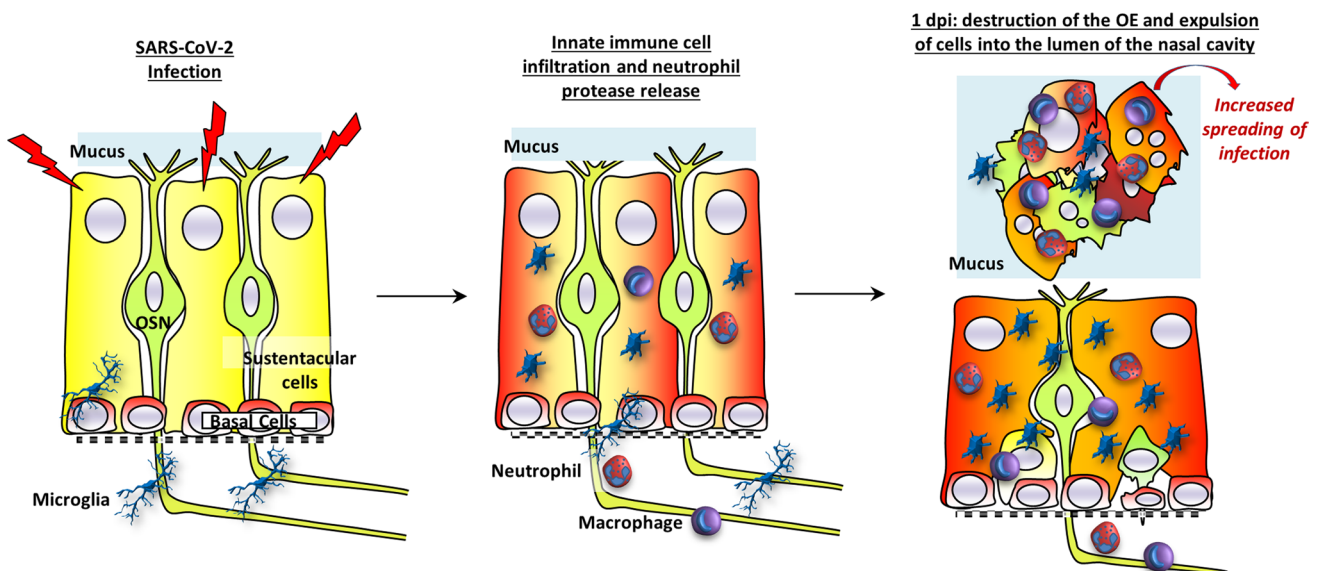


Fig. 7 Model of innate immune cell signaling leading to olfactory epithelium desquamation. The olfactory epithelium is mainly composed of olfactory sensory neurons (OSN) surrounded by supporting cells (sustentacular cells) and basal cells able to regenerate all cell types of the epithelium. During the infection of sustentacular cells (turning red), Iba1⁺ cells become activated and infiltrate the olfactory

epithelium followed by neutrophils and macrophages. Neutrophils release elastase-like proteinase leading to destabilization of the epithelium structures and the expulsion of cells including non-infected neurons into the lumen of the nasal cavity. The release of infected cells may contribute to an increased spreading of the virus in the OE

dpi, indicating that the innate immune system is extremely efficient in detecting SARS-CoV-2-infected cells to destroy them. The signal triggering this very fast action remains to be explored. The host's immune defense system that may be present to prevent pathogen invasion from the nose to the brain seems beneficial for SARS-CoV-2 to achieve a much more extensive infection of the OE than any previous virus, resulting in unprecedented olfactory dysfunction in the COVID-19 pandemic.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04643-1>.

Acknowledgements We would like to thank all VIM members for their helpful discussion, Christopher von Bartheld and Birte Nielsen for improvement of the manuscript, Dr Pierre Deshuillers from the BioPole platform of the National Veterinary School of Alfort for hamsters' blood count, and all the people from the PRBM platform of ENVA who helped us in the BSL3 animal facility. We would also like to thank Bertrand Bryche, Georges Saade, Mustapha Si-Tahar, Laëtitia Merle and Déborah Diakite for their helpful discussion and technical help.

Author contribution NM and CB were involved in conceptualization; CB, ASA, OAG, BDC, RD, BK, BK, SLP, and NM helped in investigation; CB and NM contributed to formal analysis; NM and CB helped in writing with input from all authors.

Funding NM is supported by INRAe SA department and ANR (Grant CORAR). CB is supported by the "DIM One Health." BK is supported by the "Région Centre Val de Loire (Project Pirana).

Availability of data and material Data will be made available on reasonable request, not applicable for material.

Declarations

Conflict of interest All authors do not have conflict of interest.

Ethics approval and consent to participate Not applicable.

Consent for publication Not applicable.

References

- Butowt R, Bilińska K, von Bartheld C (2022) Why does the omicron variant largely spare olfactory function? Implications for the pathogenesis of anosmia in COVID-19. *J Infect Dis*. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiac113>
- von Bartheld CS, Hagen MM, Butowt R (2020) Prevalence of chemosensory dysfunction in COVID-19 patients: a systematic review and meta-analysis reveals significant ethnic differences. *ACS Chem Neurosci*. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.0c00460>
- Vaira LA, De Vito A, Lechien JR et al (2021) New onset of smell and taste loss are common findings also in patients with symptomatic COVID-19 after complete vaccination. *Laryngoscope*. <https://doi.org/10.1002/lary.29964>
- Boscolo-Rizzo P, Menegaldo A, Fabbris C et al (2021) Six-month psychophysical evaluation of olfactory dysfunction in patients with COVID-19. *Chem Senses*. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjab006>
- Lechien JR, Chiesa-Estomba CM, Beckers E et al (2021) Prevalence and 6-month recovery of olfactory dysfunction: a multicentre study of 1363 COVID-19 patients. *J Intern Med*. <https://doi.org/10.1111/joim.13209>
- Renaud M, Thibault C, Le Normand F et al (2021) Clinical outcomes for patients with anosmia 1 year after COVID-19 diagnosis. *JAMA Netw Open* 4:e2115352. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2021.15352>
- Khan AM, Kallogjeri D, Piccirillo JF (2021) Growing public health concern of COVID-19 chronic olfactory dysfunction. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg*. <https://doi.org/10.1001/jamaoto.2021.3379>
- Meunier N, Briand L, Jacquín-Piques A et al (2021) COVID 19-induced smell and taste impairments: putative impact on physiology. *Front Physiol*. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.625110>
- Rebbholz H, Braun RJ, Ladage D et al (2020) Loss of olfactory function-early indicator for Covid-19, other viral infections and neurodegenerative disorders. *Front Neurol* 11:569333. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.569333>
- Schwob JE, Jang W, Holbrook EH et al (2017) Stem and progenitor cells of the mammalian olfactory epithelium: taking poetic license. *J Comp Neurol* 525:1034–1054. <https://doi.org/10.1002/cne.24105>
- Bilinska K, Jakubowska P, Bartheld CS, Butowt R (2020) Expression of the SARS-CoV-2 entry proteins, ACE2 and TMPRSS2, in cells of the olfactory epithelium: identification of cell types and trends with age. *ACS Chem Neurosci*. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.0c00210>
- Brann DH, Tsukahara T, Weinreb C et al (2020) Non-neuronal expression of SARS-CoV-2 entry genes in the olfactory system suggests mechanisms underlying COVID-19-associated anosmia. *Sci Adv*. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abc5801>
- Fodoulain L, Tuberosa J, Rossier D et al (2020) SARS-CoV-2 receptors and entry genes are expressed in the human olfactory neuroepithelium and brain. *iScience*. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101839>
- Bryche B, St Albin A, Murri S et al (2020) Massive transient damage of the olfactory epithelium associated with infection of sustentacular cells by SARS-CoV-2 in golden Syrian hamsters. *Brain Behav Immun* 89:579–586. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.06.032>
- Urata S, Kishimoto-Urata M, Kagoya R et al (2021) Prolonged and extended impacts of SARS-CoV-2 on the olfactory neurocircuit. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2021.11.04.467274>
- Storm N, Crossland NA, McKay LGA, Griffiths A (2022) Comparative pathogenicity of SARS-CoV-2 Omicron and Delta variants in Syrian hamsters mirrors the attenuated clinical outlook of Omicron in COVID-19 irrespective of age. *Microbiology* 24:103530
- Butowt R, Meunier N, Bryche B, von Bartheld CS (2021) The olfactory nerve is not a likely route to brain infection in COVID-19: a critical review of data from humans and animal models. *Acta Neuropathol* 141:809–822. <https://doi.org/10.1007/s00401-021-02314-2>
- Khan M, Yoo S-J, Clijsters M et al (2021) Visualizing in deceased COVID-19 patients how SARS-CoV-2 attacks the respiratory and olfactory mucosae but spares the olfactory bulb. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.10.027>
- Seo JS, Yoon SW, Hwang SH et al (2021) The microvillar and solitary chemosensory cells as the novel targets of infection of SARS-CoV-2 in Syrian golden hamsters. *Viruses*. <https://doi.org/10.3390/v13081653>
- Ye Q, Zhou J, He Q et al (2021) SARS-CoV-2 infection in the mouse olfactory system. *Cell Discovery* 7:49. <https://doi.org/10.1038/s41421-021-00290-1>

21. Yu P, Deng W, Bao L et al (2022) Comparative pathology of the nasal epithelium in K18-hACE2 Tg mice, hACE2 Tg mice, and hamsters infected with SARS-CoV-2. *Vet Pathol*. <https://doi.org/10.1177/030098582111071016>
22. Zhang AJ, Lee AC-Y, Chu H et al (2021) Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 infects and damages the mature and immature olfactory sensory neurons of hamsters. *Clin Infect Dis* 73:e503–e512. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa995>
23. Mori I, Goshima F, Imai Y et al (2002) Olfactory receptor neurons prevent dissemination of neurovirulent influenza A virus into the brain by undergoing virus-induced apoptosis. *J Gen Virol* 83:2109–2116. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-83-9-2109>
24. Le Bon SD, Horoi M (2020) Is anosmia the price to pay in an immune-induced scorched-earth policy against COVID-19? *Med Hypotheses* 143:109881. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2020.109881>
25. Burgoyne RA, Fisher AJ, Borthwick LA (2021) The role of epithelial damage in the pulmonary immune response. *Cells* 10:2763. <https://doi.org/10.3390/cells10102763>
26. Imai Y, Ibata I, Ito D et al (1996) A novel gene in the major histocompatibility complex class III region encoding an EF hand protein expressed in a monocytic lineage. *Biochem Biophys Res Commun* 224:855–862. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.1112>
27. Fekete R, Cserép C, Lénárt N et al (2018) Microglia control the spread of neurotropic virus infection via P2Y12 signalling and recruit monocytes through P2Y12-independent mechanisms. *Acta Neuropathol* 136:461–482. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1885-0>
28. Wheeler DL, Sariol A, Meyerholz DK, Perlman S (2018) Microglia are required for protection against lethal coronavirus encephalitis in mice. *J Clin Invest* 128:931–943. <https://doi.org/10.1172/JCI97229>
29. Käufer C, Chhatbar C, Bröer S et al (2018) Chemokine receptors CCR2 and CX3CR1 regulate viral encephalitis-induced hippocampal damage but not seizures. *Proc Natl Acad Sci USA* 115:E8929–E8938. <https://doi.org/10.1073/pnas.1806754115>
30. Kolaczowska E, Kubes P (2013) Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol* 13:159–175. <https://doi.org/10.1038/nri3399>
31. Meidaninikjeh S, Sabouni N, Marzouni HZ et al (2021) Monocytes and macrophages in COVID-19: friends and foes. *Life Sci* 269:119010. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.119010>
32. Janoff A (1972) Human granulocyte elastase. Further delineation of its role in connective tissue damage. *Am J Pathol* 68:579–592
33. Kawabata K, Hagio T, Matsuoka S (2002) The role of neutrophil elastase in acute lung injury. *Eur J Pharmacol* 451:1–10. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(02\)02182-9](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(02)02182-9)
34. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C et al (2004) Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303:1532–1535. <https://doi.org/10.1126/science.1092385>
35. Saffarzadeh M, Juenemann C, Queisser MA et al (2012) Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: a predominant role of histones. *PLoS ONE* 7:e32366. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032366>
36. Arango Duque G, Descoteaux A (2014) Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Front Immunol*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00491>
37. Borders AS, Getchell ML, Etscheidt JT et al (2007) Macrophage depletion in the murine olfactory epithelium leads to increased neuronal death and decreased neurogenesis. *J Comp Neurol* 501:206–218. <https://doi.org/10.1002/cne.21252>
38. Borders AS, Hersh MA, Getchell ML et al (2007) Macrophage-mediated neuroprotection and neurogenesis in the olfactory epithelium. *Physiol Genomics* 31:531–543. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00008.2007>
39. Hoagland DA, Moller R, Uhl SA et al (2021) Leveraging the antiviral type I interferon system as a first line of defense against SARS-CoV-2 pathogenicity. *Immunity*. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.01.017>
40. Korkmaz B, Lesner A, Wysocka M et al (2019) Structure-based design and in vivo anti-arthritis activity evaluation of a potent dipeptidyl cyclopropyl nitrile inhibitor of cathepsin C. *Biochem Pharmacol* 164:349–367. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.04.006>
41. Guarino C, Hamon Y, Croix C et al (2017) Prolonged pharmacological inhibition of cathepsin C results in elimination of neutrophil serine proteases. *Biochem Pharmacol* 131:52–67. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.02.009>
42. Bryche B, Dewaele A, Saint-Albin A et al (2019) IL-17c is involved in olfactory mucosa responses to Poly(I:C) mimicking virus presence. *Brain Behav Immun*. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.02.012>
43. Bryche B, Fretaud M, Saint-Albin Deliot A et al (2019) Respiratory syncytial virus tropism for olfactory sensory neurons in mice. *J Neurochem*. <https://doi.org/10.1111/jnc.14936>
44. Muller PY, Janovjak H, Miserez AR, Dobbie Z (2002) Processing of gene expression data generated by quantitative real-time RT-PCR. *Biotechniques* 32:1372–1374 (1376, 1378–1379)
45. Bouchery T, Harris N (2019) Neutrophil–macrophage cooperation and its impact on tissue repair. *Immunol Cell Biol* 97:289–298. <https://doi.org/10.1111/imcb.12241>
46. Holness C, Simmons D (1993) Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins. *Blood* 81:1607–1613. <https://doi.org/10.1182/blood.V81.6.1607.1607>
47. Leto TL, Lomax KJ, Volpp BD et al (1990) Cloning of a 67-kD neutrophil oxidase factor with similarity to a noncatalytic region of p60^{c-src}. *Science* 248:727–730. <https://doi.org/10.1126/science.1692159>
48. Peniche AG, Bonilla DL, Palma GI et al (2017) A secondary wave of neutrophil infiltration causes necrosis and ulceration in lesions of experimental American cutaneous leishmaniasis. *PLoS ONE* 12:e0179084. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179084>
49. Borregaard N, Theilgaard-Mönch K, Sørensen OE, Cowland JB (2001) Regulation of human neutrophil granule protein expression. *Curr Opin Hematol* 8:23–27. <https://doi.org/10.1097/00062752-200101000-00005>
50. Kanaya K, Kondo K, Suzukawa K et al (2014) Innate immune responses and neuroepithelial degeneration and regeneration in the mouse olfactory mucosa induced by intranasal administration of Poly(I:C). *Cell Tissue Res* 357:279–299. <https://doi.org/10.1007/s00441-014-1848-2>
51. Fumagalli V, Ravà M, Marotta D et al (2022) Administration of aerosolized SARS-CoV-2 to K18-hACE2 mice uncouples respiratory infection from fatal neuroinvasion. *Sci Immunol* 7:eabl9929. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abl9929>
52. Raynaud A, Meunier N, Acquistapace A, Bombail V (2015) Chronic variable stress exposure in male Wistar rats affects the first step of olfactory detection. *Behav Brain Res* 291:36–45. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.05.013>
53. Bates RC, Buret A, van Helden DF et al (1994) Apoptosis induced by inhibition of intercellular contact. *J Cell Biol* 125:403–415. <https://doi.org/10.1083/jcb.125.2.403>
54. Frisch S, Francis H (1994) Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol* 124:619–626. <https://doi.org/10.1083/jcb.124.4.619>
55. Morrison CB, Edwards CE, Shaffer KM et al (2022) SARS-CoV-2 infection of airway cells causes intense viral and cell shedding, two spreading mechanisms affected by IL-13. *Proc Natl Acad Sci USA* 119:e2119680119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2119680119>

56. Li S, Zhang Y, Guan Z et al (2020) SARS-CoV-2 triggers inflammatory responses and cell death through caspase-8 activation. *Sig Transduct Target Ther* 5:235. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00334-0>
57. Junqueira C, Crespo Â, Ranjbar S et al (2022) FcγR-mediated SARS-CoV-2 infection of monocytes activates inflammation. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04702-4>
58. Hasegawa-Ishii S, Shimada A, Imamura F (2017) Lipopolysaccharide-initiated persistent rhinitis causes gliosis and synaptic loss in the olfactory bulb. *Sci Rep* 7:11605. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10229-w>
59. Ueha R, Ito T, Furukawa R et al (2022) Oral SARS-CoV-2 inoculation causes nasal viral infection leading to olfactory bulb infection: an experimental study. *Front Cell Infect Microbiol* 12:924725. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.924725>
60. Guarino C, Legowska M, Epinette C et al (2014) New selective peptidyl di(chlorophenyl) phosphonate esters for visualizing and blocking neutrophil proteinase 3 in human diseases. *J Biol Chem* 289:31777–31791. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.591339>
61. Döring G (1994) The role of neutrophil elastase in chronic inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 150:S114–S117. https://doi.org/10.1164/ajrccm/150.6_Pt_2.S114
62. Li Q, Vijaykumar K, Philips SE et al (2022) Mucociliary transport deficiency and disease progression in Syrian hamsters with SARS-CoV-2 infection. *Microbiology* 5:562
63. Calvert B, Quiroz E, Lorenzana Z et al (2021) Neutrophilic inflammation promotes SARS-CoV-2 infectivity and augments the inflammatory responses in airway epithelial cells. <https://doi.org/10.1101/2021.08.09.455472>

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

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.

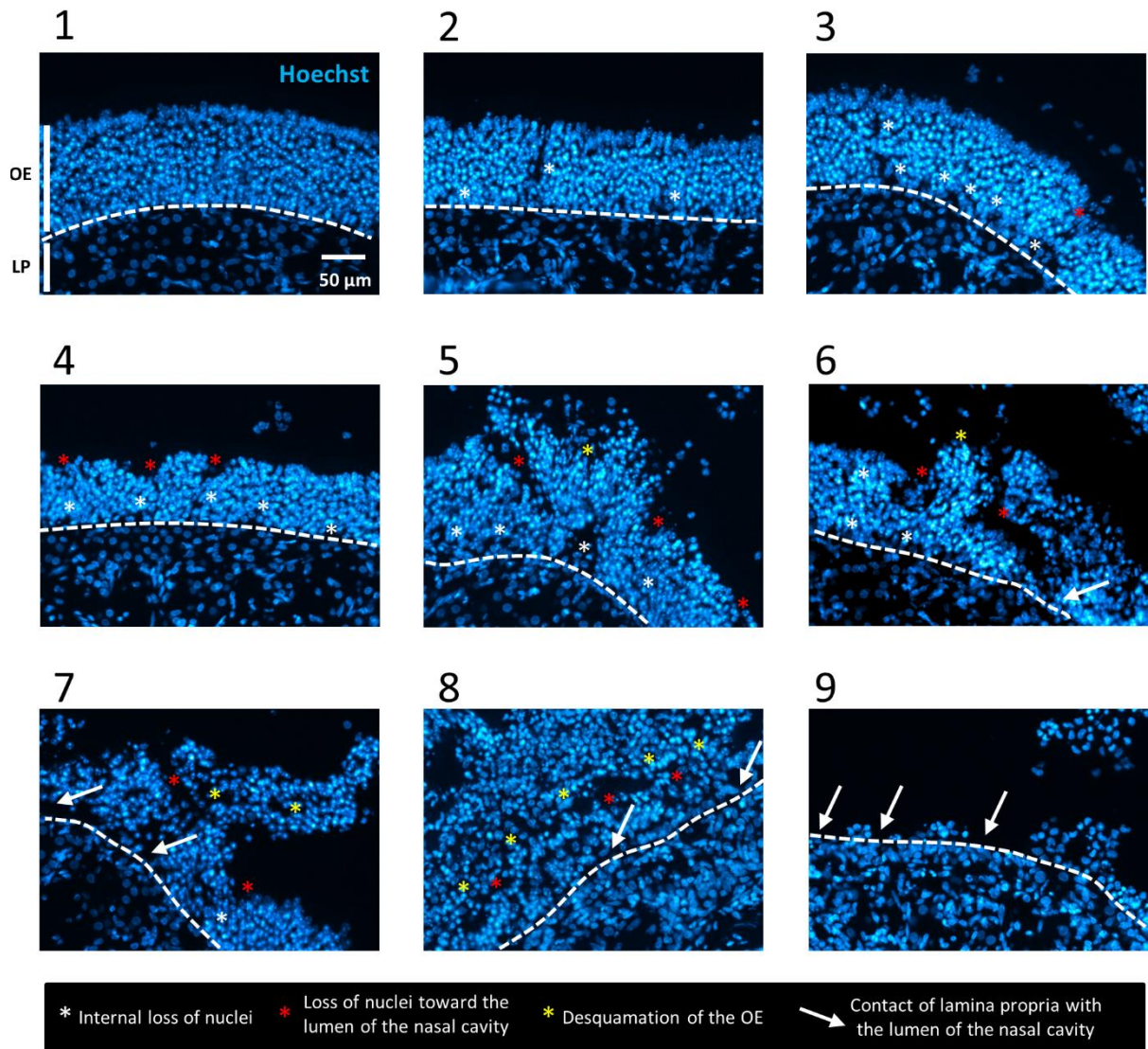
Supplementary data

Neutrophils play a major role in the destruction of the olfactory epithelium during SARS-CoV-2 infection in hamsters

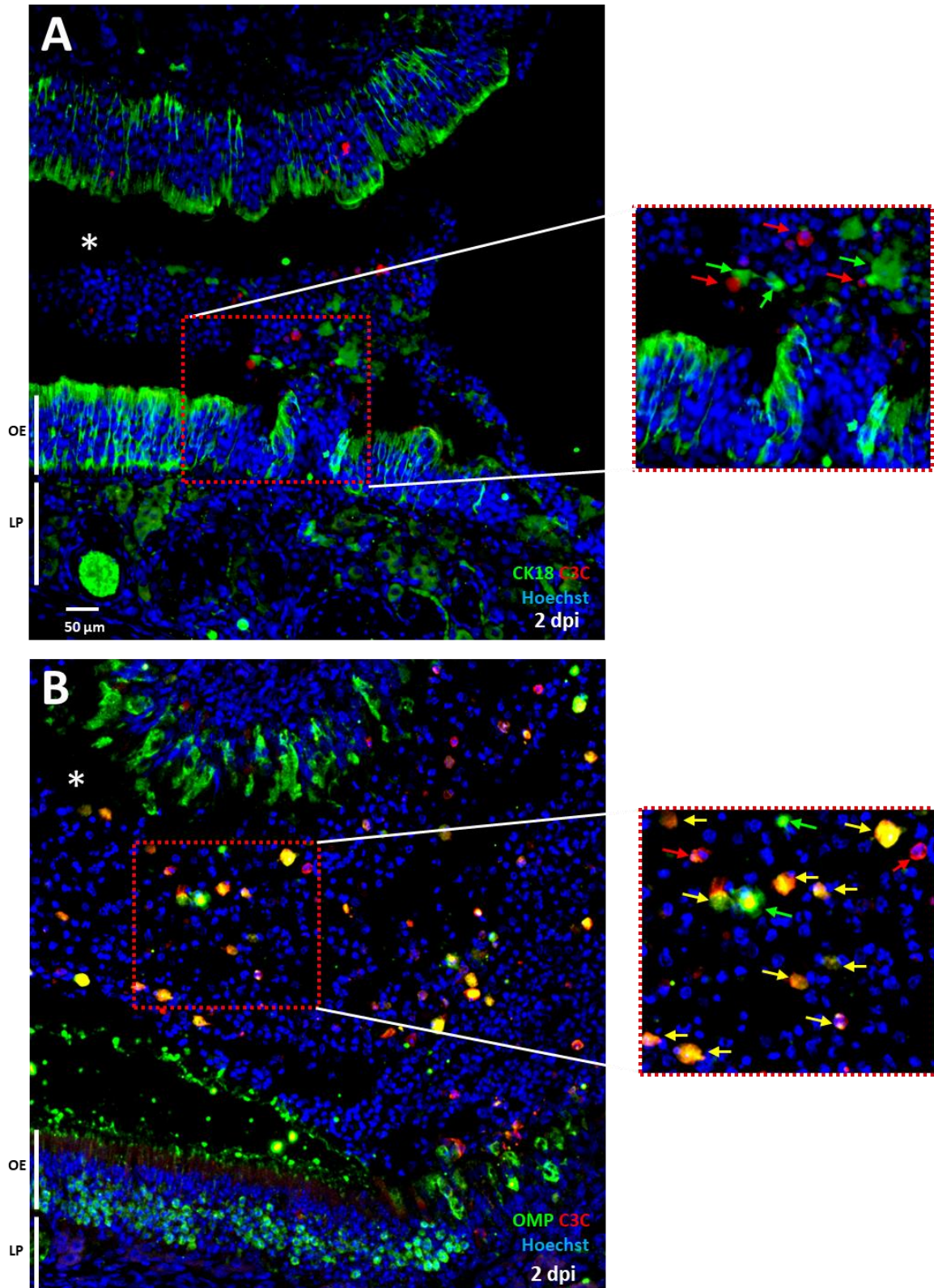
Clara Bourgon¹, Audrey St Albin¹, Ophélie Ando-Grard¹, Bruno Da Costa¹, Roxane Domain², Brice Korkmaz², Bernard Klonjkowski³, Sophie Le Poder³, Nicolas Meunier¹

Gene	Primer 5'>3'	Primer 3'>5'
G3PDH	GACATCAAGAAGGTGGTGAAGCA	CATCAAAGGTGGAAGAGTGGGA
SARS 2 N	GGGGAACCTCTCCTGCTAGAAT	CAGACATTTTGCTCTCAAGCTG
Iba1	TGGATGAGATCAACAAGCAATTC	AAGGCTTCCAGTTTGGAGGG
CD68	CACTTGGGGCCATGTTTCTC	CTCGGGTAATGCAGAAGGCA
Ncf2	ATGTTCAATGGACAGAAGGGGC	TGGGATCTTTCTGGGGCACT
TNF- α	AACTCCAGCCGGTGCCTAT	GTTCAGCAGGCAGAAGAGGATT
IL-6	AGACAAAGCCAGAGTCATT	TCGGTATGCTAAGGCACAG

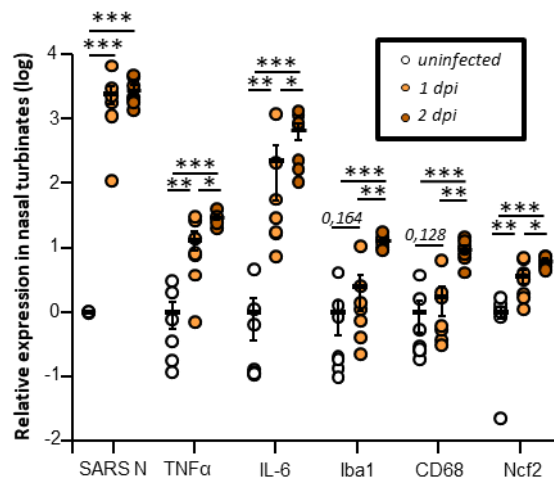
Supplementary Table 1: Sequences of primers



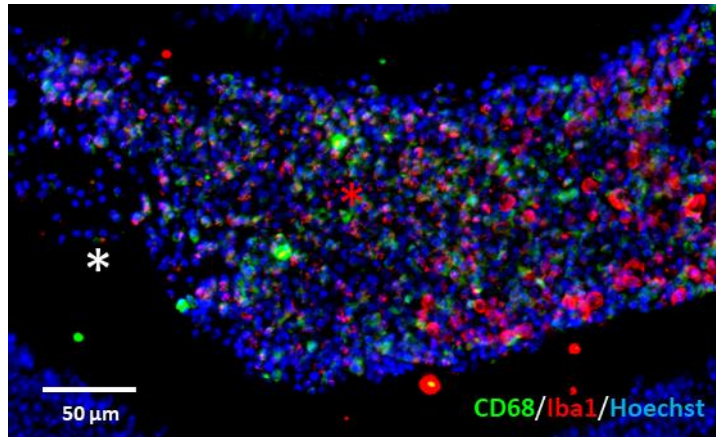
Supplementary Figure 1: Representative images of the olfactory epithelium scored from 1 to 9 according to the damage level.



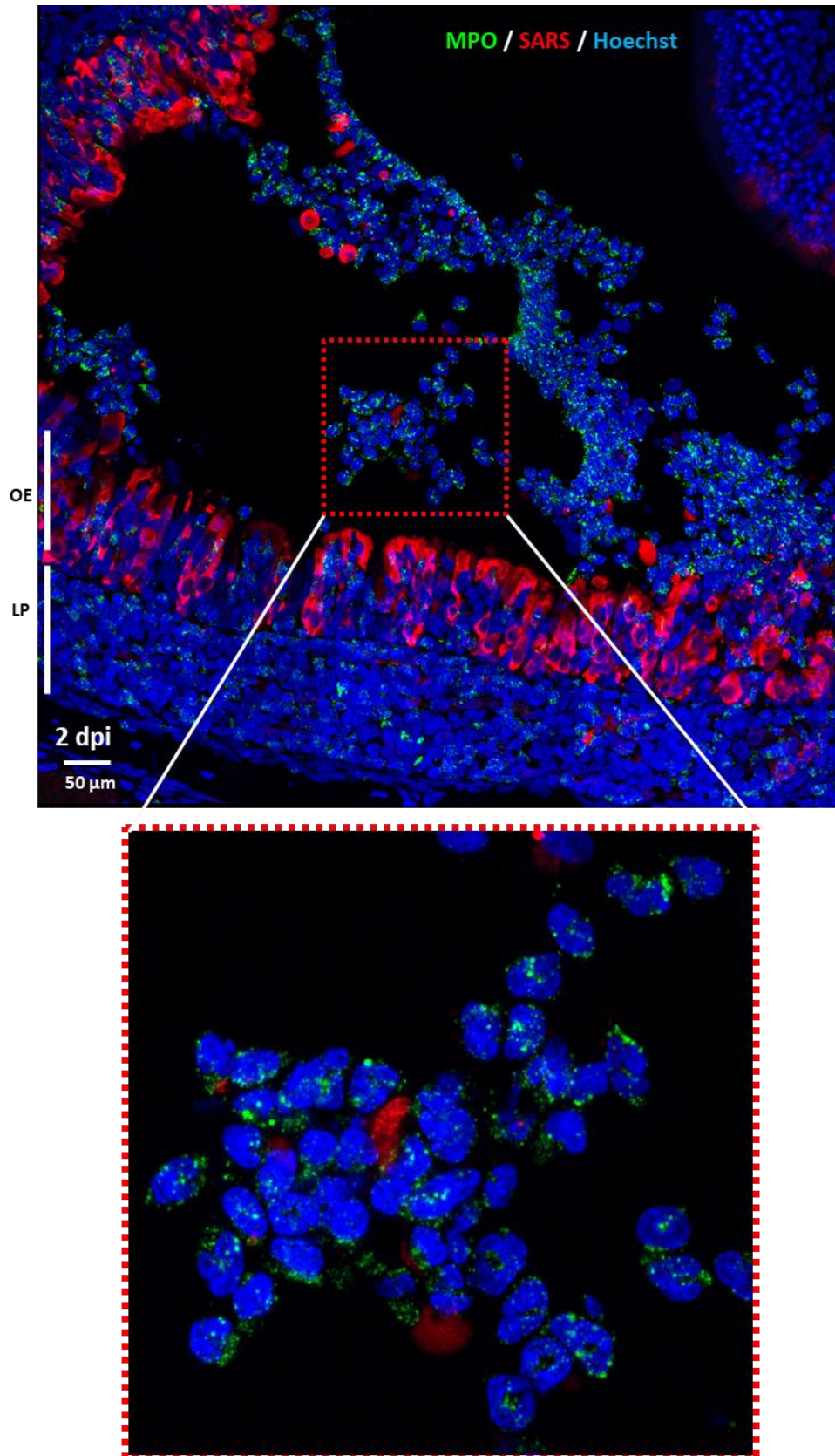
Supplementary Figure 2: Double staining against cleaved caspase 3 (red) and (A) CK18 staining sustentacular cells or (B) OMP staining mature olfactory sensory neurons (green) in the olfactory epithelium of a hamster 2 days post infection (dpi) with SARS-CoV-2.



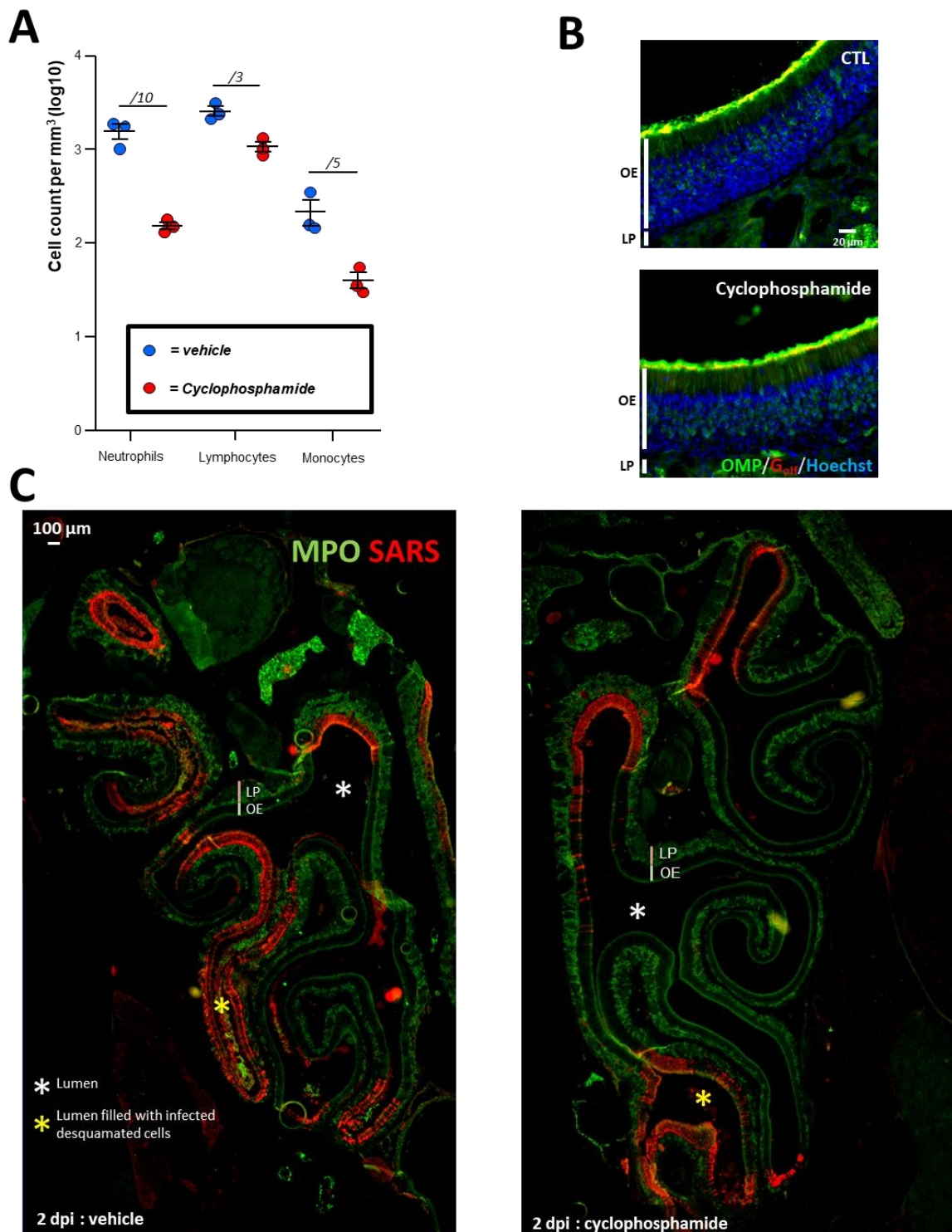
Supplementary Figure 3: Expression of innate immune genes in the nasal turbinates during SARS-CoV-2 infection. SARS N expression is related to the SARS-CoV-2 infection; TNF α and IL6 are two genes expressed during inflammation; Iba1, CD68 and Ncf2 are related to the presence of microglia/macrophages, monocytes/macrophages and neutrophils respectively. Results represent the mean \pm SEM relative to uninfected hamsters (n=7, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 (Mann-Whitney test), *nd* non-detectable).



Supplementary Figure 4: Double staining against Iba1 and CD68 markers in the desquamated cells (red asterisk) filling the lumen of the nasal cavity (white asterisk) of a SARS-CoV-2 infected hamster at 2 dpi. Part of the desquamated cells are Iba1⁺ and CD68⁺ with no co-staining.



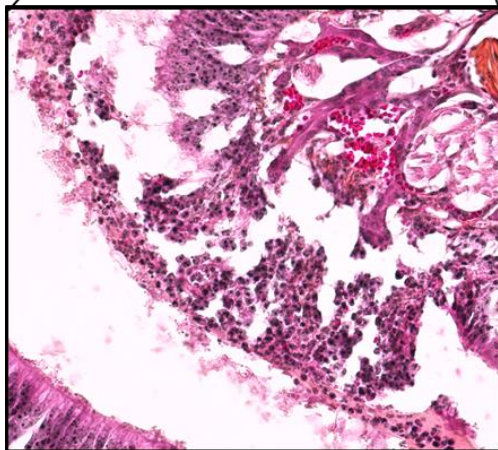
Supplementary Figure 5: Confocal imaging of MPO localization and Hoechst staining showing typical multi-lobed nuclei of neutrophils in the lumen of the nasal cavity from a hamster 2 days post infection (dpi) with SARS-CoV-2.



Supplementary Figure 6: (A) Blood numeration of neutrophils, lymphocytes and monocytes (B) Representatives images of the olfactory epithelium immunostained against OMP (Olfactory Marker Protein staining mature olfactory neurons) and olfactory specific G protein (G_{olf} ; G protein involved in olfactory transduction and present in cilia of olfactory neurons) in control (CTL) or cyclophosphamide treated uninfected animals. (C) Global view of the nasal cavity at 2 dpi showing infection level in the OE

immunostained against SARS-CoV-2 N protein (red), in cyclophosphamide treated animals, the level of infection is reduced as well as the area of desquamated infected cells (yellow asterisk) present in the lumen of the nasal cavity (white asterisk).

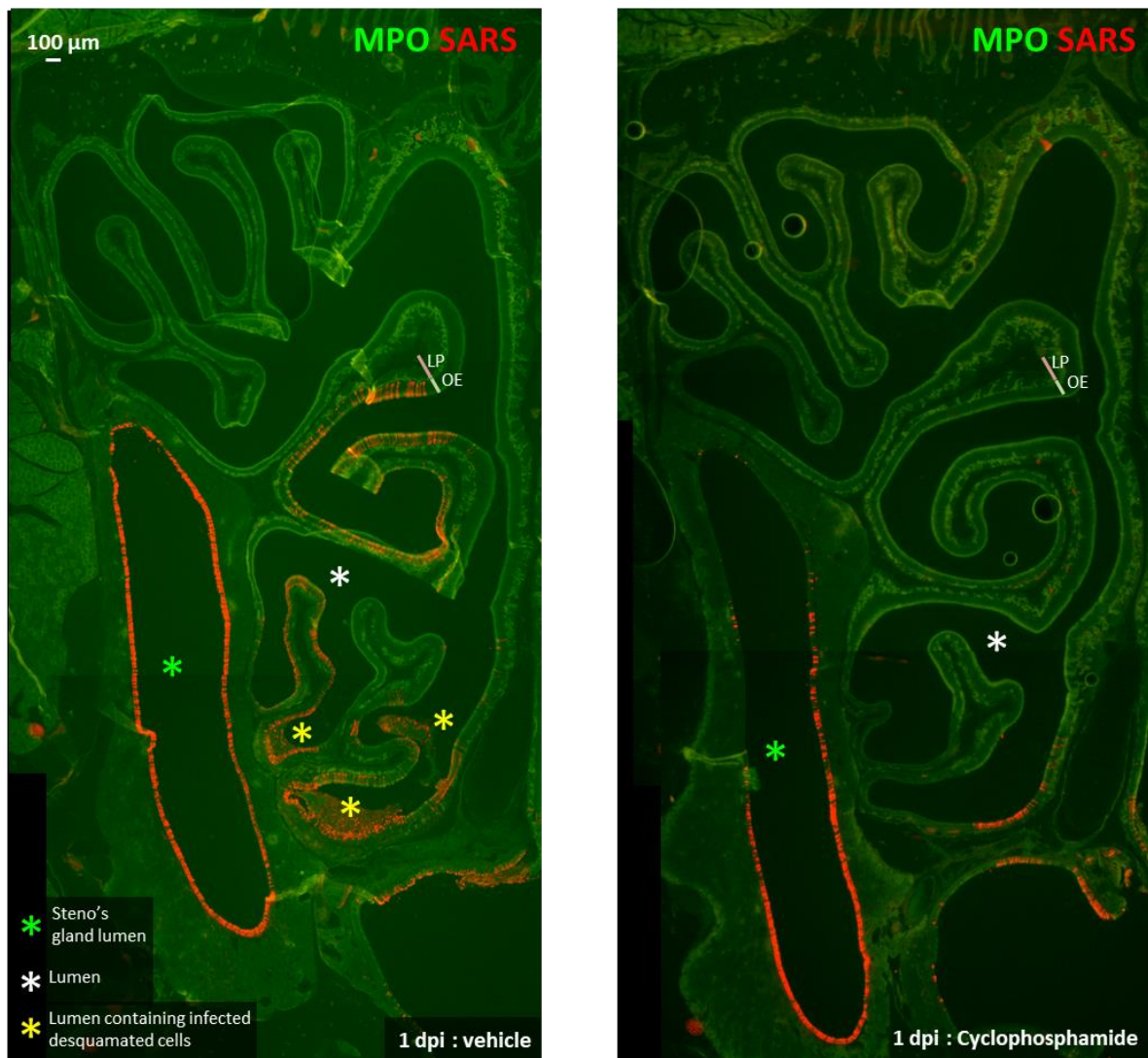
2 dpi vehicle



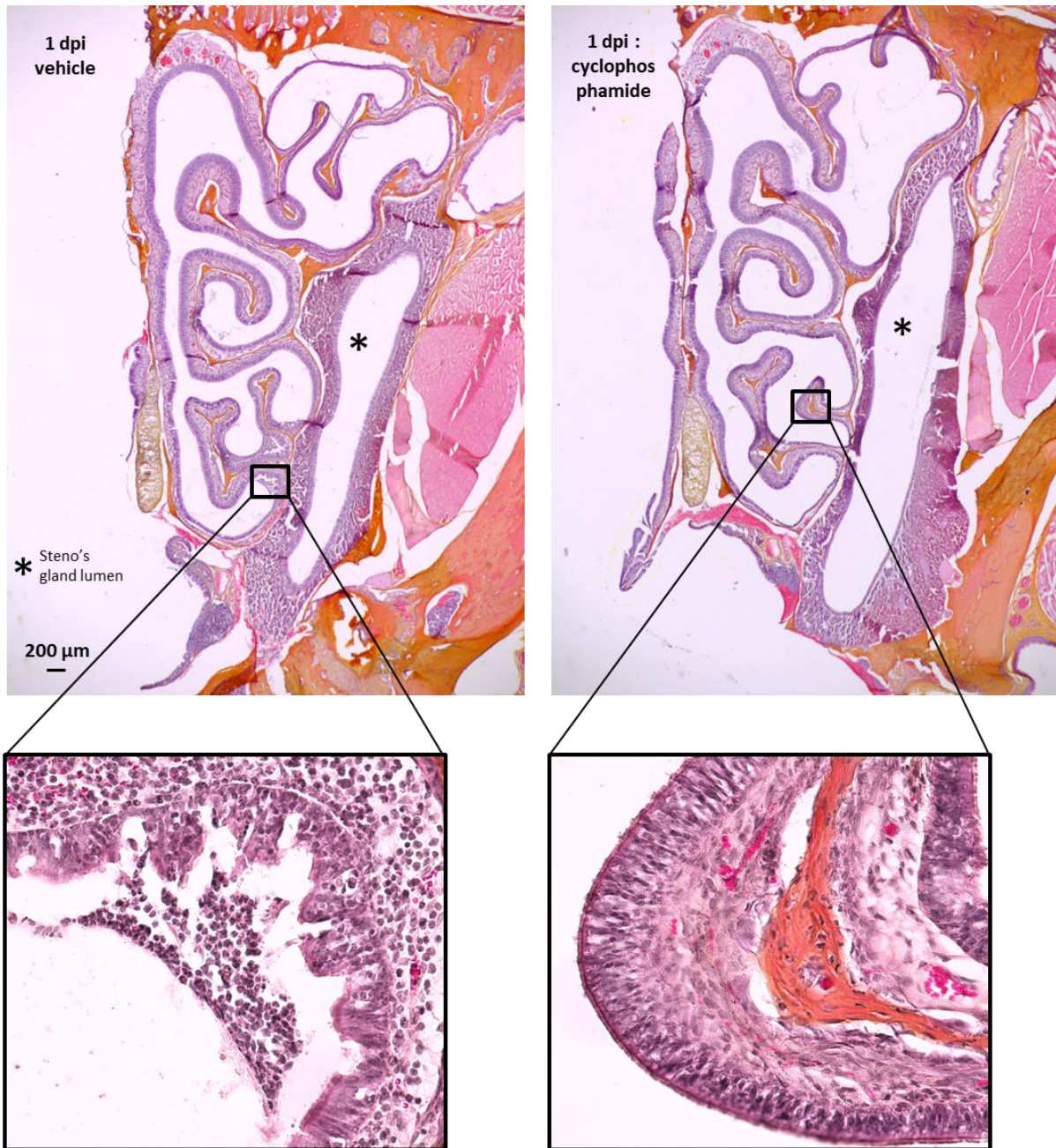
2 dpi cyclophosphamide



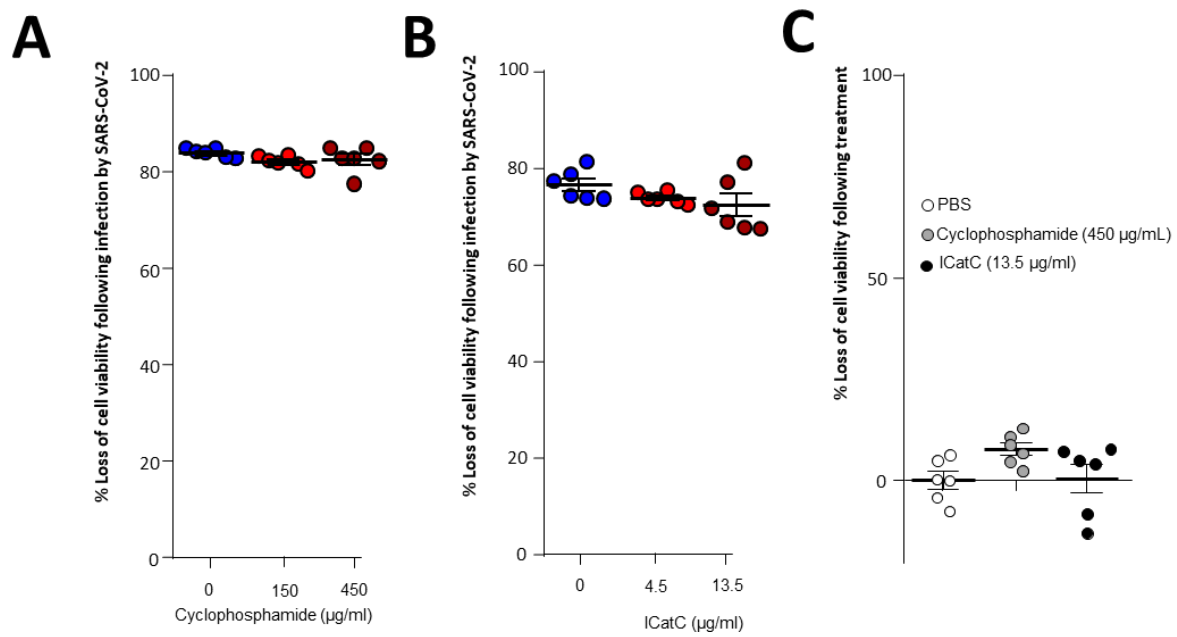
Supplementary Figure 7: Global view of the nasal cavity at 2 dpi stained with HE in similar zone and same animal as *Supp Fig 6*.



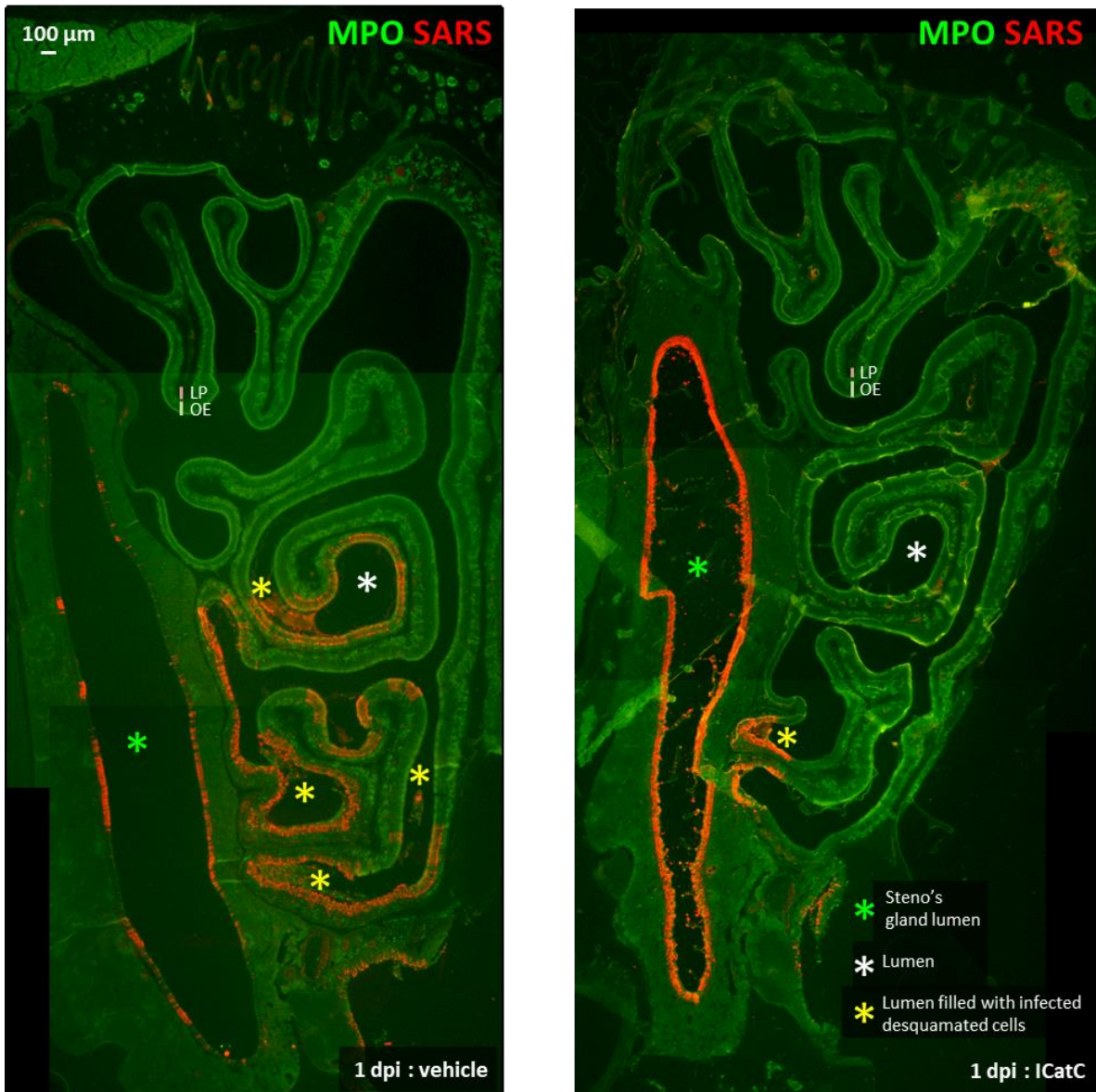
Supplementary Figure 8: Global view of the nasal cavity at 1 dpi showing infection level in the OE immunostained against SARS-CoV-2 N protein (red) and neutrophils revealed by MPO presence (green). The green signal has been overexposed to reveal the anatomy of the nasal cavity by autofluorescence. In cyclophosphamide treated animals, the level of infection is reduced in the OE and desquamated infected cells (yellow asterisk) are almost absent in the lumen of the nasal cavity (white asterisk) compared to the vehicle treated animal. In both animals, the epithelium limiting the Steno's gland lumen (green asterisk) is heavily infected.



Supplementary Figure 9: Global view of the nasal cavity at 1 dpi stained with HE in similar zone and same animal as *Supp Fig 7*.



Supplementary Figure 10: Impact of (A) cyclophosphamide and (B) Cathepsin C inhibitor (ICatC) on Vero E6 cell death following SARS-CoV-2 infection (C) Impact of the same molecules without infection (Mean \pm SEM normalized to the PBS condition used as a control; n=6).



Supplementary Figure 11: Global view of the nasal cavity at 1 dpi showing infection level in the OE immunostained against SARS-CoV-2 N protein (red) and neutrophils revealed by MPO presence (green). The green signal has been overexposed to reveal the anatomy of the nasal cavity by autofluorescence. In animals treated with cathepsin C inhibitor (ICatC), the level of infection is reduced in the OE and desquamated infected cells (yellow asterisk) are almost absent in the lumen of the nasal cavity (white asterisk) compared to the vehicle treated animal. In both animals, the epithelium limiting the Steno's gland lumen (green asterisk) is heavily infected.



Supplementary Figure 12: Global view of the nasal cavity at 1 dpi stained with HE in similar zone and same animal as *Supp Fig 11*.

2. Article 2 : La régénération de l'épithélium olfactif suite à l'infection par le SARS-CoV-2 est retardée et perturbée.

Un peu moins de 10 % des patients atteints par la COVID-19 développent des pertes de l'odorat à long terme^{18,23}. Étant donné le nombre important de patients infectés depuis le début de la pandémie de COVID-19, ces pertes de l'odorat à long terme devraient concerner plus de 60 millions de personnes dans le monde. Ces pertes de l'odorat à long terme sont donc un problème de santé publique car les pertes de l'odorat ont un impact sur le comportement alimentaire, sur l'évitement de composés toxiques et de situations dangereuses (feu,...), et sur l'état moral des patients²⁶. Pourtant, les mécanismes de cette anosmie à long terme sont encore peu connus.

Comme une desquamation massive de l'épithélium olfactif est observée suite à l'infection par le SARS-CoV-2^{27,31,32}, les dysfonctionnements de l'olfaction à long terme pourraient être associées à des perturbations de sa régénération. Des travaux déjà publiés vont dans ce sens étant donné que Finlay et al. montrent que la population de neurones olfactifs est moins importante chez les patients souffrant d'une anosmie à long terme que chez les patients ayant retrouvé leur sens de l'odorat après une COVID-19³³. Pour comprendre les mécanismes des pertes olfactives à long terme, il est important de connaître les cinétiques de la régénération de l'épithélium olfactif après infection par le SARS-CoV-2 et les facteurs potentiels qui pourraient perturber la régénération de ce dernier. Quelques travaux ont déjà été réalisés à ce sujet dans le modèle hamster à moyen terme, par exemple à 21 et 42 jours post-infection³⁶¹. Peu de travaux ont été effectués à court terme après l'infection par le SARS-CoV-2.

L'étude que nous proposons dans ce paragraphe vise à remplir cette méconnaissance du début de la régénération en étudiant l'état de l'épithélium olfactif à 8 jours, 11 jours et 17 jours post-infection. Dans cet article, nous avons suivi la prolifération des cellules basales de l'épithélium olfactif, qui est un préalable à toute régénération de l'épithélium. De plus, pour aller plus loin, nous avons également étudié la présence et l'organisation de 2 populations neuronales de la muqueuse olfactive : les neurones olfactifs matures et immatures. Dans cette étude, nous nous sommes concentrés sur 3 régions de la muqueuse olfactive. La première est située dans les parties antérieures des fosses olfactives, la première zone atteinte par le virus après une instillation intranasale. Les deux autres zones étudiées sont situées dans une zone centrale des fosses olfactives : une en dorsomédian et une en ventrolatéral. Ces zones ont été choisies car la présence de cellules immunitaires résidentes Iba1⁺ et donc l'inflammation était plus importante dans les zones dorsomédianes que dans les zones ventrolatérales à 21 et 42 jours post-infection³⁶¹. Il est déjà connu qu'une inflammation chronique est à l'origine de défauts de la régénération³⁸. Il serait important de savoir si ces zones montrent des temps de récupération différents,

ce qui pourrait expliquer des distorsions de la perception des odorants comme les parosmies, étant donné que l'expression des récepteurs aux odorants est régionalisée sur l'axe dorso-ventral⁵⁴. Une étude réalisée chez l'homme irait dans le même sens, suggérant que les parosmies observées après la COVID-19 seraient causées par la détection de certains odorants présents en faible concentration dans l'environnement. Elle serait donc dépendante des neurones olfactifs et des récepteurs olfactifs présents dans l'épithélium olfactif³⁶². Les parosmies touchent en effet près de 25 % des patients atteints par la COVID-19^{19,20}.

Par la suite, par RT-qPCR, nous avons étudié les niveaux d'inflammation dans les fosses nasales pour savoir s'il y a une inflammation résiduelle dans l'épithélium olfactif. En effet, l'étude de Chen et al. a montré que l'inflammation persistante inhibe la prolifération des cellules basales dans l'épithélium olfactif³⁸. De plus, des études comme celle de Finlay et co-auteurs suggèrent une présence plus importante de cellules immunitaires chez les patients subissant une perte de l'odorat à long terme. L'activité de ces cellules pourrait donc être impliquée dans ces dysfonctionnements de l'olfaction³³.

Nous avons à nouveau utilisé le modèle hamster pour répondre à ces questions. Nous avons infecté des hamsters avec 5.10^3 pfu de la souche D614G du SARS-CoV-2 et avons étudié l'évolution des différents paramètres présentés précédemment pendant l'infection aiguë à 1, 2 et 4 jours post-infection et peu de temps après la clairance virale à 8, 11 et 17 jours post-infection.

Cette étude nous a permis de montrer que la régénération de l'épithélium olfactif commençait à environ 8 jours post-infection dans toutes les aires de l'épithélium olfactif, bien après la clairance virale. Pourtant, dans les aires antérieures et dorsomédianes, la régénération de l'épithélium est fortement perturbée. En effet, si les cellules basales prolifèrent dans ces zones à partir de 8 jours post-infection, peu de neurones olfactifs immatures sont produits dans la partie antérieure de l'épithélium olfactif avant 17 jours post-infection, montrant un retard important dans la régénération de cette zone. Dans la zone dorsomédiane, des neurones olfactifs immatures sont produits dès 11 jours post-infection mais au lieu de se présenter en une monocouche cellulaire comme dans un épithélium non affecté, ils forment plusieurs couches désorganisées au moins jusqu'à 17 jours post-infection. Il n'est pas certain que la désorganisation observée dans ces régions puisse permettre une régénération complète de l'épithélium olfactif. Cette désorganisation est beaucoup moins importante dans les parties ventrolatérales de l'épithélium olfactif. Dans les parties antérieures et dorsomédianes, aucune récupération des populations de neurones olfactifs matures n'a pu être observée. Par contre, dans les régions ventrolatérales, la récupération des populations de neurones olfactifs matures commence à 17 jours post-infection. Donc, les cinétiques de régénération sont bien différentes dans plusieurs régions de la muqueuse olfactive. De plus, les niveaux d'expression de plusieurs cytokines (TNF- α , IL-1 β et CXCL10) et cellules immunitaires

de l'inflammation (macrophages résidents Iba1⁺ par exemple) restent significativement plus élevées dans les fosses olfactives à 17 jours post-infection que dans les animaux contrôle.

En conclusion, pendant l'infection aiguë, entre jour 2 et jour 4 post-infection, la combinaison d'une obstruction des fosses nasales par des débris cellulaires et des pertes neuronales liées à la desquamation serait à l'origine d'une anosmie très profonde chez le hamster syrien doré. A partir de 8 jours post-infection, l'obstruction de la cavité nasale est levée, ce qui est associé avec une amélioration des performances olfactives. Par contre, la population de neurones olfactifs matures n'est que peu régénérée jusqu'à 17 jours post-infection, ce qui explique le fait que les performances olfactives des hamsters syriens sont encore fortement affectées jusqu'à 17 jours post-infection.

Prolonged olfactory neurons loss following SARS-CoV-2 infection in hamsters

Clara Bourgon¹, Laetitia Merle¹, Audrey Saint-Albin¹, Bernard Klonjkowski², Sophie Le Poder², Nicolas Meunier^{1*}

¹Unité de Virologie et Immunologie Moléculaires (UR892), INRAE, Université Paris-Saclay, 78350 Jouy-en-Josas, France

²UMR 1161 Virologie, INRAE-ENVA-ANSES, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Maisons-Alfort, 94704 Paris, France

*Corresponding author: nicolas.meunier@inrae.fr

Abstract

The specific mechanisms causing the loss of smell due to SARS-CoV-2 infection are still not fully understood. Research has shown that the initial infection of sustentacular cells in the olfactory epithelium is followed by the infiltration of innate immune cells and desquamation of the olfactory epithelium but the extent of the following loss of mature olfactory neuron remains to be clarified. Infected hamsters experience a temporary loss of smell as early as 2 dpi, with a gradual recovery at 17 days post infection (dpi). We explored here extensively the spatiotemporal evolution of olfactory neuron population following SARS-CoV-2 infection until 17 dpi. We observed a continuous decrease of mature olfactory neuron population even after infection resolved at 8 dpi. Mature olfactory neurons almost completely disappeared in the nasal cavity at 11 dpi. Furthermore, we observed a delayed regeneration of the olfactory epithelium starting only at 8 dpi and leading to a high level of immature olfactory neurons. This delayed regeneration and persistent olfactory neuron population alteration was correlated with a prolonged expression of inflammatory cytokine and a rapid decrease of the level of anti-inflammatory marker linked to regeneration. Overall, our results suggests that the regeneration process may be altered in some areas of the olfactory epithelium leading to impaired regeneration of the mature olfactory neuron population. The later may explain the prolonged smell loss linked to SARS-CoV-2 infection.

Introduction

The infection by the first SARS-CoV-2 variants has been characterized by up to 50% of anosmia *i.e.* total smell loss (von Bartheld CS et al., 2020; Vaira et al., 2021;). About 10% of anosmic patients do not recover their sense of smell 6 months after the disease onset (Tan et al., 2022). Since the Omicron era, the anosmia prevalence has decreased to ~10% (Butowt et al., 2022; von Bartheld and Wang, 2023) but it stills represent a considerable number of patients as SARS-CoV-2 is circulating actively. Smelling is essential for life quality. Odours plays a major role in feeding behavior and their detection allows also to avoid exposition to food poisoning and dangerous chemicals (Meunier et al., 2021). It is thus crucial to understand the cellular basis of smell loss related to viral infection.

Olfaction starts in the olfactory epithelium (OE) containing olfactory sensory neurons (OSNs) surrounded by supporting cells called sustentacular cells. Both cell types are regenerated regularly thanks to multipotent basal cells (Schwob et al., 2017). Among these cells, only sustentacular cells express significantly ACE2 and TRPMSS2 required for SARS-CoV-2 cellular entrance (Bilinska et al., 2020; Brann et al., 2020; Fodoulian et al., 2020). Studies using the Syrian golden hamsters have shown that SARS-CoV-2 infects massively the sustentacular cells in the OE (Bryche et al., 2020; Urata et al., 2021) consistent with humans studies focused on patients deceased during the acute phase of SARS-CoV-2 infection (Khan et al., 2022, 2021). The events following this infection in link with loss of smell are less clear. Experimental human infection have shown that loss of smell duration can greatly vary from several days to several weeks / months with an average of 28 days (Killingley et al., 2022) consistent with epidemiology (Tan et al., 2022). Using rodents model, it has been shown that following infection of sustentacular cells, olfactory neurons are losing their cilia impairing olfactory transduction (Bryche et al., 2020; Verma et al., 2022). Additionally, the infection of the OE leads to fast recruitment of innate immune cells including neutrophils initiating massive damage of the epithelium (Bourgon et al., 2022). Following the damage of the epithelium, the lumen of the nasal cavity is filled with cellular debris (Chen et al., 2022; Yu et al., 2022; Zhang et al., 2020); potentially limiting the airflow reaching the olfactory turbinates. Both phenomena could explain the transient loss of smell observed in some patients but not the long-lasting anosmia which require further studies (Chen and Wang, 2023; Tsukahara et al., 2023). In hamsters, the recovery of smell follows the regeneration of the olfactory epithelium thickness indicating that the damage of the epithelium may be the main factor of prolonged smell loss (Reyna et al., 2022). The prolonged loss of smell may thus be linked to a long lasting loss of neuronal population observed in rodents (Bourgon et al., 2022; Chen et al., 2022; Finlay et al., 2022; Verma et al., 2022) and in humans as a study observed olfactory neuronal loss in hyposmic post COVID-19 patients (Finlay et al., 2022). SARS-CoV-2 infection related long term olfactory loss may also be linked to an alteration of neuronal olfactory

receptor expression in the OE (Zazhytska et al., 2022) or to central alteration of olfactory processing linked to inflammation (Kishimoto-Urata et al., 2022).

In order to improve our understanding of the cellular events behind the COVID-19 related smell loss, we focused on the evolution of the olfactory neuron population and regeneration of the olfactory epithelium in the beginning of the infection and during the recovery of smell capacity in hamsters.

Material and methods

SARS-CoV-2 isolates

In vivo experiments were carried out with SARS-CoV-2 strain BetaCoV/France/IDF/200107/2020, which was isolated in the beginning of the pandemic in Europe in March 2020 by Dr. Paccoud from the La Pitié-Salpêtrière Hospital in France. This strain was kindly provided by the Urgent Response to Biological Threats (CIBU) hosted by Institut Pasteur (Paris, France), headed by Dr. Jean-Claude Manuguerra.

Animals

Forty-three 8 weeks-old male hamsters were purchased from Janvier's breeding Center (Le Genest, St Isle, France). Animal experiments were carried out in the animal biosafety level 3 facility of the UMR Virologie (ENVA, Maisons-Alfort) ; approved by the ANSES/EnvA/UPEC Ethics Committee (CE2A16) and authorized by the French ministry of Research under the number APAFIS#25384-2020041515287655. Weight and welfare of animals were respectively measured and evaluated daily. Six animals were not infected and used as control. Thirty-seven were infected by nasal instillation ($5 \cdot 10^3$ TCID₅₀ of SARS-CoV2 strain BetaCoV/France/IDF/200107/2020 in 80 µL distributed among each nostril) on anesthetised animals under isoflurane as previously described (Bourgon et al., 2022). Six of them has been euthanised at 1-day post-infection (dpi), six at 2 dpi, six at 4 dpi, six at 8 dpi, six at 11 dpi and seven at 17 dpi. Animal olfactory performances were measured 2 days prior to infection, then before each euthanasia time. An extra food pellet colored in red was proposed daily to measure extra food consumption as a reflect of food intake. Heads were sagittally divided in two halves. One was used for immunohistochemistry experiments and olfactory turbinates have been extracted from the other to perform RNA extraction and RT-qPCR experiments.

Behaviour experiments

In order to assess the olfactory performances of hamsters, we slightly adapted the buried food test (Yang and Crawley, 2009). We found Emmental cheese to be much more attractive than the sweet food conventionally used with mice and used it as food stimulus. Hamsters get used to Emmental after leaving one small piece (10 x 4 x 2 mm) in their home cage overnight. They start actively digging for it

after a single 5-min habituation session in a test cage filled with 5 cm of bedding with a piece of cheese accessible directly on the surface. This test cage was then used for two different conditions named “easy task” or “hard task”, which consist in burying the cheese at 1 or 5 cm depth respectively. Animal activity was recorded for 200 seconds, and the time taken to find the cheese was afterwards measured by analyzing the video blind to animal condition.

Histology, immunohistochemistry and quantifications

The immunohistochemistry analysis of the olfactory mucosa tissue sections was performed as described previously (Bourgon et al., 2022). Briefly, the animal hemi-heads were fixed for 3 days at room temperature in 4% paraformaldehyde (PFA) and decalcified in Osteosoft (101728; Merck Millipore ; Saint-Quentin Fallavier ; France) for 3 weeks. Blocks were cryo-protected in 30% sucrose. Cryo-sectioning (12 µm) was performed in coronal sections of the nasal cavity. Sections were then stored at -80 °C until use.

For immunohistochemistry, non-specific staining was blocked by incubation with 2% bovine serum albumin (BSA) and 0.1% Triton. The sections were then incubated overnight with primary antibodies directed against SARS Nucleocapsid protein (1/1000; mouse monoclonal; clone 1C7C7 ; Sigma-Aldrich), Olfactory Marker Protein (OMP) (1/1000; goat polyclonal; 544-10001; Wako), GAP43 (1/500; rabbit polyclonal; NB300 143 ; Novus) and Ki67 (1/500 ; Rabbit polyclonal ; MA139550 ; ThermoFisher). Fluorescence staining was performed using donkey anti-mouse-A555; goat anti-rabbit-A488, donkey anti-rabbit-A555 and donkey anti-goat-A488 (1/800; Molecular Probes A-31570, A-11008, A-32794 and A-32814 respectively; Invitrogen).

To assess the evolution of olfactory epithelium at different time points during SARS-CoV-2 infection, we focused our measures on two sections of the nasal cavity. One was located in the anterior part of nasal cavity that contains vomeronasal organ, respiratory epithelium and a dorsal part with olfactory epithelium (**Fig. 3**). The other section was located in the central part of the nasal cavity that mainly contains olfactory epithelium but also Steno’s gland and NALT (**Fig. 3**). This olfactory epithelium can be divided in two regions: dorsomedian and ventrolateral. This study will mostly focus on the dorsomedian and the ventrolateral parts of the central section of nasal cavity and the olfactory part of the anterior part of the nasal cavity. We wanted to compare the impact and the recovery of olfactory epithelium after SARS-CoV-2 infection. It has already been shown that dorsomedian and ventrolateral region show different characteristics in their biology and their regeneration (Gaun et al., 2022; Glezer and Malnic, 2019; Liberia et al., 2019). Moreover, studies using animals euthanized at 21 dpi and 42 dpi showed a different behaviour after SARS-CoV-2 infection, notably concerning inflammation and recovery (Kishimoto-Urata et al., 2022). We also chose the olfactory part of the anterior section of nasal cavity to see if this region also showed differences of time scale of SARS-CoV-2 infection and if the

recovery of this region shows any difference with dorsomedian and ventrolateral parts of the central section.

We studied SARS-CoV-2 staining, Ki67 staining, GAP43 staining and OMP staining in the olfactory epithelium in order to study the extent of infection, the regeneration of olfactory epithelium through the activity of basal cells and the presence of immature olfactory neurons and mature olfactory neurons in olfactory epithelium. For SARS-CoV-2 staining, Ki67 staining and OMP staining, we scored the three presented regions from 0 (absence of staining) to 10 corresponding to massive infection, ubiquitous proliferative activity of basal cells and homogeneous presence of mature olfactory neurons in the whole olfactory epithelium. For GAP43 staining, we also scored disorganization of these cells from 1 to 9 based on the presence of staining in the middle part (~50%) of the OE layer where mature neurons are usually present and immature olfactory neurons absent(Moon et al., 2002).

Images for all fluorescent IHC were taken using a 1X71 Olympus microscope equipped with an Orca ER Hamamatsu cooled CCD camera (Hamamatsu Photonics France; Massy; France). Whole sections of nasal cavity HE staining were reconstructed from 2 images taken at x30 magnification using a Leica MZ10F binocular microscope.

RNA extraction and RT-qPCR analysis

Total RNA was extracted from frozen nasal turbinates using the Trizol-chloroforme method as described previously(Bryche et al., 2019). Oligo-dT first strand mixed with random hexamers cDNA synthesis was performed from 1 µg total RNA with iScript Advance cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (BioRad; #1725038) following manufacturer's recommendations. qPCR was carried out using 25 ng of cDNA added to a 15 µL reaction mix. This reaction mix contained 10 µL iTaq Universal Sybr Green SuperMix (BioRad ; #1725124), and primers at 500 nM (sequences in **Supplementary Table 1**). The reaction was performed with a thermocycler (Mastercycler ep Realplex, Eppendorf). Fluorescence during qPCR reaction was monitored and measured by Realplex Eppendorf software. A dissociation curve was plotted at the end of the forty amplification cycles of the qPCR to check the ability of these primers to amplify a single and specific PCR product.

Quantification of initial specific RNA concentration was done using the $\Delta\Delta C_t$ method. Standard controls of specificity and efficiency of the qPCR were performed. The mRNA expression of each gene was normalized with the expression level of Dicer. A correction factor was applied to each primer pair according to their efficiency(Muller et al., 2002).

Statistical analysis

All comparisons were made using Prism 8.0 (GraphPad). Mann-Whitney statistic tests were performed to assess the significance of the difference between groups. In graphs, error bars indicate the SEM.

Results

Olfactory performance evolution following SARS-CoV-2 infection

We had previously observed that hamsters behave much more effectively during the food buried test than mice and used two different level of hidden food to improve the characterisation of hamster performances (**Fig. 1A**; Merle-Nguyen et al., in revision BBI). Following SARS-CoV-2 infection, we observed that hamsters lose their olfactory performances but were never anosmic as all were able to find the shallow buried food. The loss of olfactory performances was very strong as early as 2 days post infection (dpi) for both "easy" and "hard" task (**Fig. 1B**). Hamsters recovered part of their performances at 8 dpi for the "easy" task and 17 dpi for the "hard" task. In both cases, the recovery was only partial as hamsters at 17 dpi were still performing significantly worse than prior infection.

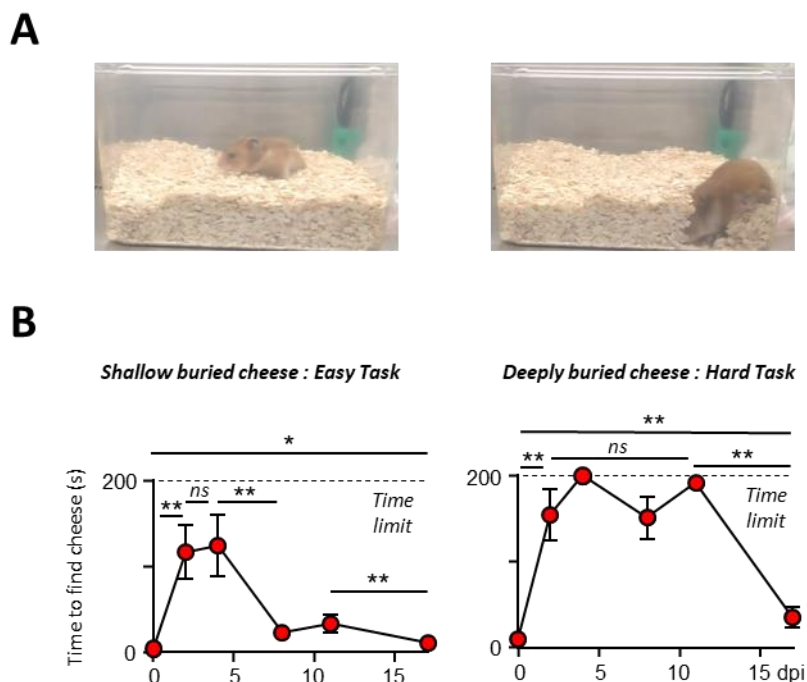


Figure 1: Evolution of olfactory abilities of SARS-CoV-2 infected hamsters (A) Representative images of a hamster scanning the surface for food (left) and digging for a deeply buried piece of cheese (right) (B) Amount of time taken to find a shallow or deeply buried piece of cheese (left and right respectively) at 6 different time points: Before infection, at 2, 4, 8, 11 and 17 dpi (Mean \pm SEM, n=6, Mann Whitney; ns: $P > 0.05$; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$). The animal has 200 seconds to find the food before the test ends.

Evolution of cellular population dynamics in the infected olfactory turbinates

In order to globally evaluate the impact of SARS-CoV-2 infection on the olfactory epithelium, we first measured the level of SARS E subgenomic RNA in olfactory turbinates. Its expression peaked at 1 and 2 dpi (days post infection) then decreased at 4 dpi and was detected at very low level from 8 dpi onward (**Fig. 2A**). We then studied the evolution of cell populations in the OE during the course of SARS-CoV-2 infection by measuring the relative expression of their hallmark genes. According to OMP expression in olfactory turbinates, mature olfactory neuron loss started at 4 dpi (**Fig. 2B**). This loss continued until 11 dpi then mature olfactory neuron population recovered without returning to the level of control animals. GAP43 expression related to immature olfactory neuron population strongly decreased equally at 4 dpi but started recovering between 8 dpi and 11 dpi, consistent with the delayed OMP increased. Last, we monitored sustentacular cell populations thanks to CK18 relative expression. Unlike other markers, the expression of CK18 was strongly enhanced at 4 dpi ($p < 0.01$) and gradually diminished to reach a level lower than prior infection at 17 dpi. In order to follow the regeneration of the OE, we measured the expression of the cell division marker Ki67. It decreased at 1 dpi compared to uninfected animals to gradually increase from 4 dpi to 11 dpi. Its expression started decreasing at 17 dpi but stayed higher than prior to infection.

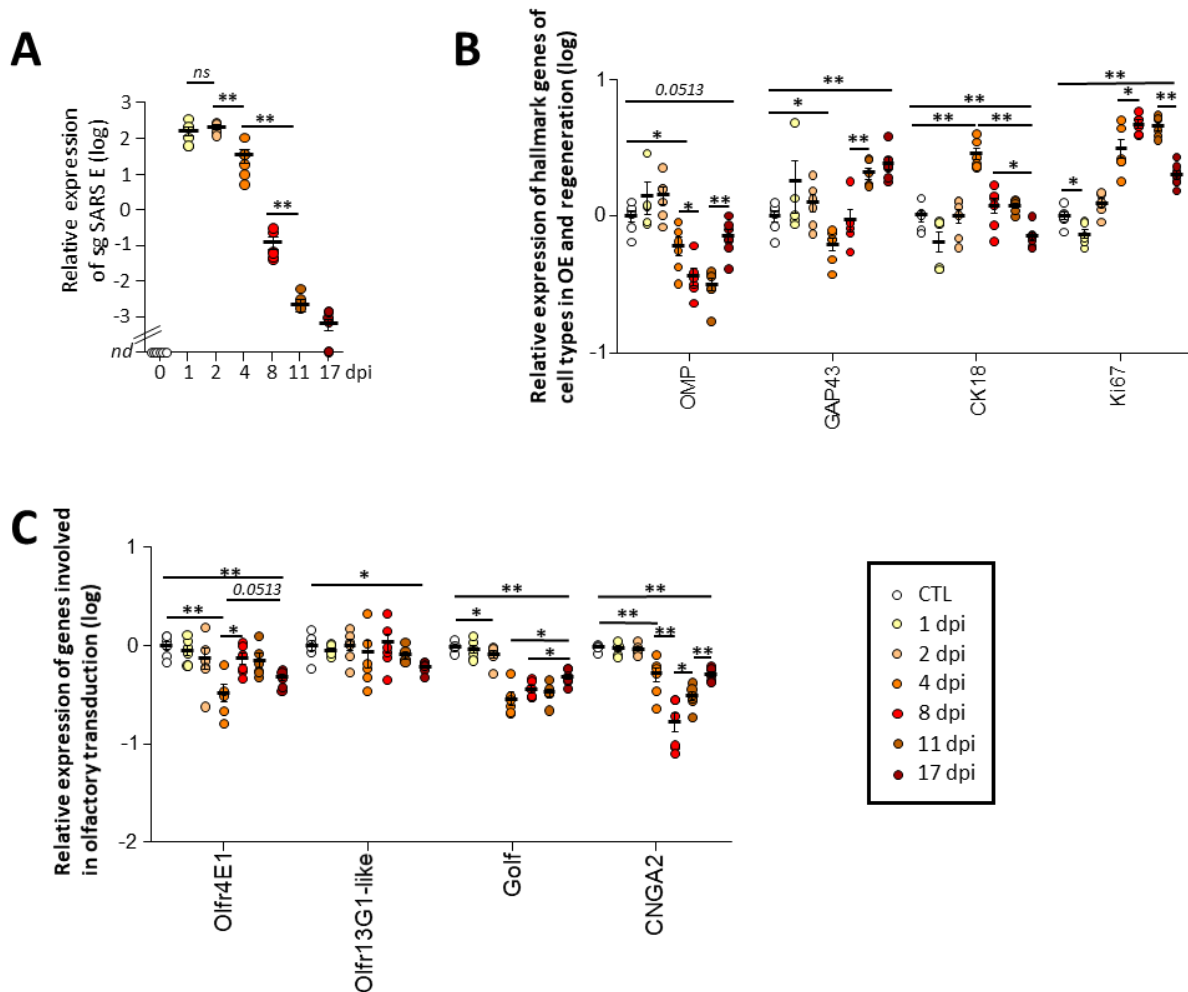


Figure 2: Olfactory neuron populations related transcript are highly impaired following SARS-CoV-2 infection. Relative evolution of different transcript prior infection to 17 dpi (days post infection): SARS-CoV-2 E subgenomic RNA (**A**). Markers of the principal cell types of olfactory epithelium (OMP for mature olfactory neurons, GAP43 for immature olfactory neurons and CK18 for sustentacular cells) and relative expression of Ki67 as a cell division marker (**B**) Two olfactory receptors (Olf4E1 and Olf13G1-like) and of two components of olfactory transduction (G_{olf} and CNGA2) (**C**). Relative expression means \pm SEM, $n=6$, Mann Whitney; (* $p<0.05$; ** $p<0.01$). nd: non detectable.

In order to better characterize the impact of the infection on the olfactory neuron population, we also measured the relative expression of two olfactory receptors (Olf4E1 et Olf13G1-like) and of two proteins involved in olfactory signal transduction (G_{olf} and CNGA2). The expressions of Olf4E1, G_{olf} and CNGA2 markedly drops at 4 dpi during early infection (**Fig. 2C**). The expression level of Olf4E1 is already recovered at 8 dpi. G_{olf} and CNGA2 expression level recover more slowly without reaching at 17 dpi the levels of control animals. Surprisingly, unlike the other genes expressed by olfactory neurons, the decrease of Olf13G1-like starts only at 17 dpi.

Spatiotemporal evolution of SARS-CoV-2 infection in the hamster olfactory turbinates and impact on cellular integrity and regeneration of the OE

We had previously observed that infection starts in the most anterior part of the olfactory turbinates then progress to the posterior part (Bourgon et al., 2022). Moreover, it has been shown in the posterior parts of the nasal cavity that the dorsomedian area remains infiltrated by innate immune cells as long as 42 dpi with a delay in olfactory neurons population recovery (Kishimoto-Urata et al., 2022). In order to examine representative areas of the nasal cavity following SARS-CoV-2 infection, we choose to characterize the evolution of infection and cellular dynamics in one anterior section of the nasal cavity and one posterior section separated in two areas (**Fig. 3**) prior and up to 17 dpi.

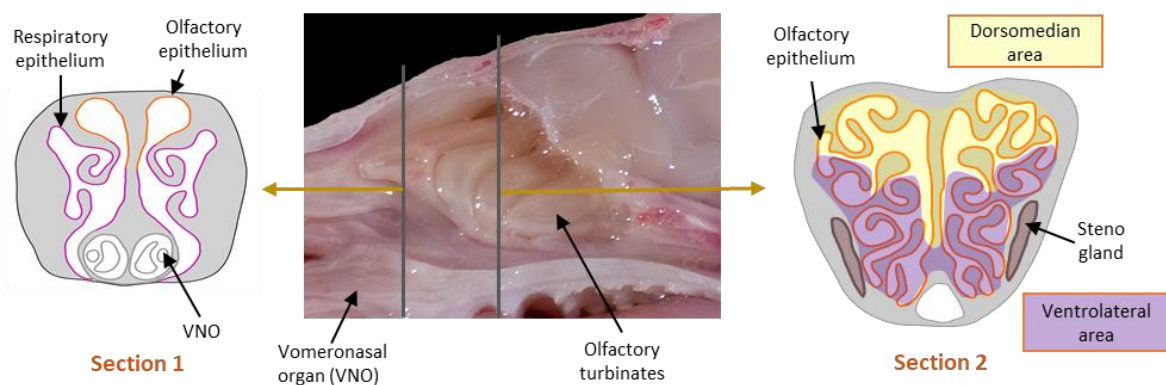


Figure 3: Focus on three areas of the hamster nasal cavity. Section 1 localized in an anterior part of olfactory turbinates. This section contains mainly respiratory epithelium and the vomeronasal organ but also olfactory epithelium in the dorsal part. The second section is localized in a central part of the olfactory turbinates. We studied separately the dorsomedian and ventrolateral parts showing different cellular dynamics in uninfected animals.

We studied the extent and the evolution of SARS-CoV-2 infection in the nasal cavity to define the time scale and spatial evolution of the acute infection. It began at 1 dpi in the anterior part and in the ventrolateral part of the central zone of the olfactory turbinates. In the dorsomedian part of the central section, infection started with a delay (**Fig. 4**). In the anterior section of the nasal cavity, the infection was nearly finished after 2 dpi. We observed differences in this zone between the olfactory and respiratory parts. The infection peaked at 1 dpi in the respiratory part and started decreasing at 2 dpi. In the olfactory epithelium, infection began at 1 dpi and was maximal at 2 dpi before decreasing significantly at 4 dpi. Conversely, in the central section of the nasal cavity, the infection finished after 4 dpi, infection staining being inexistant at 8 dpi in all animals. In dorsomedian and ventrolateral parts, the infection by SARS-CoV-2 peaked at 2 dpi. Thus, infection by SARS-CoV-2 in hamster nasal cavity starts in the anterior and ventral part of the olfactory turbinates and progresses to the dorsal and posterior part to be resolved after 4 dpi.

We previously published that the infected epithelium was rapidly damaged following innate immune cells infiltration leading to presence of cellular debris in the lumen of nasal cavity (Bourgon et al., 2022). In order to better characterize the impact of SARS-CoV-2 infection, we thus measured the presence of cellular debris in the lumen of the nasal cavity. In the anterior section of nasal cavity, the filling of nasal cavity with debris was maximal at 1 dpi and started decreasing after 2 dpi. Consistent with the observed delay in infection progression, the presence of debris was maximal at 4 dpi in the central part of the nasal cavity. These cellular debris were nearly cleared from 8 dpi onward (**Fig. 4E, 4F**).

We finally monitored the evolution of damages in the olfactory epithelium. In the anterior section of the nasal cavity, it followed the same trend than infection levels, peaking at 1 dpi and rapidly decreasing after 2 dpi. Similarly, in the central section of the nasal cavity, damage score peaked at 4 dpi and started decreasing significantly at 11 dpi. Globally, damage scores in these zones were still significantly higher at 17 dpi than prior infection (**Fig. 4F**).

We finally monitored the proliferation of basal cells through the study of Ki67⁺ cells. We did not observe any significant increase until 8 dpi (**Fig. 5**). We even measured a decrease of basal cell proliferation at 4 dpi in the ventrolateral zone of the central section. Basal cell activity was higher at 11 dpi than prior to infection in all observed zones of the OE. Some discrepancies could be observed between the different parts of the nasal cavity; proliferation level was maximum at 11 dpi in the ventrolateral area of the central section while it was at 8 dpi in the other zones. At 17 dpi, regeneration level was higher than prior to infection except in the anterior part of the OE where it returned to basal level.

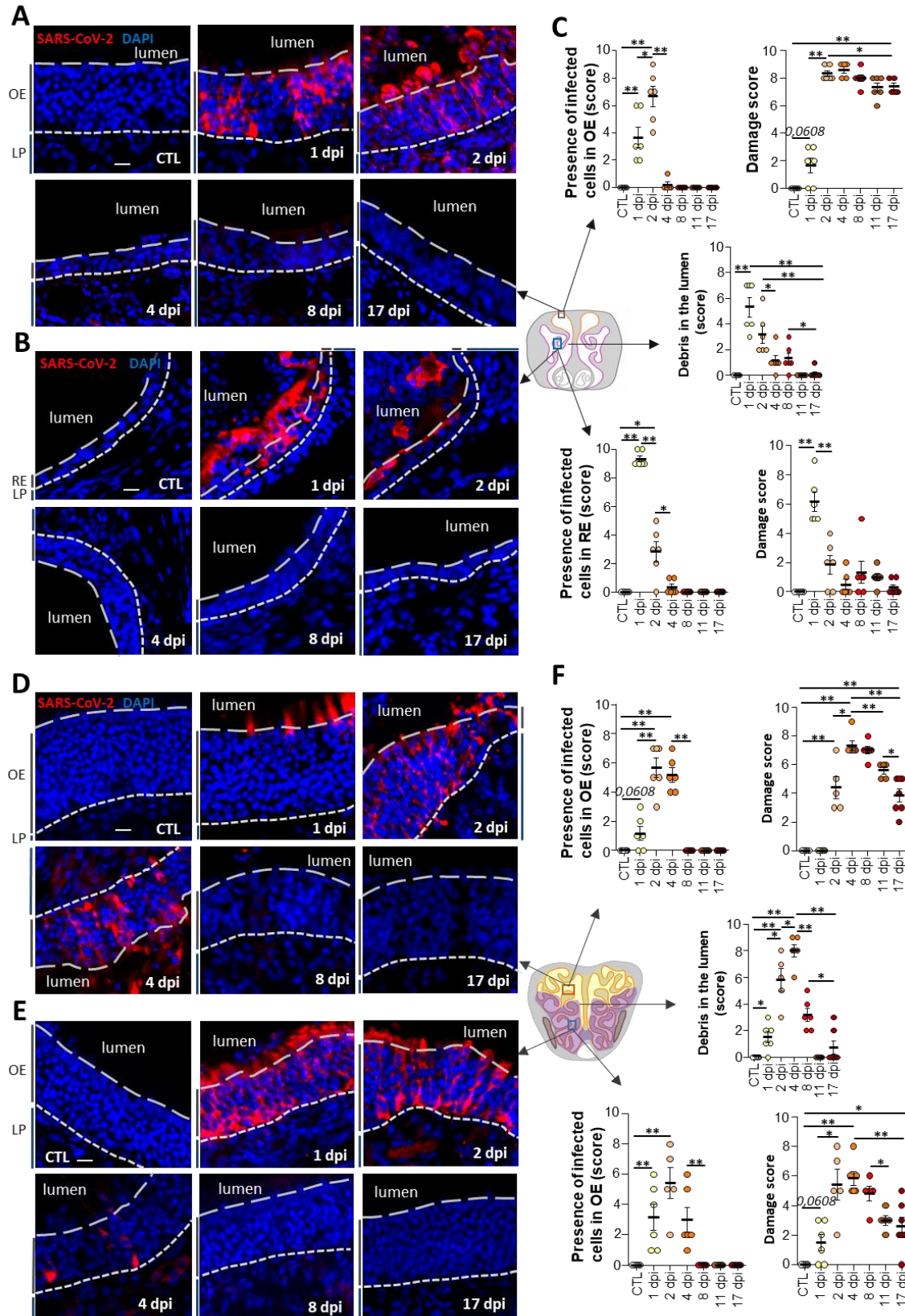


Figure 4: Spatiotemporal evolution of SARS-CoV-2 infection in the nasal cavity. Representative images of SARS-CoV-2 infection in the olfactory turbinates: Anterior with olfactory (A) or respiratory (B) epithelium and posterior in the dorsomedian (D) and ventrolateral (E) olfactory epithelium. Scores of SARS-CoV-2 infected cells; damage and presence of debris in the nasal cavity (E-F). Means \pm SEM, $n=6$, Mann Whitney; (ns $p > 0.05$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

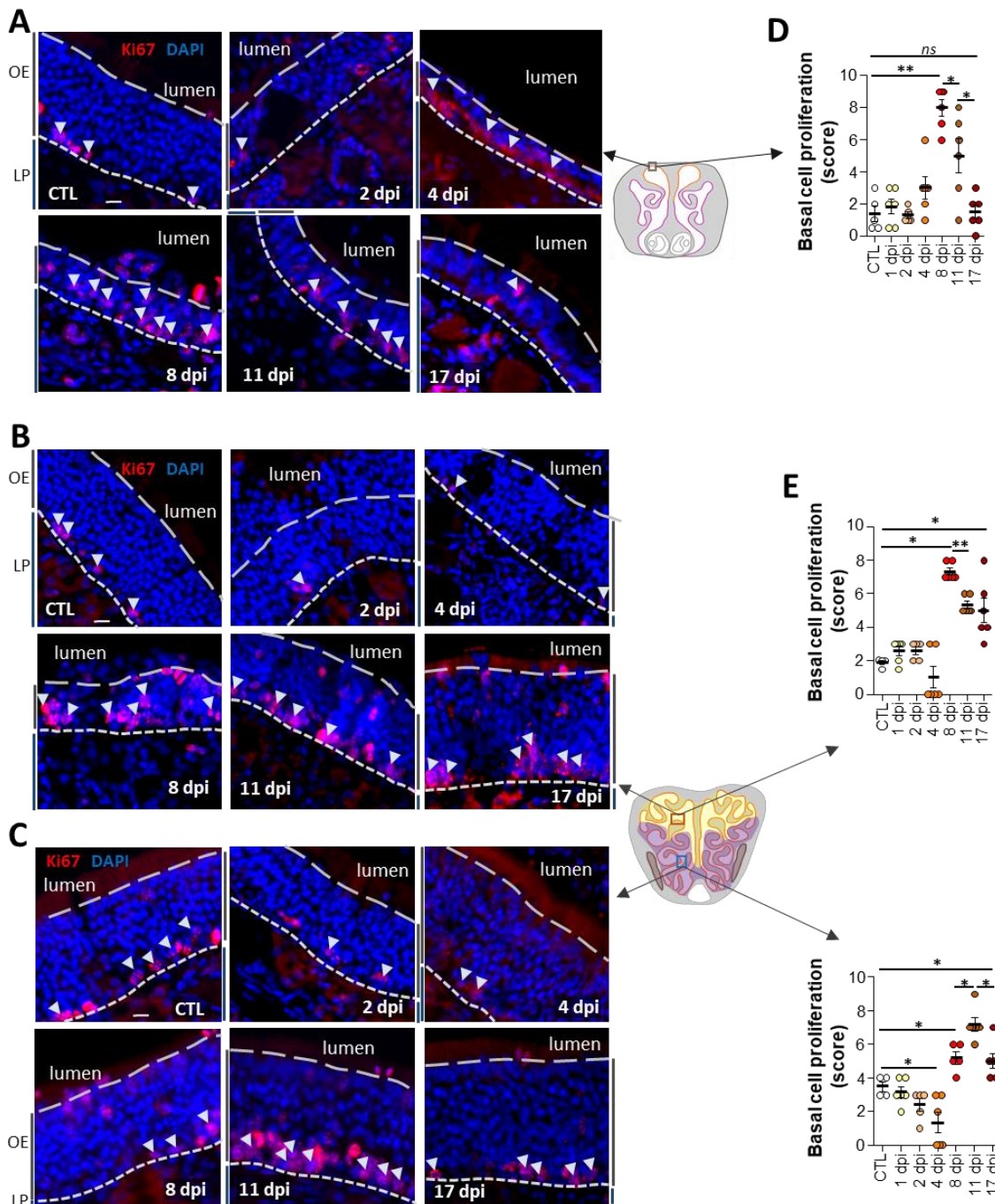


Figure 5: Spatiotemporal evolution of OE regeneration following SARS-CoV-2 infection. Representative images of Ki67 staining in the olfactory turbinates: Anterior (A); posterior in the dorsomedian (B) and ventrolateral (C) areas. Scores of Ki67⁺ cell level (D-E). Means \pm SEM, n=6, Mann Whitney; (ns $p > 0.05$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

Evolution of olfactory neuron population following SARS-CoV-2 infection

We next studied the evolution of GAP43⁺ immature olfactory neurons population. In control animals, immature olfactory neurons form a monolayer of cells located near the basal region of the olfactory epithelium (Fig. 6A). During the acute phase of SARS-CoV-2 infection between 1 dpi and 4 dpi, immature olfactory neurons were extruded in the lumen of nasal cavity during desquamation occurring between 1 and 4 dpi. During the late phase of SARS-CoV-2 infection, the number of immature

neurons in the olfactory neurons strongly increased and form a multilayer, with immature cells present in areas where only mature olfactory neurons should be. This holds particularly true in the dorsomedian central part of the nasal cavity where we observed CK18⁺ sustentacular cells present in the apical side of the OE (**Supplementary Figure 2 in construction**). Immature olfactory neuron population began to recover gradually until 17 dpi as their level of disorganization decreased without returning to control levels. This recovery was faster in the ventrolateral central part of olfactory turbinates (**Fig. 6D, E**).

We then investigated the overall state of mature olfactory neurons population. In control animals, mature olfactory neurons cellular bodies are organized as multilayers in the middle of the OE. They present a small round cell body with a dendrite reaching the surface of olfactory epithelium and presenting olfactory cilia containing high OMP level (**Fig. 7**). From 1 to 4 dpi corresponding to the acute SARS-CoV-2 infection phase, we observed a strong disorganization and a strong decrease of mature olfactory neurons (**Fig. 7D, E**). A large part of this population was extruded in the lumen of nasal cavity as observed previously (Bourgon et al., 2022). However, we observed strong spatiotemporal differences in the impact of SARS-CoV-2 infection on the mature olfactory neuron population. The OMP staining was impacted in the anterior part of the olfactory turbinates as early as 1 dpi and disappeared at 2 dpi with no recovery at 17 dpi. In the posterior part, the OMP signal in the dorsomedian area was reduced to a very low level as soon as 2 dpi (~20% compared to prior infection) without significant recovery at 17 dpi. Surprisingly, the OMP signal in the ventrolateral part of the central section started only to decrease at 4 dpi (~30% compared to prior infection) to reach its lower level at 11 dpi (~10% compared to prior infection). At 17 dpi, the mature olfactory neuron population in the ventrolateral OE started to recover but with high variability ($p = 0.0771$) (**Fig. 7E**). Several layers of cells stained with OMP could be observed in various regions of the ventrolateral olfactory epithelium at 17 dpi. However, the shape of their cell bodies appeared less ovoid and larger than in control animals (**Fig. 7C**).

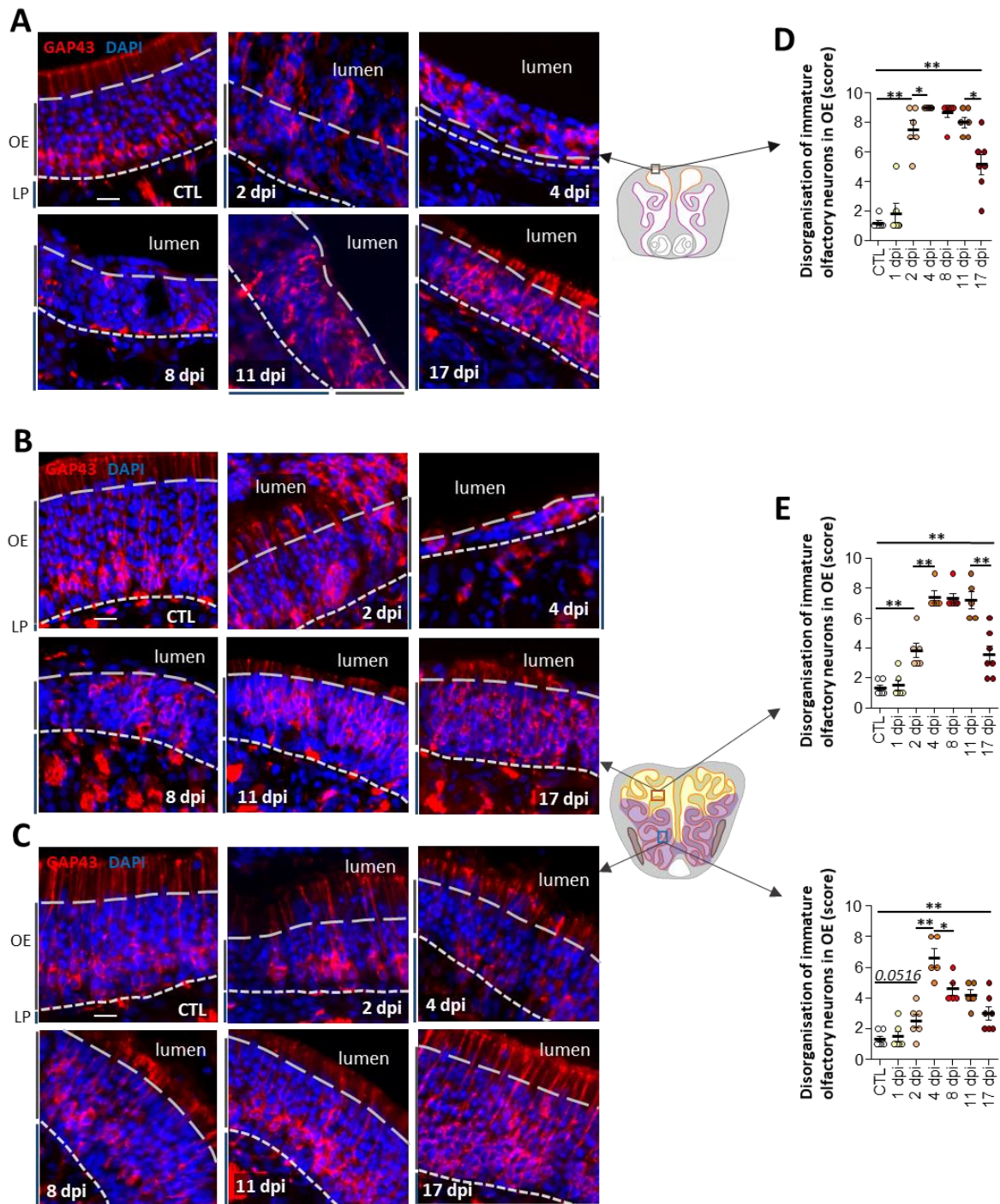


Figure 6: Spatiotemporal evolution of immature olfactory neuron population following SARS-CoV-2 infection. Representative images of GAP43 staining in the olfactory turbinates: Anterior (**A**); posterior in the dorsomedian (**B**) and ventrolateral (**C**) areas. Scores of GAP43 disorganization (**D-E**). Means \pm SEM, $n=6$, Mann Whitney; (ns $p > 0.05$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

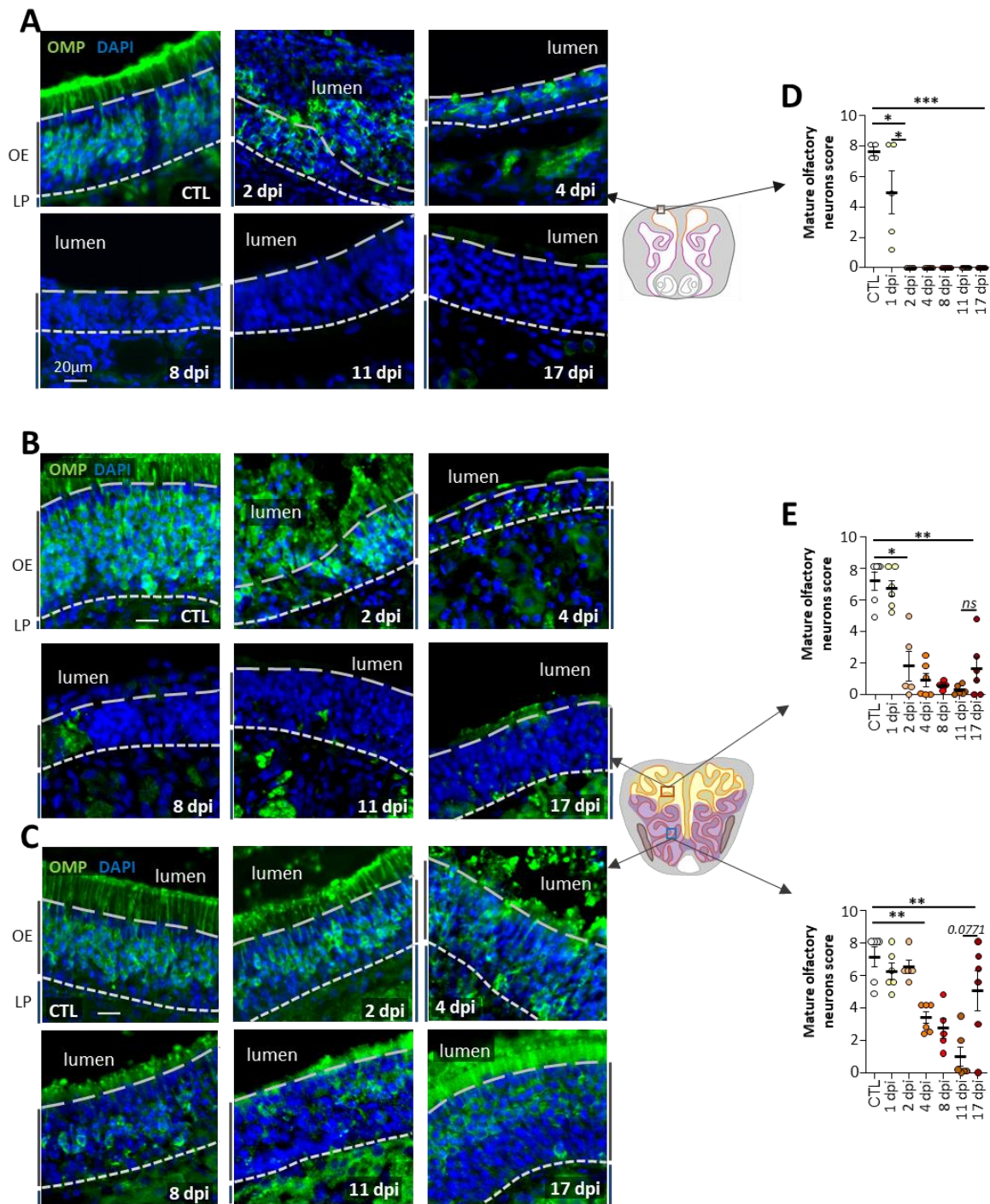


Figure 7: Spatiotemporal evolution of mature olfactory neuron population following SARS-CoV-2 infection. Representative images of OMP staining in the olfactory turbinates: Anterior (**A**); posterior in the dorsomedian (**B**) and ventrolateral (**C**) areas. Scores of OMP staining (**D-E**). Means \pm SEM, $n=6$, Mann Whitney; (ns $p > 0.05$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Evolution of innate immune cell population and cytokines level following SARS-CoV-2 infection

In order to explore the factors involved in the temporal variation of OE regeneration neuronal population, we measured the evolution of genes expression related to immune system. First, we studied components of interferon response that play a leading role in antiviral response (Bergeron et al., 2023). We measured the expression of type I interferon IFN- α produced by epithelial and innate immune cells as well as the type III interferons IFN- λ 3 known to be secreted by infected epithelial cells. We also measured the expression level of interferon-stimulated genes (ISG15 and Mx2). All were highly induced between 1 dpi and 4 dpi (**Fig. 8A**). Their expression level decreased from 8 dpi onward but remained more elevated than that of control animals except for IFN- λ 3 which became undetectable from 11 dpi onward.

In addition, we monitored the recruitment of innate immune cells during the course of infection that we had previously characterized (Bourgon et al., 2022); Iba1⁺ resident macrophages, Ncf2⁺ neutrophils, CD68⁺ M1 macrophages and CD163⁺ M2 macrophages. Iba1 and Ncf2 expression level became higher than control level as early as 1 dpi while CD68 and CD 163 level increased at 2 and 4 dpi respectively. They all reached their maximum expression level at 4 dpi then decreased gradually. Ncf2, CD68 and CD163 went back to similar level than prior infection at 8, 17, and 17 dpi respectively while Iba1 expression was still higher at 17 dpi than prior infection (**Fig. 8B**).

Finally, we monitored the expression of four inflammatory cytokines and chemokines (TNF- α , IL-6, IL-1 β and CXCL10) as well as anti-inflammatory and pro-resolving mediators (TGF- β , IL-10 and LIF - *Leukemia Inhibitory Factor*-). The expression of all inflammatory mediators strongly raised from 1 dpi and stayed high until 4 dpi. Their expression remained higher than in control animals at 17 dpi except for IL-6 expression coming back to prior infection level at 11 dpi (**Fig. 8C**). Surprisingly, expression of anti-inflammatory and pro-resolving mediators also raised as early as 1 dpi and reached their maximum at 2 dpi for LIF and 4 dpi for TGF- β and IL-10. It then decreased to reach prior infection level for IL-10 at 17 dpi contrary to TGF- β and LIF expression levels that remained higher (**Fig. 8D**).

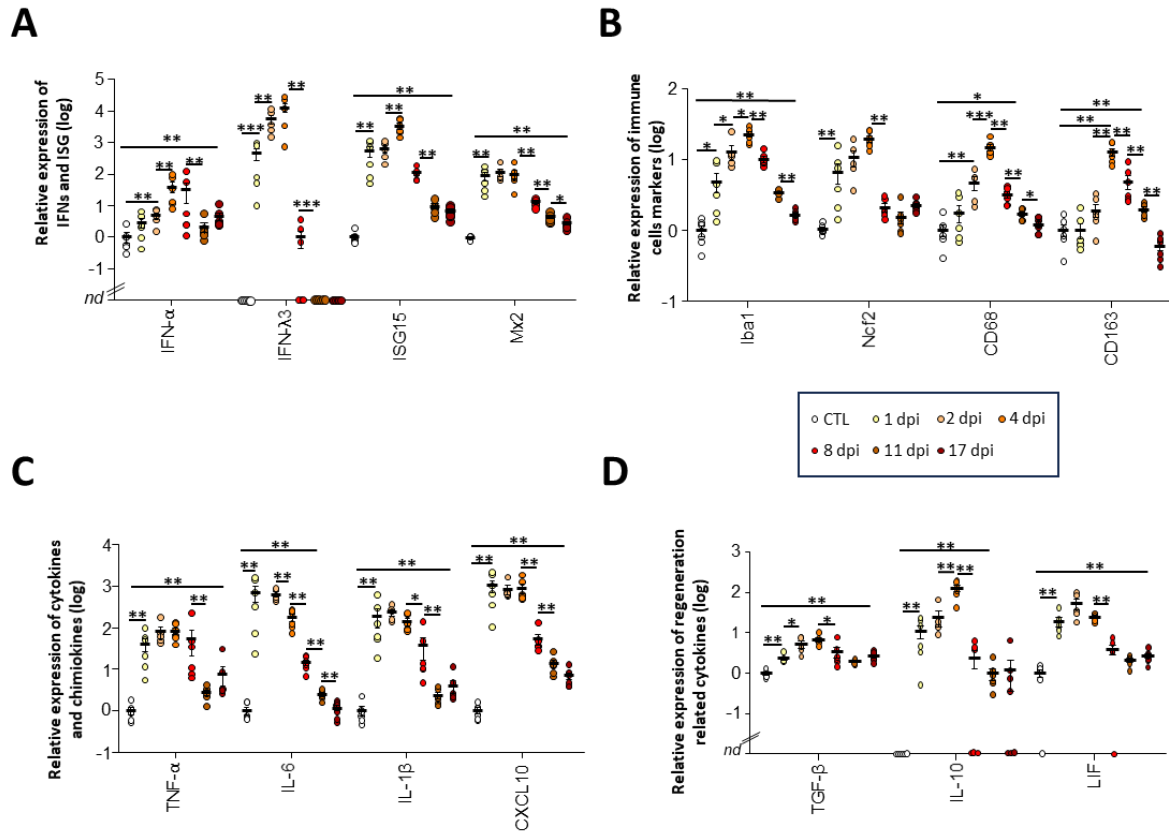


Figure 8: Temporal evolution of anti-inflammatory and pro-resolving mediators following SARS-CoV-2 infection. Relative genes expression in olfactory turbinates of: type I and type III interferons (*IFN-α* and *IFN-λ3*) and of two interferon-stimulated genes (*ISG15* and *Mx2*) in olfactory turbinates (**A**); *Iba1*, *Ncf2*, *CD68* and *CD163*; specific markers of resident macrophages, neutrophils, M1 pro-inflammatory macrophages and M2 anti-inflammatory macrophages respectively (**B**); inflammatory cytokines (*TNF-α*, *IL-6* and *IL-1β*) and the inflammatory chemokine *CXCL10* (**C**); anti-inflammatory mediators (*TGF-β*, *IL-10* and *LIF* -Leukemia inhibitory Factor-) (**D**). Relative expression means \pm SEM, $n=6$, Mann Whitney; (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$). nd: non detectable.

Discussion

The COVID-19 pandemic has shed light on the post viral olfactory disorders but after 3 years of increased research in this domain, the mechanisms leading to SARS-CoV-2 infection related loss of smell remains to be decipher (Chen and Wang, 2023; Tsukahara et al., 2023). While the initial infection of OE sustentacular cells followed by innate immune cells infiltration is now well established in both rodent model and humans (Bryche et al., 2020; Urata et al., 2021; Khan et al., 2022, 2021), the following events are less clear. Using the rodent models, several groups observed a massive desquamation of the OE with mature olfactory neuron loss (Chen et al., 2022; Yu et al., 2022; Zhang et al., 2020) and this loss seems to persist in some areas of the OE even after 42 dpi (Kishimoto-Urata et al., 2022). However one study using scRNAseq observed only an altered olfactory neuron genes expression without olfactory neuron population alteration even at 10 dpi (Zazhytska et al., 2022). In contrast, we recently confirmed by histology an important impact on the olfactory neuron population at 11 dpi with a strong decrease of

mature olfactory neuron population and disturbance of the immature olfactory neuron organization (Merle-Nguyen et al. 2023, in revision BBI). In order to improve our understanding on the early cellular and molecular events following SARS-CoV-2 infection in the OE, we explored extensively the spatiotemporal evolution of olfactory neuron population as well as OE regeneration and kinetic of various cytokines level evolution.

To improve the characterisation of olfactory performances in hamsters following SARS-CoV-2 infection, we used two different food buried test difficulties. It has been previously observed that some hamsters become anosmic at 2 dpi and recovers gradually from 8 dpi onward without reaching prior infection level before 35 dpi (Reyna et al., 2022). Our results confirmed that the smell loss was maximum as early as 2 dpi with a strong recovery at 8 dpi and 17 dpi for easy and hard task respectively without reaching prior infection level. Noteworthy, we observed that hamsters were in fact not anosmic but rather highly hyposmic as they always managed to find the food in the “easy” task (**Fig. 1B**).

In order to correlate the change in olfactory performances with molecular and cellular events in the OE, we measured the evolution of neuronal population and various genes expression. In pilot studies, we observed that infection begins as early as 1 dpi in the anterior part of the olfactory turbinates then progress to the posterior parts with a similar pattern between 2 and 4 dpi. Strong differences of SARS-CoV-2 impact have also been observed previously between dorsomedian and ventrolateral parts of the posterior olfactory turbinates (Kishimoto-Urata et al., 2022). We thus choose to focus in two sections representing 3 differently behaving zones of the olfactory turbinates during SARS-CoV-2 infection. **Figure 9** *(to be included in the final version)* summarizes the principal results. We first confirmed the strong spatial differences in the infection progress in the nasal cavity. The infection starts in the anterior part at 1 dpi and is already resolved at 4 dpi in this region (**Fig. 4E**). In contrast, the posterior part of the OE is only highly infected at 2 dpi and 4 dpi. These results are consistent with the early rise of pro-inflammatory cytokines (**Fig. 8C**). It may also explain the surprising early rise of anti-inflammatory cytokines (**Fig. 8D**) including IL-10 involved in the suppression of immune response and inflammation (Chang et al., 2009; de Waal Malefyt et al., 1991) and LIF secreted by resident macrophages and olfactory neurons to enhance the proliferation of basal cells (Bauer et al., 2003; Getchell et al., 2002). Indeed, our results show that the infection in the anterior part of the OE leads to complete olfactory loss at 2 dpi and a very strong impact at 1 dpi (**Fig. 7A**). As genes expression measures are performed on whole olfactory turbinates, it will not reflect that anti-inflammatory cytokine may only be expressed early in the anterior part of OE.

Our results clearly demonstrate an extended impact on mature olfactory neuron population but with a delay as the ventrolateral part of the OE was only affected from 4 dpi onward. It contrasts with the very early loss of smell observed at 2 dpi (**Fig. 1B**). Thus, the smell loss at 2 dpi cannot be linked

solely to the reduction of mature olfactory neurons population nor to an extended loss of olfactory cilia that we did not observe in the ventrolateral region of the OE at 2 dpi (*Supplementary figure 3; data in progress for final version*). Similarly, genes expression related to mature olfactory transduction was not impacted before 4 dpi (**Fig. 2C**). We however confirmed the massive presence of cellular debris in the lumen of the nasal cavity potentially preventing odorants to reach remaining functional olfactory neurons which seems the only explanation for the early and sudden smell loss at dpi when large parts of the OE still harbour seemingly functional mature olfactory neurons.

The infection was completely resolved at 8 dpi and this resolution occurred probably even earlier as we previously observed viral shedding at the limit of detection from 5 dpi nasal swabs (Merle-Nguyen et al. 2023, in revision BBI). Surprisingly, mature olfactory neuron population continued to regularly decrease especially in the ventrolateral part of the OE between 8 and 11 dpi (**Fig. 7**) when SARS-CoV-2 infection was completely absent (**Fig. 4F**). At 11 dpi, we observed an almost complete absence of OMP staining in all examined areas of the nasal cavity (**Fig. 7**); clearly showing a major impact of SARS-CoV-2 infection on the mature olfactory neuron population. We had previously observed that neutrophils played a major role in the early olfactory neuron loss (Bourgon et al., 2022) but they were absent from 8 dpi onward in the OE (**Fig. 8B**). The origin of this continuous diminution of mature olfactory neurons population may be related to the persistent high level of pro-inflammatory cytokine (**Fig. 8A**) but remained to be characterized.

The OMP staining started to appear again only in the ventrolateral part of the OE at 17 dpi. The delayed recovery of mature olfactory neuron population was consistent with the observed delayed regeneration of the OE. Indeed, Ki67 staining only increased from 8 dpi onward (**Fig. 5**). The strong basal cell proliferation starting around 8 dpi was consistent with the strong increase of immature neuron population at this stage (**Fig. 6**) as immature neurons are known to express GAP43 as early as 1 day post differentiation (Liberia et al., 2019). Interestingly, the lumen of the nasal cavity starts to be cleared from cellular debris in the lumen only from 8 dpi onward especially in the ventrolateral part of the OE which is consistent with the improved olfactory performances of hamsters for the "easy" task (**Fig. 1**). However, their performances did not improve for the "hard" task before 17 dpi consistent with the late rise of mature olfactory neuron population (**Fig. 7**). This result is also consistent with our recent work showing an improvement of olfactory performances following early corticoid treatment leading to improved regeneration of mature olfactory neuron population (Merle-Nguyen et al. 2023, in revision BBI). Overall, our results favour the origin of late smell loss related to mature olfactory neuron loss as observed in human biopsies from long lasting hyposmic post COVID-19 patients (Finlay et al., 2022).

Our results contrast with the scRNAseq study showing a disorganization of olfactory receptor expression in olfactory neurons without change in olfactory neuron population (Zazhytska et al., 2022).

However, this study did not present any histological data, was based on a relatively small numbers of cells (<100.000 cells from the olfactory mucosa) compared to an estimated number of 20 million for only the mature olfactory neuron population in hamsters (Schoenfeld and Knott, 2004). Furthermore, in this study the authors did not differentiate between immature and mature olfactory neurons and immature neurons are known to express multiple olfactory receptors (Tan et al., 2015).

The improved olfactory performances in the “easy task” were however not consistent at 11 dpi when OMP staining is at its lowest. A recent study had shown that immature neurons are able to convey pertinent olfactory information as early as 5 days post differentiation (Huang et al., 2022). At 11 dpi, we observed an important recovery of the immature neuron population in the ventrolateral part of the OE which could thus explain that hamsters could be successful to perform basic olfactory task with a very low level of mature olfactory neuron population but a raising population of immature olfactory neurons.

Finally, our results show that the anterior part of the olfactory turbinates as well as the dorsomedian part of the OE show little sign of recovery (**Fig. 6 and 7**) consistent with a previous study showing an impact on mature olfactory neuron population lasting at least to 42 dpi (Kishimoto-Urata et al., 2022). Strikingly, the presence of anti-inflammatory cytokines and M2 macrophages known to be involved in regeneration were almost at their level prior to infection at 17 dpi (**Fig. 8**). The regeneration process initiated by the destruction of the OE following SARS-CoV-2 infection seems thus to terminate too early. This is consistent with a study in mice showing that persistent inflammation switches the basal cells phenotype to immune defence rather than regeneration (Chen et al., 2019). Further studies are required to understand the precise cellular event leading to this phenomenon only in restricted area of the OE.

References

- Bauer, S., Rasika, S., Han, J., Mauduit, C., Raccurt, M., Morel, G., Jourdan, F., Benahmed, M., Moyses, E., Patterson, P.H., 2003. Leukemia inhibitory factor is a key signal for injury-induced neurogenesis in the adult mouse olfactory epithelium. *Journal of Neuroscience* 23, 1792–1803. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.23-05-01792.2003>
- Bergeron, H.C., Hansen, M.R., Tripp, R.A., 2023. Interferons—Implications in the Immune Response to Respiratory Viruses. *Microorganisms* 11, 2179. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11092179>
- Bilinska, K., Jakubowska, P., V. O. N. Bartheld CS, Butowt, R., 2020. Expression of the SARS-CoV-2 Entry Proteins, ACE2 and TMPRSS2, in Cells of the Olfactory Epithelium: Identification of Cell Types and Trends with Age. *ACS Chemical Neuroscience*. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.0c00210>
- Bourgon, C., Albin, A.S., Ando-Grard, O., Da Costa, B., Domain, R., Korkmaz, B., Klonejowski, B., Le Poder, S., Meunier, N., 2022. Neutrophils play a major role in the destruction of the olfactory epithelium during SARS-CoV-2 infection in hamsters. *Cellular and Molecular Life Sciences* 79, 1–16. <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04643-1>

Brann, D.H., Tsukahara, T., Weinreb, C., Lipovsek, M., Van den Berge, K., Gong, B., Chance, R., Macaulay, I.C., Chou, H.-J., Fletcher, R.B., Das, D., Street, K., de Bezieux, H.R., Choi, Y.-G., Risso, D., Dudoit, S., Purdom, E., Mill, J., Hachem, R.A., Matsunami, H., Logan, D.W., Goldstein, B.J., Grubb, M.S., Ngai, J., Datta, S.R., 2020. Non-neuronal expression of SARS-CoV-2 entry genes in the olfactory system suggests mechanisms underlying COVID-19-associated anosmia. *Sci. Adv.* 6, eabc5801. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abc5801>

Bryche, B., Frétaud, M., Saint-Albin Deliot, A., Galloux, M., Sedano, L., Langevin, C., Descamps, D., Rameix-Welti, M.A., Eléouët, J.F., Le Goffic, R., Meunier, N., 2019. Respiratory syncytial virus tropism for olfactory sensory neurons in mice. *Journal of Neurochemistry* 155, 137–153. <https://doi.org/10.1111/jnc.14936>

Bryche, B., St Albin, A., Murri, S., Lacote, S., Pulido, C., Ar Gouilh, M., Lesellier, S., Servat, A., Wasniewski, M., Picard-Meyer, E., Monchatre-Leroy, E., Volmer, R., Rampin, O., Le Goffic, R., Marianneau, P., Meunier, N., 2020. Massive transient damage of the olfactory epithelium associated with infection of sustentacular cells by SARS-CoV-2 in golden Syrian hamsters. *Brain, behavior, and immunity* 89, 579–586. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.06.032>

Butowt, R., Bilińska, K., von Bartheld, C., 2022. Why does the Omicron Variant Largely Spare Olfactory Function? Implications for the Pathogenesis of Anosmia in COVID-19. *The Journal of Infectious Diseases* jiac113. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiac113>

Chang, J., Kunkel, S.L., Chang, C.H., 2009. Negative regulation of MyD88-dependent signaling by IL-10 in dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 18327–18332. <https://doi.org/10.1073/pnas.0905815106>

Chen, M., Pekosz, A., Villano, J.S., Shen, W., Zhou, R., Kulaga, H., Li, Z., Beck, S.E., Witwer, K.W., Mankowski, J.L., Ramanathan, M., Rowan, N.R., Lane, A.P., 2022. Evolution of nasal and olfactory infection characteristics of SARS-CoV-2 variants. *bioRxiv* 2022.04.12.487379. <https://doi.org/10.1101/2022.04.12.487379>

Chen, M., Reed, R.R., Lane, A.P., 2019. Chronic Inflammation Directs an Olfactory Stem Cell Functional Switch from Neuroregeneration to Immune Defense. *Cell stem cell* 25, 501-513 e5. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2019.08.011>

Chen, S., Wang, S., 2023. The immune mechanism of the nasal epithelium in COVID-19–related olfactory dysfunction. *Front. Immunol.* 14, 1045009. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1045009>

de Waal Malefyt, R., Haanen, J., Spits, H., Roncarolo, M.-G., te Velde, A., Figdor, C., Johnson, K., Kastelein, R., Yssel, H., de Vries, J.E., 1991. Interleukin 10 (IL-10) and Viral IL-10 strongly reduce antigen-specific Human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *Journal of Experimental Medicine* 174, 915–924.

Finlay, J.B., Brann, D.H., Abi Hachem, R., Jang, D.W., Oliva, A.D., Ko, T., Gupta, R., Wellford, S.A., Moseman, E.A., Jang, S.S., Yan, C.H., Matsunami, H., Tsukahara, T., Datta, S.R., Goldstein, B.J., 2022. Persistent post-COVID-19 smell loss is associated with immune cell infiltration and altered gene expression in olfactory epithelium. *Sci. Transl. Med.* 14, eadd0484. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.add0484>

Fodoulian, L., Tuberosa, J., Rossier, D., Boillat, M., Kan, C., Pauli, V., Egervari, K., Lobrinus, J.A., Landis, B.N., Carleton, A., Rodriguez, I., 2020. SARS-CoV-2 receptors and entry genes are expressed in the human olfactory neuroepithelium and brain. *iScience* 101839. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101839>

- Gaun, V., Martens, J.R., Schwob, J.E., 2022. Lifespan of mature olfactory sensory neurons varies with location in the mouse olfactory epithelium and age of the animal. *Journal of Comparative Neurology*. <https://doi.org/10.1002/cne.25330>
- Getchell, T. V., Shah, D.S., Partin, J. V., Subhedar, N.K., Getchell, M.L., 2002. Leukemia inhibitory factor mRNA expression is upregulated in macrophages and olfactory receptor neurons after target ablation. *Journal of Neuroscience Research* 67, 246–254. <https://doi.org/10.1002/jnr.10090>
- Glezer, I., Malnic, B., 2019. Olfactory receptor function, in: *Handbook of Clinical Neurology*. Elsevier B.V., pp. 67–78. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63855-7.00005-8>
- Huang, J.S., Kunkhyen, T., Rangel, A.N., Brechbill, T.R., Gregory, J.D., Winson-Bushby, E.D., Liu, B., Avon, J.T., Muggleton, R.J., Cheetham, C.E.J., 2022. Immature olfactory sensory neurons provide behaviourally relevant sensory input to the olfactory bulb. *Nat Commun* 13, 6194. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-33967-6>
- Khan, M., Clijsters, M., Choi, S., Backaert, W., Claerhout, M., Couvreur, F., Van Breda, L., Bourgeois, F., Speleman, K., Klein, S., Van Laethem, J., Verstappen, G., Dereli, A.S., Yoo, S.-J., Zhou, H., Dan Do, T.N., Jochmans, D., Laenen, L., Debaveye, Y., De Munter, P., Gunst, J., Jorissen, M., Lagrou, K., Meersseman, P., Neyts, J., Thal, D.R., Topsakal, V., Vandenbrielle, C., Wauters, J., Mombaerts, P., Van Gerven, L., 2022. Anatomical barriers against SARS-CoV-2 neuroinvasion at vulnerable interfaces visualized in deceased COVID-19 patients. *Neuron* S0896627322010285. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.11.007>
- Khan, M., Yoo, S.-J., Clijsters, M., Backaert, W., Vanstapel, A., Speleman, K., Lietaer, C., Choi, S., Hether, T.D., Marcelis, L., Nam, A., Pan, L., Reeves, J.W., Van Bulck, P., Zhou, H., Bourgeois, M., Debaveye, Y., De Munter, P., Gunst, J., Jorissen, M., Lagrou, K., Lorent, N., Neyrinck, A., Peetermans, M., Thal, D.R., Vandenbrielle, C., Wauters, J., Mombaerts, P., Van Gerven, L., 2021. Visualizing in deceased COVID-19 patients how SARS-CoV-2 attacks the respiratory and olfactory mucosae but spares the olfactory bulb. *Cell* S0092867421012824. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.10.027>
- Killingley, B., Mann, A.J., Kalinova, M., Boyers, A., Goonawardane, N., Zhou, J., Lindsell, K., Hare, S.S., Brown, J., Frise, R., Smith, E., Hopkins, C., Noulin, N., Löndt, B., Wilkinson, T., Harden, S., McShane, H., Baillet, M., Gilbert, A., Jacobs, M., Charman, C., Mande, P., Nguyen-Van-Tam, J.S., Semple, M.G., Read, R.C., Ferguson, N.M., Openshaw, P.J., Rapeport, G., Barclay, W.S., Catchpole, A.P., Chiu, C., 2022. Safety, tolerability and viral kinetics during SARS-CoV-2 human challenge in young adults. *Nat Med* 28, 1031–1041. <https://doi.org/10.1038/s41591-022-01780-9>
- Kishimoto-Urata, M., Urata, S., Kagoya, R., Imamura, F., Nagayama, S., Reyna, R.A., Maruyama, J., Yamasoba, T., Kondo, K., Hasegawa-Ishii, S., Paessler, S., 2022. Prolonged and extended impacts of SARS-CoV-2 on the olfactory neurocircuit. *Scientific Reports* 12, 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-09731-7>
- Liberia, T., Martin-Lopez, E., Meller, S.J., Greer, C.A., 2019. Sequential maturation of olfactory sensory neurons in the mature olfactory epithelium. *eNeuro* 6, 1–19. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0266-19.2019>
- Meunier, N., Briand, L., Jacquin-Piques, A., Brondel, L., Pénicaud, L., 2021. COVID 19-Induced Smell and Taste Impairments: Putative Impact on Physiology. *Frontiers in physiology* 11. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.625110>
- Moon, C., Yoo, J.Y., Matarazzo, V., Sung, Y.K., Kim, E.J., Ronnett, G. V., 2002. Leukemia inhibitory factor inhibits neuronal terminal differentiation through STAT3 activation. *Proceedings of the National*

Academy of Sciences of the United States of America 99, 9015–9020. <https://doi.org/10.1073/pnas.132131699>

Muller, P.Y., Janovjak, H., Miserez, A.R., Dobbie, Zuzana., 2002. Processing of gene expression data generated by quantitative real time RT-PCR. *Biotechniques* 32, 1378–1379.

Reyna, R.A., Kishimoto-Urata, M., Urata, S., Makishima, T., Paessler, S., Maruyama, J., 2022. Recovery of anosmia in hamsters infected with SARS-CoV-2 is correlated with repair of the olfactory epithelium. *Sci Rep* 12, 628. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-04622-9>

Schoenfeld, T.A., Knott, T.K., 2004. Evidence for the disproportionate mapping of olfactory airspace onto the main olfactory bulb of the hamster. *J of Comparative Neurology* 476, 186–201. <https://doi.org/10.1002/cne.20218>

Schwob, J.E., Jang, W., Holbrook, E.H., Lin, B., Herrick, D.B., Peterson, J.N., Hewitt Coleman, J., 2017. Stem and progenitor cells of the mammalian olfactory epithelium: Taking poietic license. *J Comp Neurol* 525, 1034–1054. <https://doi.org/10.1002/cne.24105>

Storm, N., Crossland, N.A., McKay, L.G.A., Griffiths, A., 2022. Comparative pathogenicity of SARS-CoV-2 Omicron and Delta variants in Syrian hamsters mirrors the attenuated clinical outlook of Omicron in COVID-19 irrespective of age (preprint). *Microbiology*. <https://doi.org/10.1101/2022.03.02.482662>

Tan, B.K.J., Han, R., Zhao, J.J., Tan, N.K.W., Quah, E.S.H., Tan, C.J.-W., Chan, Y.H., Teo, N.W.Y., Charn, T.C., See, A., Xu, S., Chapurin, N., Chandra, R.K., Chowdhury, N., Butowt, R., von Bartheld, C.S., Kumar, B.N., Hopkins, C., Toh, S.T., 2022. Prognosis and persistence of smell and taste dysfunction in patients with covid-19: meta-analysis with parametric cure modelling of recovery curves. *BMJ* e069503. <https://doi.org/10.1136/bmj-2021-069503>

Tan, L., Li, Q., Xie, X.S., 2015. Olfactory sensory neurons transiently express multiple olfactory receptors during development. *Molecular Systems Biology* 11, 844. <https://doi.org/10.15252/msb.20156639>

Tsukahara, T., Brann, D.H., Datta, S.R., 2023. Mechanisms of SARS-CoV-2 Associated Anosmia. *Physiological Reviews* physrev.00012.2023. <https://doi.org/10.1152/physrev.00012.2023>

Urata, S., Kishimoto-Urata, M., Kagoya, R., Imamura, F., Nagayama, S., Reyna, R.A., Maruyama, J., Yamasoba, T., Kondo, K., Hasegawa-Ishii, S., Paessler, S., 2021. Prolonged and extended impacts of SARS-CoV-2 on the olfactory neurocircuit. *bioRxiv* 2021.11.04.467274. <https://doi.org/10.1101/2021.11.04.467274>

Verma, A.K., Zheng, J., Meyerholz, D.K., Perlman, S., 2022. SARS-CoV-2 infection of sustentacular cells disrupts olfactory signaling pathways. *JCI Insight* 7, e160277. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.160277>

von Bartheld, C.S., Wang, L., 2023. Prevalence of Olfactory Dysfunction with the Omicron Variant of SARS-CoV-2: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Cells* 12, 430. <https://doi.org/10.3390/cells12030430>

Yang, M., Crawley, J.M., 2009. Simple behavioral assessment of mouse olfaction. *Currents Protocols in Neuroscience* 48, 1–8.

Yu, P., Deng, W., Bao, L., Qu, Y., Xu, Y., Zhao, W., Han, Y., Qin, C., 2022. Comparative pathology of the nasal epithelium in K18-hACE2 Tg mice, hACE2 Tg mice, and hamsters infected with SARS-CoV-2. *Vet Pathol* 030098582110710. <https://doi.org/10.1177/03009858211071016>

Zazhytska, M., Kodra, A., Hoagland, D.A., Frere, J., Fullard, J.F., Shayya, H., McArthur, N.G., Moeller, R., Uhl, S., Omer, A.D., Gottesman, M.E., Firestein, S., Gong, Q., Canoll, P.D., Goldman, J.E., Roussos, P., tenOever, B.R., Jonathan B. Overvest, Lomvardas, S., 2022. Non-cell-autonomous disruption of nuclear

architecture as a potential cause of COVID-19-induced anosmia. Cell S0092867422001350. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.01.024>

Zhang, A.J., Lee, A.C., Chu, H., Chan, J.F., Fan, Z., Li, C., Liu, F., Chen, Y., Yuan, S., Poon, V.K., Chan, C.C., Cai, J.P., Wu, K.L., Sridhar, S., Chan, Y.S., Yuen, K.Y., 2020. SARS-CoV-2 infects and damages the mature and immature olfactory sensory neurons of hamsters. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa995>

Gene	Forward primer	Reverse primer
Dicer	GGCTTTTACACATGCCTCCTACC	GTCCAAAATCGCATCTCCCAG
SARS E sgRNA	CGATCTCTTGTAGATCTGTTCTC	ATATTGCAGCAGTACGCACACA
OMP	TCACCAACCTCATGACACGC	GCATCGGCCTCATTCCAATC
GAP43	TGCCAAGGAGGAGCCTAAAC	TTGGCTTCATCTACAGCTTCTTTC
CK18	ACCCAGTCTGCTGAAATCCG	TGTTCTCCAAGCCGATTTTCTGA
Ki67	TGCCTGTTTCGGAAGGAGTATT	AGCCCCATTTACTTGCGTTG
Olf4E1	AGGACAATGGCCATCATACTCAA	TAGCCATCTGCACCTTTGGA
Olf13G1-like	TCTGCCGGCCATTGCATTAT	ACACCAGACAAGTGAGCACC
G_{olf}	TGCTTCTGGGGGCTGGT	TTTCAGGATTGGCCAGTGGG
CNGA2	GAGATGGAAAGGGCTCTAAGAAGA	GAAGTAGTCCAGCACCAGCC
IFN-α	AGACTGGGAGTTGCCTGTGA	GAGGAATCCAGGGCTTTCCAG
IFN-λ3	TCACATAGCCCGTTCAAGTC	TTCTTGAGCAGCCACTCTTCTATG
ISG15	TCTATGAGGTCCGGCTGACA	GCACTGGGGCTTTAGGTCAT
Mx2	AGGCAGTGGTATTGTCACCAG	ATCACTGATCCCCAGGGATCTG
Iba1	TGGATGAGATCAACAAGCAATTC	AAGGCTTCCAGTTTGGAGGG
Ncf2	ATGTTCAATGGACAGAAGGGGC	TGGGATCTTTCTGGGGCACT
CD68	CACTTGGGGCCATGTTTCTC	CTCGGGTAATGCAGAAGGCA
CD163	CAGATACAGTGGCTTACAGTTTCC	CCATCAGCATTAAAATCATTGGCAT
TNF-α	AACTCCAGCCGGTGCCTAT	G TTCAGCAGGCAGAAGAGGATT
IL-6	CCACGGAGAAAGACCTCATCTG	TCGGTATGCTAAGGCACAG
IL-1β	ATCTTCTGTGACTCCTGG	GGTTTATGTTCTGTCCGT
CXCL10	CTCTACTAAGAGCTGGTCC	CTAACACACTTTAAGGTGGG
TGF-β	GCGGCAGCTGTACATCGA	GGCTCGTGAATCCACTTCCA
IL-10	GGTTGCCAAACCTTATCAGAAATG	TTCACCTGTTCCACAGCCTTG
LIF	AATGAAGGTCTTGGCCGCA	CCCCTTGAGCTGTGTAATAGGAA

Supplementary table 1 : Sequences of primers used in this study.

3. Article 3 : Lien entre inflammation et régénération des population neuronales.

Dans cette étude, j'ai surtout participé au choix des marqueurs analysés par RT-qPCR et à l'analyse des résultats de ces expériences. Les immunohistochimies et leurs analyses ont été effectuées par Laëticia Merle, actuellement à l'Université de Dijon et Ophélie Ando-Grand.

Pour mieux comprendre le rôle de l'inflammation dans les défauts de régénération observés dans l'épithélium olfactif après l'infection par le SARS-CoV-2, nous avons mis en place une troisième étude étudiant les effets sur l'épithélium d'un traitement par des anti-inflammatoires comme la dexaméthasone, un glucocorticoïde de synthèse³⁶³. Ces corticoïdes inhibent la vasodilatation et l'augmentation de la perméabilité vasculaire qui favorise le passage des cellules immunitaires vers le site d'inflammation³⁶³. De plus, les corticoïdes diminuent également l'expression de cytokines pro-inflammatoires et de molécules d'adhésion par les cellules immunitaires³⁶³. Les glucocorticoïdes bloquent les macrophages en polarisation anti-inflammatoire³⁶³. Donc la dexaméthasone diminue le recrutement des cellules immunitaires et inhibe les fonctions inflammatoires des macrophages.

Dans ces expériences, les traitements dexaméthasone ont été administrés aux hamsters syriens dorés tous les jours à partir de 2 jours post-infection, quand les pertes de l'odorat et les dommages à l'épithélium olfactif deviennent significatifs. Ces expériences nous permettront de mieux comprendre le rôle de l'inflammation sur l'état du tissu pendant les phases de résolution de l'infection et de régénération du tissu.

Nous montrons que les performances olfactives des animaux traités avec la dexaméthasone sont améliorées par rapport aux animaux contrôles. Cette amélioration est associée à une augmentation des marqueurs de macrophage M2 comme CD163 dans chez les animaux traités dexaméthasone par rapport aux animaux contrôle. Au contraire, les marqueurs de macrophage M1 comme CD68 et la cytokine pro-inflammatoire IL-6 diminuent chez les animaux traités dexaméthasone par rapport aux animaux contrôle. De plus, les neurones olfactifs matures présents en ventrolatéral semblent soit être moins affectés par l'infection soit récupérer plus rapidement. Cette étude confirme les résultats de l'article 2 qui associent les pertes d'odorats à un impact sur les populations de neurones matures.

Early corticosteroid treatment enhances recovery from SARS-CoV-2 induced anosmia in hamster

Laetitia Merle-Nguyen¹, Ophélie Ando-Grard¹, Clara Bourgon¹, Audrey St Albin¹, Bernard Klonjkowski², Sophie Le Poder², Nicolas Meunier¹

¹Unité de Virologie et Immunologie Moléculaires (UR892), INRAE, Université Paris-Saclay, Jouy-en-Josas, France

²UMR 1161 Virologie, INRAE-ENVA-ANSES, École Nationale Vétérinaire d'Alfort, Maisons-Alfort, 94704 Paris, France

Corresponding author: nicolas.meunier@inrae.fr

Nicolas Meunier (VIM, INRA-Biotechnologies Bat 440, 78352 Jouy-en-Josas Cédex)

Keywords: olfaction; nasal cavity; dexamethasone; respiratory virus; olfactory; smell

Abbreviations: Olfactory sensory neuron OSN, Olfactory epithelium OE

Word count: 8895

Abstract

Among the numerous long COVID symptoms, olfactory dysfunction persists in ~10% of patients suffering from SARS-CoV-2 induced anosmia. Among the few potential therapies, corticoid treatment has been used for its anti-inflammatory effect with mixed success in patients. In this study, we explored its impact using hamster as an animal model. SARS-CoV-2 infected hamsters lose their smell abilities and this loss is correlated with damage of the olfactory epithelium and persistent presence of innate immunity cells. We started a dexamethasone treatment 2 days post infection, when olfaction was already impacted, until 11 days post infection when it started to recover. We observed an improvement of olfactory capacities in the animals treated with corticoid compared to those treated with vehicle. This recovery was not related to differences in the remaining damage to the olfactory epithelium, which was similar in both groups. This improvement was however correlated with a reduced inflammation in the olfactory epithelium with a local increase of the mature olfactory neuron. Surprisingly, at 11 days post infection, we observed an increased and disorganized presence of immature olfactory neurons, especially in persistent inflammatory zones of the epithelium. This unusual population of immature olfactory neurons coincided with a strong increase of olfactory epithelium proliferation in both groups. Our results indicate that persistent inflammation of the olfactory epithelium following SARS-CoV-2 infection may alter the extent and speed of regeneration of the olfactory neuron population, and that corticoid treatment is effective to limit inflammation and improve olfaction recovery following SARS-CoV-2 infection.

Introduction

The COVID-19 pandemic is characterized by an unprecedented number of olfactory disorders cases. The first variants are responsible for up to 50% of these symptoms (von Bartheld et al., 2021) and, while it is less frequent with the Omicron variant, ~10% of infected patients still report olfactory disorder (von Bartheld and Wang, 2023). The disturbance of odorant perception can have a profound impact on quality of life, as this sense is essential not only for feeding behavior but also for detection of imminent danger such as gas or smoke (Meunier et al., 2021) and loss of smell is linked to an increased risk of depression and death (Van Regemorter et al., 2020). Most patients recover their olfactory capacities in a few months, but at least ~5% still suffer from persistent olfactory disorders, including anosmia, *i.e.* a total loss of smell (Tan et al., 2022).

Loss of smell was already widespread in ~5% of the population prior to the pandemic (Whitcroft et al., 2023), mainly related to chronic rhinosinusitis, but for about 25% of cases to viral infection (Okumura et al., 2022). While many therapeutic options to recover from post-viral infection disorders (PVOD) have been explored since the surge in COVID-19 cases, two main treatments have emerged: olfactory training and corticoid treatment (Huart et al., 2021; Nag et al., 2023; Rashid et al., 2021; Tragoonrunsea et al., 2023; Vaira et al., 2021). Olfactory training helps to recover (Pieniak et al., 2022), but the effectiveness of corticoid treatment appears variable according to the protocol used (Hintschich et al., 2022; Hosseinpoor et al., 2022). In addition to variations in the timing of treatment after the onset of the olfactory disorder, corticoids can be used locally or systematically, which could explain their inconsistency (Pendolino et al., 2022). Most studies showing positive results conclude that larger cohorts are required to demonstrate effectiveness (Le Bon et al., 2021).

Olfaction starts in the olfactory epithelium (OE), which contains olfactory sensory neurons (OSNs) surrounded by supporting cells called sustentacular cells. The epithelium continuously renews itself as both cell types undergoes regular apoptosis and are regenerated through multipotent basal cells (Schwob et al., 2017). We and others observed in the golden Syrian hamster model that SARS-CoV-2 massively infects the sustentacular cells in the OE, leading to its desquamation (Bryche et al., 2020; Kishimoto-Urata et al., 2022). This desquamation occurs coincident with olfactory neuron deciliation and release of these cells into the lumen of the nasal cavity, where they undergo apoptosis (Bourgon et al., 2022). It has been confirmed in humans that anosmia arises primarily from infection of the sustentacular cells of the OE followed by disruption of OE integrity without OSN infection (Khan et al., 2021). We have previously observed that innate immune cells play a major role in the destruction of the infected OE (Bourgon et al., 2022) and it has been shown that the number of resident macrophage increases as long as 42 days post infection (dpi) (Kishimoto-Urata et al., 2022). As SARS-CoV-2 infection resolves in the nasal cavity after 4 dpi (Bryche et al., 2020), the increased presence of innate immune cells in the OE

persists long after the resolution of infection and may explain the delay in resolution of the olfactory disorder. These data from animal studies have been confirmed in human, since a comparative study showed a lower level of olfactory neurons and an increased presence of immune cells in OE biopsies from patients who did not recover from COVID-19-associated olfactory disorders (Finlay et al., 2022). Overall, these results indicate that persistent inflammation may be an important factor that contributes to long-lasting olfactory disorders, and that corticoid treatment should be beneficial.

As in-depth study of their effectiveness to improve COVID-19 associated olfactory disorders is difficult to achieve in humans, we used Syrian golden hamsters which display the pathophysiology of mild COVID-19, including loss of smell (Reyna et al., 2022). We treated hamsters by subcutaneous injection of dexamethasone with an anti-inflammatory dose (1.5 mg/kg) starting at 2 dpi when the animals already display smell loss (Reyna et al., 2022) and examined them at 11 dpi when olfaction starts to recover in non-treated animals.

Material and methods

SARS-CoV-2 isolates

In vivo experiments were carried out with SARS-CoV-2 strain BetaCoV/France/IDF/200107/2020, which was isolated by Dr. Paccoud from the La Pitié-Salpêtrière Hospital in France. This strain was kindly provided by the Urgent Response to Biological Threats (CIBU) hosted by Institut Pasteur (Paris, France), headed by Dr. Jean-Claude Manuguerra.

Animals

Twenty-four 8 weeks-old male hamsters were purchased from Janvier's breeding Center (Le Genest, St Isle, France). Animal experiments were carried out in the animal biosafety level 3 facility of the UMR Virologie (ENVA, Maisons-Alfort); approved by the ANSES/EnvA/UPEC Ethics Committee (CE2A16) and authorized by the French ministry of Research under the number APAFIS#25384-2020041515287655. Weight and welfare of animals were measured and evaluated daily. Six animals were not infected and used as a control. Eighteen hamsters were infected by nasal instillation (40 μ L in each nostril with 5.10^3 TCID₅₀ of SARS-CoV2 strain BetaCoV/France/IDF/200107/2020) under isoflurane anesthesia as previously described (Bourgon et al., 2022). At 2 dpi, 6 animals were euthanized to document pathophysiology prior to dexamethasone treatment. The remaining twelve animals received daily dexamethasone subcutaneously (1.5 mg/kg; Rapidexon) or the vehicle (300 μ L PBS with 3.75 mg/mL benzylic alcohol). This dose was successfully used to reduce inflammation during SARS-CoV-2 infection in the hamster model (Wyler et al., 2022; Yuan et al., 2022). Nasal swabs were performed daily to measure the viral load secreted by brushing the nostrils of the animal from 1 to 5 dpi. Olfactory performance was measured 2 days prior to infection, then at 2 and 11 dpi. An extra food pellet colored

in red was offered daily to measure supplementary food consumption as a sign of food intake. At 11 dpi, animals were euthanized. Heads were divided sagittally into two halves, one of which was used for immunohistochemistry experiments. The nasal turbinates and olfactory bulb were extracted from the other half for qPCR analysis.

Viral titration of nasal swabs

Nasal swabs were diluted in 400 μ L of DMEM medium supplemented with 1% sodium pyruvate and antibiotics and stored at -80°C until titration by tissue culture infectious dose 50% (TCID₅₀) as described previously (Thébault et al., 2022). Briefly, each nasal swab was serially diluted within DMEM containing 1% Sodium Pyruvate and 1% antibiotics (Penicillin/Streptomycin) by 10^{-1} to 10^{-6} for 1 to 3 dpi and 10^{-1} for 4 and 5 dpi. After 1h30 incubation at 37°C with Vero E6 cells, the medium was supplemented with 5% FCS and graded 4 days later according to an all-or-nothing scoring method for the presence of a viral cytopathic effect. Infectious titers were expressed as TCID₅₀ per mL according to the Spearman Karber method (Ramakrishnan, 2016).

Behavior experiments

To assess the olfactory ability of hamsters, we used the buried food test (Yang and Crawley, 2009). We found Emmental cheese to be much more attractive than the sweet food conventionally used with mice and used it as food stimulus. Hamsters get used to Emmental after leaving one small piece (10 x 4 x 2 mm) in their home cage overnight. They start actively digging for it after a single 5-min habituation session in a test cage filled with 5 cm of bedding with a piece of cheese accessible directly on the surface. This test cage was then used for two different conditions named "easy task" or "hard task", which consisted in burying the cheese at 1 or 5 cm depth respectively. Animal activity was recorded for 200 seconds, and the time taken to find the cheese was afterwards measured by analyzing the video blind to the treatment.

Histology, immunohistochemistry and quantifications

The immunohistochemistry analysis of the olfactory mucosa tissue sections was performed as described previously in mice (Bryche et al., 2019). Briefly, animal hemi-heads were fixed for 3 days at room temperature in 4% paraformaldehyde (PFA) and decalcified in Osteosoft (101728; Merck Millipore; Saint-Quentin Fallavier; France) for 3 weeks. Blocks were cryoprotected in 30% sucrose. Cryo-sectioning (12 μ m) was performed to generate coronal sections of the nasal cavity. Sections were stored at -80°C until use.

For immunohistochemistry, non-specific staining was blocked by incubation with 2% bovine serum albumin (BSA) and 0.1% Triton. Sections were then incubated overnight with primary antibodies directed against SARS Nucleocapsid protein (1/1000; mouse monoclonal; clone 1C7C7; Sigma-Aldrich),

ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba1) (1/500; rabbit monoclonal; clone EPR16588; Abcam), Olfactory Marker Protein (OMP) (1/1000; goat polyclonal; 544-10001; Wako); GAP43 (1/500; rabbit polyclonal; NB300 143; Novus); Ki67 (1/100 ; Rabbit polyclonal; MA139550; ThermoFisher) and cleaved caspase 3 (1: 400; rabbit polyclonal, Cell Signaling; Ozyme). Fluorescence staining was performed using donkey anti-mouse-A555; donkey anti-rabbit-A488 and donkey anti-goat-A546 (1/800; Molecular Probes A-31570; A32790; A-11056 respectively; Invitrogen).

To assess the impact of corticoid treatment on the OE after SARS-CoV-2 infection, we focused our measures on coronal sections of nasal turbinates in the middle of the nasal cavity, containing the NALT and the end of Steno's gland (**Supp Fig. 1**). We choose this area as it presents two zones behaving differentially for the recovery of OE damage following SARS-CoV-2 infection (Kishimoto-Urata et al., 2022).

To measure olfactory epithelium damage, we performed conventional hematoxylin and eosin (HE) staining as previously described (Bourgon et al., 2022) and scored slices from 1 to 9 according to OE thickness, irregularities, missing areas and presence of cellular debris in the lumen of the nasal cavity.

We examined the presence of Iba1⁺ cell in both lamina propria and OE, as well as GAP43⁺ and OMP⁺ cells in the OE to assess immune cell infiltration, the presence of immature olfactory neurons and mature olfactory neurons, respectively. For Iba1 and OMP staining, we scored slices from 0 (no staining) to 9, corresponding respectively to massive immune cell infiltration and homogenous presence of mature olfactory neurons in the whole OE layer. For GAP43⁺ immature olfactory neurons, we scored a level of disorganization from 1 to 9 based on the presence of staining in the middle part (~50%) of the OE layer, where mature neurons are usually present and immature olfactory neurons absent (Moon et al., 2002). For Ki67 and C3C staining, we scored the presence of cells in the OE from 0 (absence) to 9 (ubiquitous).

Glomerular size in the olfactory bulb was measured based on OMP staining with ImageJ (Rasband, W.S., ImageJ, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997–2012). For each animal, two different slices approximately separated by 500 µm were analyzed. The size of the 4 largest glomeruli on both slices were averaged per animal and normalized to the average glomerular size of control animals.

Images for all fluorescent IHC were taken using an Olympus 1X71 microscope equipped with an Orca ER Hamamatsu cooled CCD camera (Hamamatsu Photonics France; Massy, France). Whole sections of nasal cavity HE staining were reconstructed from 2 images taken at x30 magnification using a Leica MZ10F binocular microscope.

RNA extraction and RT-qPCR analysis

Total RNA was extracted from frozen nasal turbinates using the Trizol-chloroforme method as described previously (Bryche et al., 2019). Oligo-dT first strand mixed with random hexamers cDNA synthesis was performed from 1 µg total RNA with the iScript Advance cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (Bio-Rad; #1725038) following the manufacturer's recommendations. qPCR was carried out using 25 ng of cDNA added to a 15 µL reaction mix containing 10 µL iTaq Universal Sybr Green SuperMix (BioRad; #1725124), and primers at 500 nM (sequences in **Supp Table 1**). The reaction was performed with a thermocycler (Mastercycler ep Realplex, Eppendorf). Fluorescence during the qPCR reaction was monitored and measured by Realplex Eppendorf software. A dissociation curve was plotted at the end of the forty amplification cycles of the qPCR to confirm the ability of these primers to amplify a unique and specific PCR product.

Quantification of the initial concentration of specific RNA was achieved using the $\Delta\Delta C_t$ method. Standard controls for qPCR specificity and efficiency were performed. The mRNA expression of each gene was normalized with the expression level of Dicer. A correction factor was applied to each primer pair according to their efficiency (Muller et al., 2002). Data are presented as relative expression level compared to uninfected animals in the olfactory turbinates and to vehicle in the olfactory bulb.

Statistical analysis

All comparisons were made using Prism 8.0 (GraphPad). Statistical significance between groups was assessed using non-parametric Mann Whitney tests. For correlation analyses, we used Spearman's non-parametric test. Error bars indicate the SEM. Multivariate statistical analysis on RNA levels in nasal turbinates was achieved using Principal Component Analysis (PCoA) with R software. Detailed information on statistical test used, sample size and P value are provided in the figure captions.

Results

Pathophysiological impact of early corticoid treatment on SARS-CoV-2 infection

In order to examine how an early treatment with corticoids could improve the recovery of loss of smell induced by SARS-CoV-2 infection, we treated hamsters from 2 dpi to 11 dpi with daily subcutaneous injection of 1.5 mg/kg of dexamethasone (**Fig. 1A**). We started the treatment at 2 dpi because most of the damage of the OE has already been initiated in the nasal cavity (Bourgon et al., 2022) and a very strong loss of olfactory abilities is observed in hamsters at this early stage (Reyna et al., 2022). We stopped the treatment at 11 dpi when about 50% of the OE should have regenerated (Bryche et al., 2020), making it a suitable time window to observe early improvements in OE repair due to

corticoid treatment. TCID₅₀ from nasal swabs taken between 1 and 5 dpi were not statistically different in the dexamethasone and vehicle-treated groups, indicating that the treatment starting at 2 dpi did not impact the level of infection in the nasal cavity (**Fig. 1B**). Hamsters weight decreased following infection with a maximum loss of ~7% at 6 dpi and a recovery at 11 dpi regardless of dexamethasone treatment (**Fig. 1C**). We measured food intake also indirectly by introducing an extra colored food pellet left on the bedding surface of the animal home cage overnight. The decrease of extra food consumption was similar to the weight loss during the course of infection with a maximal decrease at 5 dpi (**Fig. 1D**). However, animals treated with dexamethasone statistically consumed more extra food than those treated with the vehicle as early as 2 days post corticoid treatment (Two-way ANOVA; $F_{(1, 110)} = 5.458$; $P=0.0213$). We also measured their olfactory abilities using a slightly modified buried food test involving two different depths of hidden food (**Fig. 2**). At 2 dpi, we observed a significant decrease of olfactory performances with shallow or deeply buried food, consistent with a previous study (Reyna et al., 2022). Both the vehicle and Dexamethasone-treated animals showed a partial recovery of their ability to discover shallow buried food at 11 dpi. Indeed, at 11 dpi animals from both groups spent significantly more time to retrieve the hidden food than prior to infection (Mann Whitney, $P=0.0022$ and 0.0173 for vehicle and dexamethasone groups, respectively). When the food was deeply buried, both groups were significantly less efficient at 11 dpi than prior to infection and did not perform better than at 2 dpi. However, the dexamethasone-treated group performed significantly better than the vehicle group (Mann Whitney, $P=0.0291$), indicating that their olfactory function was improved by the corticoid treatment.

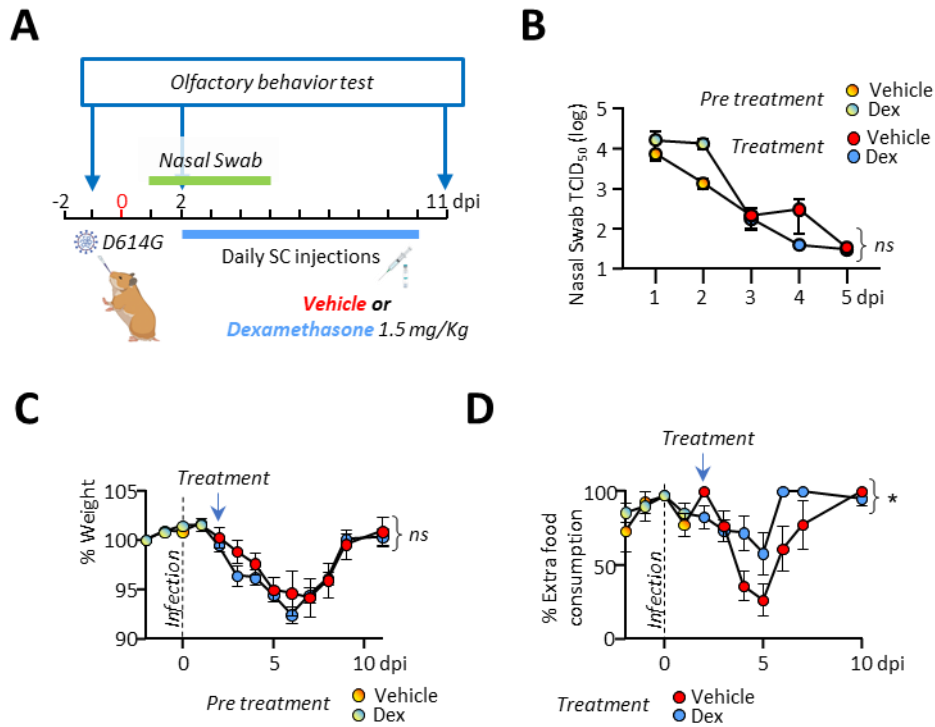


Figure 1: Pathophysiological impact of early corticoid treatment on SARS-CoV-2 infection. (A) Experimental design to evaluate the treatment of SARS-CoV-2 infected hamsters with sub-cutaneous (SC) corticoid treatment started at 2 dpi until 11 dpi (days post infection) (B) Viral load in nasal swab collected from 1 to 5 dpi (C) Weight monitoring (D) Extra food consumption as an indirect measure of food intake (Mean \pm SEM, $n=6$, 2-way ANOVA followed by Bonferroni post-test; ns: $P > 0.05$; * $P < 0.05$).

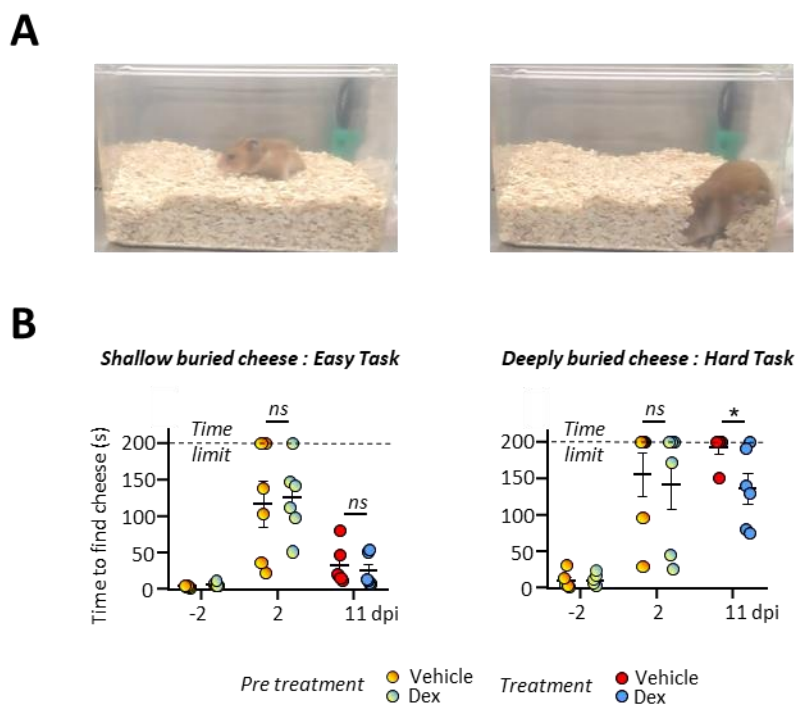


Figure 2: Monitoring of olfactory abilities of SARS-CoV-2 infected hamsters treated early with corticoids (A) Representative images of a hamster scanning the surface for food (left) and digging for a deeply buried piece of cheese (right) (B) Amount of time taken to find a shallow or deeply buried piece of cheese (left and right respectively) at 3 different time points: Before infection, at 2 dpi just before corticoid treatment and at 11 dpi after daily corticoid

(Dex) or vehicle treatment (Mean \pm SEM, n=6, Mann Whitney; ns: $P > 0.05$; * $P < 0.05$). The animal has 200 seconds to find the food before the test ends.

Change in genes expression related to odor detection and immune response

The expression of olfactory transduction-related genes in the OE has been shown to be markedly decreased following SARS-CoV-2 infection in mice (Verma et al., 2022). Most volatile odorants are transduced through the activation of an olfactory receptor (OR) coupled to a specific G protein G_{olf} , which in turn activates the adenylate cyclase III. The increase in cAMP level in turn activates a CNG channel (Cnga2), and the concentration of cAMP is buffered by the olfactory marker protein present only in mature olfactory neurons (OMP; Nakashima et al., 2020). We observed that, contrary to mice, the expression level of all olfactory transduction-related genes was not significantly affected at 2 dpi compared with uninfected animals (**Fig. 3A**). However, their expression was strongly decreased at 11 dpi without any significant impact of the corticoid treatment. We then examined the population of immature neurons using the expression level of GAP43 (Verhaagen et al., 1989). Again, its level was unaffected at 2 dpi, but increased statistically at 11 dpi without impact of the corticoid treatment (**Fig. 3A**). This increase could be linked to proliferation of basal cells, and we therefore measured the expression level of Ki67 related to cellular division (Ohta and Ichimura, 2000). The alteration of its level was consistent with GAP43. Several studies in animal models and humans have shown a long-term persistence of inflammation in the olfactory system and different brain parts following SARS-CoV-2 infection. This has been shown notably by an increased presence of Iba1⁺ cells; a marker of microglia in the brain including the olfactory bulb and activated macrophages in the olfactory turbinates (Finlay et al., 2022; Kishimoto-Urata et al., 2022; Rutkai et al., 2022). Furthermore, we previously observed an increase in the innate immune cell population as early as 1 dpi (Bourgon et al., 2022). We thus measured the expression level of Iba1⁺ (related to resident macrophages), Ncf2 (related to neutrophils) and CD68 (related to circulating macrophages). While all these genes were overexpressed at 2 dpi, their levels were significantly reduced at 11 dpi, with only CD68 related to circulating macrophages being statistically decreased by the corticoid treatment (**Fig. 3A**). We also measured the expression level of CD163, a marker of anti-inflammatory M2 macrophages (Etzerodt and Moestrup, 2013). It was significantly increased at 2 dpi and stable at 11 dpi in vehicle-treated animals. It was however statistically increased from 2 dpi to 11 dpi after corticoid treatment. Consistent with the anti-inflammatory property of corticoid treatment, we observed a significant decrease of IL6 expression levels in the olfactory turbinates and olfactory bulb of the dexamethasone group (**Fig. 3B, C**). While many markers were not statistically affected by the corticoid treatment, such as CXCL10 and IL10, we observed a tendency of decreased inflammation markers and improved olfactory marker following the treatment. We thus performed a principal

component analysis showing that animals treated with corticoid clearly form a distinct group from those treated with vehicle alone (**Fig. 3D**).

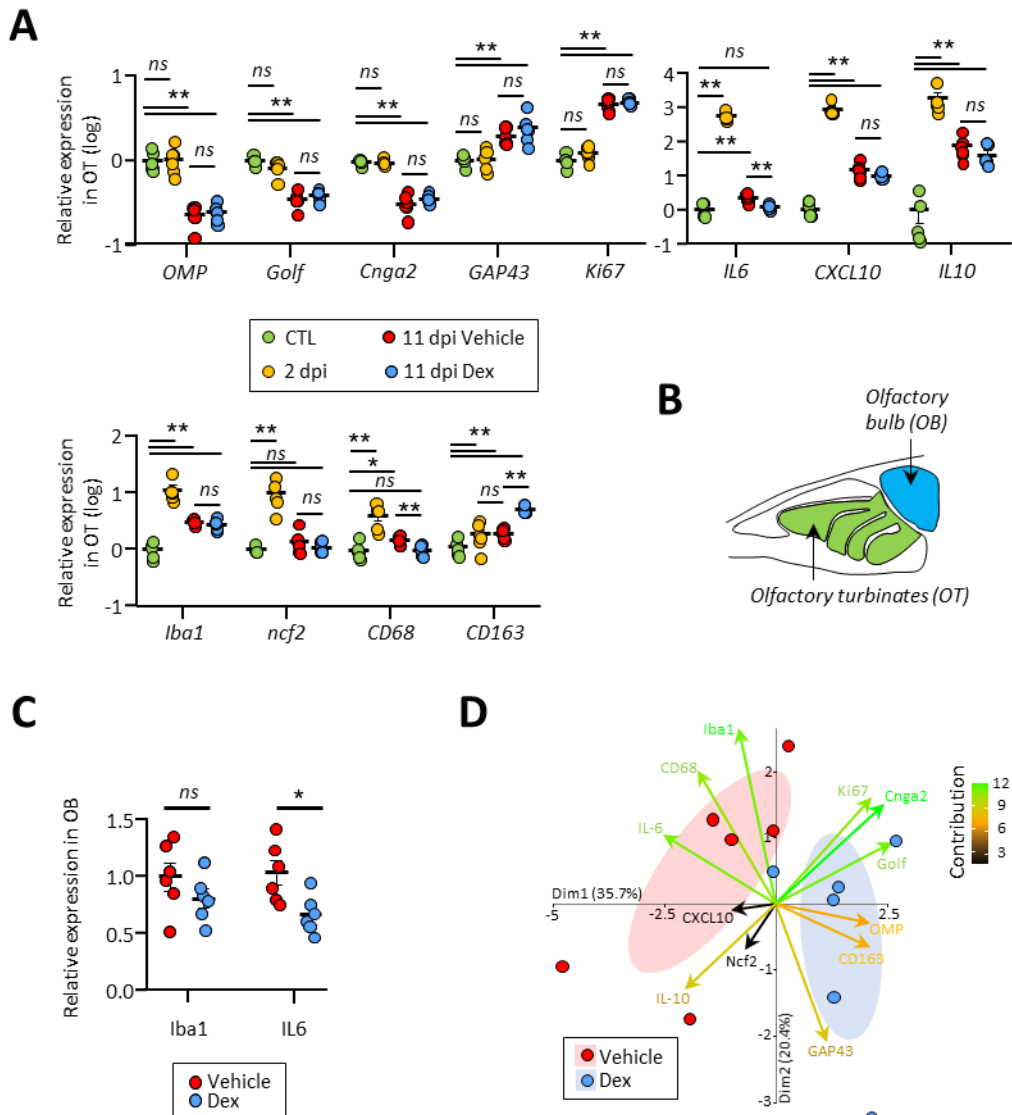


Figure 3: Molecular impact on the olfactory system of SARS-CoV-2 infected hamsters treated by early corticoids (A) Expression level of genes related to olfactory transduction and inflammation in the olfactory turbinates of animals; uninfected (CTL); at 2 dpi corresponding to the start of the corticoid treatment and at 11 dpi after treatment with vehicle or dexamethasone (Dex) (B) Schematic of an hamster hemi head anterior part showing the localization of the olfactory turbinates and olfactory bulb. (C) Expression level of genes related to inflammation in the olfactory bulb of animal at 11 dpi after treatment with vehicle or dexamethasone (Dex). Relative expression means \pm SEM, $n=6$, Mann Whitney; ns: $P > 0.05$; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$. (D) PCoA biplots of RNA levels in nasal turbinates. Each dot represents a separate animal, colored according to the treatment. Ellipses represent a confidence interval of 95%. Arrows are colored according to the contribution of the corresponding gene to the first two components of PCoA. The two groups differ significantly (permutational multivariate analysis of variance with adonis, $P < 0.005$).

Corticoid treatment reduces resident macrophages presence in the olfactory mucosa following SARS-CoV-2 infection

Prolonged inflammation following SARS-CoV-2 infection has been well characterized in the nasal cavity (Bryche et al., 2020; Finlay et al., 2022; Kishimoto-Urata et al., 2022). Among the different immune cells present during early inflammation of the infected olfactory epithelium, we previously observed a massive presence of Iba1⁺ resident macrophages as well as CD68⁺ circulating macrophages and MPO⁺ neutrophils. CD68⁺ and MPO⁺ cells were mainly observed during the phases of the epithelial damage (Bourgon et al., 2022). Among these innate immune cells, we observed only the persistence of Iba1⁺ cells at 11 dpi and thus focus our attention on them. The persistent presence of these cells in the olfactory turbinates after SARS-CoV-2 infection has been shown to be spatially restricted (Kishimoto-Urata et al., 2022). While their presence in the ventro lateral part of the OE returns to its basal state at 21 dpi, the dorso median zone has been shown to stay inflammatory and damaged up to 42 dpi (Kishimoto-Urata et al., 2022). To assess the effectiveness of the corticoid treatment following SARS-CoV-2 infection on the recovery of the OE in the nasal cavity, we focused on a coronal section in the middle of the nasal cavity where we found similarly a sustained presence of Iba1⁺ cells in both the dorso median part and the ventro lateral zone of the nasal cavity (**Fig. 4**). At 11 dpi, Iba1⁺ cells were mainly present in the lamina propria and at a higher level than prior to infection for both areas in vehicle-treated animals (Mann-Whitney, $P < 0.0001$ for both zones). The dexamethasone treatment significantly decreased their presence in both zones compared to vehicle-treated animals. However, the level remained higher than before infection (Mann-Whitney, $P < 0.0001$ and $P = 0.0082$ for dorso median and ventro lateral zones, respectively).

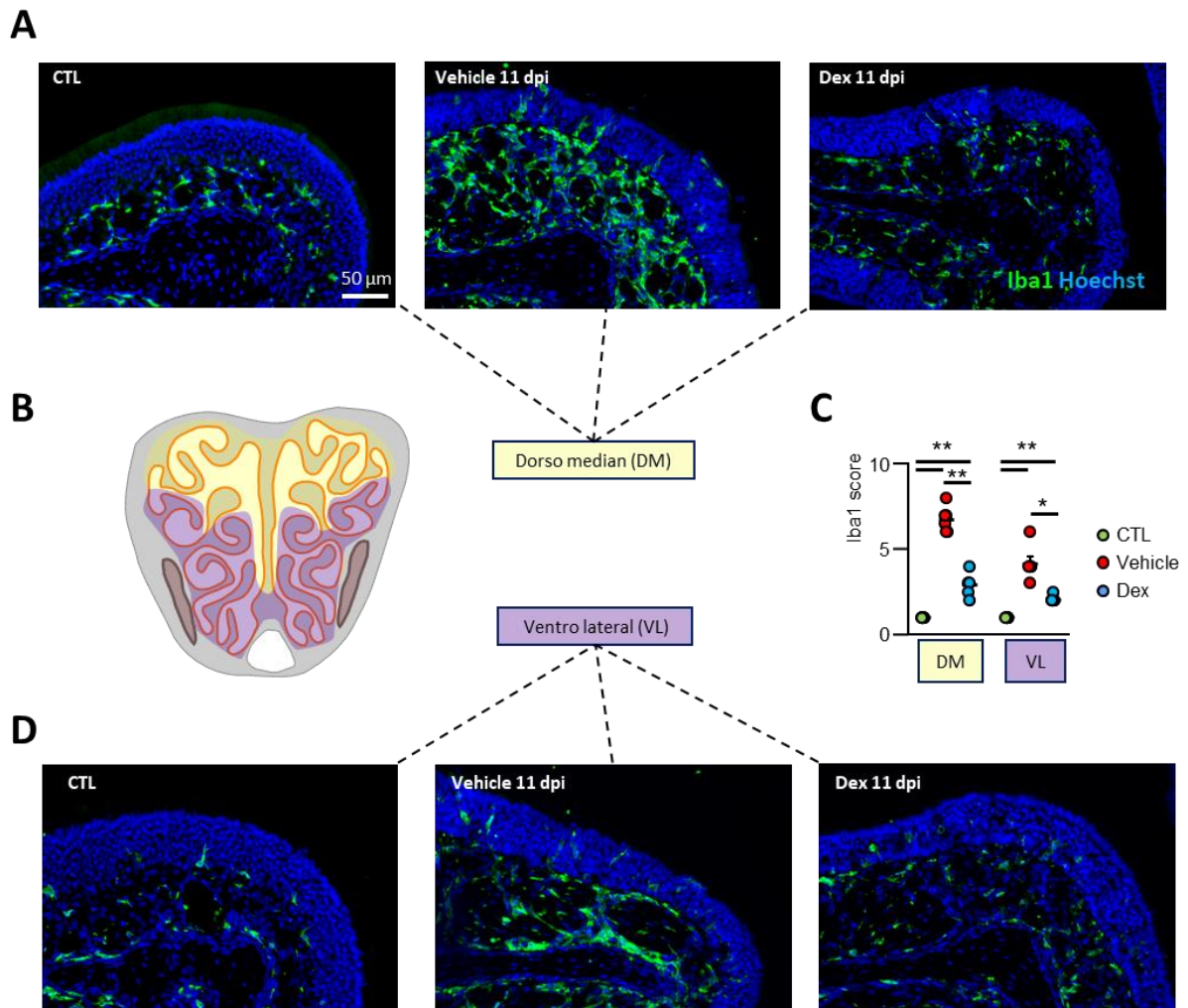


Figure 4: Reduction of resident macrophage presence in the olfactory mucosa of SARS-CoV-2 infected hamsters treated with corticoids. Representative images of olfactory turbinates in the dorso median (**A**) or ventro lateral (**D**) part of a coronal section in the middle of the nasal cavity (**B**). (**C**) Scores of resident macrophage presence revealed by Iba1⁺ marker. Mean \pm SEM, n=6, Mann Whitney; *P < 0.05; **P < 0.01

Corticoid treatment impact on the olfactory neuron population after SARS-CoV-2 infection

Following SARS-CoV-2 infection of sustentacular cells in hamsters, massive damage occurs in the epithelium, resulting in the loss of olfactory neurons into the lumen of the nasal cavity (Bourgon et al., 2022; Bryche et al., 2020). We chose 11 dpi as we expect that approximately 50% of the epithelium would have regenerated, based on previous study of the regeneration time course (Bryche et al., 2020; Reyna et al., 2022) and that corticoid treatment could improve such recovery. Indeed, prolonged inflammation has been shown to hamper the regeneration of the olfactory epithelium (Chen et al., 2019) and we observed that the treatment effectively limited inflammation in the olfactory mucosa (**Fig. 3 and 4**). We first examined the recovery from damage in the olfactory epithelium based on histological staining. We did not observe statistical difference between vehicle and corticoid-treated animals (**Supp. Fig. 1**). We next examined the regeneration level of the olfactory epithelium based on Ki67 staining

(Ohta and Ichimura, 2000). While the level was much higher than in the control uninfected animal, it was again not affected by the corticoid treatment (**Fig. Supp 2**).

We next focused on the olfactory neuron population, and first on immature neurons specifically expressing GAP43 (Verhaagen et al., 1989). In control animals, the cell bodies of immature neurons were mainly present in the basal part of the epithelium and formed only a few layers (**Fig. 5**). At 11 dpi, we observed unusual multi layers of staining with cell bodies also present in the apical part of the epithelium in vehicle and corticoid-treated animals. We thus scored the degree of disorganization of GAP 43 staining to evaluate if the corticoid treatment could improve the organization level of immature neurons. While we observed that the disorganization was higher in the dorso medial part of the olfactory turbinates, we did not observe any statistically significant effect of the corticoid treatment.

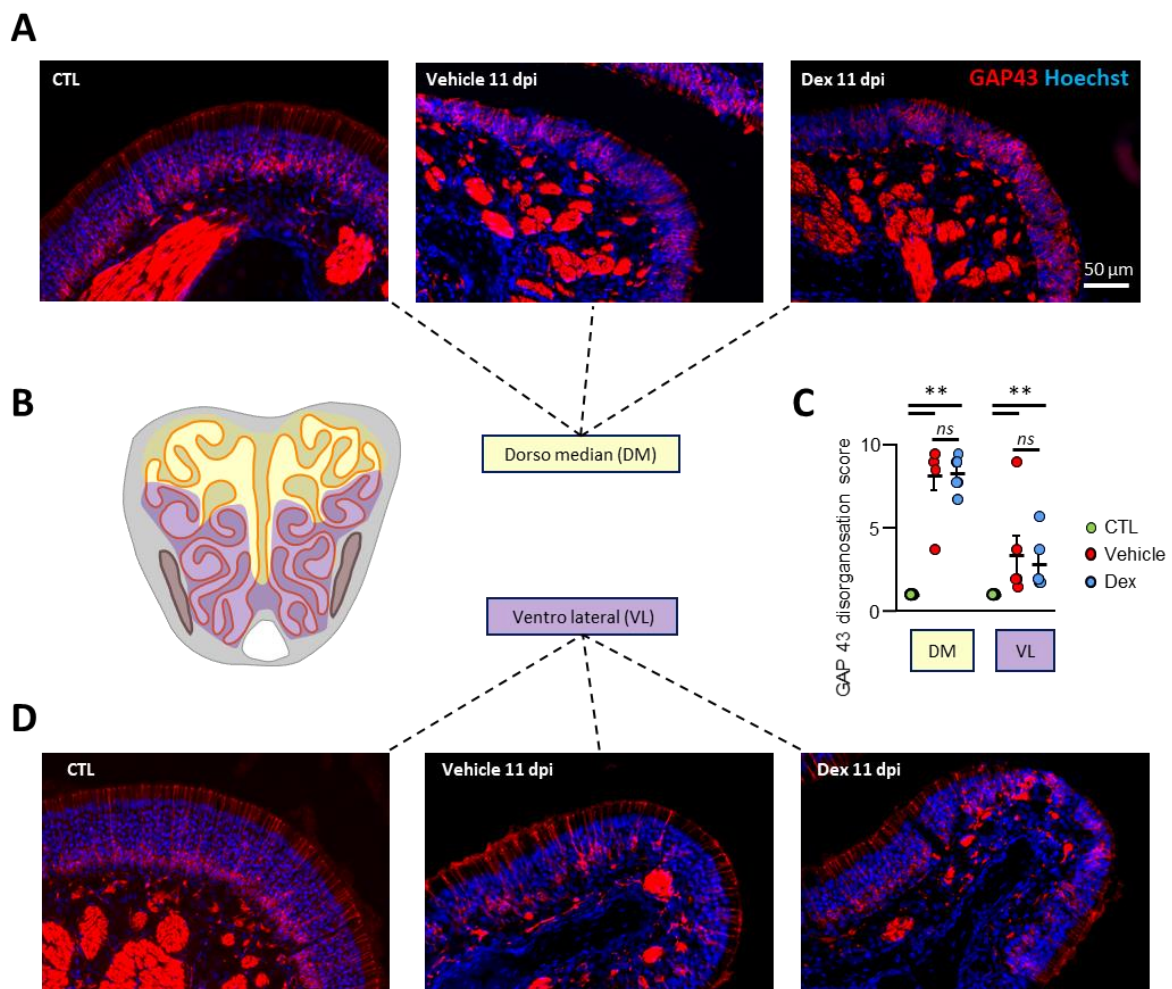


Figure 5: Disorganization of immature olfactory neuron population at 11 dpi in vehicle and corticoid treated animals. Representative images of olfactory turbinates in the dorso median (**A**) or ventro lateral (**D**) part of a coronal section in the middle of the nasal cavity (**B**). (**C**) Scores of the degree of disorganization of immature olfactory neuron population based on GAP43 staining. Mean \pm SEM, $n=6$, Mann Whitney; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

We then measured if the corticoid treatment could have locally impacted the mature olfactory neuron population based on OMP immunostaining specifically expressed in these cells (Nakashima et al., 2020). We observed in vehicle-treated animals, that at 11 dpi the mature olfactory neuron population was strongly reduced compared to control, especially in the dorso medial part of the olfactory turbinates where OMP signal was mostly absent (**Fig. 4**). While we observed a slightly better OMP signal in the dorso median part for some dexamethasone-treated animals, the group was not statistically different from vehicle-treated animals. We however observed a significant increase in OMP stained cells in the ventro lateral part of the olfactory turbinates compared to vehicle-treated animals (**Fig. 6**).

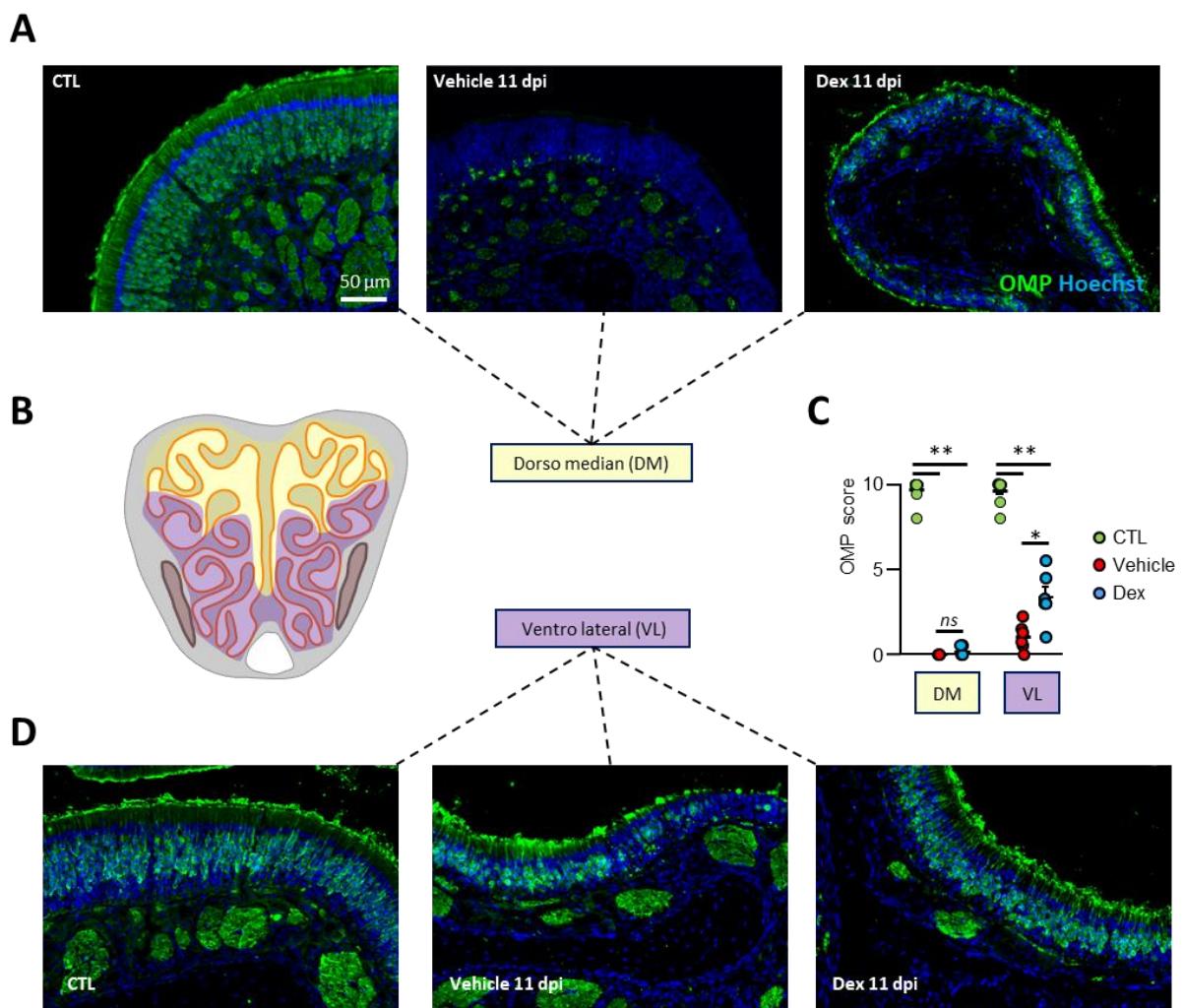


Figure 6: Local improvement of the mature olfactory neuron population at 11 dpi in SARS-CoV-2 infected hamsters treated with corticoids. Representative images of olfactory turbinates in the dorso median (**A**) or ventro lateral (**D**) part of a coronal section in the middle of the nasal cavity (**B**). (**C**) Scores of the mature olfactory neuron population based on OMP staining. Mean \pm SEM, $n=6$, Mann Whitney; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

To confirm this result, we took advantage of the OMP expression in the axons of olfactory neurons. As these axons converge in the olfactory bulb, the OMP staining can be seen in the glomeruli which collect axons from neurons expressing the same olfactory receptor. The size of the glomeruli reflects the olfactory neuron population in the olfactory epithelium (Bozza et al., 2002). We thus

measured the size of glomeruli based on OMP staining as a global measure of the olfactory neuron population. While the size was decreased for both groups compared to uninfected animals, it was higher in dexamethasone-treated animals (**Fig. 7A, B**). We also found a significant correlation between the glomerular size of animals and their time to find the buried food (**Fig. 7C**).

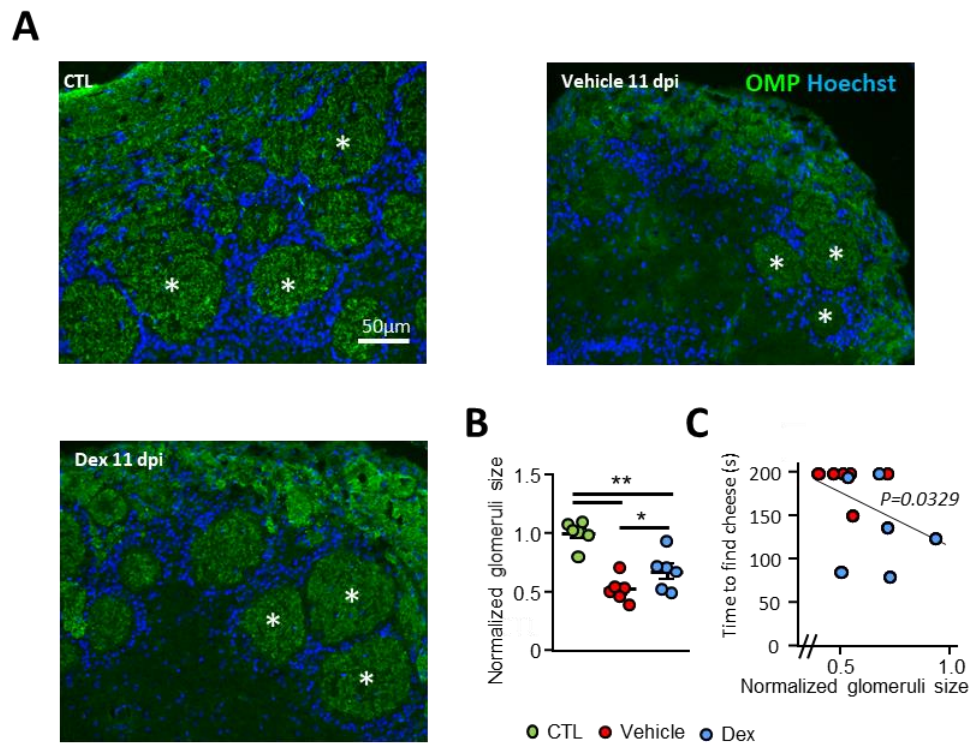


Figure 7: Improvement of glomerular size at 11 dpi in SARS-CoV-2 infected hamsters treated with corticoids. (A) Representative images of olfactory bulb periphery containing glomeruli (white asterisk) stained by OMP present in the converging axons of mature olfactory neurons. (B) Mean of normalized glomerular size \pm SEM, $n=6$, Mann Whitney; $*P < 0.05$; $**P < 0.01$. (C) Correlation between the time taken by one animal to find buried food and the average size of its glomeruli in the olfactory bulb. Spearman test p value.

We finally examined if this difference in olfactory mature neuron population could be related to a higher level of apoptosis in the olfactory epithelium by measuring the level of cleaved caspase 3 staining (Porter and Janicke, 1999). We did not observe any statistical difference between uninfected animals and vehicle or corticoid-treated animals for both zones of the olfactory epithelium (**Supp. Fig. 2**).

Discussion

As the number of patients suffering from long term olfactory disorder increases, animal models are necessary to assess the effectiveness of therapeutic treatments such as corticoid which have variable effectiveness in humans. Using Syrian golden hamsters, our results show that early systemic corticoid treatment is effective in improving olfactory recovery following SARS-CoV-2 infection.

We started the corticoid treatment at 2 dpi, when the infection is still going on. As corticoids have an anti-inflammatory effect, it may increase the level of viral infection. Such treatment started at 2 dpi has already been tested in SARS-CoV-2 infected hamsters using similar dose of dexamethasone (Wyler et al., 2022). While the authors focused on lung physiopathology, they observed a beneficial anti-inflammatory effect and a non-significant slight increase of viral burden in the lungs. Our results of viral titration from nasal swabs indicate that the dexamethasone treatment when started at 2 dpi did not impact the viral presence in the nasal cavity (**Fig. 1B**) and the similar weight loss observed in both groups indicates that it did not change strongly the pathophysiology of the infection (**Fig. 1C**). In order to characterize the olfactory performances of hamsters, we used a buried food test. This test is classically performed with only one level of buried food (Yang and Crawley, 2009) but we chose to do it with the food buried at two different levels. Interestingly, at 2 dpi, 75% of hamsters were still able to find a shallow buried piece of cheese (**Fig. 2B**), indicating that most were hyposmic. This result contrasts with a previous study where hamsters have been reported to be anosmic at 2 dpi (Reyna et al., 2022) but consistent when using only the deeply buried food. Indeed, in this condition, we observed that only 33% of hamsters could find the food, which could indicate that most are anosmic (**Fig. 2C**). It may thus be relevant to perform the food buried test at these two levels to better characterize the olfactory disorder in rodent models. Interestingly, we observed that food intake, which strongly decreases at 4 dpi in the vehicle group was much less impacted in the group treated with corticoid (**Fig. 1D**). This increase of food intake is consistent with the improved olfactory capacities observed at 11 dpi in this group, as olfaction is essential for food intake in rodents. It may also be related to the direct impact of corticoid on food intake (Dallman et al., 2004), but the consumption of extra food was similar in both groups at 11 dpi when olfaction is also recovered for an easy task in the vehicle-treated group. Such a result raises the question of the importance of olfaction in the weight loss following SARS-CoV-2 infection in hamsters.

A recent study in mice shows that following infection with a mouse adapted SARS-CoV-2, there is an important impact on gene expression related to olfactory transduction (Verma et al., 2022). Similar results have been observed in hamsters using single-cell RNA seq as early as 1 dpi (Zazhytska et al., 2022). Surprisingly, while we observed a decrease in hamster olfactory capacities at 2 dpi, we did not find any impact on the expression of genes related to olfactory transduction (**Fig. 3A**). Such result is consistent with histological data showing that at 2 dpi, most of the OE in the posterior nasal cavity is still

spared from damage (Bourgon et al., 2022). We can thus hypothesize that the loss of smell at 2 dpi may be rather related to either cellular debris in the lumen of the nasal cavity, which could impair air flow and thus odorant detection, massive loss of olfactory sensory neuron cilia (Bryche et al., 2020), or disruption of the sustentacular cells, which are essential for odorant detection (Butowt et al., 2023), but not yet to olfactory neuron loss. At 11 dpi, the expression of all genes related to olfactory transduction was strongly diminished, which could explain the persistence of hyposmia in both groups. The expression of genes related to inflammation and innate immunity cells presence in the OE was also strongly increased at 2 dpi. This expression globally decreased at 11 dpi but remained at a higher level than control for all genes, except *ncf2*, which is related to neutrophil presence. This higher level of gene expression related to inflammation and immune cell infiltration at 11 dpi is consistent with the persistence of inflammation reported previously in humans and hamsters (Finlay et al., 2022; Kishimoto-Urata et al., 2022). The corticoid treatment was effective to reduce the expression of CD68, related to macrophages presence, as well as the inflammatory cytokine IL6 in the OE and olfactory bulb (**Fig. 3C**). We also measured an increase in CD163 expression; a marker of anti-inflammatory macrophages (Etzerodt and Moestrup, 2013), and known to be over expressed during corticoid treatment (Takenouchi et al., 2021). The lower presence of markers related to immune cells presence in the OE was confirmed by histology, showing a decreased presence of Iba1⁺ cells in the olfactory mucosa (**Fig. 4**). These changes are consistent with the anti-inflammatory action of corticoid and may explain the improved olfactory abilities in the dexamethasone-treated group for the buried food test.

Prolonged inflammation has been shown to hamper the renewal of the olfactory epithelium (Chen et al., 2019), which could thus limit the regeneration of the OE following the massive desquamation caused by SARS-CoV-2 infection (Bryche et al., 2020). Despite the persistence of inflammation, we observed a strong increase in cellular proliferation consistent with an increased level of GAP43 expressed by immature olfactory neurons (**Fig. 3A; 5 and Supp. Fig. 2**). The presence of immature olfactory neurons was confirmed by histology, with a strong zonal difference. Their population had almost returned to the uninfected level in the ventro lateral zone of the nasal cavity but was strongly altered in the dorso median part. In control animals, the cell bodies of immature olfactory neurons are restricted to the basal part of the OE (Moon et al., 2002), and they project a typical dendrite extension toward the apical part of the OE with a dendritic knob. Such organization was lacking at 11 dpi in the dorso median part of the nasal cavity (**Fig. 5**). Interestingly, similar results have been observed 2 weeks after methimazole treatment inducing a complete desquamation of the OE (Bergman et al., 2002). The zone of the disorganization of immature olfactory neuron population correlates with the higher presence of Iba1⁺ cells (**Fig. 4**). This differential presence of Iba1⁺ cells has already been reported, as late as 42 dpi, in hamsters OE and was associated with a loss of olfactory mature neurons (Kishimoto-Urata et al., 2022). We found a similar result with an absence of OMP staining in the OE of vehicle-treated animals

at 11 dpi in the dorso-median zone, which was partially restored by the corticoid treatment (**Fig. 6**). The increase of the mature olfactory neuron population by the dexamethasone treatment was consistent with the size of glomeruli in the olfactory bulb. Indeed, glomerular size reflects the amount of innervating OE olfactory neurons (Bozza et al., 2002). Furthermore, the glomerular size in the olfactory bulb was correlated with the hamster's performance in the hard task of the buried food test (**Fig. 6C**). Interestingly, the size of olfactory bulb in patients suffering from long-lasting olfactory disorders following SARS-CoV-2 infection is reduced (Frosolini et al., 2022). Such reduction is consistent with a reduced mature olfactory neuron population in the OE observed in human biopsies of patients suffering from non-recovering COVID-19 hyposmia (Finlay et al., 2022). How could the diminishing inflammation help the recovery of the mature olfactory neuron population? Inflammation may either impair the differentiation of immature neurons to mature neurons or increase the level of neuronal death related to tissue damage. While we did not observe different levels of apoptosis at 11 dpi in both groups (**Supp. Fig. 2**), we would need to examine earlier time points to decipher how corticoid treatment helps to restore the mature olfactory neuron population.

While hamster basic olfaction has already recovered at 11 dpi as can be seen by the good performance of the vehicle-treated group in the easy food buried task, only the group treated with corticoid could partially recover their capacity to smell a deeply buried food. These results raise the question of the recovery evaluation of the smell capacities in humans. Indeed, UPSIT (University of Pennsylvania Smell Identification Test) is the most used olfactory test and consists at directly smelling different odors presented under the nose (Doty et al., 1984). As humans have a very good sense of smell (McGann, 2017), it may be that the olfactory disorder following SARS-CoV-2 infection lasts far longer than currently estimated, as it would require more sophisticated tests to measure the real olfactory capacities.

Overall, our results indicate that persistent inflammation may disturb the recovery of the mature olfactory neuron population and that early corticoid treatment improves the recovery from SARS-CoV-2 induced olfactory impairment. So far, most corticoid treatment has been performed in humans when the olfactory disorder does not recover spontaneously several weeks post-infection (Huart et al., 2021; Le Bon et al., 2021; Nag et al., 2023; Vaira et al., 2021). Only one has been performed within one week after the onset of COVID-19-related olfactory disorders. In this study, the authors did not observe any impact of the corticoid treatment which was performed by nasal irrigation (Tragoonrungea et al., 2023). Our results indicate that early systemic treatment may be much more effective to restore the COVID-19-related olfactory disorders. However, side effects of such treatment are not without consequences (Huart et al., 2021) and require further human studies considering that most patients will spontaneously recover part of their olfactory capacities (Whitcroft et al., 2023).

Declaration

Ethics approval and consent to participate: Not applicable

Consent for publication: Not applicable

Availability of data and material: Data will be made available upon reasonable request, not applicable for material

Competing interests: All authors do not have conflict of interest.

Funding: NM is supported by INRAE SA department; ANR (Grant CORAR); ANRS (Grant UCRAH)

. LMN is supported by the FRM (Fond pour la recherche médicale). CB is supported by the "DIM One Health".

Authors contribution: Conceptualization NM, SLP and LMN Investigation: LMN, CB, ASA, OAG, BK, SLP, NM Formal analysis: LMN, CB and NM Writing: NM, CVB with input from all authors.

Acknowledgment: We would like to thank all VIM members for their helpful discussion, Christopher von Bartheld for very helpful suggestions and global improvement of the manuscript, all the people from the PRBM platform of ENVA who helped us in the BSL3 animal facility.

References

- Bergman, U., Ostergren, A., Gustafson, A.L., Brittebo, B., 2002. Differential effects of olfactory toxicants on olfactory regeneration. *Archives of toxicology* 76, 104–12. <https://doi.org/10.1007/s00204-002-0321-2>
- Bourgon, C., Albin, A.S., Ando-Grard, O., Da Costa, B., Domain, R., Korkmaz, B., Klonjkowski, B., Le Poder, S., Meunier, N., 2022. Neutrophils play a major role in the destruction of the olfactory epithelium during SARS-CoV-2 infection in hamsters. *Cellular and Molecular Life Sciences* 79, 616. <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04643-1>
- Bozza, T., Feinstein, P., Zheng, C., Mombaerts, P., 2002. Odorant receptor expression defines functional units in the mouse olfactory system. *J Neurosci* 22, 3033–43. https://doi.org/20026321_22/8/3033 [pii]
- Bryche, B., Fretaud, M., Saint-Albin Deliot, A., Galloux, M., Sedano, L., Langevin, C., Descamps, D., Rameix-Welti, M.A., Eleouet, J.F., Le Goffic, R., Meunier, N., 2019. Respiratory syncytial virus tropism for olfactory sensory neurons in mice. *Journal of Neurochemistry* e14936. <https://doi.org/10.1111/jnc.14936>
- Bryche, B., St Albin, A., Murri, S., Lacôte, S., Pulido, C., Ar Gouilh, M., Lesellier, S., Servat, A., Wasniewski, M., Picard-Meyer, E., Monchatre-Leroy, E., Volmer, R., Rampin, O., Le Goffic, R., Marianneau, P., Meunier, N., 2020. Massive transient damage of the olfactory epithelium associated with infection of sustentacular cells by SARS-CoV-2 in golden Syrian hamsters. *Brain Behav Immun* 89, 579–586. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.06.032>
- Butowt, R., Bilinska, K., von Bartheld, C.S., 2023. Olfactory dysfunction in COVID-19: new insights into the underlying mechanisms. *Trends in Neurosciences* 46, 75–90. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2022.11.003>
- Chen, M., Reed, R.R., Lane, A.P., 2019. Chronic Inflammation Directs an Olfactory Stem Cell Functional Switch from Neuroregeneration to Immune Defense. *Cell stem cell* 25, 501–513 e5. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2019.08.011>
- Dallman, M.F., la Fleur, S.E., Pecoraro, N.C., Gomez, F., Houshyar, H., Akana, S.F., 2004. Minireview: Glucocorticoids—Food Intake, Abdominal Obesity, and Wealthy Nations in 2004. *Endocrinology* 145, 2633–2638. <https://doi.org/10.1210/en.2004-0037>
- Doty, R.L., Shaman, P., Kimmelman, C.P., Dann, M.S., 1984. University of pennsylvania smell identification test: A rapid quantitative olfactory function test for the clinic. *Laryngoscope* 94, 176–178. <https://doi.org/10.1288/00005537-198402000-00004>
- Etzerodt, A., Moestrup, S.K., 2013. CD163 and Inflammation: Biological, Diagnostic, and Therapeutic Aspects. *Antioxidants & Redox Signaling* 18, 2352–2363. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4834>
- Finlay, J.B., Brann, D.H., Abi Hachem, R., Jang, D.W., Oliva, A.D., Ko, T., Gupta, R., Wellford, S.A., Moseman, E.A., Jang, S.S., Yan, C.H., Matsunami, H., Tsukahara, T., Datta, S.R., Goldstein, B.J., 2022. Persistent post-COVID-19 smell loss is associated with immune cell infiltration and altered gene expression in olfactory epithelium. *Sci. Transl. Med.* 14, eadd0484. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.add0484>
- Frosolini, A., Parrino, D., Fabbris, C., Fantin, F., Inches, I., Invitto, S., Spinato, G., Filippis, C., 2022. Magnetic Resonance Imaging Confirmed Olfactory Bulb Reduction in Long COVID-19: Literature Review and Case Series. *Brain Sciences* 12, 430. <https://doi.org/10.3390/brainsci12040430>
- Hintschich, C.A., Dietz, M., Haehner, A., Hummel, T., 2022. Topical Administration of Mometasone Is Not Helpful in Post-COVID-19 Olfactory Dysfunction. *Life* 12, 1483. <https://doi.org/10.3390/life12101483>

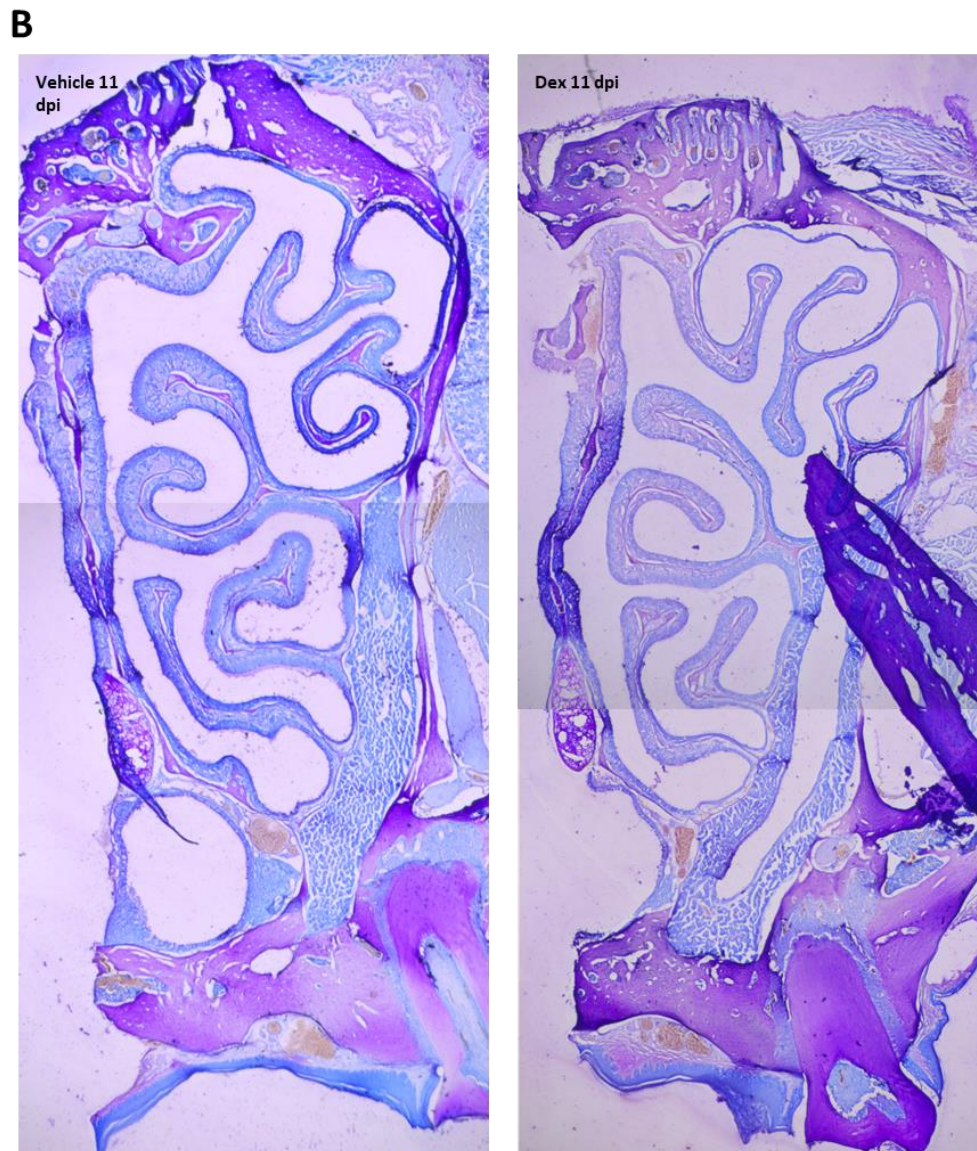
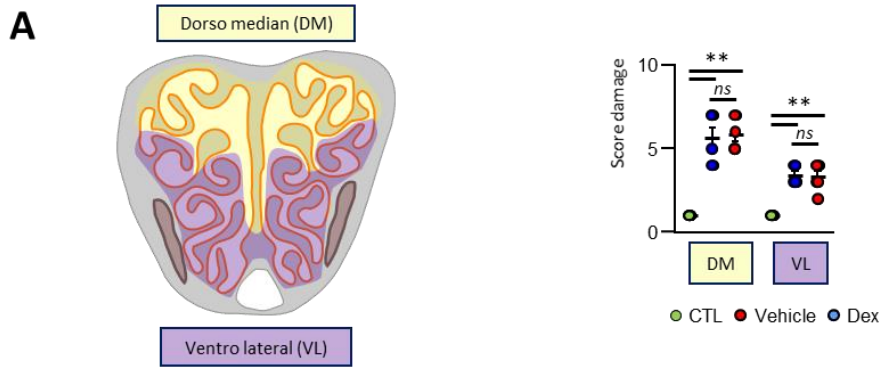
- Hosseinpour, M., Kabiri, M., Rajati Haghi, M., Ghadam Soltani, T., Rezaei, A., Faghfour, A., Poustchian Gholkhatmi, Z., Bakhshae, M., 2022. Intranasal Corticosteroid Treatment on Recovery of Long-Term Olfactory Dysfunction Due to COVID -19. *The Laryngoscope* lary.30353. <https://doi.org/10.1002/lary.30353>
- Huart, C., Philpott, C.M., Altundag, A., Fjaeldstad, A.W., Frasnelli, J., Gane, S., Hsieh, J.W., Holbrook, E.H., Konstantinidis, I., Landis, B.N., Macchi, A., Mueller, C.A., Negoias, S., Pinto, J.M., Poletti, S.C., Ramakrishnan, V.R., Rombaux, P., Vodicka, J., Welge-Lüessen, A., Whitcroft, K.L., Hummel, T., 2021. Systemic corticosteroids in coronavirus disease 2019 (COVID-19)-related smell dysfunction: an international view. *Int Forum Allergy Rhinol.* 11, 1041–1046. <https://doi.org/10.1002/alr.22788>
- Khan, M., Yoo, S.-J., Clijsters, M., Backaert, W., Vanstapel, A., Speleman, K., Lietaer, C., Choi, S., Hether, T.D., Marcelis, L., Nam, A., Pan, L., Reeves, J.W., Van Bulck, P., Zhou, H., Bourgeois, M., Debaveye, Y., De Munter, P., Gunst, J., Jorissen, M., Lagrou, K., Lorent, N., Neyrinck, A., Peetermans, M., Thal, D.R., Vandenberghe, C., Wauters, J., Mombaerts, P., Van Gerven, L., 2021. Visualizing in deceased COVID-19 patients how SARS-CoV-2 attacks the respiratory and olfactory mucosae but spares the olfactory bulb. *Cell* S0092867421012824. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.10.027>
- Kishimoto-Urata, M., Urata, S., Kagoya, R., Imamura, F., Nagayama, S., Reyna, R.A., Maruyama, J., Yamasoba, T., Kondo, K., Hasegawa-Ishii, S., Paessler, S., 2022. Prolonged and extended impacts of SARS-CoV-2 on the olfactory neurocircuit. *Sci Rep* 12, 5728. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-09731-7>
- Le Bon, S.D., Konopnicki, D., Pisanski, N., Prunier, L., Lechien, J.R., Horoi, M., 2021. Efficacy and safety of oral corticosteroids and olfactory training in the management of COVID-19-related loss of smell. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* <https://doi.org/10.1007/s00405-020-06520-8>
- McGann, J.P., 2017. Poor human olfaction is a 19th-century myth. *Science* 356. <https://doi.org/10.1126/science.aam7263>
- Meunier, N., Briand, L., Jacquin-Piques, A., Brondel, L., Pénicaud, L., 2021. COVID 19-Induced Smell and Taste Impairments: Putative Impact on Physiology. *Frontiers in physiology* 11. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.625110>
- Moon, C., Yoo, J.Y., Matarazzo, V., Sung, Y.K., Kim, E.J., Ronnett, G.V., 2002. Leukemia inhibitory factor inhibits neuronal terminal differentiation through STAT3 activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 9015–20.
- Muller, P.Y., Janovjak, H., Miserez, A.R., Dobbie, Z., 2002. Processing of gene expression data generated by quantitative real-time RT-PCR. *Biotechniques* 32, 1372–1374, 1376, 1378–1379.
- Nag, A.K., Saltagi, A.K., Saltagi, M.Z., Wu, A.W., Higgins, T.S., Knisely, A., Ting, J.Y., Illing, E.A., 2023. Management of Post-Infectious Anosmia and Hyposmia: A Systematic Review. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 132, 806–817. <https://doi.org/10.1177/00034894221118186>
- Nakashima, N., Nakashima, K., Taura, A., Takaku-Nakashima, A., Ohmori, H., Takano, M., 2020. Olfactory marker protein directly buffers cAMP to avoid depolarization-induced silencing of olfactory receptor neurons. *Nat Commun* 11, 2188. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15917-2>
- Ohta, Y., Ichimura, K., 2000. Proliferation markers, proliferating cell nuclear antigen, Ki67, 5-bromo-2'-deoxyuridine, and cyclin D1 in mouse olfactory epithelium. *The Annals of otology, rhinology, and laryngology* 109, 1046–8.
- Okumura, S., Saito, T., Okazaki, K., Fushimi, K., Tsuzuki, K., 2022. Clinical features of olfactory dysfunction in elderly patients. *Auris Nasus Larynx* S0385814622001638. <https://doi.org/10.1016/j.anl.2022.06.001>

- Pendolino, A.L., Ottaviano, G., Nijim, J., Scarpa, B., De Lucia, G., Berro, C., Nicolai, P., Andrews, P.J., 2022. A multicenter real-life study to determine the efficacy of corticosteroids and olfactory training in improving persistent COVID -19-related olfactory dysfunction. *Laryngoscope Investig Otolio* 2.989. <https://doi.org/10.1002/lio2.989>
- Pieniak, M., Oleszkiewicz, A., Avaro, V., Calegari, F., Hummel, T., 2022. Olfactory training – Thirteen years of research reviewed. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 141, 104853. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2022.104853>
- Porter, A.G., Janicke, R.U., 1999. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ* 6, 99–104.
- Ramakrishnan, M.A., 2016. Determination of 50% endpoint titer using a simple formula. *WJV* 5, 85. <https://doi.org/10.5501/wjv.v5.i2.85>
- Rashid, R.A., Zgair, A., Al-Ani, R.M., 2021. Effect of nasal corticosteroid in the treatment of anosmia due to COVID-19: A randomised double-blind placebo-controlled study. *American Journal of Otolaryngology* 42, 103033. <https://doi.org/10.1016/j.amjoto.2021.103033>
- Reyna, R.A., Kishimoto-Urata, M., Urata, S., Makishima, T., Paessler, S., Maruyama, J., 2022. Recovery of anosmia in hamsters infected with SARS-CoV-2 is correlated with repair of the olfactory epithelium. *Sci Rep* 12, 628. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-04622-9>
- Rutkai, I., Mayer, M.G., Hellmers, L.M., Ning, B., Huang, Z., Monjure, C.J., Coyne, C., Silvestri, R., Golden, N., Hensley, K., Chandler, K., Lehmicke, G., Bix, G.J., Maness, N.J., Russell-Lodrigue, K., Hu, T.Y., Roy, C.J., Blair, R.V., Bohm, R., Doyle-Meyers, L.A., Rappaport, J., Fischer, T., 2022. Neuropathology and virus in brain of SARS-CoV-2 infected non-human primates. *Nat Commun* 13, 1745. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29440-z>
- Schwob, J.E., Jang, W., Holbrook, E.H., Lin, B., Herrick, D.B., Peterson, J.N., Hewitt Coleman, J., 2017. Stem and progenitor cells of the mammalian olfactory epithelium: Taking poietic license. *J Comp Neurol* 525, 1034–1054. <https://doi.org/10.1002/cne.24105>
- Takenouchi, T., Morozumi, T., Wada, E., Suzuki, S., Nishiyama, Y., Sukegawa, S., Uenishi, H., 2021. Dexamethasone enhances CD163 expression in porcine IPKM immortalized macrophages. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Animal* 57, 10–16. <https://doi.org/10.1007/s11626-020-00535-5>
- Tan, B.K.J., Han, R., Zhao, J.J., Tan, N.K.W., Quah, E.S.H., Tan, C.J.-W., Chan, Y.H., Teo, N.W.Y., Charn, T.C., See, A., Xu, S., Chapurin, N., Chandra, R.K., Chowdhury, N., Butowt, R., von Bartheld, C.S., Kumar, B.N., Hopkins, C., Toh, S.T., 2022. Prognosis and persistence of smell and taste dysfunction in patients with covid-19: meta-analysis with parametric cure modelling of recovery curves. *BMJ* e069503. <https://doi.org/10.1136/bmj-2021-069503>
- Thébault, S., Lejal, N., Dogliani, A., Donchet, A., Urvoas, A., Valerio-Lepiniec, M., Lavie, M., Baronti, C., Touret, F., Da Costa, B., Bourgon, C., Fraysse, A., Saint-Albin-Deliot, A., Morel, J., Klonjowski, B., de Lamballerie, X., Dubuisson, J., Roussel, A., Minard, P., Le Poder, S., Meunier, N., Delmas, B., 2022. Biosynthetic proteins targeting the SARS-CoV-2 spike as anti-virals. *PLoS Pathog* 18, e1010799. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010799>
- Tragoonrunsea, J., Tangbumrungham, N., Nitivanichsakul, T., Roongpuvapaht, B., Tanjararak, K., 2023. Corticosteroid nasal irrigation as early treatment of olfactory dysfunction in COVID-19: A prospective randomised controlled trial. *Clinical Otolaryngology* 48, 182–190. <https://doi.org/10.1111/coa.14004>

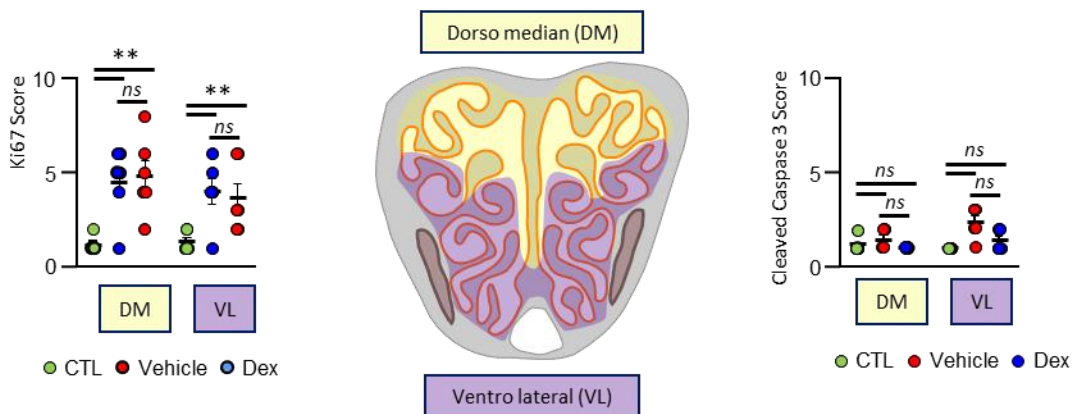
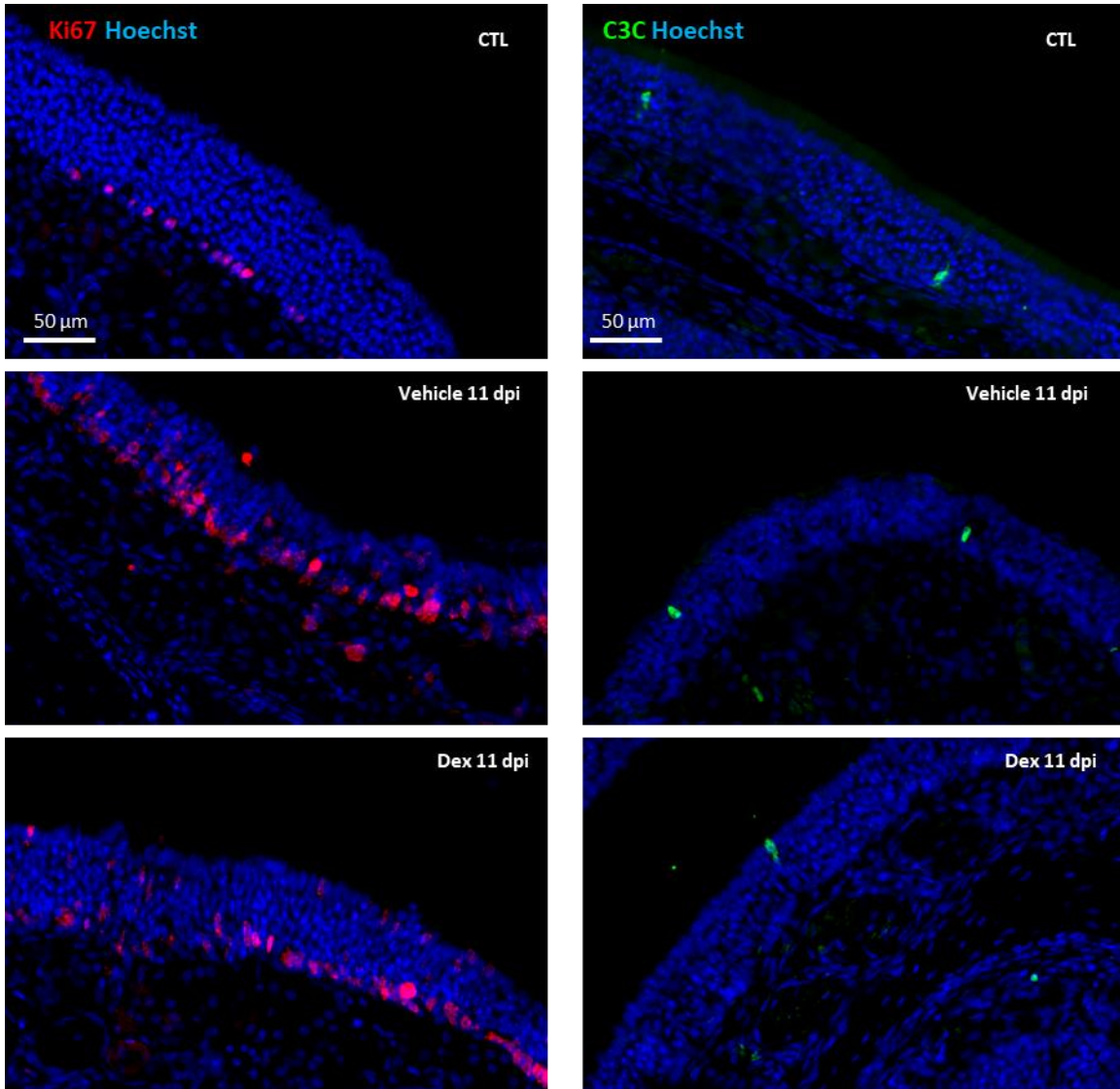
- Vaira, L.A., Hopkins, C., Petrocelli, M., Lechien, J.R., Cutrupi, S., Salzano, G., Chiesa-Estomba, C.M., Saussez, S., De Riu, G., 2021. Efficacy of corticosteroid therapy in the treatment of long- lasting olfactory disorders in COVID-19 patients. *Rhinology* 59, 21–25. <https://doi.org/10.4193/Rhin20.515>
- Van Regemorter, V., Hummel, T., Rosenzweig, F., Mouraux, A., Rombaux, P., Huart, C., 2020. Mechanisms Linking Olfactory Impairment and Risk of Mortality. *Front. Neurosci.* 14, 140. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00140>
- Verhaagen, J., Oestreicher, A.B., Gispén, W.H., Margolis, F.L., 1989. The expression of the growth associated protein B50/GAP43 in the olfactory system of neonatal and adult rats. *J Neurosci* 9, 683–91.
- Verma, A.K., Zheng, J., Meyerholz, D.K., Perlman, S., 2022. SARS-CoV-2 infection of sustentacular cells disrupts olfactory signaling pathways. *JCI Insight* 7, e160277. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.160277>
- von Bartheld, C.S., Hagen, M.M., Butowt, R., 2021. The D614G Virus Mutation Enhances Anosmia in COVID-19 Patients: Evidence from a Systematic Review and Meta-analysis of Studies from South Asia. *ACS Chem. Neurosci.* 12, 3535–3549. <https://doi.org/10.1021/acchemneuro.1c00542>
- von Bartheld, C.S., Wang, L., 2023. Prevalence of Olfactory Dysfunction with the Omicron Variant of SARS-CoV-2: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Cells* 12, 430. <https://doi.org/10.3390/cells12030430>
- Whitcroft, K.L., Altundag, A., Balungwe, P., Boscolo-Rizzo, P., Douglas, R., Enecilla, M.L.B., Fjaeldstad, A.W., Fornazieri, M.A., Frasnelli, J., Gane, S., Gudziol, H., Gupta, N., Haehner, A., Hernandez, A.K., Holbrook, E.H., Hopkins, C., Hsieh, J.W., Huart, C., Husain, S., Kamel, R., Kim, J.K., Kobayashi, M., Konstantinidis, I., Landis, B.N., Lechner, M., Macchi, A., Mazal, P.P., Miri, I., Miwa, T., Mori, E., Mullol, J., Mueller, C.A., Ottaviano, G., Patel, Z.M., Philpott, C., Pinto, J.M., Ramakrishnan, V.R., Roth, Y., Schlosser, R.J., Stjärne, P., Van Gerven, L., Vodicka, J., Welge-Luessen, A., Wormald, P.J., Hummel, T., 2023. Position paper on olfactory dysfunction: 2023. *Rhinology*. <https://doi.org/10.4193/Rhin22.483>
- Wyler, E., Adler, J.M., Eschke, K., Teixeira Alves, G., Peidli, S., Pott, F., Kazmierski, J., Michalick, L., Kershaw, O., Bushe, J., Andreotti, S., Pennitz, P., Abdelgawad, A., Postmus, D., Goffinet, C., Kreye, J., Reincke, S.M., Prüss, H., Blüthgen, N., Gruber, A.D., Kuebler, W.M., Witzernath, M., Landthaler, M., Nouailles, G., Trimpert, J., 2022. Key benefits of dexamethasone and antibody treatment in COVID-19 hamster models revealed by single-cell transcriptomics. *Molecular Therapy* S1525001622001733. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2022.03.014>
- Yang, M., Crawley, J.N., 2009. Simple behavioral assessment of mouse olfaction. *Current protocols in neuroscience* Chapter 8, Unit 8 24. <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0824s48>
- Yuan, L., Zhou, M., Ma, J., Liu, X., Chen, P., Zhu, H., Tang, Q., Cheng, T., Guan, Y., Xia, N., 2022. Dexamethasone ameliorates severe pneumonia but slightly enhances viral replication in the lungs of SARS-CoV-2-infected Syrian hamsters. *Cell Mol Immunol* 19, 290–292. <https://doi.org/10.1038/s41423-021-00793-7>
- Zazhytska, M., Kodra, A., Hoagland, D.A., Frere, J., Fullard, J.F., Shayya, H., McArthur, N.G., Moeller, R., Uhl, S., Omer, A.D., Gottesman, M.E., Firestein, S., Gong, Q., Canoll, P.D., Goldman, J.E., Roussos, P., tenOever, B.R., Jonathan B. Overvest, Lomvardas, S., 2022. Non-cell-autonomous disruption of nuclear architecture as a potential cause of COVID-19-induced anosmia. *Cell* S0092867422001350. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.01.024>

Gene	Forward primer	Reverse primer
Dicer	GGCTTTTACACATGCCTCCTACC	GTCCAAAATCGCATCTCCCAG
OMP	TCACCAACCTCATGACACGC	GCATCGGCCTCATTCCAATC
Golf	TGCTTCTGGGGGCTGGT	TTTCAGGATTGGCCAGTGGG
Cnga2	GAGATGGAAAGGGCTCTAAGAAGA	GAAGTAGTCCAGCACCAGCC
GAP43	TGCCAAGGAGGAGCCTAAAC	TTTGGCTTCATCTACAGCTTCTTTC
Ki67	TGCCTGTTCGGAAGGAGTATT	AGCCCCATTTACTTGCGTTG
IL-6	AGACAAAGCCAGAGTCATT	TCGGTATGCTAAGGCACAG
CXCL10	CTCTACTAAGAGCTGGTCC	CTAACACACTTTAAGGTGGG
IL-10	GGTTGCCAAACCTTATCAGAAATG	TTCACCTGTTCCACAGCCTTG
Iba1	TGGATGAGATCAACAAGCAATTC	AAGGCTTCCAGTTTGGAGGG
Ncf2	ATGTTCAATGGACAGAAGGGGC	TGGGATCTTTCTGGGGCACT
CD68	CACTTGGGGCCATGTTTCTC	CTCGGGTAATGCAGAAGGCA
CD163	CAGATACAGTGGCTTACAGTTTCC	CCATCAGCATTAAAATCATTGGCAT

Supplementary Table 1: sequence of primers used in this study.



Supplementary figure 1: Similar recovery of olfactory damage at 11 dpi in vehicle- or corticoid-treated hamsters. (A) Scores of the extent of damage. Mean \pm SEM, n=6, Mann Whitney; **P< 0.01 (B) Representative images of olfactory turbinates in a coronal section in the middle of the nasal cavity



Supplementary figure 2: Similar level of proliferation and apoptosis at 11 dpi in vehicle or dexamethasone treated groups. (Top) Representative images of olfactory turbinates in a coronal section in the middle of the nasal cavity showing proliferation (left, Ki67 staining) and apoptosis (Right, Cleaved caspase 3 staining) (Bottom) Scores of Ki67 and cleaved caspase 3 staining. Mean \pm SEM, $n=6$, Mann Whitney; $**P < 0.01$; ns non significant.

Discussion et perspectives.

1. L'activité des neutrophiles est cruciale dans la desquamation de l'épithélium olfactif

Alors que l'origine des pertes de l'odorat lié à la COVID-19 reste controversée^{366,367}, notre travail éclaire le rôle important joué par l'immunité innée dans leur genèse. Nous avons pu montrer que l'infiltration de neutrophiles et plus précisément l'activité des sérines protéases neutrophilaires joue un rôle prépondérant dans la destruction de l'épithélium olfactif suite à l'infection par le SARS-CoV-2 dans le modèle hamster.

D'après nos résultats, en utilisant un marquage caspase 3 clivée, l'apoptose n'est pas un des facteurs principaux impliqués dans la désorganisation du tissu et donc dans les pertes olfactives observées suite à l'infection par le SARS-CoV-2. Ces résultats différencient fortement la pathogenèse du SARS-CoV-2 de celle du virus Influenza A dans la muqueuse olfactive. En effet, en 2002, une étude de Mori et al. montrait que l'infection des neurones olfactifs par le virus Influenza A est à l'origine de leur apoptose. Ils seraient ensuite éliminés par les macrophages résident Iba1¹⁰⁷. Il faut noter que cette hypothèse ne repose que sur une image montrant un co-marquage caspase 3 clivé d'un seul neurone infecté. D'autres études dans les poumons soulignent cette propension du virus Influenza à induire une apoptose²⁶⁰. De plus, le tropisme de ces deux virus dans la muqueuse olfactive diffère étant donné que le virus Influenza infecte les neurones olfactifs¹⁰⁷ alors que le SARS-CoV-2 infecte principalement les cellules sustentaculaires²⁷⁻²⁹, ce qui pourrait expliquer en partie les différences entre les deux infections. Toutefois, d'autres types de mort cellulaires comme la nécrose, la pyroptose ou la nécroptose n'ont pas été étudiées et pourraient être impliqués dans les dommages tissulaires liés à l'infection³⁶⁸. Dans le cadre de l'infection par le SARS-CoV-2, l'ORF3a active la pyroptose, ce qui pourrait favoriser la libération du virus dans le milieu extracellulaire^{280,281,284}. Des études supplémentaires seront nécessaires pour savoir si ces mécanismes de mort cellulaire jouent un rôle secondaire dans la déstabilisation des tissus.

Dans la suite de l'étude, nous avons montré que l'infiltration des macrophages résidents, des neutrophiles et des macrophages pro-inflammatoires est fortement corrélée avec les dommages observés dans l'épithélium olfactif. Comme déjà abordé dans l'introduction, nous avons particulièrement étudié les rôles de ces cellules puisqu'elles avaient déjà été impliqués dans des dommages tissulaires au niveau de la muqueuse olfactive ou dans d'autres organes dans des cas d'infections virales^{35,37,258-260}. Par la suite, nous nous sommes concentrés uniquement sur les neutrophiles. Nous avons alors montré que l'activité de ces cellules et la libération de sérines protéases neutrophilaires sont les principaux responsables de la desquamation de l'épithélium olfactif suivant l'infection par le SARS-CoV-2. Dans

notre étude, nous avons utilisé deux méthodes pour inhiber les fonctions des neutrophiles : l'injection de cyclophosphamide, qui inhibe les divisions cellulaires des progéniteurs hématopoïétiques³⁶⁴ et l'injection d'inhibiteurs de la cathepsine C qui inhibent la maturation des sérine protéases neutrophilaires³⁶⁵. D'après Péniche et co-auteurs, la déplétion neutrophilaire par le cyclophosphamide est plus efficace que lors d'un traitement par les anticorps anti-Gr-1³⁶⁹. Pourtant, de nombreuses études montrent que les lymphocytes sont également affectés par le traitement cyclophosphamide, suggérant qu'après l'initiation de la réponse immunitaire adaptative, les effets du cyclophosphamide ne proviennent plus uniquement d'une déplétion neutrophilaire^{370,371}. Notre deuxième approche cible la cathepsine C qui est cruciale pour la maturation des sérine protéases neutrophilaires. Cette approche n'est pas non plus spécifique. En effet, la cathepsine C est également impliquée dans l'engagement des macrophages et des cellules de la microglie dans la voie pro-inflammatoire^{372,373}. De plus, la cathepsine C permet également la maturation des sérine protéases granzymes dans les lymphocytes T cytotoxiques et les cellules NK³⁷⁴. Pourtant, même si les deux molécules utilisées dans notre première étude ne sont pas totalement spécifique des neutrophiles, elles inhibent très efficacement leur activité^{364,365}. Les résultats de notre article basé sur ces deux approches différentes à des temps très précoces après l'infection sont concordants. Ils suggèrent donc que les neutrophiles jouent un rôle prépondérant dans la desquamation de l'épithélium olfactif après son infection par le SARS-CoV-2.

Dans notre étude, de manière surprenante, les inhibiteurs de neutrophile semblent inhiber la propagation de l'infection par le SARS-CoV-2 dans l'épithélium olfactif à court terme bien que ces cellules soient normalement impliquées dans la clairance virale¹⁶¹. D'autres études, comme celle de Calvert et al., montrent aussi une tendance des neutrophiles à faciliter la propagation du SARS-CoV-2 dans un modèle d'épithélium respiratoire²⁵⁹. Pourtant, des hamsters traités avec le cyclophosphamide montrent une infection par le SARS-CoV-2 prolongée et des symptômes prolongés avec une perte de poids durant jusqu'à environ 1 mois post-infection³⁷¹. Cet effet est certainement plus lié à l'effet du cyclophosphamide sur les lymphocytes et donc sur la réponse immunitaire adaptative à moyen et à long terme qu'à l'effet du cyclophosphamide sur les neutrophiles³⁷¹. La manière dont les neutrophiles favorisent la propagation virale est encore inconnue. Pourtant, d'après nos résultats, nous avons supposé que la desquamation de l'épithélium olfactif libère des cellules infectées dans la lumière de la cavité nasale. Ces cellules, en mouvement grâce à la clairance mucociliaire, pourraient porter le virus dans d'autres aires plus éloignées de l'épithélium olfactif, participant ainsi à sa propagation.

Le rôle des macrophages résidents Iba1⁺ et des macrophages pro-inflammatoires CD68⁺ n'ont pas été élucidé dans notre premier article. Ils pourraient pourtant avoir un rôle complémentaire à celui des neutrophiles et de leurs sérine protéases étant donné qu'ils sécrètent également des métalloprotéases de matrice qui pourraient avoir un rôle dans la désorganisation des tissus^{157,161}. Des

études sur le rôle de ces métalloprotéases pourraient être mises en place en utilisant des inhibiteurs de l'activité des métalloprotéases de matrice comme le périostat³⁷⁵.

En conclusion, notre étude nous a permis de suggérer un modèle mécanistique des pertes olfactives associées à la COVID-19 chez le hamster syrien. L'infection par le SARS-CoV-2 des cellules sustentaculaires est à l'origine d'une infiltration de cellules immunitaires comme les macrophages résidents, les neutrophiles et les macrophages pro-inflammatoires. Les neutrophiles libèrent des sérine protéases comme l'élastase neutrophilaire, la cathepsine G et la protéinase 3 qui déstabilisent la structure du tissu et entraînent sa desquamation. Cette dernière entraîne la libération de cellules infectées encore viables qui pourraient favoriser la propagation du SARS-CoV-2 dans la cavité nasale.

Notre étude a été effectuée dans le modèle hamster doré syrien de l'infection par le SARS-CoV-2. Celui-ci est infecté naturellement par le SARS-CoV-2 et récapitule assez fidèlement les symptômes observés chez l'humain¹⁰. Les hamsters syriens dorés développent notamment des pertes olfactives importantes qui en font un bon modèle pour l'étude de leurs mécanismes^{31,334}. Pourtant, nous ne pouvons être totalement sûrs que les mécanismes des pertes olfactives sont les mêmes que chez l'Homme bien que certaines études suggèrent qu'il y aurait aussi une desquamation de l'épithélium olfactif³². Une étude sur les effets de l'infection par le SARS-CoV-2 dans l'épithélium olfactif des primates non humains pourrait confirmer ou apporter des mécanismes complémentaires de perte d'odorat. La collaboration avec l'équipe de Catherine Chapon du CEA de Fontenay-aux-Roses aurait pu nous aider dans cette étude mais les biopsies à des temps précoces sont très compliquées à obtenir.

Pour confirmer les résultats de cette étude et aller plus loin dans les mécanismes moléculaires impliqués, nous pourrions utiliser un modèle de co-culture de neutrophiles et d'épithélium olfactif à l'interface air-liquide. Des modèles de culture d'épithélium olfactif à l'interface air-liquide ont déjà été développés par l'équipe de Schwob en 2018, bien qu'ils n'aient pas pu obtenir de neurones olfactifs matures dans ce système³⁷⁶. Une collaboration avec Vinciane Saint-Criq de l'équipe Interaction des Bactéries Commensales et probiotiques de l'hôte dans l'Unité Micalis nous permettra d'initier ces cultures à l'interface air-liquide. Ces modèles pourraient nous permettre de vérifier le modèle que nous avons développé précédemment. Ils nous permettront également d'étudier plus précisément le comportement des neutrophiles lors de l'infection par le SARS-CoV-2 dans l'épithélium olfactif. Ces modèles nous permettraient également d'identifier les chimiokines et les cytokines responsables du recrutement précoce des neutrophiles. Nous pourrions également étudier l'implication des macrophages résidents Iba1⁺ dans ce recrutement, puisque l'un des rôles les plus importants de ces cellules est le recrutement d'autres cellules impliquées dans l'inflammation¹⁴³.

Pour mieux comprendre les événements précoces de l'infection par le SARS-CoV-2 dans l'épithélium olfactif qui mènent au recrutement des neutrophiles, nous pourrions étudier l'effet de l'infection par le SARS-CoV-2 dans la muqueuse olfactive à des temps plus précoces, par exemple à 18 heures après l'instillation intranasale. En effet, à 1 jour post-infection, les neutrophiles sont déjà fortement recrutés surtout dans les parties antérieures de la cavité nasale. Les populations de cellules immunitaires présentes aux sites d'infection seront suivies pour mieux comprendre la séquence de recrutement des cellules de l'inflammation qui mène à la destruction du tissu.

2. A propos des causes des pertes de l'odorat pendant l'infection aiguë.

Les données comportementales obtenues dans notre étude nous mènent à conclure qu'entre jour 2 et jour 4 post-infection, pendant l'infection aiguë, les hamsters dorés syriens présentent une très profonde hyposmie qui est récupérée en partie à 8 jours post-infection. Pourtant, au moins jusqu'à 17 jours post-infection, ils continuent à montrer d'importants dysfonctionnements de l'odorat. Les origines des pertes de l'odorat sont encore très fortement controversées mais il a déjà été montré que celles-ci étaient fortement liées à la desquamation de la muqueuse olfactive³¹. D'après notre deuxième étude, cette desquamation mène au détachement des neurones olfactifs matures et immatures dans la lumière de la cavité nasale (**Figure 18**). Cette perte des populations neuronales de l'épithélium olfactif a déjà été confirmée dans plusieurs autres études^{220,361}. Mais, étant donné le temps de régénération de plus de 8 jours des neurones olfactifs matures, il est difficile de comprendre l'amélioration des perceptions olfactives dès 8 jours post-infection. D'autres mécanismes qu'une perte neuronale doivent intervenir pour expliquer cette amélioration précoce. La clairance mucociliaire est perturbée suite à l'infection par le SARS-CoV-2 car les cellules ciliées de l'épithélium respiratoire sont infectées³⁷⁷. Les cellules desquamées resteraient donc temporairement dans la cavité nasale, entraînant une obstruction au moins partielle des cornets olfactifs (**Figure 18**). Bryche et co-auteurs ont pu observer ce type d'obstruction à 2 jours post-infection²⁷. Certaines études chez l'humain montrent que des obstructions des voies olfactives peuvent être associées aux pertes de l'odorat³⁷⁸. Pourtant, les obstructions complètes de la cavité nasale sont plutôt rares étant donné qu'elles ne concernent qu'environ 30 % des patients atteints par la COVID-19³⁷⁹. Chez l'Homme, l'épithélium olfactif est situé dans la partie dorsale des cavités nasales, dans des fosses olfactives très étroites. Ce n'est pas le cas chez les rongeurs pour lesquels l'épithélium olfactif occupe près de 50 % de la cavité nasale. Donc, chez l'Homme, une desquamation de l'épithélium olfactif peut mener à une obstruction de la fente olfactive, empêchant la perception des odeurs sans toutefois bloquer le flux respiratoire global.

Dans le modèle hamster, nous avons observé que les débris cellulaires étaient quasi absents de la cavité nasale dès 8 jours post infection, ce qui pourrait expliquer une récupération partielle de l'odorat (**Figure 18**). De plus, dans le modèle hamster, les premiers neurones olfactifs immatures sont régénérés dans la zone ventrolatérale de l'épithélium olfactif dès 8 jours post-infection (**Figure 18**). Une étude très récente a montré que les neurones olfactifs immatures sont capables de délivrer des informations olfactives pertinentes au bulbe olfactif⁸⁸. L'apparition de nouveaux neurones olfactifs immatures pourrait donc également expliquer l'amélioration du comportement olfactif chez le hamster observé dès 8 jours post-infection.

Pourtant, cette récupération du comportement olfactif des hamsters n'est que partielle étant donné qu'ils ne parviennent pas à retrouver un morceau de fromage caché très profondément dans leur litière. A quoi ces pertes olfactives de plus longue durée sont-elles liées ? A 8 jours post-infection, les populations de neurones olfactifs matures ne sont pas encore régénérées et continuent même à diminuer dans certaines zones de l'épithélium olfactif jusqu'à 11 jours post-infection. Les déficits olfactifs observés après 8 jours post-infection seraient donc liées uniquement à la perte massive de neurones olfactifs matures.

Les mécanismes décrits dans notre étude supposeraient des pertes de l'odorat à moyen ou long terme dans le modèle hamster doré syrien, ce qui est en accord avec la durée moyenne des anosmies associées au SARS-CoV-2 estimée à 28 jours¹⁷.

Pourtant, environ 30 % des patients atteints par la COVID-19 se plaignent de pertes d'odorat qui sont résolues en environ 1 semaine, ce qui est très court par rapport à la durée de la régénération de l'épithélium olfactif¹⁷. Ces pertes de l'odorat devraient donc répondre à d'autres mécanismes. Certains chercheurs ont proposé qu'elles pourraient être causées par des dysfonctionnements temporaires des cellules sustentaculaires³⁸⁰, sachant que ces cellules sont essentielles pour maintenir les fonctions des neurones olfactifs⁶⁴. Ces pertes de l'odorat de courte durée pourraient également être expliquées par un manque de sensibilité des tests olfactifs utilisés chez l'humain. En effet, la plupart des tests olfactifs actuels consistent à tester les patients avec des odorants concentrés. Le test est positif si l'odeur est reconnue. Malheureusement, ce type de test ne permet pas de repérer une baisse de sensibilité à un ou plusieurs odorants. Certains types de déficits olfactifs ne pourraient donc pas être détectés par ces tests³⁸¹. Des tests olfactifs quantitatifs qui peuvent révéler des baisses de sensibilité aux odorants existent mais sont très contraignants, ce qui restreint fortement leur utilisation³⁸¹. Donc ces patients qui semblent avoir récupéré le sens de l'odorat après 8 jours pourraient encore avoir des déficits olfactifs comme des hyposmies.

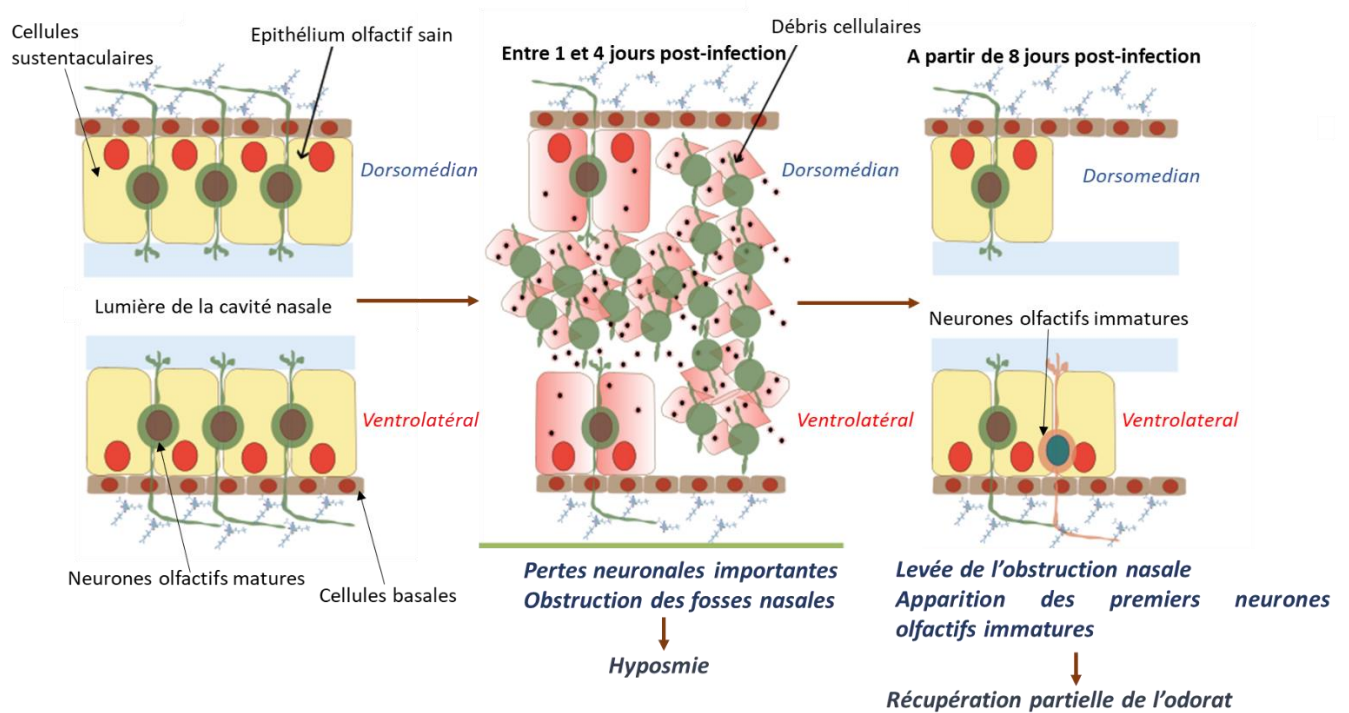


Figure 18 : Les pertes d'odorat précoces sont liées à une perte neuronale importante dans l'épithélium olfactif et à une obstruction des fosses olfactifs par les débris desquamés. Lors d'une infection par le SARS-CoV-2 dans l'épithélium olfactif, une destruction importante du tissu a lieu. Cette desquamation est à l'origine d'une perte neuronale importante. De plus, la clairance mucociliaire est fortement affectée à cause de l'infection des cellules ciliées de l'épithélium respiratoire ; les débris cellulaires libérés lors de la desquamation restent temporairement dans la lumière de la cavité nasale. La combinaison de l'obstruction de la cavité nasale et des pertes neuronales est à l'origine des hyposmies profondes observées chez le hamster doré syrien. A 8 jours post-infection, la levée de l'obstruction et l'apparition des premiers neurones olfactifs immatures dans les zones ventrolatérales de l'épithélium olfactif seraient à l'origine d'une récupération partielle de l'odorat chez le hamster syrien doré.

3. Des perturbations de la régénération de l'épithélium olfactif après l'infection par le SARS-CoV-2 : un lien avec le COVID long ?

D'après nos résultats, la régénération de l'épithélium olfactif commence à environ 8 jours post-infection chez le hamster doré syrien avec des divisions intenses des cellules basales dans toutes les zones étudiées. Les divisions cellulaires continuent activement jusqu'à 17 jours post-infection. Ces résultats diffèrent quelque peu des résultats observés en RT-qPCR dans lesquels l'expression du marqueur de division cellulaire Ki67 commence environ à 4 jours post-infection. Dans les parties antérieures de la cavité nasale, une augmentation de l'activité des cellules basales est observée dès 4 jours post-infection. Ces parties antérieures sont également extrêmement étendues chez le hamster syrien. Ces différences peuvent expliquer une telle différence entre une approche globale comme la RT-qPCR et une approche régionale comme nos analyses immunohistochimiques. Une inflammation

importante pourrait expliquer le manque de prolifération des cellules basales avant 8 jours post-infection. Les cytokines pro-inflammatoires et les radicaux libres de l'oxygène et de l'azote produits par les cellules immunitaires pourraient en effet empêcher leur prolifération^{38,235}.

Même si la prolifération des cellules basales indique que la régénération commence dès 8 jours post-infection partout dans l'épithélium olfactif, les cinétiques de récupération des trois zones étudiées diffèrent fortement. Une de ces zones était située dans les régions antérieures des cornets olfactifs. Les deux autres régions étudiées sont situées dans la partie centrale. L'une est située en dorsomédian et l'autre est située en ventrolatéral. Les raisons pour lesquelles nous avons étudié ces différentes zones sont listées dans le paragraphe **2.** des résultats.

Dans la zone ventrolatérale de l'épithélium olfactif, les premiers neurones olfactifs immatures apparaissent vers 8 jours post-infection et les premiers neurones olfactifs matures vers 17 jours post-infection (**Figure 19**). Pourtant, jusqu'à 11 jours post-infection, les populations de neurones olfactifs immatures continuent à diminuer dans ces zones, alors que l'infection y est résolue depuis longtemps. Les raisons de cette perte neuronale prolongée sont encore inconnues. Cette perte neuronale pourrait être liée à une forte inflammation résiduelle comme ce qui a été observé dans des biopsies humaine par Finlay et co-auteurs³³ ou au remodelage tissulaire observé lors de la régénération tissulaire^{265,266}. Pour départager ces deux hypothèses, il faudrait davantage étudier le contexte inflammatoire dans cette zone de la cavité nasale après infection par le SARS-CoV-2. Dans le troisième article, nous avons observé une infiltration de cellules Iba1⁺ dans ces zones, bien qu'elle soit beaucoup moins importante que dans les zones dorsomédianes de l'épithélium olfactif. Ces résultats sont confirmés par ceux obtenus à 21 et 42 jours post-infection par une équipe japonaise³⁶¹.

Dans la zone dorsomédiane de l'épithélium olfactif, aucune récupération des populations de neurones olfactifs matures n'a été observée à 17 jours post-infection. Par contre, des neurones olfactifs immatures en nombre apparaissent dès 11 jours post-infection (**Figure 19**). Néanmoins, ces cellules sont présentes en multicouches fortement désorganisées. Le niveau de désorganisation de ces cellules demande des études plus approfondies pour savoir si ces cellules sont capables de développer des dendrites et des axones. En effet, le développement d'un axone et la formation de synapses dans le bulbe olfactif sont des prérequis pour la différenciation terminale en neurones olfactifs matures et/ou la perception d'un signal olfactif cohérent. Par exemple, la microscopie confocale ou la microscopie électronique à transmission pourraient être utilisées pour étudier l'organisation de l'épithélium olfactif dans ces zones. La progression des axones des neurones olfactifs de cette zone vers le bulbe olfactif pourrait aussi être étudiée par traçage (marquage des récepteurs olfactifs correspondants sur les axones). Les liens entre ces perturbations de la régénération et l'inflammation résiduelle dans le tissu doivent aussi être étudiées. Des résultats préliminaires obtenus à 11 jours post-infection dans notre

troisième article montrent une forte infiltration de macrophages Iba1⁺ dans ces zones dorsomédianes, y indiquant donc la présence d'une forte inflammation résiduelle. Ces résultats sont à priori confirmés par ceux obtenus à 21 et 42 jours post-infection par une équipe japonaise³⁶¹. Ces études pourraient nous permettre de mieux comprendre les mécanismes des altérations de cette régénération de l'épithélium olfactif.

Dans la zone antérieure des cornets olfactifs, les premiers neurones olfactifs immatures n'apparaissent que vers 17 jours post-infection malgré les divisions cellulaires très intenses des cellules basales entre 4 et 11 jours post-infection (**Figure 19**). Les dommages tissulaires dans cette zone de l'épithélium restent d'ailleurs très importants jusqu'à 17 jours post-infection. Les raisons d'un tel retard de régénération sont encore largement inconnues. A notre connaissance, aucune étude n'a étudié les effets d'infections sur cette région de l'épithélium olfactif. Comprendre les niveaux d'inflammation dans cette zone à partir de 4 jours post-infection, après la clairance virale, serait utile pour comprendre ces retards de régénération.

Cette régénération asymétrique de l'épithélium olfactif pourrait expliquer certaines perturbations de l'odorat à moyen et long terme comme les parosmies. Les parosmies, c'est-à-dire l'association d'une odeur perçue avec une odeur différente généralement mauvaise, sont en effet présentes dans environ 25 % des cas de COVID-19^{19,20}.

En fait, une odeur est la perception d'une combinaison d'odorants^{52,53}. Chacun d'entre eux est reconnu par une combinaison de récepteurs olfactifs exprimés⁵³. Chacun de ces récepteurs olfactifs est exprimé par une population de neurones unique^{52,54,59}. De plus, l'expression des récepteurs olfactifs est généralement régionalisée dans de grandes zones de l'épithélium olfactif situées sur l'axe dorso-ventral^{54,60}. Les odorants constitutifs d'une odeur sont donc reconnus par une combinaison de récepteurs olfactifs qui peuvent être exprimés à la fois dans les zones ventrolatérales et dorsomédianes de l'épithélium olfactif. Chez le hamster doré syrien, les neurones olfactifs situés dans les zones ventrolatérales sont régénérés plus rapidement que les autres après infection par le SARS-CoV-2. Ainsi, les neurones olfactifs présents dans les zones ventrolatérales seront capables de détecter les odorants mais pas ceux des zones dorsomédianes.

L'analyse de l'expression des récepteurs olfactifs dans les fosses nasales pourrait nous permettre de mieux identifier des disparités de récupération entre les différentes populations neuronales. Les études menées par Verma et al. avec des souches virales 'murinisées' vont dans ce sens. En effet, plusieurs patterns d'expression des récepteurs olfactifs ont été observés après infection par le SARS-CoV-2 : une récupération rapide ayant lieu en 12 jours ou une récupération longue en plus de 40 jours, notamment pour les récepteurs OR 1319 et OR 1013³⁴⁹. Chez le hamster syrien, nous avons étudié les

expressions de deux récepteurs olfactifs uniquement (OR4E1 et OR13G1-like). L'expression du récepteur OR4E1 chute fortement à 4 jours post-infection mais est rapidement récupérée dès 8 jours post-infection. Aucune diminution significative de l'expression du récepteur OR13G1-like n'a pu être observée. Une étude plus étendue de l'expression des récepteurs olfactifs dans le modèle hamster serait nécessaire pour étudier ces disparités de régénération.

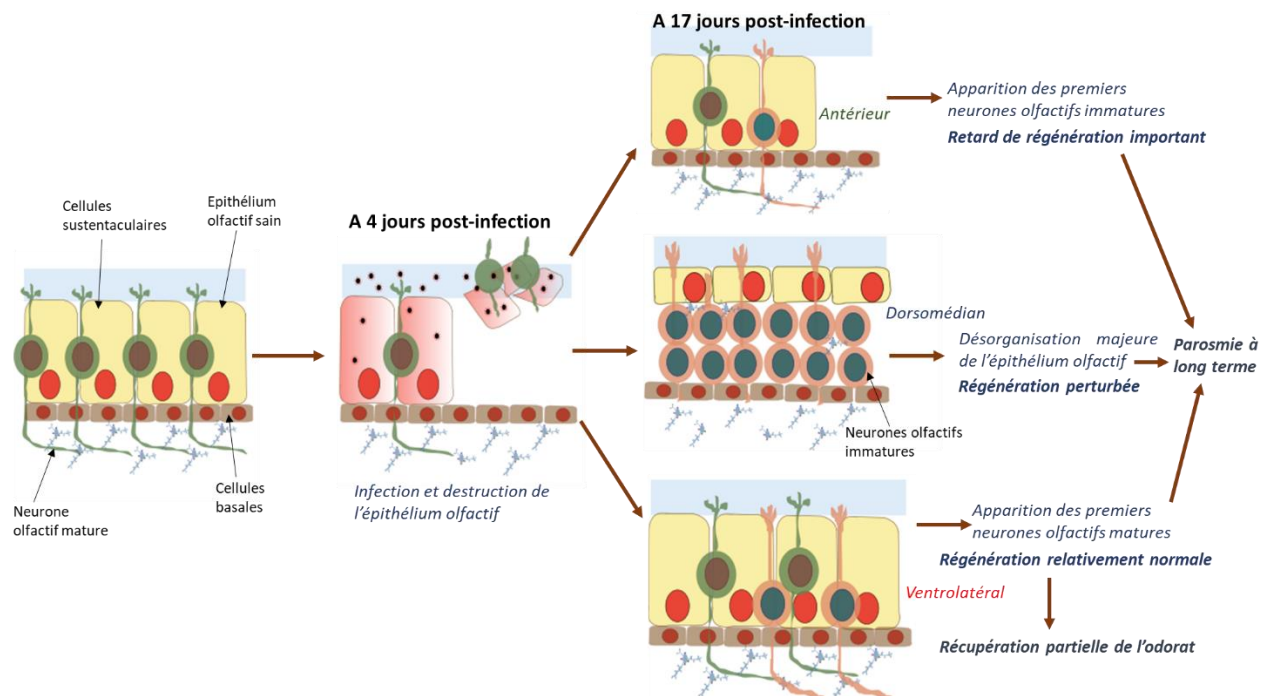


Figure 19 : La régénération asymétrique de l'épithélium olfactif après infection par le SARS-CoV-2 peut être à l'origine de perturbations de l'odorat à long terme comme des parosmies. L'infection par le SARS-CoV-2 cause une destruction de l'épithélium olfactif entre 1 et 4 jours post-infection. Plus tard, à 17 jours post-infection, de fortes disparités régionales sont observées dans les dynamiques de régénération de l'épithélium olfactif. Dans les zones ventrolatérales, les premiers neurones olfactifs matures apparaissent dans l'épithélium olfactif, ce qui permet une récupération partielle de l'odorat également. Dans les zones antérieures et dorsomédianes des cornets olfactifs, la régénération de l'épithélium est fortement retardée ou perturbée. En effet, dans les parties antérieures, les premiers neurones olfactifs immatures apparaissent uniquement vers 17 jours post-infection. Dans les zones dorsomédianes par contre, les neurones olfactifs immatures apparaissent en nombre dès 11 jours post-infection. Toutefois, ces cellules se présentent en multicouches fortement désorganisées. Nous ne savons pas si ces neurones olfactifs immatures désorganisés sont capables de développer les dendrites et des axones qui sont essentielles à leur fonction et à leur différenciation en neurones olfactifs matures. Cette asymétrie dans la régénération de l'épithélium olfactif pourrait être la cause de dysfonctionnements de l'olfaction à moyen et long terme comme les parosmies. En effet, les odorants sont reconnus par une combinaison de récepteurs olfactifs exprimés chacun par une population de neurones olfactifs. Ces populations de neurones sont fortement régionalisées sur l'axe dorso-ventral. Dans notre cas, les récepteurs exprimés en ventrolatéral pourront lier des odorants et transmettre un message olfactif vers le système nerveux central. Ce n'est pas le cas pour les récepteurs exprimés dans les régions dorsomédianes et antérieures. Ce manque de perception par certains récepteurs olfactifs pourrait entraîner des distorsions de l'odorat comme les parosmies.

Chez les hamsters traités avec la dexaméthazone (article 3), la zone ventrolatérale présente significativement plus de neurones olfactifs matures que chez les animaux non traités. Dans la région dorsomédiane de l'épithélium olfactif, au contraire, aucune amélioration n'a pu être observée chez les animaux traités par la dexaméthazone. Or, d'après nos données, les principaux dommages tissulaires ont lieu entre 2 et 4 jours post-infection dans la zone ventrolatérale de l'épithélium olfactif. Les

traitements glucocorticoïdes ont été débutés à 2 jours post-infection, c'est-à-dire lorsque les animaux commencent à présenter des pertes de l'odorat. L'amélioration observée au niveau des neurones olfactifs de la zone ventrolatérale pourrait être expliquée de deux manières. D'une part, le traitement glucocorticoïde pourrait inhiber l'entrée des neutrophiles et des macrophages dans la muqueuse olfactive et pourrait donc avoir empêché les dommages épithéliaux ayant lieu entre 2 et 4 jours post-infection dans cette région de l'épithélium³⁶³. D'autre part, la dexaméthasone force les macrophages en polarisation M2 et pourrait également permettre d'accélérer la régénération de l'épithélium olfactif dans ces régions de l'épithélium olfactif³⁶³. La première hypothèse semblerait plus probable étant donné que s'il y avait une amélioration de la régénération liée à la polarisation des macrophages, on devrait également observer une amélioration dans les aires dorsomédianes de l'épithélium olfactif. Pour vérifier cette hypothèse, nous pourrions faire une comparaison entre des animaux traités par la dexaméthazone dès 2 jours post-infection et des animaux traités à 4 jours post-infection, une fois que la plupart des dommages aient eu lieu dans la zone ventrolatérale de l'épithélium olfactif.

Dans ces articles, comme la majorité des dommages cellulaires ont lieu dans l'épithélium olfactif, nous n'avons que peu abordé les effets de l'infection par le SARS-CoV-2 sur le bulbe olfactif. Même s'il est peu probable que le virus puisse infecter le bulbe olfactif^{28,29,68}, des signes d'inflammation ont pu être observés dans les bulbes de hamsters infectés par le SARS-CoV-2 jusqu'à 42 jours post-infection³⁶¹. En effet, Kishimoto-Urata et al. ont pu observer une activation des microglies et un gliose dans la zone glomérulaire du bulbe olfactif³⁶¹. Cette gliose était plus prononcée dans les glomérules reliés aux neurones positionnés en dorsomédian que dans les glomérules reliés aux neurones positionnés en ventrolatéral³⁶¹. De plus, les glomérules reliés aux neurones dorsomédiens semblent de taille plus faible que les glomérules reliés aux neurones ventrolatéraux³⁶¹.

Or, dans notre étude et dans celle de l'équipe japonaise, l'inflammation après infection semble plus importante dans les zones dorsomédianes que dans les zones ventrolatérales³⁶¹. Dans notre étude sur le traitement dexaméthazone, les animaux traités semblent de taille plus importante que chez les animaux non traités. Donc, il semblerait que l'inflammation présente dans l'épithélium olfactif soit à l'origine d'une inflammation dans le bulbe olfactif et de perturbations de l'intégration du signal. Il a déjà été démontré qu'une inflammation chronique dans l'épithélium olfactif pouvait être à l'origine d'une inflammation dans le bulbe olfactif²²¹. Cette inflammation au niveau du bulbe olfactif empêche-t-elle la formation de synapses entre les neurones olfactifs et les cellules mitrales du bulbe olfactif ? L'étude de l'inflammation au niveau du bulbe olfactif pourrait nous apporter des informations complémentaires sur les altérations de la régénération des neurones olfactifs et de l'odorat à long terme.

Pour aller plus loin, nous pourrions étudier plus précisément la présence des neutrophiles et de macrophages M1 et M2 dans ces différentes régions pour mieux comprendre le contexte

immunologique de cette régénération perturbée. En effet, des défauts de clairance des neutrophiles par les macrophages après la phase inflammatoire pourraient être impliqués dans des défauts de régénération^{161,382}. Il serait donc intéressant de savoir si la présence de neutrophiles dans l'épithélium olfactif après la clairance virale pourrait expliquer sa régénération perturbée dans les zones dorsomédianes et antérieures des cornets olfactifs.

L'équilibre entre les 2 formes de macrophages M1 et M2 est particulièrement important pour une régénération correcte du tissu. En effet, la présence de macrophages M1 dans les tissus cause la libération d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote et de cytokines pro-inflammatoires qui empêchent la prolifération des cellules basales et donc la régénération^{38,235}. A l'opposé, une trop importante sécrétion de cytokines anti-inflammatoires par les macrophages M2 comme l'IL-13, le TGF- β , le VEGF et l'EGF pourrait être à l'origine d'une fibrose dans les tissus et donc à une régénération anormale de ce tissu²³⁵. L'étude de ces deux types de macrophages dans les différentes zones étudiées pourrait nous amener des informations complémentaires sur les mécanismes à l'origine des perturbations de la régénération observées.

Enfin, pour comprendre l'environnement inflammatoire dans les différentes régions étudiées, nous pourrions faire des microdissections laser pour les isoler et en extraire les ARN ou les protéines. Les expressions relatives d'ARN ou des protéines impliqués dans l'inflammation et dans la régénération seront par la suite analysées par RT-qPCR³⁸³. Une collaboration avec l'équipe de Claudia Bevilacqua nous permettra de réaliser ces expériences à la suite de cette thèse. Elles nous permettront de mieux comprendre le microenvironnement cytokinique dans ces zones et nous permettront de compléter notre compréhension des perturbations de la régénération observées dans nos études.

Conclusion

Un des symptômes les plus fréquents après l'infection par le SARS-CoV-2 est une perte de l'odorat. Cette perte de l'odorat a atteint presque 50 % des patients infectés²¹. De plus, près de 10 % des patients présentent des formes persistantes des pertes de l'odorat^{16,18,23}. Comme les pertes de l'odorat altèrent le comportement alimentaire et favorisent les états dépressifs²⁶, ces pertes de l'odorat deviennent un fort enjeu de santé publique. Il était donc important de mieux comprendre les mécanismes de ces dernières. C'est le but de ce travail de thèse, réalisé en collaboration avec Brice Korkmaz de l'Université de Tours et avec Sophie Le Poder de l'École Nationale Vétérinaire de Maisons-Alfort.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés aux mécanismes de l'établissement de l'anosmie pendant l'infection aiguë. Des études sur le modèle hamster doré syrien avaient déjà montré que les dommages épithéliaux associés à l'infection par le SARS-CoV-2 étaient fortement corrélés avec les pertes de l'odorat observées³¹. Nous nous sommes donc intéressés à l'origine de ces desquamations de l'épithélium olfactif. L'apoptose des cellules infectées par le SARS-CoV-2 ou des cellules avoisinantes ne semble pas être à l'origine de cette destruction du tissu d'après notre étude, contrairement à ce qui était suggéré par la littérature^{28,34}. Au contraire, l'utilisation d'inhibiteurs des fonctions des neutrophiles, le cyclophosphamide et les inhibiteurs de cathepsine, nous a permis de montrer que les neutrophiles sont les principales cellules responsables de cette desquamation et donc de la perte de l'odorat.

Pourtant, il est peu probable que ces deux drogues puissent être utilisées en clinique. En effet, les neutrophiles sont impliqués dans de nombreux aspects de l'immunité, dont la mise en place des réponses immunitaires adaptatives¹⁶¹. De plus, ces cellules sont importantes pour la clairance virale à cause de leurs nombreuses fonctions effectrices (dégranulation, formation de NET...) ¹⁶¹. Il est donc possible que l'utilisation d'inhibiteurs ciblant directement les neutrophiles soit à l'origine d'une aggravation de la maladie à plus ou moins long terme. De plus, le cyclophosphamide cible également les lymphocytes³⁷⁰ et un traitement par le cyclophosphamide sur le long terme est à l'origine d'infections persistantes par le SARS-CoV-2³⁷¹. De plus, l'arrivée des symptômes de la perte de l'odorat coïncide déjà avec la présence de dommages importants dans la muqueuse olfactive³¹. Si la prise médicamenteuse commence au premiers signes d'anosmie, il est sûr que la plupart des dommages cellulaires que ces traitements pourraient prévenir ont déjà été subis.

Dans deux autres études, nous nous sommes intéressés aux cinétiques de régénération de l'épithélium olfactif et au rôle de l'inflammation dans les dynamiques de régénération. Nos études nous ont permis de suggérer que l'hyposmie profonde observée pendant l'infection aiguë par le SARS-CoV-2 est liée à une obstruction des fosses nasales et à une perte neuronale. Suite à la disparition des débris

cellulaires de la cavité nasale et à l'apparition des premiers neurones olfactifs immatures à 8 jours post-infection, les comportements olfactifs des animaux s'améliorent même si une hyposmie persiste jusqu'à jour 17 post-infection. Cette hyposmie persistante pourrait être liée à une régénération encore incomplète de la population de neurones olfactifs matures dans l'épithélium olfactif.

De fait, une très grande disparité régionale des cinétiques de régénération de l'épithélium olfactif a pu être observée dans notre modèle hamster. A 17 jours post-infection, dans les parties ventrolatérales de l'épithélium olfactif, les premiers neurones olfactifs matures sont régénérés alors qu'aucune récupération de ces cellules n'est observée dans les parties dorsomédianes et antérieures. Le même type de différence a été observé dans une étude japonaise à 21 et 42 jours post-infection³⁶¹. Ces dysfonctionnements de la régénération pourraient expliquer des anosmies de longue durée dépendantes des récepteurs olfactifs exprimés comme le suggère l'article de Parker et co-auteurs³⁶².

Dans notre troisième étude, nous avons pu montrer que l'inflammation est beaucoup plus importante dans les zones dorsomédianes (avec une régénération perturbée) que dans les zones ventrolatérales (avec une régénération relativement normale). Ces résultats ont été confirmés par ceux d'une équipe japonaise³⁶¹. L'inflammation pourrait donc être impliquée dans les défauts de régénération observés. Notre troisième étude avec un traitement dexaméthasone soutient cette hypothèse étant donné qu'on observe une légère augmentation de la population de neurones olfactifs matures chez les animaux traités. Chez l'Homme, les patients subissant des pertes de l'odorat de longue durée présentent aussi des niveaux d'inflammation importants par rapport aux patients ayant retrouvé le sens de l'odorat³³.

Actuellement, un traitement est étudié pour le traitement des anosmies de longue durée. Ce traitement contiendrait des plaquettes dans le plus faible volume de plasma possible. Ce traitement contient également un grand nombre de facteurs de croissance qui peuvent induire la régénération de la muqueuse olfactive, dont le PDGF, le VEGF, le TGF- β ou l'EGF dont certains ont été abordés dans le paragraphe **2.1.1.2**³⁸⁴. Ce médicament ne joue donc pas directement sur l'inflammation mais fournit directement les facteurs de croissance qui sont secrétés normalement par les macrophages M2 lors de la résolution de l'inflammation^{139,140,147}. L'essai clinique réalisé sur 30 patients réalisé par Lechien et co-auteurs montre une amélioration légère mais significative des fonctions olfactives des patients, notamment sur le seuil de détection, la discrimination et l'identification des odeurs³⁸⁵.

Références.

1. Zhou P, Yang X Lou, Wang XG, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 2020;579(7798):270-273. doi:10.1038/s41586-020-2012-7
2. Wu A, Peng Y, Huang B, et al. Genome Composition and Divergence of the Novel Coronavirus (2019-nCoV) Originating in China. *Cell Host Microbe*. 2020;27(3):325-328. doi:10.1016/j.chom.2020.02.001
3. Cucinotta D, Vanelli M. WHO declares COVID-19 a pandemic. *Acta Biomed*. 2020;91(1):157-160. doi:10.23750/abm.v91i1.9397
4. Asghar A, Imran HM, Bano N, et al. SARS-COV-2/COVID-19: scenario, epidemiology, adaptive mutations, and environmental factors. *Environ Sci Pollut Res*. 2022;29(46):69117-69136. doi:10.1007/s11356-022-22333-0
5. Liu Y, Gayle AA, Wilder-Smith A, Rocklöv J. The reproductive number of COVID-19 is higher compared to SARS coronavirus. *J Travel Med*. 2020;27(2):1-4. doi:10.1093/jtm/taaa021
6. Karimizadeh Z, Dowran R, Mokhtari-azad T, Shafiei-Jandaghi NZ. The reproduction rate of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 different variants recently circulated in human: a narrative review. *Eur J Med Res*. 2023;28(1):1-10. doi:10.1186/s40001-023-01047-0
7. Liu Y, Rocklöv J. The effective reproductive number of the Omicron variant of SARS-CoV-2 is several times relative to Delta. *J Travel Med*. 2022;29(3):1-4. doi:10.1093/jtm/taac037
8. Buitrago-Garcia D, Egli-Gany D, Counotte MJ, et al. Occurrence and transmission potential of asymptomatic and presymptomatic SARSCoV-2 infections: A living systematic review and meta-analysis. *PLoS Med*. 2020;17(9):1-25. doi:10.1371/journal.pmed.1003346
9. Tan J, Ge Y, Martinez L, et al. Transmission roles of symptomatic and asymptomatic COVID-19 cases: A modelling study. *Epidemiol Infect*. 2022;150. doi:10.1017/S0950268822001467
10. Shou S, Liu M, Yang Y, et al. Animal Models for COVID-19: Hamsters, Mouse, Ferret, Mink, Tree Shrew, and Non-human Primates. *Front Microbiol*. 2021;12(626553):1-17. doi:10.3389/fmicb.2021.626553
11. Alimohamadi Y, Sepandi M, Taghdir M, Hosamirudsari H. Determine the most common clinical symptoms in COVID-19 patients: A systematic review and meta-analysis. *J Prev Med Hyg*. 2020;61(3):E304-E312. doi:10.15167/2421-4248/jpmh2020.61.3.1530
12. Ng SC, Tilg H. COVID-19 and the gastro-intestinal tract: more than meets the eye. *Gut*. 2020;69(6):973-974. doi:10.1128/jvi.00127-20
13. Wang L, Shen Y, Li M, et al. Clinical manifestations and evidence of neurological involvement in 2019 novel coronavirus SARS-CoV-2: a systematic review and meta-analysis. *J Neurol*. 2020;267(10):2777-2789. doi:10.1007/s00415-020-09974-2
14. Ng WH, Tipih T, Makoah NA, et al. Comorbidities in SARS-CoV-2 patients: A systematic review and meta-analysis. *MBio*. 2021;12(1):1-12. doi:10.1128/mBio.03647-20
15. Davis HE, Assaf GS, McCorkell L, et al. Characterizing long COVID in an international cohort: 7 months of symptoms and their impact. *eClinicalMedicine*. 2021;38. doi:10.1016/j.eclinm.2021.101019
16. Premraj L, Kannapadi N V., Briggs J, et al. Mid and long-term neurological and neuropsychiatric manifestations of post-COVID-19 syndrome: A meta-analysis. *J Neurol Sci*. 2022;434(October

- 2021):1-8. doi:10.1016/j.jns.2022.120162
17. Killingley B, Mann AJ, Kalinova M, et al. Safety, tolerability and viral kinetics during SARS-CoV-2 human challenge in young adults. *Nat Med.* 2022;28(5):1031-1041. doi:10.1038/s41591-022-01780-9
 18. Karamali K, Elliott M, Hopkins C. COVID-19 related olfactory dysfunction. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2022;30(1):19-25. doi:10.1097/MOO.0000000000000783
 19. Lechien JR, Vaira LA, Saussez S. Prevalence and 24-month recovery of olfactory dysfunction in COVID-19 patients: A multicentre prospective study. *J Intern Med.* 2022;293:82-90. doi:10.1111/joim.13564
 20. Gurrola JG, Chang JL, Roland LT, Loftus PA, Cheung SW. Short-term chemosensory distortions and phantoms in COVID-19. *Laryngoscope Invest Otolaryngol.* 2021;6(2):172-176. doi:10.1002/lio2.532
 21. Butowt R, Bilińska K, Von Bartheld C. Why Does the Omicron Variant Largely Spare Olfactory Function? Implications for the Pathogenesis of Anosmia in Coronavirus Disease 2019. *J Infect Dis.* 2022;226(8):1304-1308. doi:10.1093/infdis/jiac113
 22. Von Bartheld CS, Hagen MM, Butowt R. The D614G Virus Mutation Enhances Anosmia in COVID-19 Patients: Evidence from a Systematic Review and Meta-analysis of Studies from South Asia. *ACS Chem Neurosci.* 2021;12(19):3535-3549. doi:10.1021/acscchemneuro.1c00542
 23. Boscolo-Rizzo P, Hummel T, Hopkins C, et al. High prevalence of long term olfactory, gustatory and chemesthesis dysfunction in post-COVID-19 patients: a matched case-control study with one-year follow-up using a comprehensive psychophysical evaluation. *Rhinology.* 2021;59.
 24. Vivaldi G, Pfeffer PE, Talaei M, Basera J, Shaheen SO, Martineau AR. Articles Long-term symptom profiles after COVID-19 vs other acute respiratory infections: an analysis of data from the COVIDENCE UK study. Published online 2023:1-13. doi:10.1016/j.eclinm.2023.102251
 25. Glezer I, Bruni-Cardoso A, Schechtman D, Malnic B. Viral infection and smell loss: The case of COVID-19. *J Neurochem.* 2021;157(4):930-943. doi:10.1111/jnc.15197
 26. Rebholz H, Braun RJ, Ladage D, Knoll W, Kleber C, Hassel AW. Loss of Olfactory Function—Early Indicator for Covid-19, Other Viral Infections and Neurodegenerative Disorders. *Front Neurol.* 2020;11(October):1-15. doi:10.3389/fneur.2020.569333
 27. Bryche B, St Albin A, Murri S, et al. Massive transient damage of the olfactory epithelium associated with infection of sustentacular cells by SARS-CoV-2 in golden Syrian hamsters. *Brain Behav Immun.* 2020;89(June):579-586. doi:10.1016/j.bbi.2020.06.032
 28. Ye Q, Zhou J, He Q, et al. SARS-CoV-2 infection in the mouse olfactory system. *Cell Discov.* 2021;7(1):1-13. doi:10.1038/s41421-021-00290-1
 29. Khan M, Yoo S-J, Clijsters M, et al. Visualizing in deceased COVID-19 patients how SARS-CoV-2 attacks the respiratory and olfactory mucosae but spares the olfactory bulb. *Cell.* Published online 2021:5932-5949. doi:10.1016/j.cell.2021.10.027
 30. Sauve F, Nampoothiri S, Fernando D, et al. SARS-CoV-2 infects human GnRH neurons and tanycytes, disrupting hypothalamic-pituitary hormonal axes. *Res Sq.* Published online 2021:1-33. <https://europepmc.org/article/PPR/PPR418987%0Ahttps://europepmc.org/article/ppr/ppr418987>
 31. Reyna RA, Kishimoto-Urata M, Urata S, Makishima T, Paessler S, Maruyama J. Recovery of anosmia in hamsters infected with SARS-CoV-2 is correlated with repair of the olfactory epithelium. *Sci*

- Rep. 2022;12(1):1-8. doi:10.1038/s41598-021-04622-9
32. Vaira LA, Hopkins C, Sandison A, et al. Olfactory epithelium histopathological findings in long-term coronavirus disease 2019 related anosmia. *J Laryngol Otol.* 2020;134(12):1123-1127. doi:10.1017/S0022215120002455
 33. Finlay JB, Brann DH, Hachem RA, et al. Persistent post-COVID-19 smell loss is associated with immune cell infiltration and altered gene expression in olfactory epithelium. *Sci Transl Med.* 2022;14(676):1-14. doi:10.1126/scitranslmed.add0484
 34. Seo JS, Yoon SW, Hwang SH, et al. The microvillar and solitary chemosensory cells as the novel targets of infection of sars-cov-2 in syrian golden hamsters. *Viruses.* 2021;13(8). doi:10.3390/v13081653
 35. Kanaya K, Kondo K, Suzukawa K, et al. Innate immune responses and neuroepithelial degeneration and regeneration in the mouse olfactory mucosa induced by intranasal administration of Poly(I:C). *Cell Tissue Res.* 2014;357(1):279-299. doi:10.1007/s00441-014-1848-2
 36. Stegelmeier AA, van Vloten JP, Mould RC, et al. Myeloid cells during viral infections and inflammation. *Viruses.* 2019;11(2). doi:10.3390/v11020168
 37. Coates BM, Staricha KL, Koch CM, et al. Inflammatory monocytes drive Influenza A virus-mediated lung injury in juvenile mice. *J Immunol.* 2018;200(7):2391-2404. doi:10.4049/jimmunol.1701543.Inflammatory
 38. Chen M, Reed RR, Lane AP. Chronic Inflammation Directs an Olfactory Stem Cell Functional Switch from Neuroregeneration to Immune Defense. *Cell Stem Cell.* 2019;25(4):501-513.e5. doi:10.1016/j.stem.2019.08.011
 39. Salazar I, Sanchez-Quinteiro P, Barrios AW, López Amado M, Vega JA. *Anatomy of the Olfactory Mucosa.* Vol 164.; 2019. doi:10.1016/B978-0-444-63855-7.00004-6
 40. McGann JP. Poor human olfaction is a 19th-century myth. *Science (80-).* 2017;356(6338). doi:10.1126/science.aam7263
 41. Bushdid C, Magnasco MO, Vosshall LB, Keller A, Mixture M. Humans can discriminate more than 1 Trillion Olfactory Stimuli. *Science (80-).* 2016;343(August):1370-1373.
 42. Porter J, Craven B, Khan RM, et al. Mechanisms of scent-tracking in humans. *Nat Neurosci.* 2007;10(1):27-29. doi:10.1038/nn1819
 43. Pinto JM, Wroblewski KE, Kern DW, Schumm LP, McClintock MK. Olfactory dysfunction predicts 5-year mortality in older adults. *PLoS One.* 2014;9(10):1-9. doi:10.1371/journal.pone.0107541
 44. Chamanza R, Wright JA. A Review of the Comparative Anatomy, Histology, Physiology and Pathology of the Nasal Cavity of Rats, Mice, Dogs and Non-human Primates. Relevance to Inhalation Toxicology and Human Health Risk Assessment. *J Comp Pathol.* 2015;153(4):287-314. doi:10.1016/j.jcpa.2015.08.009
 45. Morrison EE, Costanzo RM. Morphology of the adult human olfactory epithelium. *J Comp Neurol.* 1990;297:1-13.
 46. Witt M, Wozniak W. Structure and Function of the Vomeronasal Organ. *Adv Otorhinolaryngol.* 2006;63:70-83. doi:10.1159/000093751
 47. Marshall DA, Maruniak JA. Masera's organ responds to odorants. *Brain Res.* 1986;366(1-2):329-332. doi:10.1016/0006-8993(86)91312-0
 48. Moine F, Brechbühl J, Nenniger Tosato M, Beaumann M, Broillet MC. Alarm pheromone and

- kairomone detection via bitter taste receptors in the mouse Grueneberg ganglion. *BMC Biol.* 2018;16(1):1-13. doi:10.1186/s12915-017-0479-y
49. Bumbalo R, Lieber M, Schroeder L, Polat Y, Breer H, Fleisher J. Grueneberg Glomeruli in the Olfactory Bulb are Activated by Odorants and Cool Temperature. *Cell Mol Neurobiol.* 2017;37:729-742. doi:https://doi.org/10.1007/s10571-016-0408-6
 50. Kim K, Zhao K. A Nasal Aerodynamics Perspective of Retronasal Olfaction: Rodents vs. Humans. *Chemosens Percept.* 2022;15(2):124-134. doi:10.1007/s12078-022-09300-2
 51. Brennan PA, Zufall F. Pheromonal communication in vertebrates. *Nature.* 2006;444:308-315. doi:doi:10.1038/nature05404
 52. Glezer I, Malnic B. Olfactory receptor function. In: *Handbook of Clinical Neurology.* Vol 164. Elsevier B.V.; 2019:67-78. doi:10.1016/B978-0-444-63855-7.00005-8
 53. Malnic B, Hirono J, Sato T, Buck LB. Combinatorial receptor codes for odors. *Cell.* 1999;96:713-723. doi:10.1016/S0092-8674(00)80581-4
 54. Mori K, Von Campenhausen H, Yoshihara Y. Zonal organization of the mammalian main and accessory olfactory systems. *Philos Trans R Soc B Biol Sci.* 2000;355(1404):1801-1812. doi:10.1098/rstb.2000.0736
 55. Araneda RC, Kini AD, Firestein S. The molecular receptive range of an odorant receptor. *Nat Neurosci.* 2000;3(12):1248-1255. doi:10.1038/81774
 56. Godfrey PA, Malnic B, Buck LB. The mouse olfactory receptor gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(7):2156-2161.
 57. Zozulya S, Echeverri F, Nguyen T. The human olfactory receptor repertoire. *Genome Biol.* 2001;2(6):1-12. doi:10.1186/gb-2001-2-6-research0018
 58. Joshi D, Völkl M, Shepherd GM, Laska M. Olfactory sensitivity for enantiomers and their racemic mixtures - A comparative study in CD-1 mice and spider monkeys. *Chem Senses.* 2006;31(7):655-664. doi:10.1093/chemse/bjl006
 59. Chess A, Simon I, Cedar H, Axel R. Allelic inactivation regulates olfactory receptor gene expression. *Cell.* 1994;78(5):823-834. doi:10.1016/S0092-8674(94)90562-2
 60. Vassar R, Ngai J, Axel R. Spatial segregation of odorant receptor expression in the Mammalian Olfactory Epithelium. *Cell.* 1993;74:309-318. doi:10.1007/s004410050595
 61. Levy NS, Bakalyar HA, Reed RR. Signal transduction in olfactory neurons. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1991;39(4B):633-637. doi:10.1016/B978-0-12-809324-5.24173-4
 62. Ronnett G V., Moon C. G proteins and olfactory signal transduction. *Annu Rev Physiol.* 2002;64(5):189-222. doi:10.1146/annurev.physiol.64.082701.102219
 63. Korsching SI. Olfactory receptors. In: *Encyclopedia of Biological Chemistry.* ; 2004:149-154.
 64. Liang F. Sustentacular cell enwrapment of olfactory receptor neuronal dendrites: An update. *Genes (Basel).* 2020;11(5):14-17. doi:10.3390/genes11050493
 65. Hegg CC, Irwin M, Lucero MT. Calcium store-mediated signaling in sustentacular cells of the mouse olfactory epithelium. *Glia.* 2009;57(6):634-644. doi:10.1002/glia.20792.Calcium
 66. Suzuki Y, Takeda M, Farbman AI. Supporting cells as phagocytes in the olfactory epithelium after bulbectomy. *J Comp Neurol.* 1996;376(4):509-517. doi:10.1002/(SICI)1096-9861(19961223)376:4<509::AID-CNE1>3.0.CO;2-5

67. Dahl AR, Hadley WM, Hahn FF, Benson JM, McClellan RO. Cytochrome p450-dependent monooxygenases in olfactory epithelium of dogs: possible role in tumorigenicity. *Science* (80-). 1982;216(4541):57-59.
68. Bryche B, Baly C, Meunier N. Modulation of olfactory signal detection in the olfactory epithelium: focus on the internal and external environment, and the emerging role of the immune system. *Cell Tissue Res.* 2021;384(3):589-605. doi:10.1007/s00441-021-03467-y
69. Henriques T, Agostinelli E, Hernandez-Clavijo A, et al. TMEM16A calcium-activated chloride currents in supporting cells of the mouse olfactory epithelium. *J Gen Physiol.* 2019;151(7):954-966. doi:10.1085/jgp.201812310
70. Jia C, Hegg CC. Neuropeptide Y and extracellular signal-regulated kinase mediate injury-induced neurogenesis in mouse olfactory epithelium. *Mol Cell Neurosci.* 2012;49(2):158-170. doi:10.1016/j.mcn.2011.11.004.Neuropeptide
71. Mackay-Sim A, Kittel PW. On the Life Span of Olfactory Receptor Neurons. *Eur J Neurosci.* 1991;3(3):209-215. doi:10.1111/j.1460-9568.1991.tb00081.x
72. Graziadei P, Graziadei G. Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. I. Morphological aspects of differentiation and structural organization of the olfactory sensory neurons. *J Neurocytol.* 1979;8(1):1-18. doi:10.1007/BF01206454
73. Gaun V, Martens JR, Schwob JE. Lifespan of mature olfactory sensory neurons varies with location in the mouse olfactory epithelium and age of the animal. *J Comp Neurol.* Published online 2022. doi:https://doi.org/10.1002/cne.25330
74. Iwai N, Zhou Z, Roop DR, Behringer RR. Horizontal basal cells are multipotent progenitors in normal and injured adult olfactory epithelium. *Stem Cells.* 2008;26(5):1298-1306. doi:10.1634/stemcells.2007-0891.Horizontal
75. Caggiano M, Kauer JS, Hunter DD. Globose basal cells are neuronal progenitors in the olfactory epithelium: A lineage analysis using a replication-incompetent retrovirus. *Neuron.* 1994;13(2):339-352. doi:10.1016/0896-6273(94)90351-4
76. Leung CT, Coulombe PA, Reed RR. Contribution of olfactory neural stem cells to tissue maintenance and regeneration. *Nat Neurosci.* 2007;10(6):720-726. doi:10.1038/nn1882
77. Huard JMT, Schwob JE. Cell cycle of globose basal cells in rat olfactory epithelium. *Dev Dyn.* 1995;203(1):17-26. doi:10.1002/aja.1002030103
78. Liberia T, Martin-Lopez E, Meller SJ, Greer CA. Sequential maturation of olfactory sensory neurons in the mature olfactory epithelium. *eNeuro.* 2019;6(5):1-19. doi:10.1523/ENEURO.0266-19.2019
79. Gokoffski KK, Kawauchi S, Wu HH, et al. Feedback regulation of neurogenesis in the mammalian olfactory epithelium: New insights from genetics and systems biology. In: *The Neurobiology of Olfaction.* ; 2009:241-265.
80. Mumm JS, Shou J, Calof AL. Colony-forming progenitors from mouse olfactory epithelium: Evidence for feedback regulation of neuron production. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(20):11167-11172. doi:10.1073/pnas.93.20.11167
81. Bauer S, Rasika S, Han J, et al. Leukemia inhibitory factor is a key signal for injury-induced neurogenesis in the adult mouse olfactory epithelium. *J Neurosci.* 2003;23(5):1792-1803. doi:10.1523/jneurosci.23-05-01792.2003
82. Kam JWK, Raja R, Cloutier JF. Cellular and molecular mechanisms regulating embryonic neurogenesis in the rodent olfactory epithelium. *Int J Dev Neurosci.* 2014;37:76-86.

doi:10.1016/j.ijdevneu.2014.06.017

83. Wu H-H, Ivkovic S, Murray RC, Jaramillo S. Autoregulation of Neurogenesis by GDF11. *Neuron*. 2003;37:197-207.
84. Vassar R, Chao SK, Sitcheran R, Nuiiez M, Vosshall LB, Axel R. Topographic Organization of Sensory Projection to the Olfactory Bulb. *Cell*. 1994;79:981-991.
85. Feinstein P, Bozza T, Rodriguez I, Vassalli A, Mombaerts P. Axon guidance of mouse olfactory sensory neurons by odorant receptors and the β 2 adrenergic receptor. *Cell*. 2004;117(6):833-846. doi:10.1016/j.cell.2004.05.013
86. Dal Col JA, Matsuo T, Storm DR, Rodriguez I. Adenylyl cyclase-dependent axonal targeting in the olfactory system. *Development*. 2007;134(13):2481-2489. doi:10.1242/dev.006346
87. Schwob JE, Szumowski KEM, Stasky AA. Olfactory sensory neurons are trophically dependent on the olfactory bulb for their prolonged survival. *J Neurosci*. 1992;12(10):3896-3919. doi:10.1523/jneurosci.12-10-03896.1992
88. Huang JS, Kunkhyen T, Rangel AN, et al. Immature olfactory sensory neurons provide behaviourally relevant sensory input to the olfactory bulb. *Nat Commun*. 2022;13(1). doi:10.1038/s41467-022-33967-6
89. Gadye L, Das D, Sanchez MA, et al. Injury activates transient olfactory stem cell states with diverse lineage capacities. *Cell Stem Cell*. 2017;21(6):775-790. doi:10.1016/j.stem.2017.10.014.Injury
90. Fletcher RB, Das D, Gadye L, et al. Deconstructing Olfactory Stem Cell Trajectories at Single-Cell Resolution. *Cell Stem Cell*. 2017;20(6):817-830.e8. doi:10.1016/j.stem.2017.04.003
91. Courtiol E, Wilson DA. The olfactory mosaic: Bringing an olfactory network together for odor perception. *Perception*. 2017;46(3-4):320-332. doi:10.1177/0301006616663216
92. Gascuel J, Lemoine A, Rigault C, et al. Hypothalamus-1 olfactory system crosstalk: Orexin A immunostaining in mice. *Front Neuroanat*. 2012;6(OCTOBER 2012). doi:10.3389/fnana.2012.00044
93. Yoon H, Enquist LW, Dulac C. Olfactory inputs to hypothalamic neurons controlling reproduction and fertility. *Cell*. 2005;123(4):669-682. doi:10.1016/j.cell.2005.08.039
94. Nagayama S, Homma R, Imamura F. Neuronal organization of olfactory bulb circuits. *Front Neural Circuits*. 2014;8(SEP):1-19. doi:10.3389/fncir.2014.00098
95. Burton SD. Inhibitory circuits of the mammalian main olfactory bulb. *J Neurophysiol*. 2017;118(4):2034-2051. doi:10.1152/jn.00109.2017
96. Mombaerts P, Wang F, Dulac C, et al. Visualizing an olfactory sensory map. *Cell*. 1996;87(4):675-686. doi:10.1016/S0092-8674(00)81387-2
97. Ressler KJ, Sullivan SL, Buck LB. Information coding in the olfactory system: evidence for a stereotyped and highly organised epitope map in the olfactory bulb. *Cell*. 1994;79(7):1245-1255.
98. Arevian AC, Kapoor V, Urban NN. Activity-dependent gating of lateral inhibition in the mouse olfactory bulb. *Nat Neurosci*. 2008;11(1):80-87. doi:10.1016/b978-0-12-469350-0.50014-4
99. Matsutani S, Yamamoto N. Centrifugal innervation of the mammalian olfactory bulb. *Anat Sci Int*. 2008;83(4):218-227. doi:10.1111/j.1447-073x.2007.00223.x
100. Gadziola MA, Tylicki KA, Christian DL, Wesson DW. The olfactory tubercle encodes odor valence in behaving mice. *J Neurosci*. 2015;35(11):4515-4527. doi:10.1523/JNEUROSCI.4750-14.2015

101. Mizoguchi N, Kobayashi M, Muramoto K. Integration of olfactory and gustatory chemosignals in the insular cortex. *J Oral Biosci.* 2016;58(3):81-84. doi:10.1016/j.job.2016.03.002
102. Yang J, Pinto JM. The Epidemiology of Olfactory Disorders. *Curr Otorhinolaryngol Rep.* 2016;4(2):130-141. doi:10.1007/s40136-016-0120-6
103. Hernandez AK, Landis BN, Altundag A, et al. Olfactory Nomenclature: An Orchestrated Effort to Clarify Terms and Definitions of Dysosmia, Anosmia, Hyposmia, Normosmia, Hyperosmia, Olfactory Intolerance, Parosmia, and Phantosmia/Olfactory Hallucination. *Orl.* Published online 2023:1-9. doi:10.1159/000530211
104. Schwartz JS, Tajudeen BA, Kennedy DW. Diseases of the nasal cavity. In: *Handbook of Clinical Neurology.* Vol 164. ; 2019:285-302.
105. Suzuki M, Saito K, Min WP, et al. Identification of viruses in patients with postviral olfactory dysfunction. *Laryngoscope.* 2007;117(2):272-277. doi:10.1097/01.mlg.0000249922.37381.1e
106. Flanagan CE, Wise SK, DelGaudio JM, Patel ZM. Association of Decreased Rate of Influenza Vaccination with Increased Subjective Olfactory Dysfunction. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg.* 2015;141(3):225-228. doi:doi:10.1001/jamaoto.2014.3399
107. Mori I, Goshima F, Imai Y, et al. Olfactory receptor neurons prevent dissemination of neurovirulent influenza A virus into the brain by undergoing virus-induced apoptosis. *J Gen Virol.* 2002;83:2109-2116.
108. Akerlund A, Bende M, Murphy C. Olfactory Threshold and Nasal Mucosa Changes in Experimentally Induced common cold. *Acta Otolaryngol.* 1995;115(1):88-92.
109. Yamagishi M, Fujiwara M, Nakamura H. Olfactory mucosal findings and clinical course in patients with olfactory disorders following upper respiratory viral infection. *Rhinology.* 1994;32(3):113-118.
110. Rombaux P, Mouraux A, Bertrand B, Nicolas G, Duprez T, Hummel T. Olfactory function and olfactory bulb volume in patients with postinfectious olfactory loss. *Laryngoscope.* 2006;116(3):436-439. doi:10.1097/01.MLG.0000195291.36641.1E
111. Kim YK, Hong S-L, Yoon EJ, Kim SE, Kim J-W. Central presentation of post-viral olfactory loss evaluated by positron Emission Tomography Scan: a Pilot Study. *Am J Rhinol Allergy.* 2012;26(3). doi:https://doi.org/10.2500/ajra.2012.26.3759
112. Xie F, Fang C, Schnittke N, Schwob JE, Ding X. Mechanisms of permanent loss of olfactory receptor neurons induced by the herbicide 2,6-dichlorobenzonitrile: Effects on stem cells and noninvolvement of acute induction of the inflammatory cytokine IL-6. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2013;272(3):598-607. doi:10.1016/j.taap.2013.07.020
113. Alt JA, Mace JC, Buniel MCF, Soler ZM, Smith TL. Predictors of olfactory Dysfunction in Rhinosinusitis Using the Brief Smell Identification Test. *Laryngoscope.* 2014;124(7):259-266. doi:10.1002/lary.24587.Predictors
114. Kondo K, Kikuta S, Ueha R, Suzukawa K, Yamasoba T. Age-Related Olfactory Dysfunction: Epidemiology, Pathophysiology, and Clinical Management. *Front Aging Neurosci.* 2020;12(July):1-16. doi:10.3389/fnagi.2020.00208
115. Murphy C, Schubert CR, Cruickshanks KJ, Klein BEK, Klein R, Nondahl DM. Prevalence of Olfactory Impairment in Older Adults. *JAMA - J Am Med Assoc.* 2002;288(18):2307-2312.
116. Ueha R, Shichino S, Ueha S, et al. Reduction of proliferating olfactory cells and low expression of extracellular matrix genes are hallmarks of the aged olfactory mucosa. *Front Aging Neurosci.*

- 2018;10(MAR):1-13. doi:10.3389/fnagi.2018.00086
117. Meisami E, Mikhail L, Baim D, Bhatnagar KP. Human olfactory bulb: Aging of Glomeruli and Mitral Cells and a Search for the Accessory Olfactory Bulb. *Ann New York Acad Sci.* 1998;855:708-715.
 118. Zhang S, Gan L, Cao F, et al. The barrier and interface mechanisms of the brain barrier, and brain drug delivery. *Brain Res Bull.* 2022;190(August):69-83. doi:10.1016/j.brainresbull.2022.09.017
 119. Gloor SM, Wachtel M, Bolliger MF, Ishihara H, Landmann R, Frei K. Molecular and cellular permeability control at the blood-brain barrier. *Brain Res Rev.* 2001;36(2-3):258-264. doi:10.1016/S0165-0173(01)00102-3
 120. Bicker J, Alves G, Fortuna A, Falcão A. Blood-brain barrier models and their relevance for a successful development of CNS drug delivery systems: A review. *Eur J Pharm Biopharm.* 2014;87(3):409-432. doi:10.1016/j.ejpb.2014.03.012
 121. Armulik A, Genové G, Mäe M, et al. Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature.* 2010;468(7323):557-561. doi:10.1038/nature09522
 122. van Riel D, Verdijk R, Kuiken T. The olfactory nerve: A shortcut for influenza and other viral diseases into the central nervous system. *J Pathol.* 2015;235(2):277-287. doi:10.1002/path.4461
 123. Davies LC, Jenkins SJ, Allen JE, Taylor PR. Tissue-resident macrophages. *Nat Immunol.* 2013;14(10):986-995. doi:10.1038/ni.2705
 124. T'Jonck W, Guillems M, Bonnardel J. Niche signals and transcription factors involved in tissue-resident macrophage development. *Cell Immunol.* 2018;330(November 2017):43-53. doi:10.1016/j.cellimm.2018.02.005
 125. Jurga AM, Paleczna M, Kuter KZ. Overview of General and Discriminating Markers of Differential Microglia Phenotypes. *Front Cell Neurosci.* 2020;14(August):1-18. doi:10.3389/fncel.2020.00198
 126. Rodríguez AM, Rodríguez J, Giambartolomei GH. Microglia at the Crossroads of Pathogen-Induced Neuroinflammation. *ASN Neuro.* 2022;14:1-15. doi:10.1177/17590914221104566
 127. Imai Y, Ibata I, Ito D, Ohsawa K, Kohsaka S. A Novel Gene *iba1* in the Major Histocompatibility Complex Class III Region Encoding an EF Hand Protein Expressed in a Monocytic Lineage 1. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;224:855-862.
 128. Sasaki Y, Ohsawa K, Kanazawa H, Kohsaka S, Imai Y. *Iba1* Is an Actin-Cross-Linking Protein in Macrophages / Microglia. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;286:292-297. doi:10.1006/bbrc.2001.5388
 129. Gautier EL, Shay T, Miller J, et al. resource Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. *Nat Immunol.* 2012;13(11). doi:10.1038/ni.2419
 130. Biber K, Neumann H, Inoue K, Boddeke HWGM. Neuronal ' On ' and ' Off ' signals control microglia. *Trends Neurosci.* 2007;30(11). doi:10.1016/j.tins.2007.08.007
 131. Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, et al. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science (80-).* 2010;330(6005):841-845. doi:10.1126/science.1194637.Fate
 132. Ahmed Z, Shaw G, Sharma VP, Yang C, McGowan E, Dickson DW. Actin-binding proteins coronin-1a and IBA-1 are effective microglial markers for immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem.* 2007;55(7):687-700. doi:10.1369/jhc.6A7156.2007
 133. Frere JJ, Serafini RA, Pryce KD, et al. SARS-CoV-2 infection in hamsters and humans results in

- lasting and unique systemic perturbations after recovery. *Sci Transl Med.* 2022;14:1-21.
134. Suzumura A, Marunouchi T, Yamamoto H. Morphological transformation of microglia in vitro. *Brain Res.* 1991;545:301-306.
 135. Vukovic J, Blomster L V, Chinnery HR, et al. Bone marrow chimeric mice reveal a role for CX 3 CR1 in maintenance of the monocyte-derived cell population in the olfactory neuroepithelium. *J Leucoc Biol.* 2010;88:645-654. doi:10.1189/jlb.0410194
 136. Ajami B, Bennett JL, Krieger C, Tetzlaff W, Rossi FMV. Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nat Neurosci.* 2007;10(12):1538-1543. doi:10.1038/nn2014
 137. Wang PL, Yim AKY, Kim KW, et al. Peripheral nerve resident macrophages share tissue-specific programming and features of activated microglia. *Nat Commun.* 2020;11(1):1-13. doi:10.1038/s41467-020-16355-w
 138. Mueller M, Leonhard C, Wacker K, et al. Macrophage response to peripheral nerve injury: The quantitative contribution of resident and hematogenous macrophages. *Lab Invest.* 2003;83(2):175-185. doi:10.1097/01.LAB.0000056993.28149.BF
 139. Borders AS, Getchell ML, Etscheidt JT, Rooijen NVAN, Cohen DA, Getchell T V. Macrophage Depletion in the Murine Olfactory Epithelium Leads to Increased Neuronal Death and Decreased Neurogenesis. *J Comp Neurol.* 2007;501:206-218. doi:10.1002/cne
 140. Borders AS, Hersh MA, Getchell ML, et al. Macrophage-mediated neuroprotection and neurogenesis in the olfactory epithelium. *Physiol Genomics.* 2007;31:531-543. doi:10.1152/physiolgenomics.00008.2007.
 141. Getchell T V., Shah DS, Partin J V., Subhedar NK, Getchell ML. Leukemia inhibitory factor mRNA expression is upregulated in macrophages and olfactory receptor neurons after target ablation. *J Neurosci Res.* 2002;67:246-254. doi:10.1002/jnr.10090
 142. Fink K, Ng C, Nkenfou C, Vasudevan SG, Van Rooijen N, Schul W. Depletion of macrophages in mice results in higher dengue virus titers and highlights the role of macrophages for virus control. *Eur J Immunol.* 2009;39(10):2809-2821. doi:10.1002/eji.200939389
 143. Cailhier JF, Sawatzky DA, Kipari T, et al. Resident pleural macrophages are key orchestrators of neutrophil recruitment in pleural inflammation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;173:540-547. doi:10.1164/rccm.200504-538OC
 144. Asano K, Takahashi N, Ushiki M, et al. Intestinal CD169 + macrophages initiate mucosal inflammation by secreting CCL8 that recruits inflammatory monocytes. *Nat Commun.* 2015;6(44):1-7. doi:10.1038/ncomms8802
 145. Olson JK, Miller SD. Microglia Initiate Central Nervous System Innate and Adaptive Immune Responses through Multiple TLRs. *J Immunol.* 2004;173(6):3916-3924. doi:10.4049/jimmunol.173.6.3916
 146. Haabeth OAW, Hennig K, Fauskanger M, Age G, Bogen B, Tveita A. CD4+ T-cell killing of multiple myeloma cells is mediated by resident bone marrow macrophages. *Blood Adv.* 2020;4(12):2595-2605. doi:10.1182/bloodadvances.2020001434
 147. Herold S, Mayer K, Lohmeyer J. Acute lung injury: How macrophages orchestrate resolution of inflammation and tissue repair. *Front Immunol.* 2011;2:1-13. doi:10.3389/fimmu.2011.00065
 148. Ueha R, Kondo K, Ueha S, Yamasoba T. Dose-Dependent Effects of Insulin-Like Growth Factor 1 in the Aged Olfactory Epithelium. *Front Aging Neurosci.* 2018;10(385):1-6.

doi:10.3389/fnagi.2018.00385

149. Paschaki M, Cammas L, Muta Y, et al. Retinoic acid regulates olfactory progenitor cell fate and differentiation Retinoic acid regulates olfactory progenitor cell fate and differentiation. *Neural Dev.* 2013;8(13).
150. Salamone G, Giordano M, Trevani AS, et al. Promotion of Neutrophil Apoptosis by TNF- α . *J Immunol.* 2001;166(5):3476-3483.
151. El Kebir D, Gjorstrup P, Filep JG. Resolvin E1 promotes phagocytosis-induced neutrophil apoptosis and accelerates resolution of pulmonary inflammation. *Proc Natl Acad Sci United States Am.* 2012;109(37):14983-14988. doi:10.1073/pnas.1206641109
152. El Kebir D, Levente J, Pan W, et al. 15-Epi-lipoxin A 4 Inhibits Myeloperoxidase Signaling and Enhances Resolution of Acute Lung Injury. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009;180:311-319. doi:10.1164/rccm.200810-1601OC
153. Jozsef L, Zouki C, Petasis NA, Serhan CN, Filep JG. Lipoxin A 4 and aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A 4 inhibit peroxynitrite formation , NF- κ B and AP-1 activation , and IL-8 gene expression in human leukocytes. *Proc Natl Acad Sci United States Am.* 2002;99(20):13266-13271. doi:10.1073/pnas.202296999
154. Dean RA, Cox JH, Bellac CL, Doucet A, Starr AE, Overall CM. Macrophage-specific metalloelastase (MMP-12) truncates and inactivates ELR α CXC chemokines and generates CCL2 , -7 , -8 , and -13 antagonists: potential role of the macrophage in terminating polymorphonuclear leukocyte influx. *Blood.* 2008;112(8):3455-3464. doi:10.1182/blood-2007-12-129080.The
155. Kumar KP, Nicholls AJ, Wong CHY. Partners in crime: neutrophils and monocytes / macrophages in inflammation and disease. Published online 2018:551-565.
156. Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(3):159-175. doi:10.1038/nri3399
157. Nathan C. Neutrophils and immunity: Challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol.* 2006;6(3):173-182. doi:10.1038/nri1785
158. Lacy P. Mechanisms of degranulation in neutrophils. *Allergy, Asthma Clin Immunol.* 2006;2(3):98-108. doi:10.2310/7480.2006.00012
159. Cartwright E, Athens J, Wintrobe M. The kinetics of granulopoiesis in normal man. *Blood.* 1964;24:780-803. doi:10.1182/blood.v24.6.780.780
160. Summers C, Rankin SM, Condliffe AM, Singh N, Peters AM, Chilvers ER. Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol.* 2010;31(8):318-324. doi:10.1016/j.it.2010.05.006
161. Liew PX, Kubes P. The Neutrophil's role during health and disease. *Physiol Rev.* 2019;99(2):1223-1248. doi:10.1152/physrev.00012.2018
162. Galli SJ, Borregaard N, Wynn TA. Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: Macrophages, mast cells and neutrophils. *Nat Immunol.* 2011;12(11):1035-1044. doi:10.1038/ni.2109
163. Dancy JT, Deubelbeiss KA, Harker and Finch LACA. Neutrophil kinetics in man. *J Clin Invest.* 1976;58(3):705-715. doi:10.1172/JCI108517
164. Saverymattu SH, Peters AM, Keshavarzian A, Reavy HJ, Lavender JP. The kinetics of ¹¹¹Indium distribution following injection of ¹¹¹Indium labelled autologous granulocytes in man. *Br J Haematol.* 1985;61(4):675-685. doi:10.1111/j.1365-2141.1985.tb02882.x

165. Suratt BT, Young SK, Lieber J, Nick JA, Henson PM, Worthen GS. Neutrophil maturation and activation determine anatomic site of clearance from circulation. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol*. 2001;281(4 25-4):913-921. doi:10.1152/ajplung.2001.281.4.I913
166. Pillay J, Den Braber I, Vriskoop N, et al. In vivo labeling with 2H2O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood*. 2010;116(4):625-627. doi:10.1182/blood-2010-01-259028
167. Bekkering S, Torensma R. Another look at the life of a neutrophil. *World J Hematol*. 2013;2(2):44. doi:10.5315/wjh.v2.i2.44
168. Puga I, Cols M, Barra CM, et al. B cell-helper neutrophils stimulate the diversification and production of immunoglobulin in the marginal zone of the spleen. *Nat Immunol*. 2012;13(2):170-180. doi:10.1038/ni.2194
169. Austermann J, Roth J, Barczyk-Kahlert K. The Good and the Bad: Monocytes' and Macrophages' Diverse Functions in Inflammation. *Cells*. 2022;11(12). doi:10.3390/cells11121979
170. Kigerl KA, Gensel JC, Ankeny DP, Alexander JK, Donnelly DJ, Popovich PG. Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord. *J Neurosci*. 2009;29(43):13435-13444. doi:10.1523/JNEUROSCI.3257-09.2009
171. Jakubzick C V., Randolph GJ, Henson PM. Monocyte differentiation and antigen-presenting functions. *Nat Rev Immunol*. 2017;17(6):349-362. doi:10.1038/nri.2017.28
172. Langlet C, Tamoutounour S, Henri S, et al. CD64 Expression Distinguishes Monocyte-Derived and Conventional Dendritic Cells and Reveals Their Distinct Role during Intramuscular Immunization. *J Immunol*. 2012;188(4):1751-1760. doi:10.4049/jimmunol.1102744
173. Italiani P, Boraschi D. From monocytes to M1/M2 macrophages: Phenotypical vs. functional differentiation. *Front Immunol*. 2014;5(OCT):1-22. doi:10.3389/fimmu.2014.00514
174. Das A, Sinha M, Datta S, et al. Monocyte and Macrophage Plasticity in Tissue Repair and Regeneration. *Am J Pathol*. 2015;185(10):2596-2606. doi:10.1016/j.ajpath.2015.06.001
175. Tarique AA, Logan J, Thomas E, Holt PG, Sly PD, Fantino E. Phenotypic, functional, and plasticity features of classical and alternatively activated human macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2015;53(5):676-688. doi:10.1165/rcmb.2015-0012OC
176. Stout RD, Jiang C, Matta B, Tietzel I, Watkins SK, Suttles J. Macrophages Sequentially Change Their Functional Phenotype in Response to Changes in Microenvironmental Influences. *J Immunol*. 2005;175(1):342-349. doi:10.4049/jimmunol.175.1.342
177. Chávez-Galán L, Olleros ML, Vesin D, Garcia I. Much more than M1 and M2 macrophages, there are also CD169+ and TCR+ macrophages. *Front Immunol*. 2015;6(MAY):1-15. doi:10.3389/fimmu.2015.00263
178. Erwig LP, Kluth DC, Walsh GM, Rees AJ. Initial cytokine exposure determines function of macrophages and renders them unresponsive to other cytokines. *J Immunol*. 1998;161(4):1983-1988. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9712070>
179. Shi C, Pamer EG. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2011;11:762-774. doi:10.1038/nri3070. Monocyte
180. Kratofil RM, Kubes P, Deniset JF. Monocyte conversion during inflammation and injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017;37(1):35-42. doi:10.1161/ATVBAHA.116.308198
181. Gerhardt T, Ley K. Monocyte trafficking across the vessel wall. *Cardiovasc Res*. 2015;107(3):321-330. doi:10.1093/cvr/cvv147

182. Auffray C, Fogg D, Garfa M, et al. Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science* (80-). 2007;317:666-670.
183. Tacke F, Randolph GJ. Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets. *Immunobiology*. 2006;211(6-8):609-618. doi:10.1016/j.imbio.2006.05.025
184. Petri B, Phillipson M, Kubes P. The Physiology of Leukocyte Recruitment: An In Vivo Perspective. *J Immunol*. 2008;180(10):6439-6446. doi:10.4049/jimmunol.180.10.6439
185. Sanz MJ, Kubes P. Neutrophil-active chemokines in in vivo imaging of neutrophil trafficking. *Eur J Immunol*. 2012;42(2):278-283. doi:10.1002/eji.201142231
186. Von Andrian UH, Chambers JD, Berg EL, et al. L-selectin mediates neutrophil rolling in inflamed venules through sialyl Lewis(x)-dependent and -independent recognition pathways. *Blood*. 1993;82(1):182-191. doi:10.1182/blood.v82.1.182.bloodjournal821182
187. Luscinskas FW, Kansas GS, Ding H, et al. Monocyte rolling, arrest and spreading on IL-4-activated vascular endothelium under flow is mediated via sequential action of L-selectin, β 1- integrins, and β 2-integrins. *J Cell Biol*. 1994;125(6):1417-1427. doi:10.1083/jcb.125.6.1417
188. Lämmermann T, Kastenmüller W. Concepts of GPCR- - controlled navigation in the immune system. *Immunol Rev*. 2019;289:205-231. doi:10.1111/imr.12752
189. Yao L, Pan J, Setiadi H, Pate KD, McEver RP. Interleukin 4 or Oncostatin M induces a prolonged increase in P-selectin mRNA and protein in Human Endothelial cells. *J Exp Med*. 1996;184(July). doi:10.1084/jem.184.1.81
190. Pan J, Xia L, McEver RP. Comparison of promoters for the murine and human P-selectin genes suggests species-specific and conserved mechanisms for transcriptional regulation in endothelial cells. *J Biol Chem*. 1998;273(16):10058-10067. doi:10.1074/jbc.273.16.10058
191. Collins T, Read MA, Neish AS, Whitley MZ, Thanos D, Maniatis T. Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF- κ B and cytokine-inducible enhancers. *FASEB J*. 1995;9(10):899-909. doi:10.1096/fasebj.9.10.7542214
192. Massena S, Christoffersson G, Hjertström E, et al. Achemotactic gradient sequestered on endothelial heparan sulfate induces directional intraluminal crawling of neutrophils. *Blood*. 2010;116(11):1924-1931. doi:10.1182/blood-2010-01-266072
193. Broaddus VC, Boylan AM, Hoeffel JM, et al. Neutralization of IL-8 inhibits neutrophil influx in a rabbit model of endotoxin-induced pleurisy. *J Immunol*. 1994;152(6):2960-2967.
194. Terkeltaub R, Baird S, Sears P, Santiago R, Boisvert W. The murine homolog of the interleukin-8 receptor CXCR-2 is essential for the occurrence of neutrophilic inflammation in the air pouch model of acute urate crystal-induced gouty synovitis. *Arthritis Rheum*. 1998;41(5):900-909. doi:10.1002/1529-0131(199805)41:5<900::AID-ART18>3.0.CO;2-K
195. Kuziel WA, Morgan SJ, Dawson TC, et al. Severe reduction in leukocyte adhesion and monocyte extravasation in mice deficient in CC chemokine receptor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(22):12053-12058. doi:10.1073/pnas.94.22.12053
196. Evans R, Patzak I, Svensson L, et al. Integrins in immunity. *J Cell Sci*. 2009;122(2):215-225. doi:10.1242/jcs.019117
197. Beals CR, Edwards AC, Gottschalk RJ, Kuijpers TW, Staunton DE. CD18 Activation Epitopes Induced by Leukocyte Activation. *J Immunol*. 2001;167(11):6113-6122. doi:10.4049/jimmunol.167.11.6113
198. Lupper ML, Harris EAS, Beals CR, Sui L, Liddington RC, Staunton DE. Cellular Activation of Leukocyte Function-Associated Antigen-1 and Its Affinity Are Regulated at the I Domain

- Allosteric Site. *J Immunol.* 2001;167(3):1431-1439. doi:10.4049/jimmunol.167.3.1431
199. Schenkel AR, Mamdouh Z, Muller WA. Locomotion of monocytes on endothelium is a critical step during extravasation. *Nat Immunol.* 2004;5(4):393-400. doi:10.1038/ni1051
 200. Phillipson M, Heit B, Colarusso P, Liu L, Ballantyne CM, Kubes P. Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: A molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. *J Exp Med.* 2006;203(12):2569-2575. doi:10.1084/jem.20060925
 201. Burns AR, Walker DC, Brown EC, et al. Neutrophil transendothelial migration is independent of tight junctions and occurs preferentially at tricellular corners. *J Immunol.* 1997;159(6):2893-2903.
 202. Burns AR, Bowden RA, MacDonell SD, et al. Analysis of tight junctions during neutrophil transendothelial migration. *J Cell Sci.* 2000;113(1):45-57. doi:10.1242/jcs.113.1.45
 203. Muller WA, Weigl SA, Deng X, Phillips DM. PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J Exp Med.* 1993;178(2):449-460. doi:10.1084/jem.178.2.449
 204. Schenkel AR, Mamdouh Z, Chen X, Liebman RM, Muller WA. CD99 plays a major role in the migration of monocytes through endothelial junctions. *Nat Immunol.* 2002;3(2):143-150. doi:10.1038/ni749
 205. Mihlan M, Glaser KM, Epple MW, Lämmermann T. Neutrophils: Amoeboid Migration and Swarming Dynamics in Tissues. *Front Cell Dev Biol.* 2022;10(April):1-9. doi:10.3389/fcell.2022.871789
 206. Kienle K, Lämmermann T. Neutrophil swarming: an essential process of the neutrophil tissue response. *Immunol Rev.* 2016;273:76-93. doi:10.1111/imr.12458
 207. Carp H. Mitochondrial N-formylmethionyl proteins as chemoattractants for neutrophils. *J Exp Med.* 1982;155(1):264-275.
 208. Merle NS, Church SE, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT. Complement system part I - molecular mechanisms of activation and regulation. *Front Immunol.* 2015;6(JUN):1-30. doi:10.3389/fimmu.2015.00262
 209. Afonso P V, Janka-junttila M, Lee YJ, et al. Article LTB₄ Is a Signal-Relay Molecule during Neutrophil Chemotaxis. *Dev Cell.* 2012;22:1079-1091. doi:10.1016/j.devcel.2012.02.003
 210. Wang G, Cao L, Liu X, et al. Oxidant Sensing by TRPM2 Inhibits Neutrophil Migration and Mitigates Inflammation. *Dev Cell.* 2016;38(5):453-462. doi:10.1016/j.devcel.2016.07.014
 211. Song Z, Huang G, Paracatu LC, et al. NADPH oxidase controls pulmonary neutrophil infiltration in the response to fungal cell walls by limiting LTB₄. *Blood.* 2020;135(12):891-903. doi:10.1182/blood.2019003525
 212. Guthrie LA, McPhail LC, Henson PM, Johnston RB. Priming of neutrophils for enhanced release of oxygen metabolites by bacterial lipopolysaccharide. *J Exp Med.* 1984;160:1656-1671.
 213. Condliffe AM, Kitchen E, Chilvers ER. Neutrophil priming: Pathophysiological consequences and underlying mechanisms. *Clin Sci.* 1998;94(5):461-471. doi:10.1042/cs0940461
 214. Kuhns D, Wright D, Nath J, Kaplan S, Basford R. ATP induces transient elevations of [Ca²⁺]_i in human neutrophils and primes these cells for enhanced O₂⁻ generation. *Lab Invest.* 1988;58(4):448-453.
 215. Berkow RL, Wang D, Larrick JW, et al. Enhancement of neutrophil superoxide production by preincubation with recombinant human tumor necrosis factor. *J Immunol.* 1987;139(11):3783-3791.

216. Busse WW, Vrtis RF, Steiner R, Dick EC. In vitro incubation with influenza virus primes human polymorphonuclear leukocyte generation of superoxide. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1991;4(4):347-354. doi:10.1165/ajrcmb/4.4.347
217. Orozco SL, Canny SP, Hamerman JA. Signals governing monocyte differentiation during inflammation. *Curr Opin Immunol.* 2021;73:16-24. doi:10.1016/j.coi.2021.07.007
218. Krausgruber T, Blazek K, Smallie T, et al. IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and T H 1-T H 17 responses. *Nat Immunol.* 2011;12(3):231-238. doi:10.1038/ni.1990
219. Takaoka A, Yanai H, Kondo S, Duncan G. Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. *Nature.* 2005;434:243-249. doi:10.1038/nature03391. Published
220. Ueha R, Ito T, Furukawa R, et al. Oral SARS-CoV-2 Inoculation Causes Nasal Viral Infection Leading to Olfactory Bulb Infection: An Experimental Study. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022;12(June):1-12. doi:10.3389/fcimb.2022.924725
221. Hasegawa-Ishii S, Shimada A, Imamura F. Lipopolysaccharide-initiated persistent rhinitis causes gliosis and synaptic loss in the olfactory bulb. *Sci Rep.* 2017;7(1):1-14. doi:10.1038/s41598-017-10229-w
222. Chertov O, Ueda H, Xu LL, et al. Identification of human neutrophil-derived cathepsin G and azurocidin/CAP37 as chemoattractants for mononuclear cells and neutrophils. *J Exp Med.* 1997;186(5):739-747. doi:10.1084/jem.186.5.739
223. Lim K, Hyun Y, Lambert-emo K, et al. Neutrophil trails guide influenza-specific CD8+ T cells in the airways. *Science (80-).* 2015;349(6252):aa4352. doi:10.1126/science.aaa4352. Neutrophil
224. Schutte RJ, Parisi-Amon A, Monty Reichert W. Cytokine profiling using monocytes/macrophages cultured on common biomaterials with a range of surface chemistries. *J Biomed Mater Res.* 2009;88(1):128-139. doi:10.1002/jbm.a.31863. Cytokine
225. Ardighieri L, Missale F, Bugatti M, et al. Infiltration by CXCL10 Secreting Macrophages Is Associated With Antitumor Immunity and Response to Therapy in Ovarian Cancer Subtypes. *Front Immunol.* 2021;12(June):1-18. doi:10.3389/fimmu.2021.690201
226. Tecchio C, Micheletti A, Cassatella MA. Neutrophil-derived cytokines: Facts beyond expression. *Front Immunol.* 2014;5(OCT):1-7. doi:10.3389/fimmu.2014.00508
227. Lauvau G, Chorro L, Spaulding E, Soudja SMH. Inflammatory monocyte effector mechanisms. *Cell Immunol.* 2014;291(1-2):32-40. doi:10.1016/j.cellimm.2014.07.007
228. Parameswaran N, Patial S. Tumor necrosis Factor-alpha signaling in macrophages. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2010;20(2):87-103.
229. Mantovani A, Dinarello CA, Molgora M, Garlanda C. Interleukin-1 and Related Cytokines in the Regulation of Inflammation and Immunity. *Immunity.* 2019;50(4):778-795. doi:10.1016/j.immuni.2019.03.012
230. Salazar-Mather TP, Orange JS, Biron CA. Early murine cytomegalovirus (MCMV) infection induces liver natural killer (NK) cell inflammation and protection through macrophage inflammatory protein 1 α (MIP-1 α)-dependent pathways. *J Exp Med.* 1998;187(1):1-14. doi:10.1084/jem.187.1.1
231. Zhang C, Zhang J, Niu J, Zhang J, Tian Z. Interleukin-15 improves cytotoxicity of natural killer cells via up-regulating NKG2D and cytotoxic effector molecule expression as well as STAT1 and ERK1/2 phosphorylation. *Cytokine.* 2008;42(1):128-136. doi:10.1016/j.cyto.2008.01.003
232. Prame Kumar K, Nicholls AJ, Wong CHY. Partners in crime: neutrophils and monocytes/macrophages in inflammation and disease. *Cell Tissue Res.* 2018;371(3):551-565.

doi:10.1007/s00441-017-2753-2

233. Karaji N, Sattentau QJ. Efferocytosis of pathogen-infected cells. *Front Immunol.* 2017;8(DEC):1-10. doi:10.3389/fimmu.2017.01863
234. Salina ACG, Dos-Santos D, Rodrigues TS, et al. Efferocytosis of SARS-CoV-2-infected dying cells impairs macrophage anti-inflammatory functions and clearance of apoptotic cells. *Elife.* 2022;11:1-24. doi:10.7554/eLife.74443
235. Laskin DL, Sunil VR, Gardner CR, Laskin JD. Macrophages and tissue injury: Agents of defense or destruction? *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2011;51:267-288. doi:10.1146/annurev.pharmtox.010909.105812
236. Winterbourn CC, Hampton MB, Livesey JH, Kettle AJ. Modeling the reactions of superoxide and myeloperoxidase in the neutrophil phagosome: Implications for microbial killing. *J Biol Chem.* 2006;281(52):39860-39869. doi:10.1074/jbc.M605898200
237. Vazquez-Torres A, Jones-Carson J, Mastroeni P, Ischiropoulos H, Fang FC. Antimicrobial actions of the nadph phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase in experimental salmonellosis. I. Effects on microbial killing by activated peritoneal macrophages in vitro. *J Exp Med.* 2000;192(2):227-236. doi:10.1084/jem.192.2.237
238. Tapper H, Furuya W, Grinstein S. Localized Exocytosis of Primary (Lysosomal) Granules During Phagocytosis: Role of Ca²⁺-Dependent Tyrosine Phosphorylation and Microtubules. *J Immunol.* 2002;168(10):5287-5296. doi:10.4049/jimmunol.168.10.5287
239. Furtmuller PG, Burner U, Obinger C. Reaction of myeloperoxidase compound I with chloride, bromide, iodide, and thiocyanate. *Biochemistry.* 1998;37(51):17923-17930. doi:10.1021/bi9818772
240. Metzler KD, Fuchs TA, Nauseef WM, et al. Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: Implications for innate immunity. *Blood.* 2011;117(3):953-959. doi:10.1182/blood-2010-06-290171
241. Azzouz D, Khan MA, Palaniyar N. ROS induces NETosis by oxidizing DNA and initiating DNA repair. *Cell Death Discov.* 2021;7(1). doi:10.1038/s41420-021-00491-3
242. Saffarzadeh M, Juenemann C, Queisser MA, et al. Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: A predominant role of histones. *PLoS One.* 2012;7(2). doi:10.1371/journal.pone.0032366
243. Godement M, Zhu J, Cerf C, et al. Neutrophil Extracellular Traps in SARS-CoV2 Related Pneumonia in ICU Patients: The NETCOV2 Study. *Front Med.* 2021;8(February):1-9. doi:10.3389/fmed.2021.615984
244. Jenne CN, Wong CHY, Zemp FJ, et al. Neutrophils recruited to sites of infection protect from virus challenge by releasing neutrophil extracellular traps. *Cell Host Microbe.* 2013;13(2):169-180. doi:10.1016/j.chom.2013.01.005
245. Saitoh T, Komano J, Saitoh Y, et al. Neutrophil extracellular traps mediate a host defense response to human immunodeficiency virus-1. *Cell Host Microbe.* 2012;12(1):109-116. doi:10.1016/j.chom.2012.05.015
246. Abi Abdallah DS, Egan CE, Butcher BA, Denkers EY. Mouse neutrophils are professional antigen-presenting cells programmed to instruct Th1 and Th17 T-cell differentiation. *Int Immunol.* 2011;23(5):317-326. doi:10.1093/intimm/dxr007
247. Kirby AC, Coles MC, Kaye PM. Alveolar macrophages transport pathogens to lung draining lymph

- nodes. *J Immunol.* 2009;183(3):1983-1989. doi:10.4049/jimmunol.0901089. Alveolar
248. Tillack K, Breiden P, Martin R, Sospedra M. T Lymphocyte Priming by Neutrophil Extracellular Traps Links Innate and Adaptive Immune Responses. *J Immunol.* 2012;188(7):3150-3159. doi:10.4049/jimmunol.1103414
 249. Scapini P, Bazzoni F, Cassatella MA. Regulation of B-cell-activating factor (BAFF)/B lymphocyte stimulator (BLyS) expression in human neutrophils. *Immunol Lett.* 2008;116(1):1-6. doi:10.1016/j.imlet.2007.11.009
 250. Contoli M, Papi A, Tomassetti L, et al. Blood Interferon- α Levels and Severity, Outcomes, and Inflammatory Profiles in Hospitalized COVID-19 Patients. *Front Immunol.* 2021;12(March):1-10. doi:10.3389/fimmu.2021.648004
 251. Hatton CF, Botting RA, Dueñas ME, et al. Delayed induction of type I and III interferons mediates nasal epithelial cell permissiveness to SARS-CoV-2. *Nat Commun.* 2021;12(7092):1-17. doi:10.1038/s41467-021-27318-0
 252. Stewart CE, Rall RE, Adamson CS. Inhibitors of the interferon response enhance virus replication in vitro. *PLoS One.* 2014;9(11):3-10. doi:10.1371/journal.pone.0112014
 253. Merad M, Martin JC. Pathological inflammation in patients with COVID-19: a key role for monocytes and macrophages. *Nat Rev Immunol.* 2020;20(6):355-362. doi:10.1038/s41577-020-0331-4
 254. Daamen AR, Bachali P, Owen KA, et al. Comprehensive transcriptomic analysis of COVID-19 blood, lung, and airway. *Sci Rep.* 2021;11(1):1-19. doi:10.1038/s41598-021-86002-x
 255. Becker K, Beythien G, de Buhr N, et al. Vasculitis and Neutrophil Extracellular Traps in Lungs of Golden Syrian Hamsters With SARS-CoV-2. *Front Immunol.* 2021;12(April):1-11. doi:10.3389/fimmu.2021.640842
 256. Zuo Y, Yalavarthi S, Shi H, et al. Neutrophil Extracellular Traps in COVID-19. *JCI Insight.* 2020;5(11):e138999. doi:https://doi.org/10.1172/jci.insight.138999
 257. Fortier ME, Kent S, Ashdown H, Poole S, Boksa P, Luheshi GN. The viral mimic, polyinosinic:polycytidylic acid, induces fever in rats via an interleukin-1-dependent mechanism. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol.* 2004;287(4 56-4). doi:10.1152/ajpregu.00293.2004
 258. Deng Y, Herbert JA, Smith CM, Smyth RL. An in vitro transepithelial migration assay to evaluate the role of neutrophils in Respiratory Syncytial Virus (RSV) induced epithelial damage. *Sci Rep.* 2018;8(1):1-12. doi:10.1038/s41598-018-25167-4
 259. Calvert BA, Quiroz EJ, Lorenzana Z, et al. Neutrophilic inflammation promotes SARS-CoV-2 infectivity and augments the inflammatory responses in airway epithelial cells. *Front Immunol.* 2023;14(March):1-16. doi:10.3389/fimmu.2023.1112870
 260. Herold S, Steinmueller M, Von Wulffen W, et al. Lung epithelial apoptosis in influenza virus pneumonia: The role of macrophage-expressed TNF-related apoptosis-inducing ligand. *J Exp Med.* 2008;205(13):3065-3077. doi:10.1084/jem.20080201
 261. Mittal M, Siddiqui MR, Tran K, Reddy SP, Malik AB. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. In: *Antioxidants and Redox Signaling.* Vol 20. ; 2014:1126-1167. doi:10.1089/ars.2012.5149
 262. Chatterjee S. Oxidative Stress, Inflammation, and Disease. *Oxidative Stress Biomater.* Published online 2016:35-58. doi:10.1016/B978-0-12-803269-5.00002-4
 263. Petrosillo G, Ruggiero FM, Paradies G. Role of reactive oxygen species and cardiolipin in the

- release of cytochrome c from mitochondria . *FASEB J.* 2003;17(15):2202-2208. doi:10.1096/fj.03-0012com
264. Li M, Sun W, Tyurin VA, et al. Activation of Cytochrome C Peroxidase Function Through Coordinated Foldon Loop Dynamics upon Interaction with Anionic Lipids. *J Mol Biol.* 2021;433(15). doi:10.1016/j.jmb.2021.167057
265. Getchell T V., Liu H, Vaishnav RA, Kwong K, Stromberg AJ, Getchell ML. Temporal profiling of gene expression during neurogenesis and remodeling in the olfactory epithelium at short intervals after target ablation. *J Neurosci Res.* 2005;80(3):309-329. doi:10.1002/jnr.20411
266. Puchelle E, Zahm JM, Tournier JM, Coraux C. Airway epithelial repair, regeneration, and remodeling after injury in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc.* 2006;3(8):726-733. doi:10.1513/pats.200605-126SF
267. Cowland JB, Borregaard N. Granulopoiesis and granules of human neutrophils. *Immunol Rev.* 2016;273(1):11-28. doi:10.1111/imr.12440
268. Webster NL, Crowe SM. Matrix metalloproteinases, their production by monocytes and macrophages and their potential role in HIV-related diseases. *J Leukoc Biol.* 2006;80(5):1052-1066. doi:10.1189/jlb.0306152
269. Korkmaz B, Caughey GH, Chapple I, et al. Therapeutic targeting of cathepsin C: from pathophysiology to treatment. *Pharmacol Ther.* 2018;190:202-236. doi:10.1016/j.pharmthera.2018.05.011
270. Arnhold J. Host-Derived Cytotoxic Agents in Chronic Inflammation and Disease Progression. *Int J Mol Sci.* 2023;24(3). doi:10.3390/ijms24033016
271. Ortiz-Prado E, Simbaña-Rivera K, Gómez- Barreno L, et al. Clinical, molecular, and epidemiological characterization of the SARS-CoV-2 virus and the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), a comprehensive literature review. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2020;98(1). doi:10.1016/j.diagmicrobio.2020.115094
272. Alwine JC, Casadevall A, Enquist LW, Goodrum FD, Imperiale MJ. A Critical Analysis of the Evidence for the SARS-CoV-2 Origin Hypotheses. *J Virol.* 2023;97(4):1-7. doi:10.1128/mbio.00583-23
273. Voskarides K. SARS-CoV-2: tracing the origin, tracking the evolution. *BMC Med Genomics.* 2022;15(1):1-5. doi:10.1186/s12920-022-01208-w
274. Wacharapluesadee S, Tan CW, Maneerorn P, et al. Evidence for SARS-CoV-2 related coronaviruses circulating in bats and pangolins in Southeast Asia. *Nat Commun.* 2021;12(1). doi:10.1038/s41467-021-21240-1
275. Zhou H, Chen X, Hu T, et al. A Novel Bat Coronavirus Closely Related to SARS-CoV-2 Contains Natural Insertions at the S1/S2 Cleavage Site of the Spike Protein. *Curr Biol.* 2020;30(11):2196-2203.e3. doi:10.1016/j.cub.2020.05.023
276. Wang H, Pipes L, Nielsen R. Synonymous mutations and the molecular evolution of SARS-CoV-2 origins. *Virus Evol.* 2021;7(1):1-11. doi:10.1093/ve/veaa098
277. Li X, Giorgi EE, Marichannegowda MH, et al. Emergence of SARS-CoV-2 through recombination and strong purifying selection. *Sci Adv.* 2020;6(27):1-11. doi:10.1126/sciadv.abb9153
278. Pekar JE, Magee A, Parker E, et al. The molecular epidemiology of multiple zoonotic origins of SARS-CoV-2. *Science (80-).* 2022;377:960-966.
279. Rohaim MA, El RF, Clayton E, Munir M. Microbial Pathogenesis Structural and functional insights

- into non-structural proteins of coronaviruses. *Microb Pathog.* 2021;150(November 2020):104641. doi:10.1016/j.micpath.2020.104641
280. Redondo N, Zaldivar-Lopez S, Garrido JJ, Montoya M. SARS-CoV-2 Accessory Proteins in Viral Pathogenesis: Knowns and Unknowns. *Front Immunol.* 2021;12:1-8. doi:10.3389/fimmu.2021.708264
 281. Zandi M, Shafaati M, Kalantar-neyestanaki D. Biomedicine & Pharmacotherapy The role of SARS-CoV-2 accessory proteins in immune evasion. *Biomed Pharmacother.* 2022;156:113889. doi:10.1016/j.biopha.2022.113889
 282. Xia H, Cao Z, Xie X, et al. Article Evasion of Type I Interferon by SARS-CoV-2 II Evasion of Type I Interferon by SARS-CoV-2. *Cell Rep.* 2020;33(108234):1-12. doi:10.1016/j.celrep.2020.108234
 283. Zhang Y, Chen Y, Li Y, et al. The ORF8 protein of SARS-CoV-2 mediates immune evasion through down-regulating MHC-I. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2021;118(23):1-12. doi:10.1073/pnas.2024202118
 284. Xu H, Akinyemi IA, Chitre SA, et al. SARS-CoV-2 viroporin encoded by ORF3a triggers the NLRP3 inflammatory pathway. *Virology.* 2022;568:13-22.
 285. Zhou Z, Huang C, Zhou Z, et al. Structural insight reveals SARS-CoV-2 ORF7a as an immunomodulating factor for human CD14+ monocytes. *iScience.* 2021;24(102187):1-11. doi:10.1016/j.isci.2021.102187
 286. Lin X, Fu B, Yin S, et al. ORF8 contributes to cytokine storm during SARS-CoV-2 infection by activating IL-17 pathway. *iScience.* 2021;24(4):102293. doi:10.1016/j.isci.2021.102293
 287. Yao H, Song Y, Yao H, et al. Article Molecular Architecture of the SARS-CoV-2 Virus II Article Molecular Architecture of the SARS-CoV-2 Virus. *Cell.* 2020;183(3):730-738.e13. doi:10.1016/j.cell.2020.09.018
 288. Sia SF, Yan L, Chin AWH, et al. Pathogenesis and transmission of SARS-CoV-2 in golden hamsters. *Nature.* 2020;583(March). doi:10.1038/s41586-020-2342-5
 289. Coleman KK, Jie D, Tay W, et al. Viral Load of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) in Respiratory Aerosols Emitted by Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) While Breathing , Talking , and Singing. *Clin Infect Dis.* 2022;2(10).
 290. Pitol AK, Julian TR. Community Transmission of SARS-CoV-2 by Surfaces: Risks and Risk Reduction Strategies. *Environ Sci Technol Lett.* 2021;8:263-269.
 291. Safari I, Elahi E. Evolution of the SARS - CoV - 2 genome and emergence of variants of concern. *Arch Virol.* 2022;167(2):293-305. doi:10.1007/s00705-021-05295-5
 292. Carabelli AM, Peacock TP, Thorne LG, et al. SARS-CoV-2 variant biology: immune escape , transmission and fitness. *Nat Rev Microbiol.* 2023;21:162-177. doi:10.1038/s41579-022-00841-7
 293. Gobeil SMC, Janowska K, McDowell S, et al. D614G Mutation Alters SARS-CoV-2 Spike Conformation and Enhances Protease Cleavage at the S1/S2 Junction. *Cell Rep.* 2021;34(2). doi:10.1016/j.celrep.2020.108630
 294. Tian F, Tong B, Sun L, et al. N501y mutation of spike protein in sars-cov-2 strengthens its binding to receptor ace2. *Elife.* 2021;10:1-17. doi:10.7554/eLife.69091
 295. Guo K, Barrett BS, Morrison JH, et al. Interferon resistance of emerging SARS-CoV-2 variants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2022;119(32):1-8. doi:10.1073/pnas.2203760119
 296. Thomson EC, Rosen LE, Shepherd JG, et al. Circulating SARS-CoV-2 spike N439K variants maintain

- fitness while evading antibody-mediated immunity. *Cell*. 2021;184:1171-1187. doi:10.1016/j.cell.2021.01.037
297. Prydz K, Saraste J. The life cycle and enigmatic egress of coronaviruses. *Mol Microbiol*. 2022;117(6):1308-1316. doi:10.1111/mmi.14907
298. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*. 2020;181(2):271-280.e8. doi:10.1016/j.cell.2020.02.052
299. Wang K, Chen W, Zhang Z, et al. CD147-spike protein is a novel route for SARS-CoV-2 infection to host cells. *Signal Transduct Target Ther*. 2020;5(1):1-10. doi:10.1038/s41392-020-00426-x
300. Baggen J, Jacquemyn M, Persoons L, et al. Article TMEM106B is a receptor mediating ACE2-independent SARS-CoV-2 cell entry TMEM106B is a receptor mediating ACE2-independent SARS-CoV-2 cell entry. Published online 2023:1-16. doi:10.1016/j.cell.2023.06.005
301. Cantuti-Castelvetri L, Ojha R, Pedro LD, et al. Neuropilin-1 facilitates SARS-CoV-2 cell entry and infectivity. *Science (80-)*. 2020;370(6518):1-9. doi:10.1126/science.abd2985
302. Daly JL, Simonetti B, Klein K, et al. Neuropilin-1 is a host factor for SARS-CoV-2 infection. *Science (80-)*. 2020;370(6518):861-865. doi:10.1126/science.abd3072
303. Clausen TM, Sandoval DR, Spleid CB, et al. SARS-CoV-2 Infection Depends on Cellular Heparan Sulfate and ACE2. *Cell*. 2020;183(4):1043-1057.e15. doi:10.1016/j.cell.2020.09.033
304. Nguyen L, Mccord KA, Bui DT, et al. Sialic acid-containing glycolipids mediate binding and viral entry of SARS-CoV-2. *Nat Chem Biol*. 2022;18:81-90. doi:10.1038/s41589-021-00924-1
305. Benton DJ, Wrobel AG, Xu P, et al. Receptor binding and priming of the spike protein of SARS-CoV-2 for membrane fusion. *Nature*. 2020;588(7837):327-330. doi:10.1038/s41586-020-2772-0.Receptor
306. Essalmani R, Jain J, Susan-Resiga D, et al. Distinctive Roles of Furin and TMPRSS2 in SARS-CoV-2 Infectivity. *J Virol*. 2022;96(8):1-24. doi:10.1128/jvi.00128-22
307. Ou X, Liu Y, Lei X, et al. Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. *Nat Commun*. 2020;11(1). doi:10.1038/s41467-020-15562-9
308. Koch J, Uckeley ZM, Doldan P, Stanifer M, Boulant S, Lozach P. TMPRSS2 expression dictates the entry route used by SARS-CoV-2 to infect host cells. *EMBO J*. 2021;40(16):1-20. doi:10.15252/embj.2021107821
309. Padmanabhan P, Dixit NM. Modelling how increased Cathepsin B/L and decreased TMPRSS2 usage for cell entry by the SARS-CoV-2 Omicron variant may affect the efficacy and synergy of TMPRSS2 and Cathepsin B/L inhibitors. *J Theor Biol*. 2023;572(June):111568. doi:10.1016/j.jtbi.2023.111568
310. Chitsike L, Duerksen-Hughes P. Keep out! SARS-CoV-2 entry inhibitors: their role and utility as COVID-19 therapeutics. *Virology*. 2021;18(1):1-17. doi:10.1186/s12985-021-01624-x
311. Wang D, Jiang A, Feng J, et al. The SARS-CoV-2 subgenome landscape and its novel regulatory features. *Mol Cell*. 2021;81:2135-2147. doi:10.1016/j.molcel.2021.02.036
312. Kim D, Lee J, Yang J, et al. The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome. *Cell*. 2020;181:914-921. doi:10.1016/j.cell.2020.04.011
313. Eymieux S, Rouillé Y, Terrier O, Seron K, Blanchard E. Ultrastructural modifications induced by

- SARS - CoV - 2 in Vero cells: a kinetic analysis of viral factory formation , viral particle morphogenesis and virion release. *Cell Mol Life Sci.* 2021;78(7):3565-3576. doi:10.1007/s00018-020-03745-y
314. Cortese M, Lee J-Y, Cerikan B, et al. Integrative Imaging Reveals SARS-CoV-2-induces Reshaping of Subcellular Morphologies. *Cell Host Microbe.* 2020;28:853-866.
 315. Wolff G, Limpens RWAL, Zevenhoven-dobbe JC, et al. A molecular pore spans the double membrane of the coronavirus replication organelle. *Science (80-).* 2020;369:1395-1398.
 316. Zhang Y, Zhang X, Zheng H, Liu L. Subgenomic RNAs and Their Encoded Proteins Contribute to the Rapid Duplication of SARS-CoV-2 and COVID-19 Progression. *Biomolecules.* 2022;12(1680):1-13.
 317. Scherer KM, Mascheroni L, Carnell GW, et al. SARS-CoV-2 nucleocapsid protein adheres to replication organelles before viral assembly at the Golgi / ERGIC and lysosome-mediated egress. *Sci Adv.* 2022;8(eabl 4895):1-17.
 318. Mehregan A, Sergio P, Zhuang Y, et al. Probing effects of the SARS-CoV-2 E protein on membrane curvature and intracellular calcium. *BBA-Biomembranes.* 2022;1864. doi:10.1016/j.bbamem.2022.183994
 319. Malone B, Urakova N, Snijder EJ, Campbell EA. Structures and functions of coronavirus replication–transcription complexes and their relevance for SARS-CoV-2 drug design. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2022;23(1):21-39. doi:10.1038/s41580-021-00432-z
 320. Damas J, Hughes GM, Keough KC, et al. Broad host range of SARS-CoV-2 predicted by comparative and structural analysis of ACE2 in vertebrates. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020;117(36):22311-22322. doi:10.1073/pnas.2010146117
 321. Liu Y, Hu G, Wang Y, et al. Functional and genetic analysis of viral receptor ACE2 orthologs reveals a broad potential host range of SARS-CoV-2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2021;118(12):1-9. doi:10.1073/pnas.2025373118
 322. Shi J, Wen Z, Zhong G, et al. Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS-coronavirus 2. *Science (80-).* 2020;368:1016-1020. doi:10.1126/science.abb7015
 323. Oreshkova N, Molenaar RJ, Vreman S, et al. SARS-CoV-2 infection in farmed minks , the Netherlands, April and May 2020. *Euro Surveill.* 2020;25(23):1-7. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.23.2001005>
 324. Munster VJ, Feldmann F, Williamson BN, et al. Respiratory disease in rhesus macaques inoculated with SARS-CoV-2. *Nature.* 2020;585(7824):268-272. doi:10.1038/s41586-020-2324-7
 325. Carpenter KC, Yang J, Xu JJ. Animal Models for the Study of Neurologic Manifestations of COVID-19. *Comp Med.* 2023;73(1):91-103. doi:10.30802/AALAS-CM-22-000073
 326. Shuai H, Chan JFW, Yuen TTT, et al. Emerging SARS-CoV-2 variants expand species tropism to murines. *EBioMedicine.* 2021;73:1-12. doi:10.1016/j.ebiom.2021.103643
 327. Halfmann PJ, Iida S, Iwatsuki-Horimoto K, et al. SARS-CoV-2 Omicron virus causes attenuated disease in mice and hamsters. *Nature.* 2022;603(7902):687-692. doi:10.1038/s41586-022-04441-6
 328. Richard M, Kok A, de Meulder D, et al. SARS-CoV-2 is transmitted via contact and via the air between ferrets. *Nat Commun.* 2020;11(3496):1-6. doi:10.1038/s41467-020-17367-2
 329. Belser JA, Eckert AM, Huynh T, et al. A Guide for the Use of the Ferret Model for Influenza Virus Infection. *Am J Pathol.* 2020;190(1):11-24. doi:10.1016/j.ajpath.2019.09.017

330. Kim Y Il, Kim SG, Kim SM, et al. Infection and Rapid Transmission of SARS-CoV-2 in Ferrets. *Cell Host Microbe*. 2020;27:704-709. doi:10.1016/j.chom.2020.03.023
331. Everett HE, Lean FZX, Byrne AMP, et al. Intranasal infection of ferrets with SARS-CoV-2 as a model for asymptomatic human infection. *Viruses*. 2021;13(113):1-14.
332. Au GG, Marsh GA, McAuley AJ, et al. Characterisation and natural progression of SARS-CoV-2 infection in ferrets. *Sci Rep*. 2022;12(5680):1-14. doi:10.1038/s41598-022-08431-6
333. Chan JFW, Zhang AJ, Yuan S, 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/ciaa325
334. de Melo GD, Lazarini F, Levallois S, et al. COVID-19-related anosmia is associated with viral persistence and inflammation in human olfactory epithelium and brain infection in hamsters. *Sci Transl Med*. 2021;13(596). doi:10.1126/scitranslmed.abf8396
335. Osterrieder N, Bertzbach LD, Dietert K, et al. Age-Dependent Progression of SARS-CoV-2 Infection in Syrian hamsters. *Viruses*. 2020;12(779):1-11.
336. Zhang AJ, Lee ACY, Chu H, et al. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Infects and Damages the Mature and Immature Olfactory Sensory Neurons of Hamsters. *Clin Infect Dis*. 2021;73(2):e503-e512. doi:10.1093/cid/ciaa995
337. Hoagland DA, Møller R, Uhl SA, et al. Leveraging the antiviral type I interferon system as a first line of defense against SARS-CoV-2 pathogenicity. *Immunity*. 2021;54(3):557-570.e5. doi:10.1016/j.immuni.2021.01.017
338. Francis ME, Goncin U, Kroeker A, et al. SARS-CoV-2 infection in the Syrian hamster model causes inflammation as well as type I interferon dysregulation in both respiratory and non-respiratory tissues including the heart and kidney. *PLoS Pathog*. 2021;17(7):1-32. doi:10.1371/journal.ppat.1009705
339. Lu S, Zhao Y, Yu W, et al. Comparison of nonhuman primates identified the suitable model for COVID-19. *Signal Transduct Target Ther*. 2020;5(157):1-9. doi:10.1038/s41392-020-00269-6
340. Urano E, Okamura T, Ono C, et al. COVID-19 cynomolgus macaque model reflecting human COVID-19 pathological conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021;118(43). doi:10.1073/pnas.2104847118
341. Yu P, Qi F, Xu Y, et al. Age-related rhesus macaque models of COVID-19. *Anim Model Exp Med*. 2020;3(1):93-97. doi:10.1002/ame2.12108
342. McCray PB, Pewe L, Wohlford-Lenane C, et al. Lethal Infection of K18-hACE2 Mice Infected with Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus . *J Virol*. 2007;81(2):813-821. doi:10.1128/jvi.02012-06
343. Fumagalli V, Rava M, Marotta D, et al. Administration of aerosolized SARS-CoV-2 to K18-hACE2 mice uncouples respiratory infection from fatal neuroinvasion. *Sci Immunol*. 2022;7(67). doi:10.1126/sciimmunol.abl9929
344. Kumari P, Rothan HA, Natekar JP, et al. Neuroinvasion and encephalitis following intranasal inoculation of sars-cov-2 in k18-hace2 mice. *Viruses*. 2021;13(132):1-12. doi:10.3390/v13010132
345. Zheng J, Wong LYR, Li K, et al. COVID-19 treatments and pathogenesis including anosmia in K18-hACE2 mice. *Nature*. 2021;589(7843):603-607. doi:10.1038/s41586-020-2943-z
346. Yinda CK, Port JR, Bushmaker T, et al. K18-hACE2 mice develop respiratory disease resembling

- severe COVID-19. *PLoS Pathog.* 2021;17(1):1-21. doi:10.1371/journal.ppat.1009195
347. Bao L, Deng W, Huang B, et al. The pathogenicity of SARS-CoV-2 in hACE2 transgenic mice. *Nature.* 2020;583(7818):830-833. doi:10.1038/s41586-020-2312-y
348. Sun SH, Chen Q, Gu HJ, et al. A Mouse Model of SARS-CoV-2 Infection and Pathogenesis. *Cell Host Microbe.* 2020;28(1):124-133.e4. doi:10.1016/j.chom.2020.05.020
349. Verma AK, Zheng J, Meyerholz DK, Perlman S. SARS-CoV-2 infection of sustentacular cells disrupts olfactory signaling pathways. *JCI Insight.* 2022;7(24):1-20. doi:10.1172/jci.insight.160277
350. Wong LYR, Zheng J, Wilhelmsen K, et al. Eicosanoid signalling blockade protects middle-aged mice from severe COVID-19. *Nature.* 2022;605(7908):146-151. doi:10.1038/s41586-022-04630-3
351. Bestle D, Heindl MR, Limburg H, et al. TMPRSS2 and furin are both essential for proteolytic activation of SARS-CoV-2 in human airway cells. *Life Sci Alliance.* 2020;3(9):1-14. doi:10.26508/LSA.202000786
352. Hu B, Chan JFW, Liu H, et al. Spike mutations contributing to the altered entry preference of SARS-CoV-2 omicron BA.1 and BA.2. *Emerg Microbes Infect.* 2022;11(1):2275-2287. doi:10.1080/22221751.2022.2117098
353. Bilinska K, Jakubowska P, Von Bartheld CS, Butowt R. Expression of the SARS-CoV-2 Entry Proteins, ACE2 and TMPRSS2, in Cells of the Olfactory Epithelium: Identification of Cell Types and Trends with Age. *ACS Chem Neurosci.* 2020;11(11):1555-1562. doi:10.1021/acschemneuro.0c00210
354. Brann DH, Tsukahara T, Weinreb C, et al. Non-neuronal expression of SARS-CoV-2 entry genes in the olfactory system suggests mechanisms underlying COVID-19-associated anosmia. *Sci Adv.* 2020;6(31):1-20. doi:10.1126/sciadv.abc5801
355. Chen M, Pekosz A, Villano JS, et al. Evolution of nasal and olfactory infection characteristics of SARS-CoV-2 variants. *bioRxiv.* Published online 2022:2022.04.12.487379. <http://biorxiv.org/content/early/2022/04/12/2022.04.12.487379.abstract>
356. Meinhardt J, Radke J, Dittmayer C, et al. Olfactory transmucosal SARS-CoV-2 invasion as a port of central nervous system entry in individuals with COVID-19. *Nat Neurosci.* 2021;24(2):168-175. doi:10.1038/s41593-020-00758-5
357. Bowen S, Ateh DD, Deinhardt K, et al. The phagocytic capacity of neurones. *Eur J Neurosci.* 2007;25(10):2947-2955. doi:10.1111/j.1460-9568.2007.05554.x
358. Khan M, Clijesters M, Choi S, et al. Anatomical barriers against SARS-CoV-2 neuroinvasion at vulnerable interfaces visualized in deceased COVID-19 patients. *Neuron.* 2022;110(23):3919-3935.e6. doi:10.1016/j.neuron.2022.11.007
359. von Bartheld CS, Wang L. Prevalence of Olfactory Dysfunction with the Omicron Variant of SARS-CoV-2: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Cells.* 2023;12(3):1-25. doi:10.3390/cells12030430
360. Cooper KW, Brann DH, Farruggia MC, et al. COVID-19 and the Chemical Senses: Supporting Players Take Center Stage. *Neuron.* 2020;107(2):219-233. doi:10.1016/j.neuron.2020.06.032
361. Kishimoto-Urata M, Urata S, Kagoya R, et al. Prolonged and extended impacts of SARS-CoV-2 on the olfactory neurocircuit. *Sci Rep.* 2022;12(1):1-13. doi:10.1038/s41598-022-09731-7
362. Parker JK, Kelly CE, Gane SB. Insights into the molecular triggers of parosmia based on gas chromatography olfactometry. *Commun Med.* 2022;2(1):47-49. doi:10.1038/s43856-022-00112-9
363. Coutinho AE, Chapman KE. The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of

- glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights. *Mol Cell Endocrinol.* 2011;335(1):2-13. doi:10.1016/j.mce.2010.04.005
364. Zuluaga AF, Salazar BE, Rodriguez CA, Zapata AX, Agudelo M, Vesga O. Neutropenia induced in outbred mice by a simplified low-dose cyclophosphamide regimen: characterization and applicability to diverse experimental models of infectious diseases. *BMC Infect Dis.* 2006;6(55):1-10. doi:10.1186/1471-2334-6-55
365. Guarino C, Hamon Y, Croix C, et al. Prolonged pharmacological inhibition of cathepsin C results in elimination of neutrophil serine proteases. *Biochem Pharmacol.* 2017;131:52-67. doi:10.1016/j.bcp.2017.02.009
366. Tsukahara T, Brann DH, Datta SR. Mechanisms of SARS-CoV-2-associated anosmia. *Physiol Rev.* 2023;103(4):2759-2766. doi:10.1152/physrev.00012.2023
367. Chen S. The immune mechanism of the nasal epithelium in COVID-19-related olfactory dysfunction. *Front Immunol.* 2023;14(July):1-12. doi:10.3389/fimmu.2023.1045009
368. Imre G. Cell Death signalling in virus infection. *Cell Signal.* 2020;76(109772):1-12.
369. Peniche AG, Bonilla DL, Palma GI, Melby PC, Travi BL, Osorio EY. A secondary wave of neutrophil infiltration causes necrosis and ulceration in lesions of experimental American cutaneous leishmaniasis. *PLoS One.* 2017;12(6):1-20. doi:10.1371/journal.pone.0179084
370. Revell PA. Studies on the Effect of Cyclophosphamide on T and B lymphocytes in the Blood, Lymph Nodes, and Thymus of Normal Guinea Pigs. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 1974;47(6):864-874. doi:https://doi.org/10.1159/000231277
371. Brocato RL, Principe LM, Kim RK, et al. Disruption of Adaptive Immunity Enhances Disease in SARS-CoV-2-Infected Syrian Hamsters. *J Virol.* 2020;94(22). doi:10.1128/jvi.01683-20
372. Liu Q, Zhang Y, Liu S, et al. Cathepsin C promotes microglia M1 polarization and aggravates neuroinflammation via activation of Ca²⁺-dependent PKC/p38MAPK/NF-κB pathway. *J Neuroinflammation.* 2019;16(1):1-18. doi:10.1186/s12974-019-1398-3
373. Alam S, Liu Q, Liu S, et al. Up-regulated cathepsin C induces macrophage M1 polarization through FAK-triggered p38 MAPK/NF-κB pathway. *Exp Cell Res.* 2019;382(2). doi:10.1016/j.yexcr.2019.06.017
374. Pham CTN, Ley TJ. Dipeptidyl peptidase I is required for the processing and activation of granzymes A and B in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(15):8627-8632. doi:10.1073/pnas.96.15.8627
375. Pirard B. Insight into the structural determinants for selective inhibition of matrix metalloproteinases. *Drug Discov Today.* 2007;12(15-16):640-646. doi:10.1016/j.drudis.2007.06.003
376. Peterson J, Lin B, Barrios-Camacho CM, et al. Activating a Reserve Neural Stem Cell Population In Vitro Enables Engraftment and Multipotency after Transplantation. *Stem Cell Reports.* 2019;12(4):680-695. doi:10.1016/j.stemcr.2019.02.014
377. Robinot R, Hubert M, de Melo GD, et al. SARS-CoV-2 infection induces the dedifferentiation of multiciliated cells and impairs mucociliary clearance. *Nat Commun.* 2021;12(1):1-16. doi:10.1038/s41467-021-24521-x
378. Eliezer M, Hamel AL, Houdart E, et al. Loss of smell in patients with COVID-19: MRI data reveal a transient edema of the olfactory clefts. *Neurology.* 2020;95(23):E3145-E3152. doi:10.1212/WNL.0000000000010806

379. Spinato G, Fabbris C, Polesel J, et al. Alterations in Smell or Taste in Mildly Symptomatic Outpatients with SARS-CoV-2 Infection. *JAMA - J Am Med Assoc.* 2020;323(20):2089-2091. doi:10.1001/jama.2020.6771
380. Butowt R, Bilinska K, von Bartheld CS. Olfactory dysfunction in COVID-19: new insights into the underlying mechanisms. *Trends Neurosci.* 2023;46(1):75-90. doi:10.1016/j.tins.2022.11.003
381. Whitcroft K, Altundag A, Balungwe P, et al. Position paper on olfactory dysfunction. *Rhinology.* Published online 2023.
382. Zhao X, Zhang M, Li F, Ma C, Wang D, Wang Y. The role of neutrophils in corneal nerve regeneration. *BMC Ophthalmol.* 2023;23(1):1-12. doi:10.1186/s12886-023-03088-9
383. Bevilacqua C, Ducos B. Laser microdissection: A powerful tool for genomics at cell level. *Mol Aspects Med.* 2018;59:5-27. doi:10.1016/j.mam.2017.09.003
384. Jain NK, Gulati M. Platelet-rich plasma: A healing virtuoso. *Blood Res.* 2016;51(1):3-5. doi:10.5045/br.2016.51.1.3
385. Lechien JR, Le Bon SD, Saussez S. Platelet-rich plasma injection in the olfactory clefts of COVID-19 patients with long-term olfactory dysfunction. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngology.* 2023;280(5):2351-2358. doi:10.1007/s00405-022-07788-8

