

Université de Montréal

**Utilisation de la thérapie par plasma convalescent COVID-19 dans la  
préservation de l'intégrité du système lymphatique**

par  
**Nada Amri**

Département des sciences biomédicales,  
Faculté de Médecine

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Maîtrise en Sciences Biomédicales (M.Sc.),  
Option Sciences cardiovasculaires

Mai 2022

© Nada Amri, 2022

Université de Montréal

Département des Sciences biomédicales, Faculté de Médecine

---

*Ce mémoire intitulé*

**Utilisation de la thérapie par plasma convalescent COVID-19 dans la  
préservation de l'intégrité du système lymphatique**

*Présenté par*

**Nada Amri**

*A été évalué par un jury composé des personnes suivantes*

**Alain Rivard**

Président-rapporteur

**Catherine Martel**

Directrice de recherche

**Stéphanie Lehoux**

Membre du jury

# Table des matières

Résumé .....	5
Abstract .....	6
Liste des figures .....	7
Liste des tableaux .....	8
Liste des sigles et abréviations .....	9
Remerciements .....	12
Chapitre 1 – Introduction .....	14
1.1 COVID-19.....	14
1.1.1 Pathogénèse de la maladie.....	14
1.1.2 Inflammation endothéliale artérielle et complications cliniques.....	15
1.1.3 Traitements et thérapies .....	18
1.2 Système lymphatique .....	27
1.2.1 Structure .....	27
1.2.2 Fonctions du système lymphatique .....	28
1.2.3 Contenu de la lymphe.....	32
1.3 Les vésicules extracellulaires .....	33
1.3.1 Classification et fonctions .....	33
1.3.2 Vésicules extracellulaires et inflammation .....	34
1.3.3 Vésicules extracellulaires et COVID-19 .....	35
Chapitre 2 – Résultats .....	37
2.1 Objectif du mémoire.....	37
2.2 Présentation de l’article.....	37
Chapitre 3 – Discussion.....	82
3.1 Vésicules extracellulaires : importants biomarqueurs.....	83

3.2 Bénéfices des vésicules extracellulaires dérivés de cellules endothéliales sanguines pour l'endothélium sanguin.....	86
3.3 Impact de la vaccination.....	92
Chapitre 4 – Conclusion.....	94
Références bibliographiques .....	96
Figures supplémentaires .....	107

## Résumé

Le coronavirus du syndrome respiratoire sévère aigu 2 (SARS-CoV-2, *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*), responsable de la maladie COVID-19, peut engendrer une inflammation généralisée. La clairance des cellules immunitaires et des médiateurs pro-inflammatoires est prise en charge par un système lymphatique fonctionnel, qui est omniprésent dans l'organisme. Afin de limiter les décès liés à l'infection, certaines thérapies, incluant la thérapie par plasma convalescent (CPT, *convalescent plasma therapy*) dont la sélection se base sur le titre d'anticorps anti-SARS-CoV-2, ont été étudiées, mais demeurent inconcluants. Dans le cadre de ma maîtrise, nous avons voulu déterminer quelles caractéristiques spécifiques du plasma convalescent de la COVID-19 (CCP, *COVID-19 convalescent plasma*) devraient être prises en considération pour limiter le dysfonctionnement des cellules endothéliales lymphatiques (LEC, *lymphatic endothelial cells*). Des cellules endothéliales lymphatiques du derme humain adulte (aHDLEC, *adult human dermal lymphatic endothelial cells*) ont été prétraitées avec du CCP, suivi d'un traitement cytokinique pour mimer la tempête inflammatoire. Ensuite, certains marqueurs d'activation et de perméabilité endothéliale ont été analysés et corrélés aux diverses caractéristiques cliniques et plasmatiques incluant la durée entre l'apparition des symptômes et le prélèvement de plasma ainsi que le contenu plasmatique en vésicules extracellulaires. Les expériences *in vitro* suggèrent que le CCP prélevé rapidement après l'apparition des symptômes n'endommage pas les jonctions des aHDLEC autant que le plasma obtenu plus tardivement. L'analyse du plasma a aussi révélé que les vésicules extracellulaires dérivées des LEC (LEC-EVs, *lymphatic endothelial cell derived extracellular vesicles*) sont plus abondantes dans le plasma des prélèvements précoces post-infection. Finalement, nos résultats démontrent qu'un CCP contenant une concentration élevée de LEC-EVs est corrélé à une meilleure intégrité de l'endothélium lymphatique. Ainsi, la sécrétion de LEC-EVs par l'endothélium altéré du donneur pourrait être un signal d'alarme qui déclenche l'auto-défense des vaisseaux lymphatiques périphériques contre une inflammation excessive chez le patient hospitalisé. De ce fait, ces nouvelles données pourraient permettre de sélectionner plus adéquatement et facilement le CCP et ultimement optimiser ses bénéfices chez les patients infectés par la COVID-19.

Mot clés : COVID-19, Thérapie par plasma convalescent, Système lymphatique, Endothélium, Vésicules extracellulaires.

## Abstract

Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), which causes COVID-19, can lead to widespread inflammation. The clearance of immune cells and pro-inflammatory mediators is handled by a functional lymphatic system, which is ubiquitous in the body. In order to limit infection-related deaths, some therapies, including convalescent plasma therapy (CPT) selected based on anti-SARS-CoV-2 antibody titer, have been studied but remain inconclusive. For my master's degree, we wanted to determine what specific characteristics of COVID-19 convalescent plasma (CCP) should be considered to limit the dysfunction of lymphatic endothelial cells (LEC). Adult human dermal lymphatic endothelial cells (aHDLEC) were pretreated with CCP, followed by a cytokine treatment to mimic the cytokine storm. Subsequently, selected markers of endothelial activation and permeability were analyzed and correlated with various clinical and plasma characteristics including the time from symptom onset to plasma donation and the extracellular vesicle content. *In vitro* experiments suggest that CCP obtained rapidly after the onset of symptoms does not damage aHDLEC junctions as much as plasma collected at a later timepoint. Plasma analysis also revealed that LEC-derived extracellular vesicles (LEC-EVs) are more abundant in plasma from early post-infection donations. Finally, our results demonstrate that a CCP containing a high plasma concentration of LEC-EVs correlates with a better integrity of the lymphatic endothelium *in vitro*. Thus, the secretion of LEC-EVs by the altered endothelium of the donor could be an alarm signal that triggers the self-defense of peripheral lymphatic vessels against excessive inflammation in the hospitalized patient. Therefore, these new data could allow for proper and easy selection of CCP and, ultimately, optimize its benefits in patients infected with COVID-19.

Keywords: COVID-19, lymphatics, convalescent plasma therapy, endothelium, extracellular vesicles.

## Liste des figures

<b>Figure 1.</b>	<b>Mécanisme d'entrée viral du virus SARS-CoV-2.....</b>	<b>15</b>
<b>Figure 2.</b>	<b>Traitements contre l'infection au SARS-CoV-2.....</b>	<b>19</b>
<b>Figure 3.</b>	<b>Fonctions essentielles du système lymphatique.....</b>	<b>29</b>
<b>Figure 4.</b>	<b>Production de vésicules extracellulaires.....</b>	<b>34</b>
<b>Figure 5.</b>	<b>Bénéfices d'un prélèvement précoce de plasma convalescents provenant de patients avec symptômes légers sur un endothélium lymphatique et sanguin. ....</b>	<b>95</b>
<b>Figure supplémentaire 1.</b>	<b>Un don précoce de plasma convalescent de la COVID-19 est associé à une meilleure intégrité mitochondriale. ....</b>	<b>107</b>
<b>Figure supplémentaire 2.</b>	<b>Une concentration élevée de BEC-EVs est corrélée à une activation des cellules endothéliales d'artères coronaires humaines.....</b>	<b>108</b>
<b>Figure supplémentaire 3.</b>	<b>Une concentration élevée de BEC-EVs plasmatique est associée à des symptômes légers, à un jeune âge et une faible concentration d'anticorps anti-SARS-CoV-2.....</b>	<b>109</b>

# Liste des tableaux

Tableau 1. Vaccins contre la COVID-19 approuvés. ....20



## Liste des sigles et abréviations

ACE2 : enzyme de conversion de l'angiotensine 2

ADAM17 : désintégrine et métalloprotéase 17

aHDLEC: cellules endothéliales lymphatique du derme humain adulte

APC : cellules présentatrices d'antigènes

ARDS : syndrome de détresse respiratoire aigüe

AT1R : récepteur de type 1 de l'angiotensine II

AU : unité arbitraire

BEC-EVs : vésicules extracellulaires dérivées de l'endothélium vasculaire sanguin

CCL21 : chimiokine (C-C motif) ligand 21

CCP : plasma convalescent COVID-19

CCR7 : récepteur à chimiokines de type 7

CLEC-2 : *C-Type lectin-like receptor 2*

COLCORONA : COLchicine CORONAvirus SARS-CoV-2

CPT : thérapie par plasma convalescent

DCs : cellules dendritiques

DIC : coagulation intravasculaire disséminée

EUA : autorisation d'utilisation d'urgence

EVs : vésicules extracellulaires

FDA : administration des denrées alimentaires et des médicaments

FGF- $\beta$ : facteur de croissance basique des fibroblastes

HCAECs : cellules endothéliales d'artères coronaires humaines

HDL : lipoprotéines de hautes densités

HUVECs : cellules endothéliales de veines ombilicales

ICAM-1 : molécule d'adhésion intercellulaire 1

IFN- $\gamma$  : interféron gamma

IL-1 $\beta$  : interleukine 1-bêta

IP-10 : protéine 10 induite par l'interféron gamma

ISEV : société internationale des vésicules extracellulaires

JAM-A : molécules d'adhésion jonctionnelle A

LDL-C : cholestérol des lipoprotéines de faibles densités

LDLr : récepteur aux lipoprotéines de faibles densités

LEC : cellules endothéliales lymphatiques

LEC-EVs : vésicules extracellulaires dérivés de cellules endothéliales lymphatiques

MAPK : protéines kinases activatrices de la mitose

MCP-1 : protéine chimio-attractante de monocyte 1

MSCs : cellules souches mésenchymateuses

NDFUA9 : NADH déshydrogénase 1 alpha subcomplexe sous-unité 9

NF $\kappa$ B : facteur nucléaire kappa B

NO : oxyde nitrique

O.D. : densité optique

OXPHOS : phosphorylation oxydative

PAMPs : motif moléculaire associés aux pathogènes

PEA : programme d'accès élargi

PECAM-1 : molécule-1 d'adhésion des plaquettes et des cellules endothéliales

PI : iodure de propidium

PROX1 : homéobox-1 lié à prospero

RAS : système rénine-angiotensine

RBD : domaine de liaison au récepteur

ROS : espèces réactives à l'oxygène

SARS-CoV-1 : coronavirus du syndrome respiratoire aigu sévère 1

SARS-CoV-2 : coronavirus du syndrome respiratoire aigu sévère 2

TGF- $\beta$  : facteur de croissance transformant bêta

TMPRSS2 : sérine protéase transmembranaire 2

TNF $\alpha$  : facteur de nécrose tissulaire alpha

UQCRC2 : sous-unité 2 du complexe cytochrome b-c1

VCAM-1 : molécule d'adhésion aux cellules vasculaires 1

VE-cadhérines : cadhérines endothéliales vasculaires

VEGF-C : facteur C de croissance endothélial vasculaire

VEGF-D : facteur D de croissance endothélial vasculaire

VEGFR-3 : récepteur 3 du facteur de croissance endothélial vasculaire

vWF : facteur de von Willebrand

ZO : zonula occludens

## Remerciements

Avant tout, j'aimerais remercier chaleureusement ma directrice de recherche, **Dre Catherine Martel**, pour ses encouragements et son accompagnement tout au long de ma maîtrise. Ses conseils, sa gentillesse et son humour ont su mettre du baume à mon parcours. Un grand merci pour toutes les opportunités offertes et les connaissances que j'ai acquises grâce à ses conseils durant mon parcours au laboratoire. Ses mots d'encouragements m'ont motivée lors de cette pandémie et m'ont poussée à rester curieuse et travailler fort. Encore une fois merci.

Durant cette maîtrise j'ai eu la chance de rencontrer et partager des moments très spéciaux avec plusieurs amis et collègues. Un grand merci à **Samiya Terbeche** et **Chaymae Boucheniata**, qui m'ont rappelée qui je suis et d'où je viens. J'aimerais également remercier **Amal Deis** pour sa gentillesse et son amitié. Je tiens à remercier aussi **Damien Garçon** qui m'a appris à présenter efficacement un projet de recherche. Un grand merci à **Laurent Vachon** et **Julie Langlois** pour avoir été des collègues et amis formidables. Vous étiez là à travers les hauts et les bas que représente la recherche. Merci beaucoup à **Nolwenn Tessier** pour m'avoir formée tout au long de ma maîtrise. Finalement, merci à **Rémi Bégin** pour avoir été un excellent partenaire de projet.

Je remercie mes amies **Joëlle Carrière** et **Priya Mehta** qui ont été présentes à travers les moments les plus difficiles du baccalauréat et de la maîtrise. Merci pour avoir partagé les larmes de joies et de tristesses lors de cette dernière année chargée d'émotions. Un grand merci à **Liza Amrani** pour avoir toujours cru en moi. Tu es une grande motivation et me pousse à devenir meilleure chaque jour. Tu es la résilience et la détermination incarnée que j'aspire avoir. Je tiens aussi à remercier chaleureusement mon beau-frère **Andrei Cernopolc** pour sa gentillesse infaillible et son soutien. Tu es un véritable frère pour moi.

J'aimerais également remercier mes parents, **Jalila Tamsamani** et **Mounir Amri**. Je ne serais pas la personne que je suis aujourd'hui sans leur amour inconditionnel et leur soutien. Merci pour les innombrables *coaching sessions* qui m'ont permis d'arriver là où j'en suis aujourd'hui. Vous m'avez tant appris et soutenu à travers toutes mes décisions. Je vous aime. Un énorme merci à ma sœur, meilleure amie, coloc, partenaire de voyage, coach sportif et plus encore **Lina Sadqi** pour

son amour et soutien inconditionnel. Tu as toujours été là pour moi. Merci pour ta confiance inébranlable en moi. Tu restes mon pilier quand j'ai besoin de parler et me confier. Merci pour tous les moments inoubliables.

Un immense merci à **Arnaud Schoentgen** qui m'a soutenue et su me motiver tout au long de mes études. Je ne peux espérer meilleur partenaire. Tu as été un véritable support à travers les innombrables difficultés rencontrées. Tu m'as permis de me développer et devenir une meilleure version de moi-même. Ton amour inconditionnel et tes encouragements m'ont accompagnée à travers les hauts et les bas. Merci d'être à mes côtés et d'être tout simplement toi.

Je souhaite également remercier **Dr. Yahye Merhi** et **Dre Céline Fiset** qui ont accepté de composer mon comité de parrainage et qui m'ont fourni d'excellents conseils lors de ma maîtrise. Finalement, j'adresse mes meilleurs remerciements à **Dr. Alain Rivard** et **Dre Stéphanie Lehoux** pour avoir accepté de faire partie du comité de révision de ce mémoire et pour le temps consacré à sa lecture et évaluation.

# Chapitre 1 – Introduction

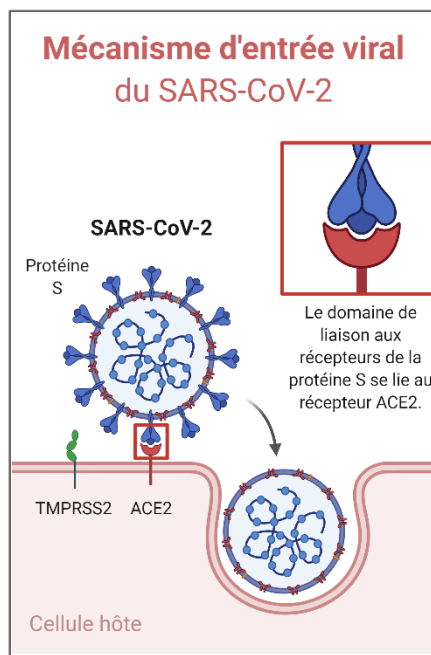
## 1.1 COVID-19

### 1.1.1 Pathogénèse de la maladie

C'est dans la nature du monde d'être la cible d'épidémies et de pandémies. Présentement, l'humanité est victime d'une pandémie de grande envergure causée par un nouveau coronavirus, soit le coronavirus du syndrome respiratoire aigu sévère 2 (SARS-CoV-2, *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*). Prenant racine à Wuhan en Chine en novembre 2019, le SARS-CoV-2 est un virus qui peut être mortel et qui est responsable de la maladie COVID-19 [1]. Jusqu'à ce jour, près de 500 millions de cas ont été recensés et le nombre de décès s'élève à plus de 6 millions de personnes [2].

Le virus SARS-CoV-2 est un bêta-coronavirus à ARN semblable au premier coronavirus SARS-CoV-1, ayant fait surface en 2002 [3]. Le génome de ces deux coronavirus est semblable à environ 80% [3]. Son génome est également similaire à 50% de celui du coronavirus lié au syndrome respiratoire du Moyen-Orient (MERS-CoV, *Middle East Respiratory Syndrome-related coronavirus*) [3]. Le SARS-CoV-2 possède des S-glycoprotéines à sa surface qui favorisent son internalisation dans les cellules via le récepteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine 2 (ACE2, *angiotensin converting enzyme 2*) (Figure 1) [4]. Ce dernier est présent à la surface de plusieurs types cellulaires, telles que les cellules rénales, intestinales, pulmonaires et cardiaques. ACE2 joue un rôle prépondérant dans le système rénine-angiotensine (RAS, *renin-angiotensin system*), utile dans le maintien de l'homéostasie cardiovasculaire [5]. Ce récepteur permet notamment de réguler la conversion de l'angiotensine 2 en angiotensine 1-7, ayant des propriétés anti-inflammatoires [4]. En revanche, en condition inflammatoires, la désintégrine et métalloprotéase 17 (ADAM17, *a disintegrin and metalloprotease 17*) clive ACE2, larguée dans la circulation sanguine, diminuant la conversion de l'angiotensine 2 et augmentant ainsi son expression [4]. Lors de la COVID-19, le SARS-CoV-2 se lie à ACE2, réduisant ainsi son activité et diminuant son expression à la surface cellulaire [6]. La sous-expression d'ACE2 peut mener à un déséquilibre inflammatoire et entraîner une augmentation de l'inflammation. Conséquemment, une augmentation de la perméabilité vasculaire et de la production d'espèces réactives à l'oxygène (ROS, *reactive oxygen species*) peut survenir. Certaines complications endothéliales, notamment la

thrombose et la vasoconstriction sont susceptibles de se produire [4]. En effet, cette diminution d'expression d'ACE2 entraîne une augmentation d'angiotensine 2, qui, via sa liaison avec le récepteur de type 1 de l'angiotensine II (AT1R, *angiotensin II receptor type 1*), peut avoir des propriétés inflammatoires, pro-thrombotiques et vasoconstrictrices [7]. Contrairement au virus SARS-CoV-1, SARS-CoV-2 nécessite la collaboration de la sérine protéase transmembranaire 2 (TMPRSS2, *transmembrane protease serine 2*) avec ACE2 pour permettre l'internalisation cellulaire du virus [4]. Le virus peut aussi être internalisé par une endocytose médiée par des clathrines [8]. Une fois internalisé dans les cellules, le virus peut affecter plusieurs organes dont, entre autres, les poumons, le cerveau, les reins, le cœur, le foie et l'endothélium vasculaire [9].



**Figure 1. Mécanisme d'entrée viral du virus SARS-CoV-2.** Schéma démontrant le mécanisme d'entrée du virus SARS-CoV-2 dans les cellules de l'hôte à l'aide du récepteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine 2. ACE2 : Enzyme de conversion de l'angiotensine 2; TMPRSS2 : Sérine protéase transmembranaire 2. Adapté de BioRender.com

### 1.1.2 Inflammation endothéliale artérielle et complications cliniques

Lors des multiples vagues d'infection à travers la planète, le virus a eu l'opportunité de muter et de générer des variants différents de la souche mère. Le premier variant, nommé variant

« alpha » ou encore B.1.1.7 a été identifié pour la première fois au Royaume-Uni [10]. Le variant « bêta » (B.1.351) a par la suite vu le jour en Afrique du Sud [10]. Le variant « gamma » (P.1) est également apparu au Japon et au Brésil [10]. Le variant provenant de l'Inde, soit le « delta » ou encore B.1.617.2 est notamment connu pour être davantage virulent et infectieux que les précédentes souches et se réplique préférentiellement au niveau du tractus respiratoire inférieur [10, 11]. Un nouveau variant, nommé « omicron » ou B.1.1.529 a ensuite émergé en Afrique du Sud. Ce dernier est nettement plus infectieux que ces prédécesseurs [11]. Cependant, les symptômes enregistrés sont moins sévères pour la majorité des individus et il y a moins de cas sévères hospitalisés par rapport aux autres variants étant donné sa répllication localisée au niveau du tractus respiratoire supérieur, plutôt qu'inférieur [11, 12]. Il est également connu pour présenter un risque plus élevé de réinfection que les autres variants [13]. Plusieurs sous-variants ont d'ailleurs vu le jour à partir du variant Omicron, tels que les variants BA.1, BA.2, BA.3 [14]. Selon les récentes données, le sous variant BA.2 aurait une capacité de répllication nettement plus grande que le sous variant BA.1 [11].

Les individus affectés par ce virus peuvent ressentir certains symptômes dont la gravité varie selon le variant, leur condition et facteurs de risque. Une méta-analyse portant sur 212 études provenant de 11 pays et régions et incluant près de 300 000 individus infectés a évalué la sévérité des symptômes parmi les individus infectés et parmi les individus atteints, les hommes, les personnes âgées et les individus ayant des comorbidités dont l'immunosuppression, le diabète et l'hypertension étaient corrélés à une mortalité plus élevée [15]. Les symptômes recensés jusqu'à présent sont semblables à ceux de la grippe, soit, toux, fièvre, frissons, fatigue, douleurs musculaires et céphalées [16]. Les symptômes gastro-intestinaux, tels que les nausées, vomissements et douleurs abdominales, les symptômes cardiovasculaires, tels que les myocardites et les arythmies et ainsi que les symptômes respiratoires (dyspnée, douleurs thoraciques) étaient associés aux cas graves de COVID-19 [15, 17]. La pneumonie et l'insuffisance d'organes étaient, quant-à-eux, fortement associées à la mortalité [15]. Cependant, bien que la présence de facteurs de risque prédispose certains individus à des complications suivant l'infection, d'autres personnes infectées ne signalent aucuns symptômes. L'Organisation Mondiale de la Santé a classifié les différents niveaux de sévérité de la maladie COVID-19 de 0 à 10 [18]. Les individus non infectés ont un score de 0 [18]. Les individus ayant une forme légère de la maladie, soit asymptomatique ou symptomatique indépendant ou encore nécessitant de l'assistance sont gradés de 1 à 3



respectivement [18]. Les cas modérés (grade 4 et 5) sont ceux hospitalisés nécessitant ou non de la thérapie par oxygène [18]. Les cas les plus sévères, soient 6 à 9 sont ceux ayant besoin de l'oxygène à haut débit, de l'intubation, de la ventilation mécanique et des médicaments et autres thérapies [18]. Finalement, le grade 10 est accordé aux décès [18].

Plusieurs hôpitaux ont signalé la présence d'une réaction inflammatoire exacerbée après l'infection [19]. Une grande proportion d'individus a développé des complications sévères suivant un état d'inflammation généralisé, plus connu sous le nom de « tempête cytokinique » [19]. La tempête cytokinique se caractérise par la sécrétion massive de plusieurs cytokines pro-inflammatoires [9, 20] par divers types cellulaires suivant l'infection par le SARS-CoV-2. Parmi ces cytokines, il est possible de noter la présence de l'interleukine 1 bêta (IL-1 $\beta$ , *interleukin 1 beta*), IL-6, IL-8, IL-10, l'interféron gamma (IFN- $\gamma$ , *interferon gamma*), la protéine 10 induite par l'interféron gamma (IP-10), la protéine chimio-attractante de monocyte 1 (MCP-1, *monocyte chemoattractant protein 1*), le facteur de nécrose tissulaire alpha (TNF $\alpha$ , *tumor necrosis factor alpha*) et plusieurs autres [21, 22]. Plus précisément, l'IL-6 a été mis en évidence comme biomarqueur témoignant de la sévérité de la maladie, étant donné sa concentration élevée chez les patients sévèrement atteints par la COVID-19 [23]. Suite à l'incubation de plasma provenant de patients sévèrement infectés par le virus sur un endothélium pulmonaire, Rauch *et al.* révèle que la dysfonction endothéliale subséquente serait attribuable à la présence accrue de cytokines pro-inflammatoires dans le plasma [24]. Cette altération de la fonction endothéliale suivant l'internalisation du virus se manifeste par un déséquilibre entre la biodisponibilité des vasodilatateurs et des vasoconstricteurs. Une diminution de la production d'oxyde nitrique (NO, *nitric oxide*), un puissant vasodilatateur, et une augmentation de la production de ROS ont été mises en évidence [25]. Ceci a pour effet d'induire un état de stress oxydatif pour la cellule endothéliale, contribuant à la progression de la pathogenèse de la maladie COVID-19 [25].

En plus de la sécrétion de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires, l'endothélium activé exprime également plusieurs marqueurs à sa surface dont la molécule d'adhésion intercellulaire 1 (ICAM-1, *intercellular adhesion molecule 1*), la sélectine E, la sélectine P et le facteur de von Willebrand (vWF, *von Willebrand factor*) [26]. L'ICAM-1 est nécessaire pour l'adhésion et le roulement des leucocytes à la surface de l'endothélium, favorisant l'extravasation des cellules immunitaires vers le site d'infection [27]. La P-sélectine et vWF, exprimées par

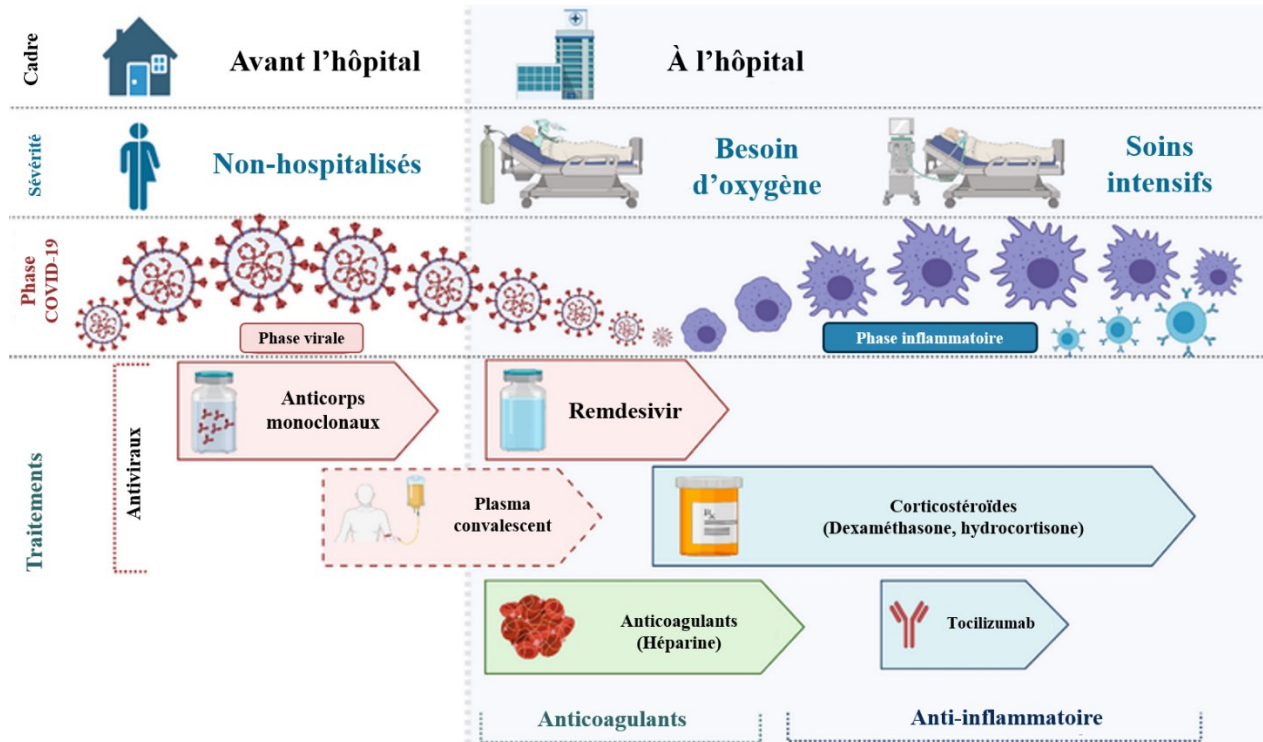
l'endothélium activé, favorisent le recrutement des plaquettes. La liaison de la P-sélectine avec ces dernières permet l'activation d'une cascade de signalisation au sein des plaquettes, menant à l'activation de la cascade de coagulation [28]. Cependant, cette activation plaquettaire est amplifiée lors de la maladie COVID-19 et cela est associée à une coagulation accrue et à un risque élevé de coagulation intravasculaire disséminée (DIC, *disseminated intravascular coagulation*) [9]. Zaid *et al.* a démontré que les plaquettes étaient hyperactivées lors de l'infection COVID-19 [29]. De surcroît, Manne *et al.* a énoncé que, lors de l'infection, l'activation des plaquettes était désorganisée due à une suractivation de la cascade de signalisation des protéines kinases activatrices de la mitose (MAPK, mitogen-activated protein kinase) et de la production de thromboxane qui est essentielle pour l'agrégation plaquettaire [30]. Cette suractivation pourrait être responsable de l'agrégation plaquettaire accrue observée chez les individus infectés par le SARS-CoV-2 [30]. Des cas de coagulation excessive dans le cerveau ont été signalés par Mao *et al.*, menant à des accidents vasculaires cérébraux (AVC) chez les patients atteints de la maladie COVID-19 [31]. Cet excès de thrombose est également notable suivant l'observation du taux élevé de D-dimères, soit des fragments issus de la dégradation de la fibrine, contenu dans les caillots sanguins [32]. Ce taux est particulièrement élevé chez les patients éprouvant des symptômes sévères [33, 34]. Subramaniam et Scharrer *et al.* explique ce phénomène par un déséquilibre entre les mécanismes anti- et pro-coagulants, menant ainsi à une activation excessive des plaquettes [35].

Certains individus présentent des symptômes de dysfonction endothéliales plusieurs mois après l'infection [36]. Sachant qu'une dysfonction endothéliale mène à l'avènement de maladies inflammatoires chroniques [37, 38], ainsi qu'au développement de complications graves, telles que le syndrome de détresse respiratoire aigüe (ARDS, *acute respiratory distress syndrome*), le syndrome coronarien aigu et l'infarctus du myocarde suivant la formation de thrombus, il est primordial de bien comprendre les mécanismes qui sous-tendent la suractivation endothéliale subséquente à l'infection au SARS-CoV-2. En effet, la grande majorité des cas de mortalité suivant l'infection sont due à la tempête cytokinique et à la défaillance multi-organe subséquente au dysfonctionnement endothélial [39].

### **1.1.3 Traitements et thérapies**

Afin de prévenir et limiter les complications graves, de multiples thérapies et traitements font actuellement l'objet d'études. Étant donné la ressemblance entre le SARS-CoV-2 et les autres

coronavirus SARS-CoV-1 et MERS-CoV, les mêmes stratégies de préventions et traitements ont été étudiées [40]. Parmi ces stratégies, on retrouve les vaccins, les médicaments anti-inflammatoires, les antiviraux ainsi que la thérapie par plasma convalescent (CPT) (Figure 2).



**Figure 2. Traitements contre l'infection au SARS-CoV-2.** Plusieurs traitements sont disponibles pour combattre l'infection par le SARS-CoV-2. Les anticorps monoclonaux, le remdesivir et le plasma convalescent peuvent être utilisés comme traitements antiviral pour contrer l'infection à divers stades de gravité de la maladie. L'utilisation d'anti-inflammatoires, tels que les corticostéroïdes et le tocilizumab est possible lors de la phase inflammatoire de l'infection. Finalement, des anticoagulants, telle que l'héparine, peut être envisagées pour contrer les risques de thromboses. (Adapté de Georgios D. Kitsios. *Treatments for COVID-19 and their timing*. Disponible à : <https://inside.upmc.com/6-covid-19-treatments-helping-patients-survive/>)

### *Les vaccins*

Le SARS-CoV-2, ayant fait son apparition en novembre 2019, est un nouveau virus pour lequel il n'existait pas de vaccins. Plusieurs compagnies pharmaceutiques se sont donc penchées sur le développement d'un vaccin efficace contre ce nouveau fléau. Des essais cliniques ont vu le jour très rapidement et finalement, les premiers vaccins contre le virus causant la maladie COVID-19 furent approuvés pour leur utilisation (Tableau 1) [41].

Tableau 1. – Vaccins approuvés contre la COVID-19.

<b>Vaccins</b>	<b>Efficacité</b>	<b>Description</b>
Pfizer – BioNTech (BNT162b2)	Protection de 95% contre les cas sévères d'infections	Sécurité et efficacité testée selon l'essai clinique NCT04368728 sur 21 720 personnes de plus de 16 ans qui ont reçu deux doses de vaccins [42].
Moderna (mRNA-1273)	Efficacité de 94,1% contre le développement des cas graves de l'infection	L'essai clinique NCT04470427 a étudié l'efficacité et la sécurité de l'administration de ce vaccin chez 15 210 participants injectés [43].
AstraZeneca- Université d'Oxford (ChAdOx1 nCoV-19 (AZD1222))	Efficacité de 70%	L'efficacité du vaccin AZD1222, développé en collaboration entre AstraZeneca et l'Université d'Oxford, fut étudié dans une méta-analyse regroupant 4 essais cliniques étudiant l'efficacité et la sécurité du vaccin à travers différentes régions du monde [44].
Johnson & Johnson (Ad26.COV2.S)	Efficacité de 52.9% après une dose de vaccin	Un essai clinique (NCT04505722) a permis l'étude de l'efficacité du vaccin auprès de 39 185 participants [45].

Vaccins	Efficacité	Description
Gamaleya ( <i>Sputnik V</i> )	Efficacité de 91.6% contre la COVID-19	Le vaccin fut testé en suivant 21977 participants selon l'essai clinique NCT04530396 [46].
Sinovac Biotech	Efficacité de 50%	Vaccin à virus inactivé [47].
Sinopharm	Efficacité de 79%	Vaccin à virus inactivé [47].
Bharat Biotech	Efficacité estimée de 77.8%	Essai clinique de phase 3 suivant 25 798 individus pour tester l'efficacité du vaccin à virus inactivé [48].

Bien que les vaccins soient présentement disponibles, ce ne fut pas le cas au début de la pandémie. Par conséquent, les centres de soins se devaient de fournir des traitements et thérapies pour limiter les complications graves chez les patients infectées. Également, malgré la disponibilité et la distribution massive des vaccins, certaines personnes ne sont pas vaccinées. De ce fait, diverses thérapies doivent être mises en place pour pouvoir traiter les individus souffrant de symptômes sévères et complications graves. Certaines personnes vaccinées peuvent aussi être atteinte par le virus et souffrir des effets secondaires de la tempête cytokinique [49]. Ainsi, divers traitements, notamment les anti-inflammatoires et les antiviraux, ont été étudiés.

#### *Les anti-inflammatoires*

Sachant que l'infection au SARS-CoV-2 induit une sécrétion importante de cytokines pro-inflammatoires et qu'une concentration plasmatique d'IL-6 est corrélée à un mauvais pronostic [21, 23, 50], un anti-inflammatoire bloquant le récepteur de l'IL-6 fut étudié [51]. Le tocilizumab, un anticorps monoclonal ciblant le récepteur à l'IL-6, est originalement utilisé dans plusieurs maladies inflammatoires chroniques, comme l'arthrite rhumatoïde. Par conséquent, un essai clinique de phase 3 fut mis en place pour évaluer la sécurité et l'efficacité de l'utilisation du tocilizumab chez des patients hospitalisés avec la COVID-19, ayant une pneumonie, mais sans ventilation mécanique [52]. Bien que l'efficacité du tocilizumab pour atténuer les symptômes des patients sévèrement infectés fut démontrée, une diminution de la mortalité ne fut pas observée [51, 52]. Un autre anti-inflammatoire, soit la colchicine, a été étudié afin de réduire la mortalité et les

hospitalisations des individus infectés par la COVID-19. La colchicine est originalement utilisée pour le traitement de la goutte et de la péricardite [53], cependant, étant un traitement administré oralement et à faible coût, cela était avantageux pour les individus infectés et non-hospitalisés. Par contre, l'effet de la colchicine, évalué grâce à l'essai clinique randomisé contrôlé et à double aveugle COLchicine CORONAvirus SARS-CoV-2 (COLCORONA) suivant 4488 patients, ne fut pas significativement efficace pour réduire la mortalité ni le taux d'hospitalisation [53]. L'utilisation de glucocorticoïdes, tels que la dexaméthasone, fut également étudiée pour réduire la mortalité des patients infectés et hospitalisés [54]. La dexaméthasone, initialement utilisée comme anti-inflammatoire pour réduire l'enflure et la douleur, fut testée à l'aide d'un essai clinique randomisé et contrôlé regroupant 6425 patients infectés par la COVID-19 [54]. L'utilisation de ce médicament a permis de réduire le taux de mortalité chez les patients ayant la ventilation mécanique ou un apport en oxygène, mais ce ne fut pas le cas pour les patients ne recevant pas de support respiratoire [54]. Un autre traitement permettant de contrôler l'inflammation observée chez les patients infectés est l'utilisation de cellules souches mésenchymateuses (MSCs, *mesenchymal stem cells*) [55]. Les MSCs peuvent être isolées à partir de sang périphérique, du sang provenant du cordon ombilical ou encore du placenta et ont de fortes propriétés anti-inflammatoires et immunomodulatrices. Un essai clinique randomisé et contrôlé suivant 24 patients infectés a également démontré la présence des propriétés anti-inflammatoires de la thérapie par MSCs lors de la COVID-19 [56]. Suivant l'administration de MSCs provenant du cordon ombilical, le temps d'hospitalisation des patients traités était inférieur à celui des patients contrôles [56]. Certaines cytokines pro-inflammatoires étaient également diminuées chez le groupe recevant la thérapie par MSCs [56]. Globalement, les patients de cette étude recevant la thérapie par MSCs avaient un meilleur taux de survie que ceux ne recevant pas la transplantation de MSCs [56]. Cependant, certaines considérations éthiques et la rareté des dons de MSCs rendent cette thérapie moins accessible.

#### *Les antiviraux*

D'autres avenues thérapeutiques, tels que l'utilisation d'antiviraux comme la chloroquine, l'hydroxychloroquine, le remdesivir et le Paxlovid ont été analysés pour atténuer les taux d'hospitalisations et de mortalité liés à l'infection au SARS-CoV-2 [40]. L'hydroxychloroquine est un médicament utilisé pour les maladies auto-immunes et la malaria [40]. La chloroquine peut augmenter le pH endosomal, prévenant ainsi la fusion cellulaire et par conséquent l'infection virale

[40]. Wang *et al.* a démontré *in vitro* un bénéfice de la chloroquine à inhiber l'infection par le SARS-CoV-2 [57]. Selon une méta-analyse regroupant 12 études de cohorte et 1 essai clinique randomisé, l'efficacité de l'hydroxychloroquine n'est pas prouvée [58]. En effet, ils n'ont pas observé une réduction de la mortalité à court terme chez les patients infectés par la COVID-19 [58]. Cette différence d'efficacité *in vitro* et *in vivo* est consistante avec la littérature [58]. L'hydroxychloroquine et la chloroquine ont toutes les deux exhibé leurs propriétés antivirales en contact avec des cellules E6 Vero [57, 59], par contre, lorsqu'utilisés lors de maladies virales, ces deux médicaments ne présentaient pas les mêmes fonctions protectrices [58]. Un autre antiviral fut l'objet d'étude, soit le remdesivir. Le remdesivir est un antiviral à large spectre ayant des propriétés antivirales contre plusieurs virus à ARN, soit le virus de l'Ebola, le SARS-CoV-1 ou encore le MERS-CoV en entraînant un arrêt précoce de la transcription de l'ARN [60]. Ce médicament a été évalué notamment dans une étude clinique randomisée à double aveugle menée auprès de 1062 patients infectés par la COVID-19 [61]. Selon les données présentées, le remdesivir serait efficace pour réduire le temps de rétablissement des patients infectés comparés au placebo [61]. Par contre, l'efficacité du remdesivir reste mitigée lorsqu'il était évalué dans une étude clinique de moins grande envergure [62]. Certains mentionnent le potentiel d'une meilleure efficacité du médicament suivant une administration précoce, soit avant 10 jours d'hospitalisations [62]. Ceci est soutenu par le fait que le médicament serait davantage bénéfique avant le sommet de la phase de réplication du virus [60]. Également, le remdesivir se doit d'être administré par voie intraveineuse à l'hôpital, rendant difficile son administration auprès de la population en générale [62]. La combinaison d'antiviraux fut également étudiée pour combattre l'infection de la COVID-19 et réduire le temps d'hospitalisation des patients infectés [63]. La combinaison notamment de l'interféron bêta-1b, le lopinavir-ritonavir et le ribavirin fut évaluée auprès de 127 patients infectés regroupés dans une étude clinique randomisée [63]. L'usage de la triple combinaison fut plus efficace pour réduire le temps d'hospitalisation des patients infectés que le traitement avec le lopinavir-ritonavir seulement [63]. Finalement, un nouveau médicament développé par Pfizer, soit l'antiviral Paxlovid, vient de recevoir l'autorisation par la FDA pour participer à la lutte contre la COVID-19. Cet antiviral permet d'inhiber la protéase du virus SARS-CoV-2, essentiel pour sa réplication. Il est administré par voie orale [64]. Selon Pfizer Inc. le Paxlovid permet de réduire les risques d'hospitalisations et de mortalité de 89% [64]. Pour demeurer efficace, Paxlovid doit être pris en combinaison avec de faibles doses de ritonavir [64].

### *Les immunomodulateurs*

Hormis les diverses thérapies ciblant l'inflammation ou la réplication du virus, d'autres traitements visant la neutralisation du virus sont également étudiés. Parmi ceux-ci, il y a le traitement par anticorps neutralisants monoclonaux. Les anticorps neutralisants monoclonaux permettent de lier et neutraliser le virus responsable de la maladie SARS-CoV-2 en se liant, pour certains, au domaine de liaison au récepteur du virus [65]. Selon Du *et al.* l'utilisation d'anticorps neutralisants monoclonaux reste une thérapie potentielle pour réduire le taux de mortalité lié à la COVID-19, en particulier chez les individus hospitalisés [66]. Par conséquent, plusieurs anticorps monoclonaux, dont le bamlanivimab, ont reçu une autorisation d'utilisation d'urgence (EUA, *Emergency Use Authorization*) de la part de l'administration des denrées alimentaires et des médicaments (FDA, *Food and Drug Administration*) pour le traitement de la COVID-19 [67]. L'avantage de la thérapie par anticorps monoclonaux est l'administration d'une grande quantité d'anticorps provenant de patients convalescents [65]. Or, la clairance rapide du virus par les anticorps neutralisants n'est pas suffisante [65], étant donné l'hyperinflammation provoquée par la tempête cytokinique.

### *La thérapie par plasma convalescent*

Pour adresser la tempête cytokinique, une clairance rapide du virus couplée à un contrôle de l'inflammation est nécessaire. La thérapie par plasma convalescent (CPT, *convalescent plasma therapy*) permet d'accélérer la clairance du virus, tout en médiant la suractivation immunitaire et l'hyperinflammation grâce aux médiateurs immunomodulateurs présents dans le plasma convalescent. Cette thérapie repose sur le prélèvement de plasma recueilli chez un individu après la résolution d'une infection [68]. Cet individu aurait produit des anticorps contre le pathogène en question et ces derniers, incluant d'autres médiateurs immunomodulateurs présents du plasma convalescent, seraient administrés à un individu infecté et hospitalisé [37]. Ces anticorps présents dans le plasma peuvent se lier au pathogène et le neutraliser en se liant à son domaine de liaison au récepteur [69]. Cependant, la CPT promeut d'autres mécanismes d'immunité passive, tels que l'activation du complément, la phagocytose ou la cytotoxicité cellulaire anticorps-dépendant [69]. La CPT est utilisée depuis longtemps et a servi pour combattre plusieurs infections dont l'Ebola [70, 71], le SARS-CoV-1 [72-74], le MERS-CoV [75, 76], la grippe espagnole de 1918 [77] et la fièvre Lassa [78]. Ainsi, étant donné la similitude entre le SARS-CoV-1, le MERS-CoV et le SARS-CoV-2 [3], des essais cliniques étudiant l'efficacité et la sécurité du CPT chez des patients



infectés et hospitalisés ont été menés [79]. De ce fait, le plasma convalescent COVID-19 (CCP) a été proposé comme une option thérapeutique pour les patients sévèrement affectés par la COVID-19.

Au début de la pandémie, le plasma convalescent COVID-19 (CCP, *COVID-19 convalescent plasma*) a été mis à disposition aux États-Unis via le biais du programme d'accès élargi (EAP, *expanded access programs*) de la FDA, puis par le biais de l'accès d'urgence. Selon les premières données, l'immunisation passive était très efficace, car les patients recevant la CCP contenant des titres élevés d'anticorps anti-SARS-CoV-2 avaient 30 % moins de risques de mourir de la maladie que ceux recevant la CCP avec des titres faibles [80]. Une autre étude clinique avait également démontré un effet positif du CCP en mesurant un changement des cellules immunitaires et du profil cytokinique 28 jours après la transfusion, ainsi qu'une élévation des anticorps IgG anti-SARS-CoV-2 [81]. Selon les auteurs, la dose d'anticorps neutralisant efficace est d'environ 1:160. Toutefois, des titres supérieurs à 1 : 640 ont démontré des résultats plus prometteurs 2 semaines après le traitement [82]. Également, plusieurs essais cliniques ont étudié le moment de l'administration du CCP pour optimiser la rémission [83-85]. Dans un essai clinique randomisé à double aveugle, contrôlé par placebo, l'administration précoce du CCP à haut titre d'anticorps anti-SARS-CoV-2 a réduit la progression de l'infection [83]. Une méta-analyse regroupant 10 essais cliniques randomisés et 15 non-randomisés démontre que lorsque le CCP est administré à des stades précoces de la maladie, il permet de réduire significativement la mortalité. Par contre, lorsque la CCP est administré chez des patients sévèrement atteints ou dans des conditions critiques, il ne réduit pas la mortalité, probablement dû à l'état déjà avancé de l'infection [85]. D'autre part, le bénéfice sur la mortalité n'était pas augmenté par l'utilisation de plasma avec un titre d'anticorps élevé par rapport au plasma non sélectionné [85]. L'étude de Beaudoin-Bussièrès *et al.* propose également de privilégier le don précoce par rapport au don tardif, compte tenu de la diminution des anticorps anti-SARS-CoV-2 dans le temps [86]. Ils démontrent que l'activité neutralisante du plasma diminue au cours des semaines suivant la rémission des symptômes, en particulier les IgM qui disparaissent plus rapidement que les IgG et les IgA [86]. Ainsi, un prélèvement antérieur à 6 semaines post-infection permettrait d'obtenir un taux plus élevé d'anticorps neutralisants [86]. Également, il semblerait que les donneurs de CCP ayant exprimés des symptômes plus sévères développent plus d'anticorps que ceux dont les symptômes étaient modérés, voire légers [84]. Ainsi, une des recommandations relative à l'utilisation du CCP serait

d'utiliser le plasma provenant de patients ayant eu des symptômes sévères afin d'obtenir un taux élevé d'anticorps neutralisants.

Par contre, un plasma provenant d'un patient ayant été sévèrement atteint par la COVID-19 pourrait avoir des effets néfastes subséquents chez le patients receveur. En effet, une méta-analyse démontre que les niveaux d'IL-6 étaient élevés chez les patients sévèrement atteints par la COVID-19 comparativement aux patients avec atteinte modérée [87]. Le plasma convalescent de patients sévèrement infectés pourrait ainsi contenir des niveaux élevés de cytokines pro-inflammatoires et être néfaste pour l'hôte. Plusieurs essais cliniques randomisés majeurs n'ont d'ailleurs pas réussi à montrer un bénéfice par rapport au traitement standard, soit sans l'administration de médicaments contre la COVID-19 ou de CCP [54, 68, 79, 88]. Les résultats de l'étude *CONvalescent Plasma for Hospitalized Adults With COVID-19 Respiratory Illness* (CONCOR-1) suggèrent que la différence relative de mortalité précédemment observée avec le CCP à titre élevé d'anticorps par rapport à celle à titre faible peut s'expliquer par un effet délétère du CCP à titre faible d'anticorps [68]. Cela a des implications importantes pour l'interprétation d'un essai clinique montrant un bénéfice du CCP qui a utilisé du plasma non-convalescent comme contrôle [89]. Une étude récente a également mis en évidence le manque d'efficacité de l'administration précoce de CCP aux patients à haut risque, car elle n'a pas empêché la progression de la maladie [90]. Compte tenu de l'opinion mitigée sur l'efficacité d'une administration précoce de la CCP, nous avons émis l'hypothèse que le moment du prélèvement du CCP, et non le moment où elle est administrée aux patients, devrait être considéré [91]. En fin de compte, ces résultats montrent à quel point les véritables mécanismes qui sous-tendent l'effet immunomodulateur du CCP contre le COVID-19 demeurent incompris et qui ne sont probablement pas déterminés uniquement par la teneur en anticorps du CCP. Par conséquent, il est essentiel d'étudier les constituants du plasma convalescent et leurs effets sur le patient receveur. Si ces traitements optimisés s'avèrent efficaces pour aider à combattre l'infection par le SARS-CoV-2, ils pourraient potentiellement être utilisés en routine lorsqu'un nouveau virus émerge. Étant donné l'impact de l'inflammation par la COVID-19 sur l'organisme, le système lymphatique, de par son rôle pour résorber l'inflammation, doit être étudié davantage.

## 1.2 Système lymphatique

### 1.2.1 Structure

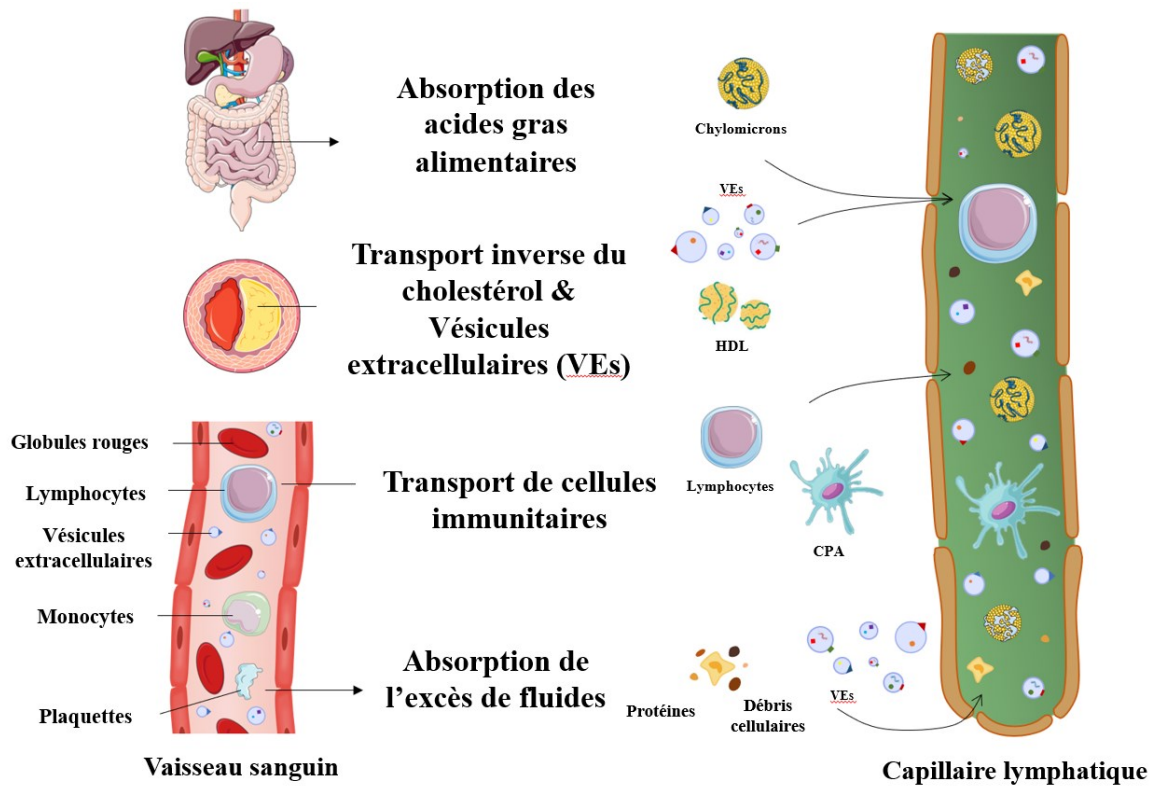
Découvert au XVII<sup>e</sup> siècle par Aselli [92], l'origine [93] et les véritables fonctions [94] du système lymphatique n'ont été élucidées que les siècles suivants. Œuvrant en étroite collaboration avec le système cardiovasculaire, ces deux systèmes disposent de structures et fonctions bien différentes. Issu originellement du système sanguin [93], le système lymphatique se différencie durant l'embryogenèse à partir de la sixième semaine chez l'humain. Subséquemment, certaines cellules endothéliales provenant des veines cardinales déclenchent l'expression du facteur d'expression de l'homéobox-1 lié à prospero (PROX1, *prospero homeobox protein 1*) [95]. Ce dernier, stimulé par le facteur C de croissance endothélial vasculaire (VEGF-C, *vascular endothelial growth factor C*) sécrété par des cellules environnantes [96], entame l'expression de marqueurs des cellules endothéliales lymphatiques (LEC, *lymphatic endothelial cells*) [95], notamment le récepteur 3 du facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGFR-3, *vascular endothelial growth factor receptor 3*, aussi connu sous le nom *Flt4*) ayant pour ligands VEGF-C et VEGF-D. L'interaction de VEGFR-3 avec son ligand VEGF-C permet le développement et la prolifération du système lymphatique [97]. Bien que le système lymphatique et le système sanguin se séparent durant l'embryogenèse, ils demeurent toutefois connectés à la jonction lymphoveineuse [98]. Afin d'empêcher le reflux du sang dans le système lymphatique au niveau de cette jonction, l'interaction entre les LEC et les plaquettes y est cruciale. Les LEC, exprimant la podoplanine, se lient aux plaquettes via leur récepteur *C-Type lectin-like receptor 2* (CLEC-2) [98]. Cette association déclenche une cascade de signalisation favorisant l'agrégation des plaquettes et la formation d'un thrombus, bloquant ainsi la jonction lymphoveineuse d'un reflux sanguin [98].

Le système lymphatique est constitué de capillaires lymphatiques (aussi appelés vaisseaux lymphatiques initiaux) et de vaisseaux collecteurs [99]. Les vaisseaux lymphatiques initiaux sont constitués d'une monocouche de LEC reliés par des jonctions en forme de boutons, notamment, les cadhérines endothéliales vasculaires (VE-cadhérines, *vascular endothelial-cadherins*), molécule-1 d'adhésion des plaquettes et des cellules endothéliales (PECAM-1 ou CD31, *platelet endothelial cells adhesion molecules 1*), la zonula occludens (ZO), les molécules d'adhésion jonctionnelle A (JAM-A, *junctional adhesion molecule A*), occludine et claudine-5 [100]. Les capillaires ont pour fonction d'absorber l'ultrafiltrat plasmatique, soit le liquide interstitiel, au niveau des tissus.

Conséquemment, les capillaires sont très perméables afin de permettre la pénétration des macromolécules, des cellules immunitaires et autres composants de l'ultrafiltrat plasmatique [101]. Cette perméabilité se traduit par une interaction des LEC avec la matrice extracellulaire sous-jacente menant à une ouverture des jonctions serrées [102]. Suite à l'absorption du liquide interstitiel dans les capillaires lymphatiques, le liquide, appelé lymph, est drainé dans les vaisseaux lymphatiques pré-collecteurs qui débouchent eux-mêmes sur les vaisseaux lymphatiques collecteurs, plus gros et moins perméables [99]. Ces derniers sont composés de LEC connectés via des jonctions serrées « *zipper-like* » [100] et sont entourés de cellules musculaires lymphatiques favorisant la contraction du vaisseau et à la propulsion de la lymph [103]. Les unités contractiles des vaisseaux collecteurs sont appelées « lymphangions » [104]. Les vaisseaux collecteurs mènent aux ganglions lymphatiques, nécessaires au développement de l'immunité adaptative via l'interaction entre les cellules présentatrices d'antigènes (APC, *antigen-presenting cells*) et les lymphocytes [102]. Les vaisseaux collecteurs possèdent également des valves à deux volets qui permettent à la lymph d'être propulsée de manière unidirectionnelle vers la veine sous-clavière gauche où elle rejoindra la circulation sanguine à la jonction lymphoveineuse [105].

### **1.2.2 Fonctions du système lymphatique**

La structure particulière du système lymphatique lui confère plusieurs fonctions primordiales pour assurer le bon fonctionnement de l'organisme (Figure 3). Initialement, le système lymphatique était connu pour réguler l'homéostasie des fluides corporels, transporter passivement les cellules immunitaires et absorber les lipides alimentaires de l'intestin [102]. Cependant, une nouvelle fonction du système lymphatique a été mise en évidence plus récemment. Dre Martel et ses collaborateurs ont démontré que le système lymphatique participait également au transport inverse du cholestérol hors de la paroi artérielle [106]. Malgré les connaissances encore trop limitées à propos du système lymphatique, il demeure néanmoins essentiel au bon fonctionnement du corps humain.



**Figure 3. Fonctions essentielles du système lymphatique.** Schéma démontrant les quatre fonctions du système lymphatique, soit l'absorption des lipides alimentaires, la préservation de l'équilibre hydrostatique et la défense immunitaire. Une nouvelle fonction du système lymphatique découvert récemment est son rôle dans le transport inverse du cholestérol, médié par les macrophages vers les capillaires lymphatiques présent dans l'adventice des artères. Les vésicules extracellulaires sont abondantes dans la circulation sanguine. Étant donné que l'ultrafiltrat plasmatique est collecté par le système lymphatique, il est possible que les vésicules extracellulaires accèdent à la circulation lymphatique en compagnie des protéines, des débris cellulaires et autres macromolécules. APC, cellules présentatrices d'antigènes; EVs, vésicules extracellulaires; HDL, lipoprotéine de haute densité. (Adapté de Milasan, A., M. Farhat, and C. Martel, *Frontiers in Physiology*, 2020. 11: p. 476.)

### *Homéostasie des liquides*

La principale fonction du système lymphatique est de récolter le liquide interstitiel en excès dans les capillaires et de le ramener dans la circulation sanguine [102]. Ce liquide interstitiel est

pris en charge par les capillaires lymphatiques, pour ensuite être acheminé via les vaisseaux collecteurs. La lymphe du côté gauche du corps, ainsi que l'abdomen et les membres inférieurs est dirigé vers le canal thoracique, pour ensuite rejoindre la veine sous-clavière gauche [107]. La lymphe provenant du côté droit du corps, du thorax et de la tête va quant-à-elle dans le tronc droit lymphatique pour finalement retourner dans le sang via la veine sous-clavière droite [107]. Le liquide interstitiel contient du fluide, des macromolécules, des leucocytes, mais également des cytokines et autres médiateurs [102]. De ce fait, un défaut de drainage de cet ultrafiltrat plasmatique pourrait entraîner une accumulation de cytokines pro-inflammatoires, de cellules immunitaires et autres médiateurs pro-inflammatoires au niveau du tissu périphérique [108]. Pour pallier cette inflammation exacerbée, un processus de lymphangiogenèse est enclenché. Ceci fut constaté par la relâche de VEGF-C et VEGF-D par les macrophages présents au site inflammatoire [109]. Or, malgré l'augmentation du trafic de cellules immunitaires pouvant résoudre l'inflammation et la clairance accrue de cytokines pro-inflammatoires, il n'est pas exclu que les nouveaux vaisseaux lymphatiques soient dysfonctionnels. En outre, les cytokines pro-inflammatoires peuvent endommager les vaisseaux lymphatiques [110]. Certaines cellules cancéreuses possèdent des propriétés pro-lymphangiogéniques [111], notamment par la sécrétion de facteurs de croissances, tels que VEGF-A, VEGF-C et VEGF-D, promouvant ainsi la migration de cellules cancéreuses vers les ganglions lymphatiques drainants et favorisant la formation de métastases [111]. Ainsi, une dysfonction au niveau de l'absorption de l'excès de liquide interstitiel et son accumulation dans certains tissus pourrait favoriser l'exacerbation de maladies inflammatoire, telle que la COVID-19. De plus, de par la présence de leucocytes et cellules immunitaires dans le liquide interstitiel, une dysfonction lymphatique pourrait mener à une dysfonction au niveau de l'immunité adaptative.

#### *Transport de cellules immunitaire*

Étant donné l'abondance du réseau lymphatique dans tous les organes du corps, en particulier la peau, ce système est fortement impliqué dans l'immunité adaptative [108]. Lors d'une infection par un agent pathogène, les cellules dendritiques (DCs) présents dans la peau vont surexprimer le récepteur à chimiokines de type 7 (CCR7) suivant l'interaction avec un motif moléculaire associés aux pathogènes (PAMPs, *pathogen associated molecular patterns*) [112]. Ceci a pour effet d'augmenter son interaction avec son ligand CCL21, exprimé par les cellules endothéliales lymphatiques [108]. Subséquemment, les DCs et autres APC migrent à travers les

vaisseaux lymphatiques afférents vers les ganglions lymphatiques. Dans ces derniers, les présentations d'antigènes par les APC aux lymphocytes T sont exécutées permettant l'activation de la réponse immunitaire adaptative [108]. Ainsi, un système lymphatique fonctionnel comportant des vaisseaux drainant efficacement les modulateurs pro-inflammatoires des tissus périphériques est essentiel pour résoudre efficacement une infection, telle que la COVID-19. Finalement, un système lymphatique fonctionnel est nécessaire pour combattre l'infection, mais également pour permettre une réponse immunitaire adéquate face à la vaccination contre le SARS-CoV-2 [113].

#### *Absorption des lipides alimentaires*

Le système lymphatique est également primordial dans l'absorption des lipides alimentaires au niveau du petit intestin [102]. Les entérocytes présents dans les villosités intestinales permettent la transformation de ces lipides en chylomicrons de 75 à 1200 nm de diamètre [102]. Ces derniers sont absorbés par les vaisseaux lymphatiques situés au centre des villosités et également appelé lacté [102]. Ces vaisseaux lactéaux rejoignent les vaisseaux collecteurs mésentériques plus vastes. Une absorption déficiente par les vaisseaux lactéaux fut soulevé par Harvey et ses collaborateurs, menant ainsi à l'obésité [114]. Ainsi, une absorption adéquate par le système lymphatique promet le maintien de l'intégrité du réseau et évite une déstructuration du système lymphatique et, conséquemment, le développement de pathologies [102].

#### *Transport inverse du cholestérol*

Martel *et al.* a proposé en 2013 une nouvelle fonction du système lymphatique, soit le transport inverse du cholestérol [106]. Cette fonction permet l'expulsion du cholestérol des lipoprotéines de faibles densités (LDL-C, *low-density lipoprotein cholesterol*) hors de l'intima via les vaisseaux lymphatiques présents dans l'adventice des artères pour éventuellement rejoindre la circulation sanguine et permettre leur dégradation par le foie [106]. Le LDL-C privilégierait un passage à travers les capillaires lymphatiques de l'adventice, car rejoindre le système sanguin directement irait à l'encontre du gradient de pression hydrostatique [106]. Une dysfonction du système lymphatique joue un rôle clé dans le développement de cette l'athérosclérose, maladie cardiovasculaire caractérisée par une accumulation de cholestérol et de cellules immunitaires dans l'intima de la paroi artérielle [106]. En effet, une dysfonction du système lymphatique est notable chez la souris atteinte d'athérosclérose [115]. Une atteinte des vaisseaux lymphatique collecteurs, plutôt qu'un défaut de drainage par les capillaires lymphatique seraient à l'origine d'une mauvaise

prise en charge du cholestérol [115]. Ainsi, cela entraînerait une accumulation de LDL-C dans l'intima et exacerberait la pathologie [115]. À l'inverse, il est possible de prévenir cette dysfonction lymphatique chez la souris via un traitement précoce au VEGF-C 152S qui permettrait de cibler le récepteur VEGFR-3 et stimuler la lymphangiogenèse, soit la formation de nouveaux vaisseaux lymphatiques [115]. En effet, traiter des souris pouvant développer de l'athérosclérose et déficientes pour le récepteur au LDL (*LDLr<sup>-/-</sup>*) avec du VEGF-C 152S a permis de réduire la taille de la plaque et de la stabiliser [115]. Il est donc essentiel de veiller au maintien de l'intégrité des vaisseaux lymphatiques, car une altération pourrait provoquer de sérieuses pathologies, telle que l'athérosclérose.

### 1.2.3 Contenu de la lymphe

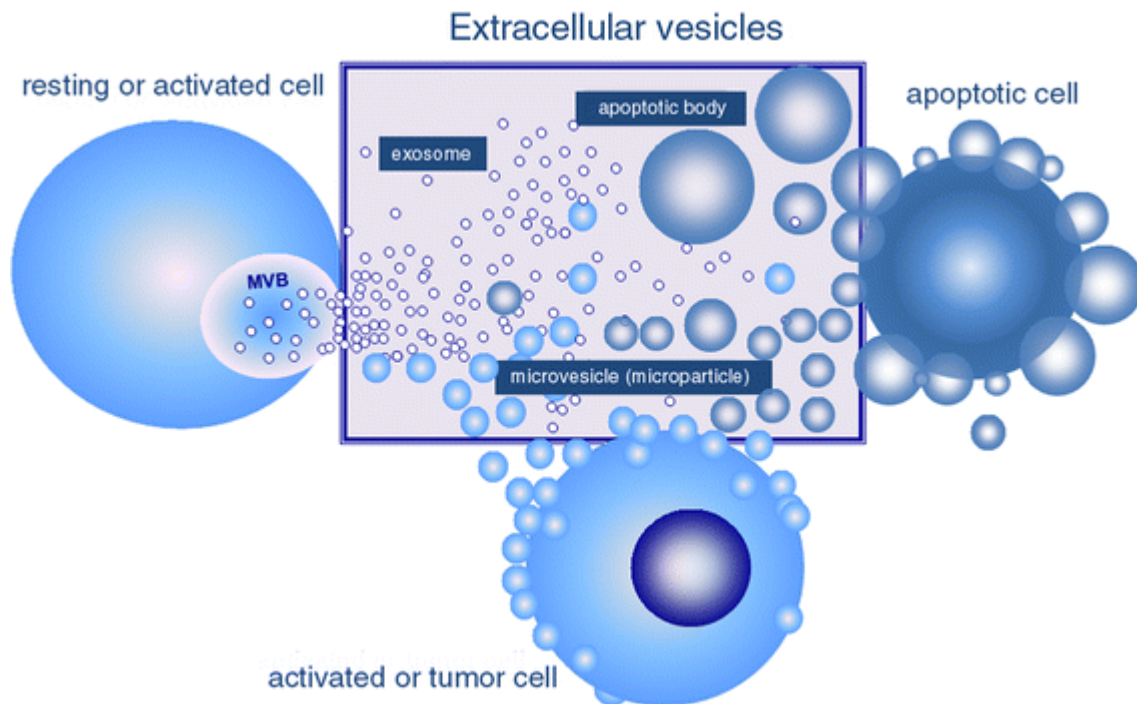
En raison de l'omniprésence du réseau lymphatique à travers l'organisme, une altération de son fonctionnement est connue pour entraîner de nombreuses pathologies, telles que l'athérosclérose et les maladies inflammatoires chroniques [99]. Il est donc pertinent de se pencher sur les constituants de la lymphe et de leurs effets sur les organes cibles, mais également de leurs impacts sur l'intégrité du système lymphatique. La lymphe provient majoritairement de l'ultrafiltrat plasmatique drainé par les capillaires lymphatiques dans les tissus périphériques [101]. Cet ultrafiltrat plasmatique est appelé « lymphe » une fois présent dans le système lymphatique. Étant donné la perméabilité des capillaires lymphatiques et des jonctions présentes entre les LEC, la composition de la lymphe se différencie du plasma ou du sérum [106]. La lymphe contient entre autres des protéines, des lipides, des facteurs de croissances, des cytokines et autres médiateurs pro- et anti-inflammatoires, ainsi que des lipoprotéines et apolipoprotéines associées. Le laboratoire de Dre Catherine Martel a également noté l'abondance de vésicules extracellulaires (EVs, *extracellular vesicles*) et de médiateurs pro-inflammatoires dans la lymphe de souris [104]. Leurs concentrations seraient augmentées chez les souris souffrant d'athérosclérose [104]. Les EVs pourraient ainsi être internalisées par les LEC des vaisseaux collecteurs et, subséquemment, altérer la fonction lymphatique [116].



## 1.3 Les vésicules extracellulaires

### 1.3.1 Classification et fonctions

Selon la société internationale des vésicules extracellulaires (ISEV, *International Society for Extracellular Vesicles*), les EVs sont délimitées par une bicouche lipidique et ne peuvent pas se répliquer en raison de l'absence de noyau fonctionnel [117]. Les EVs sont libérées par les cellules lors de l'activation ou de l'apoptose [118]. Les EVs sont habituellement regroupées en trois sous catégories, soit les exosomes, les microparticules et les corps apoptotiques (Figure 4). Les exosomes regroupent les vésicules de 40 à 100nm [119], alors que les microparticules regroupent celles ayant une taille variant de 100 à 1000nm. Les corps apoptotiques ont, quant à eux, une taille variant de 1000 à 5000nm [120]. Or, cette classification est remise en question dans la littérature [121]. Ces sous-catégories de EVs se distinguent selon leurs mécanismes de formations, mais également par leurs morphologies, leurs compositions et leurs fonctions [119]. Les EVs sont produites par toutes les cellules de l'organismes et peuvent servir de messagers intercellulaires et libérer ce qu'elles contiennent [122]. La composition des EVs diffère dépendamment de leur cellule d'origine, mais également du fluide biologique dans lesquelles elles sont présentes [122]. Les EVs sont généralement composés d'ARN, ADN, de protéines, de lipides et facteurs de croissances [122]. Les EVs sont impliquées dans plusieurs mécanismes pro- et anti-inflammatoires, ce qui les rend très polyvalentes quant à leurs implications dans certaines pathologies [122, 123]. Bien que leurs fonctions ne soient pas complètement élucidées, elles demeurent d'intéressants biomarqueurs pour diverses maladies.



**Figure 4. Production de vésicules extracellulaires.** Illustration de la genèse de vésicules extracellulaires à partir de cellules activées ou apoptotiques. Trois grandes catégories distinguent les sous-types de EVs, soient les exosomes, les microvésicules et les corps apoptotiques. Les exosomes regroupent les vésicules de 40 à 100nm alors que les microvésicules regroupent celles ayant une taille variant de 100 à 1000nm. Les corps apoptotiques possèdent une taille variant de 1 à 5µm. MVB, corps multivésiculaires, (Adapté de György, B., Szabó, T.G., Pásztói, M. *et al. Cell. Mol. Life Sci.* 68, 2667–2688 (2011))

### 1.3.2 Vésicules extracellulaires et inflammation

Le rôle des EVs a été étudié dans certaines pathologies inflammatoires, telle que l'athérosclérose. Les EVs sont connues pour déstabiliser la plaque et entraîner des dommages à l'endothélium vasculaire notamment en augmentant sa perméabilité [124] et en altérant la synthèse de NO. Certains sous-types de EVs présents dans la plaque d'athérosclérose ont des effets prothrombotiques, conséquence d'une déstabilisation de la plaque et de sa rupture [125]. De plus, Oggero *et al.* a démontré que des EVs dérivées d'agrégats de plaquettes et monocytes pouvaient moduler la stabilité des plaques d'athéroscléroses [126]. L'obésité est une autre morbidité posant un risque de développer des maladies cardiovasculaires. Étant donné la capacité des EVs à

transmettre ce qu'elles contiennent aux cellules cibles, il a été notamment démontré que les EVs provenant d'adipocytes inflammés pouvaient induire la production de la molécule d'adhésion aux cellules vasculaires 1 (VCAM-1, *vascular cell adhesion molecule 1*) chez les cellules endothéliales vasculaires, augmentant ainsi l'attachement des leucocytes [127]. Les EVs provenant d'environnements inflammés sont ainsi des véhicules et peuvent moduler la fonction des cellules cibles. Cette altération de fonction peut survenir suite à l'adhésion des EVs aux cellules ou leur internalisation dans ces dernières [122].

### **1.3.3 Vésicules extracellulaires et COVID-19**

Les EVs sont également d'importants acteurs dans la maladie COVID-19. Selon Pironti *et al.* les virus peuvent utiliser les EVs pour sortir des cellules infectées et infecter d'autres cellules environnantes en utilisant les mêmes voies d'entrée des EVs [128]. De plus, les EVs, étant des messagers intercellulaires, elles peuvent faciliter l'entrée du virus SARS-CoV-2 dans les cellules. Un des mécanismes utilisés serait le transfert de ACE2 aux cellules cibles par des exosomes exprimant ACE2 [129]. Également, les EVs contenant la tétraspanine CD9 peuvent l'utiliser pour moduler l'entrée du virus dans les cellules [130]. La tétraspanine contenue dans les EVs est connue pour s'associer avec TMPRSS2 permettant le clivage de la protéine S du coronavirus MERS-CoV pour son entrée rapide dans les cellules [130]. Ceci pourrait refléter une méthode alternative d'entrée virale médiée par les EVs. Or, les vésicules extracellulaires exprimant ACE2 ne sont pas que favorables à l'infection. En effet, selon El-Shennawy *et al.* les EVs exprimant ACE2 peuvent bloquer l'infection au SARS-CoV-2 en le neutralisant [131]. Les EVs exprimant ACE2 compétitionnerait avec le récepteur des cellules de l'hôte pour sa liaison avec la protéine S du virus [131]. Ils ont également dénoté une augmentation significative de EVs-ACE2<sup>+</sup> dans le plasma de patients infectés par la COVID-19 [131]. Hormis la facilitation de l'entrée du virus dans les cellules par les EVs, ces dernières peuvent être utilisées par les virus pour échapper au système immunitaire. En effet, Troyer *et al.* démontre que les EVs peuvent exhiber la protéine S du SARS-CoV-2, pouvant ainsi leurrer les anticorps neutralisants anti-SARS-CoV-2 [132].

Les EVs peuvent également influencer l'infection virale de la COVID-19 en modulant la tempête cytokinique. Les MSCs sont connues comme étant bénéfiques, car elles ont des effets anti-inflammatoires [133]. Ainsi, les EVs dérivées de MSCs seraient aussi bénéfiques, car elles auraient des propriétés angiogéniques [128]. Ainsi, il pourrait y avoir un effet bénéfique à l'injection

intraveineuse de EVs de MSCs chez des patients infectés par la COVID-19 [128]. Ces EVs sécrètent plusieurs cytokines et chimiokines anti-inflammatoires qui peuvent interagir avec les cellules immunitaires [134]. Ces EVs peuvent également atténuer la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 et le TNF $\alpha$  chez la souris [135]. Cela confère ainsi un pouvoir immunomodulateur aux EVs. Abstraction faite des EVs dérivées des MSCs, certains EVs, notamment les EVs dérivées de plaquettes (pEVs), sont connues pour leur influence sur l'angiogenèse [136, 137]. Les pEVs transportent des facteurs de croissances (tels que le facteur de croissance basique des fibroblastes (FGF- $\beta$ , *basic fibroblast growth factor*), le facteur de croissance transformant bêta (TGF- $\beta$ , *transforming growth factor beta*) et VEGF) et peuvent mener à l'activation de voies de signalisation induisant la prolifération et migration de cellules endothéliales [137].

Les vésicules extracellulaires sont ainsi très prometteuses, malgré la complexité de leur mécanisme d'action. Conséquemment, il est primordial d'évaluer et analyser leur contribution dans la pathogénèse de la maladie COVID-19 et d'identifier leur potentielle utilisation en tant que biomarqueur dans cette pathologie. Étant donné la controverse entourant la thérapie par plasma convalescent, il serait intéressant d'étudier la composition en EVs du plasma convalescent.

## **Chapitre 2 – Résultats**

### **2.1 Objectif du mémoire**

La thérapie par plasma convalescent fut longuement étudiée depuis le début de la pandémie COVID-19. Cependant, l'efficacité de la thérapie n'a pas été concluante. Le transport lymphatique se situe à l'interface entre la réponse immunitaire et la résolution de l'inflammation des tissus périphériques, y compris la paroi artérielle. Étant donné l'importance du système lymphatique dans la clairance des cellules immunitaires et autres modulateurs pro-inflammatoires des tissus périphériques, une atteinte à son intégrité pourrait compromettre cette fonction vitale [108]. Ainsi, nous supposons qu'une sélection adéquate du plasma convalescent de la COVID-19 pourrait ultimement optimiser l'effet chez le patient infecté et hospitalisé. C'est la raison pour laquelle l'impact du plasma convalescent de la COVID-19 sur le système lymphatique doit être étudié. Ce mémoire a donc pour objectif de :

- Déterminer quelles caractéristiques cliniques des donneurs de plasma convalescent doivent être considérées pour sélectionner le plasma convalescent optimal pour la thérapie et rendre la sélection facile et adaptée à tous les centres de soins hospitaliers.
  
- Déterminer quelles caractéristiques du plasma convalescent de la COVID-19 doivent être pris en considération pour limiter le dysfonctionnement des cellules endothéliales lymphatique induit par la tempête cytokinique.

### **2.2 Présentation de l'article**

Au cours de cette pandémie, notre laboratoire a souhaité contribuer à la recherche portant sur la COVID-19 afin d'identifier des thérapies bénéfiques, avantageuses et efficaces pour les individus infectés par le SARS-CoV-2. Dans le cadre de ma maîtrise, j'ai pu profiter de l'expertise de notre laboratoire sur le système lymphatique afin d'élargir mes connaissances sur ce système essentiel au bon fonctionnement de l'organisme. J'ai également pu m'initier au monde du réseau lymphatique grâce à la participation à la rédaction d'un article de revue portant sur l'optimisation de l'administration des médicaments pour contrer les maladies cardiovasculaires en ciblant le

système lymphatique [138]. Cet article fut publié dans le journal *Pharmaceutics* en août 2021 (doi : <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13081200>).

L'article présenté dans ce mémoire fut publié dans le journal *Pharmaceuticals* en mars 2022.

# Use of Early Donated COVID-19 Convalescent Plasma Is Optimal to Preserve the Integrity of Lymphatic Endothelial Cells

Nada Amri <sup>1,2,†</sup>, Rémi Bégin <sup>1,2,†</sup>, Nolwenn Tessier <sup>1,2</sup>, Laurent Vachon <sup>1,2</sup>, Louis Villeneuve <sup>2</sup>, Philippe Bégin <sup>3,4</sup>, Renée Bazin <sup>5</sup>, Lionel Loubaki <sup>5</sup> and Catherine Martel <sup>1,2,\*</sup>

**Citation:** Amri, N.; Bégin, R.; Tessier, N.; Vachon, L.; Villeneuve, L.; Bégin, P.; Bazin, R.; Loubaki, L.; Martel, C. Use of Early Donated COVID-19 Convalescent Plasma Is Optimal to Preserve the Integrity of Lymphatic Endothelial Cells. *Pharmaceuticals* **2022**, *15*, x.

<https://doi.org/10.3390/xxxxx>

Academic Editor(s): Jean Jacques Vanden Eynde

Received: 16 February 2022

Accepted: 16 March 2022

Published: date

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

<sup>1</sup> Faculty of Medicine, Université de Montréal, Pavillon Roger-Gaudry, 2900 Edouard Montpetit Blvd, Montreal, QC H3T 1J4, Canada;

<sup>2</sup> Montreal Heart Institute, 5000, Belanger Street, Montreal, QC H1T 1C8, Canada;

<sup>3</sup> Department of Pediatrics, CHU Sainte-Justine, 3175 Chem. de la Côte-Sainte-Catherine, Montreal, QC H3T 1C5, Canada;

<sup>4</sup> Department of Medicine, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, 900, rue Saint-Denis, Montreal, QC H2X 0A9, Canada

<sup>5</sup> Medical Affairs and Innovation, Héma-Québec, 1070, Avenue des Sciences-de-la-Vie, Québec, QC G1V 5C3, Canada;

\* Correspondence: [catherine.martel@icm-mhi.org](mailto:catherine.martel@icm-mhi.org); Tel.: +1-(514)-376-3330 (ext. 2977)

† These authors equally contributed to this work.

**Abstract:** (1) Background: Convalescent plasma therapy (CPT) has gained significant attention since the onset of the coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic. However, clinical trials designed to study the efficacy of CPT based on antibody concentrations were inconclusive. Lymphatic transport is at the interplay between the immune response and the resolution of inflammation from peripheral tissues, including the artery wall. As vascular complications are a key pathogenic mechanism in COVID-19, leading to inflammation and multiple organ failure, we believe that sustaining lymphatic vessel function should be considered to define optimal CPT. We herein sought to determine what specific COVID-19 convalescent plasma (CCP) characteristics should be considered to limit inflammation-driven lymphatic endothelial cells (LEC) dysfunction. (2) Methods: CCP donated 16 to 100 days after the last day of symptoms was characterized and incubated on inflammation-elicited adult human dermal LEC (aHDLEC). (3) Results: Plasma analysis revealed that late donation correlates with higher concentration of circulating pro-inflammatory cytokines. Conversely, extracellular vesicles (EVs) derived from LEC are more abundant in early donated plasma ( $r = -0.413$ ,  $p = 0.004$ ). Thus, secretion of LEC-EVs by an impaired endothelium could be an alarm signal that instigate the self-defense of peripheral lymphatic vessels against an excessive inflammation. Indeed, *in vitro* experiments suggest that CCP obtained rapidly following the onset of symptoms does not damage the aHDLEC junctions as much as late-donated plasma. (4) Conclusions: We identified a particular signature of CCP that would counteract the effects of an excessive inflammation on the lymphatic endothelium. Accordingly, an easy and efficient selection of convalescent plasma based on time of donation would be essential to promote the preservation of the lymphatic and immune system of infected patients.

**Keywords:** COVID-19; lymphatics; convalescent plasma therapy; endothelium; extracellular vesicles

## 1. Introduction

To date, an alarming number of people worldwide have been infected with severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), a coronavirus responsible for the disease commonly referred to as coronavirus disease 2019 (COVID-19) [1]. Although many individuals with COVID-19 are asymptomatic or suffer from mild symptoms, other individuals develop severe complications, such as acute respiratory distress syndrome, disseminated intravascular coagulation and cardiovascular diseases including acute coronary syndrome and myocardial infarction [2]. A common thread between these complications and causes of mortality is the presence of impaired endothelial function [3–6]. The underlying cause appears to be the prolonged overactivation of the immune system resulting in a hyperinflammatory state, also known as “cytokine storm” [4].

Early in the pandemic, COVID-19 convalescent plasma (CCP) was proposed as a potential therapeutic option for severe COVID-19. The approach consists of transfusing plasma from donors who recently recovered from the disease to hospitalized patients, and thus transfer humoral protection against the virus. The approach was very compelling, because it was readily available. Early in the pandemic, CCP was made available in the United States through the Food and Drug Administration (FDA) Expanded Access program (EAP), and later through Emergency Use Access. Initial data from the EAP suggested that passive immunization was very effective, because patients receiving CCP with high anti-COVID-19 antibody titers were 30% less likely to die from the disease than those receiving CCP with low titers [7].

The enthusiasm for CCP plummeted in winter 2021 after several major randomized clinical trials failed to show a benefit over standard of care [8–11]. The only way to reconcile a potential benefit in specific subgroups with this overall lack of effect would be if CCP was harmful in other subgroups. In fact, results from the CONCOR-1 study suggest that the previously observed relative difference in mortality with high- vs. low-titer CCP may be explained in absolute terms by a deleterious effect of CCP with low antibody titer [10]. This has important implications for the interpretation of an even more recent trial showing a benefit from CCP that used non-convalescent plasma as a control [12]. Ultimately, these results go to show how little we understand the true mechanisms underlying the immunomodulatory effect of CCP in COVID-19, which is likely not determined solely by the antibody content. This highlights the need to investigate the presence of other modulators within CCP to limit endothelial dysfunction and subsequent inflammatory complications seen in severely hospitalized patients.

Lymphatic transport is at the interplay between the immune response and the resolution of inflammation from peripheral tissues, including the artery wall [13]. Constituting initial vessels, also called lymphatic capillaries, in the peripheral tissues that drain excess interstitial fluids [14], the lymphatic system is a key player in the clearance of immune cells and pro-inflammatory modulators [15]. As vascular complications are a key pathogenic mechanism in COVID-19, leading to inflammation and multiple organ failure, we hypothesize that part of the clinical effect of CCP could derive from its effect on lymphatic vessel (LV) function. This study seeks to identify a particular signature of CCP that would decrease the effects of an excessive inflammation on the lymphatic endothelium. Following the analysis of 49 CCP donations, we observed a heterogeneous effect on adult human dermal lymphatic endothelial cells (aHDLEC) in culture. We herein demonstrate that an early donation of convalescent plasma could protect against the loss of lymphatic endothelial cells (LEC) integrity observed during inflammation.



## 2. Results

### *2.1. Characteristics of COVID-19 Convalescent Plasma Donors*

Forty-five donors were recruited in this study and their anthropometric data are presented in Table 1. The average age of the donors included in our study was 41-year-old (Table 1). Of the CCP donors, 38% were women. Half of the individuals experienced symptoms ranging from 10 to 20 days. Furthermore, CCP donation was made on average 67 days after the onset of symptoms. Since some studies suggest a correlation between blood type and COVID-19 outcomes [16], we characterized the blood type of donors. Forty percent of individuals were a blood type O, whereas 33%, 11% and 16% were of blood type A, B and AB, respectively. Of all 45 patients, only 7 had a negative rhesus. Most individuals had mild-to-moderate symptoms, whereas 1 and 7 people experienced no symptoms or severe symptoms, respectively. However, none of these donors were hospitalized. Individuals who lost their sense of smell or taste represented 44% of the donors. The optical density of the concentration of receptor-binding domain (RBD) of SARS-CoV-2 antibodies within CCP was on average 1.08 (minimum = 0.26, maximum = 2.41). Since dyslipidemia increases the risk to develop severe outcomes from the COVID-19 infection, we measured the level of total cholesterol of donors [17]. The average total cholesterol amongst donors was 188.5 mg/dL.

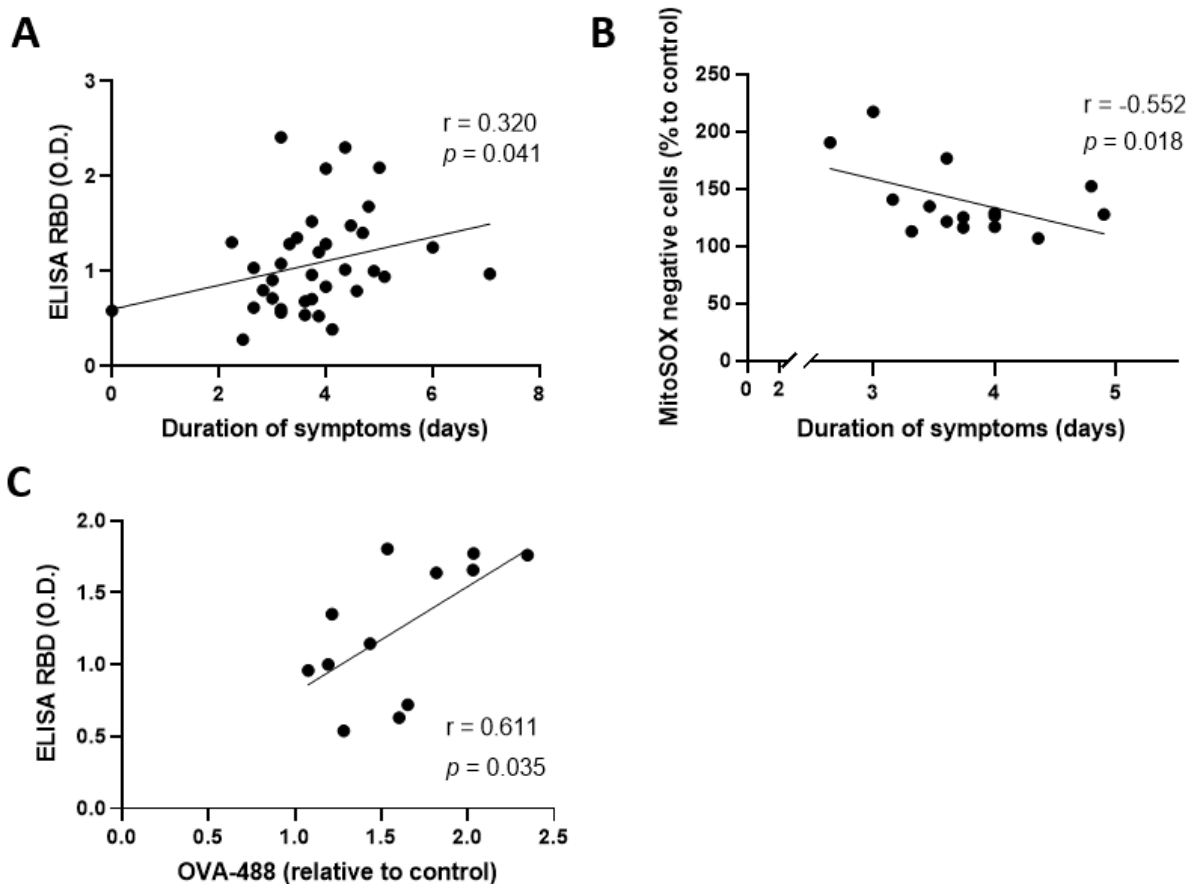
**Table 1.** Clinical parameters of donors of convalescent plasma.

<b>Variables</b>	
Age, years	41 ± 14
Female sex, <i>n</i> (%)	17 (38%)
Duration of symptoms, days (IQR)	14 (10-20)
Time of donation, days	67 ± 25
ABO Blood group, <i>n</i> (%)	
O	18 (40)
A	15 (33)
B	5 (11)
AB	7 (16)
Rhesus, <i>n</i> (%)	
Positive	38 (84)
Negative	7 (16)
Severity, <i>n</i> (%)	
Asymptomatic	1 (2)
Mild	12 (27)
Moderate	9 (20)
Severe	7 (16)
Loss of smell/taste, <i>n</i> (%)	
Yes	20 (44)
No	7 (16)
Unknown	18 (40)
O.D RBD-antibody concentrations, AU (min, max)	1.08 ± 0.54 (0.26, 2,41)
Total cholesterol, mg/dL	188.5 ± 45.1

Values are given as mean ± standard deviation, unless mentioned otherwise. Duration of symptoms is not normally distributed; its value is given as median and interquartile range (IQR). Severity was graded following a questionnaire answered by donors. O.D, optical density; RBD, receptor-binding domain; AU, arbitrary unit; Min, minimum; Max, maximum.

## *2.2. Elevated Antibody Concentrations and Prolonged Symptoms Are Detrimental for the Lymphatic Endothelium Integrity*

Several studies suggest that the effect of CCP is dependent on its antibody titers [10,18], hence the importance of proper donor selection. The concentration of antibodies is known to increase during the first week of symptoms [19]. Since our CCP donors reported experiencing symptoms for a duration ranging between 0 and 50 days, we wanted to assess whether the concentration of antibodies was associated with the duration of symptoms. Indeed, prolonged symptoms were positively correlated with an elevation of antibody concentrations contained in convalescent plasma ( $r = 0.321$ ,  $p = 0.041$ ) (Figure 1A). We then sought to investigate whether the duration of symptoms of donors was associated with an effect on a lymphatic endothelium (Figure 1B). To measure the latter, we marked aHDLEC with the MitoSOX<sup>TM</sup> Red probe following incubation of CCP to assess the production of mitochondrial superoxide, an indicator of intracellular oxidative stress. Low-to-moderate levels of mitochondrial superoxide can regulate many essential cellular processes, including gene expression and signal transduction [20]. In contrast, overproduction of mitochondrial superoxide, shown by a high expression of MitoSOX<sup>TM</sup> Red (shift toward the right on flow cytometry plots of Figure S1C,D), can trigger cellular oxidative damage that contributes to the pathogenesis of a wide variety of diseases [21]. Detection of intracellular mitochondrial superoxide is therefore of importance for understanding proper cellular redox regulation and the impact of its deregulation on lymphatic function. We found that duration of symptoms correlated negatively with MitoSOX<sup>TM</sup> Red negative cells ( $r = -0.552$ ,  $p = 0.018$ ) (Figure 1B). In other words, plasma from donors with short duration of symptoms triggered a lower oxidative response in the lymphatic endothelium than that from patients who experienced symptoms for a longer duration. This highlights a potential risk of deleterious effect of plasma from a donor with prolonged symptoms on the lymphatic endothelium of recipients. Since prolonged symptoms is also correlated with antibody concentrations, we investigated whether concentration of antibodies was also associated with a detrimental effect on the lymphatic endothelium. We observed a positive correlation between the concentration of antibodies and the permeability of the lymphatic endothelium ( $r = 0.611$ ,  $p = 0.035$ ) (Figure 1C). However, by multivariate analysis, we observed the collinearity of concentration of antibodies and the duration of symptoms, indicating that they are not independent factors. Taken together, our data suggest that both the elevated antibody concentrations and the prolonged symptoms are detrimental for the lymphatic endothelium.



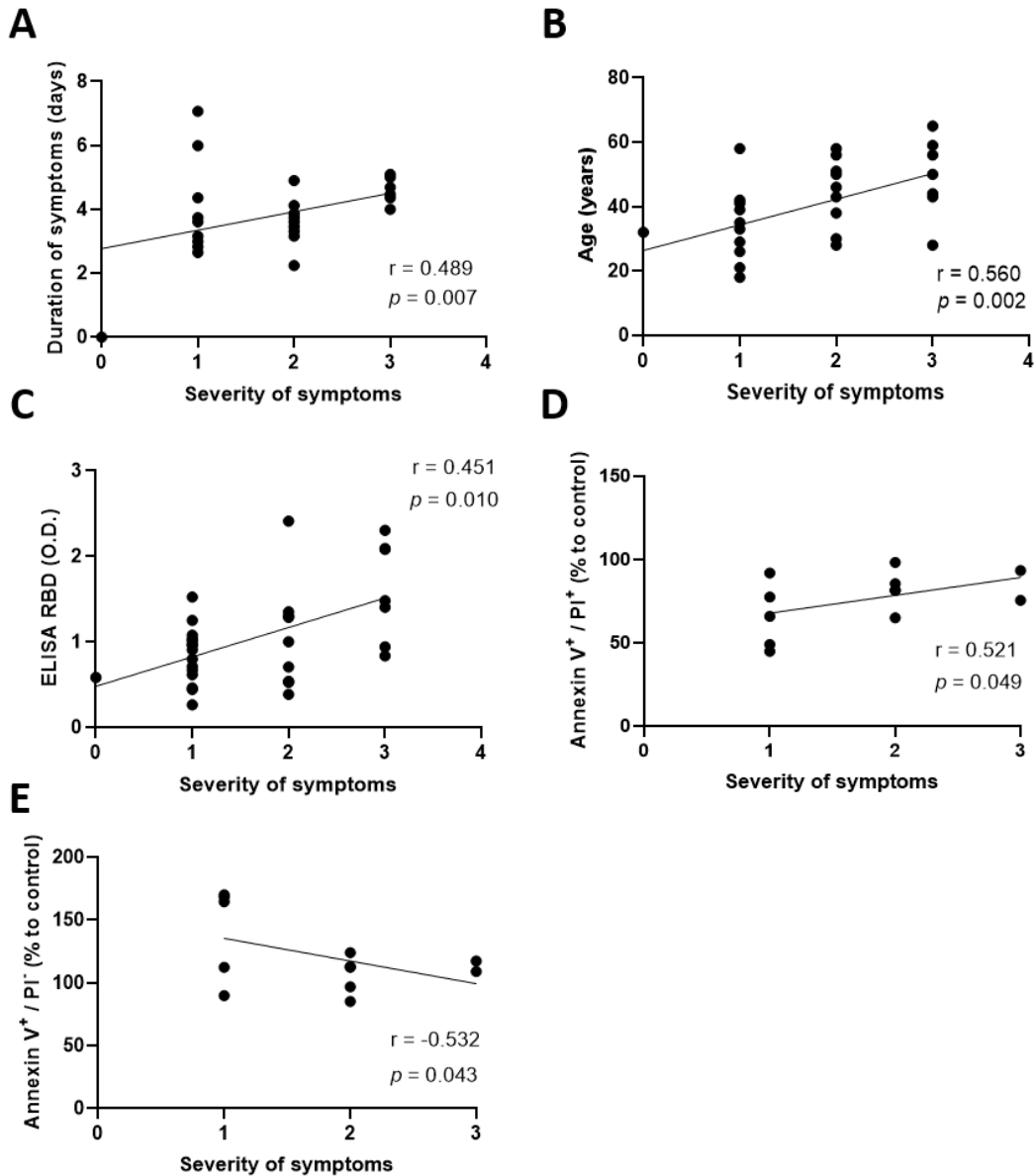
**Figure 1.** Elevated antibody concentrations and prolonged symptoms are detrimental for the lymphatic endothelium integrity. **(A)** Correlation between the duration of symptoms (square-root transformation) and the concentration of plasmatic SARS-CoV-2- receptor-binding-domain antibodies measured by ELISA. **(B)** Correlation between the duration of symptoms and MitoSOX<sup>TM</sup> Red-negative cells measured by flow cytometry after incubating aHDLEC with convalescent plasma for 4 h and cytokines cocktail for 20 h. **(C)** Correlation between the concentration of plasmatic RBD antibodies measured by ELISA and the permeability of the endothelium measured by spectrophotometry (absorbance of OVA-488) after incubating human LEC with convalescent plasma for 4 h and cytokines cocktail for 20 h. Each point represents a treatment. Significance ( $p < 0.05$ ) was determined by a Pearson correlation. A square-root transformation of the duration of symptoms to reach normal distribution was performed. RBD—receptor-binding domain; O.D—optical density; OVA—ovalbumin; aHDLEC—adult human dermal lymphatic endothelial cells.

### 2.3. COVID-19 Convalescent Plasma from Patients Experiencing Severe Symptoms Induces Cellular Necrosis

Casadevall *et al.* recommended the use of CCP from donors with severe symptoms, as they have more antibodies than donors with mild symptoms [22]. Therefore, we sought to investigate whether this other parameter, namely the severity of the symptoms, could be a potential characteristic to take into consideration for the selection of convalescent plasma based on its effect on LEC. We first reported a positive correlation between prolonged symptoms and their severity

( $r = 0.489$ ,  $p = 0.007$ ) (Figure 2A). So far, studies found that older individuals experienced more severe symptoms than younger individuals [23]. This correlation was also found in our study ( $r = 0.560$ ,  $p = 0.002$ ) (Figure 2B). Furthermore, there are higher level of antibodies within CCP of severely infected individuals [22,24,25]. Similarly, a higher concentration of antibodies was also present in the plasma of donors displaying more severe symptoms ( $r = 0.451$ ,  $p = 0.010$ ) (Figure 2C). In the multivariate model ( $r = 0.531$ ), severity of symptoms was the only variable independently associated with anti-SARS-CoV-2 antibody levels ( $\beta = 0.585$ ,  $p = 0.013$ ). In line with previous literature, the model could be further improved ( $r = 0.590$ ) by including both symptom severity ( $\beta = 0.541$ ,  $p = 0.001$ ) and delay since the onset of symptoms ( $\beta = -0.259$ ,  $p = 0.09$ ), although the latter did not reach statistical significance.

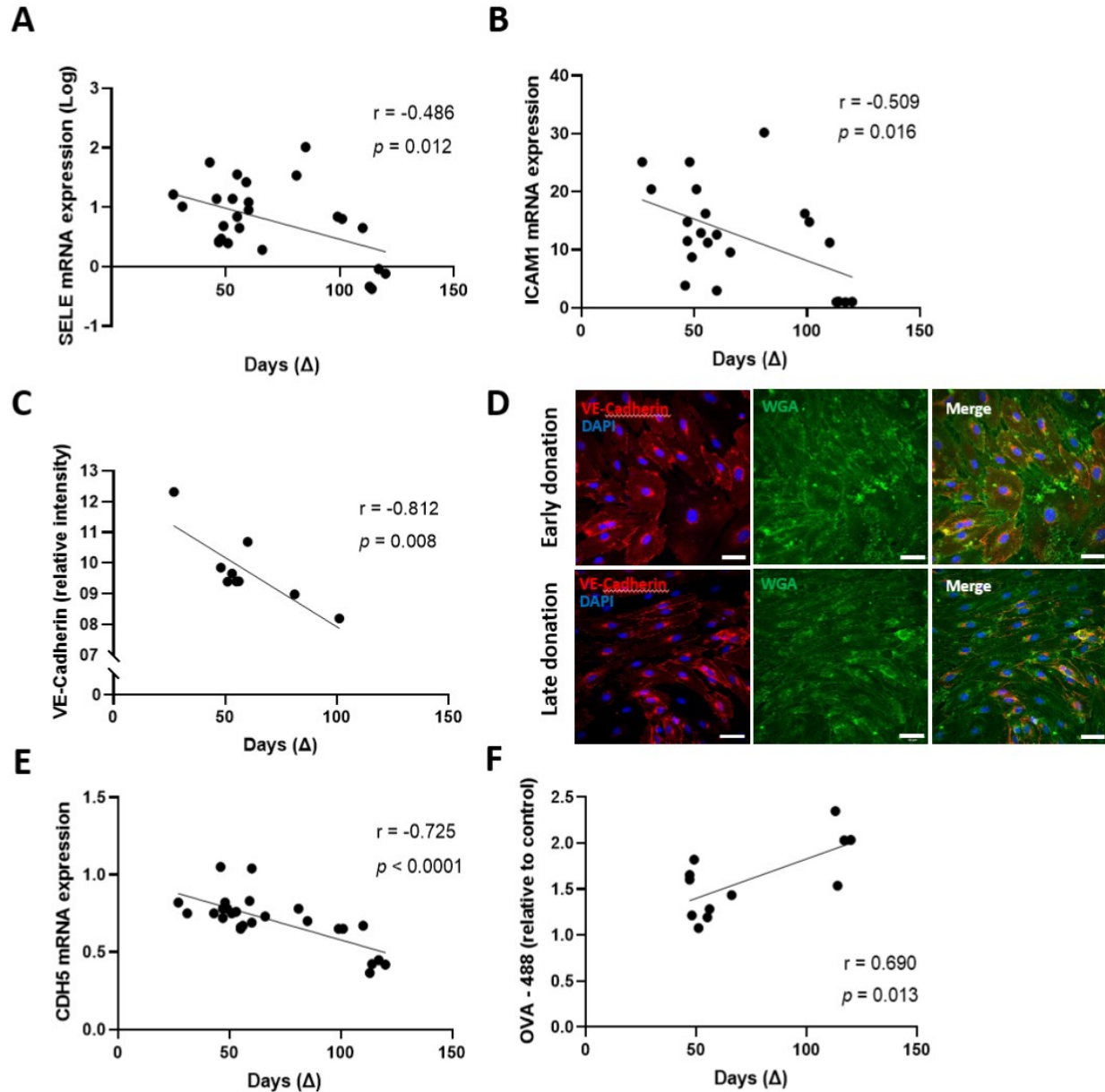
Given these results, and the detrimental effect of prolonged symptoms and higher antibody levels on the lymphatic endothelium, we sought to determine whether severe symptoms also correlated with an altered lymphatic endothelium integrity. Our results suggest that plasma isolated from patients experiencing severe symptoms is more likely to promote aHDLEC late apoptosis or necrosis ( $r = 0.521$ ,  $p = 0.049$ ) (Figure 2D) while abrogating early apoptosis ( $r = -0.532$ ,  $p = 0.043$ ) (Figure 2E). Herein, we demonstrate that while severity of the symptoms may be a good predictor of higher antibody content, it may also be associated with a plasma phenotype that could exert a deleterious effect onto the lymphatic endothelium.



**Figure 2.** The severity of symptoms correlates with the duration of symptoms, age, receptor-binding-domain antibodies of donors and cell viability of lymphatic endothelial cells. **(A)** Severity was quantified using a questionnaire answered by donors and graded as follows: asymptomatic, mild, moderate and severe. Severe symptoms were correlated with a higher duration of symptoms (square-root transformation to reach a normal distribution). **(B)** Correlations between severity of the symptoms and the age of the donors were performed. **(C)** Severity was correlated with the concentration of antibodies measured by ELISA. **(D–E)** Treated aHDLEC were labeled with Annexin V and PI and analyzed by flow cytometry. The severity of the symptoms was correlated with cells in late apoptosis/necrosis **(D)** and in early apoptosis **(E)** represented by Annexin V- and PI-positive cells and Annexin V-positive and PI-negative cells, respectively. Cells are given as percentages relative to cells treated with control plasma. Significance was determined by a Spearman correlation.  $p < 0.05$  was considered significant. RBD, receptor-binding domain; O.D, optical density; PI, propidium iodide; aHDLEC, adult human dermal lymphatic endothelial cells.

#### 2.4. An Early Donation Could Help Maintain the Integrity of the Lymphatic Endothelium

We then sought to determine whether another easily identifiable factor could be considered for a judicious selection of convalescent plasma. Antibody levels, especially IgM and IgA, decrease with time in CCP donated long after the onset of symptoms [26,27]. Thus, we sought to investigate the association between the time of donation and CCP effect on the integrity of lymphatic endothelial cells. It has been reported that lymphatic endothelial cell activation could contribute to help limit inflammatory diseases such as acute skin inflammation [28] and edema [29]. We herein observed that the expression of markers of endothelial activation correlated with cellular viability and mitosis and correlated inversely with lymphatic permeability and production of mitochondrial reactive oxygen species (ROS) (Figure S2). Given the potential benefits of endothelium activation markers on the integrity of the recipient endothelium (Figure S2), we aimed to evaluate whether the timing of convalescent plasma donation could impact the expression of endothelial cell activation markers *in vitro*. We noted a negative correlation between donation time and mRNA expression of E-selectin (*SELE*) ( $r = -0.486$ ,  $p = 0.012$ ) and of intercellular adhesion molecule 1 (*ICAM1*) ( $r = -0.509$ ,  $p = 0.016$ ) (Figure 3A,B). Given the importance of functional and impermeable lymphatic vessels for the clearance of cellular debris, interstitial fluids, and immune cells [15], we further evaluated the association between donation time and endothelium permeability. We found a strong negative correlation between the donation time frame and VE-Cadherin intensity measured by immunofluorescence ( $r = -0.812$ ,  $p = 0.008$ ) (Figure 3C). Immunofluorescence imaging represented in Figure 3D demonstrates the difference in intercellular junctions (stained by anti-VE-Cadherin antibody) between aHDLEC incubated with CCP donated 27 days after the onset of symptoms (upper panels) and CCP donated 101 days after the onset of symptoms (lower panels). VE-cadherin (*CDH5*) mRNA expression was also strongly correlated with the time of donation ( $r = -0.725$ ,  $p < 0.0001$ ) (Figure 3E). Moreover, the permeability of the lymphatic endothelium was characterized using ovalbumin diffusing through the endothelium. A large amount of ovalbumin-488 passing through depicts a highly permeable endothelium. The quantity of ovalbumin-488 diffusing through the endothelium was positively correlated to the time between the onset of symptoms and donation ( $r = 0.690$ ,  $p = 0.013$ ) (Figure 3F). Therefore, early donation should be included in the CCP-selection process given its correlation with decreased permeability, foreseeing a beneficial effect on the lymphatic endothelium integrity.



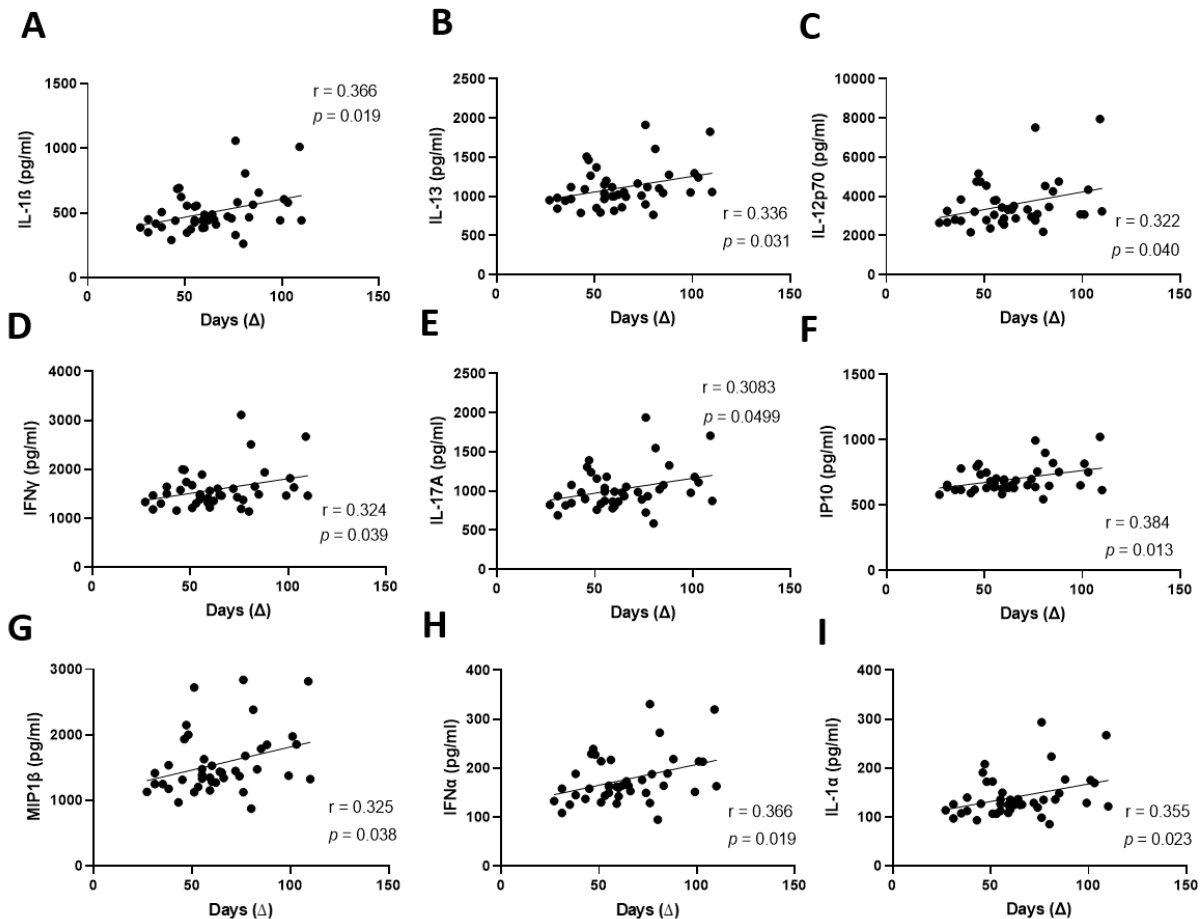
**Figure 3.** Early donation of COVID-19 convalescent plasma is a good predictor of preserved endothelial integrity. (A,B) Treated aHDLEC (convalescent plasma for 4 h and cytokines for 20 h) were harvested and the mRNA expression, measured by RT-qPCR, of *SELE* (A) and *ICAM1* (B) was correlated with the time of donation since the onset of symptoms. (C) Following treatment, cells were fixed in paraformaldehyde (PFA) 2% and incubated with anti-VE-Cadherin antibodies. The intensity of VE-Cadherin relative to cells treated with control plasma was correlated to the duration between the onset of symptoms and the donation. (D) Immunofluorescence images of treated aHDLEC incubated with CCP donated at 27 days (upper panels) and 101 days (lower panels) post onset of symptoms. The left panels show the expression of VE-Cadherin and DAPI, whereas the middle panel represents the WGA staining. The right panels show the representation of the merged staining. Scale bar = 50  $\mu$ m. (E) VE-Cadherin mRNA expression was correlated to the duration between the onset of symptoms and donation ( $\Delta$ ). (F) Endothelial permeability was analyzed by the relative concentration of ovalbumin-488 measured following migration through



the endothelium compared to control. The concentration of OVA-488 was correlated with the duration between the onset of symptoms and the donation. Significance was determined by Pearson correlation and  $p < 0.05$  was considered significant.  $\Delta$ , time of donation since onset of symptoms; *SELE*, gene coding for E-selectin; *ICAM1*, gene coding for intercellular adhesion molecule 1; WGA, wheat germ agglutinin; *CDH5*, gene coding for VE-Cadherin; OVA, ovalbumin; aHDLEC, adult human dermal lymphatic endothelial cells; CCP, COVID-19 convalescent plasma.

### 2.5. Late Donations of COVID-19 Convalescent Plasma Contain Elevated Pro-Inflammatory Cytokines Levels

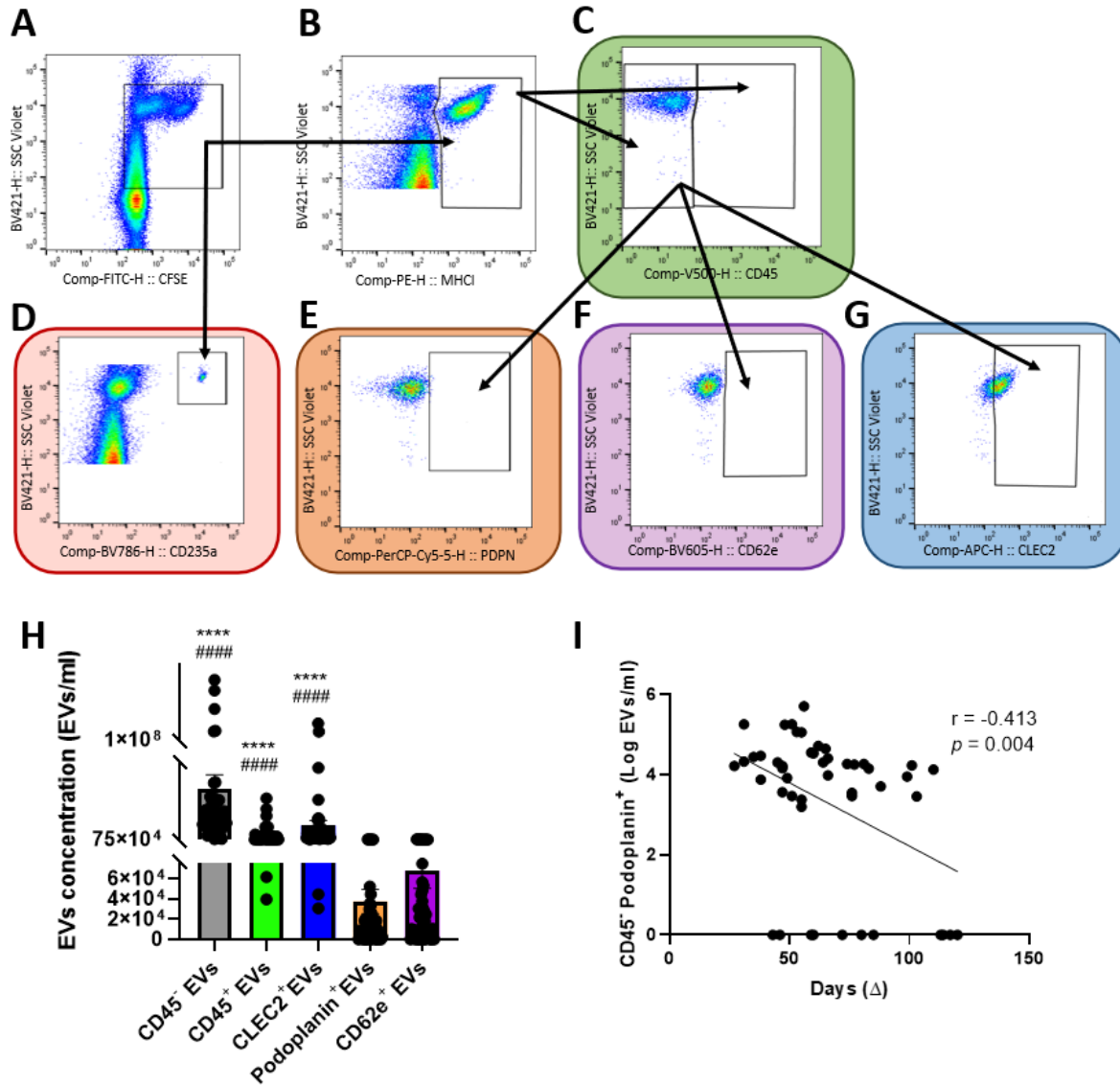
Given the association between a late donation and lymphatic endothelium dysfunction, we hypothesized that convalescent plasma donated at a later stage after the resolution of symptoms could contain more pro-inflammatory cytokines and mediators. Thus, we characterized the pro- and anti-inflammatory profile of cytokines contained in our convalescent plasma samples. We observed a positive correlation between the time of donation and the levels of pro-inflammatory mediators interleukin 1-beta (IL-1 $\beta$ ), IL-13, IL-12p70, interferon gamma (IFN $\gamma$ ), IL-17A, interferon gamma-induced protein 10 (IP-10), macrophage inflammatory protein-1 (MIP-1), IFN $\alpha$  and IL-1 $\alpha$  (Figure 4A–I). We noted previously a decrease in endothelial activation following a treatment with convalescent plasma donated in a later stage (Figure 3A,B). Since pro-inflammatory cytokines are increased in late donated plasma, we sought to investigate whether this decrease could be due to another marker contained in convalescent plasma, namely extracellular vesicles (EVs).



**Figure 4.** Late donation correlates with higher concentration of circulating pro-inflammatory cytokines. (A–I). Concentration of pro-inflammatory cytokines and mediators contained in the convalescent plasma was analyzed using a Multiplex kit. The duration between onset of symptoms and donation ( $\Delta$ ) was correlated to interleukin 1 beta (IL-1 $\beta$ ) (A), IL-13 (B), IL-12 p70 (C), interferon gamma (IFN $\gamma$ ) (D), IL17A (E), IP-10 (F), MIP1 (G), IFN $\alpha$  (H) and IL-1 $\alpha$  (I). Significance was determined by a Pearson correlation and  $p < 0.05$  was considered significant.  $\Delta$ , time of donation since onset of symptoms. IL, interleukin; IFN, interferon; IP10, interferon gamma-induced protein 10; MIP1, macrophage inflammatory protein 1.

#### *2.6. Extracellular Vesicles Derived from Human Lymphatic Endothelial Cells Are More Abundant in Early Donated Plasma*

EVs are small vesicles released from apoptotic or activated cells. They contain proteins, lipids, and mRNAs also present in their cell of origin. They are also used as prognostic markers for several pro-inflammatory diseases [30]. In our study, we characterized the presence of EVs derived from red blood cells (CD235a<sup>+</sup>), total leucocytes (CD45<sup>+</sup>), LEC (CD45<sup>-</sup> podoplanin<sup>+</sup>), blood endothelial cells (CD45<sup>-</sup> CD62e<sup>+</sup>) and platelets (CD45<sup>-</sup>, C-type lectin-like type II + (CLEC2<sup>+</sup>)) in the plasma of COVID-19 convalescent donors (Figure 5A–G). We observed low concentrations of CD45<sup>-</sup> podoplanin<sup>+</sup> EVs compared to the rest of the EVs population quantified (Figure 5H). Interestingly, CD45<sup>-</sup> podoplanin<sup>+</sup> EVs correlated with the time of donation ( $r = -0.413$ ,  $p = 0.004$ ) (Figure 5I), whereas other EVs population did not (Figure S3A–D). In multivariate analysis, concentration of total EVs (CFSE<sup>+</sup>) ( $\beta = 0.350$ ,  $p = 0.011$ ) and delay since symptoms onset ( $\beta = -0.317$ ,  $p = 0.020$ ) were independent predictors of the concentration of CD45<sup>-</sup> podoplanin<sup>+</sup> EVs in convalescent plasma. We herein demonstrate that although CD45<sup>-</sup> podoplanin<sup>+</sup> EVs represents a minority of EVs in CCP, they are the only population to correlate with the time of donation, a characteristic believed to be beneficial for the lymphatic endothelium.



**Figure 5.** Characterization of extracellular vesicles and correlation with duration between onset of symptoms and donation. (A–G) EVs gating strategy (side scatter) for CFSE<sup>+</sup> EVs (A), MHCI<sup>+</sup> EVs (B), CD45<sup>+</sup> EVs (C), CD235<sup>+</sup> EVs (D), CD45<sup>-</sup> podoplanin<sup>+</sup> EVs (E), CD62e<sup>+</sup> EVs (F) and CLEC2<sup>+</sup> EVs (G). (H) Concentration of EVs in CCP measured by flow cytometry. Kruskal–Wallis test with a Dunn post hoc test was performed. (I) Concentration of CD45<sup>-</sup> podoplanin<sup>+</sup> EVs in convalescent plasma and correlation with the duration between the onset of symptoms and the donation. Significance was determined by a Pearson correlation after a logarithmic transformation of CD45<sup>-</sup> podoplanin<sup>+</sup> EVs concentration to reach a normal distribution.  $p < 0.05$  was considered significant. \*\*\*\* $p < 0.0001$  significantly different from podoplanin<sup>+</sup> EVs. ##### $p < 0.00001$  significantly different from CD62e<sup>+</sup> EVs. EVs, extracellular vesicles; CCP, COVID-19 convalescent plasma; CFSE, carboxyfluorescein succinimidyl ester; MHCI, major histocompatibility complex I; PDPN, podoplanin; CLEC2, C-type lectin-like type II;  $\Delta$ , time of donation since onset of symptoms.

## 2.7. Elevated Plasma Extracellular Vesicles Derived from Human Lymphatic Endothelial Cells Correlates with Enhanced Lymphatic Endothelium Integrity

Extracellular vesicles are abundant in lymph [31]. Since plasma ultrafiltrates are collected by the lymphatic system after escaping from the bloodstream, we envision that EVs could easily access the lymphatic circulation along with proteins, cells debris and other macromolecules [30,31]. Since LEC-EVs are more abundant in early donated convalescent plasma, we wanted to explore the relation between EVs characterized in the plasma and lymphatic endothelium integrity (Table 2). First, we observed a positive correlation between CD45<sup>-</sup> podoplanin<sup>+</sup> EVs and increased early apoptosis as well as decreased permeability, both markers of preservation of the integrity of lymphatic endothelial cells. Furthermore, unlike CD235a<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup> and CD45<sup>-</sup> CLEC2<sup>+</sup> EVs (i.e., red blood cells, leucocytes and platelets EVs, respectively), CD45<sup>-</sup> podoplanin<sup>+</sup> levels are positively correlated to the expression markers of the activation of LEC such as *ICAM1* and vascular endothelial growth factor receptor 3 (VEGFR-3). Indeed, we observed a correlation between VEGFR-3 expression and markers of endothelial integrity (Figure S4). Specifically, *FLT4* expression was associated with decreased endothelial permeability (Figure S4A), increased podoplanin (*PDPN*) expression (Figure S4B) and decreased percentage of MitoSOX<sup>TM</sup> Red-positive cells (Figure S4C,D).

To distinguish the confounding effects of donation delay since symptoms, antibody titers, tested cytokines and LEC-EVs on lymphatic endothelial function, we performed multiple linear regression. LEC-EVs was the only variable to be independently associated with ICAM-1 ( $\beta = 0.776, p = 0.001$ ) and VEGFR expression ( $\beta = 0.450, p = 0.040$ ), as well as with LEC necrosis-to-apoptosis ratio ( $\beta = -0.469, p = 0.010$ ), MitoSOX<sup>TM</sup> Red-positivity ratio ( $\beta = -0.589, p = 0.020$ ) and LEC permeability ( $\beta = -0.813, p = 0.001$ ). Thus, the abundance of LEC-EVs in the plasma of convalescent donors could be a useful marker indicating that CCP promotes favorable lymphatic function with incubation.

**Table 2.** Correlation between extracellular vesicles and lymphatic endothelial cell markers.

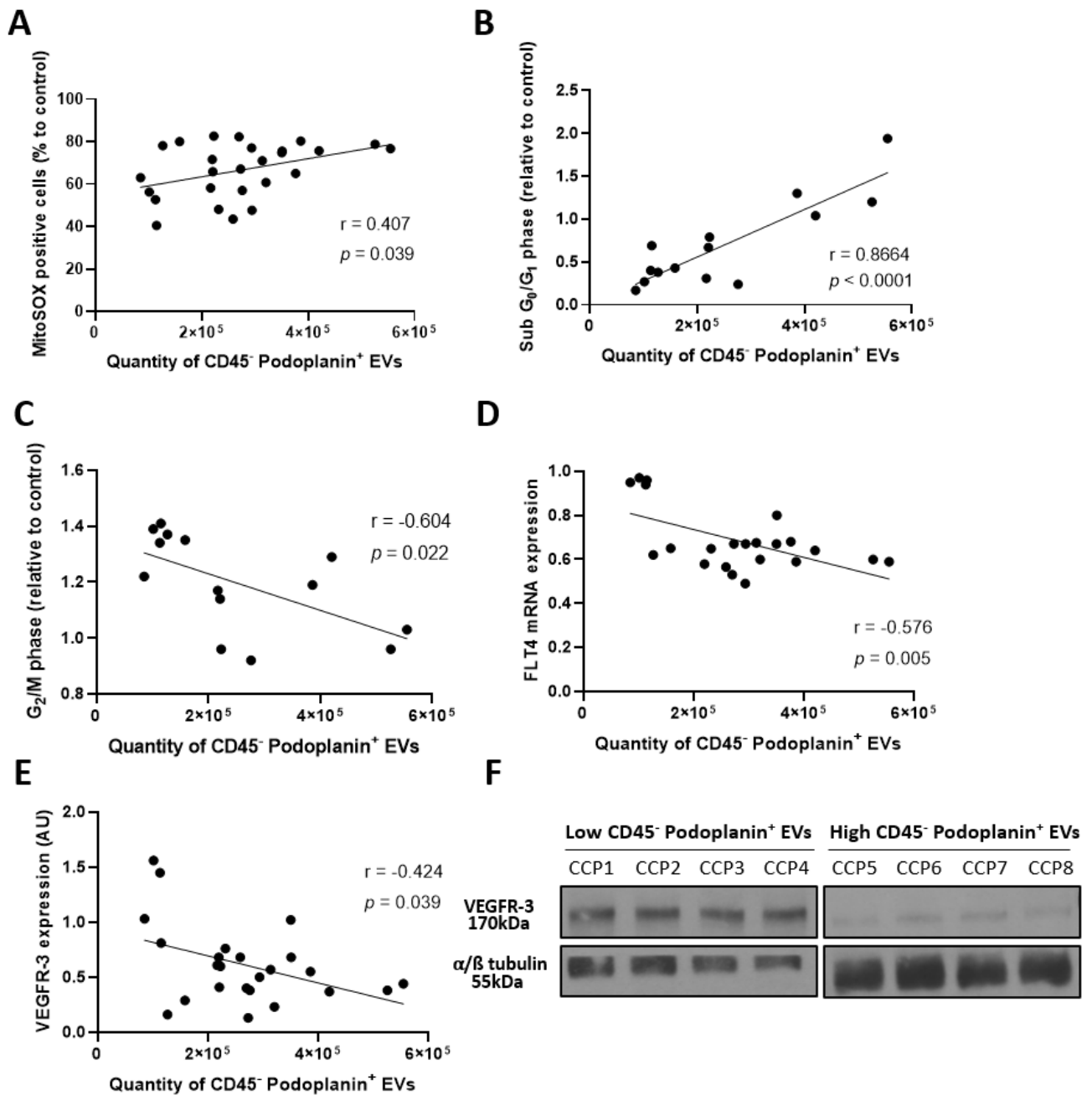
	CD235a <sup>+</sup> (EVs/mL)		CD45 <sup>+</sup> (EVs/mL)		CD45 <sup>-</sup> CLEC2 <sup>+</sup> (EVs/mL)		CD45 <sup>-</sup> Podoplanin <sup>+</sup> (EVs/mL)	
	Pearson (r)	p Value	Pearson (r)	p Value	Pearson (r)	p Value	Spearman (r)	p Value
Early apoptosis	-0.026	0.899	0.464	0.017 *	0.158	0.439	0.561	0.003 **
Permeability	0.019	0.954	-0.596	0.041 *	-0.103	0.749	-0.836	0.0007 ***
<i>FLT4</i> mRNA	0.322	0.144	0.078	0.729	0.292	0.187	0.616	0.002 **
<i>ICAM1</i> mRNA	0.009	0.970	0.300	0.174	-0.185	0.409	0.689	0.0004 ***

CD235a<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup> and CD45<sup>-</sup> CLEC2<sup>+</sup> EVs were transformed using a logarithmic transformation to reach normal distribution. CD45<sup>-</sup> podoplanin<sup>+</sup> EVs did not reach a normal distribution despite logarithmic transformation. Early apoptosis determined by cells positive for Annexin V and negative for propidium iodide (PI)-normalized cells treated with control plasma. Permeability was measured by ovalbumin-488 diffusing through aHDLEC following the transwell assay. Correlations of Pearson (for CD235a<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup> and CD45<sup>-</sup> CLEC2<sup>+</sup> EVs) and Spearman (for CD45<sup>-</sup> podoplanin<sup>+</sup> EVs) were used. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ . EVs, extracellular vesicles; CLEC2, C-type lectin-like type II; *FLT4*, gene coding for vascular endothelial growth factor

receptor 3; *ICAM1*, gene coding for intercellular adhesion molecule 1; aHDLEC, adult human dermal lymphatic endothelial cells.

### *2.8. Secretion of Extracellular Vesicles Derived from Human Lymphatic Endothelial Cells Reflects an Alteration of the Lymphatic Endothelium*

EVs production occurs during apoptosis or cell activation. We sought to determine the quantity of EVs secreted by the lymphatic endothelium in culture following CCP treatment. We quantified CD45<sup>-</sup> podoplanin<sup>+</sup> EVs collected in the supernatant post-treatment by subtracting the quantity measured in the plasma. As expected, we noted an association between human LEC-derived EVs secretion and increased percentage of cells positive for MitoSOX<sup>TM</sup> Red ( $r = 0.407$ ,  $p = 0.039$ ) and cells in the sub G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase of the cell cycle ( $r = 0.8664$ ,  $p < 0.0001$ ) (Figure 6A,B). Cells in the sub-G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase of the cell cycle are known to be apoptotic cells [32]. Likewise, the quantity of LEC-EVs was correlated with a decrease in cells in the G<sub>2</sub>/M phase ( $r = -0.604$ ,  $p = 0.022$ ) (Figure 6C), which represents active mitosis [33]. Since the expression of VEGFR-3 is associated with the preservation of the integrity of the lymphatic endothelium [28,29,34], we sought to investigate whether LEC-EVs could also be correlated to its expression. Following a quantification of VEGFR-3 expression upon aHDLEC, we found a negative correlation between its expression and the quantity of CD45<sup>-</sup> podoplanin<sup>+</sup> EVs contained in the supernatant by RT-qPCR ( $r = -0.576$ ,  $p = 0.005$ ) and immunoblot ( $r = -0.424$ ,  $p = 0.039$ ) (Figure 6D–F). Thus, EVs released by the lymphatic endothelium is related to impaired lymphatic endothelium integrity.



**Figure 6.** Secretion of lymphatic endothelial cells derived extracellular vesicles is a marker of impaired integrity. (A) Treated aHDLEC (convalescent plasma for 4 h and cytokines for 20 h) labeled by the MitoSOX<sup>TM</sup> Red probe and correlated with the quantity of EVs shed by the lymphatic endothelial cells. (B,C) Cells in sub-G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> (B) and G<sub>2</sub>/M (C) phases of the cell cycle, determined by cell cycle analysis using PI, were correlated to the quantity of EVs secreted by the lymphatic endothelium. (D,E). Treated aHDLEC were harvested and expression of *FLT4* was assessed by RT-qPCR (D) and immunoblot (E) followed by a normalization onto the expression of *ACTB* or  $\alpha/\beta$  tubulin, respectively. The measured expression of VEGFR-3 was then correlated with the quantity of EVs secreted by the endothelium. (F) Immunoblot analysis for VEGFR-3 and

the loading control  $\alpha/\beta$  tubulin. The left panel represents aHDLEC secreting low quantities of CD45<sup>-</sup> podoplanin<sup>+</sup> EVs (less than 120,000 EVs) following incubation with CCP, and the right represents aHDLEC secreting high quantities of CD45<sup>-</sup> podoplanin<sup>+</sup> EVs (more than 380,000 EVs). Significance was determined by a Pearson correlation and  $p < 0.05$  was considered significant. EVs, extracellular vesicles; PI, propidium iodide; CCP, COVID-19 convalescent plasma; VEGFR-3, vascular endothelial growth factor receptor 3; FLT4, gene coding for VEGFR-3; aHDLEC, adult human dermal lymphatic endothelial cells; AU, arbitrary unit.

### 3. Discussion

The COVID-19 pandemic is affecting an exponentially growing number of people and is still a high-risk disease [1]. Endothelial damage following cytokine storm is experienced by severely infected patients [3–5]. Given the impact of a dysfunctional lymphatic system on the evolution of the severity of inflammatory diseases [35,36], treatments should ideally take into consideration the effect on the lymphatic network. Convalescent plasma therapy has been used in various contexts, including for SARS-CoV-1 [37,38], Ebola virus [39] and Lassa fever [40], among others. The safety and efficacy of CCP therapy were also tested by several clinical trials, as summarized in a published review [11]. Most of these studies confirmed the safety of that procedure. However, the efficacy of this treatment to reduce mortality was mitigated. In particular, the CONCOR-1 study, an international randomized controlled trial, aimed to assess the efficacy of this therapy using mortality and intubation of patients at day 30 as the primary endpoint [10]. The trial, and others as reviewed elsewhere [18], selected the CCP based on the titer of anti-SARS-CoV-2 antibodies to ultimately transfuse it to infected patients [10]. Ultimately, this study failed to show the superiority of CCP over standard of care and even raised the possibility of harmful effects in plasma with low antibody content [10]. The mechanism by which plasma could have a deleterious effect on COVID-19 is unclear. It may be that the strategy of selection of plasma to be injected in ill individuals needs to be optimized based on physiological parameters other than the anti-SARS-CoV-2 antibodies. In fact, CCP with low antibody titers are more likely to have been collected later after the onset of symptoms and therefore to contain less LEC-EVs, which could be a confounding factor. The lymphatic system is a key player in the clearance of immune cells and pro-inflammatory modulators [15]. As vascular complications are a key pathogenic mechanism in COVID-19, leading to inflammation and multiple organ failure, we believe that sustaining lymphatic vessel function should be a factor to be considered to define optimal convalescent plasma therapy. In this study, we identified a particular signature of CCP that would counteract the effects of an excessive inflammation on the lymphatic endothelium. We herein demonstrate that an early donation of convalescent plasma correlates with more plasma LEC-EVs and could protect against the loss of LEC integrity observed during inflammation.

We first assessed the association between the antibody concentrations and clinical parameters, since level of antibodies is the most used CCP selection parameter for clinical trials [10,18]. We observed that patients experiencing a longer duration of symptoms have more anti-SARS-CoV-2 antibodies. Multivariate analysis suggested this may be because these patients also experienced more severe symptoms, which are known to correlate with higher antibody concentration. We did however observe an independent trend for decreased antibody concentration over time since symptoms onset, which is in line with the literature. We then found that aHDLEC exposed to late donations of CCP expressed increased mitochondrial ROS production and lymphatic endothelium permeability, which could potentially be harmful. Increased ROS production is harmful for cells, as it can lead to oxidative stress and cell death [20,21]. Furthermore, one of the key roles of the lymphatic system is to drain the excess fluids of the interstitial tissues, containing cellular debris, immune cells and pro-inflammatory mediators [15]. A disrupted lymphatic endothelium would impair the clearance of interstitial fluids and promote the accumulation of immune cells and pro-inflammatory mediators, which may lead to organ failure [15,41].

In line with studies assessing the correlation between the severity of the disease and benefits of CPT [22,24], we observed that patients experiencing stronger symptoms have more anti-SARS-CoV-2 antibodies, are older and have a longer duration of illness. We also observed that severe symptoms experienced by donors were correlated with more necrosis and less early apoptosis of aHDLEC. Early apoptosis is a defense mechanism initiated by cells to avoid or limit cellular



damage [42]. It is also responsible for promoting cell death without causing further inflammation and damage [43]. This is not the case with necrosis, as it induces greater inflammation, proven to be harmful to cells surrounding the dead cell [44]. This inflammation could be driven by the pro-inflammatory mediators contained in the severe CCP. Indeed, Rauch *et al.* demonstrated endotheliopathy induced by plasma from critically ill patients and noticed cytotoxicity as soon as one hour after the incubation on endothelial pulmonary cells [4]. The observed cytotoxicity was due to biomarkers or the inflammation reaction *per se*. In light of these results, selection of CCP based on the severity of symptoms experienced by donors may be questionable, since it is shown to be detrimental for the lymphatic endothelium by promoting necrosis. Further, in multiple studies, including ours, the severity of symptoms was assessed by donors using a self-questionnaire, which may introduce a bias in this parameter. Being aware of this limitation, this parameter is deemed unreliable to be taken into consideration for convalescent plasma selection.

Several clinical trials studied the time of administration of CCP to optimize remission [18,22,45]. The study by Beaudoin-Bussi eres *et al.* also proposed that early donation should be favored compared to late donation, given the decrease in anti-SARS-CoV-2 antibodies over time [26]. However, a recent study highlighted the lack of efficacy of the early administration of CCP to high-risk patients since it did not prevent the progression of the disease [46]. Given the mitigated opinion upon the efficacy of an early administration of CCP, we hypothesized that the timeframe of selection of CCP, not the time when it is given to patients, should be considered. We observed that early donation correlated with an activation of the lymphatic endothelium, previously found to be essential for rapid migration of T cells to draining lymph nodes, an important mechanism for the resolution of infectious diseases [47]. Furthermore, in this study, an early donation of CCP was also correlated with a preservation of LEC junctions. An adequate permeability of initial lymphatics is crucial for tissue homeostasis and lymphatic function [48]. Increased permeability could promote lymphatic dysfunction and lead to inflammation and edema [48]. In the study by Cromer *et al.*, they show an increased lymphatic permeability, characterized by a decrease in VE-cadherin expression, following a cytokine treatment [48]. Another study confirmed the importance of VE-cadherin expression in lymphatic permeability, as the inhibition of VE-cadherin led to increased permeability [49]. Thus, the decreased permeability of aHDLEC observed in our study suggests a beneficial impact of early donated CCP administration. Another study identified the need to focus on the donation window and highlighted a 60-day post onset of symptoms period for high-titer anti-spike protein CCP [50]. Herein, we describe an additional potential reason to select plasma early following the resolution of symptoms. In this regard, clinical trials may need to consider timing of plasma collection independently of antibody titer since plasma collected late after disease resolution could still be associated with LEC injury despite having high antibody titers.

Bonny *et al.* quantified cytokine and chemokine levels in CCP and demonstrated higher levels of IFN $\gamma$ , IL-10, IL-15, IL-21, and MCP-1 compared to plasma of healthy donors [51]. Since the late-donated CCP appears to be more detrimental for the endothelium, we hypothesized that a late donation of CCP would contain more pro-inflammatory mediators than an early donated CCP. We quantified cytokines contained in the convalescent plasma and correlated their levels with the time of donation. A late donation was correlated with higher pro-inflammatory cytokines levels, which could explain the detrimental impact observed on the lymphatic endothelium.

EVs are shown to be able to modulate and regulate the activation of the endothelium by increasing the expression of ICAM-1 [52]. Additionally, Rosell *et al.* reports that patients infected with COVID-19 have elevated circulating EVs tissue factor activity which is associated with

severity of the disease [53]. Krishnamachary *et al.* also found correlations between severity of the disease and EVs-associated proteins as well as EVs-mediated endothelial apoptosis [54]. EVs can also serve as decoys for neutralizing antibodies and modulate immunity [55]. A review article from Askenase focuses on the involvement of exosomes in convalescent plasma for COVID-19 therapy [56]. Thus, we characterized the EVs population contained in the plasma, focusing on EVs derived from total leucocytes, platelets, erythrocytes as well as blood and lymphatic endothelial cells. In this study, we highlighted an elevated concentration of CD45<sup>-</sup> podoplanin<sup>+</sup> EVs (i.e., LEC-EVs) in early donated plasma, whereas EVs levels from leucocytes, blood endothelial cells, platelets and erythrocytes remained unchanged depending on the time of donation.

We then sought to determine the reason why LEC-EVs are more abundant in early donated plasma. We investigated the impact of LEC-EVs contained in the plasma on a lymphatic endothelium. LEC-EVs correlated with an increase in early apoptosis, but most importantly, a decrease in lymphatic endothelium permeability, as indicated by less ovalbumin diffusing through the endothelium. In several studies, EVs were identified as being used as defense mechanisms for sending alarm signals to target cells [57,58]. They are also present in lymph [31] and can transport microRNA, lipids, proteins and growth factors, among others, and be internalized by lymphatic endothelial cells [30]. EVs can release their content and modify the cellular metabolism and function of targeted cells [57]. In our study, cells incubated with plasma containing high levels of LEC-EVs expressed higher levels of *FLT4* and *ICAM1*, demonstrating a lymphatic endothelium activation following incubation of LEC-EVs-rich CCP.

Given the beneficial impact observed of LEC-EVs contained in the plasma on aHDLEC in culture, we hypothesized that these EVs were secreted by the dysfunctional and ill lymphatic endothelial cells of the donors in the attempt to preserve the surrounding lymphatic cells. To validate this, we examined the state of aHDLEC and correlated their condition to the quantity of EVs secreted in culture. The results observed seemed to corroborate our assumptions. Indeed, aHDLEC in culture secreting the highest amount of EVs were those approaching an inflammatory and apoptotic state, as characterized, respectively, by an increase in mitochondrial ROS production and a sub-G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phenotype of the cell cycle. Finally, aHDLEC secreting the most amount of EVs were associated with less expression of VEGFR-3, emphasizing the altered state of the lymphatic endothelium. Indeed, in pro-inflammatory conditions, VEGFR-3 is deemed beneficial by promoting lymphangiogenesis and increasing lymphatic contraction capacity, thus limiting inflammation [13,28,29,34,59].

## 4. Materials and Methods

### 4.1. Collection of COVID-19 Convalescent Plasma

Plasma from 45 convalescent donors was collected by apheresis [10]. Donors were required to have resolution of symptoms at least 14 days prior to donation and to have been confirmed positive for COVID-19 by PCR testing. The severity of the symptoms was obtained through a questionnaire filled by donors (appended document). Eligible men or women donors (women with no history of pregnancy) gave consent for a plasma donation of 500–700 mL, which was separated into aliquots and frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$ . The collection and distribution of the samples was performed and administered by Héma-Québec, an organization that collaborates with several teams studying convalescent plasma, including the team responsible for the pan-Canadian clinical study CONCOR-1. The research project was approved by the Montreal Heart Institute Ethics Committee (protocol #2021-2812) and Héma-Québec (protocol #2020-004) and in accordance with the Declaration of Helsinki.

### 4.2. Cell Culture

Primary adult human dermal lymphatic endothelial cells (aHDLEC, PromoCell, cat. C-12217) were used in this study and called adult human lymphatic endothelial cells (aHDLEC) throughout the manuscript. The cells were cultured with EGM-MV-2 (supplemented by FCS-25, hEGF-2.5, HC-100, VEGF-0.25, hbFGF-5, R3 IGF-1, AA-500) complete culture medium (PromoCell, cat. C-39221). Heparin (Stemcell Technologies, cat. 07980) at a final concentration of  $8\ \mu\text{g/mL}$  was added to basal medium EBM-MV-2 (PromoCell, cat. C-22221) (depleted of fetal bovine serum (FBS) or growth factors) to prevent clotting of the CCP. Antibiotics (Penicillin-Streptomycin, ThermoFisher Scientific, Waltham, USA, cat. 15140148) at a final concentration of 1%, to ensure inhibition of bacterial growth, were also added to the medium. The cells were used at a passage between 4 and 6, when a confluence of at least 80% was reached. The experimental design of this study is illustrated in Figure S5. Adult HDLEC were treated with 10% convalescent plasma or control plasma for 4 h in EBM-MV-2 and heparin. The control plasma was a commercial human plasma depleted of fibrinogen and treated according to FDA recommendations (SeraCon™ II Negative Diluent) and free of any pathogens, including SARS-CoV-2. To mimic the cytokine storm observed in individuals infected with SARS-CoV-2, we added interleukin 6 (IL-6) (PeproTech, cat. 10778-280), tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ) (R&D Systems, cat. 210-TA-10), and interferon gamma (IFN $\gamma$ ) (PeproTech, cat. 10773-476) at final concentrations of 20 ng/mL, 20 ng/mL, and 10 ng/mL, respectively for 20 h. Two additional controls were used in the experiments. The first was an inflamed control, to which cells were incubated with basal medium for 4 h, followed by the cytokines for 20 h. The second one was a healthy control to which the cells were incubated with complete medium for 24 h.

### 4.3. Production of Reactive Oxygen Species

For detection of mitochondrial ROS production, aHDLEC in 6-well plates following treatment ( $n = 26$ ) were detached with accutase (Sigma, cat. A6964), centrifuged and transferred to a 96-well plate (Sarstedt, cat. 82.1583). Following centrifugation, aHDLEC were labeled with MitoSOX™ Red probe for 30 min at  $37^{\circ}\text{C}$ . All samples were analyzed on a flow cytometer (BD FACSCelesta™). The results obtained were analyzed using FlowJo™ version 10 software (Tree star). The gating strategy is shown in Figure S1A–C. Information on the MitoSOX™ Red probe is described in Table S1. Hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , Sigma, cat. H1009) at 1 mM was used as a

positive control for the experiment (Figure S1D). All CCP data were normalized to the control plasma.

#### *4.4. Measurement of Cell Viability*

For the measurement of cell viability, treated aHDLEC ( $n = 26$ ) were centrifuged, resuspended in cold Annexin V buffer 1X (BD BioSciences, cat. 5-66121E) and transferred to a 96-well plate. Following centrifugation, cells were labeled with Annexin V and propidium iodide (PI) for 15 min at room temperature (RT) and cold Annexin V buffer 1X was added. All samples were analyzed in flow cytometry (BD FACSCelesta™). The results obtained were analyzed using FlowJo™ version 10 software. The gating strategy is shown in Figure S1. Information on Annexin V and PI is described in Table S1. Staurosporine (Cayman, cat. 81590) at 1  $\mu$ M was used as a positive control for apoptosis in the experiment (Figure S1H). All data were normalized to the control plasma.

#### *4.5. Assessment of Cell-Cycle Distribution*

Adult HDLEC were fixed in cold 70% ethanol, washed and stained with a propidium iodide (PI) solution (Biotium cat. #40017), which is fluorogenic and binds to nucleic acids in a stoichiometric manner to allow for the assessment of the proportion of cells in each phase of the cell cycle (pre-replicative ( $G_0/G_1$ ), replicative (S) and post-replicative and mitotic cells ( $G_2/M$ )) [60]. The results obtained were analyzed using ModFit LT™ version 5.0 software (Verity Software House, Topsham, USA). All CCP data ( $n = 14$ ) were normalized to the control plasma. Information about the PI solution is described in Table S1.

#### *4.6. Quantification of Receptor-Binding-Domain Antibodies*

Antibodies within convalescent plasma were determined by human anti-SARS-CoV-2 S RBD ELISA as previously described [61]. Briefly, recombinant SARS-CoV-2 S RBD protein was prepared [26] and adsorbed (2.5  $\mu$ g/mL) to plates (Immulon 2 HB, ThermoFisher Scientific) overnight at 4 °C. Coated wells were blocked with a buffer (phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.1% Tween 20 and 2% BSA) for 1 h at RT. Diluted plasma (1/100) was incubated with the RBD-coated wells for 1 h at RT followed by an incubation with anti-human polyvalent IgA + IgG + IgM (H + L) conjugated to horseradish peroxidase (HRP) (diluted in blocking buffer) for 1 h at RT. The activity of HRP enzyme was assessed following the addition of 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB, ESBE Scientific, Saint Laurent, Canada). The colorimetric reaction proceeded for 20 min at RT and was stopped by addition of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N (ThermoFisher Scientific). The plates were then read within 30 min at 450 nm using a Synergy H1 microplate reader (BioTek).

#### *4.7. Quantification of Plasma Cytokines*

Pro- and anti-inflammatory mediators within 41 convalescent plasmas were quantified according to the manufacturer's protocol (Inflammation 20-plex Human ProcartaPlex Panel, ThermoFisher Scientific, cat. EPX200-12185-901).

#### *4.8. Analyses of Extracellular Vesicles in Plasma and Lymphatic Endothelial Cell Supernatant*

For the staining of EVs in plasma ( $n = 48$ ), 10  $\mu$ L of CCP or control plasma were added to 90  $\mu$ L of Annexin V buffer 1X (BD BioSciences, cat. 5-66121E) supplemented with 10  $\mu$ M D-

phenylalanyl-L-prolyl-L-arginine chloromethyl ketone (PPACK) (Cayman, cat. 15160-1). The antibody mix including carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) to establish the presence of active esterases and antibodies binding major histocompatibility complex 1 (MHC-I), CD235a, CD45, C-type lectin-like type II (CLEC2), CD62e, and podoplanin with the concentrations described in Table S1 was then performed in Annexin V buffer 1X and filtered through a column (Millipore, cat. UFC500396) centrifuged at 10,000g for 1 min, and 100  $\mu$ L of the antibody mix was added to the plasma [62].

Stained EVs in CCP and in the supernatant ( $n = 26$ ) of treated aHDLEC were quantified as described previously [63]. Briefly, samples were processed with a flow cytometer (BD FACSCelesta™) in which the 450/40 bandpass filter (BV421, violet laser) was manually swapped after cytometer setting and tracking (CS and T) calibration with a 1 mm-thick magnetron sputtered 405/10 bandpass filter (Chroma Technology, Bellows Falls, VT, USA), referred to as V-SSC in this manuscript. Plots and histograms show all parameters in height (indicated as –H), as recommended for EV detection [64]. Events were acquired at a flow rate of 12  $\mu$ L/min, which is the lowest flow rate on the FACSCelesta. The flow rate during acquisition was kept to a minimum to avoid swarming effects and coincident detection [65]. For a more precise calibration for assessment of biological vesicle size (refractive index in the range 1.36 to 1.42), the flow cytometer was calibrated for EV detection using the ApogeeMix (#1493, Apogee Flow Systems, Hemel Hempstead, UK), which consists of a mixture of non-fluorescent silica beads (180, 240, 300, 590, 880, and 1300 nm) and FITC-fluorescent latex beads (110 and 500 nm) (Figure S6). The EV gate was set to contain events ranging from ~100 to ~1000 nm using the size of the non-fluorescent silica beads in the ApogeeMix, whose refractive index is close to that of cellular membranes [66]. The threshold for the forward scatter (FSC) detector was set at the lowest possible value (200 V) in FACS Diva software (BD Biosciences). The background in the EV gate was determined by running samples containing all reagents and antibodies except EV-containing culture media and was subtracted from the values obtained for samples with EV-containing culture media. Single-labeled tubes and one unlabeled tube were also analyzed to adjust the cytometer voltages, compensations, and to create the analysis strategy shown in Figure S6. To confirm the cellular origin of the extracellular vesicles detected, 0.1% Triton X-100 (0.05% final concentration) was added to the samples for 30 min, and the decrease in EVs count was denoted (Figure S6). Data were analyzed using FlowJo™ software (Tree Star Inc., Ashland, USA).

For characterization of EVs in the supernatant of aHDLEC, 50  $\mu$ L was mixed with 50  $\mu$ L of Annexin V buffer 1X and all subsequent steps were identical to those for plasma. We characterized the composition of convalescent plasma in EVs by using the gating strategy shown in Figure S6 and Figure 5A–G. The absolute concentration of EVs/mL was calculated using count beads (Apogee Flow System, cat. 1426) and Equation (1),  $cb$ , count beads;  $V$ , volume;  $DF$ , dilution factor;  $Bg$ , background sample.

$$[EVs] = \left( \frac{\#EVs}{\#cb} \times \frac{V_{cb} \times [initial\ cb]}{V_{total}} \times DF \right) \times 1000 - [EVs\ in\ Bg] \quad (1)$$

#### 4.9. Total Cholesterol

Measurement of cholesterol in CCP samples ( $n = 33$ ) was performed according to the manufacturer's protocol (Cholesterol E-Test, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, cat. 439-17501).

#### 4.10. Messenger RNA Analysis by RT-qPCR

Treated aHDLEC were harvested, suspended in RiboZol™ RNA Extraction Reagent and stored at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  for at least 24 h. The RNA was extracted using the PureLink RNA Mini Kit extraction kit (Invitrogen, cat. 12183025) according to the manufacturer's protocol and quantified on a NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer (ThermoFisher Scientific). Reverse transcription of RNA was performed using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (ThermoFisher Scientific, cat. 4368814). Quantitative PCR was performed on the QuantStudio™ 3 (ThermoFisher Scientific) using 10 ng of complementary DNA (cDNA) mixed with Itaq™ Universal SYBR® Green Supermix (Biorad, cat. 1725121). The primers used are displayed in Table S2. The amplification cycles were performed at  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 10 s and at  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 45 s for 40 cycles. The relative expression was calculated by the comparative method of ( $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ ) and normalized to the housekeeping gene *ACTB*. All CCP samples were then normalized to the control plasma.

#### 4.11. Immunofluorescence

Adult HDLEC were seeded in 8-well plates (Sigma, cat. PEZGS0816) at 30,000 cells per well until confluence was reached. Following treatment, aHDLEC were incubated with 10 ng/mL Wheat Germ Agglutinin, Alexa Fluor™ 488 Conjugate (ThermoFisher Scientific, cat. W11261) for 7.5 min in the dark and fixed in PFA 2% for 25 min. Cells were then blocked in 2% Donkey Serum for 30 min at RT and incubated with anti-VE-Cadherin antibody (Abcam, cat. Ab33168) for 1 h at RT at a final dilution of 1/200. Secondary antibody Alexa Fluor™ anti-rabbit 647 (Jackson ImmunoResearch, cat. 711-606-152) was incubated for 1 h at RT at a final dilution of 1/300. Adult HDLEC were then incubated with DAPI (1/250) for 30 min and visualized using an LSM 710 Confocal Microscope (Zeiss) equipped with a x63/1.4 oil dic objective. Images were analyzed using ImageJ software and relative intensity was obtained by normalization of CCP samples ( $n = 9$ ) to the control plasma.

#### 4.12. Transwell Permeability Assay

Adult HDLEC were seeded in transwell inserts (Corning cat. 3470 and Greiner Bio-one cat. 662640) in a 24-well plate (vWR cat. 10861-700) and treated in the apical side. Inflamed and healthy aHDLEC were used as positive (incubated with basal medium and cytokines) and negative control (incubated with complete medium), respectively. Permeability was assessed by the addition of ovalbumin Alexa Fluor™ 488 (50 ng/mL) (Invitrogen cat. 34781) in a phenol-free medium (Promocell, cat. C-22226) for 20 min at RT followed by its recovery in the basolateral region. The medium containing the ovalbumin was transferred in a 96-well black flat plate and its fluorescence was read with the plate reader Synergy 2 (BioTek) with 485/20 nm of excitation and 528/20 nm of emission. All CCP samples ( $n = 12$ ) were then normalized to the control plasma.

#### 4.13. Immunoblotting

Proteins were extracted from treated aHDLEC using ice-cold radioimmunoprecipitation (RIPA) assay buffer and the protein concentrations were determined using MicroBCA™ Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific, cat. 23235). Protein samples were diluted in 4× Laemmli buffer, heated at 95 °C for 5 min and separated by electrophoresis on a 7.5% SDS-PAGE. Proteins were then transferred on a poly (vinylidene fluoride) (PVDF) membrane overnight at 4 °C. The membranes were blocked with 5% nonfat dry milk or 5% bovine serum albumin (BSA) in Tris-buffered saline (TBST, 0.1% Tween 20) for 2h at RT, then incubated with an anti-VE-Cadherin (Abcam, cat. Ab33168), anti-phospho-VE-Cadherin (Invitrogen, cat. 44-11446), anti-VEGFR-3 (ProteinTech, cat. 20712-1-AP) and anti- $\alpha/\beta$  tubulin (Cell Signaling, cat. 2148) overnight at 4 °C. The membranes were incubated with HRP-conjugated secondary anti-rabbit (Abcam, cat. Ab6721) and anti-mouse (ThermoFisher Scientific, cat. PR-W4021) antibodies for 1 h at RT. An ECL Blotting Substrates Kit (ThermoFisher Scientific, cat. PI32209) was used for detection. Each plasma sample ( $n = 24-26$ ) was normalized with its respective non-phosphorylated or  $\alpha/\beta$ -tubulin expression followed by a normalization on the control plasma expression.

#### 4.14. Statistical Analysis

Normally distributed data are represented as mean and standard deviation (SD), whereas non-normally distributed data are represented as median and interquartile range. For continuous variables passing the Shapiro–Wilk normality test, a two-tailed Pearson’s correlation was performed. For variables that did not pass the normality test, a logarithmic or square-root transformation (if the previous one failed to normalize the data) was performed to obtain a homogeneous distribution. For the variables that still did not pass the normality test following the transformation, the initial values were used, but a non-parametric two-tailed Spearman’s correlation was performed. Finally, in Figure 5H, a Kruskal–Wallis test with a Dunn post hoc test was used. Multiple linear regression was performed using forward method, whenever more than one variable from the univariate analysis was associated with the tested outcome. Reported  $p$  values are two-sided and the significance level was  $p < 0.05$  for all statistical tests. Analyses were performed using SPSS version 27 software and figures were represented using Prism version 9 software (GraphPad).

### 5. Conclusions

In conclusion, we reported in this study a new and easily measurable parameter to take into consideration for the selection of CCP used in CPT. Our results demonstrate that an early donation of convalescent plasma could protect against lymphatic dysfunction, as it contains circulating LEC-EVs. We envision that the secretion of LEC-EVs by an impaired endothelium could be an alarm signal that instigates the self-defense of peripheral lymphatic vessels against an excessive inflammation. Contrariwise, a late donation could promote loss of endothelial integrity and increased permeability of the lymphatic endothelium. Dysfunctional lymphatic drainage could alter the clearance of immune cells and pro-inflammatory mediators, leading to the exacerbation of inflammation in infected COVID-19 patients. Accordingly, an easy and efficient selection of convalescent plasma based on time of donation would be essential to promote the preservation of the lymphatic and immune system of infected patients. Further clinical trials are needed to investigate whether early donations of CCP would be beneficial for the well-being of infected and hospitalized patients.

In terms of limitations, the recruitment of patients occurred solely during the first half-year of the pandemic, which prevented a thorough and longitudinal follow up of donors, and excluded the effect of vaccine. A restricted amount of CCP donors is also another limitation of this study. The severity of the disease was based on self-assessment, and thus graded by donors themselves using a self-questionnaire. Clinical parameters that could have been insightful for the analysis of this study, such as body mass index, history of cardiac events and medications, were also unavailable. Finally, the total count of EVs produced by aHDLEC *in vitro* was calculated based on the total number found in the media minus the number of EVs contained in the plasma that was incubated on the lymphatic endothelial cell monolayer.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: [www.mdpi.com/xxx/s1](http://www.mdpi.com/xxx/s1), Figure S1: Gating strategy in flow cytometry for reactive oxygen species production and cellular viability. Figure S2: Endothelial activation markers are predictors of preserved endothelial integrity; Figure S3: No significant correlations between extracellular vesicles and time of donation of COVID-19 convalescent plasma; Figure S4. VEGFR-3 mRNA expression correlates to a preserved endothelial integrity; Figure S5: Experimental design; Figure S6: Flow cytometry plots gating for the identification of extracellular vesicles; Table S1: List of conjugated antibodies and markers used for flow cytometry; Table S2: List of sequences for PCR primers used throughout the study.

**Author Contributions:** Conceptualization, N.T. and C.M.; methodology, N.A., R.B. (Rémi Bégin), N.T. and C.M.; formal analysis, N.A. and R.B. (Rémi Bégin); assisted on the EVs characterization, staining and analyses, L.V. (Laurent Vachon); Performed the confocal microscopy experiments, L.V. (Louis Villeneuve); provided CCP samples and anti-RBD measurements, R.B. (Renée Bazin); realized the multiplex assay on the COVID-19 Convalescent Plasma, L.L.; writing—original draft preparation, N.A., R.B. (Rémi Bégin), and C.M.; writing—review and editing, N.A., R.B. (Rémi Bégin), N.T., P.B. and C.M.; supervision, C.M.; project administration, C.M.; funding acquisition, C.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by the Canadian Institutes for Health Research (Canada Research Chair to C.M. (950-232250) and MSc training grant to L.V. (Laurent Vachon)) and the Montreal Heart Institute Foundation (to C.M.).

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committee of the Montreal Heart Institute (protocol #2021-2812 approved on september 17<sup>th</sup> 2020) and Héma-Québec (protocol #2020-004 approved on June 12<sup>th</sup> 2020)

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in the study

**Data Availability Statement:** Data is contained within the article and Supplementary Materials.

**Acknowledgments:** The authors acknowledge Annik Fortier from the Department of Statistics, Montreal Health Innovations Coordinating Center (MHICC), Montréal, Québec, Canada for the verification of the quality of statistical analysis and Amal Deis for her assistance with the validation of primers and the Western blots experiment.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflicts of interest.



## References

1. WHO. *World Health Organization coronavirus disease (COVID-19) dashboard*. World Health Organization, Switzerland: **2020**.
2. Del Rio, C.; Collins, L.F.; Malani, P. Long-term Health Consequences of COVID-19. *JAMA* **2020**, *324*, 1723–1724. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.19719>.
3. Amraei, R.; Rahimi, N. COVID-19, Renin-Angiotensin System and Endothelial Dysfunction. *Cells* **2020**, *9*. <https://doi.org/10.3390/cells9071652>.
4. Rauch, A.; Dupont, A.; Goutay, J.; Caplan, M.; Staessens, S.; Moussa, M.; Jeanpierre, E.; Corseaux, D.; Lefevre, G.; Lassalle, F.; *et al.* Endotheliopathy is induced by plasma from critically-ill patients and associated with organ failure in severe COVID-19. *Circulation* **2020**, *142*, 1881–1884. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.120.050907>.
5. Varga, Z.; Flammer, A.J.; Steiger, P.; Haberecker, M.; Andermatt, R.; Zinkernagel, A.S.; Mehra, M.R.; Schuepbach, R.A.; Ruschitzka, F.; Moch, H. Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19. *Lancet* **2020**, *395*, 1417–1418. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30937-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30937-5).
6. Chioh, F.W.J.; Fong, S.-W.; Young, B.E.; Wu, K.-X.; Siau, A.; Krishnan, S.; Chan, Y.-H.; Carissimo, G.; Teo, L.L.Y.; Gao, F.; *et al.* Convalescent COVID-19 patients are susceptible to endothelial dysfunction due to persistent immune activation. *eLife* **2021**, *10*, e64909. <https://doi.org/10.7554/eLife.64909>.
7. Joyner, M.J.; Carter, R.E.; Senefeld, J.W.; Klassen, S.A.; Mills, J.R.; Johnson, P.W.; Theel, E.S.; Wiggins, C.C.; Bruno, K.A.; Klompas, A.M.; *et al.* Convalescent Plasma Antibody Levels and the Risk of Death from Covid-19. *N. Engl. J. Med.* **2021**, *384*, 1015–1027. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2031893>.
8. RECOVERY Collaborative Group. Convalescent plasma in patients admitted to hospital with COVID-19 (RECOVERY): A randomised controlled, open-label, platform trial. *Lancet* **2021**, *397*, 2049–2059. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(21\)00897-7](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(21)00897-7).
9. Writing Committee for the REMAP-CAP Investigators. Effect of Convalescent Plasma on Organ Support–Free Days in Critically Ill Patients With COVID-19: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* **2021**, *326*, 1690–1702. <https://doi.org/10.1001/jama.2021.18178>.
10. Bégin, P.; Callum, J.; Jamula, E.; Cook, R.; Heddle, N.M.; Tinmouth, A.; Zeller, M.P.; Beaudoin-Bussièrès, G.; Amorim, L.; Bazin, R.; *et al.* Convalescent plasma for hospitalized patients with COVID-19: An open-label, randomized controlled trial. *Nat. Med.* **2021**, *27*, 2012–2024. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01488-2>.
11. Piechotta, V.; Iannizzi, C.; Chai, K.L.; Valk, S.J.; Kimber, C.; Dorando, E.; Monsef, I.; Wood, E.M.; Lamikanra, A.A.; Roberts, D.J.; *et al.* Convalescent plasma or hyperimmune immunoglobulin for people with COVID-19: A living systematic review. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2021**, *5*, Cd013600. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD013600.pub4>.
12. Sullivan, D.J.; Gebo, K.A.; Shoham, S.; Bloch, E.M.; Lau, B.; Shenoy, A.G.; Mosnaim, G.S.; Gniadek, T.J.; Fukuta, Y.; Patel, B.; *et al.* Randomized Controlled Trial of Early Outpatient COVID-19 Treatment with High-Titer Convalescent Plasma. *medRxiv* **2021**, 21267485. <https://doi.org/10.1101/2021.12.10.21267485>.
13. Milasan, A.; Smaani, A.; Martel, C. Early rescue of lymphatic function limits atherosclerosis progression in Ldlr mice. *Atherosclerosis* **2019**, *283*, 106–119. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2019.01.031>.
14. Tammela, T.; Alitalo, K. Lymphangiogenesis: Molecular mechanisms and future promise. *Cell* **2010**, *140*, 460–476. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.045>.
15. Schwager, S.; Detmar, M. Inflammation and Lymphatic Function. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 308. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00308>.

16. Zhang, Y.; Garner, R.; Salehi, S.; La Rocca, M.; Duncan, D. Association between ABO blood types and coronavirus disease 2019 (COVID-19), genetic associations, and underlying molecular mechanisms: A literature review of 23 studies. *Ann. Hematol.* **2021**, *100*, 1123–1132. <https://doi.org/10.1007/s00277-021-04489-w>.
17. Hariyanto, T.I.; Kurniawan, A. Dyslipidemia is associated with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19) infection. *Diabetes Metab. Syndr. Clin. Res. Rev.* **2020**, *14*, 1463–1465. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2020.07.054>.
18. De Candia, P.; Prattichizzo, F.; Garavelli, S.; La Grotta, R.; De Rosa, A.; Pontarelli, A.; Parrella, R.; Ceriello, A.; Matarese, G. Effect of time and titer in convalescent plasma therapy for COVID-19. *iScience* **2021**, *24*, 102898. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102898>.
19. Figueiredo-Campos, P.; Blankenhaus, B.; Mota, C.; Gomes, A.; Serrano, M.; Ariotti, S.; Costa, C.; Nunes-Cabaço, H.; Mendes, A.M.; Gaspar, P.; *et al.* Seroprevalence of anti-SARS-CoV-2 antibodies in COVID-19 patients and healthy volunteers up to 6 months post disease onset. *Eur. J. Immunol.* **2020**, *50*, 2025–2040. <https://doi.org/10.1002/eji.202048970>.
20. Redza-Dutordoir, M.; Averill-Bates, D.A. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochim. Biophys. Acta* **2016**, *1863*, 2977–2992. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.09.012>.
21. Laforge, M.; Elbim, C.; Frère, C.; Hémadi, M.; Massaad, C.; Nuss, P.; Benoliel, J.-J.; Becker, C. Tissue damage from neutrophil-induced oxidative stress in COVID-19. *Nat. Rev. Immunol.* **2020**, *20*, 515–516. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0407-1>.
22. Casadevall, A.; Joyner, M.J.; Pirofski, L.A. SARS-CoV-2 viral load and antibody responses: The case for convalescent plasma therapy. *J. Clin. Invest.* **2020**, *130*, 5112–5114. <https://doi.org/10.1172/jci139760>.
23. Gallo Marin, B.; Aghagoli, G.; Lavine, K.; Yang, L.; Siff, E.J.; Chiang, S.S.; Salazar-Mather, T.P.; Dumenco, L.; Savaria, M.C.; Aung, S.N.; *et al.* Predictors of COVID-19 severity: A literature review. *Rev. Med. Virol.* **2021**, *31*, e2146. <https://doi.org/10.1002/rmv.2146>.
24. Wang, Y.; Zhang, L.; Sang, L.; Ye, F.; Ruan, S.; Zhong, B.; Song, T.; Alshukairi, A.N.; Chen, R.; Zhang, Z.; *et al.* Kinetics of viral load and antibody response in relation to COVID-19 severity. *J. Clin. Investig.* **2020**, *130*, 5235–5244. <https://doi.org/10.1172/JCI138759>.
25. Garcia-Beltran, W.F.; Lam, E.C.; Astudillo, M.G.; Yang, D.; Miller, T.E.; Feldman, J.; Hauser, B.M.; Caradonna, T.M.; Clayton, K.L.; Nitido, A.D.; *et al.* COVID-19-neutralizing antibodies predict disease severity and survival. *Cell* **2021**, *184*, 476-488.e411. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.12.015>.
26. Beaudoin-Bussièrès, G.; Laumaea, A.; Anand, S.P.; Prévost, J.; Gasser, R.; Goyette, G.; Medjahed, H.; Perreault, J.; Tremblay, T.; Lewin, A.; *et al.* Decline of Humoral Responses against SARS-CoV-2 Spike in Convalescent Individuals. *mBio* **2020**, *11*(5).<https://doi.org/10.1128/mBio.02590-20>.
27. Anand, S.P.; Prévost, J.; Nayrac, M.; Beaudoin-Bussièrès, G.; Benlarbi, M.; Gasser, R.; Brassard, N.; Laumaea, A.; Gong, S.Y.; Bourassa, C.; *et al.* Longitudinal analysis of humoral immunity against SARS-CoV-2 Spike in convalescent individuals up to 8 months post-symptom onset. *Cell Rep. Med.* **2021**, *2*, 100290. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2021.100290>.
28. Huggenberger, R.; Ullmann, S.; Proulx, S.T.; Pytowski, B.; Alitalo, K.; Detmar, M. Stimulation of lymphangiogenesis via VEGFR-3 inhibits chronic skin inflammation. *J. Exp. Med.* **2010**, *207*, 2255–2269. <https://doi.org/10.1084/jem.20100559>.
29. Kajiya, K.; Sawane, M.; Huggenberger, R.; Detmar, M. Activation of the VEGFR-3 Pathway by VEGF-C Attenuates UVB-Induced Edema Formation and Skin Inflammation by Promoting Lymphangiogenesis. *J. Investig. Dermatol.* **2009**, *129*, 1292–1298. <https://doi.org/10.1038/jid.2008.351>.

30. Milasan, A.; Farhat, M.; Martel, C. Extracellular Vesicles as Potential Prognostic Markers of Lymphatic Dysfunction. *Front. Physiol.* **2020**, *11*, 476. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00476>.
31. Milasan, A.; Tessandier, N.; Tan, S.; Brisson, A.; Boilard, E.; Martel, C. Extracellular vesicles are present in mouse lymph and their level differs in atherosclerosis. *J. Extracell. Vesicles* **2016**, *5*, 31427. <https://doi.org/10.3402/jev.v5.31427>.
32. Hsiao, C.-J.; Hsiao, G.; Chen, W.-L.; Wang, S.-W.; Chiang, C.-P.; Liu, L.-Y.; Guh, J.-H.; Lee, T.-H.; Chung, C.-L. Cephalochromin Induces G0/G1 Cell Cycle Arrest and Apoptosis in A549 Human Non-Small-Cell Lung Cancer Cells by Inflicting Mitochondrial Disruption. *J. Nat. Prod.* **2014**, *77*, 758–765. <https://doi.org/10.1021/np400517g>.
33. Ohi, R.; Gould, K.L. Regulating the onset of mitosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **1999**, *11*, 267–273. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(99\)80036-2](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(99)80036-2).
34. Huggenberger, R.; Siddiqui, S.S.; Brander, D.; Ullmann, S.; Zimmermann, K.; Antsiferova, M.; Werner, S.; Alitalo, K.; Detmar, M. An important role of lymphatic vessel activation in limiting acute inflammation. *Blood* **2011**, *117*, 4667–4678. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-10-316356>.
35. Jurisic, G.; Sundberg, J.P.; Detmar, M. Blockade of VEGF receptor-3 aggravates inflammatory bowel disease and lymphatic vessel enlargement. *Inflamm. Bowel. Dis.* **2013**, *19*, 1983–1989. <https://doi.org/10.1097/MIB.0b013e31829292f7>.
36. Reed, H.O.; Wang, L.; Sonett, J.; Chen, M.; Yang, J.; Li, L.; Aradi, P.; Jakus, Z.; D'Armiento, J.; Hancock, W.W.; *et al.* Lymphatic impairment leads to pulmonary tertiary lymphoid organ formation and alveolar damage. *J. Clin. Investig.* **2019**, *129*, 2514–2526. <https://doi.org/10.1172/JCI125044>.
37. Cheng, Y.; Wong, R.; Soo, Y.O.; Wong, W.S.; Lee, C.K.; Ng, M.H.; Chan, P.; Wong, K.C.; Leung, C.B.; Cheng, G. Use of convalescent plasma therapy in SARS patients in Hong Kong. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2005**, *24*, 44–46. <https://doi.org/10.1007/s10096-004-1271-9>.
38. Zhang, J.S.; Chen, J.T.; Liu, Y.X.; Zhang, Z.S.; Gao, H.; Liu, Y.; Wang, X.; Ning, Y.; Liu, Y.F.; Gao, Q.; *et al.* A serological survey on neutralizing antibody titer of SARS convalescent sera. *J. Med. Virol.* **2005**, *77*, 147–150. <https://doi.org/10.1002/jmv.20431>.
39. Van Griensven, J.; Edwards, T.; de Lamballerie, X.; Semple, M.G.; Gallian, P.; Baize, S.; Horby, P.W.; Raoul, H.; Magassouba, N.; Antierens, A.; *et al.* Evaluation of Convalescent Plasma for Ebola Virus Disease in Guinea. *N. Engl. J. Med.* **2016**, *374*, 33–42. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1511812>.
40. Frame, J.D.; Verbrugge, G.P.; Gill, R.G.; Pinneo, L. The use of Lassa fever convalescent plasma in Nigeria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1984**, *78*, 319–324. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(84\)90107-x](https://doi.org/10.1016/0035-9203(84)90107-x).
41. Russell, P.S.; Hong, J.; Windsor, J.A.; Itkin, M.; Phillips, A.R.J. Renal Lymphatics: Anatomy, Physiology, and Clinical Implications. *Front. Physiol.* **2019**, *10*, 251. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00251>.
42. Estaquier, J.; Vallette, F.; Vayssiere, J.L.; Mignotte, B. The mitochondrial pathways of apoptosis. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2012**, *942*, 157–183. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-2869-1\\_7](https://doi.org/10.1007/978-94-007-2869-1_7).
43. Elmore, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol. Pathol.* **2007**, *35*, 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>.
44. Yang, Y.; Jiang, G.; Zhang, P.; Fan, J. Programmed cell death and its role in inflammation. *Mil. Med. Res.* **2015**, *2*, 12. <https://doi.org/10.1186/s40779-015-0039-0>.
45. Libster, R.; Pérez Marc, G.; Wappner, D.; Coviello, S.; Bianchi, A.; Braem, V.; Esteban, I.; Caballero, M.T.; Wood, C.; Berrueta, M.; *et al.* Early High-Titer Plasma Therapy to Prevent

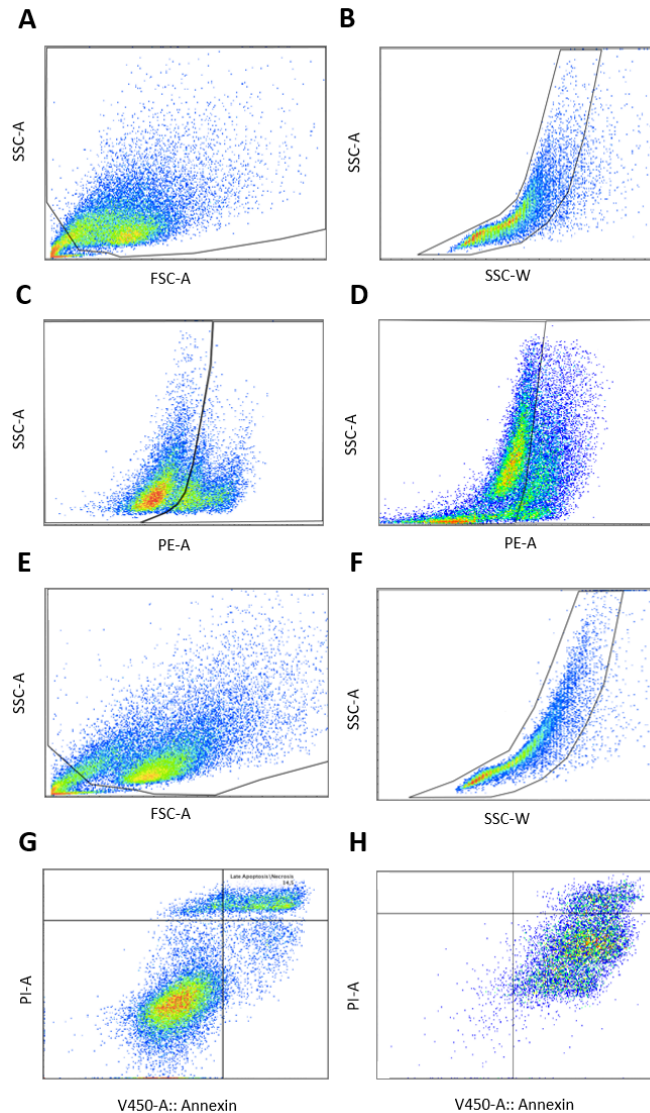
- Severe Covid-19 in Older Adults. *N. Engl. J. Med.* **2021**, *384*, 610–618. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2033700>.
46. Korley, F.K.; Durkalski-Mauldin, V.; Yeatts, S.D.; Schulman, K.; Davenport, R.D.; Dumont, L.J.; El Kassab, N.; Foster, L.D.; Hah, J.M.; Jaiswal, S.; *et al.* Early Convalescent Plasma for High-Risk Outpatients with Covid-19. *N. Engl. J. Med.* **2021**, *385*, 1951–1960. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2103784>.
  47. Teijeira, A.; Hunter, M.C.; Russo, E.; Proulx, S.T.; Frei, T.; Debes, G.F.; Coles, M.; Melero, I.; Detmar, M.; Rouzaut, A.; *et al.* T Cell Migration from Inflamed Skin to Draining Lymph Nodes Requires Intralymphatic Crawling Supported by ICAM-1/LFA-1 Interactions. *Cell Rep.* **2017**, *18*, 857–865. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.12.078>.
  48. Cromer, W.E.; Zawieja, S.D.; Tharakan, B.; Childs, E.W.; Newell, M.K.; Zawieja, D.C. The effects of inflammatory cytokines on lymphatic endothelial barrier function. *Angiogenesis* **2014**, *17*, 395–406. <https://doi.org/10.1007/s10456-013-9393-2>.
  49. Jannaway, M.; Scallan, J.P. VE-Cadherin and Vesicles Differentially Regulate Lymphatic Vascular Permeability to Solutes of Various Sizes. *Front. Physiol.* **2021**, *12*. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.687563>.
  50. Wirz, O.F.; Röltgen, K.; Stevens, B.A.; Pandey, S.; Sahoo, M.K.; Tolentino, L.; Verghese, M.; Nguyen, K.; Hunter, M.; Snow, T.T.; *et al.* Use of Outpatient-Derived COVID-19 Convalescent Plasma in COVID-19 Patients Before Seroconversion. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 739037. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.739037>.
  51. Bonny, T.S.; Patel, E.U.; Zhu, X.; Bloch, E.M.; Grabowski, M.K.; Abraham, A.G.; Littlefield, K.; Shrestha, R.; Benner, S.E.; Laeyendecker, O.; *et al.* Cytokine and Chemokine Levels in Coronavirus Disease 2019 Convalescent Plasma. *Open Forum. Infect. Dis.* **2021**, *8*, ofaa574. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofaa574>.
  52. Barry, O.P.; Praticò, D.; Savani, R.C.; FitzGerald, G.A. Modulation of monocyte-endothelial cell interactions by platelet microparticles. *J. Clin. Invest.* **1998**, *102*, 136–144. <https://doi.org/10.1172/jci2592>.
  53. Rosell, A.; Havervall, S.; Meijerfeldt, F.V.; Hisada, Y.; Aguilera, K.; Grover, S.P.; Lisman, T.; Mackman, N.; Thålin, C. Patients With COVID-19 Have Elevated Levels of Circulating Extracellular Vesicle Tissue Factor Activity That Is Associated With Severity and Mortality. *Brief Report. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2021**, *41*, 878–882. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.120.315547>.
  54. Krishnamachary, B.; Cook, C.; Kumar, A.; Spikes, L.; Chalise, P.; Dhillon, N.K. Extracellular vesicle-mediated endothelial apoptosis and EV-associated proteins correlate with COVID-19 disease severity. *J. Extracell. Vesicles* **2021**, *10*, e12117. <https://doi.org/10.1002/jev2.12117>.
  55. Troyer, Z.; Alhusaini, N.; Tabler, C.O.; Sweet, T.; de Carvalho, K.I.L.; Schlatzer, D.M.; Carias, L.; King, C.L.; Matreyek, K.; Tilton, J.C. Extracellular vesicles carry SARS-CoV-2 spike protein and serve as decoys for neutralizing antibodies. *J. Extracell. Vesicles* **2021**, *10*, e12112. <https://doi.org/10.1002/jev2.12112>.
  56. Askenase, P.W. COVID-19 therapy with mesenchymal stromal cells (MSC) and convalescent plasma must consider exosome involvement: Do the exosomes in convalescent plasma antagonize the weak immune antibodies? *J. Extracell. Vesicles* **2020**, *10*, e12004. <https://doi.org/10.1002/jev2.12004>.
  57. Yáñez-Mó, M.; Siljander, P.R.; Andreu, Z.; Zavec, A.B.; Borràs, F.E.; Buzas, E.I.; Buzas, K.; Casal, E.; Cappello, F.; Carvalho, J.; *et al.* Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J. Extracell. Vesicles* **2015**, *4*, 27066. <https://doi.org/10.3402/jev.v4.27066>.
  58. Simeone, P.; Bologna, G.; Lanuti, P.; Pierdomenico, L.; Guagnano, M.T.; Pieragostino, D.; Del Boccio, P.; Vergara, D.; Marchisio, M.; Miscia, S.; *et al.* Extracellular Vesicles as

- Signaling Mediators and Disease Biomarkers across Biological Barriers. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*. <https://doi.org/10.3390/ijms21072514>.
59. Breslin, J.W.; Gaudreault, N.; Watson, K.D.; Reynoso, R.; Yuan, S.Y.; Wu, M.H. Vascular endothelial growth factor-C stimulates the lymphatic pump by a VEGF receptor-3-dependent mechanism. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2007**, *293*, H709–H718. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00102.2007>.
  60. Riccardi, C.; Nicoletti, I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 1458–1461. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.238>.
  61. Perreault, J.; Tremblay, T.; Fournier, M.-J.; Drouin, M.; Beaudoin-Bussi eres, G.; Pr evost, J.; Lewin, A.; B egin, P.; Finzi, A.; Bazin, R. Waning of SARS-CoV-2 RBD antibodies in longitudinal convalescent plasma samples within 4 months after symptom onset. *Blood* **2020**, *136*, 2588–2591. <https://doi.org/10.1182/blood.2020008367>.
  62. Morales-Kastresana, A.; Telford, B.; Musich, T.A.; McKinnon, K.; Clayborne, C.; Braig, Z.; Rosner, A.; Demberg, T.; Watson, D.C.; Karpova, T.S.; *et al.* Labeling Extracellular Vesicles for Nanoscale Flow Cytometry. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1878. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01731-2>.
  63. Vachon, L.; Smaani, A.; Tessier, N.; Jean, G.; Demers, A.; Milasan, A.; Ardo, N.; Jarry, S.; Villeneuve, L.; Alikashani, A.; *et al.* Downregulation of low-density lipoprotein receptor mRNA in lymphatic endothelial cells impairs lymphatic function through changes in intracellular lipids. *Theranostics* **2021**, *12*, 1440–1458.
  64. Poncelet, P.; Robert, S.; Bailly, N.; Garnache-Ottou, F.; Bouriche, T.; Devalet, B.; Segatchian, J.H.; Saas, P.; Mullier, F. Tips and tricks for flow cytometry-based analysis and counting of microparticles. *Transfus. Apher. Sci.* **2015**, *53*, 110–126. <https://doi.org/10.1016/j.transci.2015.10.008>.
  65. Poncelet, P.; Robert, S.; Bouriche, T.; Bez, J.; Lacroix, R.; Dignat-George, F. Standardized counting of circulating platelet microparticles using currently available flow cytometers and scatter-based triggering: Forward or side scatter? *Cytom. A* **2016**, *89*, 148–158. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.22685>.
  66. Beuthan, J.; Minet, O.; Helfmann, J.; Herrig, M.; Muller, G. The spatial variation of the refractive index in biological cells. *Phys. Med. Biol.* **1996**, *41*, 369–382.

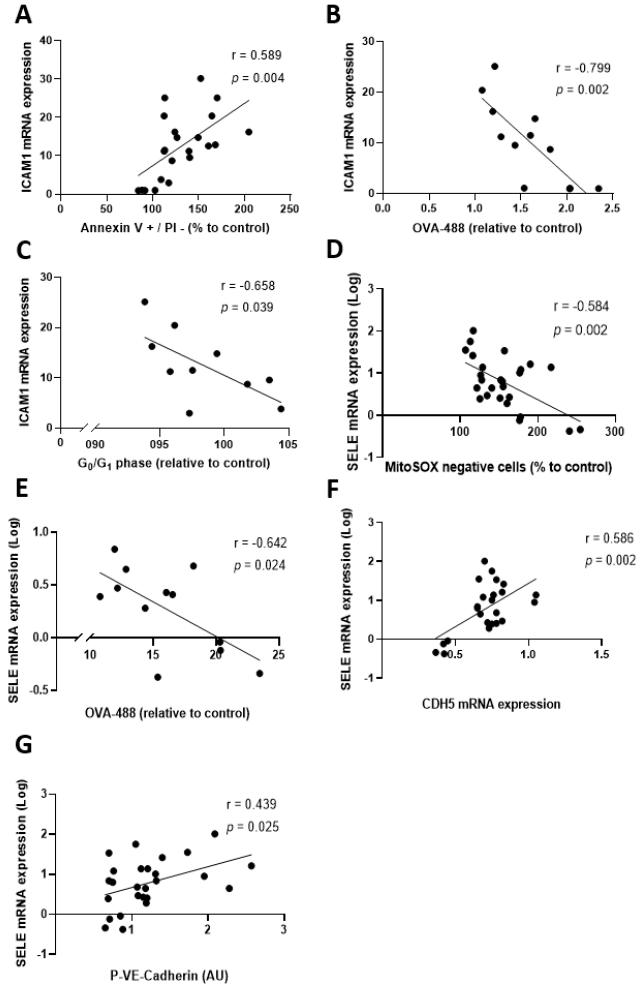
**Use of early donated COVID-19 convalescent plasma is optimal to preserve the integrity of lymphatic endothelial cells**

## **Supplementary material**

## Supplementary figures & tables



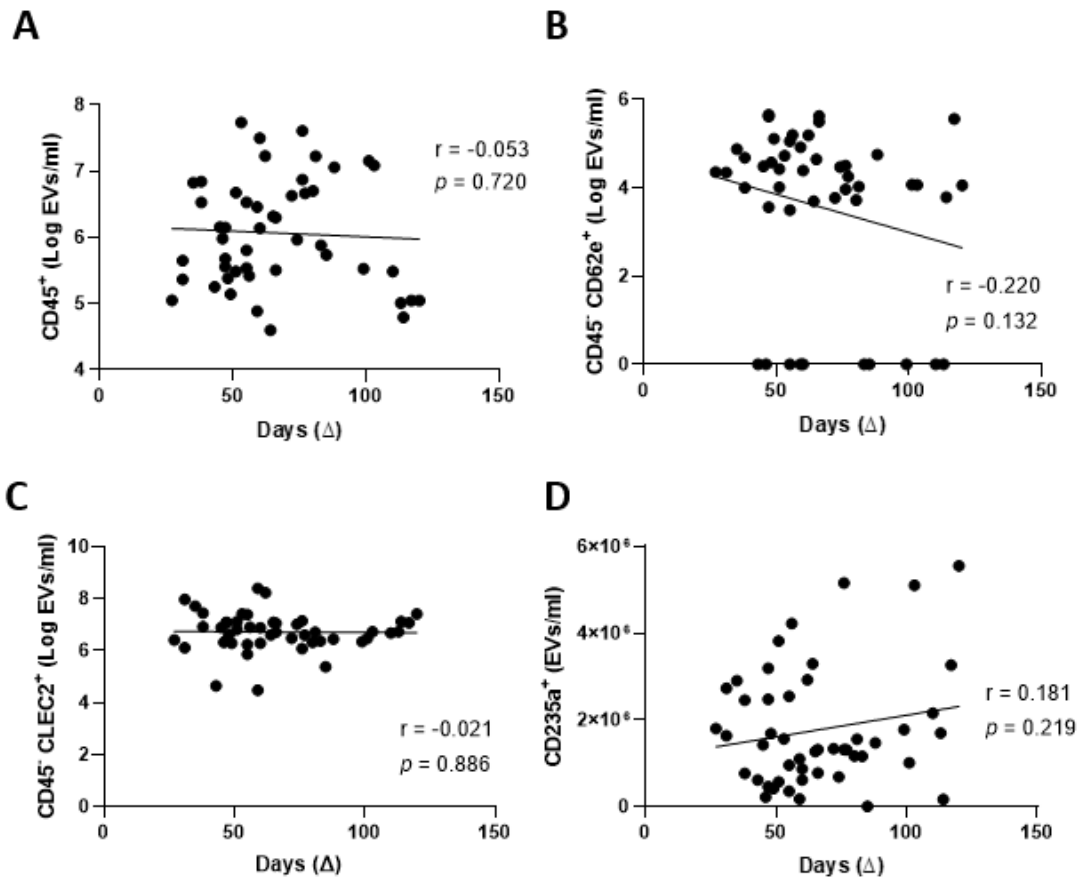
**Figure S1. Gating strategy in flow cytometry for reactive oxygen species production and cellular viability. (A – D).** MitoSOX<sup>TM</sup> Red gating strategy through viable cells (side scatter-area) (A), single cells (side scatter-area) (B) MitoSOX<sup>TM</sup> Red negative and positive populations following incubation with CCP (side scatter-area) (C) and MitoSOX<sup>TM</sup> Red negative and positive populations following incubation with 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (side scatter-area) (D). (E – H) Cellular viability gating strategy using Annexin V and PI through viable cells (side scatter-area) (E), single cells (side scatter-area) (F) early apoptosis population (Annexin V positive and negative for PI) and necrosis (Annexin V positive and PI positive) following incubation with CCP (PI - area) (G) and MitoSOX<sup>TM</sup> Red negative and positive populations following incubation with 1  $\mu$ M Staurosporine (side scatter-area) (H). SSC-A, side scatter-area; FSC-A, forward scatter-area; PI, propidium iodide; CCP, COVID-19 convalescent plasma.



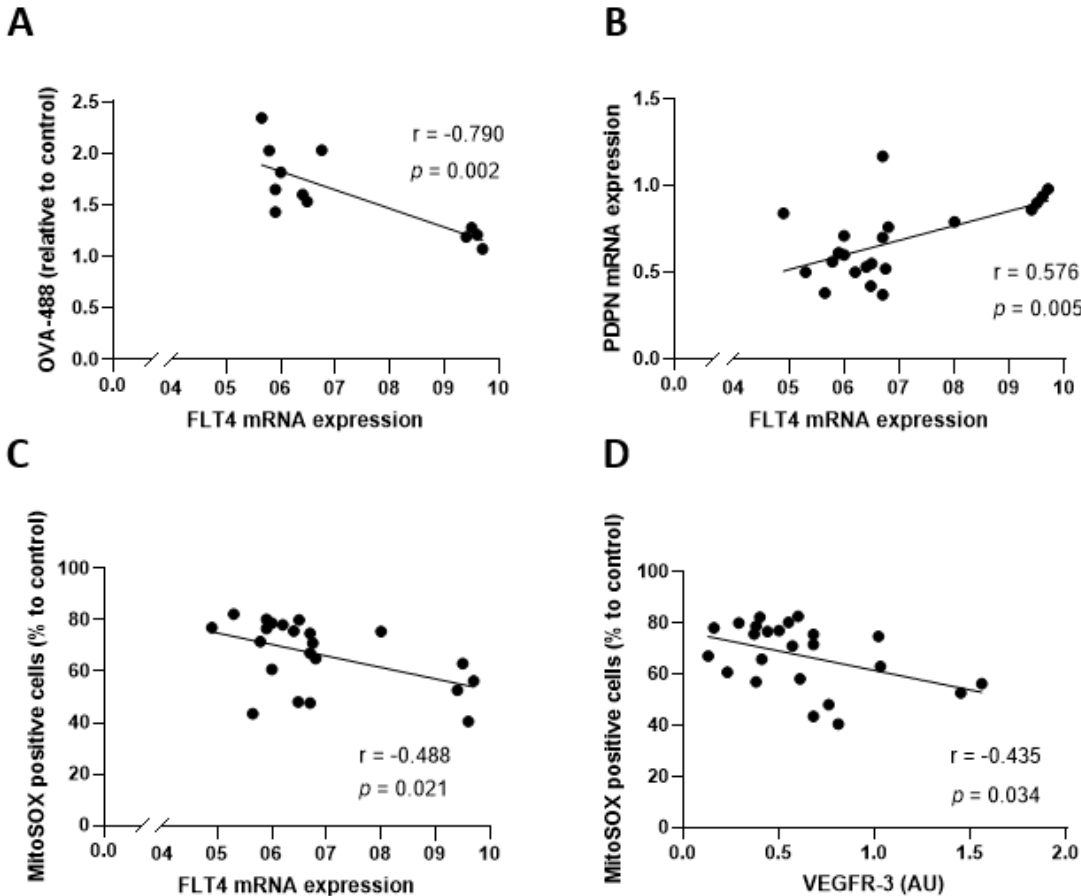
**Figure S2. Endothelial activation markers are predictors of preserved endothelial integrity.**

(A – C) Treated aHDLEC (convalescent plasma for 4h and cytokines for 20h) were harvested and mRNA expression of activation marker *ICAM1* was assessed by RT-qPCR and correlated with cells in early apoptosis (positive for Annexin V and negative for propidium iodide (PI) (A), concentration of ovalbumin-488 following the permeability transwell test (B) and cells in the G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase of the cell cycle, determined by DNA fragmentation using PI (C). (D – G). Treated aHDLEC were harvested and mRNA expression of activation marker E-selectin (*SELE*) was determined by RT-qPCR and correlated with cells not labeled by the MitoSOX<sup>TM</sup> Red probe (D), concentration of ovalbumin-488 (E), VE-Cadherin mRNA expression (F) and phosphorylated VE-Cadherin expression measured by immunoblot and normalized to the expression of non-phosphorylated VE-Cadherin (G). Significance was determined by a Pearson correlation and  $p < 0,05$  was considered significant. *ICAM1*, gene coding for intercellular adhesion molecule 1; *SELE*, gene coding for E-selectin; PI, propidium iodide; *CDH5*, gene coding for VE-Cadherin; OVA, ovalbumin; P-VE-Cadherin, phosphorylated VE-Cadherin; aHDLEC, adult human dermal lymphatic endothelial cells.

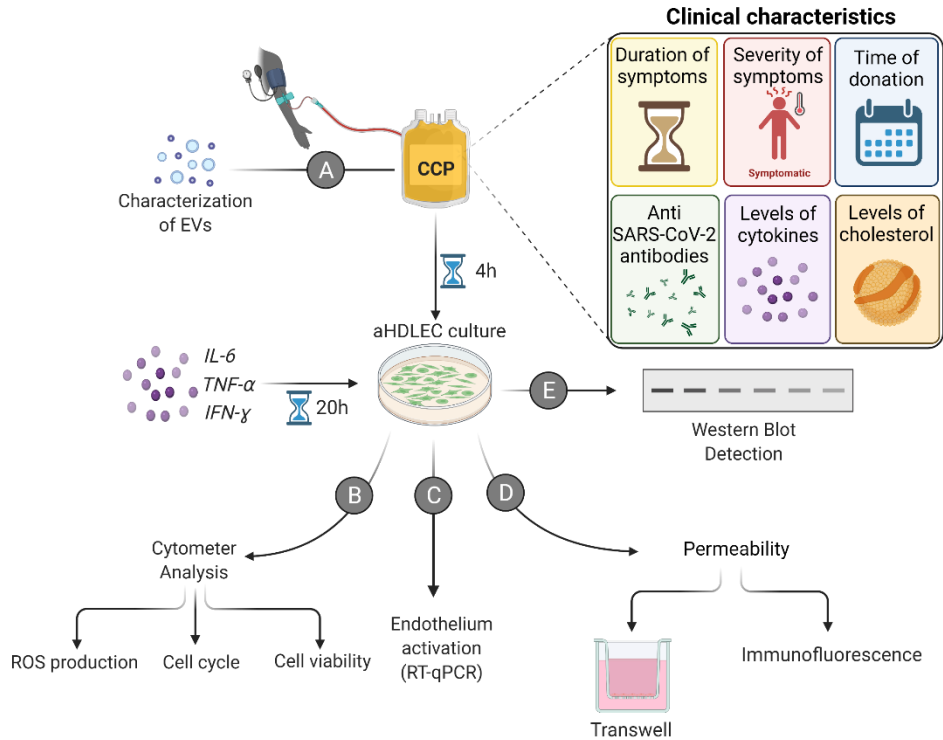




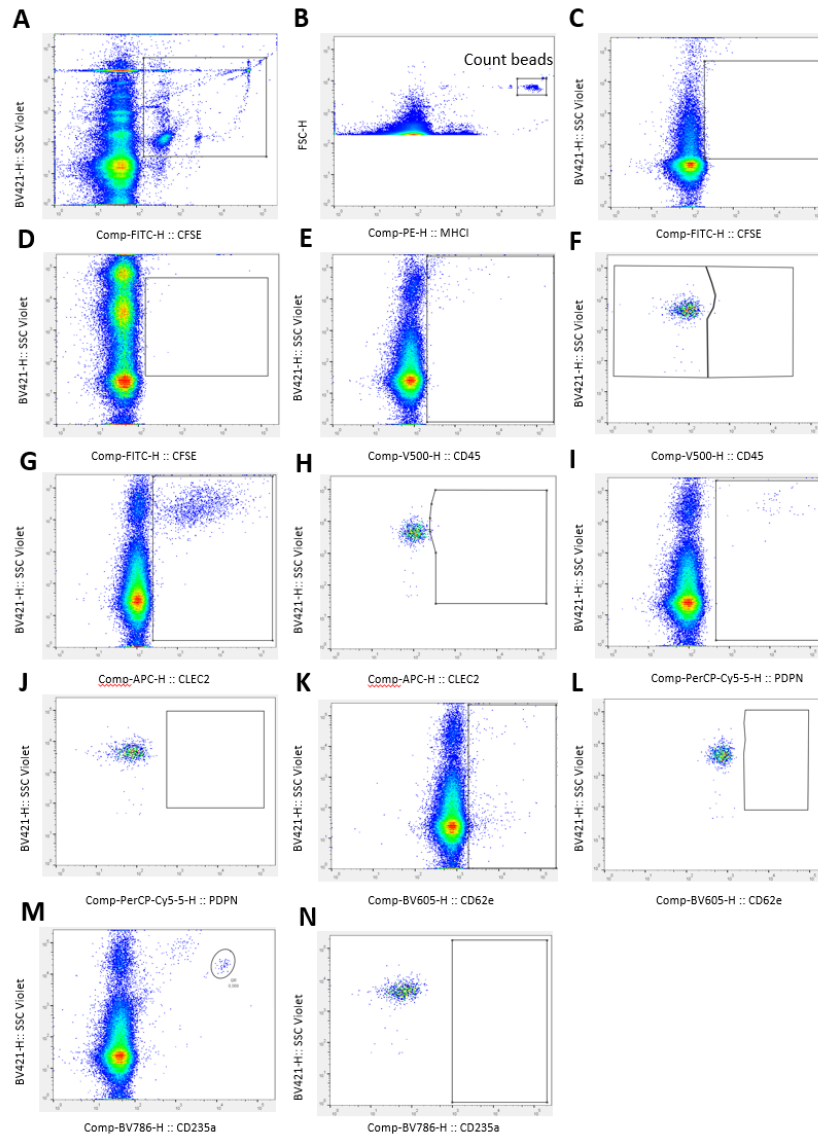
**Figure S3. No significant correlations between extracellular vesicles and time of donation of COVID-19 convalescent plasma.** (A – D) Correlation between the duration between the onset of symptoms and the donation and the concentration of CD45<sup>+</sup> EVs (A), CD45<sup>+</sup> CD62e<sup>+</sup> EVs (B), CD45<sup>-</sup> CLEC2<sup>+</sup> EVs (C) and CD235a<sup>+</sup> EVs in CCP (D). Significance was determined by a Pearson correlation after a logarithmic transformation of CD45<sup>+</sup> EVs, CD45<sup>-</sup> CD62e<sup>+</sup> EVs and CD45<sup>-</sup> CLEC2<sup>+</sup> EVs concentration to reach a normal distribution.  $p < 0,05$  was considered significant.  $\Delta$ , time of donation since onset of symptoms; EVs, extracellular vesicles; CLEC2, C-type lectin-like type II; CCP, COVID-19 convalescent plasma.



**Figure S4. VEGFR-3 mRNA expression correlates to a preserved endothelial integrity.** **A.** Treated cells (convalescent plasma for 4h and cytokines for 20h) were harvested and mRNA expression of *FLT4* was assessed by RT-qPCR and correlated with the concentration of ovalbumin-488 measured following the permeability transwell assay. **B.** The mRNA expression of FLT-4 was correlated with the mRNA expression of podoplanin in treated cells **C.** The mRNA expression of FLT4 was correlated with cells labeled by the MitoSOX<sup>TM</sup> Red probe (relative to cells treated with control plasma) **D.** Proteins from treated cells were extracted and the expression of VEGFR-3 was assessed by immunoblot and correlated with cells labeled by the MitoSOX<sup>TM</sup> Red probe (relative to cells treated with control plasma). Significance was determined by a Pearson correlation and  $p < 0,05$  was considered significant. OVA, ovalbumin; FLT4, gene coding for VEGFR-3; VEGFR-3, vascular endothelial growth factor receptor 3; PDPN; gene coding for podoplanin.



**Figure S5. Experimental design.** (A – E) Clinical characteristic of COVID-19 convalescent plasma donors were assessed. EVs within CCP were characterized (A). Following the incubation of CCP on aHDLEC, cells were treated with a pro-inflammatory cocktail of cytokines (IFN $\gamma$  [10 ng/ml], IL-6 [20 ng/ml] and TNF $\alpha$  [20 ng/ml]). Flow cytometry analysis for cell viability, mitochondrial ROS production and cell cycle were performed (B). Endothelial activation (C), permeability (D), and protein expression (E) were also analyzed. CCP, COVID-19 convalescent plasma; EVs, extracellular vesicles; aHDLEC, adult human dermal lymphatic endothelial cells; ROS, reactive oxygen species; IFN $\gamma$ , interferon gamma; IL-6, interleukin 6; TNF $\alpha$ , tumor necrosis factor alpha. *Created with BioRender.com*



**Figure S6. Flow cytometry plots gating for the identification of extracellular vesicles.** **A.** Megamix (180- to 1300-nm silica beads and 110- and 500-nm fluorescent latex Apogee beads) and filter of 405/40 gated with CFSE (side scatter-height). **B.** Count Beads (3- $\mu$ m-diameter MP-CB) (forward scatter-height). **C.** Background sample used to eliminate background noise (side scatter-height). **D.** Unlabeled sample used as unstained sample for gating strategy (side scatter-height). Single stained samples were used for gating strategy. As controls, detergent Triton X-100 was added to the antibody mix to verify the membrane of EVs. Single stained (**E**) and depletion using Triton X-100 (**F**) of CD45<sup>+</sup> EVs. Single stained (**G**) and depletion (**H**) of CLEC2<sup>+</sup> EVs. Single stained (**I**) and depletion (**J**) of podoplanin<sup>+</sup> EVs. Single stained (**K**) and depletion (**L**) of CD62e<sup>+</sup> EVs. Single stained (**M**) and depletion (**N**) of CD235a<sup>+</sup> EVs. SSC, side scatter; FSC-H, forward scatter-height; CFSE, carboxyfluorescein succinimidyl ester; MHCI, major histocompatibility complex I; PDPN, podoplanin; CLEC2, C-type lectin-like type II; EVs, extracellular vesicles.

Table S1– List of conjugated antibodies and markers used for flow cytometry

<b>Antibodies/ Proteins</b>	<b>Fluoro.</b>	<b>Excitation (nm)</b>	<b>Emission (nm)</b>	<b>Company</b>	<b>Catalogue</b>	<b>Dilution or Conc.</b>
<b>CFSE</b>	FITC	488	530/30	Cedarlane	S8269-10MG	1/5000
<b>MHC I</b>	PE	488	575/25	BD Biosciences	555553	1/200
<b>CD235a</b>	BV786	405	780/60	BD Biosciences	740984	1/500
<b>CD45</b>	V500	405	525/50	BD Biosciences	560777	1/100
<b>CLEC2</b>	APC	640	670/30	BioLegend	372005	1/50
<b>CD62e</b>	BV605	405	610/20	BD Biosciences	563359	1/75
<b>Podoplanin</b>	PerCP-Cy5.5	488	695/40	BioLegend	337011	1/100
<b>Annexin V</b>	V450	405	450/40	BD Biosciences	560506	1µL/test
<b>PI*</b>		488	610/20	Biotium	40017	2,5µg/mL
<b>PI**</b>		488	610/20	Sigma	P4170-25MG	50µg/mL
<b>MitoSOX™ Red</b>		510	575/25	Thermo Fisher	M36008	1,67µM

Fluoro, fluorochrome; Conc, concentration; CFSE, carboxyfluorescein succinimidyl ester; MHC I, major histocompatibility complex I; CLEC2, C-type lectin-like type II; PI\*, propidium iodide used for cell viability; PI\*\*, propidium iodide used for cell cycle distribution.

Table S2– List of sequences for PCR primers used throughout the study

Genes	Primers sequence (5' → 3')
<i>ACTB</i>	F : GACGACATGGAGAAAATCTG R : ATGATCTGGGTCATCTTCTC
<i>ICAM1</i>	F : ACCATCTACAGCTTTCCG R : TCACACTTCACTGTCACC
<i>SELE</i>	F : GAGAATTCACCTACAAGTCC R : AGGCTTGAACATTTTACCAC
<i>FLT4</i>	F : GAGCAGATAGAGAGCAGGCAT R : ACATTCTGGCCAGGTCCTTTAC
<i>PDPN</i>	F : AAGATGGTTTGTCAACAGTG R : GTACCYYCCCGACATTTTTC
<i>CDH5</i>	F : CGCAATAGACAAGGACATAAC R : TATCGTGATTATCCGTGAGG

F, forward; R, reverse; *ACTB*, gene coding for  $\beta$ -actin; *ICAM1*, gene coding for intercellular adhesion molecule 1; *SELE*, gene coding for E-selectin; *FLT4*, gene coding for vascular endothelial growth factor receptor 3; *PDPN*, gene coding for podoplanin; *CDH5*, gene coding for VE-Cadherin.

Questionnaire

**Multicentre Study to Evaluate the Safety and Efficacy of Convalescent Plasma in the Treatment of COVID-19: Convalescent Plasma Donor Component.**

<b>Participant ID number</b>	_____
<b>Origin of infection</b>	
Travel abroad	<input type="checkbox"/>
Community transmission	<input type="checkbox"/>
Unknown	<input type="checkbox"/>

<b>Symptoms</b>	
Date of onset of symptoms	____ / ____ / ____
Date of positive test result	____ / ____ / ____
End date of symptoms	____ / ____ / ____

<b>Symptoms: types and severity</b>	
Overall health condition	<input type="checkbox"/> Fever <input type="checkbox"/> Fatigue
Respiratory	<input type="checkbox"/> Cough <input type="checkbox"/> Difficulty breathing
Digestive	<input type="checkbox"/> Nausea





<p>Did you require mechanical ventilation/Were you intubated?</p>	<p><input type="checkbox"/> Yes</p> <p><input type="checkbox"/> No</p>
---	--

<p style="text-align: center;"><b>Post-test</b></p>	
<p>Were you tested for the virus after symptoms ceased/disappeared?</p>	<p><input type="checkbox"/> Yes</p> <p><input type="checkbox"/> No</p>
<p>If yes, what was the result of this test?</p>	<p><input type="checkbox"/> Positive</p> <p><input type="checkbox"/> Negative</p>

<p><b>Completed by:</b></p> <p>_____</p>	<p><b>DATE :</b></p> <p>____/____/____</p> <p><b>DATE:</b></p> <p>____/____/____</p>
--	--

## Chapitre 3 – Discussion

Dans le cadre de ma maîtrise et dans le contexte de la pandémie COVID-19, j'ai tenté de mieux comprendre l'impact de la thérapie par plasma convalescent sur le système lymphatique. Le nombre d'individus atteints par le SARS-CoV-2 augmente de manière exponentielle et la maladie reste un fléau pour l'humanité [2]. Malgré l'avancement de la vaccination générale et le développement de nouvelles options thérapeutiques et préventives, certaines personnes demeurent infectées et hospitalisées. De plus, leur corps restent à risque d'une défaillance multi-organes suivant la tempête inflammatoire [88]. La thérapie par plasma convalescent permettrait de prévenir ces conséquences et de potentiellement réduire le risque de mortalité. Or, une sélection adéquate du CCP demeure primordiale pour optimiser son effet bénéfique, tout en limitant ses effets néfastes sur l'hôte. Étant donné l'importance que revêt le système lymphatique dans la clairance des cellules immunitaires et autres modulateurs pro-inflammatoires des tissus périphériques, une atteinte à son intégrité pourrait compromettre cette fonction vitale [108]. En effet, une déficience de clairance ou de contraction au niveau des vaisseaux collecteurs pourrait compromettre la clairance des débris et cytokines pro-inflammatoire hors des tissus atteints et favoriser l'internalisation de ces cytokines dans les cellules lymphatiques. Également, les cytokines et autres constituants de l'ultrafiltrat plasmatique pourrait porter atteinte à l'intégrité des vaisseaux collecteurs et engendrer une stagnation de la lymphe contenant ces médiateurs pro-inflammatoire au sein du réseau lymphatique. Ainsi, l'impact du plasma convalescent de la COVID-19 sur le système lymphatique doit être davantage étudié.

De ce fait, nous avons procédé à l'identification d'une signature particulière de CCP qui pourrait être bénéfique pour l'intégrité du système lymphatique. Nous avons soumis un endothélium lymphatique à une condition d'inflammation afin de mimer en partie la tempête cytokinique observée chez les patients sévèrement infectés [22, 139]. Nous avons par la suite caractérisé du plasma provenant de patients convalescents à la COVID-19. Pour ce faire, nous avons mesuré la concentration de cytokines pro- et anti-inflammatoires, la concentration d'anticorps anti-SARS-CoV-2, ainsi que la concentration de cholestérol total. Nous avons également caractérisé les EVs présents dans le plasma convalescent. Suivant la caractérisation du plasma, nous avons procédé à son incubation sur un endothélium lymphatique. De même, nous avons pris en considération plusieurs caractéristiques démographiques des donneurs, soit le sexe,

l'âge, la sévérité des symptômes expérimentés, la durée des symptômes et la durée entre le début des symptômes et le prélèvement de sang. Nos résultats démontrent qu'un don précoce post-infection de CCP, soit un don donné rapidement après le début des symptômes du donneur, pourrait protéger contre le dysfonctionnement lymphatique, car il contient des vésicules extracellulaires dérivés de cellules endothéliales lymphatiques (LEC-EVs, *lymphatic endothelial cells-derived extracellular vesicles*) circulants [91]. A l'inverse, un don de CCP tardif post-infection pourrait favoriser la perte d'intégrité endothéliale, ainsi qu'accroître la perméabilité de l'endothélium lymphatique *in vitro* et *in vivo*. Ainsi, un drainage lymphatique dysfonctionnel pourrait altérer la clairance des cellules immunitaires et des médiateurs pro-inflammatoires, conduisant à l'exacerbation de l'inflammation chez les patients infectés par la COVID-19. Étant donné l'abondance de LEC-EVs retrouvés dans le plasma convalescent donné rapidement après le début des symptômes, nous supposons que leur sécrétion par l'endothélium altéré des donneurs pourrait être un signal d'alarme qui déclenche, chez le patient receveur, l'autodéfense des vaisseaux lymphatiques périphériques contre une inflammation excessive.

### **3.1 Vésicules extracellulaires : importants biomarqueurs**

Dans le cadre de ce projet, nous avons caractérisé les populations d'EVs contenues dans le plasma convalescent de patients présentant la COVID-19, en nous concentrant sur les EVs issues des leucocytes totaux, des plaquettes, des érythrocytes ainsi que des cellules endothéliales sanguines et lymphatiques [91]. Dans cette étude, nous avons mis en évidence une concentration plus élevée d'EVs CD45<sup>-</sup> podoplanin<sup>+</sup> (c'est-à-dire des LEC-EVs) dans les prélèvements précoces post-infections de plasma convalescent par rapport aux dons obtenus tardivement par les patients convalescents, alors que les niveaux d'EVs provenant des leucocytes, des cellules endothéliales sanguines, des plaquettes et des érythrocytes demeurent inchangés en fonction du moment du prélèvement. Voulant déterminer la raison pour laquelle les LEC-EVs sont plus abondants dans les prélèvements précoces post-infections, nous avons étudié leur impact sur l'endothélium lymphatique.

#### *Messagers intercellulaires*

Les EVs représentent d'importants messagers intercellulaires, car elles peuvent transporter des microARN, des lipides, des protéines et des facteurs de croissances et sont présent dans la lymphe [104, 140]. Dans notre étude, les LEC-EVs ont été corrélées à une augmentation de

l'apoptose précoce des cellules endothéliales lymphatiques du derme humain adultes (aHDLEC, *adult human dermal lymphatic endothelial cells*). L'apoptose précoce est un mécanisme de défense initié par les cellules pour éviter ou limiter les dommages cellulaires [141]. Elle est également chargée de favoriser la mort cellulaire sans provoquer d'avantage d'inflammations [142]. Cela diffère de la nécrose, provoquant plus d'inflammation, nuisible pour les cellules entourant la cellule morte [143]. Une étude a d'ailleurs démontré que certains exosomes dérivés de monocytes peuvent induire un effet apoptotique chez des cellules endothéliales lors de maladies inflammatoires [144]. Les EVs servent également de messagers intercellulaires dans la maladie inflammatoire COVID-19. En effet, une étude menée par Krishnamachary et ses collaborateurs a démontré un rôle inhérent des EVs dans la pathologie causée par le virus SARS-CoV-2 [145]. Des EVs provenant de 84 patients ayant divers niveaux de sévérité d'infection ont été prélevées et incubées sur un endothélium pulmonaire humain [145]. L'incubation d'EVs en provenance de patients sévèrement atteints fut associée à l'apoptose des cellules endothéliales, alors que celles provenant de patients non infectés n'a pas induit de mortalité cellulaire [145]. Finalement, les EVs enrichies en marqueurs pro-inflammatoires et pro-coagulants ont permis de distinguer les patients sévèrement atteints de ceux non-infectés par le virus SARS-CoV-2 [145].

Dans notre étude, les LEC-EVs ont aussi été corrélées à une diminution de la perméabilité de l'endothélium lymphatique. Un endothélium lymphatique perméable est nécessaire au niveau des capillaires lymphatique notamment pour permettre une absorption adéquate de l'ultrafiltrat plasmatique. Or, au niveau des vaisseaux collecteurs, les LEC sont liées entre elles avec des jonctions serrées « *zipper-like* », empêchant ainsi la lymphe de fuiter hors des vaisseaux lymphatiques et permettre une propulsion convenable vers les ganglions et, ultimement, vers la circulation sanguine. Une altération de l'intégrité cellulaire et une augmentation de la perméabilité des LEC favoriserait la fuite de la lymphe hors des vaisseaux lymphatique, compromettant ainsi la fonction de clairance, de transport de cellules immunitaires et d'EVs du système lymphatique. Les LEC-EVs présents en grande quantité dans le CCP obtenu précocement post-infection pourraient ainsi être prises en charge par les vaisseaux lymphatiques et servir de biomarqueurs. En effet, les vésicules extracellulaires, retrouvées dans tous les fluides du corps, font d'ailleurs d'excellent biomarqueurs [146]. Une revue de Ciferri *et al.* décrit notamment l'utilisation d'EVs comme biomarqueurs dans divers types de cancers [147]. Également, une étude a rapporté que les patients infectés par la COVID-19 présentaient une concentration élevée d'EVs exprimant le facteur

tissulaire, qui serait associé à la gravité de la maladie [148]. Troyer *et al.* a également démontré une utilité des EVs dans la maladie COVID-19, soit en exprimant des protéines du virus, servant ainsi de leurre pour les anticorps neutralisant [132].

### *Signal d'alarme*

Dans notre étude, les cellules incubées avec du plasma contenant un niveau élevé de LEC-EVs plasmatique ont exprimé des niveaux plus élevés de *FLT4* (gène codant pour VEGFR-3) et *ICAM1*, démontrant une activation de l'endothélium lymphatique suite à l'incubation de CCP riche en LEC-EVs [91]. Étant donné l'impact bénéfique observé des LEC-EVs contenues dans le plasma sur les aHDLEC en culture, nous avons émis l'hypothèse que ces EVs étaient sécrétées par les cellules endothéliales lymphatiques dysfonctionnelles et malades du donneur dans le but de préserver les cellules lymphatiques environnantes. Pour valider cette hypothèse, nous avons examiné l'état des aHDLEC et corrélé leur état à la quantité d'EVs sécrétées en culture. Les résultats observés semblent corroborer nos hypothèses. En effet, les aHDLEC en culture sécrétant la plus grande quantité d'EVs étaient celles se rapprochant d'un état inflammatoire et apoptotique et exprimant moins le VEGFR-3. Dans des conditions pro-inflammatoires, le VEGFR-3 est jugé bénéfique en favorisant la lymphangiogenèse et en augmentant la capacité de contraction lymphatique [115, 149-152]. Cette faible expression de VEGFR-3 démontre ainsi un état altéré de l'endothélium lymphatique.

Les EVs peuvent libérer leur contenu et subséquemment, modifier le métabolisme cellulaire et altérer la fonction des cellules ciblées [140]. Il a été démontré par Barry et ses collaborateurs que les EVs étaient capables de moduler et de réguler l'activation de l'endothélium, notamment en augmentant l'expression d'ICAM-1 [153]. En effet, en utilisant des microparticules sécrétées par les plaquettes, ils ont observé que celles-ci permettaient d'optimiser l'adhésion de monocytes à des cellules endothéliales de veines ombilicales (HUVECs, *human umbilical vein endothelial cells*). Cette augmentation d'adhésion atteignait son maximum 24h suivant l'incubation d'EVs sur l'endothélium [153]. Également, durant l'athérosclérose, les cellules endothéliales sanguines peuvent entrer en apoptose et relâcher des corps apoptotiques en grande quantité [154]. Cela peut donc servir de biomarqueurs à des fins de pronostic. Or, ces corps apoptotiques sécrétés possèdent d'autres fonctions encore peu élucidées. En effet, les corps apoptotiques provenant de cellules endothéliales sanguines matures peuvent induire la prolifération et la différenciation de cellules

progénitrices endothéliales *in vitro* [155]. Les microparticules de cellules endothéliales progénitrices peuvent également engendrer de l'angiogenèse via un transfert de leur contenu en ARNm [156]. Grâce à cette communication intercellulaire, les corps apoptotiques permettent également la relâche de facteurs de croissance, tel que le VEGF, lorsqu'elles sont internalisées par les phagocytes [157]. Une étude de Zerneck *et al.* a aussi mis en évidence la transmission de signaux d'alarme via les EVs, plus particulièrement via les corps apoptotiques de cellules endothéliales sanguines [154]. Ces signaux d'alarme transmis à des cellules survivantes situées à proximité a permis d'induire la production de la chimiokine CXCL12, agissant afin de mobiliser les cellules progénitrices et servant comme facteur anti-apoptotique [154]. Cette boucle de rétroaction autorégulatrice, déclenchée via le transfert de miR-126, a permis de maintenir l'intégrité de l'endothélium [154]. Tang *et al.* a également démontré que des exosomes dérivés de monocytes activés entraînaient la production de molécules d'adhésion, telles qu'*ICAM-1* et *CCL2*, ainsi que de la cytokine IL-6 par des cellules endothéliales suivant l'activation de la voie de signalisation du facteur nucléaire kappa B (NFκB, *nuclear factor kappa B*) [158]. Les EVs peuvent donc servir de signaux d'alarme et modifier la fonction de leur cellule cible. Ceci pourrait expliquer la sécrétion massive de LEC-EVs par un endothélium lymphatique inflammé et apoptotique et l'activation de marqueurs lymphatiques d'un endothélium lymphatique incubé avec un CCP riche en LEC-EVs.

Étant donné la capacité des EVs à agir comme messagers intercellulaire, les LEC-EVs abondants dans le CCP donné précocement post-infection pourraient donc servir de signal d'alarme pour les cellules endothéliales lymphatiques du patient infecté recevant le plasma convalescent. Nonobstant l'impact du CCP sur un endothélium lymphatique, son effet sur un endothélium sanguin demeure toutefois sous-évalué.

### **3.2 Bénéfices des vésicules extracellulaires dérivés de cellules endothéliales sanguines pour l'endothélium sanguin**

Une atteinte endothéliale sanguine suivant la tempête cytokinique est ressentie par les patients sévèrement infectés par la COVID-19 [24, 25, 159]. Compte tenu de l'impact d'un système lymphatique dysfonctionnel sur l'évolution de la sévérité des maladies inflammatoires [160, 161], les traitements proposés afin de contrer cette pandémie devraient idéalement prendre en compte l'effet sur le réseau lymphatique. La sécurité et l'efficacité de la thérapie par plasma convalescent de la COVID-19 ont également été testées par plusieurs essais cliniques [79], or, ses effets sur

l'intégrité du système lymphatique n'ont pas été étudiés. Le système lymphatique demeure méconnu comparativement au système vasculaire sanguin. Suivant le développement de technologies d'imagerie plus avancées, le système lymphatique a attiré davantage d'intérêt au cours des dernières décennies. Malgré l'omniprésence du réseau lymphatique dans l'organisme et son importance primordiale dans l'évolution des pathologies inflammatoire, le système lymphatique est souvent négligé. Lors de ma maîtrise, je me suis penché sur l'identification d'un plasma convalescent de la COVID-19 ayant le moins d'impact délétère sur un endothélium lymphatique [91], essentiel à une bonne clairance des médiateurs pro-inflammatoires hors des tissus et organes de l'hôte [162]. Toutefois, nous avons également effectué les mêmes expériences sur un endothélium vasculaire sanguin, soit sur des cellules endothéliales d'artères coronaires humaines (HCAECs, *human coronary artery endothelial cells*) afin de vérifier si les bénéfices du plasma sont transférables à un endothélium sanguin également.

*Un don de plasma convalescent obtenu précocement promet l'intégrité mitochondriale des cellules endothéliales sanguines*

Un dysfonctionnement au niveau de l'endothélium vasculaire sanguin peut avoir des effets déplorables sur l'avènement de complications subséquentes [163]. Une altération endothéliale peut mener à une multitude de maladies, dont, entre autres, les maladies cardiovasculaires [164], les maladies rénales [165] et cérébrovasculaires [166]. Ainsi, nous avons commencé par étudier l'effet d'un plasma convalescent riche en anticorps anti-SARS-CoV-2, étant donné son importance en tant que critère de sélection du plasma convalescent. Tout d'abord, dans notre étude, nous avons remarqué que la concentration d'anticorps anti-SARS-CoV-2 corrélait positivement avec la perméabilité de l'endothélium lymphatique, traduisant ainsi un effet néfaste sur les aHDLEC [91]. Également, nous avons remarqué que la durée des symptômes des donneurs de plasma était associée à une haute concentration en anticorps, ainsi qu'à une déstabilisation de la balance redox de l'endothélium lymphatique, marqué par la sonde *MitoSOX<sup>TM</sup> Red* [91]. Nous nous sommes donc penchés sur la question à savoir si ces deux caractéristiques du plasma convalescent, soit la concentration en anticorps anti-SARS-CoV-2 et la durée des symptômes du donneur étaient également associées à une détérioration de l'endothélium vasculaire sanguin. En effet, nous souhaitons observer si les caractéristiques protectrices ou délétères du CCP pour le système lymphatique étaient les mêmes que pour le système sanguin. Pour ce faire, nous avons incubé du CCP sur des HCAECs en culture et nous avons mesurés par cytométrie en flux la mortalité

cellulaire, suivant un marquage par Annexine V et par iodure de propidium (PI, *propidium iodide*). Nous avons ensuite constaté que le plasma contenant une grande concentration d'anticorps anti-SARS-CoV-2 n'était pas corrélé à une augmentation de cellules en apoptose tardive, caractérisée par un marquage Annexine V<sup>+</sup> et PI<sup>+</sup> (Figure supp. 1A). Nous avons observé que la durée des symptômes du donneur ne corrélait pas non plus avec la mortalité cellulaire (Figure supp. 1B). Nos précédents résultats ont également démontré que l'incubation d'un plasma convalescent provenant d'un patient ayant éprouvé des symptômes sévères étaient corrélés avec plus d'apoptose tardive et de nécrose chez des aHDLEC [91]. Ceci ne fut toutefois pas le cas chez des cellules endothéliales vasculaires sanguines (Figure supp. 1C). Cela suggère donc que la concentration en anticorps anti-SARS-CoV-2 du CCP ainsi que la durée et la sévérité des symptômes du donneur sont des paramètres influençant uniquement l'intégrité de l'endothélium lymphatique, mais non sanguin. Lors de notre étude, nous avons mis en évidence un autre paramètre à prendre en considération lors de la sélection du CCP pour en optimiser ses bienfaits.

En effet, nous avons ensuite constaté que les aHDLEC exposées à des prélèvements tardifs de CCP exprimaient une production accrue de ROS mitochondriaux et une augmentation de la perméabilité de l'endothélium lymphatique, ce qui pourrait être potentiellement nuisible [91]. L'un des rôles clés du système lymphatique est de drainer l'excès de fluides des tissus interstitiels, contenant des débris cellulaires, des cellules immunitaires et des médiateurs pro-inflammatoires [162]. Ainsi, un endothélium lymphatique perturbé altérerait la clairance des fluides interstitiels, et favoriserait l'accumulation de cellules immunitaires et de médiateurs pro-inflammatoires, ce qui pourrait conduire à une défaillance des organes [162] [167]. De ce fait, nous voulions vérifier si le temps de prélèvement du plasma convalescent était également associé à un effet bénéfique sur l'endothélium sanguin.

Nous avons ainsi constaté que les HCAECs exprimaient moins la NADH déshydrogénase 1 alpha subcomplexe sous-unité 9 (NDUFA9, *NADH:Ubiquinone Oxidoreductase Subunit A*) et la sous-unité 2 du complexe cytochrome b-c1 (UQCRC2, *Ubiquinol-Cytochrome C Reductase Core Protein 2*) lorsqu'elles étaient incubées avec un plasma convalescent obtenu tardivement après le début des symptômes (Figure supp. 1D et 1E). La NDUFA9 est une sous unité essentielle pour l'assemblage et la stabilité du complexe I, premier et plus grand complexe de la chaîne respiratoire mitochondriale [168]. Le complexe I, en forme de L, comprends 45 sous-unités qui sont encodés



par l'ADN mitochondrial [168]. Ce complexe se divise en 3 fractions fonctionnelles essentielles dans la phosphorylation oxydative (OXPHOS, *Oxidative phosphorylation*) [168]. Une déficience de ce complexe est un des défauts les plus commun du système OXPHOS [168]. Des dysfonctions de ce système peuvent engendrer plusieurs maladies dévastatrices [169]. Une mutation du gène *NDFUA2* détecté dans le tissu musculaire et les fibroblastes fut détecté chez un patient [168]. Cette mutation a causé une dépolarisation significative de potentiel de membrane mitochondrial, influençant de ce fait sa fonction [168]. Un phénotype de mortalité néonatale fut reporté chez un patient ayant une mutation du gène *NDFUA9* [170]. Ceci serait notamment une autre cause potentielle du syndrome de Leigh, maladie sévère neurologique, caractérisée par des lésions nécrotiques bilatérales symétrique dans le thalamus, le tronc cérébral et les colonnes postérieurs de la moelle épinière [171]. Une sous-expression du gène *NDFUA9* pourrait ainsi avoir des conséquences sur le fonctionnement de la cellule endothéliale sanguine des patients infectés par la COVID-19 recevant la thérapie par plasma convalescent.

La protéine UQCRC2 est, quant-à-elle, essentielle pour le fonctionnement du complexe III de la chaîne respiratoire mitochondriale [172]. Une déficience enzymatique du complexe III de la mitochondrie est responsable de maladies rares, tels que le syndrome de Bjornstad, le syndrome GRACILE et le syndrome de Leigh pouvant causer de graves complications dont entre autres de l'hypoglycémie, de l'acidose lactique, de la kétose, un retard de développement intra-utérin ainsi qu'une insuffisance hépatique [172, 173]. Dans le cas de UQCRC2, une épilepsie et un délai de développement furent notés suite à une mutation de ce gène [174]. Une baisse d'expression de ces gènes entraine donc une dysfonction mitochondriale, menant à une perte de fonction des cellules endothéliales. Ceci traduit ainsi le potentiel impact bénéfique de l'incubation d'un CCP obtenu précocement sur l'endothélium sanguin et sur l'endothélium lymphatique, tel que démontré par une perméabilité et une production de ROS réduite [91].

#### *Activation de l'endothélium sanguin par les vésicules extracellulaire dérivés des cellules endothéliales sanguines*

Sachant que les LEC-EVs ont été corrélées à une augmentation de l'apoptose précoce, mais surtout à une diminution de la perméabilité de l'endothélium lymphatique, nous supposons que les EVs sont utilisées comme signal d'alarme pour avertir les cellules cibles de l'hôte [91]. En effet, dans notre étude, les aHDLEC incubées avec du plasma contenant un niveau élevé de LEC-EVs

ont exprimé des niveaux plus élevés de *FLT4* et *ICAM1*, démontrant une activation de l'endothélium lymphatique suite à l'incubation de CCP riche en LEC-EVs [91]. Nous supposons que les EVs dérivées de l'endothélium vasculaire sanguin (BEC-EVs, *blood endothelial cells-derived extracellular vesicles*) produiraient un effet de signal d'alarme similaire sur les cellules endothéliales sanguines. Nous avons donc incubé du plasma convalescent riche en BEC-EVs (identifiées à l'aide d'un marquage CD45<sup>-</sup> CD62e<sup>+</sup>) sur des HCAECs en culture. Nous avons constaté que l'incubation avec un plasma pauvre en BEC-EVs était corrélées à davantage de cellules en apoptose tardive ou nécrose, caractérisées par un marquage par l'Annexine V et PI (Figure supp. 2A). Également, un plasma riche en BEC-EVs est associé à une augmentation de l'expression de l'ARNm d'*ICAM1* et de la sous-unité 1 du facteur nucléaire kappa B (*NFκB1*, *nuclear factor-kappa B subunit 1*) par les HCAECs en culture (Figure supp. 2B et 2C), démontrant ainsi une activation de l'endothélium sanguin en culture suivant l'incubation avec des BEC-EVs. Ceci soutient l'hypothèse des EVs utilisées comme signal d'alarme. En effet, ces BEC-EVs produites en grande quantité par le donneur de CCP pourraient être internalisées par les cellules endothéliales sanguines de l'hôte et modifier leurs fonctions afin d'exprimer des marqueurs retrouvés lors d'une inflammation, préparant ainsi les cellules à s'adapter à l'inflammation généralisée observée lors de la COVID-19. Cette surexpression d'*ICAM1* et *NFκB* coïnciderait également avec la diminution d'expression de la forme phosphorylée de VE-Cadhérine (Figure supp. 2D). Lors d'un processus inflammatoire, l'endothélium vasculaire sanguin augmente l'expression de certaines molécules d'adhésion facilitant l'adhésion de monocytes et cellules immunitaires pouvant combattre l'agent pathogène [27]. Or, ces cellules immunitaires doivent parfois procéder à l'extravasation à travers l'endothélium [27], diminuant ainsi l'adhérence des cellules endothéliales entre elles, expliquant cette baisse d'expression de VE-Cadhérine. Une étude menée par Gotsch et ses collaborateurs a démontré que VE-Cadhérine participait au processus d'extravasation des leucocytes à travers l'endothélium [175]. Suite à l'injection d'un anticorps monoclonal bloquant l'agrégation de VE-Cadhérine, ils ont observé une augmentation de la migration des neutrophiles à travers l'endothélium [175]. Également, il a été démontré que l'amarrage des neutrophiles à la surface apicale des cellules endothéliales en culture a provoqué la dégradation de la β-caténine associée à la VE-cadhérine et a mené à une augmentation de la perméabilité de l'endothélium pour les macromolécules [176]. Ainsi, les BEC-EVs pourraient adhérer aux HCAECs ou être internalisés et activer la même voie de signalisation que les

leucocytes adhérents permettant cette augmentation de perméabilité de l'endothélium et facilitant l'extravasation. Nos résultats suggèrent donc que les EVs serviraient de signal d'alarme pour les cellules endothéliales lymphatiques et vasculaires en favorisant notamment l'activation de l'endothélium, mais aussi en régulant l'expression de marqueurs propres à l'inflammation, tels que VEGFR-3 et VE-Cadhérine pour l'endothélium lymphatique et vasculaire respectivement. Cette fonction de signal d'alarme ne serait donc pas uniquement liée au système lymphatique, mais aussi au système vasculaire sanguin, mettant davantage l'accent sur la sélection de CCP riche en LEC-EVs et BEC-EVs afin d'optimiser les bénéfices de la thérapie chez les patients infectés par la COVID-19.

*Abondance de vésicules extracellulaires dérivées des cellules endothéliales sanguines dans le plasma convalescent des individus à symptômes légers*

Par la suite, étant donné l'effet bénéfique d'un plasma riche en LEC-EVs sur un endothélium lymphatique en culture, nous souhaitons identifier quelles caractéristiques du CCP pouvaient être corrélées à une concentration élevée de LEC-EVs [91]. Nous avons ainsi mis en évidence que les dons de CCP précoces après le début des symptômes contenaient davantage de LEC-EVs. Or, les niveaux de EVs de sous-groupes différents, incluant les BEC-EVs, restent stables indépendamment du temps de prélèvement du CCP [91]. Par conséquent, nous souhaitons identifier quel plasma convalescent était associé à une concentration élevée de BEC-EVs. Nous avons ainsi corrélé les niveaux de BEC-EVs en fonction de diverses caractéristiques démographiques et plasmatiques des donneurs de CCP. Nous avons constaté que le plasma provenant de patients ayant éprouvés des symptômes légers était associé à une concentration élevée de BEC-EVs (Figure supp. 3A). Également, le plasma provenant de patients plus jeunes était corrélé à un plus haut niveau de BEC-EVs (Figure supp. 3B). Finalement, nous avons observé que le plasma contenant moins d'anticorps anti-SARS-CoV-2 était corrélé à une plus grande concentration de BEC-EVs (Figure supp. 3C). Or, à l'aide d'un modèle multivarié, une colinéarité parmi les variables de sévérité des symptômes et l'âge des donneurs fut observée. Dans le modèle multivarié, la sévérité des symptômes était la seule variable indépendamment associée aux taux de BEC-EVs ( $\beta = -0.456, p = 0.018$ ). En incluant la concentration d'anticorps anti-SARS-CoV-2, on ne parvient pas à atteindre la significativité statistique pour cette variable ( $\beta = -0.163, p = 0.377$ ).

Il a été soulevé que les cellules immunitaires chez les patients infectés par le SARS-CoV-2 étaient dérégulées et dysfonctionnelles lors de l'infection [177]. Une diminution des lymphocytes T et B fut également observée parmi les patients infectés par la COVID-19 [178] [179]. Une diminution de cellules B fut également associée à un mauvais pronostic des patients sévèrement infectés par la COVID-19 [179]. De ce fait, une sélection adéquate du plasma convalescent de la COVID-19 est primordiale pour optimiser ses bienfaits et limiter les effets néfastes potentiels sur l'organisme. Selon les résultats démontrés dans ce mémoire, un CCP donné précocement après la fin des symptômes du donneur, provenant d'un patient ayant éprouvé des symptômes légers et ayant des anticorps fonctionnels est à privilégier pour la thérapie par plasma convalescent de la COVID-19. Identifier un plasma convalescent riche en BEC-EVs et LEC-EVs pourrait également favoriser les chances de rémission des patients et contribuer au maintien de l'intégrité de l'endothélium sanguin et lymphatique. Or, mesurer la concentration en LEC-EVs et BEC-EVs d'un CCP nécessite des moyens qui peuvent se révéler coûteux en termes de temps, de main d'œuvre et d'argent. Ce projet a donc permis d'identifier certaines caractéristiques du plasma convalescent qui sont corrélés à une haute concentration de LEC-EVs et BEC-EVs afin de faciliter sa sélection auprès des milieux hospitaliers. Ces résultats démontrent ainsi l'importance de sélectionner adéquatement le CCP à utiliser à des fins thérapeutiques afin d'optimiser ses effets bénéfiques sur le patient infecté et hospitalisé. Ceci demeure essentiel pour d'éventuelles pandémies et/ou épidémies où la thérapie de plasma convalescent pourraient potentiellement être avantageuse.

### **3.3 Impact de la vaccination**

Les résultats obtenus démontrent l'importance que revêt une sélection adéquate du plasma convalescent de la COVID-19 afin d'optimiser ses bénéfices lorsqu'il est incubé sur un endothélium sanguin ou lymphatique. Les constituants plasmatiques, tels que les anticorps et les EVs ont été caractérisés et sont important dans le maintien de l'intégrité de l'endothélium. Or, le plasma étudié fut collecté bien avant l'apparition des vaccins contre le SARS-CoV-2. Il est ainsi important de prendre en considération l'impact de la vaccination sur la thérapie par plasma convalescent, étant donné que plus de 4.5 milliards d'individus sont entièrement vaccinés [2].

La vaccination contre la COVID-19 a permis de stimuler la réponse immunitaire chez les individus préalablement infectés en augmentant notamment la concentration d'anticorps neutralisants anti-SARS-CoV-2 produits [180]. Une étude menée par Tang et ses collaborateurs a

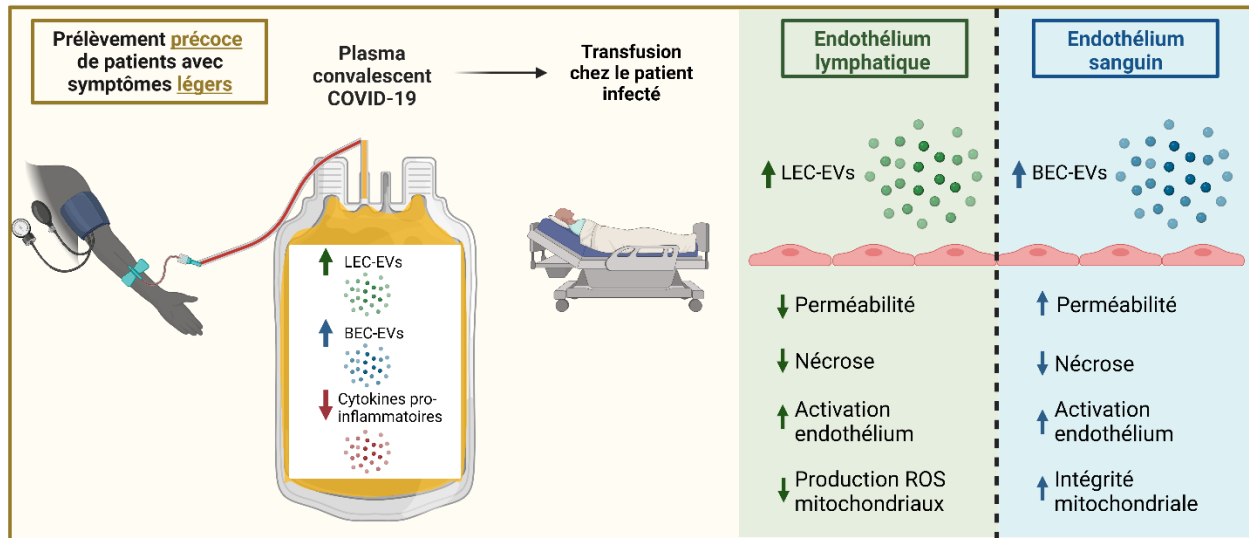
permis d'étudier l'affinité des anticorps présents dans le sérum de patients non-infectés et convalescents suivant la vaccination contre la COVID-19 [181]. Ils ont découvert des niveaux d'anticorps neutralisants plus élevés chez les adultes convalescents par rapport aux adultes non-infectés [181]. Également, la liaison des anticorps au domaine de liaison au récepteur (RBD, *receptor binding domain*) a montré une liaison plus faible des sérums post-vaccination des individus non-infectés par rapport aux individus convalescents [181]. De plus, ils ont observé une maturation précoce de l'affinité des anticorps chez les individus convalescents après une dose de vaccin et une affinité des anticorps plus élevée après deux doses par rapport au groupe non-infecté [181].

Également, la vaccination, par l'utilisation d'adjuvant, promeut la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires [182]. En effet, les DCs produisant de l'interféron de type I et d'autres cellules qui ont absorbé les acides nucléiques dérivés du vaccin peuvent délivrer un signal à la fois antigénique et inflammatoire aux lymphocytes T dans les ganglions lymphatiques drainant le site d'injection du vaccin [182]. Cette production d'interféron de type I induite par le vaccin est connue pour favoriser la différenciation des cellules T effectrices CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> produisant des médiateurs inflammatoires et cytotoxiques, et des cellules T folliculaires auxiliaires, qui stimulent la différenciation des cellules B en plasmocytes sécrétant des anticorps [182]. De ce fait, l'interféron de type I stimulé par le vaccin amplifie la mémoire des lymphocytes T et favorise la différenciation et la survie des lymphocytes B, suggérant ainsi que l'inflammation associée au vaccin peut favoriser la génération et la perpétuation de la mémoire immunologique à long terme [182]. Ainsi, la thérapie par plasma convalescent utilisant du plasma provenant d'individus vaccinés et préalablement infecté pourrait être privilégiée. De plus, identifier le moment optimal pour le don de plasma convalescent selon la date de vaccination sera facilité [183].

## Chapitre 4 – Conclusion

Malgré l'avancement de la vaccination et des nombreuses thérapies actuellement disponible, les décès dus à la COVID-19 sont toujours observés. Les individus sévèrement infectés sont aux prises avec une tempête inflammatoire généralisée, causée par la sécrétion massive de cytokines pro-inflammatoires pouvant entraîner une dysfonction endothéliale et mener à des maladies cardiovasculaires, la défaillance de plusieurs organes et même la mort. La thérapie par plasma convalescent, sélectionné essentiellement à partir du taux d'anticorps anti SARS-CoV-2, a fait ses preuves lors d'épidémies antérieures. Or, son efficacité ne fut pas concluante pour combattre la COVID-19. Parallèlement, un système lymphatique fonctionnel est nécessaire pour une clairance efficace des sites inflammés et le transport des cellules immunitaires aux ganglions lymphatiques. Ainsi, une sélection du plasma convalescent adéquate et efficace basée sur d'autres paramètres doit être investiguée.

Dans notre étude, nous avons identifié que le plasma convalescent de la COVID-19 donné précocément post-infection devrait être privilégié afin de maintenir l'intégrité de l'endothélium lymphatique (Figure 5). Cela aura pour conséquence probable d'optimiser la clairance de cellules immunitaires et médiateurs pro-inflammatoires hors des tissus périphériques et faciliter la résolution de la maladie auprès des patients infectés et hospitalisés. Également, un plasma convalescent donné précocément est associé à une concentration plasmatique élevée de vésicules extracellulaires dérivés de cellules endothéliales lymphatiques. Nous supposons que ces LEC-EVs agiront comme signal d'alarme auprès des cellules endothéliales lymphatiques de l'hôte et préparer l'endothélium à l'inflammation subséquente qui pourrait survenir. De même, auprès d'un endothélium sanguin, un plasma donné précocément possède également des effets bénéfiques, cette fois-ci au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale. Une augmentation des BEC-EVs plasmatiques est aussi corrélée à l'activation de l'endothélium vasculaire sanguin.



**Figure 5. Bénéfices d'un prélèvement précoce de plasma convalescents provenant de patients avec symptômes légers sur un endothélium lymphatique et sanguin.** Schématisation des effets bénéfiques d'un CCP obtenu précocement et riche en LEC-EVs et BEC-EVs sur l'endothélium lymphatique et sanguin de patients infectés par la COVID-19. LEC-EVs, vésicules extracellulaires dérivées de cellules endothéliales lymphatiques; BEC-EVs, vésicules extracellulaires dérivées de cellules endothéliales sanguines; ROS, espèces réactives à l'oxygène; CCP, Plasma convalescent de la COVID-19. (Créé avec BioRender.com)

Ainsi, une sélection adéquate du plasma convalescent de la COVID-19 permettra d'optimiser ses bénéfices auprès des patients infectés et hospitalisés. La caractérisation de nouveaux paramètres plasmatiques et cliniques pour identifier le plasma optimal pour la thérapie par plasma convalescent permettra d'avoir une meilleure prise en charge des patients infectés par la COVID-19 et limiter les conséquences cliniques subséquentes. Les paramètres identifiés, tels que le temps de prélèvement du CCP et les vésicules extracellulaires peuvent également être pris en considération pour l'utilisation de la thérapie par plasma convalescent lors d'éventuelles pandémies. Le rôle des EVs en tant que signal d'alarme lors des maladies inflammatoires se doit d'être étudiée davantage.

## Références bibliographiques

1. Ciotti, M., et al., *COVID-19 Outbreak: An Overview*. *Chemotherapy*, 2019. **64**(5-6): p. 215-223.
2. WHO, *World Health Organization coronavirus disease (COVID-19) dashboard*, in *World Health Organization*. 2020.
3. Lu, R., et al., *Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding*. *The Lancet*, 2020. **395**(10224): p. 565-574.
4. Liu, P.P., et al., *The Science Underlying COVID-19*. *Circulation*, 2020. **142**(1): p. 68-78.
5. Samavati, L. and B.D. Uhal, *ACE2, Much More Than Just a Receptor for SARS-COV-2*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2020. **10**.
6. Beyerstedt, S., E.B. Casaro, and É.B. Rangel, *COVID-19: angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) expression and tissue susceptibility to SARS-CoV-2 infection*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 2021. **40**(5): p. 905-919.
7. Fraga-Silva, R.A., et al., *ACE2 activation promotes antithrombotic activity*. *Mol Med*, 2010. **16**(5-6): p. 210-5.
8. Jackson, C.B., et al., *Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells*. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2022. **23**(1): p. 3-20.
9. Teuwen, L.-A., et al., *COVID-19: the vasculature unleashed*. *Nature Reviews Immunology*, 2020. **20**(7): p. 389-391.
10. Hayawi, K., et al., *Vaccine versus Variants (3Vs): Are the COVID-19 Vaccines Effective against the Variants? A Systematic Review*. *Vaccines*, 2021. **9**(11): p. 1305.
11. Mahase, E., *Covid-19: What do we know about omicron sublineages?* *bmj*, 2022. **376**.
12. Abdullah, F., et al., *Decreased severity of disease during the first global omicron variant covid-19 outbreak in a large hospital in tshwane, south africa*. *International Journal of Infectious Diseases*, 2022. **116**: p. 38-42.
13. Pulliam, J.R.C., et al., *Increased risk of SARS-CoV-2 reinfection associated with emergence of Omicron in South Africa*. *Science*, 2022. **0**(0): p. eabn4947.
14. Arora, P., et al., *Comparable neutralisation evasion of SARS-CoV-2 omicron subvariants BA.1, BA.2, and BA.3*. *Lancet Infect Dis*, 2022.
15. Li, J., et al., *Epidemiology of COVID-19: A systematic review and meta-analysis of clinical characteristics, risk factors, and outcomes*. *Journal of Medical Virology*, 2021. **93**(3): p. 1449-1458.
16. Struyf, T., et al., *Signs and symptoms to determine if a patient presenting in primary care or hospital outpatient settings has COVID-19*. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2021(2).
17. Kochi, A.N., et al., *Cardiac and arrhythmic complications in patients with COVID-19*. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*, 2020. **31**(5): p. 1003-1008.
18. Marshall, J.C., et al., *A minimal common outcome measure set for COVID-19 clinical research*. *The Lancet Infectious Diseases*, 2020. **20**(8): p. e192-e197.



19. Ye, Q., B. Wang, and J. Mao, *The pathogenesis and treatment of the 'Cytokine Storm' in COVID-19*. J Infect, 2020. **80**(6): p. 607-613.
20. Mehta, P., et al., *COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression*. The Lancet, 2020. **395**(10229): p. 1033-1034.
21. Yang, Y., et al., *Plasma IP-10 and MCP-3 levels are highly associated with disease severity and predict the progression of COVID-19*. J Allergy Clin Immunol, 2020. **146**(1): p. 119-127.e4.
22. Wang, J., et al., *Cytokine storm and leukocyte changes in mild versus severe SARS-CoV-2 infection: Review of 3939 COVID-19 patients in China and emerging pathogenesis and therapy concepts*. J Leukoc Biol, 2020. **108**(1): p. 17-41.
23. Liu, B., et al., *Can we use interleukin-6 (IL-6) blockade for coronavirus disease 2019 (COVID-19)-induced cytokine release syndrome (CRS)?* J Autoimmun, 2020. **111**: p. 102452.
24. Rauch, A., et al., *Endotheliopathy is induced by plasma from critically-ill patients and associated with organ failure in severe COVID-19*. Circulation. **0**(0).
25. Amraei, R. and N. Rahimi, *COVID-19, Renin-Angiotensin System and Endothelial Dysfunction*. Cells, 2020. **9**(7).
26. Gustafson, D., et al., *Overcoming Barriers*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2020. **40**(8): p. 1818-1829.
27. Adams, D.H. and S. Shaw, *Leucocyte-endothelial interactions and regulation of leucocyte migration*. The Lancet, 1994. **343**(8901): p. 831-836.
28. Frenette, P.S., et al., *Platelets roll on stimulated endothelium in vivo: an interaction mediated by endothelial P-selectin*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1995. **92**(16): p. 7450-7454.
29. Zaid, Y., et al., *Platelets Can Associate with SARS-Cov-2 RNA and Are Hyperactivated in COVID-19*. Circ Res, 2020. **127**(11): p. 1404-18.
30. Manne, B.K., et al., *Platelet gene expression and function in patients with COVID-19*. Blood, 2020. **136**(11): p. 1317-1329.
31. Mao, L., et al., *Neurologic Manifestations of Hospitalized Patients With Coronavirus Disease 2019 in Wuhan, China*. JAMA Neurology, 2020. **77**(6): p. 683-690.
32. Giannis, D., I.A. Ziogas, and P. Gianni, *Coagulation disorders in coronavirus infected patients: COVID-19, SARS-CoV-1, MERS-CoV and lessons from the past*. J Clin Virol, 2020. **127**: p. 104362.
33. Zhang, Y., et al., *Mechanisms involved in the development of thrombocytopenia in patients with COVID-19*. Thromb Res, 2020. **193**: p. 110-115.
34. Lippi, G., M. Plebani, and B.M. Henry, *Thrombocytopenia is associated with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19) infections: A meta-analysis*. Clin Chim Acta, 2020. **506**: p. 145-148.
35. Subramaniam, S. and I. Scharrer, *Procoagulant activity during viral infections*. Front Biosci (Landmark Ed), 2018. **23**(6): p. 1060-1081.
36. Haffke, M., et al., *Endothelial dysfunction and altered endothelial biomarkers in patients with post-COVID-19 syndrome and chronic fatigue syndrome (ME/CFS)*. Journal of Translational Medicine, 2022. **20**(1): p. 138.

37. Bandopadhyay, P., et al., *Nature and Dimensions of Systemic Hyperinflammation and its Attenuation by Convalescent Plasma in Severe COVID-19*. J Infect Dis, 2021. **224**(4): p. 565-574.
38. Cowan, L.T., et al., *Inpatient and Outpatient Infection as a Trigger of Cardiovascular Disease: The ARIC Study*. J Am Heart Assoc, 2018. **7**(22): p. e009683.
39. Chen, N., et al., *Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study*. The Lancet, 2020. **395**(10223): p. 507-513.
40. Tsang, H.F., et al., *An update on COVID-19 pandemic: the epidemiology, pathogenesis, prevention and treatment strategies*. Expert Review of Anti-infective Therapy, 2021. **19**(7): p. 877-888.
41. Tregoning, J.S., et al., *Progress of the COVID-19 vaccine effort: viruses, vaccines and variants versus efficacy, effectiveness and escape*. Nature Reviews Immunology, 2021. **21**(10): p. 626-636.
42. Polack, F.P., et al., *Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine*. N Engl J Med, 2020. **383**(27): p. 2603-2615.
43. Baden, L.R., et al., *Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine*. N Engl J Med, 2021. **384**(5): p. 403-416.
44. Voysey, M., et al., *Single-dose administration and the influence of the timing of the booster dose on immunogenicity and efficacy of ChAdOx1 nCoV-19 (AZD1222) vaccine: a pooled analysis of four randomised trials*. Lancet, 2021. **397**(10277): p. 881-891.
45. Sadoff, J., et al., *Final Analysis of Efficacy and Safety of Single-Dose Ad26.COV2.S*. N Engl J Med, 2022. **386**(9): p. 847-860.
46. Logunov, D.Y., et al., *Safety and efficacy of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine: an interim analysis of a randomised controlled phase 3 trial in Russia*. The Lancet, 2021. **397**(10275): p. 671-681.
47. Kim, J.H., F. Marks, and J.D. Clemens, *Looking beyond COVID-19 vaccine phase 3 trials*. Nature medicine, 2021. **27**(2): p. 205-211.
48. Ella, R., et al., *Efficacy, safety, and lot-to-lot immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine (BBV152): interim results of a randomised, double-blind, controlled, phase 3 trial*. Lancet, 2021. **398**(10317): p. 2173-2184.
49. Bergwerk, M., et al., *Covid-19 Breakthrough Infections in Vaccinated Health Care Workers*. New England Journal of Medicine, 2021. **385**(16): p. 1474-1484.
50. Zhu, J., et al., *Elevated interleukin-6 is associated with severity of COVID-19: A meta-analysis*. J Med Virol, 2021. **93**(1): p. 35-37.
51. Xu, X., et al., *Effective treatment of severe COVID-19 patients with tocilizumab*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2020. **117**(20): p. 10970-10975.
52. Salama, C., et al., *Tocilizumab in Patients Hospitalized with Covid-19 Pneumonia*. New England Journal of Medicine, 2020. **384**(1): p. 20-30.
53. Tardif, J.C., et al., *Colchicine for community-treated patients with COVID-19 (COLCORONA): a phase 3, randomised, double-blinded, adaptive, placebo-controlled, multicentre trial*. Lancet Respir Med, 2021. **9**(8): p. 924-932.

54. Abani, O., et al., *Convalescent plasma in patients admitted to hospital with COVID-19 (RECOVERY): a randomised controlled, open-label, platform trial*. The Lancet, 2021. **397**(10289): p. 2049-2059.
55. Golchin, A., E. Seyedjafari, and A. Ardeshirylajimi, *Mesenchymal Stem Cell Therapy for COVID-19: Present or Future*. Stem Cell Reviews and Reports, 2020. **16**(3): p. 427-433.
56. Lanzoni, G., et al., *Umbilical cord mesenchymal stem cells for COVID-19 acute respiratory distress syndrome: A double-blind, phase 1/2a, randomized controlled trial*. Stem Cells Translational Medicine, 2021. **10**(5): p. 660-673.
57. Wang, M., et al., *Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro*. Cell Research, 2020. **30**(3): p. 269-271.
58. Kashour, Z., et al., *Efficacy of chloroquine or hydroxychloroquine in COVID-19 patients: a systematic review and meta-analysis*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2020. **76**(1): p. 30-42.
59. Keyaerts, E., et al., *In vitro inhibition of severe acute respiratory syndrome coronavirus by chloroquine*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2004. **323**(1): p. 264-268.
60. Sheahan, T.P., et al., *Comparative therapeutic efficacy of remdesivir and combination lopinavir, ritonavir, and interferon beta against MERS-CoV*. Nature Communications, 2020. **11**(1): p. 222.
61. Beigel, J.H., et al., *Remdesivir for the Treatment of Covid-19 — Final Report*. New England Journal of Medicine, 2020. **383**(19): p. 1813-1826.
62. Wang, Y., et al., *Remdesivir in adults with severe COVID-19: a randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre trial*. The Lancet, 2020. **395**(10236): p. 1569-1578.
63. Hung, I.F.-N., et al., *Triple combination of interferon beta-1b, lopinavir&#x2013;ritonavir, and ribavirin in the treatment of patients admitted to hospital with COVID-19: an open-label, randomised, phase 2 trial*. The Lancet, 2020. **395**(10238): p. 1695-1704.
64. Pfizer, *Pfizer's novel COVID-19 oral antiviral treatment candidate reduced risk of hospitalization or death by 89% in interim analysis of phase 2/3 EPIC-HR study*.
65. Taylor, P.C., et al., *Neutralizing monoclonal antibodies for treatment of COVID-19*. Nature Reviews Immunology, 2021. **21**(6): p. 382-393.
66. Du, L., Y. Yang, and X. Zhang, *Neutralizing antibodies for the prevention and treatment of COVID-19*. Cellular & Molecular Immunology, 2021. **18**(10): p. 2293-2306.
67. Network, J., *An EUA for Bamlanivimab-A monoclonal Antibody for COVID-19*. JAMA Journal of American Medical Association, 2020.
68. Bégin, P., et al., *Convalescent plasma for hospitalized patients with COVID-19: an open-label, randomized controlled trial*. Nature Medicine, 2021. **27**(11): p. 2012-2024.
69. Bloch, E.M., et al., *Deployment of convalescent plasma for the prevention and treatment of COVID-19*. The Journal of Clinical Investigation, 2020. **130**(6): p. 2757-2765.
70. Luczkowiak, J., et al., *Specific neutralizing response in plasma from convalescent patients of Ebola Virus Disease against the West Africa Makona variant of Ebola virus*. Virus Research, 2016. **213**: p. 224-229.
71. van Griensven, J., et al., *Evaluation of Convalescent Plasma for Ebola Virus Disease in Guinea*. N Engl J Med, 2016. **374**(1): p. 33-42.

72. Cheng, Y., et al., *Use of convalescent plasma therapy in SARS patients in Hong Kong*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2005. **24**(1): p. 44-6.
73. Zhang, J.S., et al., *A serological survey on neutralizing antibody titer of SARS convalescent sera*. J Med Virol, 2005. **77**(2): p. 147-50.
74. Hung, I.F., et al., *Convalescent plasma treatment reduced mortality in patients with severe pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus infection*. Clin Infect Dis, 2011. **52**(4): p. 447-56.
75. Arabi, Y., et al., *Feasibility of Using Convalescent Plasma Immunotherapy for MERS-CoV Infection, Saudi Arabia*. Emerging Infectious Disease journal, 2016. **22**(9): p. 1554.
76. Ko, J.H., et al., *Challenges of convalescent plasma infusion therapy in Middle East respiratory coronavirus infection: a single centre experience*. Antivir Ther, 2018. **23**(7): p. 617-622.
77. Luke, T.C., et al., *Meta-Analysis: Convalescent Blood Products for Spanish Influenza Pneumonia: A Future H5N1 Treatment?* Annals of Internal Medicine, 2006. **145**(8): p. 599-609.
78. Frame, J.D., et al., *The use of Lassa fever convalescent plasma in Nigeria*. Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 1984. **78**(3): p. 319-324.
79. Piechotta, V., et al., *Convalescent plasma or hyperimmune immunoglobulin for people with COVID-19: a living systematic review*. Cochrane Database Syst Rev, 2021. **5**(5): p. Cd013600.
80. Joyner, M.J., et al., *Convalescent Plasma Antibody Levels and the Risk of Death from Covid-19*. New England Journal of Medicine, 2021. **384**(11): p. 1015-1027.
81. Acosta-Ampudia, Y., et al., *COVID-19 convalescent plasma composition and immunological effects in severe patients*. Journal of autoimmunity, 2021. **118**: p. 102598.
82. Maor, Y., et al., *Compassionate use of convalescent plasma for treatment of moderate and severe pneumonia in COVID-19 patients and association with IgG antibody levels in donated plasma*. EClinicalMedicine, 2020. **26**: p. 100525.
83. Libster, R., et al., *Early High-Titer Plasma Therapy to Prevent Severe Covid-19 in Older Adults*. N Engl J Med, 2021. **384**(7): p. 610-618.
84. Casadevall, A., M.J. Joyner, and L.A. Pirofski, *SARS-CoV-2 viral load and antibody responses: the case for convalescent plasma therapy*. J Clin Invest, 2020. **130**(10): p. 5112-5114.
85. de Candia, P., et al., *Effect of time and titer in convalescent plasma therapy for COVID-19*. iScience, 2021. **24**(8): p. 102898.
86. Beaudoin-Bussières, G., et al., *Decline of Humoral Responses against SARS-CoV-2 Spike in Convalescent Individuals*. mBio, 2020. **11**(5): p. e02590-20.
87. Mojtabavi, H., A. Saghadzadeh, and N. Rezaei, *Interleukin-6 and severe COVID-19: a systematic review and meta-analysis*. European Cytokine Network, 2020. **31**(2): p. 44-49.
88. Estcourt, L.J., et al., *Effect of Convalescent Plasma on Organ Support-Free Days in Critically Ill Patients With COVID-19: A Randomized Clinical Trial*. Jama, 2021. **326**(17): p. 1690-1702.
89. Sullivan, D.J., et al., *Randomized Controlled Trial of Early Outpatient COVID-19 Treatment with High-Titer Convalescent Plasma*. medRxiv, 2021: p. 2021.12.10.21267485.

90. Korley, F.K., et al., *Early Convalescent Plasma for High-Risk Outpatients with Covid-19*. New England Journal of Medicine, 2021. **385**(21): p. 1951-1960.
91. Amri, N., et al., *Use of Early Donated COVID-19 Convalescent Plasma Is Optimal to Preserve the Integrity of Lymphatic Endothelial Cells*. Pharmaceuticals (Basel), 2022. **15**(3).
92. Suy, R., S. Thomis, and I. Fourneau, *The discovery of the lymphatics in the seventeenth century. Part iii: the dethroning of the liver*. Acta Chirurgica Belgica, 2016. **116**(6): p. 390-397.
93. Butler, M.G., S. Isogai, and B.M. Weinstein, *Lymphatic development*. Birth Defects Res C Embryo Today, 2009. **87**(3): p. 222-31.
94. Bekker, J. and S. Meijer, *[The historical perspective of the sentinel lymph node concept]*. Ned Tijdschr Geneesk, 2008. **152**(1): p. 38-45.
95. Wigle, J.T. and G. Oliver, *Prox1 function is required for the development of the murine lymphatic system*. Cell, 1999. **98**(6): p. 769-78.
96. Karkkainen, M.J., et al., *Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins*. Nature immunology, 2004. **5**(1): p. 74-80.
97. Jeltsch, M., et al., *Hyperplasia of Lymphatic Vessels in VEGF-C Transgenic Mice*. Science, 1997. **276**(5317): p. 1423-1425.
98. Osada, M., et al., *Platelet activation receptor CLEC-2 regulates blood/lymphatic vessel separation by inhibiting proliferation, migration, and tube formation of lymphatic endothelial cells*. J Biol Chem, 2012. **287**(26): p. 22241-52.
99. Oliver, G., et al., *The Lymphatic Vasculature in the 21(st) Century: Novel Functional Roles in Homeostasis and Disease*. Cell, 2020. **182**(2): p. 270-296.
100. Baluk, P., et al., *Functionally specialized junctions between endothelial cells of lymphatic vessels*. Journal of Experimental Medicine, 2007. **204**(10): p. 2349-2362.
101. Alitalo, K., *The lymphatic vasculature in disease*. Nature Medicine, 2011. **17**(11): p. 1371-1380.
102. Tammela, T. and K. Alitalo, *Lymphangiogenesis: Molecular mechanisms and future promise*. Cell, 2010. **140**(4): p. 460-76.
103. Muthuchamy, M. and D. Zawieja, *Molecular Regulation of Lymphatic Contractility*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2008. **1131**(1): p. 89-99.
104. Milasan, A., et al., *Extracellular vesicles are present in mouse lymph and their level differs in atherosclerosis*. J Extracell Vesicles, 2016. **5**: p. 31427.
105. Foster, R.S., Jr., *General anatomy of the lymphatic system*. Surg Oncol Clin N Am, 1996. **5**(1): p. 1-13.
106. Martel, C., et al., *Lymphatic vasculature mediates macrophage reverse cholesterol transport in mice*. J Clin Invest, 2013. **123**(4): p. 1571-9.
107. Jeltsch, M., et al., *Genesis and pathogenesis of lymphatic vessels*. Cell and tissue research, 2003. **314**(1): p. 69-84.
108. Jones, D. and W. Min, *An overview of lymphatic vessels and their emerging role in cardiovascular disease*. Journal of cardiovascular disease research, 2011. **2**(3): p. 141-152.

109. Cursiefen, C., et al., *VEGF-A stimulates lymphangiogenesis and hemangiogenesis in inflammatory neovascularization via macrophage recruitment*. The Journal of clinical investigation, 2004. **113**(7): p. 1040-1050.
110. Chaitanya, G., et al., *Differential cytokine responses in human and mouse lymphatic endothelial cells to cytokines in vitro*. Lymphatic research and biology, 2010. **8**(3): p. 155-164.
111. Schoppmann, S.F., et al., *Tumor-associated macrophages express lymphatic endothelial growth factors and are related to peritumoral lymphangiogenesis*. The American journal of pathology, 2002. **161**(3): p. 947-956.
112. Dieu, M.-C., et al., *Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites*. The Journal of experimental medicine, 1998. **188**(2): p. 373-386.
113. Mahase, E., *Covid-19: Schedule breast screening before vaccine or 4 to 6 weeks after to avoid false positives, says guidance*. BMJ, 2021. **372**: p. n617.
114. Harvey, N.L., et al., *Lymphatic vascular defects promoted by Prox1 haploinsufficiency cause adult-onset obesity*. Nature genetics, 2005. **37**(10): p. 1072-1081.
115. Milasan, A., A. Smaani, and C. Martel, *Early rescue of lymphatic function limits atherosclerosis progression in Ldlr(-/-) mice*. Atherosclerosis, 2019. **283**: p. 106-119.
116. Jean, G., et al., *Extracellular vesicles can be friends or foes in atherosclerosis-related lymphatic dysfunction*. Atherosclerosis Supplements, 2018. **32**: p. 93.
117. Théry, C., et al., *Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines*. Journal of Extracellular Vesicles, 2018. **7**(1): p. 1535750.
118. Jimenez, J.J., et al., *Endothelial cells release phenotypically and quantitatively distinct microparticles in activation and apoptosis*. Thrombosis Research, 2003. **109**(4): p. 175-180.
119. Raposo, G. and W. Stoorvogel, *Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends*. Journal of Cell Biology, 2013. **200**(4): p. 373-383.
120. Caruso, S. and I.K.H. Poon, *Apoptotic Cell-Derived Extracellular Vesicles: More Than Just Debris*. Frontiers in Immunology, 2018. **9**.
121. Yokoi, A. and T. Ochiya, *Exosomes and extracellular vesicles: Rethinking the essential values in cancer biology*. Seminars in Cancer Biology, 2021. **74**: p. 79-91.
122. Milasan, A., M. Farhat, and C. Martel, *Extracellular Vesicles as Potential Prognostic Markers of Lymphatic Dysfunction*. Front Physiol, 2020. **11**: p. 476.
123. Buzas, E.I., et al., *Emerging role of extracellular vesicles in inflammatory diseases*. Nature Reviews Rheumatology, 2014. **10**(6): p. 356-364.
124. Densmore, J.C., et al., *ENDOTHELIUM-DERIVED MICROPARTICLES INDUCE ENDOTHELIAL DYSFUNCTION AND ACUTE LUNG INJURY*. Shock, 2006. **26**(5): p. 464-471.
125. Leroyer, A.S., et al., *Cellular origins and thrombogenic activity of microparticles isolated from human atherosclerotic plaques*. Journal of the American College of Cardiology, 2007. **49**(7): p. 772-777.
126. Oggero, S., et al., *Extracellular vesicles from monocyte/platelet aggregates modulate human atherosclerotic plaque reactivity*. J Extracell Vesicles, 2021. **10**(6): p. 12084.

127. Wadey, R.M., et al., *Inflammatory adipocyte-derived extracellular vesicles promote leukocyte attachment to vascular endothelial cells*. *Atherosclerosis*, 2019. **283**: p. 19-27.
128. Pironti, G., D.C. Andersson, and L.H. Lund, *Mechanistic and Therapeutic Implications of Extracellular Vesicles as a Potential Link Between Covid-19 and Cardiovascular Disease Manifestations*. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2021. **9**(197).
129. Wang, J., S. Chen, and J. Bihl, *Exosome-Mediated Transfer of ACE2 (Angiotensin-Converting Enzyme 2) from Endothelial Progenitor Cells Promotes Survival and Function of Endothelial Cell*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020. **2020**: p. 4213541.
130. Earnest, J.T., et al., *The tetraspanin CD9 facilitates MERS-coronavirus entry by scaffolding host cell receptors and proteases*. *PLoS pathogens*, 2017. **13**(7): p. e1006546.
131. El-Shennawy, L., et al., *Circulating ACE2-expressing extracellular vesicles block broad strains of SARS-CoV-2*. *Nature Communications*, 2022. **13**(1): p. 405.
132. Troyer, Z., et al., *Extracellular vesicles carry SARS-CoV-2 spike protein and serve as decoys for neutralizing antibodies*. *J Extracell Vesicles*, 2021. **10**(8): p. e12112.
133. Pocsfalvi, G., et al., *COVID-19 and Extracellular Vesicles: An Intriguing Interplay*. *Kidney and Blood Pressure Research*, 2020. **45**(5): p. 661-670.
134. Yen, B.L., et al., *Current status of mesenchymal stem cell therapy for immune/inflammatory lung disorders: Gleaning insights for possible use in COVID-19*. *Stem Cells Translational Medicine*, 2020. **9**(10): p. 1163-1173.
135. Danchuk, S., et al., *Human multipotent stromal cells attenuate lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice via secretion of tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced protein 6*. *Stem Cell Research & Therapy*, 2011. **2**(3): p. 27.
136. Tao, S.-C., S.-C. Guo, and C.-Q. Zhang, *Platelet-derived Extracellular Vesicles: An Emerging Therapeutic Approach*. *International Journal of Biological Sciences*, 2017. **13**(7): p. 828-834.
137. Guo, S.C., et al., *Exosomes derived from platelet-rich plasma promote the re-epithelization of chronic cutaneous wounds via activation of YAP in a diabetic rat model*. *Theranostics*, 2017. **7**(1): p. 81-96.
138. Tessier, N., et al., *Focus on the Lymphatic Route to Optimize Drug Delivery in Cardiovascular Medicine*. *Pharmaceutics*, 2021. **13**(8).
139. Soy, M., et al., *Cytokine storm in COVID-19: pathogenesis and overview of anti-inflammatory agents used in treatment*. *Clin Rheumatol*, 2020. **39**(7): p. 2085-2094.
140. Yáñez-Mó, M., et al., *Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions*. *J Extracell Vesicles*, 2015. **4**: p. 27066.
141. Estaquier, J., et al., *The mitochondrial pathways of apoptosis*. *Adv Exp Med Biol*, 2012. **942**: p. 157-83.
142. Elmore, S., *Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death*. *Toxicologic Pathology*, 2007. **35**(4): p. 495-516.
143. Yang, Y., et al., *Programmed cell death and its role in inflammation*. *Mil Med Res*, 2015. **2**: p. 12.
144. Aharon, A., T. Tamari, and B. Brenner, *Monocyte-derived microparticles and exosomes induce procoagulant and apoptotic effects on endothelial cells*. *Thromb Haemost*, 2008. **100**(5): p. 878-85.

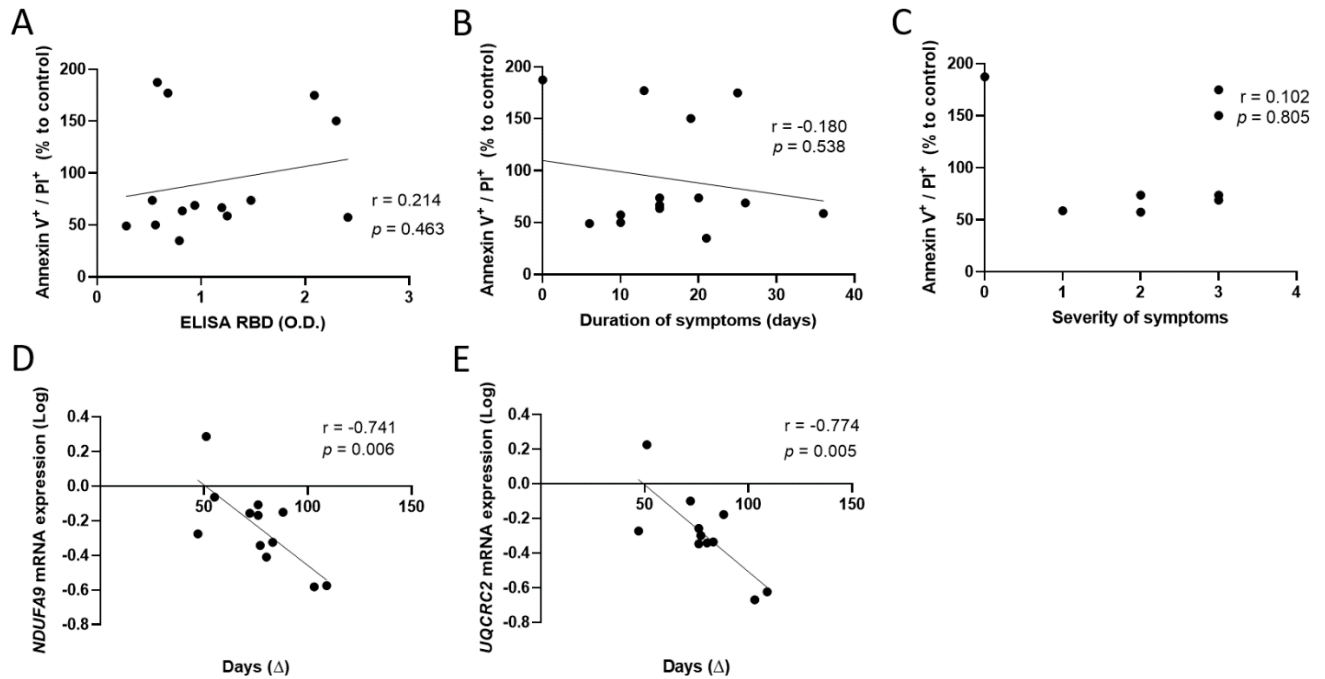
145. Krishnamachary, B., et al., *Extracellular vesicle-mediated endothelial apoptosis and EV-associated proteins correlate with COVID-19 disease severity*. Journal of Extracellular Vesicles, 2021. **10**(9): p. e12117.
146. Boukouris, S. and S. Mathivanan, *Exosomes in bodily fluids are a highly stable resource of disease biomarkers*. PROTEOMICS – Clinical Applications, 2015. **9**(3-4): p. 358-367.
147. Ciferri, M.C., R. Quarto, and R. Tasso, *Extracellular Vesicles as Biomarkers and Therapeutic Tools: From Pre-Clinical to Clinical Applications*. Biology (Basel), 2021. **10**(5).
148. Rosell, A., et al., *Patients With COVID-19 Have Elevated Levels of Circulating Extracellular Vesicle Tissue Factor Activity That Is Associated With Severity and Mortality*; Brief Report. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2021. **41**(2): p. 878-882.
149. Huguenberger, R., et al., *Stimulation of lymphangiogenesis via VEGFR-3 inhibits chronic skin inflammation*. Journal of Experimental Medicine, 2010. **207**(10): p. 2255-2269.
150. Huguenberger, R., et al., *An important role of lymphatic vessel activation in limiting acute inflammation*. Blood, 2011. **117**(17): p. 4667-4678.
151. Kajiya, K., et al., *Activation of the VEGFR-3 Pathway by VEGF-C Attenuates UVB-Induced Edema Formation and Skin Inflammation by Promoting Lymphangiogenesis*. Journal of Investigative Dermatology, 2009. **129**(5): p. 1292-1298.
152. Breslin, J.W., et al., *Vascular endothelial growth factor-C stimulates the lymphatic pump by a VEGF receptor-3-dependent mechanism*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. **293**(1): p. H709-18.
153. Barry, O.P., et al., *Modulation of monocyte-endothelial cell interactions by platelet microparticles*. J Clin Invest, 1998. **102**(1): p. 136-44.
154. Zerneck, A., et al., *Delivery of MicroRNA-126 by Apoptotic Bodies Induces CXCL12-Dependent Vascular Protection*. Science Signaling, 2009. **2**(100): p. ra81-ra81.
155. Hristov, M., et al., *Apoptotic bodies from endothelial cells enhance the number and initiate the differentiation of human endothelial progenitor cells in vitro*. Blood, 2004. **104**(9): p. 2761-6.
156. Deregibus, M.C., et al., *Endothelial progenitor cell derived microvesicles activate an angiogenic program in endothelial cells by a horizontal transfer of mRNA*. Blood, 2007. **110**(7): p. 2440-8.
157. Golpon, H.A., et al., *Life after corpse engulfment: phagocytosis of apoptotic cells leads to VEGF secretion and cell growth*. Faseb j, 2004. **18**(14): p. 1716-8.
158. Tang, N., et al., *Monocyte exosomes induce adhesion molecules and cytokines via activation of NF- $\kappa$ B in endothelial cells*. The FASEB Journal, 2016. **30**(9): p. 3097-3106.
159. Varga, Z., et al., *Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19*. The Lancet, 2020. **395**(10234): p. 1417-1418.
160. Reed, H.O., et al., *Lymphatic impairment leads to pulmonary tertiary lymphoid organ formation and alveolar damage*. The Journal of Clinical Investigation, 2019. **129**(6): p. 2514-2526.
161. Jurisic, G., J.P. Sundberg, and M. Detmar, *Blockade of VEGF receptor-3 aggravates inflammatory bowel disease and lymphatic vessel enlargement*. Inflamm Bowel Dis, 2013. **19**(9): p. 1983-9.



162. Schwager, S. and M. Detmar, *Inflammation and Lymphatic Function*. Frontiers in Immunology, 2019. **10**(308).
163. Scicchitano, P., et al., *The role of endothelial dysfunction and oxidative stress in cerebrovascular diseases*. Free Radical Research, 2019. **53**(6): p. 579-595.
164. Lerman, A. and A.M. Zeiher, *Endothelial function: cardiac events*. Circulation, 2005. **111**(3): p. 363-8.
165. Malyszko, J., *Mechanism of endothelial dysfunction in chronic kidney disease*. Clinica Chimica Acta, 2010. **411**(19): p. 1412-1420.
166. Cosentino, F., et al., *Endothelial dysfunction and stroke*. J Cardiovasc Pharmacol, 2001. **38 Suppl 2**: p. S75-8.
167. Russell, P.S., et al., *Renal Lymphatics: Anatomy, Physiology, and Clinical Implications*. Frontiers in Physiology, 2019. **10**(251).
168. Hoefs, S.J.G., et al., *NDUFA2 Complex I Mutation Leads to Leigh Disease*. The American Journal of Human Genetics, 2008. **82**(6): p. 1306-1315.
169. Smeitink, J., L. van den Heuvel, and S. DiMauro, *The genetics and pathology of oxidative phosphorylation*. Nature Reviews Genetics, 2001. **2**(5): p. 342-352.
170. van den Bosch, B.J., et al., *Defective NDUFA9 as a novel cause of neonatally fatal complex I disease*. J Med Genet, 2012. **49**(1): p. 10-5.
171. Chang, X., et al., *A meta-analysis and systematic review of Leigh syndrome: clinical manifestations, respiratory chain enzyme complex deficiency, and gene mutations*. Medicine (Baltimore), 2020. **99**(5): p. e18634.
172. Miyake, N., et al., *Mitochondrial Complex III Deficiency Caused by a Homozygous UQCRC2 Mutation Presenting with Neonatal-Onset Recurrent Metabolic Decompensation*. Human Mutation, 2013. **34**(3): p. 446-452.
173. Gaignard, P., et al., *UQCRC2 mutation in a patient with mitochondrial complex III deficiency causing recurrent liver failure, lactic acidosis and hypoglycemia*. Journal of Human Genetics, 2017. **62**(7): p. 729-731.
174. Gaignard, P., et al., *Mutations in CYC1, encoding cytochrome c1 subunit of respiratory chain complex III, cause insulin-responsive hyperglycemia*. The American Journal of Human Genetics, 2013. **93**(2): p. 384-389.
175. Gotsch, U., et al., *VE-cadherin antibody accelerates neutrophil recruitment in vivo*. Journal of Cell Science, 1997. **110**(5): p. 583-588.
176. Del Maschio, A., et al., *Polymorphonuclear leukocyte adhesion triggers the disorganization of endothelial cell-to-cell adherens junctions*. J Cell Biol, 1996. **135**(2): p. 497-510.
177. Kusnadi, A., et al., *Severely ill patients with COVID-19 display impaired exhaustion features in SARS-CoV-2-reactive CD8<sup>+</sup> T cells*. Science Immunology, 2021. **6**(55): p. eabe4782.
178. Diao, B., et al., *Reduction and Functional Exhaustion of T Cells in Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)*. Frontiers in Immunology, 2020. **11**.
179. Çölkesen, F., et al., *Memory B cells and serum immunoglobulins are associated with disease severity and mortality in patients with COVID-19*. Postgraduate Medical Journal, 2022.

180. Vickers, M.A., et al., *Exponential increase in neutralizing and spike specific antibodies following vaccination of COVID-19 convalescent plasma donors*. *Transfusion*, 2021. **61**(7): p. 2099-2106.
181. Tang, J., et al., *Antibody affinity maturation and cross-variant activity following SARS-CoV-2 mRNA vaccination: Impact of prior exposure and sex*. *eBioMedicine*, 2021. **74**.
182. Teijaro, J.R. and D.L. Farber, *COVID-19 vaccines: modes of immune activation and future challenges*. *Nature Reviews Immunology*, 2021. **21**(4): p. 195-197.
183. Jabal, K.A., K.B. Wiegler, and M. Edelstein, *Convalescent plasma from people vaccinated after COVID-19 infection*. *The Lancet Microbe*, 2021. **2**(5): p. e171-e172.

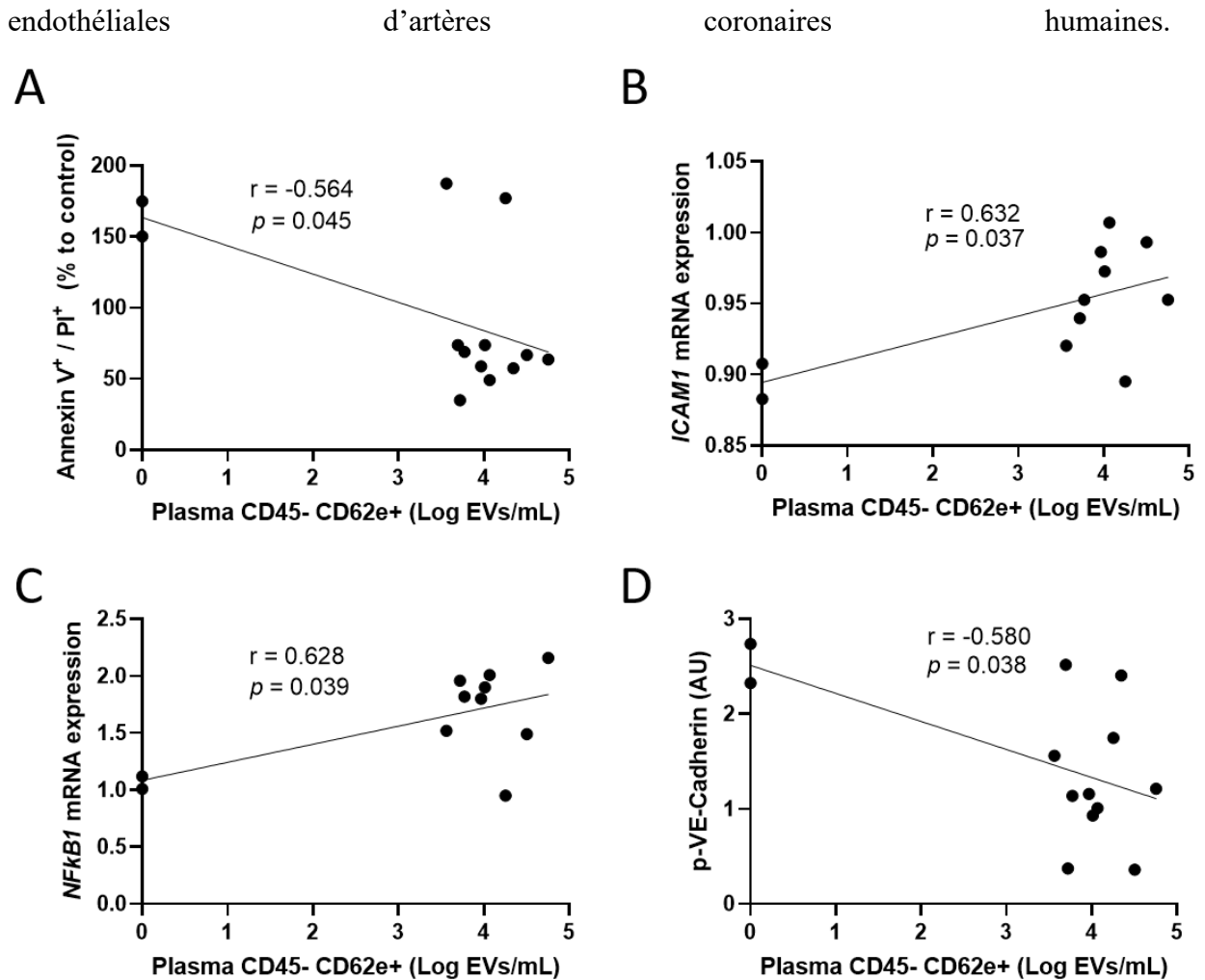
## Figures supplémentaires



### Figure supplémentaire 1. Un don précoce de plasma convalescent de la COVID-19

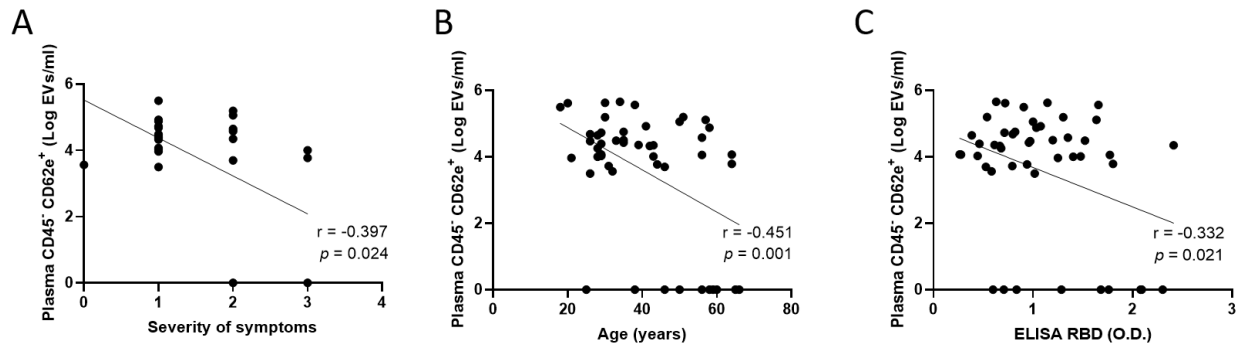
est associé à une meilleure intégrité mitochondriale. (A - C) Des cellules HCAECs furent

incubés avec du plasma convalescent de la COVID-19 suivi par une incubation avec un cocktail de cytokines de 20h. Les cellules en apoptose tardive et nécrose, caractérisé par un marquage positif en Annexine V et iodure de propidium, furent corrélés avec la concentration en anticorps anti-SARS-CoV-2 du plasma (A) avec la durée des symptômes du donneur (B) et avec la sévérité des symptômes du donneur, quantifiée à l'aide d'un questionnaire et gradé comme suit : asymptomatique, léger, modéré et sévère (C). La durée entre le début des symptômes et le don fut ensuite corrélé à l'expression de l'ARNm de NDFUA9 (D) et UQCRC2 (E) exprimé par les HCAECs et déterminé par RT-qPCR. Les cellules sont représentées comme un pourcentage relatif aux cellules traitées avec le plasma contrôle, non infecté. La significativité fut déterminée par une corrélation de Spearman.  $p < 0.05$  fut considéré significatif. PI : propidium iodide; RBD : domaine de liaison au récepteur; O.D. : densité optique.  $\Delta$ , durée entre le début des symptômes et le don; NDFUA9 : NADH déshydrogénase 1 alpha subcomplexe sous-unité 9; UQCRC2 : sous-unité 2 du complexe cytochrome b-c1; HCAECs : cellules



**Figure supplémentaire 2. Une concentration élevée de BEC-EVs est corrélée à une activation des cellules endothéliales d'artères coronaires humaines.**(A - D) Des cellules HCAECs furent incubés avec du plasma convalescent de la COVID-19 suivi par une incubation avec un cocktail de cytokines de 20h. Des EVs CD45<sup>-</sup> CD62e<sup>+</sup> furent caractérisé dans le plasma convalescent et corrélés à des cellules en apoptose tardive et nécrose, caractérisées par un marquage positif en Annexine V et iodure de propidium (A) à l'expression de l'ARNm d'ICAM1 (B) à l'expression de l'ARNm de NFkB1 déterminé par RT-qPCR (C) et de l'expression de la protéine phosphorylée VE-Cadhérine déterminée par immunoblot (D). Les cellules sont représentées comme un pourcentage relatif aux cellules traitées avec le plasma contrôle, non infecté. La significativité fut déterminée par une corrélation de Pearson.  $p < 0.05$  fut considéré significatif. PI : propidium iodide; BEC-EVs : vésicules extracellulaires dérivés de cellules endothéliales

sanguines; AU : unité arbitraire; HCAECs : cellules endothéliales d'artères coronaires humaines.



**Figure supplémentaire 3. Une concentration élevée de BEC-EVs plasmatique est associée à des symptômes légers, à un jeune âge et une faible concentration d'anticorps anti-SARS-CoV-2.** (A - C) Des EVs CD45<sup>-</sup> CD62e<sup>+</sup> furent caractérisés dans le plasma convalescent de la COVID-19 et corrélé à la sévérité des symptômes des donneurs (A) à l'âge des donneurs (B) et à la concentration en anticorps anti-SARS-CoV-2 du plasma (C). La significativité fut déterminée par une corrélation de Spearman pour la sévérité des symptômes et par une corrélation de Pearson pour l'âge et la concentration d'anticorps.  $p < 0.05$  est considéré significatif. Une régression linéaire multiple a été effectuée en utilisant la méthode *forward*, étant donné que plus d'une variable de l'analyse univariée était associée au résultat testé. BEC-EVs : vésicules extracellulaires dérivés de cellules endothéliales sanguines; RBD : domaine de liaison au récepteur; O.D. : densité optique.