



**HAL**  
open science

# Séquelles perfusionnelles après une embolie pulmonaire : pronostic, prédiction et mécanismes physiopathologiques

Benjamin Planquette

## ► To cite this version:

Benjamin Planquette. Séquelles perfusionnelles après une embolie pulmonaire : pronostic, prédiction et mécanismes physiopathologiques. Pneumologie et système respiratoire. Université Sorbonne Paris Cité, 2016. Français. NNT : 2016USPCB254 . tel-02182517

**HAL Id: tel-02182517**

**<https://theses.hal.science/tel-02182517>**

Submitted on 12 Jul 2019

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

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



Université Paris Descartes

---

## **THESE**

Pour obtenir le grade de  
**DOCTEUR**

Ecole doctorale Bio Sorbonne Paris Cité (BioSPC)

**Discipline: Biologie Cellulaire et Moléculaire,  
Physiologie et Physiopathologie"**

Présentée et soutenue publiquement par

Mr PLANQUETTE Benjamin  
15 décembre 2016

**Séquelles perfusionnelles après une embolie  
pulmonaire : pronostic, prédiction et  
mécanismes physiopathologiques**

Jury :

Pr Laurence Camoin  
Pr Laurent Bertoletti  
Pr David Smadja  
Pr Olivier Sanchez  
Pr Guy Meyer

Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Directeur de thèse  
Invité

**A Géraldine, sans qui cette aventure n'aurait pas été possible.  
Je t'en serai éternellement reconnaissant.**

**A Rose et Arthur, nos deux premières merveilles.**

## REMERCIEMENTS

---

Je souhaite remercier en premier lieu mon directeur de thèse Mr Olivier Sanchez, Professeur des Universités, pour m'avoir tant appris depuis si longtemps. Je lui suis également reconnaissante pour le temps qu'il m'a accordé, ses qualités pédagogiques et scientifiques, sa franchise et sa sympathie.

J'adresse de chaleureux remerciements au professeur Guy Meyer pour son soutien indéfectible à cette thèse de science. Votre savoir-faire, votre écoute et votre sagesse sont autant d'exemples que je m'efforce de suivre depuis notre rencontre à l'hôpital Laennec.

Je remercie toute l'équipe californienne qui m'a accueilli : le professeur Timothy Morris pour avoir cru en notre projet, Peter Child, mon guide au laboratoire, et Jim Marsh, pour nos discussions constructives. Vous m'avez tant appris lors de mon trop bref passage à San Diego, nos déjeuners au *Cuervo* le vendredi me manquent.

J'adresse de sincères remerciements à Mr David Smadja, Professeur des Universités, pour son aide et son soutien tout au long de ma thèse, pour ses nombreux conseils, son écoute et son énergie. J'ai pris un grand plaisir à travailler avec toi.

Je voudrais remercier les rapporteurs de cette thèse Mme Laurence Camoin, Professeur des Universités de l'université d'Aix-Marseille et Mr Laurent Bertoletti, Professeur des Universités Jean Monnet de Saint Etienne pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail.

Je souhaite remercier tout particulièrement Adeline, Anne, Céline, Nour et Nicolas pour votre soutien, votre patience, votre bonne humeur et surtout votre amitié tout au long de ma thèse. Sans vous, je n'y serais pas arrivé.

Merci à vous, Bruno et Cédric, pour la confiance que vous m'avez accordé. Cette aventure m'a tant aidé ces derniers mois.

Je tiens à remercier tous les membres de l'Unité INSERM 1140, Thérapeutiques innovantes en hémostase, en particulier sa directrice Mme Pascale Gaussem : vous m'avez si gentiment accueilli.

Je tiens à remercier mes parents et mes beaux-parents qui, depuis 4 ans, n'ont jamais cessé de nous aider, de me rassurer dans les moments difficiles, et ont traversé le monde pour venir nous voir à San Diego. Je sais ce que nous vous devons.

Je remercie aussi mes frères et sœurs : Antoine, Samuel, Pierre-Marie, Maxime, Emilie et Elodie. Tout particulièrement Antoine, compagnon de galère ces derniers mois. L'année 2017 sera l'année du renouveau pour nous deux...

**Mes plus grands remerciements et mon amour infini sont pour ma femme Géraldine et nos enfants. Merci, merci, merci de votre aide, de votre patience, des sacrifices consentis.**

# TABLE DES MATIERES

---

Liste des travaux .....	7
Liste des figures .....	8
Liste des tableaux .....	10
Liste des abréviations .....	11
<b>Introduction</b> .....	13
1. <u>Embolie pulmonaire</u> .....	14
1.1. <u>Incidence</u> .....	14
1.2. <u>Facteurs de risque de MVTE</u> .....	17
1.3. <u>Durée de traitement</u> .....	19
1.4. <u>Pronostic immédiat</u> .....	19
1.5. <u>Résolution des caillots après une embolie pulmonaire aigue</u> .....	20
1.6. <u>Pronostic à long terme</u> .....	21
2. <u>Syndrome post embolie pulmonaire</u> .....	23
2.1. <u>Définition</u> .....	23
2.2. <u>Méthodes d'évaluation des séquelles perfusionnelles</u> .....	24
2.3. <u>Prévalence</u> .....	26
2.4. <u>Impact fonctionnel</u> .....	30
3. <u>Récidive d'embolie pulmonaire</u> .....	31
3.1. <u>Prévalence</u> .....	32
3.2. <u>Prévention des récurrences par l'anticoagulation prolongée</u> .....	34
3.3. <u>Prédiction des récurrences</u> .....	35
4. <u>Hypertension pulmonaire thromboembolique chronique</u> .....	42
4.1. <u>Prévalence</u> .....	43
4.2. <u>Facteurs de risque</u> .....	44
4.3. <u>Prédiction</u> .....	45
5. <u>Physiopathologie de la MVTE chronique</u> .....	46
5.1. <u>Lésions constatées au cours de la MVTE chronique</u> .....	47
5.1.1. <u>Persistance du caillot et remodelage vasculaire de contact</u> .....	49

5.1.2. <u>Lésions de vasculopathies distales</u> .....	51
5.2. <u>Rôle du fibrinogène dans la physiopathologie</u> .....	52
5.2.1. <u>Fibrinogène</u> .....	52
5.2.2. <u>Fibrine</u> .....	55
5.2.3. <u>Fibrinolyse</u> .....	60
5.2.4. <u>Interactions cellulaires de la fibrine</u> .....	60
5.2.5. <u>Récepteurs impliqués dans les interactions cellules           endothéliales-fibrine</u> .....	61
5.2.6. <u>Fibrinogène et MVTE</u> .....	66
5.3. <u>Compartiment endothélial et MVTE Chronique</u> .....	73
5.3.1. <u>Cellules endothéliales circulantes</u> .....	73
5.3.2. <u>Progéniteurs endothéliaux</u> .....	74
5.3.3. <u>Progéniteurs endothéliaux et maladies vasculaires pulmonaires</u> .....	76
5.3.4. <u>Progéniteurs et résolution du caillot</u> .....	79
5.3.4.1. <u>Effet sur la coagulation/fibrinolyse</u> .....	79
5.3.4.2. <u>Effet sur l'angiogenèse</u> .....	82
5.4. <u>Interaction de la fibrine avec les cellules du compartiment endothélial</u> .....	84
5.4.1. <u>Résorption des caillots et régulation de la fibrinolyse</u> .....	84
5.4.2. <u>Signal pro inflammatoire</u> .....	85
5.4.3. <u>Signal Angiogénique</u> .....	86
<b>Hypothèses de travail</b> .....	90
1. <u>Hypothèse clinique</u> .....	91
2. <u>Hypothèses fondamentales</u> .....	91
2.1. <u>Existe-y-il des anomalies fonctionnelles et/ou des variants du fibrinogène           associés aux séquelles perfusionnelles après une embolie pulmonaire ?</u> .....	92
2.2. <u>Etude du comportement endothélial à la phase aigüe et au décours d'une           embolie pulmonaire</u> .....	92
<b>Méthodes</b> .....	93
1. <u>Approche clinique</u> .....	94
1.1. <u>Etude du fibrinogène dans la survenue de séquelles perfusionnelles</u> .....	94
1.2. <u>Eudes des CEC à la phase aigüe et au décours de l'embolie pulmonaire</u> .....	95

2. <u>Approche protéique</u> .....	96
2.1. <u>Purification du fibrinogène</u> .....	96
2.2. <u>Turbidité</u> .....	97
2.3. <u>Perméabilité</u> .....	97
2.4. <u>Cross-linking de la chaîne A<math>\alpha</math> de la fibrine</u> .....	98
2.5. <u>Résistance à la lyse de la fibrine</u> .....	99
2.6. <u>Accessibilité de la séquence <math>\beta</math>15-42 de la séquence N terminale de la</u> <u>Chaîne <math>\beta</math> du fibrinogène</u> .....	100
2.7. <u>Détection des variants du fibrinogène</u> .....	102
2.8. <u>Séquençage des gènes du fibrinogène</u> .....	104
3. <u>Approche cellulaire</u> .....	105
3.1. <u>Etudes des CEC à la phase aigue et au décours de l'EP</u> .....	105
3.2. <u>Isolement des progéniteurs</u> .....	106
3.3. <u>Mise en évidence et inhibition de l'expression VLDLr par les ECFCs</u> .....	107
3.3.1. <u>Extraction de l'ARN et dosage au Nanodrop</u> .....	107
3.3.2. <u>Transcription reverse de l'ARN en ADNc</u> .....	107
3.3.3. <u>PCR quantitative</u> .....	108
3.3.4. <u>Mise en évidence de VLDLr en cytométrie de flux</u> .....	108
3.3.5. <u>Mise au point du silencing de VLDLr avec un siARN complémentaire et</u> <u>validation de l'inhibition par cytométrie en flux</u> .....	109
<b>Résultats</b> .....	111
<b>Travail 1</b> .....	112
<b>Travail 2</b> .....	140
<b>Travail 3</b> .....	151
<b>Travail 4</b> .....	178
<b>Discussion</b> .....	184
<b>Conclusion</b> .....	195
<b>Références</b> .....	197
<b>Annexe</b> .....	213

## **LISTE DES TRAVAUX**

---

### **Travail 1**

#### **Residual pulmonary vascular obstruction and recurrence after acute pulmonary embolism. A single center cohort study.**

Benjamin Planquette, Alexis Ferré, Julien Peron, Amandine Vial-Dupuy, Jean Pastre, Gisèle Mourin, Joseph Emmerich, Marie-Anne Collignon , Guy Meyer and Olivier Sanchez.

**Etat : accepté pour publication dans Thrombosis Research le 21/10/2016**

### **Travail 2**

#### **Mise au point et validation d'un test combinant étude de la perméabilité et de l'accessibilité de l'épitope $\beta$ 15-42 de la chaîne B $\beta$ du fibrinogène au sein de la fibrine.**

Session poster « Fibrinogen/fibrin/D-dimer II »  
Congrès de l'ISTH 2015 - Toronto - Canada  
Poster P0201-TUE

### **Travail 3**

#### **Prediction of Residual Obstruction Manifested after Pulmonary Embolism Treatment (PROMPT)**

Benjamin Planquette, Oliver Sanchez, Guy Meyer, James J. Marsh, Peter G. Chiles, Gregoire Le Gal, Timothy A. Morris

**Etat : manuscrit en reviewing par les co-auteurs**

### **Travail 4**

#### **Evaluation du taux des cellules endothéliales circulantes et des progéniteurs à la phase aiguë et au décours d'une première embolie pulmonaire.**

Benjamin Planquette, Anne Roche, Nicolas Gendron, Nour Bacha, David Smadja et Olivier Sanchez

**Etat : article en cours de rédaction**

## **LISTE DES FIGURES**

---

Figure 1. Scintigraphie V/Q: aspect normal (8 incidences)

Figure 2. Scintigraphie V/Q: aspect de séquelles perfusionnelles < 10%

Figure 3. Scintigraphie V/Q: aspect de séquelles perfusionnelles > 10%

Figure 4. Schéma conceptuel de la physiopathologie de la maladie veineuse thromboembolique, d'après Fernandez et al [38]

Figure 5. Physiopathologie de l'HTP-TEC, d'après Piazza et al [37]

Figure 6-a. Coupe histologique d'artère pulmonaire de groupe calibre, d'après Piazza et al [37]

Figure 6-b. Analyse histochimique de la structure du matériel d'endartériectomie pulmonaire, d'après Yao et al [102]

Figure 7 : coupe histologique d'artériole pulmonaire, d'après Piazza et al [37]

Figure 8. Aspect morphologique de l'hétéro-dimères de fibrinogène, d'après Mossesson et al [106]

Figure 9. Aspect schématique de l'assemblage des molécules de fibrinogène, d'après Mossesson et al [106]

Figure 10. Elasticité de la fibrine : rôle du cross-linking [116]

Figure 11. Structure schématique du récepteur VLDLr : importance des domaines répétitifs CR, d'après Yakovlev et al [140]

Figure 12. Mécanismes et signalisation intra-cellulaire des interactions thrombospondine-VLDLr, d'après Oganesian et al [137]

Figure 13. Facteurs modifiant la formation du caillot de fibrine, d'après Undas et al [165]

Figure 14. Capacités angiogéniques des cellules endothéliales (CE) et des progéniteurs endothéliaux (ECFC) (matrigel®), d'après Alvarez et al [181]

Figure 15. Mobilisation et rôle des ECFCs dans la physiopathologie des maladies vasculaires pulmonaires, d'après Duong et al [183]

Figure 16. Evolution de la résorption du caillot, d'après Singh et al [194]

Figure 17. Résolution du thrombus (T) de la veine cave inférieure (VC), d'après Singh et al [194]

Figure 18. Formation de tubes capillaires après stimulation par la fibrine, d'après Chapulowicz et al [207].

Figure 19. Effet de la structure de la fibrine induite par des variations de pH sur le potentiel angiogénique d'HUVEC et l'activité fibrinolytique in vitro, d'après Collen et al [210]

Figure 20. Réalisation d'un test de perméabilité sur 12 prélèvements de la cohorte

Figure 21. Aspect d'un SDS de fibrinogène et de fibrine réduite: évaluation du pourcentage de cross-linking de la chaîne  $\alpha$ .

Figure 22. Aspect de la courbe d'absorptiométrie dans le temps au cours du test de lyse (dupliquette)

Figure 23. Aspect des spectres de LCMS de chacune des chaînes du fibrinogène

Figure 24. Principes de la séparation immuno-magnétique

Figure 25. Fixation des anticorps à la fibrine

Figure 26. Liaison de l'anticorps ZFB et de l'anticorps MOPC à la fibrine des sujets selon les conditions de polymérisation (contrôle 1)

Figure 27. Fixation de VE-Cadhérine à des fibrines de structure différente.

Figure 28. Accessibilité des épitopes  $\beta$ 15-42 chez les patients présentant des mutations San Diego III et San Diego V

Figure 29. Taux de cellules endothéliales circulantes identifiées en IMS au moment du diagnostic d'EP.

Figure 30. Résultats préliminaires : expression de l'ARN de VLDLr par les cellules endothéliales (RT-PCT, méthode Taqman®)

Figure 31. Expression de VLDLr par les HUVEC et les ECFCs (cytométrie)

Figure 32. Silencing de l'expression de VLDLr par les PECs (n=2)

## **LISTE DES TABLEAUX**

---

Tableau 1. Facteurs de risque de MVTE

Tableau 2. Scores clinico-biologiques de prédiction des récives de MVTE

Tableau 3. Définition des épisodes non provoqués selon les modèles de prédiction des récives

Tableau 4. Variables prédictives retenues selon les modèles de prédiction des récives

Tableau 5. Séquelles perfusionnelles (SP) et risque de récive de MVTE

Tableau 6. Facteurs de risque d'HTP-PE, d'après Piazza et al [41]

Tableau 7. Polymorphismes fréquents des chaines A $\alpha$ , B $\beta$  constitutives du fibrinogène, d'après Morris et al [110]

Tableau 8. Facteurs influençant la formation des deux types de jonctions des protofibrilles et des fibres du réseau de fibrine

Tableau 9. Synthèse du rôle de chaque chaîne du fibrinogène dans la synthèse de la formation de la fibrine

Tableau 10. Fréquence des allèles et des phénotypes des principaux polymorphismes communs du fibrinogène

Tableau 11. Principales caractéristiques des dysfibrinogénémies San Diego I à V associées à l'HTP-PEC, adapté de Morris et al [110]

Tableau 12. Principales caractéristiques des fibrinogènes San Diego III et V, d'après Morris et al [107]

Tableau 13. Principales caractéristiques des patients de la cohorte

.

## **LISTE DES ABREVIATIONS**

---

ADN : Acide DexosyriboNucléique  
AFSSAPS : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé  
ARN : Acide RiboNucléique  
AVK : Anti-Vitaminique K  
 $\alpha$ 2P :  $\alpha$ 2 Plasmin Inhibitor  
BSA: Bovine Serum Albumine  
CE : Cellule Endothéliale  
CEC : Cellule Endothéliale Circulante  
CRP : C Reactive Protein  
CXCR 4 : C-X-C motif chemokine 10  
CXCL10 : C-X-C motif chemokine 10  
DAPI : 4'-6'-Diaminodino-2-phenylindole  
Domaine CR : Domaine riche en Cystéine  
EBM : Endothelial Basal Medium  
ECFC: Endothelial Colony-Forming Cells  
ECG: ElectroCardioGramme  
EP : Embolie Pulmonaire  
EPCR: Endothelial protein C receptor  
FGA: Fibrinogen Gene A  
FGB: Fibrinogen Gene B  
FGG: Fibrinogen Gene G  
Flk-1: Fetal Liver Kinase 1  
GETBO: Groupe d'Etude de la Thrombose de Bretagne Occidentale  
HTP-TEC: HyperTension Pulmonaire – ThromboEmbolique Chronique  
HR: Hazar Ratio  
HUVEC: Human Umbiliac Veine Endothelial Cell  
IC: Intervalle de Confiance  
ICAM-1 : InterCellular Adhesion Molecule 1  
ICOPER: International COoperative Pulmonary Embolism Registry  
IL-1: InterLeukine 1  
IL-8: InterLeukine 8  
IMC : Indice de masse corporelle  
IP 10: IFN-gamma-inducible protein 10  
ISTH: International Society of Thrombosis and Haemostasis  
KDa : Kilo Dalton  
KDR : Kinase Insert Domain Receptor  
LCMS: Liquid Chromatography Mass Spectrophotometry  
MVTE: Maladie Veineuse ThromboEmbolique  
NYHA: New York Heart Association  
OR: Odds Ratio  
PAI-1: Plasminogen Inhibitor 1

PAI-2 : Plasminogen Inhibitor 2  
PAP: Pression Artérielle Pulmonaire  
PAR-1: Protein Activated Receptor 1  
PAR-2: Protein Activated Receptor 2  
PBS : Phosphate-Buffered Saline  
PF-4: Platelet Factor 4  
PEC: Progéniteur endothéliaux ciculants  
PIOPED: Prospective Investigation of Pulmonary Embolism Diagnosis  
RR: Risque Relatif  
SNP : Single nucleotide Polymorphism  
SMA: Smooth Muscle  $\alpha$ -Actine  
sPESI : simplified Pulmonary Embolism Severity Index  
SF-36 : Short Form 36  
SPECT: Single photon emission computed tomography  
SDF-1 : Stroma Derived Factor 1  
SV: Sérum Veau Fœtal  
TF : Tissue Factor  
TFPI : tissue Factor Pathway Inhibitor  
TNF $\alpha$ : Tumor Necrosis Factor  $\alpha$   
tPA: tissue Plasminogen Activator  
TSP-1: Thrombospondine 1  
TSP-2 : Thrombospondine 2  
uPA: urokinase PLasminogen Activator  
VCAM-1 vascular cell adhesion molecule 1  
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor  
VEGFR2 : Récepteur 2 du VEGF  
VLDL : very low-density lipoprotein receptor  
V/Q : ventilation/perfusion

# **INTRODUCTION**

## INTRODUCTION

---

### 1. Embolie pulmonaire

#### 1.1. Incidence

La maladie veineuse thromboembolique (MVTE) est la troisième maladie cardiovasculaire la plus fréquente et peut se manifester soit sous forme de thrombose veineuse des membres inférieurs, ou phlébite, soit sous forme d'embolie pulmonaire (EP) dont elle est la manifestation la plus grave [1], [2]. L'incidence précise de la MVTE est difficile à évaluer car certains événements peuvent rester asymptomatiques là où d'autres peuvent se révéler par une mort subite sans que le diagnostic d'EP soit évoqué ou prouvé. De plus, la MVTE est une maladie fréquemment récidivante et l'inclusion des récurrences dans l'estimation de l'incidence de la maladie n'est pas homogène d'une étude à l'autre. Néanmoins, l'incidence de la maladie, incluant les cas communautaires et les cas diagnostiqués à l'hôpital, a été évaluée entre 71 à 117 cas pour 100 000 habitants aux Etats-Unis [3], [4]. En Europe, deux études épidémiologiques menées en France [5] et en Suède [6] ont rapporté une incidence plus importante: 160 à 180 cas pour 100 000 habitants. Ces deux études ont inclus l'ensemble des cas de MVTE sans distinction entre premiers épisodes et récurrences.

Une autre étude a modélisé l'incidence des événements thromboemboliques dans 6 pays d'Europe, dont la France, en distinguant les cas communautaires des cas survenus lors d'un séjour à l'hôpital et en évaluant aussi la morbi-mortalité associée à ces événements [2]. Ainsi, sur la base d'une population estimée à 310 millions d'individus et sur le nombre de cas rapportés dans les 6 pays européens, l'incidence globale des phlébites, premiers épisode et récurrences, a été estimée à 148 cas pour 100 000 habitants par an.

Ces données ont récemment été confirmées. Une enquête anglaise reposant sur le système d'affiliation à un médecin généraliste référent a permis de suivre prospectivement les cas incidents de MVTE de 2004 à 2010 dans une population de près de 2,6 millions de personnes âgées de 25 à 84 ans sans antécédent de MVTE, ne recevant pas d'anticoagulant et à distance de toute grossesse. L'incidence globale de la MVTE était de 146 pour 100 000 habitants et les EP représentaient 39% des événements [7].

Récemment, le groupe d'étude en thrombose de Bretagne Occidentale (GETBO) a évalué l'incidence de la MVTE dans cette région avec la même méthodologie que celle utilisée en 1998 [5] et a pu en décrire l'évolution sur une période de 15 ans [8]. En 1998, l'incidence de la MVTE était estimée à 183 cas pour 100 000 habitants. En 2013, l'incidence globale de la MVTE était de 157 cas pour 100 000 habitants, correspondant à une réduction significative de 28% sur la période étudiée. De façon intéressante, l'analyse du taux d'incidence standardisé montre que la baisse constatée concerne avant tout les phlébites alors que l'incidence des EP reste stable. Si l'on s'intéresse aux EP sans phlébite associée, l'incidence augmente entre 1998 et 2013. Ces résultats témoignent conjointement de l'évolution des moyens diagnostiques et des progrès réalisés dans la prévention de la MVTE en milieu hospitalier. Concernant l'EP, en 1998 seules 4,4% des EP étaient diagnostiquées à l'aide d'un angioscanner alors qu'en 2013 cet examen était à la fois plus performant pour détecter les thrombus dans la vascularisation artérielle pulmonaire et était devenu l'examen de première ligne pour confirmer le diagnostic d'EP chez près de trois quarts des patients. Les progrès réalisés en termes de prévention sont attestés par la baisse significative des cas diagnostiqués chez des patients hospitalisés passant de 25,8% à 15,1% des cas.

Le registre ICOPER [9] regroupant 52 centres hospitaliers de 7 pays européens et nord-américains a inclus 2110 patients avec une EP et avait pour objectif d'évaluer la

mortalité à 3 mois après une EP. La mortalité globale était de 17,4% à 3 mois mais seulement 179 des 426 décès avaient pu être attribués avec certitude à l'EP. En 2004, la mortalité associée à la MVTE dans 6 pays d'Europe en 2004 était estimée à 370000 décès dont 34% attribuées à des EP [2]. Tsai et al. ont spécifiquement étudié la mortalité attribuable aux EP aux Etats-Unis de 2001 à 2008 [10]. Sur cette période, la mortalité attribuable passe de 11,4% en 2001-2002 à 7,4% en 2007-2008. De manière intéressante, la mortalité était toujours plus faible quand l'EP était identifiée comme la cause de l'hospitalisation (2,4%).

L'ensemble de ces données épidémiologiques confirme que l'EP est une maladie fréquente d'incidence stable, potentiellement grave mais rarement fatale déplaçant les problématiques de prise en charge vers les complications chroniques de la maladie.

## 1.2. Facteurs de risque de MVTE

Le premier facteur de risque de MVTE est l'âge. La MVTE est en effet rare chez l'enfant. L'incidence augmente de façon exponentielle avec l'âge passant de 25 cas pour 100 000 habitants chez les sujets de moins de 40 ans, à 150 cas pour 100000 habitants dans la tranche d'âge de 60 à 70 ans. Le point d'inflexion se situe autour de 60-65 ans [3]. Un âge supérieur ou égal à 65 ans a été retenu comme étant significativement associé à une majoration du risque de MVTE, en particulier dans les scores de probabilité clinique d'embolie pulmonaire [11], [12].

Plusieurs facteurs de risques, associés ou non, peuvent être à l'origine d'un épisode de MVTE et sont classiquement répartis en deux catégories : transitoires (ou réversibles) et persistants. Les facteurs de risque majeurs de MVTE sont décrits dans le tableau 1.

Cette répartition permet de classer les EP en deux groupes : les épisodes dits provoqués survenant en présence d'un facteur de risque majeur transitoire et les épisodes

considérés spontanés, ou non provoqués, survenant en l'absence de facteur de risque majeur transitoire. Cette distinction est fondamentale dans la stratégie de prise en charge de la MVTE car le risque de récurrence de MVTE est très différent selon sa nature provoquée ou non. Initialement décrit chez les patients présentant une thrombose veineuse post-opératoire [13], le risque de récurrence est en effet faible après un épisode de MVTE provoquée, et estimé à 3% [14]-[17].

**Tableau 1. Facteurs de risque de MVTE**

<b>Facteurs de risque transitoires de MVTE</b>	
<b>Odds ratio &gt;6</b>	
Chirurgie	Chirurgie de cancer, chirurgie orthopédique des membres inférieurs, traumatisme du bassin, chirurgie viscérale et gynécologique lourde
Immobilisation ou traumatisme d'un membre inférieur	Fracture des membres inférieurs < 3 mois, immobilisation prolongée (plâtre, attelle)
Hospitalisation et immobilisation pour un motif médical	Motif médical : accident vasculaire cérébral, insuffisance cardiaque ou respiratoire, sepsis
<b>Odds ratio &lt;6</b>	
Facteurs hormonaux	Grossesse, post-partum, contraception, traitement hormonal substitutif
Voyage	Trajet aérien de plus de 6 heures
<b>Facteurs de risque transitoires de MVTE</b>	
Antécédent personnel ou familial au premier degré de thrombose	
Néoplasie	Cancers solides, myéloproliférations, dysglobulinémie
Obésité	
Maladies inflammatoires	Infections chroniques Entéropathies inflammatoires Lupus systémique, maladie de Buerger, maladie de Behçet
Maladies chroniques	Insuffisance cardiaque Insuffisance respiratoire Syndrome néphrotique Hypertension pulmonaire
Compression mécanique	Syndrôme de Cocket
Médicaments	Traitements hormonaux des cancers, chimiothérapie, anti-angiogéniques

### 1.3. Durée de traitement

Le traitement d'un épisode de MVTE repose sur les anticoagulants. Une fois le diagnostic confirmé, le clinicien doit choisir la molécule la plus adaptée à la situation clinique du patient et définir la durée de traitement optimale. Ces deux décisions conditionnent le rapport bénéfice-risque du traitement anticoagulant, dont la principale complication est la survenue d'un accident hémorragique.

La durée de traitement des épisodes de MVTE a fait l'objet de nombreux essais thérapeutiques. Il est aujourd'hui acquis qu'il faut proposer des durées différentes aux patients présentant un premier épisode provoqué de MVTE de ceux dont le premier épisode est non provoqué. Les recommandations internationales proposent 3 mois de traitement pour un épisode provoqué de MVTE et 6 mois pour une première EP non provoquée [18], [19]. Les patients présentant une récurrence de MVTE non provoquée sont traités à vie.

### 1.4. Pronostic immédiat

L'évaluation de la gravité d'une EP ne se limite plus aujourd'hui à la recherche de signes cliniques d'état de choc cardiogénique (hypotension artérielle, tachycardie, turgescence jugulaire) et d'hypoperfusion périphérique, dont la présence est associée à un mauvais pronostic depuis plus de 40 ans [20]. Le registre ICOPER a montré que la mortalité des EP était considérablement impactée par l'état hémodynamique au moment du diagnostic [9]. Ainsi, la mortalité à 3 mois passait de 15,1% en l'absence d'état de choc, à 58,3% en présence d'une défaillance hémodynamique, l'hypotension était identifiée comme un facteur de risque indépendant de mortalité. Les dernières recommandations européennes définissent ainsi les EP à haut risque de mortalité par la seule présence d'un état de choc cardiogénique au diagnostic [18]. Ces patients ne représentent que 3 à

5% des patients avec une embolie pulmonaire. Une étude a confirmé qu'une obstruction initiale supérieure ou égale à 50% était un facteur de risque de mortalité précoce mais n'affectait pas le pronostic à long terme de la maladie [21].

Des scores utilisant essentiellement des données cliniques simples ont été développés afin d'évaluer le risque de mortalité précoce des patients. Ils permettent d'adapter la stratégie de prise en charge, en offrant la possibilité aux patients les moins graves d'être rapidement traités en ambulatoire [18]. Si la gravité initiale d'une EP ne conditionne pas la nature et la durée de traitement car elle n'impacte pas directement le pronostic de la maladie à moyen et long terme, certains cliniciens prolongent ou n'interrompent pas le traitement anticoagulant chez des patients qui ont présenté des EP idiopathique ayant menacé le pronostic vital comme le suggèrent les recommandations de l'AFSSAPS [22].

### 1.5. Résolution des caillots après une EP aiguë

Les études qui se sont intéressées à la cinétique de régression des thrombus au sein de la vascularisation artérielle pulmonaire ont montré qu'il s'agissait d'un phénomène progressif, précoce et non constant dans le temps. Dans les 24 premières heures de la prise en charge, les essais ayant comparé la thrombolyse à l'anticoagulation efficace par l'héparine non fractionnée dans le traitement des EP les plus sévères ont montré une résolution des thrombus négligeable à la deuxième heure du traitement, et de 10% après 24 heures de traitement pour les patients anticoagulés par l'héparine non fractionnée. Dès 2000, Wartski et al. [23] ont évalué à 49% la résolution de l'obstruction initiale au 8<sup>ème</sup> jour puis à 61 % au 3<sup>ème</sup> mois chez 157 patients de l'essai THESEE, à l'aide de la scintigraphie de ventilation perfusion [24]. Passé ce délai, les anomalies scintigraphiques n'évoluaient quasiment plus, si bien que 104 patients (66%) conservaient une obstruction résiduelle de la vascularisation pulmonaire de plus de 5%

au 3<sup>ème</sup> mois. D'autres cohortes de patients suivis prospectivement ont depuis confirmé ces données en utilisant différents examens pour évaluer l'obstruction résiduelle : la scintigraphie [21], l'angioscanner thoracique [25]–[28] et la tomoscintigraphie [29]. Dans cette dernière étude, 83 patients étaient suivis prospectivement et étaient régulièrement évalués précocement (2 semaines après l'épisode) à 3 mois et à 6 mois. Les résultats sont comparables à ceux obtenus à l'aide de la scintigraphie planaire: 54% de résolution à 2 semaines, 79% au 3<sup>ème</sup> mois et plus de résorption significative des thrombus passé le 3<sup>ème</sup> mois [23].

La régression des caillots, évaluée par les différentes techniques d'imagerie, témoigne de l'activité de la fibrinolyse endogène et ne semble pas influencée par la nature du traitement anticoagulant dans deux analyses ancillaires [22] [27] d'essais thérapeutiques randomisés ayant respectivement comparé les héparines de bas poids moléculaires à l'héparine non fractionnée à la phase initiale du traitement anticoagulant [24] et le rivaroxaban à la warfarine à la phase d'entretien du traitement [30]. La phase de plateau débutant au 3<sup>ème</sup> mois décrite par plusieurs études suggère que les caillots résiduels sont remaniés et organisés, constituant des cicatrices endovasculaires fibreuses non réversibles malgré la poursuite du traitement anticoagulant curatif.

#### 1.6. Pronostic à long terme

Klok et al. ont de 866 patients de deux centres néerlandais avec une EP entre 2001 et 2007. Les patients ont été suivis prospectivement pendant 3 ans [31]. Les complications regroupaient les récives de MVTE, la mortalité globale, le développement d'une hypertension pulmonaire thromboembolique chronique (HTP-TEC), la survenue d'un évènement cardiovasculaire artériel grave (principalement syndrome coronarien aigu et accident vasculaire cérébral) et diagnostic de cancer. La population était composée de

patients avec une EP provoquée ou non provoquée, et d'un groupe de patients contrôles sans EP. Le pronostic global combinant l'ensemble des complications était comparable que l'épisode d'EP soit provoqué ou non ; les risques de survenue d'une néoplasie et d'un événement cardiovasculaire étaient similaires chez les patients avec EP et les témoins indemnes de MVTE. Les patients avec une EP non provoquée présentaient un risque de mortalité inférieure à ceux avec une EP provoquée mais avaient un risque plus important de mortalité non liée à une néoplasie, de récurrence thromboembolique, de survenue de cancer, d'évènements cardiovasculaires et d'HTP-TEC. Enfin, 50% patients avec une EP avaient présenté au moins une complication à 4 ans contre 16% dans le groupe contrôle. Ces résultats sont cohérents avec ceux publiés par Miniati et al. qui ont suivi une cohorte de 834 patients avec une EP [21]. De façon intéressante, la mortalité directement attribuable à l'EP était la première cause de mortalité pendant les 3 premiers mois. Au-delà, la mortalité était liée aux comorbidités des patients ou à la survenue d'une HTP-TEC.

A l'arrêt du traitement anticoagulant, les deux principales complications évolutives sont donc la survenue d'une récurrence thromboembolique, qui est majoritairement une EP, et le développement d'une HTP-TEC. Les récurrences d'EP ont longtemps constitué la principale problématique après un premier épisode non provoqué car elles concernent 20% des patients à 5 ans [32]–[34] alors que l'HTP-TEC ne concerne que 2 à 4% des patients [35]–[37] mais est une source de morbi-mortalité importante. Néanmoins, l'observation fréquente de cas de patients présentant une dyspnée persistante et une altération de la qualité de vie ou des performances à l'effort après une EP, sans que ces patients ne présentent ni une récurrence ni une HTP-TEC, a fait émerger le concept de "syndrome post embolie pulmonaire" [34]. Néanmoins, ce syndrome post EP a permis de modifier le schéma physiopathologique conceptuel de la MVTE en la faisant évoluer

d'une maladie intermittente et discontinue (premier épisode ± récurrence ± HTP-TEC) vers une maladie chronique et très probablement séquentielle, dont la compréhension des mécanismes physiopathologiques reste encore très hypothétique [37] [38].

## **2. Syndrome post embolie pulmonaire :**

### **2.1. Définition**

Le syndrome post phlébitique est une complication fréquente chez les patients qui ont présenté une phlébite. Ce syndrome se développe chez près d'un tiers des patients et associe de manière variable différents symptômes comme de l'œdème, une douleur ou des lésions cutanées [15], [40]. Le syndrome post phlébitique est une source de handicap et d'altération de la qualité de vie [41]. A l'instar de ce syndrome, il est aujourd'hui admis qu'il existe un syndrome post embolie pulmonaire à distance d'un épisode d'EP aiguë. Ce syndrome, qui n'a pas encore de définition consensuelle, regroupe aujourd'hui les patients dont l'évolution après une EP est marquée par la persistance d'une dyspnée et/ou d'une limitation dans les activités physiques [42]. Il semble important d'évaluer la dyspnée à distance de l'épisode initial car elle est un symptôme fréquent de la maladie, présent chez 40% des patients et dont la régression est lentement progressive. Le délai communément admis pour l'évaluer est le terme théorique du traitement anticoagulant, c'est-à-dire 6 mois. Ce délai repose sur le double constat qu'à 6 à 8 semaines de l'épisode aigu, tous les patients présentent encore ce symptôme [43] et que la résolution des thrombus est aussi un phénomène lentement évolutif dans la circulation artérielle pulmonaire, estimé classiquement à 50% à 4 semaines et entre 70 à 85% à 6 mois de l'EP [42]. Une obstruction résiduelle du lit artériel pulmonaire plus ou moins étendue est donc fréquemment retrouvée chez les patients au décours d'un premier épisode d'EP. Cette obstruction témoigne de l'absence

de résolution du caillot fibrino-cruorique et de son organisation en une cicatrice fibrineuse endovasculaire, constituant des séquelles perfusionnelles.

## 2.2. Méthodes d'évaluation des séquelles

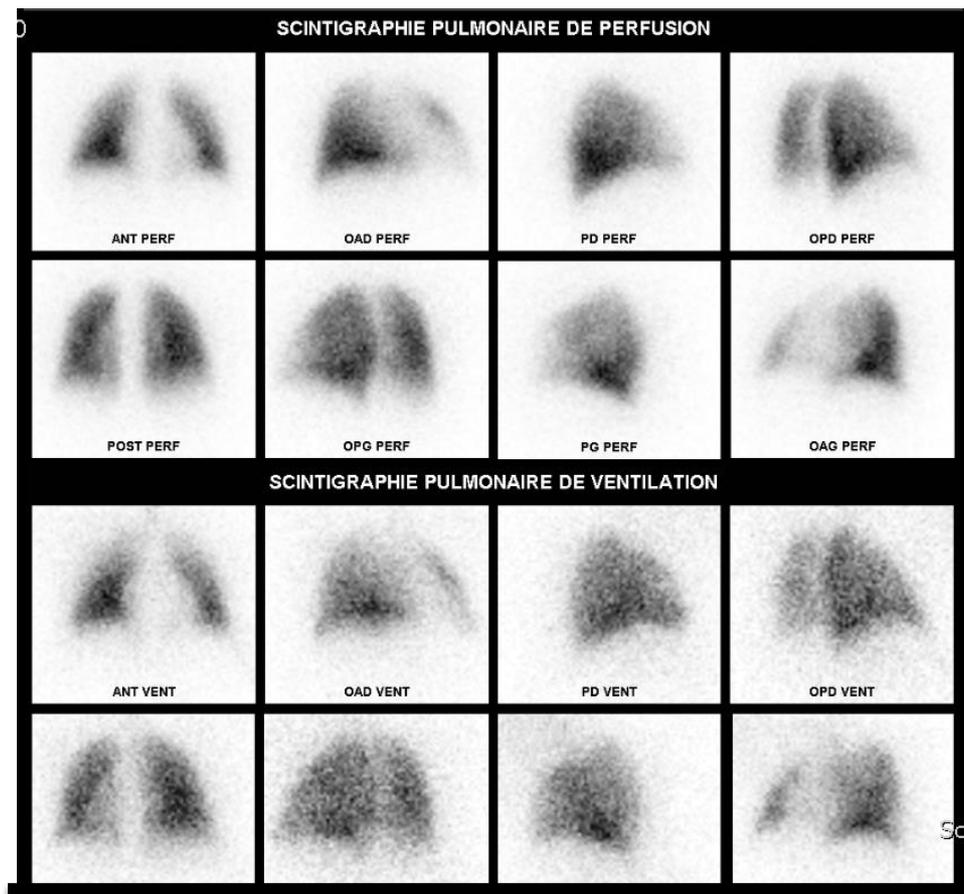
L'angioscanner thoracique et la scintigraphie de ventilation/perfusion sont deux examens permettant de faire le diagnostic d'EP [18] et d'évaluer l'obstruction vasculaire pulmonaire. L'angioscanner thoracique visualise directement les thrombus intravasculaires alors que la scintigraphie pulmonaire de ventilation-perfusion (V/Q) rend compte de la conséquence de la présence des thrombi en comparant la perfusion à la ventilation des poumons.

Le scanner thoracique multibarettes après injection de produit de contraste est l'examen le plus utilisé pour diagnostiquer une embolie pulmonaire jusqu'au niveau sous-segmentaire [44]. Ses performances dans l'évaluation des maladies vasculaires pulmonaires ne se limitent pas à la détection des thrombus intravasculaires, plusieurs paramètres peuvent ainsi être évalués comme le degré d'obstruction vasculaire à l'aide d'un score validé [45], la mesure de la dilatation du tronc de l'artère pulmonaire, la dilatation des cavités cardiaques droites et une analyse séméiologique fine des thrombus intra-artériels pulmonaires comme la diminution du calibre des vaisseaux pulmonaires, l'aspect marginé des caillots chroniques, l'aspect de pseudo-épaississement pariétal ou certaines anomalies du parenchyme pulmonaire associées [46], [47]. Le score proposé par Quanadli est un outil simple d'évaluation du degré d'obstruction vasculaire sur l'angioscanner [45]: chaque poumon est segmenté en 10 artères pulmonaires segmentaires dont l'obstruction est évaluée par un score à 3 paliers (0 point en l'absence de thrombus, 1 point en présence d'un thrombus partiellement occlusif et 2 points en présence d'un thrombus complètement occlusif) ;

l'index d'obstruction global varie donc de 0 à 40 et le pourcentage d'obstruction vasculaire est calculé par la formule  $(\text{index d'obstruction du patient}/40) \times 100$ . Ce score est celui qui a été utilisé dans la très grande majorité des travaux évaluant la résorption des caillots ou les séquelles perfusionnelles post EP [21], [25]–[28], [48]–[50]. Parmi ces études, seule la série de 146 patients avec une EP publiée par Sanchez et al. [48] a analysé la séméiologie compatible avec des lésions vasculaires chroniques à la phase initiale de l'EP. Dans cette étude, 106 scanners ont été relus et 99 patients sans HTP-TEC présentaient des anomalies vasculaires compatibles avec cette maladie témoignant d'un processus chronique d'initiation précoce.

La scintigraphie V/Q planaire permet une exploration de la perfusion et de la ventilation du poumon. L'évaluation de la perfusion artérielle pulmonaire consiste à injecter par voie intraveineuse périphérique des micro-agrégats d'albumine marqués au technétium  $^{99m}$  ( $^{99m}\text{Tc}$ ) dont la répartition dans l'arbre artériel est directement dépendante du débit sanguin local. Les conditions de réalisation sont strictes : le patient doit être en décubitus dorsal afin de s'affranchir du gradient vertical de distribution de la perfusion pulmonaire et les images, sous 8 incidences, sont acquises immédiatement car les micro-agrégats sont bloqués dès leur premier passage dans les capillaires pulmonaires. L'étude de la ventilation se fait à l'aide de séquences distinctes réalisées selon les mêmes incidences après inhalation d'un gaz radioactif insoluble, le plus souvent le krypton  $^{81}\text{m}$ . Il s'agit d'une imagerie fonctionnelle : une scintigraphie normale est caractérisée par une répartition homogène des deux traceurs radioactifs et cohérente sur les clichés en ventilation et sur ceux en perfusion sur l'ensemble des incidences (figure 1).

**Figure 1. Scintigraphie V/Q: aspect normal (8 incidences)**



Les images en ventilation sont superposables aux images en perfusion

La scintigraphie V/Q est donc une imagerie fonctionnelle qui permet donc d'affirmer la normalité de la vascularisation pulmonaire ou d'en détecter des anomalies apparaissant sous forme de lacunes ou de plages d'hypoactivité sur les clichés de perfusion. L'interprétation des clichés se fait à l'aide des critères proposés par l'étude PIOPED [51] qui a défini les sensibilité et spécificité de l'examen pour le diagnostic d'embolie pulmonaire. Il est admis qu'une séquelle perfusionnelle est une anomalie caractéristique compatible avec une embolie pulmonaire, qui persiste au terme du traitement anticoagulant usuel de 6 mois.

Deux critères sont nécessaires pour considérer ces anomalies comme des altérations isolées de la vascularisation artérielle pulmonaire : (1) elles doivent être systématisées et correspondre à un territoire anatomique fonctionnel pulmonaire (lobaire,

segmentaire ou sous segmentaire) sur deux incidences et (2) elles doivent être discordantes, ou « mismatchées », avec les clichés obtenus en ventilation dans les territoires correspondants.

Les séquelles perfusionnelles peuvent être quantifiées à l'aide d'une méthodologie validée après s'être assuré du caractère « mismatché » des anomalies [52]. La distribution régionale du débit sanguin artériel pulmonaire permet d'attribuer à chacun des lobes un pourcentage de la vascularisation pulmonaire. Ainsi, en décubitus dorsal et chez un sujet sain, le lobe inférieur droit représente 25% de la vascularisation pulmonaire, le lobe moyen 12%, le lobe supérieur droit 18%, le lobe inférieur gauche 20% et le lobe supérieur gauche 25%. La comparaison de la photodensité de chaque lobe à celle d'un territoire normalement perfusé permet une évaluation semi-quantitative de la perfusion, en lui attribuant un score allant de 0 en l'absence totale de perfusion à 1 pour une perfusion normale. La perfusion de chaque lobe peut ainsi être calculée en multipliant ce score par le poids respectif de chacun des lobes. Le score de perfusion globale correspond à la somme du score pour chacun des 5 lobes pulmonaires et le pourcentage d'obstruction résiduelle calculée à l'aide de la formule  $(1 - \text{score de perfusion globale}) \times 100$ . Les figures 2 et 3 présentent des scintigraphies anormales avec des séquelles perfusionnelles chiffrées respectivement à  $<10\%$  et  $>10\%$  (figures 2 et 3).

### 2.3. Prévalence

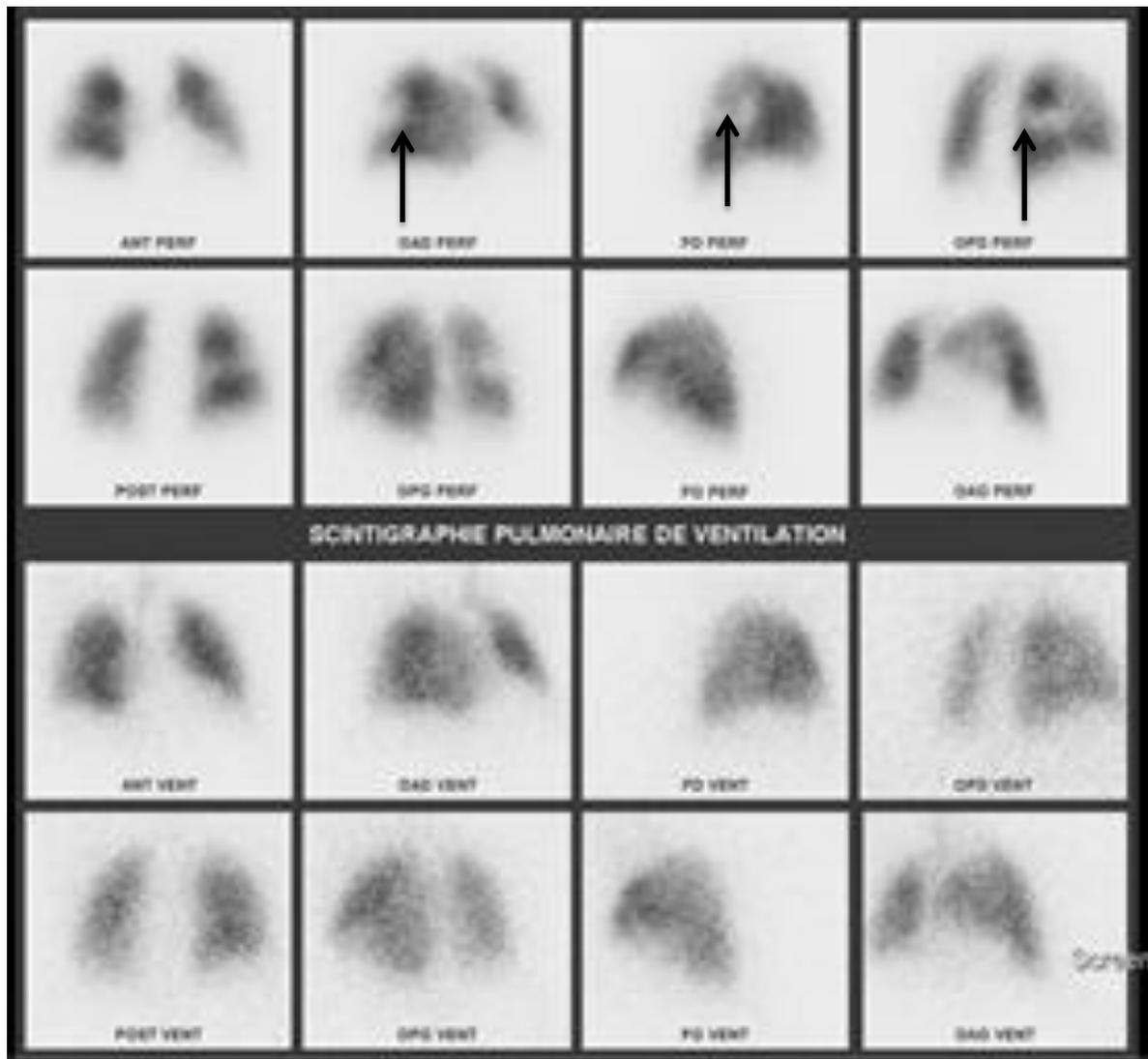
La prévalence des séquelles perfusionnelles est très variable dans la littérature. Ces différences peuvent être expliquées par la différence de performance entre l'angioscanner et la scintigraphie pulmonaire de ventilation et de perfusion dans la détection de celles-ci. Le scanner thoracique est moins performant pour détecter la présence de séquelles au 6<sup>ième</sup> mois. La prévalence des séquelles post emboliques scannographiques varie de 29% à 15% selon les études [26], [28], [49], [50], [53], [54].

Deux études ont comparé la scintigraphie à l'angioscanner pour la détection des séquelles post emboliques. Dans une analyse ancillaire de l'étude Einstein PE sur 347 patients présentant la même obstruction initiale, la prévalence des séquelles était de 38% chez les 84 patients évalués par scintigraphie alors qu'elle était de 29% chez les patients évalués par l'angioscanner [28]. Cosmi et al. ont retrouvé des prévalences similaires, respectivement 28% et 15% à 3 mois, dans une population de 173 patients présentant un premier épisode d'EP, diminuant le biais induit par des épisodes antérieurs potentiellement sources de séquelles [53]. De façon intéressante, les patients évalués par angioscanner et ceux évalués par scintigraphie V/Q étaient comparables en termes de présentation clinique et de traitement anticoagulant (nature et durée).

Seule une étude ayant inclus 227 patients suspects d'HTP-TEC a comparé les performances des deux examens [55]. Les scintigraphies étaient analysées selon les critères PIOPED et les angioscanners évaluaient le degré d'obstruction et les autres signes en faveur de lésions thrombotiques chroniques. Soixante-dix-huit patients présentaient une HTP-TEC confirmée. Les sensibilités respectives des deux examens étaient de 51% pour l'angioscanner et de 95% pour la scintigraphie V/Q, avec une spécificité excellente et comparable (> 90%).

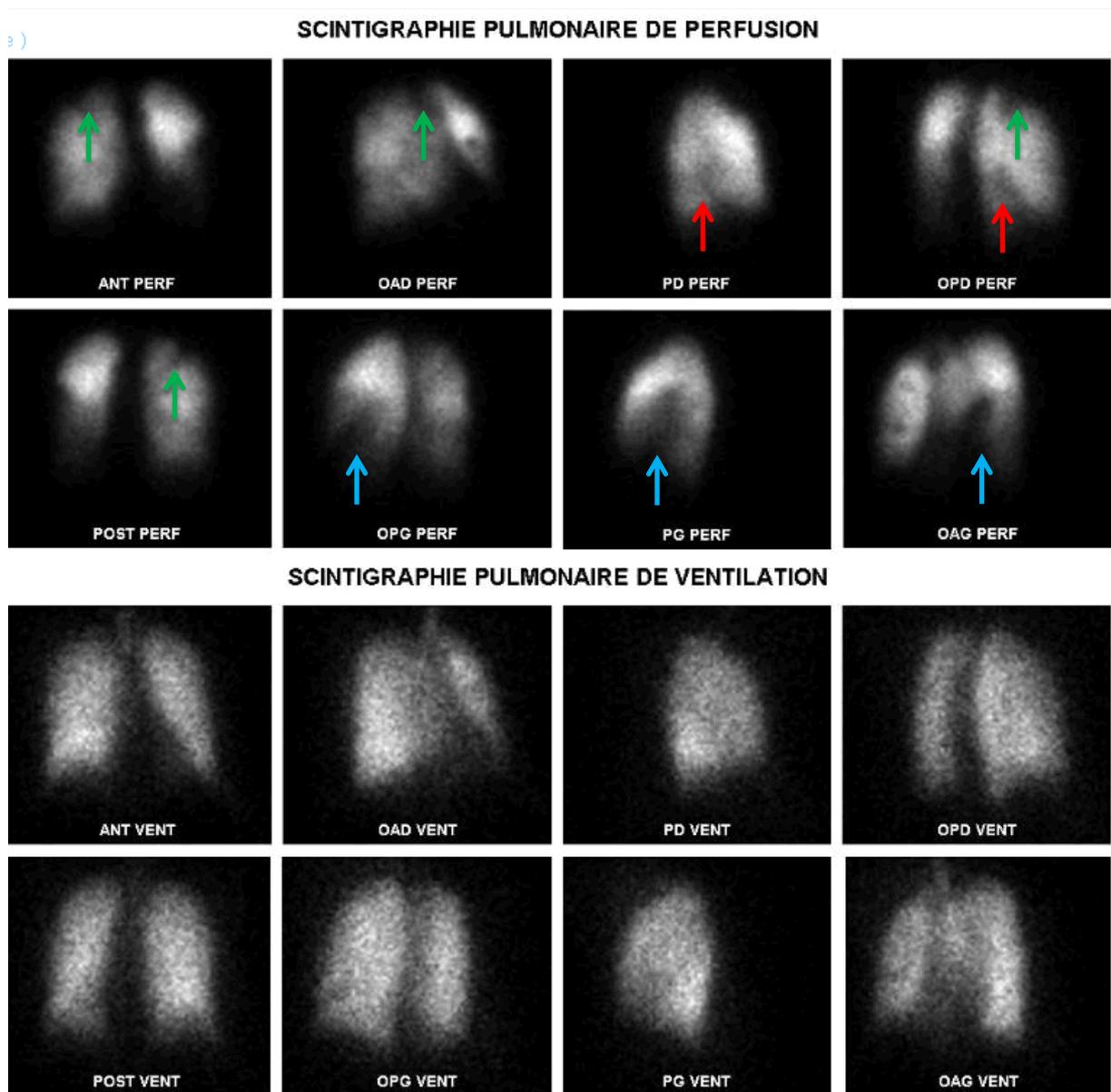
La scintigraphie est donc l'examen le plus performant pour détecter les séquelles perfusionnelles, et a été retenu dans l'algorithme diagnostique des suspicions de HTP-TEC par les recommandations internationales [18], [56]. Des études de cohorte avec un suivi scintigraphique ont montré que des séquelles perfusionnelles sont présentes chez 30 à 50% des patients un an après une EP [48], [57].

**Figure 2. Scintigraphie V/Q : aspect de séquelles perfusionnelles < 10%**



Présence de défauts de perfusion (flèches) sur 3 incidences (oblique antérieur droit, profil droit et oblique postérieur droit) dans le segment supérieur du lobe inférieur droit. Ventilation normale. Score d'obstruction 6%.

**Figure 3. Scintigraphie V/Q : aspect de séquelles perfusionnelles > 10%**



Présence de 3 défauts de perfusion (flèches de couleurs) sur plusieurs incidences dans le segment apical du lobe supérieur droit (flèche verte), la pyramide basale droite (flèche rouge) et la lingula (flèche bleue) Ventilation normale. Score d'obstruction 18%.

## 2.4. Impact fonctionnel

Plusieurs études se sont intéressées au pronostic fonctionnel à distance d'une EP en l'absence de survenue d'une HTP-TEC. Ainsi, Klok et al. ont documenté, dans une série de 48 patients suivis prospectivement, une dyspnée chez la majorité d'entre eux (56%) [58]. Sept fois sur dix, la dyspnée ne préexistait pas à l'épisode d'EP aiguë ou était nettement majorée après celui-ci. Ainsi, 40% des patients présentaient une dyspnée de stade III ou IV de la NYHA. La même équipe a aussi montré que la dyspnée est associée à une altération significative des capacités à l'exercice, mais qu'elle est imputable dans la très grande majorité des cas à une comorbidité préexistante [59]. Néanmoins, d'autres études montrent des résultats contradictoires sur ce dernier point. Ainsi, chez 109 patients indemnes de comorbidités cardio-vasculaires, Stevinson et al. ont ainsi prospectivement évalué 6 mois après l'épisode d'EP la fonction ventriculaire droite à l'échographie, la capacité à l'exercice par le test de marche de 6 minutes, et la dyspnée par l'échelle NYHA [60]: 45% des patients présentaient au moins une anomalie cardio-vasculaire et 25% avaient une limitation fonctionnelle à l'effort définie par une distance parcourue lors du test de marche de 6 minutes inférieure à 330 mètres et/ou une dyspnée de stade III ou IV de la NYHA. Deux autres études ont aussi corrélié l'existence d'une élévation des pressions systoliques du ventricule droit à une dyspnée invalidante à distance d'une EP [48], [61]. Kline et al. ont montré, chez 180 patients survivants après une EP, que 7% d'entre eux conservaient une élévation de la pression artérielle pulmonaire (PAP) > 40 mmHg à distance de l'épisode [61]. De façon intéressante, 39 patients avaient une augmentation de la PAP lors de la réévaluation, comparée à la mesure à la phase aiguë de l'EP: 18 avaient une diminution des performances à l'effort. L'étude menée par Sanchez et al. chez 254 patients suivis prospectivement après une EP

traitée par les anticoagulants au moins 3 mois s'est intéressée aux conséquences fonctionnelles des séquelles perfusionnelles, définies comme une obstruction résiduelle supérieure à 10%, et a cherché à en identifier les facteurs de risque [48]. Dans cette étude, 40% des patients présentant des séquelles perfusionnelles conservaient une dyspnée, dont la moitié de stade III ou IV de la NYHA, et avaient une limitation de la performance à l'effort avec une diminution significative de la distance parcourue au test de marche des 6 minutes, et une élévation significative de la pression artérielle systolique pulmonaire évaluée à l'échographie.

Les mécanismes de la dyspnée persistante après une EP restent encore discutés. Compte tenu de l'absence d'HTP-TEC chez ces patients, une des hypothèses est l'altération des rapports ventilation-perfusion. A la phase aiguë d'une EP, la conjonction d'un effet espace-mort dans les territoires embolisés et d'un effet shunt dans les territoires où se redistribue le débit artériel pulmonaire, explique probablement l'hypoxémie et l'hypocapnie des patients. Il a été montré que l'amélioration des échanges gazeux était corrélée à la résolution des caillots chez des patients bénéficiant d'une thrombolyse [62]. De façon intéressante, une étude a comparé les performances cardio-respiratoires lors d'une épreuve d'effort standardisée chez des patients présentant une HTP-TEC, des patients présentant un syndrome post EP et des patients contrôles sédentaires [63]. Ainsi, au maximum de l'exercice, les patients présentant un syndrome post EP avaient, comparativement aux sujets contrôles, une  $VO_2$ max plus basse, un pouls d'oxygène plus bas traduisant une limitation cardiaque plus importante, une pente  $V_E/VCO_2$  plus élevée traduisant une inefficience ventilatoire accrue et un espace mort physiologique ( $V_D/V_T$ ) augmenté. Ces anomalies étaient significativement plus marquées chez les patients avec une HTP-TEC. Bien qu'aucune corrélation ne puisse être faite entre l'altération des capacités à l'exercice et la non résolution des thrombus dans cette étude, il est

intéressant de noter que les patients avec HTP-TEC ou avec un syndrome post EP avaient une obstruction résiduelle de la vascularisation artérielle pulmonaire importante. Dans ce sens, il a été montré dans une série prospective regroupant 834 patients avec une EP que la restauration de la perfusion pulmonaire évaluée par la scintigraphie était associée à une amélioration considérable de l'oxygénation artérielle [21].

Plusieurs études se sont aussi récemment intéressées à l'altération de la qualité de vie après un épisode d'EP [64]–[66]. Dans une population de 392 patients, les patients avaient des scores de qualité de vie (SF-36) inférieurs à ceux des contrôles 3 ans et demi après une EP aiguë [64].

### **3. Récidives d'embolie pulmonaire**

#### **3.1. Prévalence**

L'incidence cumulée des récurrences après un premier épisode de MVTE varie de 4,9% à 8,3% à 3 mois et de 10% à 17,5% à 2 ans selon les études [15], [17], [32]. Ces variations importantes sont expliquées par l'hétérogénéité des critères d'inclusion de ces études : phlébites ou phlébitis et EP, premiers épisodes ou non, patients avec un cancer.

La prévalence des récurrences thromboemboliques à l'arrêt des anticoagulants varie selon le contexte de survenue de la MVTE [17]. De nombreux travaux ont montré que les épisodes provoqués par un facteur de risque majeur transitoire étaient associés à un risque de récurrence faible [13]–[16], [32]. Dans une étude prospective, Prandoni et al. ont montré que les événements thromboemboliques survenus après une chirurgie ou un traumatisme d'un membre inférieur étaient associés à un risque de récurrence plus faible que les épisodes non provoqués (hazard ratio 0,36; IC 95% 0,21-0,62 et 0,51, IC95% 0,32-0,87, respectivement) [15]. Le risque de récurrence est aussi plus faible quand

l'évènement survient dans un contexte hormonal : grossesse, post-partum ou traitement contraceptif, avec un risque comparable à celui d'un épisode provoqué [67], [68]. Deux méta-analyses récentes montrent que l'incidence des récurrences à 1 an après un épisode provoqué par un facteur de risque majeur transitoire, comme la chirurgie, est de 1% [69], [70]. Une étude de cohorte a suivi 1627 patients avec un premier épisode de phlébite proximale ou d'EP sans cancer connu, pendant une durée médiane de 50 mois et certains patients jusqu'à 10 ans [71]. L'incidence cumulée des récurrences était de 11% (95% IC, 9,5-12,5) à 1 an, 19.6% (95% IC ; 17,5-21,7) à 3 ans, 29.1% (95% IC;26,3-31,9) à 5 ans, et 39.9% (35.4-44.4) à 10 ans. En dehors du caractère non provoquée de la MTEV (HR 2.30 (95% IC ; 1,82-2,90), les autres facteurs de risque indépendants de ré,80)), une durée de traitement anticoagulant courte (< 6 mois), l'âge (HR pour une augmentation de 10 ans: 1,14 (1,06-1,12)) et la présence d'une thrombophilie biologique (HR 1,44 (1,03-2,03)). Par ailleurs, plusieurs études montrent que le risque de récurrence est plus important après une EP qu'après une phlébite distale [70] et que dans 80% des cas la récurrence se présente sous la même forme que l'épisode initial [72]. Enfin, la létalité des récurrences d'EP est supérieure à celle des phlébites : 15% vs 2% [73]. La survenue de récurrences d'embolie pulmonaire est un facteur de risque documenté de développer des séquelles perfusionnelles et une HTP-TEC [37], [48]. L'arrêt du traitement peut donc avoir un impact sur les capacités fonctionnelles et la qualité de vie des patients lorsqu'ils présentent un syndrome post EP. Par ailleurs, il a aussi été montré que les récurrences d'EP étaient un facteur de risque indépendant d'altération de la qualité de vie des patients [64].

### 3.2. Prévention des récurrences par l'anticoagulation prolongée:

Le risque de récurrence étant faible chez les patients avec un épisode provoqué, la problématique d'un traitement prolongé ne concerne que les premiers épisodes idiopathiques de MVTE. Pour ces patients, une durée de traitement inférieure à 3 mois est associée à une augmentation du risque de récurrence [16], [74]. Il est acquis qu'il faut traiter les EP non provoqués au moins 6 mois [18]. Au-delà de cette phase initiale, la durée optimale de traitement a fait l'objet de nombreuses études. Les résultats de l'étude récente PADIS-EP ont montré qu'une durée 24 mois de traitement n'améliorait pas le pronostic des patients : à distance de l'arrêt du traitement prolongé le taux de récurrence était identique à celui constaté chez les patients traités 6 mois, de l'ordre de 20% à 5 ans [33]. Cela suggère que le maintien du traitement anticoagulant doit être illimité pour prévenir les récurrences, qui ne concernent que 20% des patients à long terme après un premier épisode d'EP non provoqué.

Si la prévention des récurrences peut être efficacement assurée par le maintien du traitement anticoagulant, le bénéfice clinique net d'une telle stratégie est parfois difficile à évaluer et doit prendre en compte le risque de survenue d'accidents hémorragiques. En effet, l'anticoagulation curative réduit le risque de récurrence de près de 90% mais expose à un risque hémorragique de 1 à 3% par an [75]. L'Agence Nationale de Sécurité du Médicament a montré en 2012 que les anticoagulants de la famille des antivitaminiques K étaient responsables de 5000 à 6000 accidents mortels par an en France [76]. Spencer et al. ont montré que le risque de saignement augmentait nettement avec l'âge, en particulier après 65 ans, et avec la durée de traitement [4], [77]. Ainsi, chez les patients de plus de 65 ans traités pour un épisode de MVTE, l'incidence des saignements selon la définition consensuelle proposée par l'ISTH [78] était de 13,6% à un an alors que les récurrences de MVTE et d'EP étaient respectivement de 10,8% et de

2,7%. Récemment, un nouveau score, VTE BLEED score, a été dérivé pour évaluer spécifiquement le risque de saignement chez les patients traités pour un épisode de MVTE quel que soit l'anticoagulant proposé au patient [79]. Ce score identifie 25% de la population traitée comme à fort risque hémorragique. Par ailleurs, il a été proposé que le traitement soit maintenu quand le risque de récurrence était supérieur à plus de 5% [80]. Enfin, une méta-analyse [81] récente a inclus 6 essais randomisés comparant deux stratégies de durée de traitement (traitement court d'au 3 mois contre traitement prolongé) chez des patients avec une MVTE (70% d'épisodes non provoqués) afin d'évaluer l'impact de l'anticoagulation prolongée sur la mortalité toute cause confondue. L'analyse a porté sur 5920 patients, dont 2532 dans le groupe traitement court ; 3 études utilisaient des AVK et 3 des anticoagulants oraux directs. En moyenne les patients recevaient 7 mois et demi d'anticoagulants dans le groupe de courte durée et 18,6 mois dans le groupe de traitement prolongé. L'anticoagulation prolongée était associée à une réduction significative de la mortalité toute cause confondue (0,8% contre 1,8%; RR 0,47 (IC95%, 0,29-0,75)) mais aussi de la mortalité liée à l'EP (0,2% contre 0,6% RR 0,32 IC95%, 0,12-0,83)).

Il semble donc que le bénéfice net de la poursuite du traitement anticoagulant au terme de la période initiale de 6 mois puisse être amélioré par l'identification des patients à fort risque de récurrence, d'autant plus que la MVTE concerne préférentiellement des patients de plus de 65 ans et que le risque hémorragique augmente avec l'âge et la durée d'exposition aux anticoagulants [77].

### 3.3. Prédiction des récurrences :

Chez les patients avec un premier épisode non provoqué, le risque de récurrence à l'arrêt du traitement est de l'ordre de 10% à 1 an [69] et atteint 30% à 5 ans. Plusieurs

approches ont été proposées pour prédire la survenue des récurrences et essayer d'identifier des patients à plus faible de risque de récurrence: le dosage des DDimères plasmatiques, l'évaluation des séquelles post-thrombotiques et le développement de scores prédictifs.

Concernant le dosage des DDimères plasmatiques, si leur positivité en fin de traitement ou à l'arrêt de celui-ci est associée à une majoration du risque de récurrence, leur négativité ne permet d'identifier de façon satisfaisante des patients à faible risque de récurrence. En effet, la valeur prédictive négative reste imparfaite et le taux annuel de récurrence est estimé entre 3 et 7% chez les malades avec des DDimères négatifs [68], [82]–[84]. Le dosage répété des DDimères à l'arrêt des anticoagulants puis 1 mois après n'améliore pas les performances de l'examen. Dans une étude récente, les patients avec deux dosages des DDimères négatifs successifs à un mois d'intervalle présentaient un taux de récurrence de 6,9% par an [68]. Le bénéfice du dosage répété des DDimères semble donc limité d'autant plus que la période d'arrêt expose les patients au risque de récurrence. Enfin, l'ajustement du seuil des DDimères à l'âge et/ou au sexe pourrait améliorer les performances du test mais des investigations supplémentaires sont nécessaires.

Plusieurs scores ont été développés en combinant différents facteurs de risque cliniques ou biologiques, en particulier le dosage des plasmatique des DDimères, pour identifier les patients à faible risque de récurrence chez qui le traitement peut être arrêté. Trois principaux scores – DASH, "Men continue and Herdoo2", VIENNA- ont été ainsi proposés (tableaux 2, 3, 4). Ces scores sont intéressants car ils permettent d'évaluer le risque individuel de récurrence et sont méthodologiquement robustes car tous dérivés de cohortes prospectives permettant de collecter les variables pronostiques sans connaître les événements chez les patients [85]. Les 3 analyses ont utilisé des critères d'inclusion et de non inclusion similaires : tous les patients présentaient un premier épisode de

MVTE non provoquée traité au moins 3 mois par anticoagulants. Les patients de moins de 18 ans, ou avec une thrombophilie connue associée à un fort risque de récurrence ou les patients traités moins de 3 mois étaient exclus. Les patients de DASH étaient sensiblement plus âgés et le suivi dans la cohorte VIENNA plus prolongé. Toutefois, la définition du caractère non provoqué de la MVTE variait sensiblement d'une étude à l'autre, en particulier dans les cohortes DASH et HERDOO2 qui ont inclus les épisodes survenant sous contraception ou traitement hormonal substitutif considérant qu'il s'agit d'un facteur de risque de récurrence faible. Le critère de jugement principal était identique dans les 3 cohortes : la première récurrence documentée de MVTE. Il est aussi important de noter que l'analyse de l'étude REVERSE manque de puissance. En effet, 36 variables pronostiques ont été incluses dans le modèle pour 91 récurrences soit 2,5 événements/variable; or, il a été montré qu'un nombre d'événement/variable < 10 peut biaiser l'estimation de l'effet prédictif. Comparativement, les modèles VIENNA et DASH ont inclus respectivement 15 et 14 variables d'intérêt pour 176 et 239 récurrences. Le sexe et les DDimères sont les variables communes aux 3 règles de prédiction. Bien que commun aux scores Herdoo2 [86] et DASH [87], l'âge semble jouer un rôle contradictoire dans chacun de ces modèles. Les seuils à risque retenus par chacun des 2 scores sont opposés : le Men continue and Herdoo2 attribue un risque majoré après 65 ans alors que le DASH majore le risque chez les patients de moins de 50 ans. Cette apparente contradiction traduit le caractère non continu du risque de récurrence dans le temps, les épisodes de MVTE chez les patients les plus jeunes étant plus souvent associés à une thrombophilie constitutive et témoigne probablement des différences entre les cohortes de dérivation de ces deux scores. A ce jour, seul le score VIENNA a été validé de manière externe dans une autre cohorte de patients [88]. En résumé, ces 3 règles de prédiction n'ont pas été encore prospectivement validées et ne peuvent donc

être utilisées en pratique clinique. Les résultats de deux essais prospectifs randomisés REVERSE II (NCT00967304) et VISTA évaluant respectivement les scores Men continue and HERDOO2 et VIENNA, sont en attente.

**Tableau 2. Scores clinico-biologiques de prédiction des récidives de MVTE**

Modèle	Herdoo2 Rodger et al [86]	Vienna Prediction model Eichinger et al [88]	DASH prediction model Tosetto et al [87]
Année de publication	2008	2010	2012
Méthodologie	Cohorte prospective multicentrique internationale	Cohorte prospective multicentrique autrichienne	Cohorte prospective multicentrique internationale
Critères d'inclusion	Première épisode de MVTE non provoqué chez des patients de plus de 18 ans traités au moins 3 mois		
Critère de jugement principal	Première récidive symptomatique et documentée de MVTE		
Délai d'évaluation	12 mois	12 et 60 mois	12,24 et 60 mois
Nombre total de patients de la cohorte	646	929	1818
Nombres de récidives	91	176	239
<b>Modèles pronostiques</b>			
	HERDOO2	VIENNA	DASH
	Tous les hommes sont traités au long cours Chez les femmes : Hyperpigmentation Œdème ou rougeur DDimères (sous traitement seuil >250 µg/mL) Obésité (IMC>30) Âge (>65 ans)	Sexe Localisation de la thrombose (EP, phlébite proximale ou phlébite distale) DDimères (à l'arrêt du traitement)	DDimères (à l'arrêt du traitement, seuil>500 µg/mL) Age (< 50 ans,+1) Sexe (masculin,+1) Traitement hormonal (-2) Arrêt du traitement si DASH score ≤ 1

IMC : Indice de masse corporelle

**Tableau 3. Définition des épisodes non provoqués selon les modèles de prédiction des récives.**

Modèle	Herdoo2 Rodger et al [86]	Vienna Prediction model Eichinger et al [88]	DASH prediction model Tosetto et al [87]
Episode non provoqué par			
Traumatisme	X	X	X
Chirurgie	X	X	X
Cancer	X	X	X
Grossesse		X	X
Alitement	X		X
Traitement hormonal		X	

**Tableau 4. Variables prédictives retenues selon les modèles de prédiction des récives.**

Modèle	Herdoo2 Rodger et al [86]	Vienna Prediction model Eichinger et al [88]	DASH prediction model Tosetto et al [87]
Variable incluse			
DDimères	X	X	X
Age	X	X	X
Sexe	-	X	X
IMC	X		
Syndrome post phlébitique	X		
Site de la thrombose initiale		X	
Traitement hormonal			X

IMC : Indice de masse corporelle

Une autre question importante est le rôle de ces séquelles dans le risque de survenue d'une récive thrombo-embolique. Le syndrome post phlébitique clinique témoigne de la persistance d'une obstruction vasculaire résiduelle des veines des membres inférieurs

et semble associé à un risque majoré de récurrence de phlébite [89], [90]. Néanmoins, la présence d'une obstruction vasculaire aux membres inférieurs ne permet pas de prédire le risque de récurrence d'EP [75]. La relation, voire le continuum physiopathologique aujourd'hui proposé par certains[39], entre les séquelles perfusionnelles et la survenue de récurrence d'EP est encore incertaine. Plusieurs séries ont été rapportées dans la littérature avec des résultats contradictoires (Tableau 5). Dans une série rétrospective monocentrique suédoise de 227 patients ayant eu au moins deux évaluations par tomoscintigraphie pulmonaire V/Q (SPECT) pendant la période de traitement, Alhadad et al ont identifié la présence de séquelles perfusionnelles (odds ratio 10,6 ; IC95% 2,1-52,6 ; p=0,0039) et l'âge (odds ratio 1,083; IC95% 1,031-1,137, p=0,0013) comme facteurs indépendants de récurrence [91]. La présence de séquelles était corrélée à l'importance de l'obstruction initiale de l'EP comme l'avait précédemment montré Sanchez et al [48]. Ces résultats sont cependant limités par l'absence de critères précis de définition des séquelles perfusionnelles, l'absence d'évaluation quantitative de celles-ci et l'inclusion de 20% de patients présentant un antécédent d'EP les exposant à des séquelles préexistantes. Une autre série de 236 patients présentant une EP, dont 25% d'épisodes provoqués, a été rapportée par Poli et al [92]. Cette étude rétrospective ne montre pas d'association entre la présence de séquelles perfusionnelles scintigraphiques > 10% et la survenue d'une récurrence. Toutefois, l'évaluation de l'obstruction résiduelle était limitée à une exploration de la perfusion sans étude combinée de la ventilation, nécessaire pour s'assurer qu'un défaut de perfusion est bien discordant avec la ventilation. Deux autres séries [49], [50] ont rapporté des résultats négatifs concernant la prédiction du risque de récurrences thromboemboliques par l'obstruction résiduelle vasculaire pulmonaire mais l'évaluation des séquelles était réalisée à l'aide d'un angioscanner, qui est moins sensible que la scintigraphie pour les

détecter [55]. Il manque des études prospectives de plus grande envergure pour évaluer le potentiel rôle des séquelles perfusionnelles dans le risque de récurrence. Bien qu'elles aient été associées à une altération du pronostic fonctionnel des patients leur présence n'est pas prise, à ce jour, en compte pour déterminer la durée du traitement anticoagulant et optimiser la prévention des récurrences après un premier épisode d'EP.

**Tableau 5. Séquelles perfusionnelles (SP) et risque de récurrence de MVTE**

Référence	Méthodologie Nombre de patients	Technique d'évaluation / délai	Récurrences de MVTE	Séquelles perfusionnelles	Résultats principaux
Alhadad et al [91]	Analyse rétrospective 227 patients, dont 50 (20%) patients avec un antécédent de MVTE	Scintigraphie de ventilation/perfusion en mode tomographique (SPECT) 6 à 8 mois (moyenne)	37 (16%)	76 patients normalisent leur perfusion pulmonaire, 226 (66%) présentent des anomalies (pas de calcul du% d'obstruction résiduel)	SP : facteur de risque indépendant de récurrence d'EP (odds ratio 10,6 ; IC95% 2,1-52,6, p=0.0039)
Poli et al [92]	Analyse rétrospective 135 patients chez qui le traitement est interrompu  Premiers épisodes à priori	Scintigraphie de perfusion, planaire 11 mois (médiane)	20 (14,8%)	31 (22,3%)	<b>Pas d'association SP&gt;10% et récurrence d'EP</b>
Den Exter [50]	Prospective Multicentrique 157 patients, dont 25 (16%) patients avec un antécédent de MVTE	Angioscanner thoracique, 6 mois	16 (10,1%)	25 (15,9%)	<b>Pas d'association entre SP et récurrence d'EP</b>
Pesavento, [49]	Prospective, monocentrique 113 patients avec un premier épisode	Angioscanner thoracique, 6 mois	19 (16,8%)	16 (14,2%)	<b>Pas d'association entre SP et récurrence d'EP</b>

#### **4. Hypertension pulmonaire thromboembolique chronique**

L'hypertension pulmonaire thromboembolique chronique (HTP-TEC) est liée à la persistance et l'organisation fibreuse d'embols fibrino-cruoriques associé au développement d'un remodelage micro-circulatoire pulmonaire dans les territoires non occlus. Elle appartient au groupe 4 de la classification des hypertensions pulmonaires [56], [93]. Elle est définie par une élévation de la pression artérielle pulmonaire moyenne  $\geq 25$  mmHg au repos avec une pression capillaire  $\leq 15$  mmHg associée à au moins un défaut de perfusion mismatché sur une scintigraphie pulmonaire planaire V/Q et des lésions thrombotiques chroniques spécifiques sur un angioscanner thoracique ou une angiographie pulmonaire après au moins 3 mois d'anticoagulation efficace [56].

##### 4.1. Prévalence

Autrefois considérée comme exceptionnelle, cette pathologie est de plus en plus souvent recherchée et diagnostiquée grâce à l'amélioration des techniques d'imagerie vasculaire pulmonaire mais aussi grâce au développement de nouvelles options thérapeutiques, chirurgicale ou non qui ont permis d'en modifier le pronostic. Des séries rétrospectives anciennes estimaient la fréquence de survenue d'une HTP-TEC entre 0,1 et 0,5% parmi les patients survivants à une EP aiguë. Des études prospectives ont rapporté des incidences de l'HTP-TEC de 2 à 3,8% à 2 ans [35], [94]. Toutefois, dans la cohorte rapportée par Pengo et al, le délai écoulé entre l'épisode embolique initial et le diagnostic d'HTP-TEC était très court: moins de 12 mois chez 6 des 7 patients présentant une HTP-TEC. Ces données sont cohérentes avec celles rapportées par Korkmaz et al qui rapportent une prévalence d'HTP-TEC de 4,6% dont 80% des cas surviennent dans la première année après le diagnostic d'EP initiale et aucun cas près 2 ans [95]. Ces résultats sont surprenants étant donné qu'il existe le plus souvent un intervalle libre entre l'épisode embolique initial et l'apparition des symptômes d'HTP-

TEC appelé « lune de miel ». L'ensemble de ces éléments suggère que certains patients inclus dans ces études présentaient probablement déjà une HTP-TEC méconnue au moment du diagnostic initial d'EP et seraient à l'origine d'une surestimation de son incidence. Afin de tester cette hypothèse, une étude multicentrique prospective incluant 150 patients atteints d'EP a dépisté prospectivement les cas d'HTP-TEC par une échocardiographie cardiaque. Un cathétérisme cardiaque était réalisé chez les patients dyspnéiques qui présentaient une échocardiographie anormale afin de confirmer le diagnostic d'HTP-TEC. Après un suivi médian de 2 ans, la prévalence de l'HTP-TEC était de 4,7%, proche de celle rapportée dans d'autres études [36]. Le diagnostic d'HTP-TEC était posé après un délai moyen de 13,7 mois et dans l'année qui suivait l'EP chez 5 des 7 patients avec une HTP-TEC. Les patients atteints d'HTP-TEC étaient plus âgés, avaient plus fréquemment des antécédents thromboemboliques et une EP proximale. Ils présentaient, dès l'EP initiale, une élévation importante de la pression artérielle pulmonaire systolique sur l'échocardiographie. Enfin, la relecture de l'angioscanner thoracique ayant permis de diagnostiquer l'EP initiale retrouvait déjà des anomalies évocatrices d'HTP-TEC chez les 7 patients. Ces résultats suggèrent donc qu'une majorité de patients qui ont une HTP-TEC diagnostiquée après une EP a déjà des lésions d'hypertension pulmonaire méconnues au moment de l'épisode d'EP qui a été en quelque sorte le révélateur de cette pathologie. Par ailleurs, Klok et al ont aussi montré que la fréquence de l'HTP-TEC était plus élevée chez les patients ayant présenté une EP non provoquée [96] inscrivant cette complication dans le même cadre nosologique que les récurrences d'EP ou le syndrome post EP. Compte tenu d'une prévalence de l'HTP-TEC faible, il n'est pas recommandé de dépister cette pathologie au décours d'une EP sauf en cas de dyspnée persistante. Dans ce cas, l'échocardiographie et la scintigraphie pulmonaires sont les 2 examens de 1<sup>ère</sup> intention recommandés [18].

#### 4.2. Facteurs de risque :

Les données d'un large registre prospectif international incluant des patients avec une HTP-TEC montrent que 80% des patients ont un antécédent d'EP [97]. Certaines caractéristiques de l'EP constituent des facteurs de risque de développer une HTP-TEC (tableau 6). De manière intéressante, on note que l'HTP-TEC et les séquelles perfusionnelles partagent des facteurs de risque communs suggérant que les séquelles perfusionnelles pourraient constituer un état pathologique intermédiaire précédant la survenue d'une HTP-TEC [48], [60], [61].

Enfin, près de 25% des patients ne rapportent aucun antécédent de MVTE. Ainsi, d'autres pathologies, comme la splénectomie, les dérivations ventriculo-atriales ou encore les maladies inflammatoires (ostéomyélites, colites...) peuvent se compliquer d'HTP-TEC et sont aussi associés à un moins bon pronostic de la maladie [98]. La relation entre le sepsis chronique de dispositifs endovasculaires et l'HTP-TEC, en particulier les infections à *Staphylococcus epidermidis*, a été suggérée par la publication d'une série de 17 cas d'HTP-TEC chez des patients porteurs d'une voie veineuse centrale avec chambre implantable, dont un tiers présentait une infection à *Staphylocoque* [99]. Un modèle murin d'HTP-TEC a été développé en injectant des thrombi infectés dans la veine cave inférieure ligaturée [100].

**Tableau 6. Facteurs de risque d'HTP-PE, d'après Piazza et al [37]**

<b>Facteurs de risque associé à l'embolie pulmonaire</b>
Récidive ou épisode non provoqué Obstruction initiale importante Ages extrêmes au diagnostic d'EP PAPs>50mmHG Elévation de la pression artérielle pulmonaire à l'échographiques après 6 mois de traitement
<b>Maladies chroniques</b>
Infection chronique de shunt dérivation ventriculo-atriale, de sonde de pace maker Splénectomie Maladie inflammatoire chronique Traitement hormonal substitutif thyroïdien Cancer
<b>Facteur de risque de thrombose</b>
Lupus et SAPL Elévation du facteur VIII Dysfibrinogénémie
<b>Facteurs génétiques</b>
Groupe sanguin autre que O Polymorphisme HLA Fibrinolyse endogène défaillante

PAPs : Pression Artérielle Pulmonaire Systolique

SAPL : syndrome des antiphospholipides

#### 4.3. Prédiction

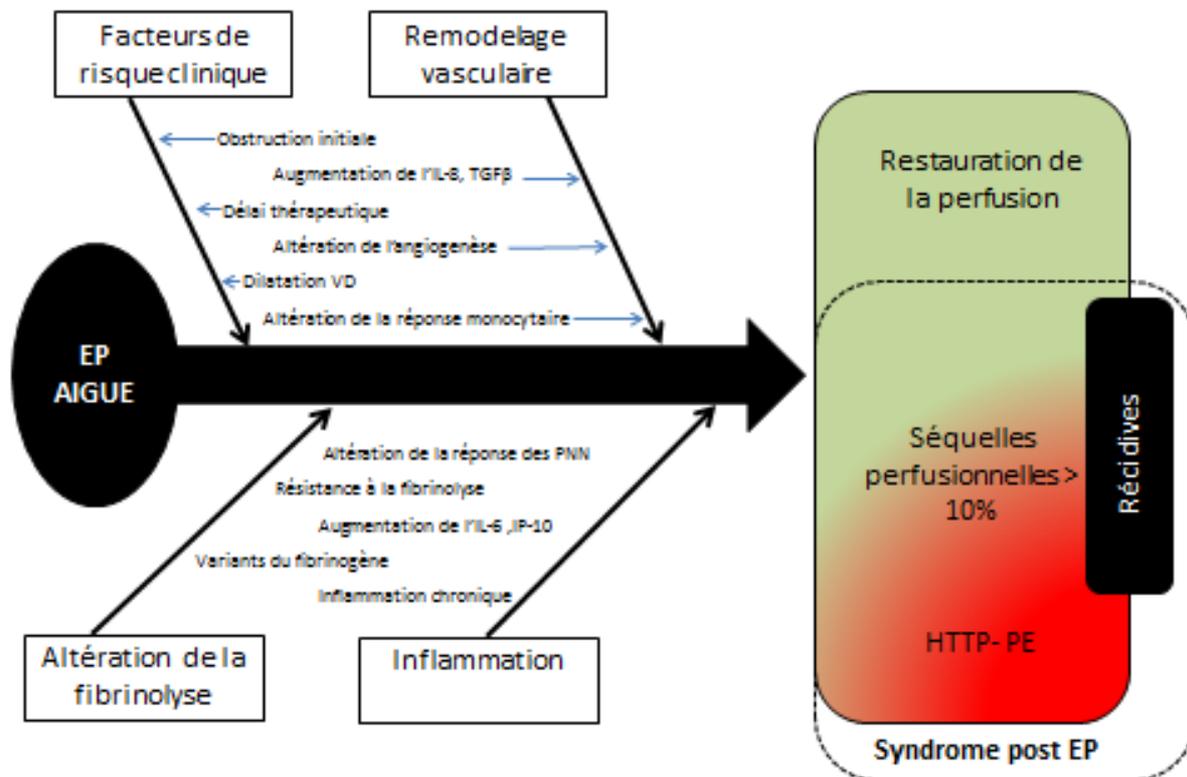
Plusieurs stratégies ont été proposées pour prédire la survenue d'une HTP-TEC. Une étude a comparé 82 patients atteints d'HTP-TEC à 160 patients chez lesquels ce diagnostic avait été éliminé [101] permettant de développer un modèle diagnostique qui associe des anomalies de l'ECG et un dosage du NT-pro-BNP plasmatique. Ce modèle permet d'écartier le diagnostic d'HTP-TEC avec une valeur prédictive négative satisfaisante. Plus récemment, la même équipe a proposé un score prédictif d'HTP-TEC permettant d'identifier des patients à fort risque développer la complication [79]. L'étude a inclus 772 patients, 22 patients (2,8%) ont développé une HTP-TEC confirmée par un cathétérisme droit. Le score proposé est composé de 6 variables : caractère non

provoqué de l'EP (6 points), hypothyroïdie (3 points), délai diagnostique de l'EP > 2 semaines (3 points), dysfonction ventriculaire droite au diagnostic sur l'angioscanner ou l'échographie cardiaque (2 points), diabète (- 3 points) et thrombolyse ou embolectomie (- 3 points). 73% des patients étaient à faible risque d'HTP-TEC (incidence 0,38% IC95%, 0-1.5%) et 27 % des patients étaient à haut risque d' HTP-TEC (incidence 10% IC95%, 6.5-15%). Ce score n'a pas encore été validé prospectivement. Aucun de ces 2 modèles n'a inclus l'existence de séquelles perfusionnelles.

## **5. Physiopathologie de la MVTE chronique**

La physiopathologie de la MVTE chroniques demeure mal comprise à ce jour. Il apparaît néanmoins que celle-ci n'est pas un phénomène séquentiel mais continu. La conjonction de facteurs de risque intrinsèques aux patients, hypothyroïdie ou groupe sanguin par exemple, et d'altérations de la réponse à la thrombose permet de proposer un nouveau schéma conceptuel de la MVTE chronique [38], [39]. La persistance du thrombus au sein du lit vasculaire pulmonaire semble jouer un rôle déterminant et précoce. L'implication de mécanismes inflammatoires et de processus de réparation vasculaire (angiogenèse) sont aussi déterminants dans le développement du remodelage microvasculaire mis en évidence dans les pièces d'endartériectomie de patients traités chirurgicalement pour une HTP-TEC [102]. La transition d'une maladie de l'hémostase vers une pathologie vasculaire pulmonaire reste cependant mal comprise et le rôle du fibrinogène pourrait être central (figure 4).

**Figure 4. Schéma conceptuel de la physiopathologie de la maladie veineuse thromboembolique, d'après Fernandez et al [38]**

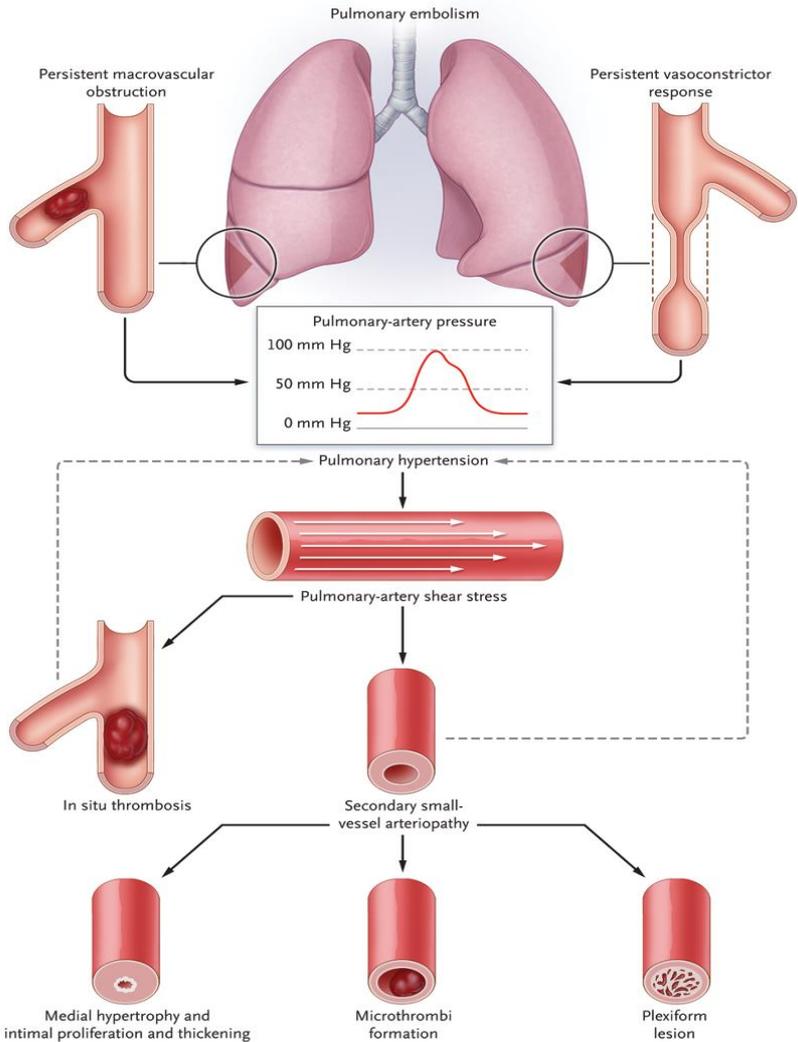


### 5.1. Lésions constatées au cours de la MVTE chronique

Lang et al ont conduit une analyse histologique des tissus pulmonaires de 6 patients décédés d'EP aiguë et les ont comparés à des tissus artériels pulmonaires sains indemnes de thrombus [103]. De façon intéressante, il existe précocement des lésions endovasculaires obstructives riches en fibrine, plaquettes et globules rouges au contact de l'intima des artères pulmonaires et des lésions où le thrombus est déjà organisé avec un remodelage de la paroi vasculaire dont témoigne la disparition de la structure endothéliale pulmonaire au profit d'une prolifération cellulaires qui semble provenir de l'intima du vaisseau. Lang constatait aussi l'existence précoce d'aspects d'organisation du thrombus d'âges différents témoignant probablement du caractère répété et continu des phénomènes emboliques avant le diagnostic d'EP. En dehors de cette étude, la très

grande majorité des données disponibles à ce jour sont les descriptions des lésions constatées au cours de l'HTP-TEC dont les deux principales caractéristiques sont la persistance du caillot dans la circulation artérielle pulmonaire et l'existence de lésions microvasculaires. En 1993, Moser et al [104] décrivaient deux types de lésions vasculaires chez les patients atteints d'HTP-TEC : une vasculopathie avec un remodelage vasculaire dans les territoires occlus où le caillot persiste et une vasculopathie distale dans les territoires non obstrués. (Figure 5)

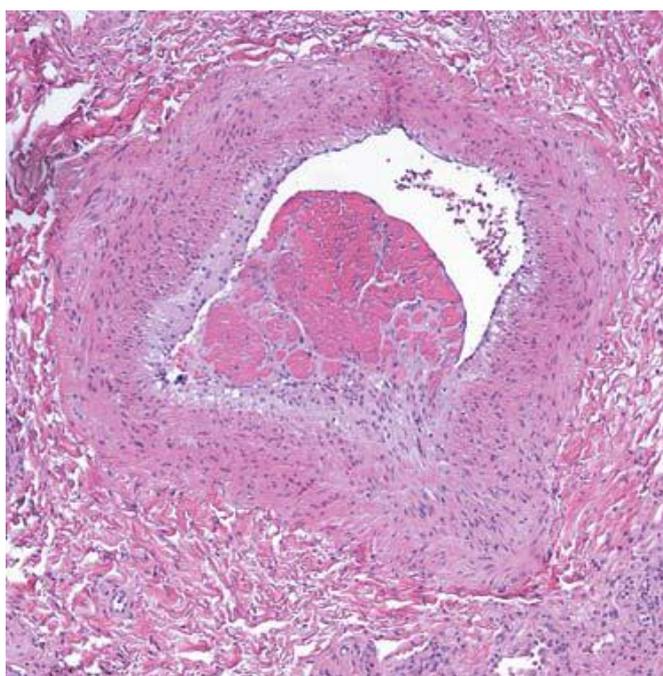
**Figure 5. Physiopathologie de l'HTP-TEC, d'après Piazza et al.[37]**



### 5.1.1. Persistance du caillot et remodelage vasculaire de contact :

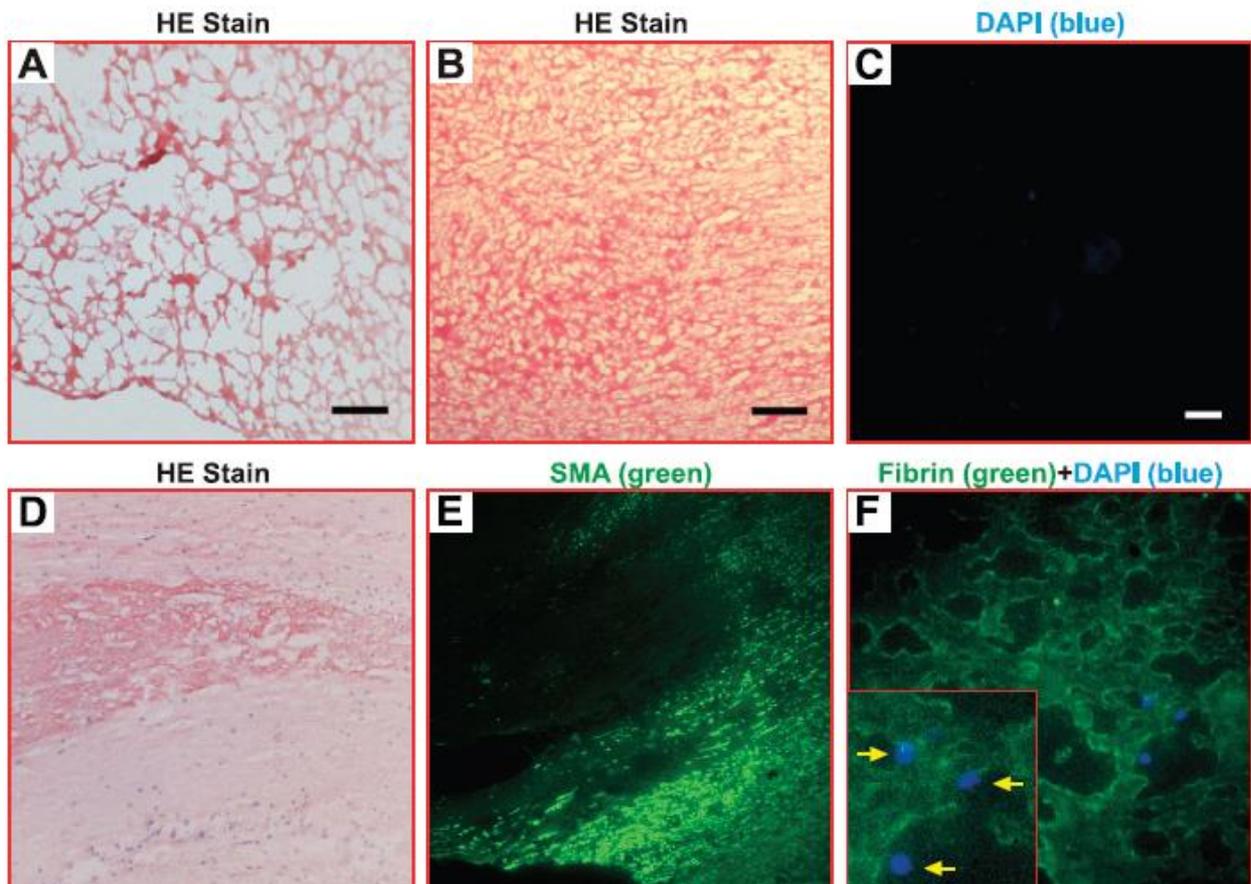
La résolution d'un thrombus va impliquer plusieurs mécanismes : la fibrinolyse physiologique, l'infiltration du thrombus par des cellules de l'inflammation et la formation de nouveaux vaisseaux à partir des cellules du compartiment endothélial. La persistance du caillot va s'accompagner d'une organisation progressive et hétérogène avec l'apparition de tissu conjonctif et fibreux. Plusieurs travaux ont étudié le matériel d'endartérectomie pulmonaire et décrivent des aspects histologiques différents dans les zones proximales et dans les zones distales de ce matériel. Le matériel d'endartérectomie comprend le matériel thrombotique organisé et une partie de la paroi artérielle pulmonaire au contact de celui-ci, essentiellement l'intima bordant le caillot. Yao et al [102] ont mis en évidence que la partie centrale du matériel était riche en structure fibreuses et pauvres en cellules (figure 6).

**Figure 6-a. Coupe histologique d'artère pulmonaire de groupe calibre, d'après Piazza et al [37].**



L'artère contient un thrombus organisé qui occlue totalement sa lumière  
(Coloration hématoxyline et éosine, faible grossissement)

**Figure 6-b. Analyse histochimique de la structure du matériel d'endartériectomie pulmonaire, d'après Yao et al [102]**



Réseau fibreux présent dans le matériel d'endartériectomie : A et B, coloration hématoxyline et éosine; C : coloration DAPI (4'-6'-Diaminodino-2-phenylindole) colorant les noyaux. Barre d'échelle : 150  $\mu$ m. D et E : coloration hématoxyline et éosine (D) et SMA+ (smooth muscle  $\alpha$ -actine) (E) montrent l'absence de noyaux et de cellules musculaires dans la région centrale du caillot. F : Cooration en vert de la fibrine avec présence de quelques cellules (flèches) identifiée par la coloration DAPI.

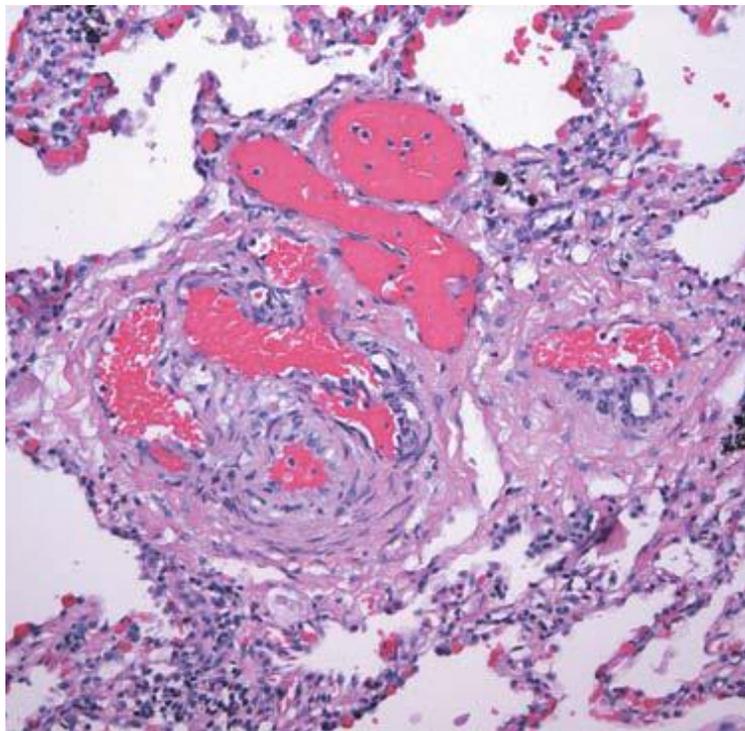
Dans la partie proximale des lésions obstruées, l'analyse de la structure vasculaire met en évidence la présence de nombreuses cellules positives pour SM- $\alpha$ A+, marqueur caractéristique des cellules musculaires, au contact du thrombus au niveau de l'intima et dans la média. Dans les lésions plus distales, les auteurs décrivent une faible infiltration par les cellules SM- $\alpha$ A+ de la néo-intima mais la présence de nombreuses structures

tubulaires. L'immunomarquage de ces structures tubulaires est positif pour SM- $\alpha$ A et le facteur von Willebrand attestant de la présence de cellules endothéliales et musculaires formant une structure vasculaire. Les lésions proximales et distales étaient infiltrées par des cellules CD34+ Flk-1+CD133+ mettant ainsi en évidence la présence de progéniteurs endothéliaux d'origine médullaire. Zabini et al [105] ont mis en évidence de fortes concentrations en facteurs angiostatiques (PF-4, IP-10) dans le matériel d'endartérectomie distale. Dans ce même travail, les cellules endothéliales des pièces d'endartériectomie étaient isolées et mises en culture. Leur stimulation par le PF4 induisait une réduction de 34% des capacités de migration, de 29% des capacités de prolifération et de 59% des capacités angiogéniques. Cette dysfonction endothéliale importante semble médiée par une nette augmentation du calcium intra-cellulaire lors de la stimulation par les facteurs angiogéniques par rapport à des cellules endothéliales humaines d'artères pulmonaires saines [39].

#### 5.1.2. Lésions de vasculopathie distale

Moser et al ont décrit des lésions de vasculopathie distale dans les territoires non embolisés de patients atteints d'HTP-TEC [104]. Ces lésions sont en tous points similaires à celles observée dans l'hypertension artérielle pulmonaire. Deux types de lésions sont retrouvées : (1) un épaississement de la paroi intimale avec réduction de la lumière vasculaire marqué par une forte prolifération de myofibroblastes et de cellules musculaires lisses, et (2) des lésions plexiformes témoignant d'une prolifération anarchique de cellules endothéliales [37] ; figure 7. Au sein de la lumière vasculaire, des micro-thromboses sont constatées avec en leur sein des structures tubulaires vasculaires.

**Figure 7. Coupe histologique d'artériole pulmonaire, d'après Piazza et al [37].**



L'artère contient des lésions plexiformes (flèches). Des petites structures vasculaires multiples sont présentes. (Coloration hématoxyline et éosine, faible grossissement)

## 5.2. Rôle du fibrinogène dans la physiopathologie

Le constituant principal du thrombus est un polymère de fibrine, formés après l'activation du fibrinogène par la thrombine activée, facteur Iia, au terme de l'activation de la cascade de la coagulation.

### 5.2.1. Fibrinogène

La molécule de fibrinogène est un hexamère composé de deux sets de trois chaînes glycopeptidiques : les chaînes  $A\alpha$ ,  $B\beta$  et  $\gamma$  liées entre elles par cinq ponts disulfures en position N terminale assemblées de manière symétrique. Les extrémités N terminales de chaque chaîne sont situées en position centrale, formant un domaine d'intérêt appelé domaine E. Chacune des trois chaînes est codée par un gène différent : FGA, FGB, FGG

tous situés sur le chromosome 4q26-qter [106]. Chez l'homme, il existe un polymorphisme documenté pour chacun de ces gènes FGA, FGB et FGG. Ainsi, chaque chaîne constitutive de la molécule de fibrinogène peut être représentée par son allèle natif, son allèle variant ou par les deux en cas d'hétérozygotie. Pour chaque chaîne les variations des séquences nucléotidiques et protéiques sont connues (tableau 7).

**Tableau 7. Polymorphismes fréquents des chaînes A $\alpha$ , B $\beta$  constitutives du fibrinogène [d'après Morris et al, [107]**

Chaîne du fibrinogène	Polymorphisme commun	Poids moléculaire (KDa)
A $\alpha$ *	312 A	66102
	312 T	66132
B $\beta$ **	448 K	54185
	448 R	54213

\* : poids moléculaire de la forme non phosphorylée

\*\* : poids moléculaire de la forme mono sialylatée

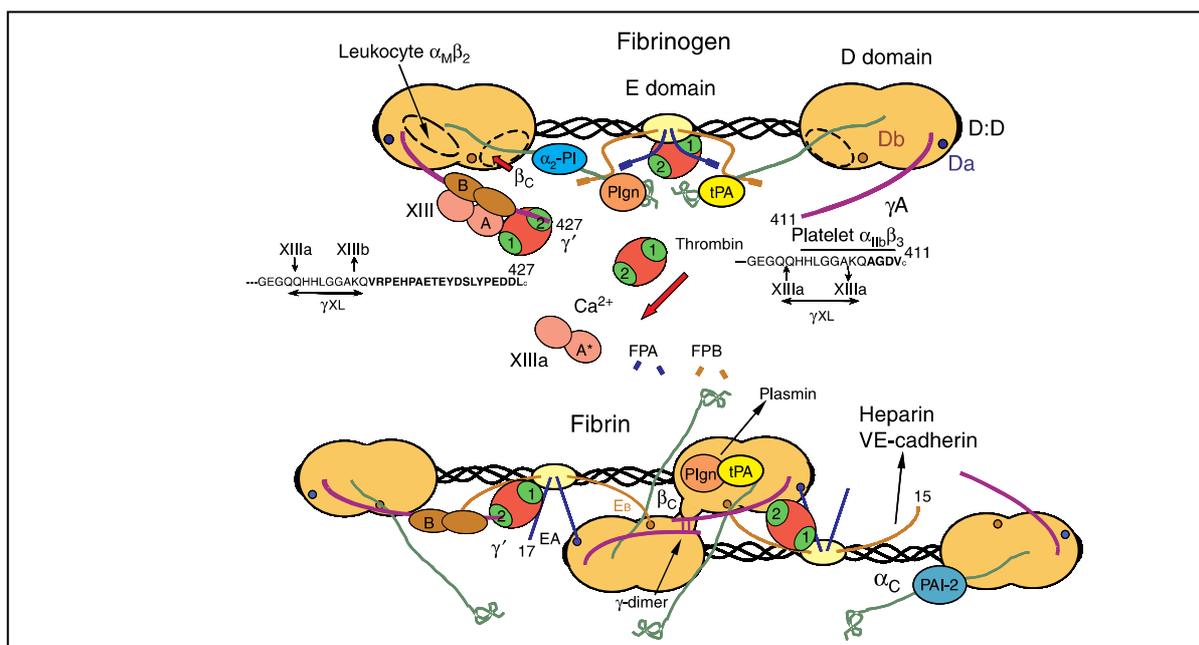
La molécule de fibrinogène a un poids moléculaire de 340 kDa et contient 2964 acides aminés : 610 pour la chaîne  $\alpha$ , 461 pour la chaîne  $\beta$  et 411 pour la chaîne  $\gamma$ . La chaîne A $\alpha$  peut être non phosphorylée, mono ou biphosphorylée. Les chaînes B $\beta$  et  $\gamma$  subissent une sialylation par ajout d'un ou deux résidus d'acide sialique de poids moléculaire de 290 KDa et existent donc sous deux formes détectables monosialylatée ou bisialylatée [108]. En effet, il a été montré que les chaînes B $\beta$  et  $\gamma$  présentaient les mêmes chaînes polysaccharidiques bi-antennées dont les acides sialiques terminaux se lient à l'aspartate en position 364 de la chaîne B $\beta$  et en position 52 de la chaîne  $\gamma$ . L'acide sialique représente moins de 1% du poids moléculaire du fibrinogène mais il a été montré qu'un excès de sialylation altérerait la polymérisation du fibrinogène [109], [110]. Inversement, il a été montré qu'un « asialofibrinogène » obtenu par clivage des acides sialiques par une neuraminidase présentait une polymérisation accélérée. Dang et al ont

ainsi montré que l'affinité du fibrinogène pour le calcium était diminuée en l'absence d'acide sialique modifiant les interactions entre les monomères de fibrines [111].

Enfin, la chaîne  $\gamma$  existe aussi sous la forme d'un variant  $\gamma'$  obtenu par épissage alternatif de l'ARN messager primitif substituant ( $\gamma$ 408-411) une séquence de 3 acides aminés par une séquence de 20 acides aminés ( $\gamma'$  408-427) contenant 2 tyrosines [112], [113]. La chaîne  $\gamma'$  représente 8% du fibrinogène total et est le plus souvent associée dans des hétérodimères  $\gamma/\gamma'$ , représentant 15% des molécules de fibrinogène plasmatique.

En microscopie électronique, le fibrinogène apparaît comme formé de deux sous-unités identiques reliées par les ponts disulfures, donnant à la molécule une forme de fibre comportant 3 globules : un central (domaine E) et deux distaux (domaines D), mesurant une longueur totale de 45 nm. Figure 8.

**Figure 8. Aspect morphologique de l'hétéro-dimères de fibrinogène, d'après Mossesson et al [106]**

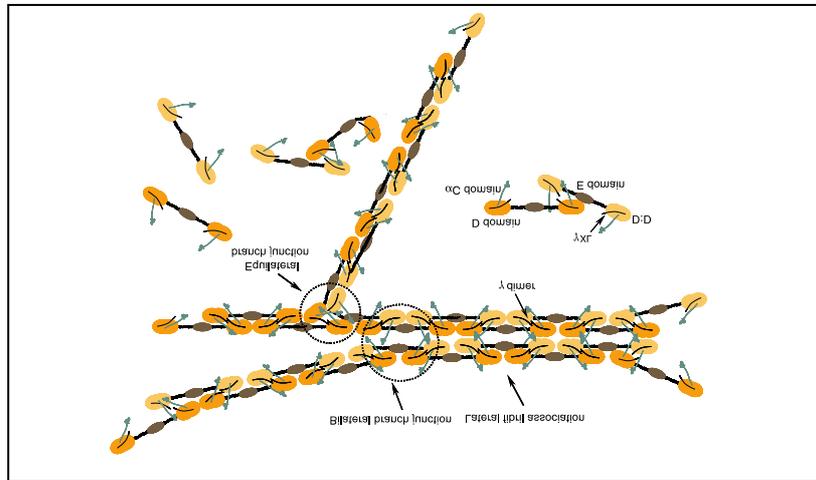


### 5.2.2. Fibrine

L'activation du fibrinogène par l'action enzymatique de la thrombine activée (IIa) va cliver des séquences peptidiques N-terminales des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  les fibrinopeptides A et B. Il s'ensuit une cascade d'événements biochimiques conduisant à la polymérisation des molécules de fibrinogène en un réseau de fibrine puis à la stabilisation de ce dernier. Ce phénomène se fait en 3 étapes successives qui sont (1) la formation de protofibrilles double brin par association des monomères de fibrinogène activé, (2) la formation de fibre de fibrines de diamètre variable par l'association de protofibrilles formant un réseau plus ou moins dense et (3) la stabilisation de ce réseau de fibrine par un phénomène appelé « cross-linking » correspondant à la formation de liaisons covalentes entre les chaînes  $\alpha$  entre elles ou les chaînes  $\gamma$  des molécules de fibrinogène constitutives du réseau de fibrine sous l'action d'une enzyme transglutaminase, le facteur XIII activé de la coagulation.

Le clivage du fibrinopeptide A va libérer et exposer un site de polymérisation au sein du domaine E appelé  $E_A$ .  $E_A$  est un domaine constitué de la séquence peptidique N terminale de la chaîne  $\alpha$  de 4 acides aminés en position 17-20 (gly-pro-arg-val ou GPTV) et de la séquence peptidique N terminale de la chaîne  $\beta$  composée de 27 acides aminés en position 15-42. Chaque domaine  $E_A$  va se lier de façon covalente à un domaine complémentaire d'une autre molécule de fibrinogène situé dans le domaine D, appelé  $D_a$  correspondant à une séquence de 34 acides aminés de la chaîne  $\gamma$  ( $\gamma$ 337-379) ; figure 8. Ce sont les combinaisons répétées  $E_A:D_a$  qui permettent l'alignement alterné et chevauchant de molécules de fibrogène de proche en proche. L'association des protofibrilles entre elles peut se faire selon deux modalités qui forment soit des jonctions bilatérales soit des jonctions perpendiculaires (figure 9).

**Figure 9. Aspect schématique de l'assemblage des molécules de fibrinogène, d'après Mossesson et al [106]**



Les premières se forment par la convergence de deux protofibrilles l'une vers l'autre alors que les secondes dites perpendiculaires vont apparaître lorsque 3 protofibrilles vont converger les unes vers les autres. La proportion de chacune de ces jonctions au sein du réseau de fibrine qu'elles forment est déterminante de ses propriétés biochimiques et physiques. Ainsi les jonctions bilatérales favorisent la formation de fibres épaisses formant un réseau peu dense. Inversement, les jonctions équilatérales contribuent à former des fibres plus fines mais qui s'agencent en un réseau au maillage plus fin et dense. Par ailleurs, le clivage du fibrinopeptide FPB, plus lente que FPA, va permettre la formation d'une liaison d'un site  $E_B$  de la chaîne  $\beta$  avec un segment du domaine D complémentaire,  $D_b$  sur la même chaîne  $\beta$ . La libération de FPB va permettre la libération de la partie C terminale de la chaîne  $\alpha$ , plus longue que  $\beta$  de 149 acides aminés, comprenant une séquence d'intérêt appelé domaine  $\alpha C$  correspondant à la séquence  $\alpha C$  220-610, dont il a été montré l'importance dans la polymérisation du fibrinogène par la promotion de jonctions latérales [114], [115]. En effet, le fibrinogène  $A\alpha$  251 dépourvu de cette séquence  $\alpha C$  va générer des réseaux de fibres de fibrines fines organisées de façon dense et dont la perméabilité est diminuée de 50%. La

chaîne  $\gamma$  joue aussi un rôle dans la formation et l'agencement du réseau de fibrine à deux niveaux. Elle permet l'alignement des protofibrilles à leur extrémités favorisant les interactions D:D et ont des sites accessibles au facteur XIII activé ( $\gamma_{XL}$ ) pour former des liaisons covalentes intermoléculaires (cross-linking). Le tableau 8 résume les facteurs influençant la formation de jonctions latérales ou perpendiculaires.

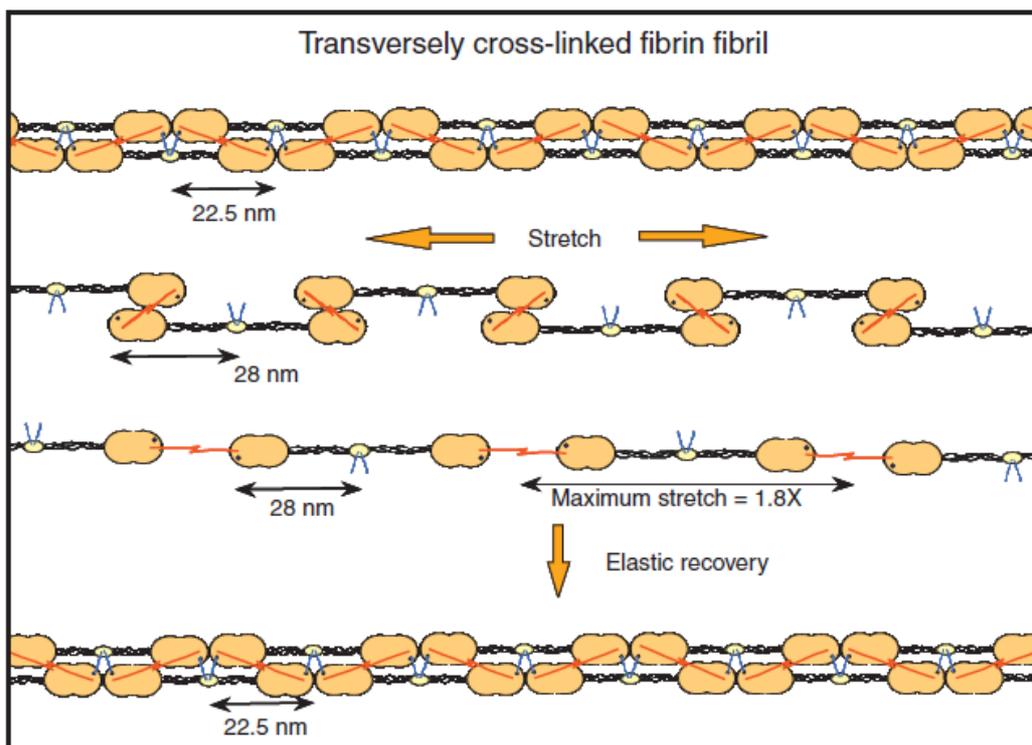
**Tableau 8. Facteurs influençant la formation des deux types de jonctions des protofibrilles et des fibres du réseau de fibrine**

	<b>Jonction latérale</b>	<b>Jonction perpendiculaire</b>
Fibre de fibrine	Epaisse	Fine
Réseau de fibrine	Lâche, peu dense	Dense
Facteurs favorisants	Forte concentration de thrombine activée  Domaine $\alpha C$  Liaison $E_B : Db$	Fable concentration de thrombine activée

La dernière étape de la formation des thrombus est la stabilisation du réseau sous l'action du facteur XIII activé de la coagulation de façon dépendante du calcium. Son action enzymatique de transglutaminase forme des liaisons covalentes entre la lysine  $\gamma$  406 d'une chaîne  $\gamma$  et une glutamine d'une autre chaîne  $\gamma$  d'une part ; et entre les chaînes  $\alpha$  mais de façon plus lente d'autre part. Des ponts entre les chaînes  $\alpha$  et  $\gamma$  peuvent aussi exister. Sous l'effet de cross-linking, les fibres de fibrine diminuent de calibre, elles sont plus fines, et forment un réseau plus dense. Le cross linking est un élément déterminant des propriétés de la fibrine : un thrombus fait de fibres fines en réseau dense sera moins perméable, aura une élasticité meilleure et diminuera sa viscosité, c'est-à-dire sa capacité à se déformer de façon réversible [116] ; Figure 10. Il n'existe pas de relation

entre les propriétés mécaniques (viscosité et élasticité) de la fibrine et ses propriétés chimiques, sensibilité à fibrinolyse. Dans ce sens, Duval et al ont montré que le cross linking des chaînes  $\alpha$  et  $\gamma$  ne donnait pas les mêmes propriétés à la fibrine [117]. En effet, le cross linking de  $\gamma$  va se faire au sein des protofibrilles les affinant alors que les cross-linking des chaînes  $\alpha$  va se faire entre deux protofibrilles déterminant leur propriétés physiques essentiellement. Enfin, la chaîne  $\gamma'$  régule la formation générale du caillot en inhibant le facteur XIII activé [118] et en liant l'antithrombine I dans le domaine D qu'elle constitue [119].

**Figure 10. Elasticité du de la fibrine : rôle du cross-linking [116]**



Le tableau 9 résume pour chacune des chaînes son rôle dans la formation du caillot.

**Tableau 9. Synthèse du rôle de chaque chaîne du fibrinogène dans la synthèse de la formation de la fibrine**

<b>Chaîne <math>\alpha</math> - principale effectrice</b>	<b>Chaîne <math>\beta</math> - régulatrice positive</b>
$E_A$ : site de polymérisation rapide, favorise les jonctions latérales  Domaine $\alpha C$ : <ul style="list-style-type: none"> <li>- favorise les contacts <math>E_A - D_a</math></li> <li>- site de portage du plasminogène</li> </ul> Cross-linking interprotofibrille	$E_B$ : polymérisation plus lente que le site $E_A$ mais plus favorable aux jonctions latérales  Régulation importante : le clivage de FPB libère le domaine $\alpha C$
<b>Chaîne <math>\gamma</math>- stabilisatrice</b>	<b>Chaîne <math>\gamma'</math> - régulatrice négative</b>
Alignement correct des extrémités des protofibrilles pour les jonctions latérales  Cross-linking intraprotofibrille	Inhibition du facteur XIII  Site de fixation de l'AntiThrombine 1

### 5.2.3. *Fibrinolyse*

Au-delà de son rôle pivot dans l'amplification de la formation du caillot, le fibrinogène interagit avec le système fibrinolytique en régulant l'activation du plasminogène par le tPA (tissue plasminogen activator) synthétisé par les cellules endothéliales de la paroi vasculaire. L'activation du plasminogène par le tPA est accélérée en présence de fibrine mais pas de fibrinogène [106]. Il existe à la fois un site de fixation de haute affinité pour le plasminogène et un site de fixation du tPA dans le domaine  $\alpha C$  de la chaîne  $A\alpha$  de la fibrine régulant ainsi la fibrinolyse en formant un complexe ternaire avec le plasminogène et le tPA (figure 8). Il existe aussi un site de fixation au tPA sur la chaîne  $\gamma$ . Le clivage par la thrombine des fibrinopeptides A et B va induire des changements importants de conformation de la molécule de fibrinogène activé par les interactions des domaines D:E permettant la formation du complexes ternaire tPA-plaminogène- fibrine fortement activateur de la fibrinolyse.

D'autres mécanismes indirects impliquent la fibrine dans la régulation négative de la fibrinolyse dont le principal est le cross linking à la chaîne  $\alpha$  du fibrinogène de l'inhibiteur  $\alpha_2$  de la plasmine ( $\alpha_2$ PI) et de PAI-2, un inhibiteur des activateurs du fibrinogène comme l'urokinase ou le tPA. Le cross-linking des protofibrilles de fibrine va donc avoir un effet anti-fibrinolytique multiple en fixant  $\alpha_2$ PI, en limitant la fixation du plasminogène sur la fibrine et par le cross-linking des chaînes  $\alpha$ [120].

L'action de la plasmine va fragmenter le polymère de fibrine et créer d'autres sites de clivages (lysine) et amplifier ainsi le phénomène de fibrinolyse. L'analyse au microscope confocal a permis d'étudier les modifications structurelles dynamiques au cours de la fibrinolyse à l'échelle de la fibre et à l'échelle du réseau de fibres. Il a été ainsi montré que les fibres de fibrines de gros diamètres sont digérées plus lentement que les fibres fines. Lorsqu'un réseau est étudié, les réseaux denses formés de fibres plus fines, notamment par effet du cross-linking, lysent plus lentement que les thrombus formés de fibres épaisses en réseau lâche [116]. La digestion par la plasmine libère d'importants complexes protéiques, dont font partis les DDimères, témoignant d'une action diffuse par section des protofibrilles sur plusieurs sites simultanément.

#### 5.2.4. Interactions cellulaires de la fibrine

Le fibrinogène est aussi capable de se lier à plusieurs cellules circulantes. Les effets décrits dans la littérature sont multiples : adhésion aux héparines modifiant les interactions des cellules avec la matrice extra-cellulaire, induction d'un signal d'activation et d'adhésion plaquettaire, induction de la prolifération des fibroblastes [106]. Il se lie aux plaquettes activées de manière spécifique par le récepteur GP2bIIIa contribuant à la stabilité et la rétraction du caillot. Le fibrinogène peut aussi se lier aux cellules endothéliales (CE) directement via la séquence protéique  $\beta_{15-42}$  en position N

terminale de la chaîne  $\beta$  du fibrinogène. Des interactions ont aussi été décrites avec les cellules monocytaires via les récepteurs de la famille des intégrines  $\alpha_M\beta_2$ , ou MAC-1, dont l'affinité est faible pour le fibrinogène mais forte pour la fibrine dans son domaine D sur deux séquences de la chaîne  $\gamma$  témoignant de l'exposition des séquences lorsque le fibrinogène est activé et capable de polymériser [121]. Il existe donc des changements conformationnels importants du domaine D lors de la formation du réseau de fibrine. Ainsi la fibrine par une action endovasculaire localisée au thrombus stimulerait le recrutement de cellules inflammatoires en induisant l'expression de molécules d'adhésion comme ICAM-1 et la sécrétion de cytokines proinflammatoires comme l'IL-8 par les cellules endothéliales [122], [123]. L'interaction directe via Mac 1 entre les cellules mononuclées et la fibrine génère un signal proinflammatoire important. Flick et al ont montré chez des souris homozygotes pour un allèle du gène de la chaîne  $\gamma$  dépourvue de la séquence peptidique de liaison à Mac-1, qu'il existait un défaut de clairance des Staphylocoques par les cellules mononuclées. La régulation à la baisse par un mécanisme direct ou indirecte de l'inflammation induite par la fibrine pourrait ainsi participer à la non résorption du caillot. Il a en effet été montré que dans un modèle in vivo murin de thrombose veineuse aiguë que la résorption du caillot était corrélée à son infiltration par les macrophages [124].

Les interactions entre la fibrine et les cellules du compartiment endothélial stimulent leur prolifération, leur capacité de migration et leurs capacités angiogéniques.

#### 5.2.5. *Récepteurs impliqués dans les interactions cellules endothéliales – fibrine*

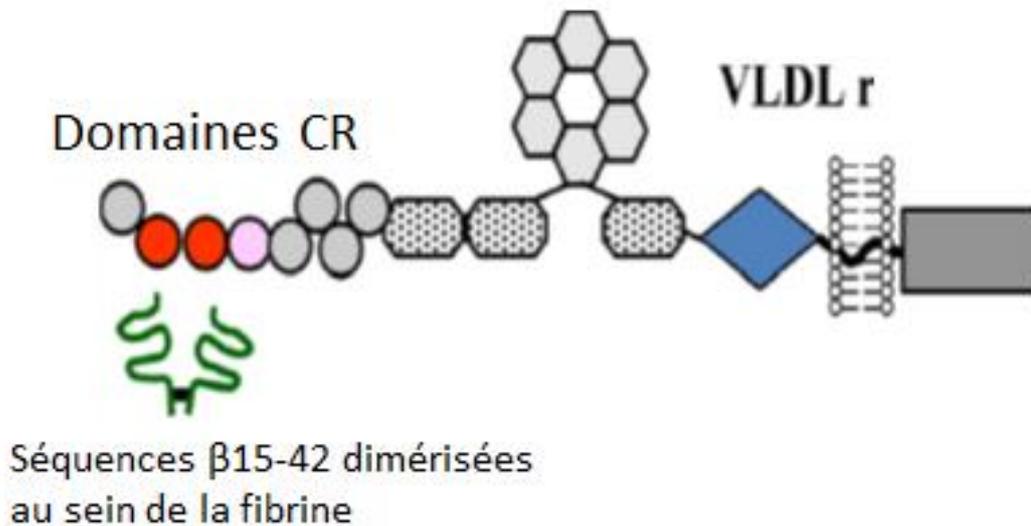
Jusqu'à très récemment, les interactions avec les cellules endothéliales avaient été expliquées par la fixation de la séquence  $\beta_{15-42}$  de la partie N terminale de la chaîne  $\beta$  de la fibrine au récepteur VE-Cadhérine, ou CD 144, molécule d'adhésion de la surface

des CE [125]. L'implication de la séquence  $\beta$ 15-42 avait été au préalable suggérée par plusieurs études. Sporn et al ont montré qu'une fibrine obtenue par l'activation réduite du fibrinogène par la reptilase qui ne clive que le fibrinopeptide A et n'expose donc pas la séquence  $\beta$ 15-42 induisait la prolifération de cellules endothéliales de façon réduite [126]. Les résultats étaient identiques en utilisant des fibrines issues de fibrinogènes dépourvus de la séquence  $\beta$ 15-42. Les travaux de Bach et al ont permis d'identifier la VE-Cadhérine comme le principal ligand de la séquence  $\beta$ 15-42 [127]. Cette étude a en effet montré que la liaison de la fibrine aux CE ne se faisait pas pour des fibrinogènes dépourvus de la séquence ou avec une séquence non exposée. La liaison au récepteur a été décrite comme spécifique et réversible à 70% et indépendante du calcium. Ce récepteur été identifié comme VE-Cadherine par l'incubation d'anticorps spécifiques qui inhibait la liaison et par la fixation de la séquence  $\beta$ 15-42 à des lysats de CE isolés préalablement à l'aide d'un anticorps dirigé contre VE-Cadhérine. Bach et al ont ensuite mis en évidence que la stimulation de l'angiogenèse par la fibrine était dépendante de VE-Cadhérine sans qu'un mécanisme de signalisation ait été mis en évidence [128]. Il a été ensuite démontré qu'une forme dimérique du peptide avait une affinité plus importante pour ce récepteur que sa forme monomérique indiquant que l'interaction avec la VE-Cadhérine implique deux segments de la chaîne  $\beta$  du fibrinogène [129]. Ces données soulignent l'importance de l'organisation de la structure du réseau de fibrine puisqu'il a été montré que le nombre de séquence  $\beta$ 15-42 des chaînes  $\beta$  accessibles à la fixation d'un anticorps spécifique diminuait avec l'organisation et la densification du thrombus, en particulier sous l'effet du calcium, co-facteur indispensable au cross-linking du fibrinogène [130], [131]. De façon très intéressante, il a été montré que VE-Cadhérine pouvait aussi se lier à un peptide  $\beta$ 15-42 dimérisée  $[(\beta$ 15-42) $]$ <sub>2</sub> sans qu'il soit contenu dans la fibrine: le peptide agissant alors comme un inhibiteur compétitif de VE-

Cadhérine [132]. Néanmoins, la faible affinité ( $K_d$  267 $\mu$ M) mise en évidence dans cette étude entre VE-Cadhérine et  $(\beta 15-42)_2$  semblait discordante avec la forte affinité de  $(\beta 15-42)_2$  pour la surface des CE ( $K_d$  0,18 $\mu$ M), l'hypothèse d'un autre récepteur endothélial a été émise.

Yakovlev et al ont ainsi mis en évidence que le domaine N-terminal  $\beta 15-42$  de la chaîne  $\beta$  de la fibrine était un ligand du récepteur au very-low-density-lipoprotein (VLDLr) exprimé à la surface des cellules endothéliales de cordon ombilical humain [133]. VLDLr est un récepteur transmembranaire de 86 kDa qui appartient à la famille des LDL récepteurs mis en évidence dans l'espèce humaine en 1994 [134] [135]. VLDLr est codé par un gène situé sur le chromosome très conservé d'une espèce à l'autre et est exprimé par les neurones et les cellules endothéliales et musculaires de la paroi des vaisseaux [136]. Ce récepteur au VLDL (VLDLr) est présent à la surface des cellules endothéliales matures. La première fonction physiologique décrite de VLDLr était nutritionnelle expliquée par son rôle dans l'endocytose de lipoprotéines mais des fonctions de signalisation ont été décrites avec d'autres ligands comme la thrombospondine [137] ou la reelin dont la liaison au VLDLr des neurones du système nerveux central module la migration et le neurodéveloppement par activation d'une cascade de phosphorylations après liaison de son domaine intracellulaire à des protéines adaptatrices [138]. L'affinité de VLDLr pour ses ligands est dépendante de l'état de phosphorylation de son domaine intracellulaire sur une sérine [139]. Yakovlev et al ont montré que l'affinité du peptide  $\beta 15-42$  de la chaîne  $\beta$  de la fibrine pour le VLDLr était supérieure à celle pour VE Cadherine. La liaison à la fibrine se fait à deux des huit (les 2<sup>ième</sup> et 3<sup>ième</sup>) domaines CR, séquences de 40 acides aminés riches en cystéine. La 4<sup>ième</sup> séquence CR détermine la forte affinité de VLDLr pour la fibrine [140] (figure 11).

**Figure 11. Structure schématique du récepteur VLDLr : importance des domaines répétitifs CR, d'après Yakovlev et al [140]**

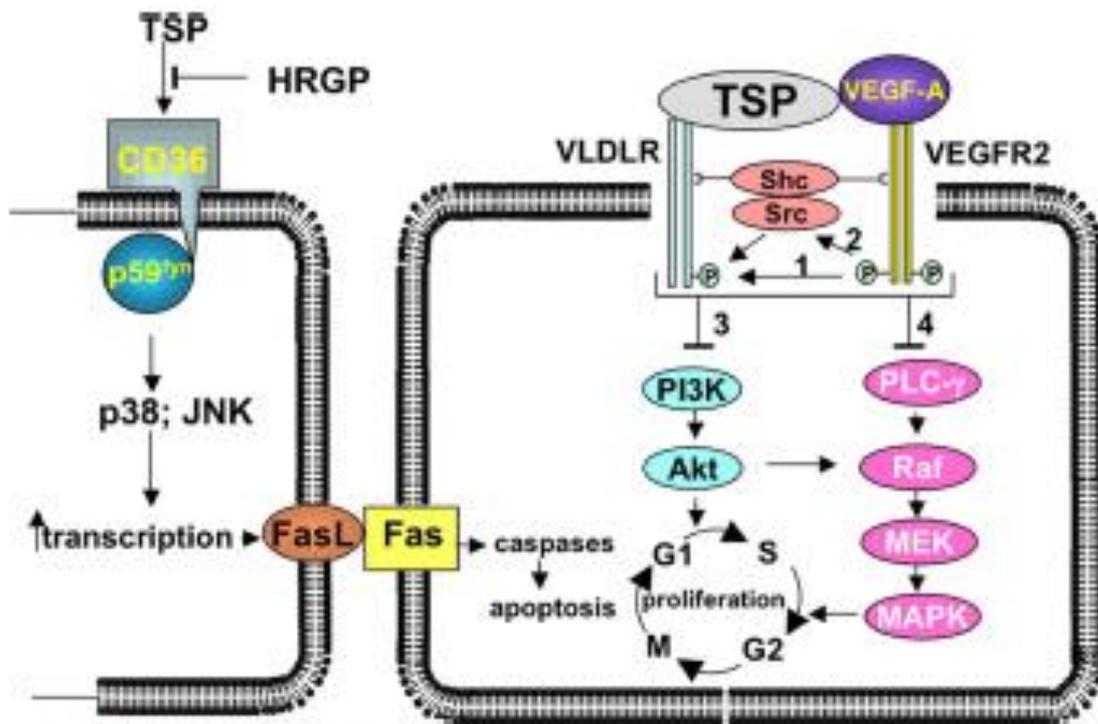


Dans l'étude ayant identifié VLDLr comme un nouveau récepteur endothélial à la fibrine, Yakovlev et al montrent aussi que la fixation de la fibrine sur ce récepteur induit la transmigration des leucocytes in vitro à travers une couche monocellulaire de CE stimulées par un fragment de fibrine contenant la séquence  $\beta 15-42$  [133]. La co-incubation des CE avec un inhibiteur de VLDLr (RAP) ou avec le peptide dimérisée  $(\beta 15-42)_2$  inhibait ce phénomène. Ces données ont été confirmées in vivo dans un modèle murin de péritonite. La transmigration des leucocytes pourrait être facilitée par l'internalisation de VE-Cadhérine, molécule d'adhésion, modifiant les jonctions inter-cellulaires.

Plusieurs travaux ont montré que le VLDLr est impliqué dans la régulation de l'angiogenèse. Les thrombospondines 1-2 (TSP-1, TSP-2) sont de puissants inhibiteurs de l'angiogenèse et induisent l'apoptose de CE de microvaisseaux humains. Il a été montré que TSP-1 et 2 inhibaient aussi l'angiogenèse de CE du derme humain sans induire d'apoptose via VLDLr en bloquant les voies des protéines kinases PI3K/Akt et

MAPK (figure 12). Il a aussi été montré que des souris knock-out pour VLDLr développaient précocement une néovascularisation rétinienne et que la formation de tubules à partir des CE de vaisseaux rétiniens étaient de 3 à 11 fois supérieures à celle constatée avec des CE de souris sauvages [141]. Il a été découvert aussi que la lignée de souris r26, modèle animal de pathologie rétinienne, présentait une mutation non-sens (2239C>T) codant pour un VLDLr tronqué indétectable dans les CE de la rétine[142]. Enfin, Yang et al ont montré que l'acide salvianolique en diminuant l'expression endothéliale du VLDLr inhibait les modifications métaboliques et fonctionnelles induites sur les CE de cordon ombilical par les phénomènes d'ischémie reperfusion [143]. Le TFPI (Tissue Factor Pathway Inhibitor), puissant inhibiteur de la coagulation, a une activité antiproliférative, apoptotique et antiangiogénique sur les CE humaines via le VLDLr [144], [145]. Enfin, VLDLr pourrait aussi être impliqué dans la régulation de la coagulation et de la fibrinolyse en particulier car il a été montré que son activation par des lipoprotéines induit la sécrétion endothéliale de PAI-1 [146], [147].

**Figure 12. Mécanismes et signalisation intra-cellulaire des interactions thrombospondine-VLDLr, d'après Oganessian et al [137]**



A gauche : mécanismes du signal pro-apoptotique induit par les thrombospondines 1 et 2 (TSP1-2). A droite : interaction coordonnée des TSP1-2/VLDLr et VEGF/VEGFR2 activant Src et Shc conduisant à l'inhibition des voies de signalisation de la PI3K et de MAPK résultant en une limitation de l'entrée dans le cycle de prolifération. Les mécanismes fléchés 1,2,3 et 4 sont suspectés.

### 5.2.6. Fibrinogène et MVTE

Tregouet et al [148] ont comparé les caractéristiques génétiques de patients atteints de MVTE à des témoins dans 3 cohortes européennes. Leur analyse a mis en évidence une association entre la MVTE et deux Single Nucleotide Polymorphisms : rs6285454 localisé dans le groupe de gènes codant pour FGA et FGB sur le chromosome 4 et rs 867186 du gène codant pour le récepteur endothélial à la CRP (EPCR). Ce dernier SNP est en déséquilibre de liaisons avec deux polymorphismes de la chaîne  $\gamma$  et de la chaîne  $\alpha$ .

Plusieurs études ont étudié la fréquence des polymorphismes du fibrinogène au cours de la MVTE. Concernant le polymorphisme de la chaîne  $\gamma$ , il a été montré qu'un polymorphisme (FGG-H2) était associé à une diminution de la forme  $\gamma'$ , obtenue par épissage, et à une majoration du risque de phlébite dans une cohorte de 474 patients présentant une première phlébite comparé à des témoins [149]. Carter et al ont montré une augmentation de la fréquence de l'allèle  $\text{A}\alpha\text{-Thr312Ala}$  du fibrinogène chez les patients présentant des épisodes de MVTE [150]. Dans cette étude qui a inclus 221 patients avec un épisode de MVTE, dont 99 avec une embolie pulmonaire, l'allèle  $\text{A}\alpha\text{-Thr312Ala}$  était plus fréquemment retrouvé chez les patients avec une EP (33,1%) que chez les contrôles (21,4%) ou les patients avec une phlébite (29,1%). Le tableau 10 présente ces résultats en les comparant à l'étude de référence décrivant la fréquence cet allèle dans la population générale et à une autre étude chez des patients atteints d'HTP-PE. Ces données ont depuis été confirmées dans d'autres séries de patients [151], [152] sans que l'allèle  $\text{A}\alpha\text{-Thr312Ala}$  ne s'impose comme un facteur de risque déterminant de MVTE. Le mécanisme physiopathologique reste mal compris et des résultats contradictoires ont été publiés. En effet, Standeven et al ont montré que l'allèle  $\text{A}\alpha\text{-Thr312Ala}$  formait un réseau de fibres de diamètres plus fines et moins denses [153]. Cependant, ces modifications morphologiques ne modifiaient ni la turbidité, qui évalue la vitesse de formation puis de lyse d'un caillot de fibrine, ni la perméabilité du caillot; seule l'élasticité était augmentée faisant supposer que ces caillots auraient une prédisposition plus facile à emboliser [154]. Ce même polymorphisme a été retrouvé avec une fréquence significativement plus importante chez des patients atteints d'HTP-TEC [155] par rapport à des patients contrôles (tableau 10) avec des fréquences respectives de l'allèle de 24% et de 17%, ( $p=0,03$ ). Ces résultats ont été confirmés dans une autre cohorte de 101 patients atteints d'HTP-TEC mais la fréquence de l'allèle était

de 55% chez ces patients : cette forte prévalence pourrait être expliquée par l'éthnie asiatique des patients de la cohorte. Néanmoins, ce point reste très controversé : certains auteurs considérant que la fréquence plus élevée de l'allèle  $\alpha$ -Thr312Ala dans l'HTP-TEC est cohérente avec celle constatée chez les patients avec une EP d'autant plus qu'aucune anomalie de la fibrinolyse n'est détectable avec cet allèle. Néanmoins, une publication récente l'associe à une résistance à lyse majorée pour cet allèle  $\alpha$ -Thr312Ala chez les patients CTEPH [156].

**Tableau 10. Fréquence des allèles et des phénotypes des principaux polymorphismes communs du fibrinogène**

	Population générale [157]	Patients (n=218) avec un épisode de MVTE [150]				Patients avec une HTP-PE [155]	
		MVTE (n=218)	Phlébites (n=120)	EP (n=98)	Contrôles (n=250)	HTP-PE (n=214)	Contrôles (n=200)
A	24%	30,9% (135/436)	29,1% (70/240)	33,1% (65/196)	21,4% (107/500)	35,5% (145/248)	19% (76/400)
AA	7%	12%	8%	15%	6%	11,8% (24/214)	8,5% (17/200)
AT	34%	39%	42%	36%	34%	47,5% (97/214)	53,5% (107/200)
K	15%	-	-	-	-	16,3% (68/428)	19,2% (77/400)
KK	1%	-	-	-	-	2,9% (6/214)	1,5% (3/200)
BK	28%	-	-	-	-	26,9% (56/214)	35,5% (71/200)

A : allèle du polymorphisme T312A de la chaîne  $\alpha$

K: allèle du polymorphisme B448K de la chaîne  $\beta$

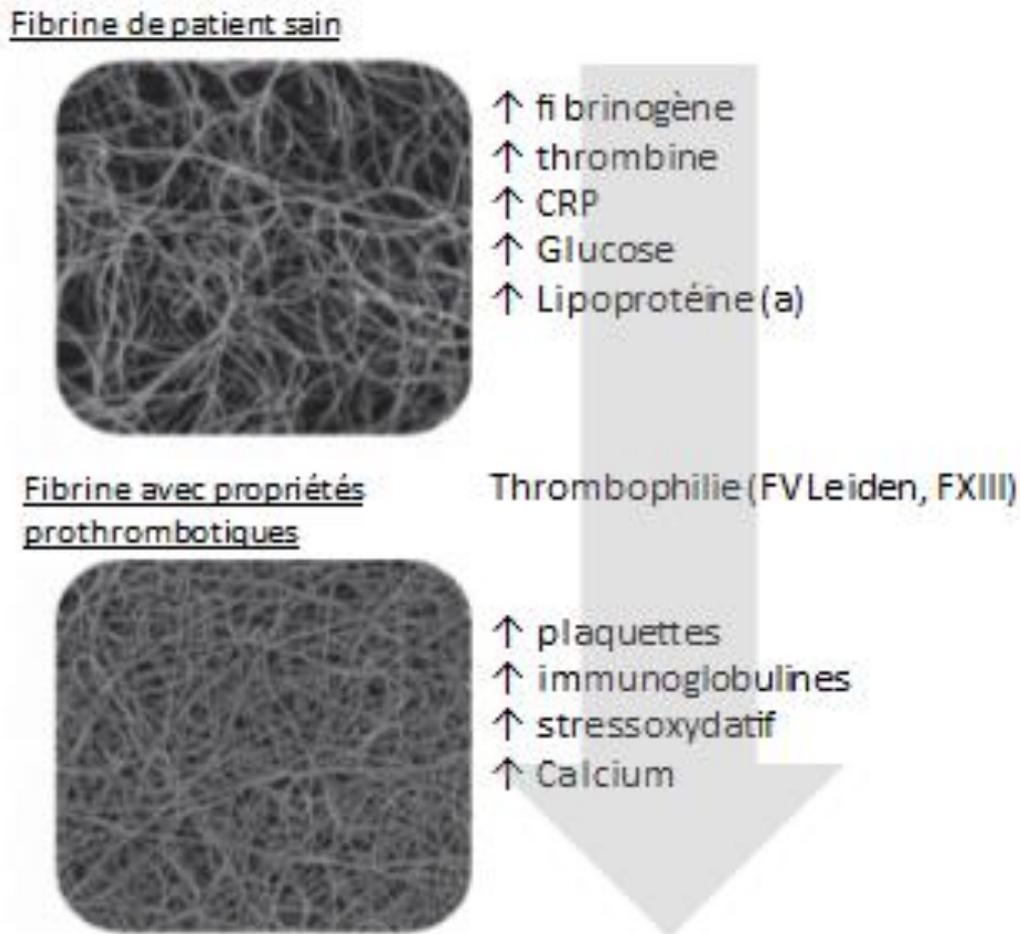
Certaines anomalies de la fibrinolyse sont associées à la MVTE et aux maladies vasculaires pulmonaires. En 2005, Lisman montrait, dans une cohorte de 421 patients, qu'une augmentation du temps de lyse du caillot au-delà du 90<sup>ième</sup> percentile était un facteur indépendant de thrombose veineuse (odds ratio 1,6 (IC95%, 1,0-2,5)) [158]. En

2009, Undas et al ont comparé les caractéristiques des caillots issus de la fibrine de 100 patients présentant un premier épisode de MVTE idiopathique sans thrombophilie identifiée à 100 témoins intrafamiliaux et 100 témoins sans lien génétique [159]. Les patients présentaient des caillots dont la perméabilité et le temps de lyse étaient significativement augmentés par rapport aux témoins ; chez les patients avec une EP l'augmentation du temps de lyse semblait moins marquée confortant l'hypothèse d'une lyse « plus rapide » chez ces patients favorisant la fragmentation et la migration des caillots. Les résultats obtenus chez les contrôles intrafamiliaux n'étaient pas superposables à ceux des contrôles sans lien de parenté : les apparentés présentaient des caractéristiques (temps de lyse, perméabilité, densité du réseau de fibrine) intermédiaires à celles des patients et des non-apparentés laissant supposer que les anomalies fonctionnelles de la fibrine étaient d'ordre génétique et héritable. Cette même équipe s'est intéressée à montré que la résistance à la fibrinolyse dont témoignent l'augmentation de 25% du temps de lyse et la plus faible production de DDimères (-8%) persistaient à distance des épisodes de thrombose et n'étaient pas associés à des thrombophilies [160]. Enfin, l'existence de séquelles de phlébite attestée par l'existence d'une obstruction vasculaire résiduelle échographique a été corrélée, chez 86 patients, à une baisse de 14,1% de la perméabilité ( $p=0,011$ ) et à une augmentation de 11,3% du temps de lyse ( $p=0,022$ ) [161]. Ces études ont pour principale limite de travailler sur du plasma total et non du fibrinogène purifié ce qui limite l'imputabilité de l'hypofibrinolyse mise en évidence au seul fibrinogène dans la mesure où de nombreux facteurs plasmatiques peuvent influencer la formation et la lyse du caillot (figure 13). Néanmoins des résultats similaires montrant des degrés croissants de résistance à la lyse des caillots de fibrine issu de fibrinogène purifié chez des patients avec une EP, une hypertension pulmonaire et une HTP-TEC ont été publiés [162].

Il a été montré qu'aucune anomalie connue de la coagulation ne favorisait la survenue de des séquelles perfusionnelles après une EP alors qu'elles sont la traduction scintigraphiques de la persistance du thrombus [48]. Seul le taux plasmatique de TFPI était associé à la survenue de séquelles. La persistance d'un caillot traduirait une insuffisance de la fibrinolyse physiologique dont le rendement est dépendant de ses médiateurs mais aussi de la fibrine. Miniati et al. [162] ont ainsi mis en évidence une résistance à lyse de la fibrine chez les patients présentant une EP ou chez ceux présentant une HTP-TEC ou une HTAP du groupe 1 confirmant les résultats des travaux de Morris et al. chez des patients atteints d'HTP-TEC [163] . Ces deux études ont utilisé du fibrinogène purifié permettant de s'affranchir de facteurs confondants plasmatiques pouvant influencer la fibrinolyse. C'est une des limites des travaux de Lami et al qui ont montré récemment que les patients présentant des séquelles perfusionnelles présentaient aussi des altérations de la fibrinolyse dont témoignaient une prolongation du temps de lyse de la fibrine et une élévation des taux plasmatiques de PAI-1 [164]. Les tests de turbidimétrie et de temps de lyse ont été réalisés sur du plasma dans cette étude. L'élévation de PAI-1 n'était pas retrouvé dans la série de Sanchez et al [48]. Morris et al ont aussi identifié chez des patients présentant une HTP-TEC 5 dysfibrinogémies associées à une diminution significative du temps du temps de lyse et une désorganisation de la structure de la fibrine [107].

D'autres hypothèses pourraient expliquer la relative résistance à la fibrinolyse du caillot, en particulier le délai diagnostique. Il a été montré que le vieillissement du caillot majorait sa résistance à la fibrinolyse par augmentation de la multimérisation de la chaîne  $\gamma$  du fibrinogène au sein du réseau de fibrine [118].

**Figure 13. Facteurs modifiant la formation du caillot de fibrine, d'après Undas et al [165]**



C'est dans l'HTP-TEC que des dysfibrinogénémies ont pu être identifiées et associées à ce phénomène de résistance à la fibrinolyse [107]. Les premiers travaux menés par cette équipe sur du fibrinogène purifié ont mis en évidence que le fibrinogène de patients atteints d'HTP-TEC étaient anormalement résistants à la fibrinolyse physiologique induite par la plasmine comparativement à des sujets contrôles sans antécédents thrombotiques [163]. En effet, l'analyse de la migration en électrophorèse des fragments de fibrine issus de sa digestion par la plasmine dans des gels de

polyacrylamide atteste d'une dégradation plus lente de toutes les chaînes constituant les fibres du caillot. Ces résultats ont permis d'émettre l'hypothèse que le retard à la lyse modifiait les interactions fibrine-cellules.

La même équipe a décrit l'existence de cinq nouvelles mutations sur les gènes codant pour les chaînes  $A\alpha$  (Fibrinogen San Diego IV et V),  $B\beta$  (Fibrinogen San Diego III), et  $\gamma$  (Fibrinogen San Diego I et II) du fibrinogène chez des patients atteints d'HTP-PE [107]. Ces mutations ont été recherchées chez 33 patients et retrouvées chez 5 d'entre eux soit une prévalence de 15% qui n'a pas été confirmée depuis dans des séries plus larges. Les mutations étaient détectées à l'aide d'une chromatographie en phase liquide-spectrométrie de masse permettant d'identifier les variants de poids moléculaires pour chacune des chaînes de fibrine afin de cibler le séquençage du gène de la chaîne concernée. Le tableau 11 détaille les positions de chacune des 5 mutations ainsi que les changements d'acide aminé et la modification de fonctionnalité potentielle. Ces 5 dysfibrinogénémies ont ensuite été analysées d'un point de vue fonctionnel et structurel montrant une diminution constante de la turbidité, du taux de lyse et de la génération de produits de dégradation du caillot contenant la séquence d'intérêt  $\beta 15-42$  renforçant l'hypothèse d'une modification des interactions fibrines-cellules du compartiment endothélial à la phase de transition de la MVTE. Ces anomalies fonctionnelles ont pu être corrélées à des modifications structurelles du réseau de fibrine qu'elles forment après activation par la thrombine analysées par en microscopie confocale. Les dysfibrinogénémies San Diego I à V formaient des caillots de fibres plus fines 79% à 90% du diamètre de fibres issus de fibrinogènes témoins à l'origine de réseaux plus désorganisés (dispersion spatiale des fibres 116 à 112% des valeurs des fibrines issus de fibrinogènes témoins) modifiant potentiellement l'accessibilité de séquences protéiques d'intérêt, en particulier la séquence  $\beta 15-42$ , aux récepteurs cellulaires [166].

Dans ce sens, Morris et al avait préalablement montré que la fixation d'anticorps dirigés contre la séquence  $\beta$ 15-42 diminuait de façon proportionnelle au degré d'organisation du réseau de fibrine, en particulier sous l'action du calcium cofacteur du cross-linking par le facteur XIII activée [131].

**Tableau 11. Principales caractéristiques des dysfibrinogémies San Diego I à V associées à l'HTP-PEC, adapté de Morris et al [107]**

<u>LCMS</u>	<u>Patients</u>	<u>Gène</u>	<u>Exon</u>	<u>Nucléotide</u>	<u>Acide aminé</u>
↑ sialylation de $\gamma$ et $B\beta$	1	FGG	9	9163 C>T	$\gamma$ R375W
Pic $\gamma$ - 28 KDa	2	FGG	5	3977 T>C	$\gamma$ Y114H
Pic $B\beta$ + 14 KDa	1,2,3	FGB	5	7337 C>T	$B\beta$ P235L
Pic $A\alpha$ + 24 KDa	4	FGA	3	4075 T>A	$A\alpha$ L69H
Pic $A\alpha$ + 19 KDa	5	FGA	5	7261 G>A	$A\alpha$ R554H

### 5.3. Compartiment endothélial et MVTE chronique

#### 5.3.1. Cellules endothéliales circulantes

Les cellules endothéliales circulantes (CEC) sont des cellules matures détachées de l'endothélium lors de l'activation de la réparation de celui-ci après une agression [167]. Les CECs expriment un certain nombre de marqueurs membranaires en particulier le CD146, une molécule d'adhésion exprimée par les cellules endothéliales mais pas par leurs précurseurs issus de la moelle hématopoïétique[168], [169]. Les CECs peuvent aussi exprimer le CD36, un marqueur endothélial des vaisseaux de petits calibres. Un nombre élevé de CEC a été rapporté dans diverses situations d'agression endothéliale: syndrome coronarien aigu, vascularites, syndrome de détresse respiratoire aigu de l'adulte[170] . Dans la plupart de ces pathologies, l'augmentation des CEC semble associée à une élévation des taux plasmatiques de marqueurs de dysfonction endothéliale incluant le facteur Willebrand, la thrombomoduline soluble et les molécules d'adhésion solubles (ICAM-1, VCAM-1, E et P sélectines). Il a aussi été mis en évidence le

rôle pronostique des CEC chez des patients atteints d'HTAP liée aux cardiopathies congénitales [171]. Dans cette étude, Smadja et al ont montré que les CEC étaient significativement plus élevées (57 CEC/mL) chez les patients atteints d'une HTAP associée aux cardiopathies congénitales non réversible après correction chirurgicale du shunt intracardiaque comparativement aux patients avec une HTAP réversible et à des contrôles indemnes d'HTAP (3 CEC/mL dans chacun des groupes). Levy et al ont travaillé sur les biopsies pulmonaires de patients atteints d'HTP associée aux cardiopathies congénitales et ont montré qu'en cas d'irréversibilité de la maladie: (1) les CEC expriment un fort signal anti-apoptique évalué par l'expression de Bcl-2 [172], et (2) l'intima des vaisseaux pulmonaire est le siège d'un intense remodelage. Enfin, Levy et al ont montré que les CEC étaient corrélées à la réponse aux traitements des HTP : les CEC baissent lorsque les patients s'améliorent sous l'effet du traitement et leur réascension dans le sang est associée à l'aggravation clinique des patients [173].

Au cours de l'HTP, un taux élevé de CEC semble est un marqueur de gravité [174]. Toutefois, leur taux n'est pas augmenté au cours de l' HTP-TEC [175]. Au cours de la MVTE, l'agression endothéliale et la dysfonction qu'elle induit ne semblent pas identiques à celle observée au cours de l'hypertension pulmonaire. Il est possible que les mécanismes de réparation endothélial ne mobilise pas de la même façon les cellules endothéliales matures de l'intima et les progéniteurs circulants selon la nature et l'étendue des lésions et probablement l'âge des patients [176].

### 5.3.2. Progéniteurs endothéliaux circulants

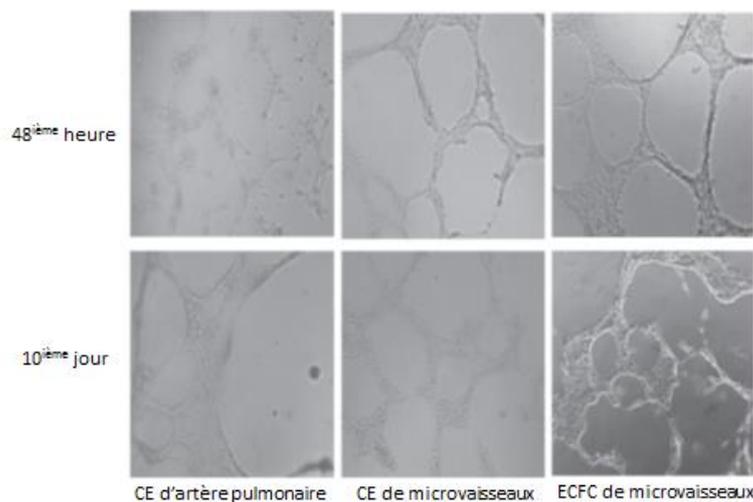
La possibilité de la participation de cellules progénitrices endothéliales d'origine non vasculaire a été suggérée par la description des mécanismes de réparation de l'endothélium au cours des agressions vasculaires, et en particulier de l'existence d'une

vasculogénèse, indépendante des vaisseaux préexistants. Au cours de l'angiogénèse, l'effecteur majeur de la réparation après une mise à nu d'un endothélium semble être une cellule adjacente à l'endothélium, présente dans l'intima mais de morphologie différente. Au cours de la vasculogénèse, l'apparition de vaisseaux au sein de tumeur ne peut faire appel qu'à un précurseur cellulaire endothélial dont l'origine suspectée est médullaire compte tenu de l'origine embryonnaire mésodermique [176]. Les progéniteurs endothéliaux circulants (PECs) ont été initialement décrits par Asahara et al. en 1997 et sont des cellules capables d'induire une néovascularisation chez l'adulte [177]. Ces PEC sont caractérisés par l'expression de marqueurs de cellules endothéliales tels CD34, CD146, CD31, Flk-1 and CD105, mais, à la différence des cellules hématopoïétiques, elles n'expriment ni le CD133, ni le CD14 ni le CD45 [177]. Depuis, il est admis que deux populations cellulaires différentes peuvent être isolées à partir de sang périphérique: les PECs précoces ou CFU-Hill qui sont des cellules hématopoïétiques avec des propriétés d'angiogénèse apparaissant après 3 à 7 jours de culture et sécrétant de nombreuses cytokines proangiogéniques et les PECs tardifs ou ECFCs (Endothelial Colony-Forming Cells) qui sont de véritables précurseurs engagés dans la lignée endothéliale, apparaissant après 7 à 30 jours de culture. Ces ECFCs peuvent être isolés à partir de sang périphérique adulte. Les ECFCs étant rares dans le sang périphérique, elles ont été isolées à partir de différents tissus telle la veine ombilicale, l'aorte ou l'artère pulmonaire ou encore le sang de cordon ombilical [178]. Leur isolement et leur culture sont maintenant bien décrits [179]. Le phénotype des progéniteurs endothéliaux retrouvés dans les vaisseaux pulmonaires est identique à celui des progéniteurs endothéliaux isolés à partir de sang de cordon ombilical.

### 5.3.3. PEC et maladies vasculaires pulmonaires

Le compartiment endothélial n'est pas homogène et il existe des différences fonctionnelles importantes au sein d'un même organe entre les cellules endothéliales artérielles, capillaires ou veineuses. Dans ce sens, King et al ont montré que les cellules endothéliales issues de microvaisseaux pulmonaires proliféraient deux fois plus vite que les cellules endothéliales issues d'artères pulmonaires [180]. Ce sont les travaux d'Alvarez et al qui associent cette capacité proliférative à la présence de PEC CD31+, CD144+, CD34+, CD309+ au sein de l'intima des microvaisseaux [181]. Ce travail a aussi mis en évidence que les capacités angiogéniques de ces cellules étaient supérieures aux cellules endothéliales : dans un modèle Matrigel®, la formation de vaisseaux structurés au 10<sup>ème</sup> jour était deux fois plus importante qu'avec les cellules endothéliales d'artères pulmonaires (figure 14).

**Figure 14. Capacités angiogéniques des cellules endothéliales (CE) et des progéniteurs endothéliaux (ECFC) (matrigel®), d'après Alvarez et al [181]**



Les ECFC ont été étudiées dans plusieurs maladies pulmonaires comme l'asthme, la broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) et les maladies vasculaires

pulmonaires. Dans l'asthme, les ECFC sont recrutés par les lymphocytes et colonisent la paroi des voies aériennes où elles induisent une angiogenèse importante et contribuent à entretenir l'inflammation caractéristique de cette maladie [182]. Contrairement aux CEC, l'étude des ECFCs dans le sang au cours des maladies vasculaires pulmonaires ont montré des résultats discordants. Smadja et al n'ont pas mis en évidence de taux anormaux entre les ECFCs dans le sang ni d'association avec le pronostic au cours de l'HTAP idiopathique, de l'HTAP associée aux cardiopathies congénitales et de l'HTP-TEC [171], [175]. Ces travaux sont limités par le faible nombre de patients inclus. Des résultats contradictoires ont été publiés par d'autres équipes. Certains travaux montrent que les ECFCs circulantes sont diminuées au cours de l'HTP associée à la fibrose pulmonaire ou au syndrome d'Eisenmenger, témoignant probablement d'une altération des capacités de recrutement [182]. Toshner et al ont montré une augmentation des ECFCs circulantes au cours de l'HTP par rapport à des sujets contrôles. Dans le même travail, cette équipe montre une forte expression au sein des lésions plexiformes de marqueurs des ECFCs (CD133) et de SDF-1 (Stroma Derived Factor 1) impliqués dans le recrutement de celles-ci. Ces résultats ont été confortés par les travaux de Farha et al qui ont montré une infiltration massive des vaisseaux pulmonaires par les ECFCs, 10 fois supérieure à celle de vaisseaux témoins. Les vaisseaux pulmonaires montraient aussi de fortes concentrations d'agents chimiotactiques pour les ECFCs comme SDF-1 [183]. Ces données ont aussi été confortées par la mise en évidence dans des modèles d'hypertension pulmonaire hypoxique chez le veau ou la souris du recrutement précoce d'ECFCs au sein des lésions de remodelage [184].

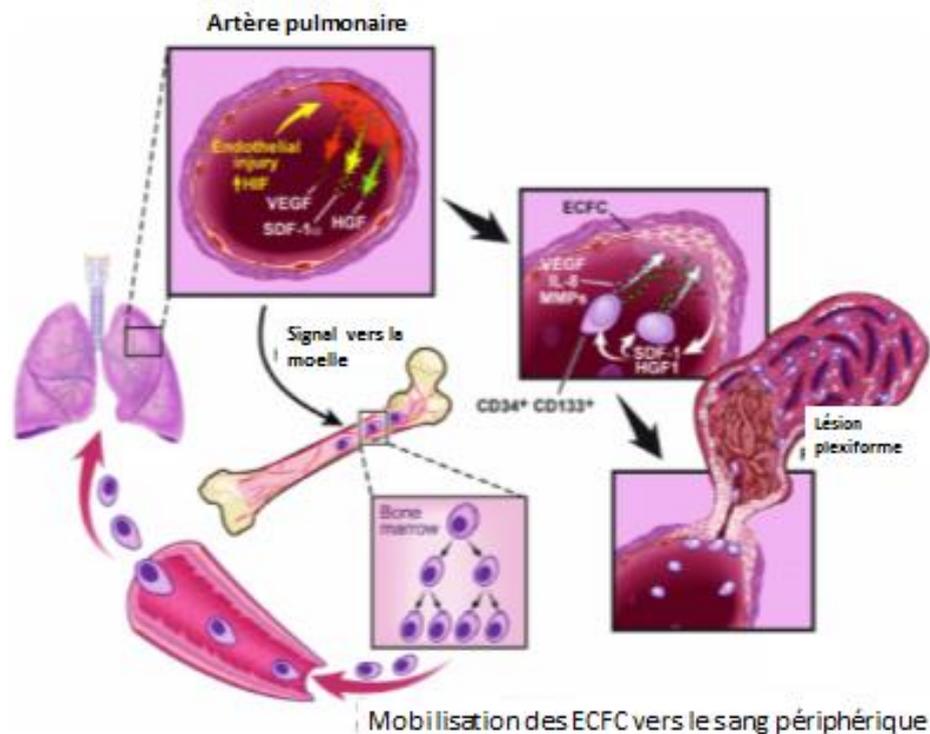
Le rôle joué par les ECFCs dans les maladies vasculaires pulmonaires reste cependant à ce jour mal compris. Les ECFCs mis en évidence dans les lésions plexiformes sont dysfonctionnelles et présentent un phénotype modifié, avec des capacités de

prolifération et d'angiogenèse in vitro altérées [185]. Les travaux de Farha vont aussi dans ce sens, les ECFCs favoriseraient le remodelage vasculaire en stimulant de façon inadéquate les mécanismes de réparation de l'endothélium pulmonaire [183]. Youg et al ont montré que le blocage de l'infiltration des vaisseaux pulmonaires par les ECFCs en inhibant la voie SDF-1/CXCR4 permettait de corriger les lésions de remodelage vasculaire induites par l'hypoxie dans un modèle murin d'hypertension pulmonaire [186]. Plus récemment encore, Yan et al viennent de montrer que la transplantation de moelle hématopoïétique de souris sauvages à des souris déficientes pour le gène BMPR2, un modèle murin héréditaire d'hypertension pulmonaire, prévenait le développement de la maladie [187]. A l'inverse, l'allogreffe de moelle de souris déficientes pour le gène BMPR2 induisait chez les souris sauvages la maladie. Enfin, des travaux récents ont montré que le treprostinil, un des vasodilateurs utilisé dans le traitement de l'hypertension pulmonaire, augmentait le nombre d'ECFC dans la circulation des patients recevant ce traitement, une fois isolées ces ECFCs présentaient un fort potentiel prolifératif et angiogénique [188]. Des travaux complémentaires de la même équipe ont montré que l'action du treprostinil était médiée par la sécrétion de VEGF-A par les cellules mésenchymateuses [189]. Ces résultats sont le témoin du nouveau paradigme physiopathologique proposé pour les PEC dans le développement d'une hypertension pulmonaire. Les PEC sont recrutés depuis la moelle hématopoïétique pour investir les vaisseaux pulmonaires où ils sont censés stimuler l'angiogenèse et la réparation des vaisseaux lésés, voire s'y incorporer, en jouant un rôle de chef d'orchestre. Néanmoins, une dysrégulation des PEC pourrait avoir des effets délétères : vasculogenèse déficiente, signaux pro-inflammatoires et pro-fibrosants (figure 15).

Il est donc possible qu'une partie des lésions constatées au cours de l'HTP-TEC soit le

témoin d'une altération de la mobilisation, du recrutement ou de l'activité sécrétoire ou de l'expression phénotypique des PEC.

**Figure 15. Mobilisation et rôle des ECFCs dans la physiopathologie des maladies vasculaires pulmonaires, d'après Duong et al [182]**



#### 5.3.4. PEC et résolution du caillot

##### 5.3.4.1. Effet sur la coagulation/fibrinolyse

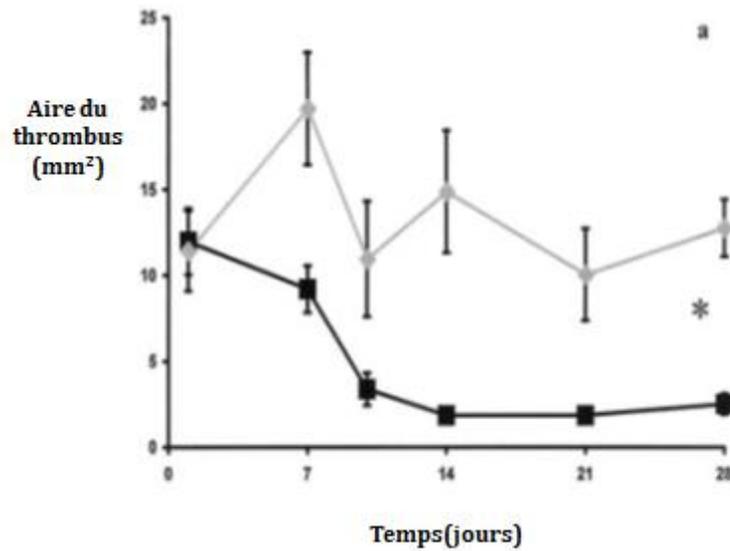
A l'état basal, l'endothélium pulmonaire a une activité profibrinolytique prédominante protégeant la circulation des phénomènes de thrombose [190]. L'activation des CE, par contact direct avec la fibrine ou majoration du stress pariétal en rapport avec l'élévation des pressions et la modification du flux intra-artériel, va donner aux CE un profil plutôt antifibrinolytique par expression de PAI-1 et de thrombomoduline[191], [192]. En effet, Lang et al ont montré que l'expression des inducteurs et des inhibiteurs de la fibrinolyse était différente au sein des vaisseaux embolisés au cours de l'EP aiguë qu'au

sein des vaisseaux non embolisés [179], [180]. Une forte expression d'uPA (activateur du plasminogène type urokinase) était constatée dans les cellules mononuclées infiltrées dans le thrombus et les cellules migrant vers le thrombus; une forte concentration de PAI-1 était détectée dans les cellules endothéliales au contact direct du thrombus.

Néanmoins, l'implication directe des CE dans l'inhibition massive et exagérée de la fibrinolyse physiologique du thrombus au cours de la MVTE chronique paraît peu probable. En effet, il n'a pas été mis en évidence de différence entre les profils de sécrétion de PAI-1 et de l'activateur tissulaire du plasminogène entre des CE humaines de sujets sains et des CE de patients atteints d'HTP-TEC [193].

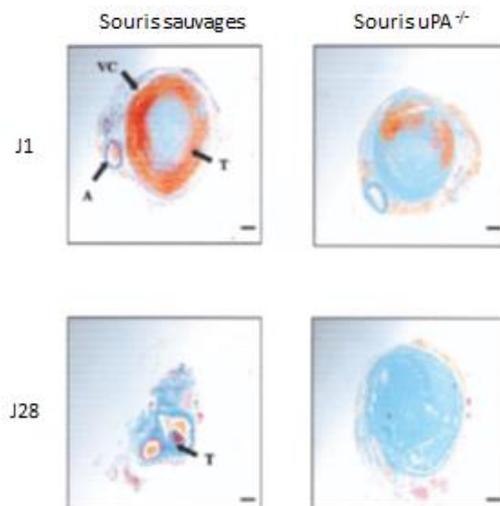
Le rôle des PEC a aussi été suggéré par les travaux de Singh et al qui compare la résolution et l'infiltration par les macrophages dans le temps de thrombus après ligature de veine cave inférieure chez des souris sauvages à des souris déficientes pour l'uPA (Activateur du Plasminogène de type urokinase) [194]. La résolution du caillot était significativement réduite chez les souris déficientes et l'infiltration du thrombus par les macrophages était 4 fois moins importante au 14<sup>ième</sup> jour (figures 16 et 17). De façon intéressante, la résolution du caillot était restaurée par la transplantation de moelle hématopoïétique de souris sauvages aux souris déficientes pour uPA suggérant l'implication de PEC sans toutefois les mettre en évidence dans les thrombus, ni analyser les mécanismes impliqués, en particulier l'induction de la rétraction et de la fibrinolyse du thrombus.

**Figure 16. Evolution de la résorption du caillot, d'après Singh et al [194]**



Ligne noire : souris sauvages, Ligne grise souris uPA<sup>-/-</sup>

**Figure 17. Résolution du thrombus (T) de la veine cave inférieure (VC), d'après Singh et al [194]**



Le bleu de Martius scarlet colore en jaune les globules rouges, en rouge la fibrine et el collagène en bleu. Échelle 300 µm.

Il a été montré que les ECFCs pouvaient avoir une activité procoagulante, en particulier dans des conditions inflammatoires. Cuccuini et al ont montré que la stimulation d'ECFCs isolées à partir du sang périphérique d'adultes sains par le TNF $\alpha$  induisait une forte expression de facteur tissulaire (TF); en revanche l'augmentation de TF était moins

importante pour les ECFCs de cordon. La forte induction de TF a été associée à une majoration de la génération de thrombine pour les deux types d'ECFC. De façon intéressante, les capacités de prolifération et angiogénique des ECFCs de cordon n'étaient pas modifiées ni par le  $\text{TNF}\alpha$ , ni par le FVIIa ni par la stimulation successive  $\text{TNF}\alpha$ -FVIIa. Une autre étude a aussi montré une augmentation de l'expression de TF par les PEC in vitro après stimulation par les lipopolysaccharides [195].

Au cours la résolution du caillot, les ECFC semblent promouvoir une activité antifibrinolytique via l'activation du récepteur PAR-1 par la thrombine dont témoigne la sécrétion importante de PAI-1 et la baisse des DDimères produits dans le surnageant des ECFC en culture sur un gel de fibrine [196]. Cette même équipe a aussi montré que l'activation des ECFC par la thrombine via PAR-1 stimulait l'angiogénèse par stimulation de l'angiopoïétine [197] et l'activation de la voie SDF-1/CXCR4 [198].

#### 5.3.4.2. Effet sur l'angiogénèse

La résolution du caillot fait intervenir les cellules du compartiment endothélial, CE et PEC, à l'origine d'une néovascularisation du thrombus. Des études animales ont montré que très précocement les thrombus se rétractent de la paroi vasculaire autorisant la formation de structures vasculaires entre la paroi et le corps du thrombus puis au sein même du thrombus [199]-[201]. Dans ce sens, il a été mis en évidence de fortes concentrations de facteurs de croissance endothéliaux, en particulier le VEGF, au sein de thrombi en voie de résolution [202]. Dans un modèle de thrombose par ligature de la veine cave chez le rat, l'injection de  $10\mu\text{L}$  VEGF dans le thrombus favorisait sa rétraction et sa résolution par rapport aux témoins [203]. Les interactions fibrine cellules du compartiment endothélial semblent déterminantes comme le montrent les travaux

d'Alias et al prouvant qu'une altération de l'angiogenèse réduit la résolution du thrombus dans un modèle animal et chez les patients atteints d'HTP-TEC [193]. Chez des souris déficientes pour Kdr, le récepteur du VEGF, sur les CE matures, la taille du caillot, son infiltration par les macrophages et sa néo vascularisation étaient nettement altérées dans les 14 premiers jours par rapport à des souris témoins non déficientes pour Kdr. Ces différences disparaissaient au 28<sup>ième</sup> jour alors que le récepteur Kdr était retrouvé dans le thrombus témoignant de son infiltration probable par des cellules d'une autre lignée que les CE matures, probablement des PEC. Enfin, ce travail a comparé histologiquement les caillots des souris prélevés à différents temps aux produits d'endartériectomie pulmonaire de patients atteints d'HTP-TEC. Comme déjà montré dans des séries autopsiques, les thrombus des pièces d'endartériectomie sont composés de thrombus frais et de thrombus vieillis et organisés, histologiquement comparable à ceux du modèle murin. Les thrombus frais semblent avoir une action plutôt angiostatique sur les CE dans cette étude. Ces résultats sont cohérents avec ceux de Zabini et al qui ont mis en évidence de fortes concentrations de facteurs angiostatiques, PF-4 et IP-10 notamment, dans le matériel de pièces d'endartériectomie et une altération des capacités angiogéniques et prolifératives des CE isolées à partir de ces prélèvements [105].

Le rôle des ECFCs dans la résolution des thrombus veineux a été suggéré par les travaux de Modarai et al [199]. Des souris allogreffées de moelle exprimant un marqueur fluorescent (GFP) associée à l'expression d'une tyrosine kinase caractéristiques de la lignée endothéliale ont subi une ligature de la veine cave inférieure pour générer un thrombus veineux. L'analyse des thrombus a montré une infiltration très importante par les cellules GFP + d'origine médullaire survenant entre le 7<sup>ième</sup> et 14<sup>ième</sup> jour. De façon intéressante, ces cellules n'étaient pas situées dans les néo vaisseaux présents dans les

thrombi et exprimaient des marqueurs membranaires macrophagiques comme Mac-3 et CD-68 et des marqueurs endothéliaux comme VEGFR2. En cytométrie de flux, des ECFCs circulantes (CD34-/VEGFR2-) étaient détectées dans le sang de toutes les souris dès le 3<sup>ième</sup> jour. Les ECFC au sein des thrombus semblent donc jouer un rôle de régulation à l'interface entre l'angiogenèse et l'inflammation dont témoigne leur plasticité phénotypique. Il semble donc que la néo vascularisation du thrombus implique les CE à la phase précoce de rétraction du caillot avec une angiogenèse en périphérie de celui-ci, et plus tardivement les PEC.

Le matériel endovasculaire retiré par endartériectomie chez des patients atteints d'HTP-TEC est composé essentiellement de fibrine et de lésions intimes de remodelage. Les lésions proximales étaient riches en cellules exprimant un marqueur musculaire (SM- $\alpha$ A), les lésions plus distales correspondant aux territoires embolisés initialement, par une forte néovascularisation. L'ensemble des lésions était infiltré par des ECFCs (CD34+ CD133+ Flk-1+); dans les lésions proximales certaines ECFCs présentes dans les lésions de remodelage intimal exprimaient SM- $\alpha$ A [102].

#### 5.4. Interactions fibrine – cellules du compartiment endothélial

##### 5.4.1. Résorption du caillot et régulation de la coagulation/fibrinolyse

Les interactions entre les CE et la fibrine sont rapides. Martinez et al ont ainsi montré que l'adhésion de la fibrine marquée à l'iode<sup>125</sup> aux CE de cordon ombilical atteignait un pic de l'ordre de 60% à la 3<sup>ième</sup> heure d'incubation [127]. L'adhésion de la fibrine aux HUVEC a été associée à un cross-linking intense des chaînes alpha. Jerome et al montrent, dans un modèle reproduisant la formation et la lyse du caillot de fibrine dans un vaisseau recouvert de CE, un retard à la lyse du caillot par sécrétion de PAI-1 par les

CE et une réorganisation importante du caillot à leur contact [204]. Ainsi les CE contribueraient initialement à freiner la résorption du caillot afin d'y proliférer, la fibrine jouant le rôle de matrice temporaire. Dans ce sens, Smadja et al ont montré que le fibrinogène stimule la prolifération et la migration de progéniteurs endothéliaux circulants et que cette interaction modifie la balance coagulation/fibrinolyse en diminuant la lyse du caillot [196]. En effet, ce travail a mis en évidence une importante augmentation de la sécrétion endothéliale de l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1 (PAI-1).

#### 5.4.2. Signal pro inflammatoire

Plusieurs études démontrent l'importance des interactions fibrine – CE dans l'induction de la réaction inflammatoire qui joue aussi un rôle dans la résolution du caillot. Il a été montré dans un modèle murin de thrombose veineuse aiguë que la résorption du caillot était corrélée à son infiltration par les macrophages et à l'activité des métalloprotéines, dont font partie les enzymes de la fibrinolyse [124]. La réduction de l'infiltration du caillot par les cellules mononuclées était associée à une nette réduction de sa résolution. Des taux élevés de marqueurs de l'inflammation comme la C-réactive protéine (CRP), le Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ) ont été mis en évidence dans le plasma mais aussi les thrombus de patients atteints d'HTP-TEC et corrélés à l'importance de l'atteinte hémodynamique [39]. Enfin, Qi et al [122] ont mis en évidence que les CE humaines cultivées sur des gels de fibrine majoraient l'expression d'ICAM-1 dès la 4<sup>ème</sup> heure et de façon dose dépendante en réponse à l'augmentation de la concentration en fibrine du milieu de culture. L'adhésion des cellules mononuclées aux CE stimulées à la fibrine était 36 fois celle constatée après culture dans un milieu standard et le double après culture en présence d'IL1. Cette même équipe a montré l'induction de la sécrétion d'IL-8

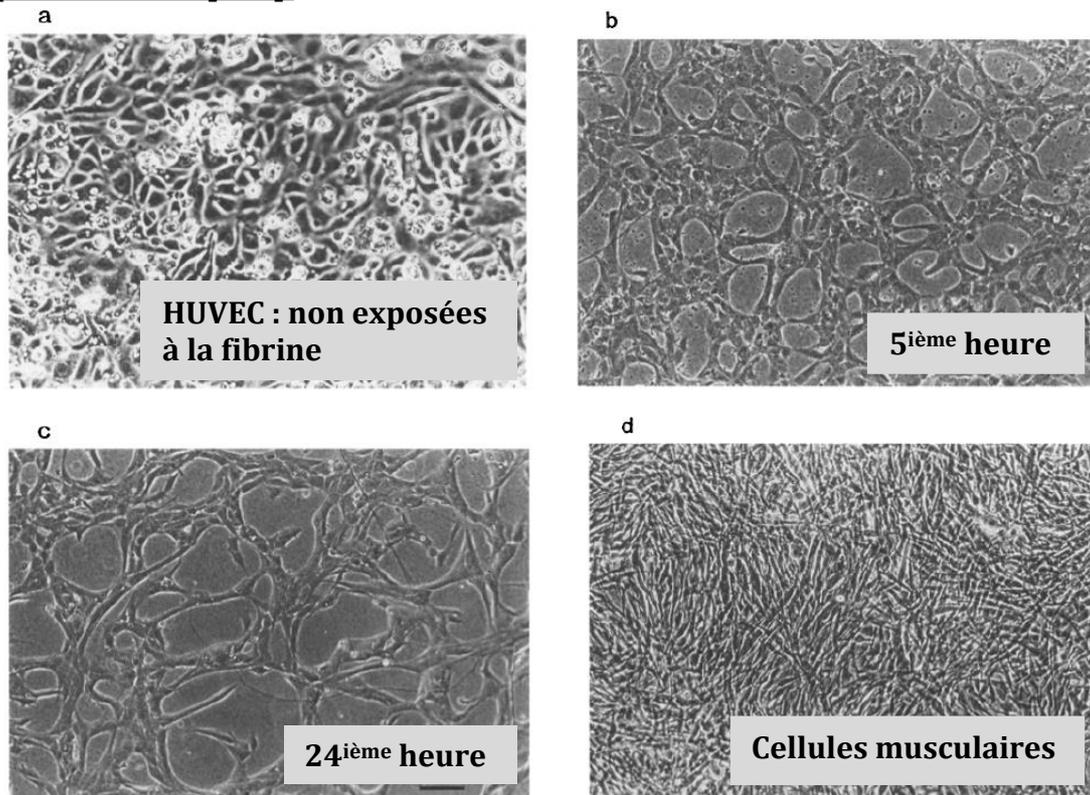
par les CE cultivées sur de la fibrine [122], [205]. La stimulation des cellules endothéliales par le caillot est déterminante dans l'induction de la réaction inflammatoire nécessaire à sa résorption. Petzelbauer et al ont ainsi montré que les séquences  $\beta$ 15-42 de la fibrine induisaient la transmigration des leucocytes à travers une couche monocellulaire de CE [206]. Le mécanisme supposé est celui d'un pontage par la fibrine des cellules monoclées et des CE de l'endothélium vasculaire via leurs récepteurs respectifs les intégrines leucocytaires  $\alpha_M\beta_2$  et le récepteur endothélial VE cadhérine.

Les mécanismes, en particulier le rôle du fibrinogène et des PEC, régulant ou altérant le processus inflammatoire dans la persistance du caillot et le développement des lésions de vasculopathie au cours de la MVTE chronique ne sont pas compris à ce jour.

#### 5.4.3. Signal angiogénique

Plusieurs études se sont intéressées à l'effet angiogénique de la fibrine sur les CE. Chalupowicz et al [207] ont montré que la fibrine stimulait rapidement l'angiogenèse de CE de cordon ombilical humain dès la 5<sup>ème</sup> heure de culture par la mise en évidence de formation de tubes capillaires (figure 18). La comparaison de fibrines déficientes pour certains segments peptidiques a permis de montrer le rôle clé de la séquence  $\beta$  15-42 dans la stimulation de l'angiogenèse des CE. En effet, il n'a pas été mis en évidence de signal proangiogénique chez les CE après stimulation par la séquence  $\alpha$ C du fibrinogène via des intégrines des CE. Dans cette étude, Yakovlev et al ont montré que le domaine  $\alpha$ C induisait la prolifération et la migration des CE.

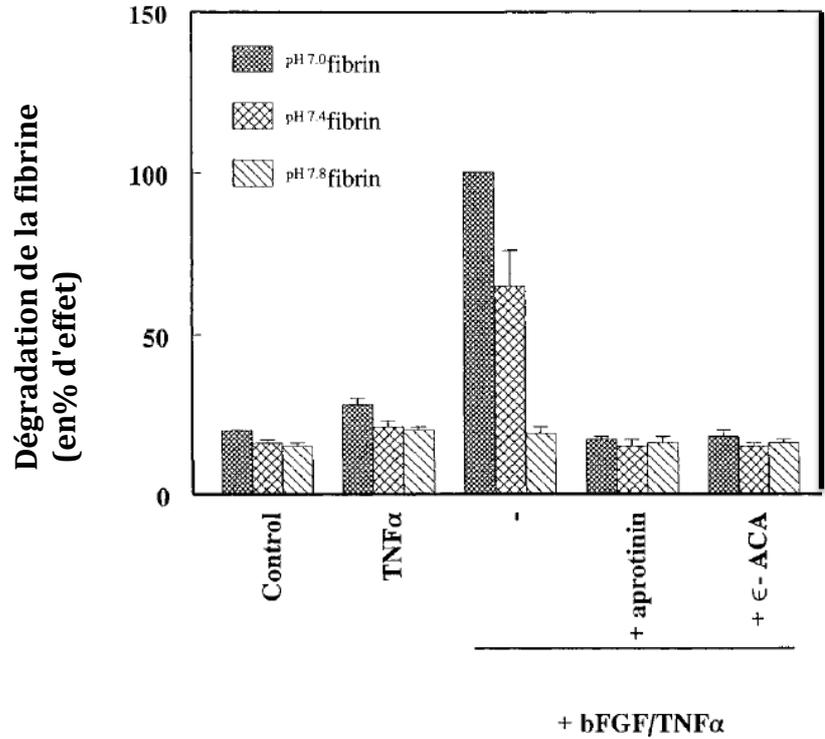
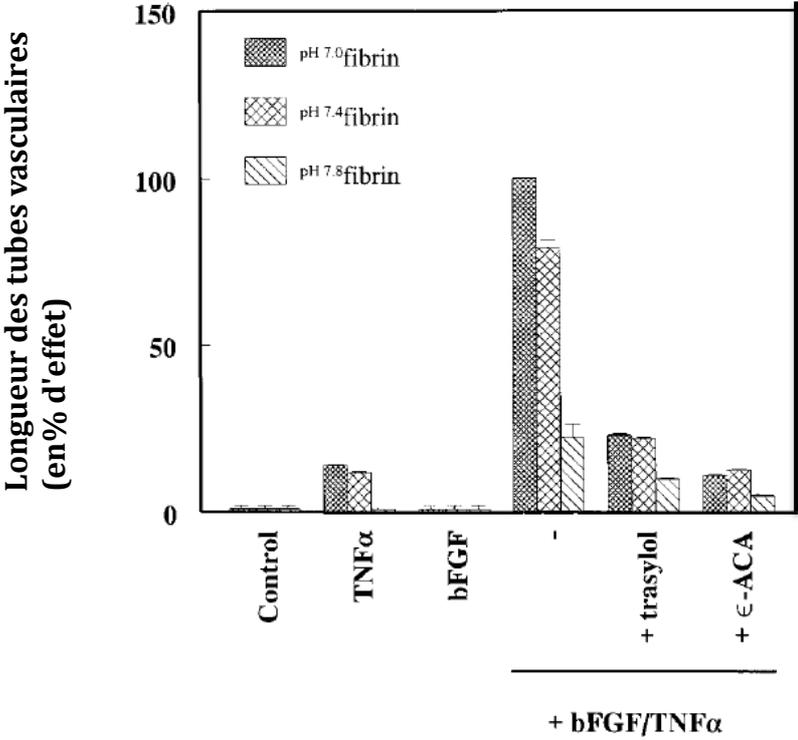
**Figure 18. Formation de tubes capillaires après stimulation par la fibrine, d'après Chapulowicz et al [207].**



L'accessibilité des séquences peptidiques dans les réseaux de fibrine semble être un élément déterminant leurs interactions avec les CE. Yakovlev a montré que l'action du domaine  $\alpha C$  était dépendante de sa polymérisation reproduisant l'alignement des motifs  $\alpha C$  dans la fibrine [208]. L'accessibilité de la séquence peptique  $\beta 15-42$  de la chaîne  $\beta$  déjà évoquée, est aussi questionnée par les résultats proposés par Nehls et al qui ont montré que la structure du réseau de fibrine était déterminante dans l'induction de l'angiogenèse et des capacités migratoires des CE [199]. Dans cette étude, des gels de fibrine bovine de structures différentes étaient obtenus en faisant varier le pH ou la concentration de thrombine à quantité de fibrinogène constant. La migration et la capacité de formation de tubes capillaires étaient évaluées par un opérateur non informé de la lecture du gel. Les caillots les plus organisés, obtenus à des pH acides ou avec de fortes concentration de thrombine, stimulaient l'angiogenèse là où des gels moins denses ne le permettaient pas. Cette étude a montré l'importance de la structure

du réseau de fibrine dans la stimulation de l'angiogenèse des CE d'artères pulmonaires mais reste limitée par l'absence d'étude des mécanismes moléculaires sous-jacents. Ces résultats ont été confortés par ceux de Collen et al sur du fibrinogène humain industriel [210]. De la même manière, des fibrines de structures différentes étaient polymérisées à pH croissant : les gels les plus denses et organisés (pH 7,0) permettaient la formation des tubes capillaires les plus longs: les longueurs moyennes correspondaient à pH 7,4 et pH 7,8 respectivement à  $79\% \pm 3$  et  $22\% \pm 4$  de celles obtenues à pH 7,0. De façon intéressante, la formation de microtubules nécessitait une costimulation des CE en culture par le  $TNF\alpha$  et un facteur de croissance (bFGF ou VEGF). La croissance des CE microvasculaires humaines était inhibée par la présence d'inhibiteur de la fibrinolyse dans les milieux de culture (figure 19). Ces résultats sont cohérents avec ceux de Smadja et al avec des progéniteurs endothéliaux circulants de cordon [171]. Il existe une régulation par la fibrine et les cellules du compartiment endothélial de la fibrinolyse d'abord en la limitant pour favoriser la prolifération et la migration des CE puis en la stimulant pour favoriser l'angiogenèse et la vasculogenèse. Enfin il est possible que l'inflammation joue un rôle déterminant dans la création de conditions favorables aux phénomènes d'angiogenèse.

**Figure 19. Effet de la structure de la fibrine induite par des variations de pH sur le potentiel angiogénique d'HUVEC et l'activité fibrinolytique in vitro, d'après Collen et al [210]**



# **HYPOTHESES DE TRAVAIL**

## **HYPOTHESES DE TRAVAIL**

---

### **1. Hypothèse clinique**

Après une embolie pulmonaire, la restauration de la perfusion des vaisseaux par résolution des caillots fibrino-cruoriques embolisés au sein du lit artériel pulmonaire est souvent incomplète témoignant de séquelles perfusionnelles. Ces dernières sont associées à une altération du pronostic fonctionnel mais leur impact sur la survenue d'une récurrence de la maladie est encore incertain. Les données de la littérature disponibles sont discordantes et limitées soit par les faibles effectifs des cohortes étudiées ou le choix de l'angioscanner thoracique pour la détection et l'évaluation quantitative des séquelles perfusionnelles.

**Ce travail de recherche pose comme hypothèse que l'existence de séquelles vasculaires est un facteur de risque de récurrence de maladie veineuse thromboembolique.**

### **2. Hypothèses fondamentales**

#### **2.1. Existe-t-il des anomalies fonctionnelles et/ou des variants du fibrinogène associés aux séquelles perfusionnelles après une embolie pulmonaire ?**

En assumant que la présence de séquelles perfusionnelles soit associée à un risque majoré de survenue de récurrence d'événements thromboemboliques, l'identification à la phase aiguë de l'embolie pulmonaire de patients à fort risque de survenue de développer un syndrome post-embolie pulmonaire serait pertinente pour les cliniciens. D'autre part, la mise en évidence d'anomalie du fibrinogène pourrait contribuer à améliorer la compréhension de la physiopathologie de la MVTE chronique. **Ce travail teste l'hypothèse que des variants du fibrinogène, communs ou mutations**

**nouvelles comme celles décrites au cours de l'HTP-TEC, et/ ou des altérations fonctionnelles de la fibrine pourraient exister chez les patients présentant des séquelles vasculaires après une EP.**

2.2. Etude du comportement endothélial à la phase aigüe et au décours d'une embolie pulmonaire

Aucune donnée n'est disponible à ce jour sur les CEC et les PEC à la phase aigüe et au décours d'une EP. Les résultats disponibles actuellement dans l'hypertension pulmonaire sont discordants et probablement pas comparable à la phase aigüe d'une première EP, où il n'existe pas de lésions endothéliales préexistantes. Nous émettons l'hypothèse que la survenue de séquelles perfusionnelles est aussi le témoin d'une dysfonction endothéliale et que les séquelles perfusionnelles ainsi qu'un processus lésionnel endothélial intermédiaire avant d'autres complications de la maladie.

**Ce travail teste l'hypothèse d'une dysfonction endothéliale précoce immédiate ou d'apparition progressive après une première embolie pulmonaire chez les patients qui développeront des séquelles perfusionnelles.**

## **METHODES**

## Méthodes

---

### 1. Approche clinique

#### 1.1. Etude du fibrinogène dans la survenue de séquelles perfusionnelles

Il s'agit d'une étude de cohorte prospective avec constitution d'une banque d'échantillons biologiques. La cohorte est constituée de patients hospitalisés et suivis à l'HEGP pour un premier épisode d'EP entre 1999 et 2009. Le diagnostic d'EP était confirmé objectivement selon les recommandations [18].

Au terme de la durée théorique du traitement anticoagulant, l'obstruction vasculaire pulmonaire résiduelle était quantifiée à l'aide d'un score scintigraphique préalablement validé [62]. La présence de séquelles perfusionnelles était définie par un score d'obstruction > 10% sur la scintigraphie ventilation-perfusion.

Les patients recevaient un traitement anticoagulant curatif pendant une durée minimale de 3 mois ; la durée était laissée à l'appréciation du clinicien en accord avec les recommandations. Les patients étaient suivis à la recherche de récurrence thromboembolique veineuse qui devait être confirmée objectivement ou d'HTP-PE qui devait être confirmée par cathétérisme cardiaque droit.

Un prélèvement sanguin était réalisé au moment du diagnostic d'EP ou lors de la réalisation de la scintigraphie pour évaluation des séquelles pour la constitution de la sérothèque (tube sec), la plasmathèque et de la DNAtèque (tube citraté). Le sang a été prélevé sur tube citraté (3,8%) et le plasma a été obtenu par centrifugation à 2000g pendant 10 minutes à 4°C. L'ADN génomique a été isolé en utilisant le kit spécifique QUIAGEN (QIAamp DNA Blood Kit). Les prélèvements réalisés au moment du diagnostic (visite 1) seront utilisés pour ce travail après avoir été conservés sous forme congelée à -70°C.

## 1.2. Eudes des CEC à la phase aigüe et au décours de l'embolie pulmonaire

Il s'agit d'une étude de cohorte observationnelle prospective monocentrique (Hôpital Européen Georges Pompidou, APHP, Paris-France) de patients suivis prospectivement après un premier épisode d'EP. Les patients recevaient au moins 3 mois de traitement anticoagulant et étaient évalués au terme de la période d'anticoagulation à dose curative pour la recherche séquelles post-emboliques par une scintigraphie de ventilation et de perfusion. Un score d'obstruction résiduelle était alors calculé [52]. Un seuil d'obstruction résiduelle > 10% était retenu pour définir les patients avec des séquelles perfusionnelles significatives [48]. Des prélèvements sanguins sur tube EDTA après une purge veineuse ont été réalisés à différents temps du suivi : à la phase aiguë, à 3 mois et lors de l'évaluation des séquelles post-emboliques à 6 mois. Des sujets témoins sains sans antécédents thromboemboliques ont été recrutés à l'Etablissement Français du Sang de l'HEGP. Le protocole de recherche a reçu l'aval de l'Université Paris Descartes (CCPSL UNT Numéro 12/EFS/064). Les patients ont donné leur consentement favorable par écrit.

Les critères d'inclusion étaient : (1) premier épisode d'embolie pulmonaire objectivement confirmé par au moins une des conditions suivantes validées dans la littérature internationale [18]: lacune dans une artère pulmonaire, quelle qu'en soit la localisation, sur un angioscanner spiralé des artères pulmonaires, aspect de haute probabilité PIOPED sur une scintigraphie de ventilation/perfusion, thrombose veineuse profonde proximale sur une échographie veineuse chez un patient présentant une symptomatologie thoracique, cœur pulmonaire aigu échocardiographique inexpliqué en présence d'une forte probabilité clinique chez un patient en état de choc cardiogénique intransportable et (2) consentement signé.

Les critères de non-inclusion étaient (1) âge < 18 ans, (2) malade non affilié à un régime de sécurité sociale, (3) antécédent d'embolie pulmonaire objectivement confirmé, (4) hypertension pulmonaire connue, (4) suivi impossible et (5) présence d'une comorbidité connue pouvant augmenter le taux de CEC (syndrome coronarien < 1mois, sepsis sévère contemporain de l'EP aigue, contexte post-opératoire ou ischémie aigue d'un membre inférieur).

## 2. Approche protéique :

Cette partie du travail a été réalisée de novembre 2013 à février 2015 dans le laboratoire de recherche fondamentale du Pr Timothy Morris à UC San Diego.

### 2.1. Purification du fibrinogène

Le fibrinogène a été purifié à partir du plasma recueilli sur tube citrate à l'aide d'une précipitation à froid à l'éthanol [211]. La méthode initiale a été modifiée afin de s'adapter aux faibles volumes des aliquots de plasma disponibles (500µL). Le fibrinogène était précipité à froid à l'éthanol une première fois avant de passer sur une colonne de Gelatine Sepharose (GE Helthcare®) afin d'éliminer la fibronectine. Après une centrifugation le surnageant était à nouveau précipité à froid à l'éthanol. La pureté de la solution de fibrinogène finale était supérieure à 95%. La concentration en fibrinogène de la solution obtenue a été mesurée à l'aide d'un Nanodrop spectrophotomètre pour être ensuite ramenée à une concentration standard de 4mg/ml. Toutes les expériences ont été conduites sur le fibrinogène purifié des patients de la cohorte. Des données préliminaires ont montré que la purification à l'éthanol permettait la co-purification d'assez de Facteur XIII pour permettre le cross-linking complet de la fibrin en présence de calcium après analyse en SDS-PAGE.

## 2.2. Turbidimétrie

La turbidimétrie est un test fiable permettant une analyse quantitative de l'organisation du réseau formé par les fibres de fibrine. Il s'agit d'une approche indirecte mais corrélée à l'analyse structurale (dispersion et branchements) des fibres en microscopie confocale [212]. La turbidité de la fibrine a été évaluée pour chacun des échantillons disponibles. La fibrine était formée par polymérisation du fibrinogène en présence de facteur XIII, de thrombine et de chlorure de calcium [107]. Dans une plaque de 96 puits, des caillots de 100  $\mu$ L de fibrine (1mg/mL) étaient formés pendant 2 heures dans une chambre humide par l'action de la thrombine (5ui/mL) en présence de fibrinogène purifié, de plasminogène (20 $\mu$ g/mL) et de calcium (100mM). Les gels de fibrine obtenus étaient alors incubés avec du plasminogène (20 $\mu$ g/mL) et du tPA (1 $\mu$ g/mL) et immédiatement placés dans un lecteur de microplaques pour en mesurer l'absorbance à la fréquence de 405 nm toutes les 1 à minutes pendant 4 heures. La turbidité du gel est définie par tube la valeur maximale d'absorptiométrie.

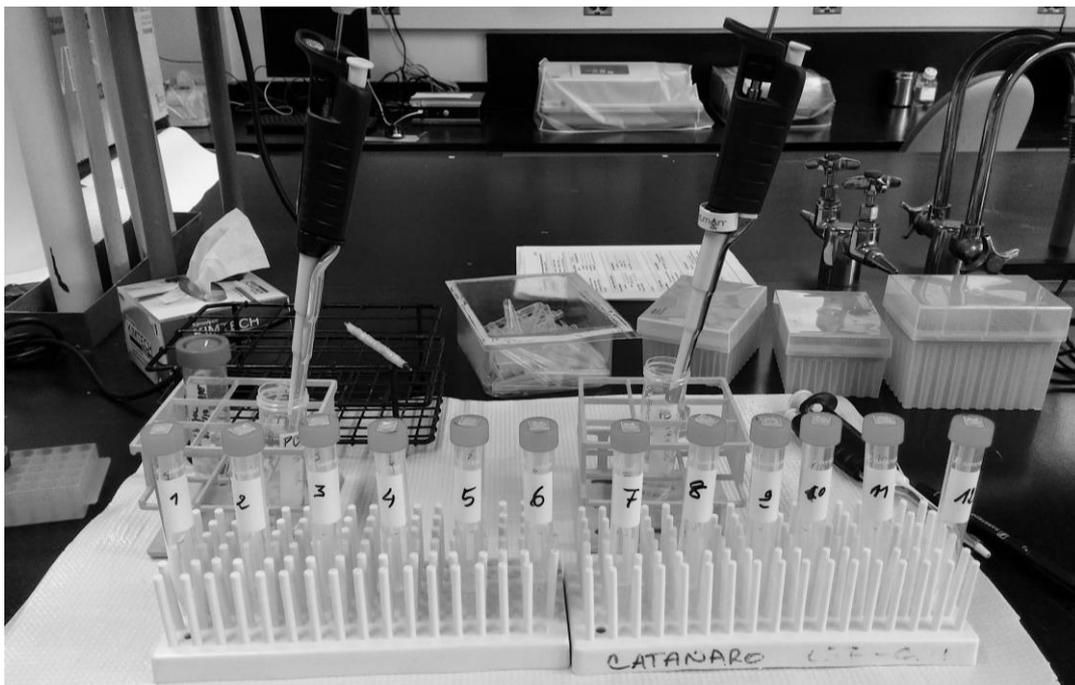
## 2.3. Perméabilité

La perméabilité du caillot mesure la rigidité obtenue par la polymérisation des molécules de fibrinogène. La perméabilité a été mesurée sur des gels de fibrine de 300  $\mu$ L de volume (1mg/mL) obtenus après deux heures d'incubation en présence de thrombine (5ui/mL) et de calcium (100mM) dans des colonnes d'extraction en phase solide dans une chambre humide.

Une solution de perméation (permeation buffer) était ajoutée au-dessus du gel formé jusqu'à l'extrémité supérieure de la colonne et était maintenue à pression constante (réinjection à niveau de la solution toutes les minutes) pendant une heure. Cette solution de perméation est un mélange du tampon Tris (50 nM, NaCl 150nM, pH 7,0 à 1% de BSA (albumine de sérum bovin). Après une heure d'incubation, le volume de

soluté ayant traversé le caillot était collecté et pesé. La perméabilité est évaluée par la constante de Darcy,  $K_s$ , qui représente la surface du caillot autorisant le passage de la solution. La  $K_s$  est calculé à l'aide de la formule  $K_s = \frac{Q \cdot L \cdot n}{t \cdot A \cdot \Delta P}$  où  $Q$  est le volume collecté (mL),  $L$  (la hauteur du gel de fibrine formé dans la colonne (1,176 cm pour un caillot de 300  $\mu$ L),  $n$  la constance de viscosité ( $10^{-3}$ ),  $t$  le temps d'injection de la solution (1 heure soit 3600 seconde s).  $A$  l'aire de la section de la colonne (0,2555  $\text{cm}^2$  pour les colonnes de 1 mL utilisé ici et  $\Delta P$  le différentiel de pression au sein de la colonne (6374 dybe/ $\text{cm}^2$  correspondant à 6,5 cm d' $\text{H}_2\text{O}$  dans la colonne de 1 mL) ; figure 20.

**Figure 20. Réalisation d'un test de perméabilité sur 12 prélèvements de la cohorte.**

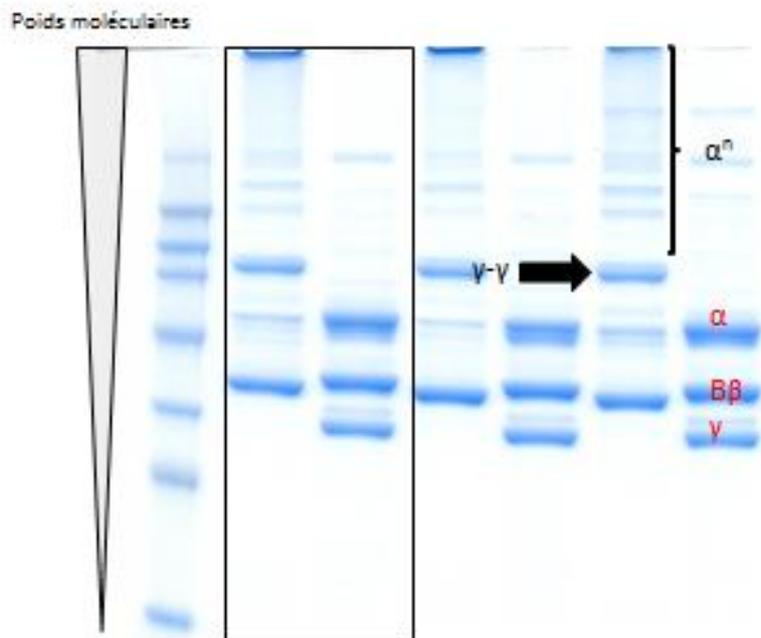


#### 2.4. Cross-linking de la chaîne $A\alpha$ de la fibrine

Le degré de cross-linking des chaînes alpha du fibrinogène au sein de la fibrine est une méthode d'évaluation de son degré d'organisation. Le fibrinogène (1 mg/mL) était polymérisé en présence de thrombine (5 UI/mL) et de calcium (100 mM) pendant 2

heures dans une chambre humide. Le gel de fibrine obtenu était dénaturé et réduit pendant 60 minutes à l'aide d'un tampon LDS/DTT obtenu par l'adjonction d'agent de réduction (NuPAGE DTT Reducing Agent, NP0009 ThermoFischer ®) au tampon NuPAGE LDS (NuPAGE LDS Sample Buffer (4X), NP0007 ThermoFischer ®). Après ajout d'un colorant, le fibrinogène et la fibrine dénaturée/réduite étaient déposés (2 µg/puit) dans un gel pour un électrophorèse en SDS-PAGE. A la fin de la migration, les gels étaient extraits de la plaque de conditionnement et placés sur un scanner afin de mesurer la densité des blots à l'aide du logiciel Imagem software®. Le degré de cross-linking était calculé par le ratio de l'intensité du blot de chaîne A $\alpha$  de la fibrine dénaturée/ réduite sur l'intensité du blot de la chaîne  $\alpha$  du fibrinogène, exprimé en pourcentage.

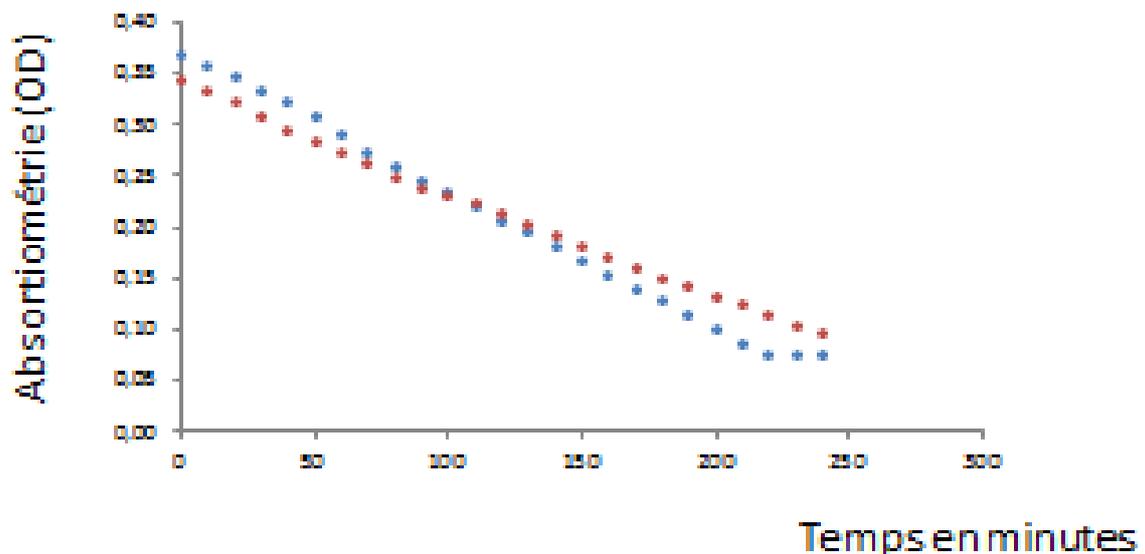
**Figure 21. Aspect d'un SDS de fibrinogène et de fibrine réduite: évaluation du pourcentage de cross-linking de la chaîne  $\alpha$ .**



## 2.5. Résistance à la fibrinolyse de la fibrine

La résistance à l'action de la plasmine est évaluée par la quantité de fibrine résiduelle après deux heures d'activité de celle-ci. Dans une plaque de 96 puits, des caillots de 100  $\mu$ L de fibrine (1mg/mL) étaient formés pendant 2 heures dans une chambre humide par l'action de la thrombine (5ui/mL) en présence de fibrinogène purifié, de plasmingène (20 $\mu$ g/mL) et de calcium (100mM). Les gels de fibrine obtenus étaient alors incubés avec du plasminogène (20  $\mu$ g/mL) et du tPA (1 $\mu$ g/mL) et immédiatement placés dans un lecteur de microplaques pour en mesurer l'absorbance (OD) à la fréquence de 405 nm toutes les minutes pendant 4 heures. La quantité résiduelle de fibrine était définie par le ratio de l'OD après 2 heures de lyse sur l'OD maximale (initiale). Le taux de lyse était défini par la pente de diminution de l'OD à la minute à la phase stable (pente linéaire) de la fibrinolyse [107] ; figure 22.

**Figure 22. Aspect de la courbe d'absorptiométrie dans le temps au cours du test de lyse (dupliquette)**



2.6. Accessibilité de la séquence  $\beta$ 15-42 de la séquence N terminale de la chaîne  $\beta$  du fibrinogène

L'accessibilité des épitopes  $\beta$ 15-42 a été évaluée juste après la mesure de perméabilité sur le caillot de fibrine dans la colonne utilisée pour la perméation. La technique a été développée spécifiquement pour le présent travail afin de pouvoir réaliser le maximum de tests alors que la quantité de fibrinogène purifié était limitée,

- Marquage des anticorps par l'iode 125

L'iode 125 [ $^{125}\text{I}$ ] (PerkinElmer #NEZ033A) était activée à l'aide d'un tube de Pierce contenant l'activateur de l'iode 125 (Thermo Scientific®) puis incorporée à 150  $\mu\text{g}$  d'anticorps spécifique de la séquence peptidique  $\beta$ 15-42 [131]. Le pourcentage d'incorporation à l'anticorps était déterminé après séparation de l' $^{125}\text{I}$  non liée à l'aide d'un filtre séparateur de seuil 30 KDa lors d'une centrifugation et était vérifié pour chacune des mesures d'accessibilité. La radioactivité (en cpm) était mesurée sur 10  $\mu\text{L}$  des solutions pré et post centrifugation à l'aide d'un compteur  $\gamma$ . La formule suivante permettait le calcul du % d'incorporation = (radioactivité post centrifugation / (radioactivité pré-centrifugation - radioactivité post-centrifugation)  $\times 100$ , Une incorporation  $>90\%$  était jugée satisfaisante.

- Mesure d'accessibilité des épitopes  $\beta$ 15-42

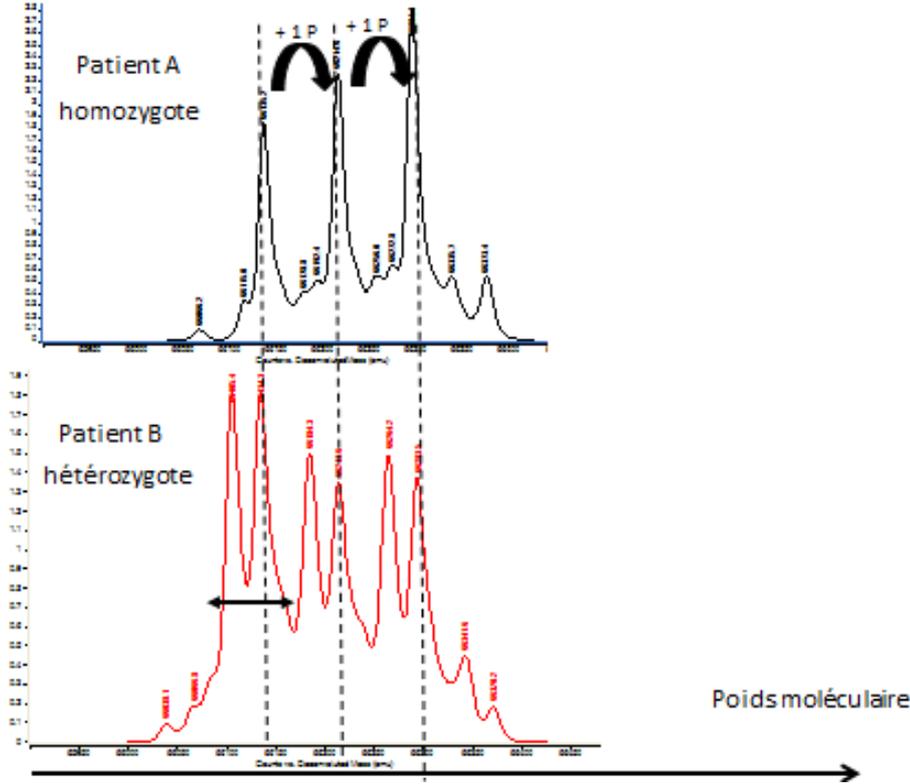
Immédiatement après l'expérience de perméabilité du caillot, le tampon de perméation résiduel était pipeté de chaque colonne et le tampon encore présent dans le caillot était drainé spontanément pendant une heure. 100  $\mu\text{L}$  d'anticorps ZFB- $^{125}\text{I}$ , dilué au 1/5<sup>ème</sup> dans un tampon Tris (50mM Tris pH7.5, 150mM NaCl) + BSA1mg/mL, étaient déposés dans la colonne sur le caillot. Après 30 minutes d'incubation, le caillot était rincé 3 fois par 800  $\mu\text{L}$  de tampon Tris. La colonne était placée dans un tube hermétique puis la radioactivité (cpm) comptée à l'aide du compteur  $\gamma$ . La quantité totale d'anticorps ZFB- $^{125}\text{I}$  fixée aux épitopes  $\beta$ 15-42 était calculée en tenant compte du % d'incorporation de l'iode 125 à l'anticorps ZFB (quantité de ZFB lié ( $\mu\text{g}$ ) = radioactivité de la colonne

/radioactivité par  $\mu\text{g}$  de protéine où radioactivité/  $\mu\text{g}$  de protéine = (radioactivité pré-centrifugation x % d'incorporation)/quantité de protéines déposées).

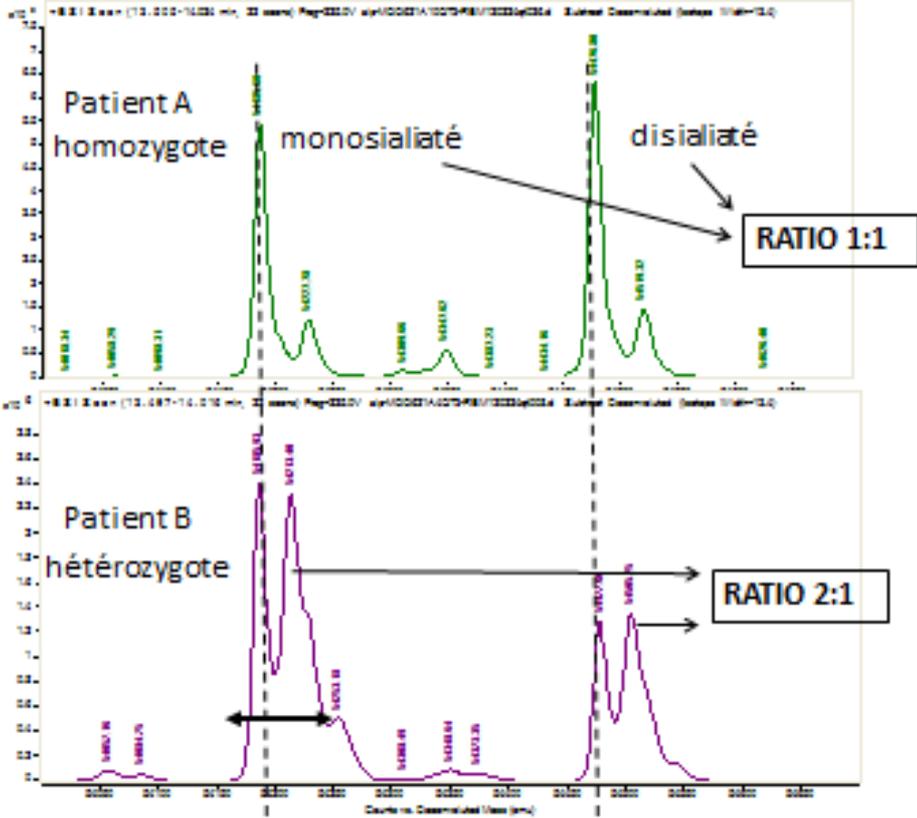
## 2.7. Détection des variants du fibrinogène

Le poids moléculaire de chacune des chaînes constitutives du fibrinogène a été mesurée par une chromatographie liquide en spectrométrie de masse (LCMS). Cinquante  $\mu\text{L}$  de fibrinogène (4 mg/mL) ont été dilués dans 17  $\mu\text{L}$  d'une solution constituée de 50% d'éthanol et de 50% de tampon CN (55 mM sodium citrate, 150 mM NaCl, pH 7,0) pour le précipiter. Après centrifugation et retrait du surnageant, le fibrinogène était remis en solution dans 200  $\mu\text{L}$  de d'une solution dénaturante séparant les 3 chaînes constitutives (tampon Tris-urée-DTT) pendant 4 heures à 37°C. La solution était acidifiée à l'aide de 20  $\mu\text{L}$  d'acide trifluoro-acétique à 10% pour prévenir la formation de ponts disulfures entre les chaînes. La concentration protéique était mesurée à l'aide du nanodrop spectrophotomètre ( $A_{280}$ ), puis ramenée à 1mg/mL. Les aliquots obtenus étaient congelés dans l'azote liquide puis transmis au laboratoire « Mass Spectrometry and Proteomics Core lab” de City of Hope (Calirfonia, USA), partenaire de UC San Diego, pour y réaliser la LCMS. Chaque LCMS génère pour un échantillon de plasma donné 3 spectres de migration en fonction du poids moléculaires correspondant au “profil” de chacune des chaînes  $A\alpha$ ,  $B\beta$  et  $\gamma$  du fibrinogène. Chacun des spectres (figure 23) a été lu et interprété à San Diego : le poids moléculaire de chacune était noté ainsi que la hauteur de chacun des pics (Corel Drawn software®).

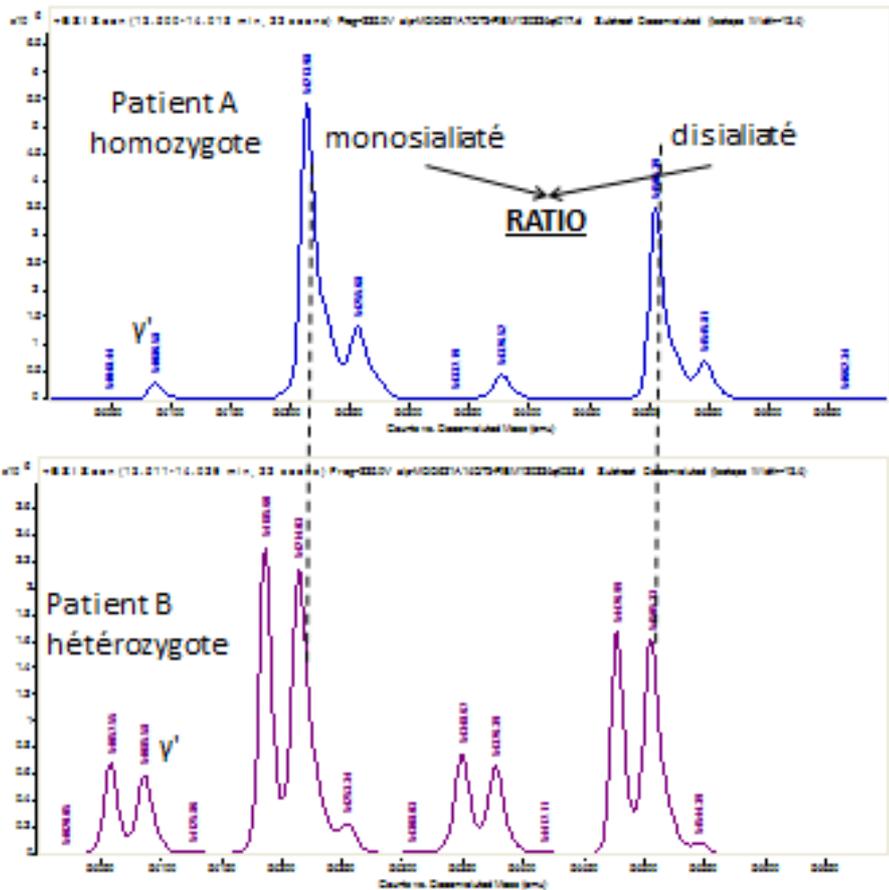
**Figure 23. Aspect des spectres de LCMS de chacune des chaînes du fibrinogène**



Aspect de la chaîne  $\alpha$



Aspect de la chaîne  $\alpha$



Aspect de la chaîne  $\gamma$

2.8. Séquençage des gènes des chaînes du fibrinogène

Chacun des gènes FGA, FGB et FGG codant respectivement pour les chaînes  $\text{A}\alpha$ ,  $\text{B}\beta$  et  $\gamma$  du fibrinogène ont été séquencés lorsque l'ADN était disponible. Les exons de chacun des 3 gènes ainsi que leurs promoteurs et la région 3'UTRs ont été amplifiés par PCR après purification à l'aide du kit QIaquickPCR Purification Kit. Le séquençage a été réalisé dans un laboratoire dédié de UC San Diego (ETON Biosciences). L'ADN était quantifié à l'aide du nanodrop spectrophotomètre ( $A_{260}$ ) et chaque échantillon ramené à une concentration de 10 ng/mL pour la PCR. Chacune de celles-ci utilise 1 ng/  $\mu\text{L}$  d'amorce d'ADN (0,2 $\mu\text{M}$ ) pour chacune des deux amorces (forward et reverse) et 1,25 UI de la polymérase AmpliTaq Glod 360 Master Mix (Applied Biosystem®). Trente-cinq cycles d'amplification (dénaturation à 95°C 30 sec, stabilisation à 56°C 30 sec puis

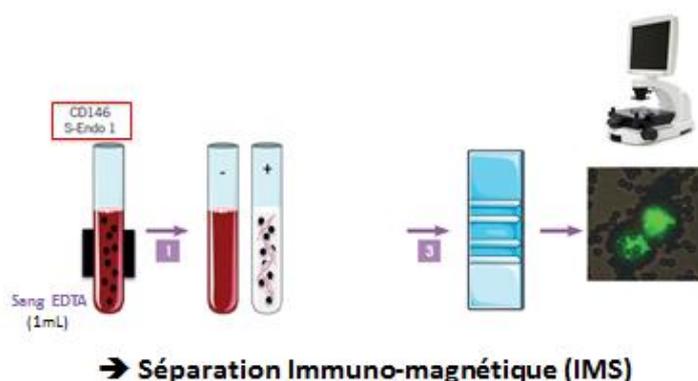
amplification à 72°C pendant 1h30min) ont été réalisés. Seuls les ADN des fibrinogènes présentant une variation de poids moléculaire connu (polymorphisme commun) ou inconnu lors de la phase de screening en LCMS ont été amplifiés.

### 3. Approche cellulaire

#### 3.1. Etudes des CEC à la phase aigüe et au décours de l'embolie pulmonaire

Les CEC sont quantifiées à l'aide de la technique de séparation immuno-magnétique (IMS, figure 24) à partir d'un prélèvement de sang veineux non traumatique sur tube EDTA et collecté après une purge afin d'éviter la contamination par des cellules endothéliales détachées lors du prélèvement. Un échantillon de 1 mL de sang est incubé en présence de billes magnétiques (Dyna-bead™) marquées avec un anticorps anti-CD146, à +4 °C. La fraction CD146+ est isolée puis diluée dans du PBS. L'ajout d'acridine au mélange permet de mettre en évidence la présence de cellules nucléées [166]. Les CEC sont ensuite comptées à l'aide d'un microscope à fluorescence (EVOS, Life Technologies®). Les CEC étaient identifiées selon les critères proposées par l'ISTH [213]: cellules nucléées, de plus de 10 µm de longueur, avec plus de 5 billes fixées et qui sont positives pour le marqueur endothélial, ici CD146+ [214].

**Figure 24. Principes de la séparation immuno-magnétique : principes.**



### 3.2. Isolement des ECFCs à partir de sang de cordon

Les sangs de cordon ombilicaux proviennent de l'Unité de thérapie cellulaire de l'hôpital Saint-Louis (Banque de sang de cordon, Hôpital Saint Louis, Laboratoire de thérapie Cellulaire, Pr, Jérôme LARGHERO). Le sang est prélevé à l'accouchement, dans une poche stérile contenant 10mL d'anticoagulant composé d'acide citrique 130 mM, Citrate trisodique 126 mM, glucose 110 mM (ACD-C) et transporté au laboratoire dans un délai maximal de 24 heures. Le sang est dilué au  $\frac{1}{2}$  dans du RPMI 2% SVF (Sérum Veau Foetal) puis les cellules mononucléées sont séparées par centrifugation sur un gradient de Pancoll (Dutscher®). Cette étape est suivie d'un lavage des cellules par du RPMI 2% SVF et de leur centrifugation à trois reprises pendant 10 minutes à 1800, 1500 et 1000 rpm. Les monocytes et polynucléaires sont éliminés par adhésion sur du plastique. Les cellules CD34+ sont ensuite immuno-séparées à l'aide de billes électromagnétiques (Myltenyi Biotech®) puisensemencées à une densité de  $5,10^5$  cellules/puits en plaque 24 puits pré-coatée à la gélatine 0,2% dans 1mL de milieu EGM2 (LONZA®). un milieu riche en facteurs de croissance proangiogène. Les plaques sont placées à l'étuve 37°C/ 5% CO<sub>2</sub>. Le milieu est changé les quatrième et dixième jours après préparation, Il est ensuite renouvelé tous les trois jours. Les clones apparaissent classiquement au bout de 15 à 30 jours de culture ; ils sont identifiés morphologiquement par leur aspect pavimenteux. Lorsque la colonie est de taille suffisante, les cellules sont décollées à la trypsine et passées dans un puits de plaque 6 puits en milieu EGM2 + 10% SVF (2mL). Les cellules sont utilisées entre les passages 3 et 7. Ces procédures ont été publiées et sont réalisées en routine par notre équipe [171].

### 3.3. Mises en évidence et inhibition de l'expression VLDLr par les ECFCs

#### 3.3.1. Extraction de l'ARN et dosage au Nanodrop

Les cellules en culture sont rincées avec du PBS puis lysées avec du RNable (Eurobio®) (1mL par puits de plaque 6 puits) avant d'être congelées à -80°C, L'ARN est ensuite extrait en ajoutant 0,1mL de chloroforme à la solution. Le mélange est vortexé brièvement et centrifugé pendant 15 min à 12000 rpm, La phase aqueuse est récupérée et mélangée à volume égal avec de l'isopropanol afin de précipiter l'ARN. Le mélange est placé pendant 2h à 4°C puis centrifugé (12000 rpm, 5min) pour d'obtenir un culot qui contient l'ARN. Ce culot est lavé deux fois à l'éthanol à 70% (centrifugation 5 min à 7500 rpm) puis séché 20 min à l'air libre et repris dans 15 à 30µL d'eau stérile, La concentration en ARN est déterminée par mesure de l'absorbance à 260nm au Nanodrop ND-1000 (Labtech®). Les ratios A260/280 et A260/230 permettent d'évaluer respectivement la contamination par l'ADN et les protéines.

#### 3.3.2. Transcription reverse de l'ARN en ADNc

L'ARN est ensuite transcrit en ADN complémentaire à l'aide du kit QuantiTect Reverse Transcription (Qiagen®). La première étape consiste à éliminer l'ADN génomique grâce à la réaction suivante : 2µL de gDNA Whipeout Buffer mélangé avec 12µL d'ARN (1000ng) et incubé pendant 2 min à 42°C. La deuxième étape est l'étape de synthèse d'ADNc proprement dite : au mélange réactionnel précédent est ajouté 1µL de Quantiscript Reverse Transcriptase, 4µL de Quantiscript Buffer et 1µL de RT Primer Mix. Le cycle d'amplification est programmé de la façon suivante : 30 min à 42°C, 3 min à 95°C et 5 min à 4°C (DNA Engine, Biorad), Les ADNc obtenus sont ensuite conservés à -20°C.

### **3.3.3. PCR quantitative**

La PCR quantitative a été réalisée selon la méthode Taqman® qui utilise des sondes fluorescentes pour évaluer la quantité d'ARNm reflet de l'expression du gène d'intérêt. Le gène de référence choisi pour normaliser les résultats est la GAPDH (4326317E, Applied®). Le gène d'intérêt étudié est le gène codant pour le récepteur VLDLr humain (Hs01045922\_m1, Life technologies®). La réaction a été réalisée grâce à l'automate TaqMan 7900 HT FAST (Applied Biosystem®). Le mélange réactionnel contient 5µL de Master Mix (Universal PCR Master MIX, No AmpErase®UNG, ref 4324018 Applied®). 0,5µL d'amorce GAPDH, 0,5µL d'amorce du gène d'intérêt, 2µL d'ADNc et 2µL d'eau stérile. L'amplification est faite pendant 50 cycles de la façon suivante : 10 minutes à 95°C, 15 s à 95°C et 10 minutes à 60°C. Les résultats ont été analysés avec le logiciel SDS v2,3. Ils sont exprimés en ratio normalisé par rapport à la limite du Ct quantifiable, arbitrairement fixé à 35.

### **3.3.4. Mise en évidence de VLDLr en cytométrie de flux**

La cytométrie en flux permet le compte cellulaire et l'analyse de constituants cellulaires. La protéine d'intérêt analysée est le récepteur VLDLr transmembranaire potentiellement présent sur les ECFC. L'anticorps utilisé est un anticorps IgG1 monoclonale de souris spécifique (Anti-VLDL Receptor antibody [1H10] -ab75591, Abcam®). Un anticorps secondaire de chèvre couplé au fluorochrome FITC est utilisé pour le marquage (Goat Anti Mouse Ig1- FITC- 41116015, Beckam Coulter ®). Les ECFCs sont aussi marquées par l'anticorps anti CD31 humain (PN IM2409, Beckman Coulter ®) directement conjugué avec un fluorochrome (PE) servant de contrôle positif. En pratique, après trypsinisation les cellules sont placées dans des eppendorfs et centrifugées pendant 5 minutes à 1500rpm à température ambiante. Elles sont ensuite incubées dans 1mL de BSA (Bovine Sérum Albumine) 1% (dilution dans du PBS) dans la

glace (4°C) pendant 30 minutes afin de bloquer d'éventuelles liaisons aspécifiques. Une seconde centrifugation est effectuée (5 minutes à 1500rpm à 5°C) puis elles sont comptées pour ramenées à la concentration de 100,00 cellules/ 100 µL de PBS/BSA 1%. Une première fixation est réalisée sur les cellules avec 0,2 µg d'anticorps anti VLDLr et sur les cellules contrôles avec la même quantité de son isotype (IgG1 mouse) pendant 30 minutes à 4°C dans l'obscurité. Après un rinçage au PBS/BSA 1% (1mL) et centrifugation (5 minutes à 1500rpm à 5°C), les cellules sont remises en suspension dans 100 µL de PBS/BSA 1% et incubées avec l'anticorps secondaire marqué au FITC et l'anticorps anti CD31 humain conjugué à PE pendant 30 minutes à 4°C dans l'obscurité. De la même façon, des cellules contrôles sont incubées par l'anticorps secondaire et par un anticorps IgG (A07796, Berkman®) non spécifique couplé à PE. Les cellules sont ensuite lavées à 2 reprises, pour éviter l'hyperfluorescence, avec 1mL de PBS/BSA 1% puis centrifugées (5 minutes à 1500 rpm à 5°C). Elles sont enfin remises en suspension dans 200 µl de PBS/BSA1% afin d'être analysées par cytométrie. Le cytomètre (Attune®) compte le nombre de cellules présentant le VLDLr marquée au FITC par l'anticorps.

### **3.3.5. Mise au point du silencing de VLDLr avec un siARN complémentaire et validation de l'inhibition par cytométrie en flux**

Afin d'inhiber l'expression de, les ARN messagers codants pour la protéine sont inhibés à l'aide de siARN complémentaires (VLDLr 7436 si-iRAN5 nmol, L-003721-00-0005 Dharmacon®) ou siARN contrôles (AllStars Negative Control, QUIAGEN®).

La veille de la transfection, les ECFCs sontensemencées à une densité de 150,10<sup>3</sup> cellules/puits sur des plaques 6 puits préalablement coatée à la gélatine 0,2% dans 2 mL d'EGM2-5%SVF (Lonza®). Le lendemain, les cellules sont contrôlées pour s'assurer de

leur confluence supérieure à 80% dans le puit de culture. Elles sont rincées au PBS puis transfectées, dans 1,8 mL milieu EGM2 (LONZA®) sans antibiotique et 200 µl de siARN (5 µl à 20nM) dilué dans 95 µl de Buffer 1X Dharmacon (cat n° : B-002000-UB-100) complexé à 20 µl d'agent transfectant (lipofectant : Dharmafect 2 (cat n° : T-2002, Dharmacon) préalablement dilué au 1/5<sup>ème</sup> dans de l'EBM-2 (Lonza®). Les plaques sont placées à l'étuve 37°C/ 5% CO<sub>2</sub>. Le milieu est changé après 24 heures de transfection pour de l'EGM-2 dépourvu d'antibiotiques. Il est ensuite renouvelé tous les trois jours.

Une fois dans la cellule, les ARN double brins interférents (siARN) sont pris en charge par le complexe RISC, par l'intermédiaire duquel l'ARNm d'intérêt sera reconnu puis dégradé. La cytométrie en flux, selon le même protocole décrit ci dessus, est utilisée afin de contrôler le niveau d'inhibition de VLDLr à un jour, deux jours, trois jours et à 7 jours de la transfection afin de déterminer le moment optimal d'utilisation des ECFC pour les tests complémentaires de prolifération et d'angiogenèse. L'expérience est menée en dupliquette pour chaque colonie d'ECFCs, les ECFCs transfectées par le siRNA contrôle servent de référence pour les calculs du pourcentage d'expression de VLDLr.

## **RESULTATS**

## Travail 1

---

### **Residual pulmonary vascular obstruction and recurrence after acute pulmonary embolism. A single center cohort study.**

Benjamin Planquette, Alexis Ferré, Julien Peron, Amandine Vial-Dupuy, Jean Pastre, Gisèle Mourin, Joseph Emmerich, Marie-Anne Collignon , Guy Meyer and Olivier Sanchez.

**Etat : accepté pour publication dans Thrombosis Research le 21/10/2016**

### **Résumé**

La première partie de ce projet de recherche translationnelle s'est intéressée au pronostic de patients présentant des séquelles perfusionnelles après une première embolie pulmonaire. L'objectif principal de cette étude était d'identifier les facteurs de risque de récurrence de MVTE. Pour ce faire nous avons analysé les données cliniques d'une cohorte de patients consécutifs avec une première embolie pulmonaire suivis prospectivement à l'Hôpital Européen Georges Pompidou de 1999 à 2009. Les patients étaient inclus à distance de l'embolie pulmonaire au moment de la recherche de séquelles vasculaires par la scintigraphie de ventilation-perfusion, définies par une obstruction persistante > 10% de la vascularisation pulmonaire. Les récurrences étaient diagnostiquées selon les recommandations internationales et confirmées par un investigateur indépendant en aveugle des résultats de la scintigraphie. Trois cents-dix patients ont été inclus, la prévalence des séquelles perfusionnelles était de 19% (60 patients) et des récurrences de MVTE de 21,2% (66 patients) après un suivi médian de 51 mois. Une analyse de Cox identifie les séquelles comme un facteur de risque de récurrence indépendant de MVTE (Hazard Ratio 1,94; IC 95% [1,11-3,39]). Deux analyses de sensibilité montrent que l'association persiste chez les patients les plus à risque de récurrence c'est à dire avec une EP non provoquée, et chez ceux pour qui les anticoagulants

avait été interrompus après au moins 3 mois de traitement. En effet, le caractère non provoqué de l'embolie pulmonaire était aussi associé à une augmentation du risque de récurrence (HR 3,56; IC95% [1,79-7,07]) alors que la poursuite du traitement anticoagulant, pour une autre indication que la MVTE dans la très grande majorité des cas, diminuait significativement le risque de récurrence (HR 0,19; IC95% [0,07-0,55]). Ces résultats suggèrent que les séquelles perfusionnelles sont une étape intermédiaire du syndrome post EP.

**Your Submission**

ees.tr.0.3ceacf.1dac1008@eesmail.elsevier.com de la part de Thrombosis Research  
[thrombosisresearch@elsevier.com]

Envoyé : jeudi 27 octobre 2016 00:36

A : PLANQUETTE Benjamin

Ref.: Ms. No. TR-D-16-00585R2

Residual pulmonary vascular obstruction and recurrence after acute pulmonary embolism.  
A single center cohort study.  
Thrombosis Research

Dear Dr. Planquette,

We are happy to inform you that your manuscript has been accepted for publication in  
Thrombosis Research.

Your accepted manuscript will now be transferred to our production department and work  
will begin on creation of the proof. If we need any additional information to create  
the proof, we will let you know. If not, you will be contacted again in the next few  
days with a request to approve the proof and to complete a number of online forms that  
are required for publication.

When your paper is published on ScienceDirect, you want to make sure it gets the  
attention it deserves. To help you get your message across, Elsevier has developed a  
new, free service called AudioSlides: brief, webcast-style presentations that are shown  
(publicly available) next to your published article. This format gives you the  
opportunity to explain your research in your own words and attract interest. You will  
receive an invitation email to create an AudioSlides presentation shortly. For more  
information and examples, please visit <http://www.elsevier.com/audioslides>.

With kind regards

Marc A. Rodger, M.D., FRCPC, MSc  
Editor-in-Chief

Thrombosis Research

**Residual pulmonary vascular obstruction and recurrence after acute pulmonary embolism. A single center cohort study.**

Benjamin Planquette\* (1,2,3), Alexis Ferré\* (1,2), Julien Peron (4,5), Amandine Vial-Dupuy (1,2), Jean Pastre (1,2), Gisèle Mourin (1,2), Joseph Emmerich (1,6), Marie-Anne Collignon (7), Guy Meyer (1,2,8,9), Olivier Sanchez (1,2,3).

- (1) Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité
- (2) Service de Pneumologie et Soins Intensifs, Hôpital Européen Georges Pompidou, AP-HP, Paris
- (3) INSERM UMR-S 1140, Paris
- (4) Medical Oncology Department, Centre Hospitalier Lyon Sud, Institut de Cancérologie des Hospices Civils de Lyon, Pierre-Bénite
- (5) CNRS, UMR 5558, Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive, Equipe Biostatistique-Santé, Université Lyon 1, Villeurbanne
- (6) Médecine Vasculaire – Cardiologie, Centre de Diagnostic et de Thérapeutique, Hôpital Hôtel Dieu, AP-HP, Paris
- (7) Service de Médecine Nucléaire, Hôpital Européen Georges Pompidou, AP-HP, Paris
- (8) INSERM CIC-1418, Paris
- (9) INSERM UMR-S 970, Paris

*\*These two authors contribute equally to this study*

**Corresponding author**

Dr Benjamin Planquette

Service de Pneumologie et de Soins Intensifs

Hôpital Européen Georges Pompidou

20 rue Leblanc

75015 Paris

Tel: + 33 1 56 09 34 89

Fax: + 33 1 56 09 32 55

Email: benjamin.planquette@aphp.fr

**Key words:** pulmonary embolism, management of pulmonary embolism, thrombosis, lung scintigraphy, risk factor, pulmonary circulation physiopathology

**Total words count (excluding abstract, tables, figures, and references): words:**  
2432 words

**Abstract:** 230 words

### **Highlights**

- After a first pulmonary embolism, residual pulmonary vascular obstruction is frequent.
  - RPVO is associated with increased dyspnea and elevated pulmonary pressure.
  - The association of RPVO with venous thromboembolism recurrences remains debated.
- 
- RPVO are associated with an increased risk for VTE recurrence after first PE,
  - RPVO, if available, may help clinicians for patients' recurrence risk assessment.

## **Abstract**

**Introduction:** Up to 50% of patients with pulmonary embolism (PE) present lung perfusion defects after six months of anticoagulant treatment, suggesting residual pulmonary vascular obstruction (RPVO). The risk of recurrence in patients with RPVO remains unknown. The present study aims to assess the risk of recurrent venous thromboembolism (VTE) in patients with RPVO after a first symptomatic episode of PE. **Methods:** Consecutive patients who survived a first objectively proven acute PE, treated for at least three months with anticoagulants, were included and followed prospectively. RPVO was defined as a pulmonary vascular obstruction of more than 10% on ventilation/perfusion lung scan performed at inclusion. Objectively proven VTE recurrences were registered and confirmed by an investigator unaware of the result of the ventilation/perfusion lung scan. **Results:** Among the 310 patients (median age: 61 years) included in the study, 60 (19%) had RPVO. During a median follow-up of 51.3 months, 66 patients (21.2%, 95% CI [17.5-26.7]) experienced recurrent VTE. In an adjusted cox proportional hazards analysis, we identified RPVO (HR 1.94; 95% CI [1.11-3.39]; p = 0.026) and unprovoked PE (HR 3.56; 95% CI [1.79-7.07]; p = 0.00051) as independent risk factors for recurrent VTE whereas extended anticoagulation therapy (HR 0.19; 95% CI [0.07-0.55]; p = 0.00014) was associated with a low risk of recurrence. **Conclusion:** The results suggest that RPVO is an independent risk factor of recurrent VTE after a first PE.

## **INTRODUCTION**

A substantial proportion of patients with venous thromboembolism (VTE) experience new events after anticoagulant treatment is withdrawn. This is especially true for patients with unprovoked VTE who carry a risk of recurrent VTE of approximately 10% after one year [1], [2]. Even patients with provoked VTE have a substantial risk of recurrent VTE over the long-term, with a recurrence rate of 4.2% per patient-year in patients with transient non-surgical risk factors [3]. Many attempts have been made to identify risk-factors for recurrent VTE [4]–[7].

Residual venous obstruction assessed by ultrasound has been identified as an independent predictor of recurrence after deep vein thrombosis (DVT). However, little is known about the role of residual pulmonary vascular obstruction (RPVO) assessed by ventilation/perfusion lung scan (V/Q lung scan) as a risk factor for recurrence after an acute episode of pulmonary embolism (PE) [8], [9]. Up to 50% of patients with PE present perfusion defects on V/Q lung scan after anticoagulant treatment, suggesting RPVO [10], [11]. RPVO is associated with increased pulmonary artery pressure, a shortened 6 min walking distance, and a higher dyspnea score [12]. However, it is still unclear whether RPVO is associated with the risk of recurrent VTE after an acute episode of PE. The aim of the present study was to assess whether RPVO is associated with an increase in the risk of VTE recurrence.

## **PATIENTS AND METHODS**

### **Study design and setting**

This study was a single-center, prospective, observational cohort study conducted in an academic teaching hospital (Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris). The study was approved by the local ethics committee. All patients provided written informed consent before enrolment. Patient data were recorded on a database hosted in one computer.

### **Patients**

Consecutive patients aged over 18 years were included at the intended end of the anticoagulation treatment if they (1) survived a first episode of objectively confirmed symptomatic PE, (2) received at least three months of anticoagulant therapy, and (3) did not present any recurrence during this period. Patients underwent a planar V/Q lung scan at the day of inclusion. Index PE was objectively confirmed by (1) spiral computed tomography (spiral CT) showing at least multiple sub-segmental PE, or (2) high probability V/Q lung scan according to the PLOPED criteria, or (3) proximal lower limb DVT on compression ultrasonography (CUS) in patients with a high clinical probability of PE [13]. The following index PE data were collected at inclusion: demographics, comorbid conditions, risk factors for VTE, initial pulmonary vascular obstruction using validated scores according to the diagnostic procedure [14], [15], and initial therapeutic management. The index PE was considered to be provoked if it occurred in the presence of one of the following major risk factors: active cancer, surgery, trauma, or immobilization > 3 months. PE occurring in the absence of major risk factors or hormonal therapy, including oral contraceptives and hormonal replacement therapy, was considered to be unprovoked.

### **Assessment of Residual Pulmonary Vascular Obstruction on V/Q lung scan**

Each perfusion scan was compared to ventilation scan to identify mismatched defects and then scored as previously described by an investigator blinded to the occurrence of recurrent VTE. Briefly, (1) each lobe was assigned a weight, based on the regional distribution of pulmonary blood flow: right lower lobe 25%, right middle lobe 12%, right upper lobe 18%, left lower lobe 20%, lingula 12%, and left upper lobe 13%; (2) a semi-quantitative perfusion score (0, 0.25, 0.5, 0.75 or 1) was estimated for each lobe from the film density in the anterior, posterior, and oblique views by comparing them with the photodensity of an apparently normally perfused area; (3) each lobar perfusion score was then calculated by multiplying the weight by the perfusion score; (4) the overall perfusion score was determined by summing the six separate lobar perfusion scores; and (5) the percentage of vascular obstruction was then calculated as  $(1 - \text{overall perfusion score}) \times 100$  [15]. To consider mismatched defect as a residual pulmonary vascular obstruction, V/Q lung has been compared to the index PE diagnostic test in order to check that the mismatched defect did not concern a new pulmonary vascular segment. A residual perfusion defect was defined as a pulmonary vascular obstruction >10%. This 10% threshold corresponds to an amputation of at least two pulmonary segments and to the minimal obstruction defining a high-probability result on diagnostic V/Q lung scans [12], [16].

### **Anticoagulant treatment, long-term follow, up and recurrence**

The duration of treatment was at the discretion of the physician in charge of the patient. Our standard practice was to treat provoked PE for at least three months and unprovoked PE for six months. Extended treatment was defined as anticoagulant

therapy given for more than six months. Patients included in the study were trained to quickly detect new symptoms and return to the hospital for diagnostic assessment. Patients lost to follow-up were individually contacted by phone and by post. In the absence of an answer, we contacted their general practitioner and the Civil Register to define if the patient was living or deceased.

### **End-point**

The primary endpoint was the occurrence of an objectively confirmed symptomatic VTE or death due to PE. A diagnosis of recurrent thromboembolism was confirmed by a new thrombus in a different segmental area than for the initial PE on spiral CT, a new perfusion defect on V/Q lung scan, or detection of proximal lower limb DVT in a new territory by CUS. For the recurrence of ipsilateral DVT, an increase of > 4 mm relative to the residual diameter was also considered to be a recurrence for popliteal and femoral veins. Sudden unexplained death was considered to be due to PE. All events were adjudicated by one of the investigators, blinded to the V/Q lung scan results.

### **Statistical analysis**

Quantitative variables were expressed as median values and 25th-75th percentiles. Categorical variables were expressed as absolute numbers and percentages. Non-parametric Mann–Whitney U test or Fisher’s exact test were used as appropriate to compare continuous or categorical variables between the two groups with and without recurrence of thromboembolism. Recurrence-free survival was the time from the day of the V/Q lung scan to the date of VTE recurrence or the date of the most recent follow-up visit, if no proven VTE recurrence occurred.

Thromboembolic recurrence-free survival distributions were estimated by the Kaplan-Meier method and compared using the Log-Rank test. The impact of potential prognostic factors (including RPVO) on thromboembolic recurrence-free survival was evaluated by including these factors in univariate cox proportional hazard models. Covariates were modeled as binary or categorical as appropriate. The proportional hazards assumption was assessed using the scaled Schoenfeld residuals. Variables considered to be clinically relevant and yielding p values of less than 0.1 by univariate analysis were retained for multivariate model analysis. The objective of the multivariate analysis was to assess the independent effect of perfusion defect on thromboembolic recurrence-free survival. The added value of perfusion defect in the multivariate model was evaluated using a likelihood ratio test: likelihood scores of the model evaluated with and without perfusion defect were compared, considering that lower likelihood scores indicate better fitting models. All testing was two-tailed and  $p < 0.05$  was considered to be statistically significant. Statistical analysis was performed using R software version 3.2.2.

## **RESULTS**

### **Population (Figure 1, Table 1)**

From January 1999 to January 2009, 1244 patients with PE were admitted to our institution, of which 868 were for a first episode of PE . Finally, 321 patients were included and had a V/Q lung scan assessment. Eleven patients (3.4%) were lost to follow-up. Thus, we analyzed 310 patients .

The median duration of anticoagulant treatment was 6.5 months (inter-quartile range (IQR) 6.1-9.2). Fifty-one patients (16%) received extended anticoagulant treatment for one or more of the following reasons: atrial fibrillation or other cardiac disease (n = 17), cancer (n = 7), major thrombophilia (n = 4), chronic thromboembolic pulmonary hypertension (n = 7), RPVO (n = 7), major residual vein obstruction (n = 1), clinical trial (n = 3), or other (n = 5).

### **V/Q lung scan results**

The median time between initial PE diagnosis and V/Q lung scan was 8.7 months (IQR 7.2-12.4). A residual perfusion defect was observed in 60 patients (19%; 95% confidence interval (CI), 15.5%- 24.3%). Table 2 presents the characteristics of patients with or without RPVO. Patients with RPVO > 10% were older than those without (median age 71 y vs 57 y,  $p < 0.00001$ ), had had a vascular obstruction > 10% at the time of the initial PE (87% vs 70%,  $p=0.012$ ), and were likely to receive more prolonged anticoagulant therapy (median duration 7.5 mo vs 6.4 mo,  $p = 0.0084$ ) than patients without RPVO .

### **Follow-up and VTE recurrences**

A total of 30 patients (9.7%) died during a median follow-up period of 51.3 months (IQR 47.8-57.2). The two main causes of death were sepsis (n = 8) and cancer (n =

7). Other deaths were due to chronic cardiac insufficiency (n = 3), chronic respiratory insufficiency (n = 3), chronic thromboembolic pulmonary hypertension (n = 2), stroke (n = 2), and other causes (n = 5).

A total of 66 patients (21.2%) experienced a recurrent VTE during follow-up; 65 were objectively confirmed and one was a sudden death attributed to recurrent fatal PE. The median time from inclusion to recurrence was 22.9 months (IQR 8.5-48.5). Recurrences took the form of PE in 46 cases (70.8%), including 16 events with associated DVT (24.6%), and isolated DVT in 19 cases (29.2%). Nineteen (29%) patients with recurrence presented RPVO whereas 41 (17%) patients without recurrence had RPVO (p=0.035). The risk of recurrent VTE was non-significantly higher in patients with RPVO than in those without residual vascular obstruction on lung scan (p = 0.058 by the Log-Rank test) (Figure 2). However, RPVO was significantly associated with a higher risk of recurrent VTE (p = 0.026) when we adjusted the risk of recurrent VTE for risk factors (major, minor, cancer or unprovoked), age, and treatment duration in the Cox model analysis (Figure 3).

#### **Risk factors for VTE recurrence**

In the adjusted cox model regression analysis, RPVO (HR 1.94; 95% CI, 1.11-3.39) and unprovoked PE (HR 3.56; 95% CI, 1.79-7.07) were independently associated with a higher risk of recurrent VTE whereas prolonged anticoagulant treatment (HR 0.19; 95%CI 0.07-0.55) was associated with a lower recurrence risk (Table 3). The association between RPVO and VTE recurrence remained the same in the subgroup analysis of patients with unprovoked PE (n = 153) and of PE without extended treatment (n = 259) (tables S1 and S2, supplementary appendix).

## **DISCUSSION:**

The present study confirms that about 20% of patients have significant residual pulmonary vascular obstruction after a first PE. This study also identifies perfusion defects and unprovoked VTE as independent risk factors for recurrent VTE whereas prolonged anticoagulant treatment was associated with a lower risk of recurrence.

The rate of recurrent VTE in the present study is in accordance with previous data [17]. Our study also confirms that recurrent VTE after PE takes the form of a new PE in most cases [1], [18].

As previously reported, unprovoked VTE was identified as a major risk factor for recurrent VTE [19] and prolonged anticoagulant treatment was associated with a lower risk of recurrence [1]. Recurrent VTE was also less frequent in women when the index PE occurred during hormonal therapy, as previously reported [7], [20].

Several previous studies provided contrasting findings for the role of residual perfusion defects as a risk-factor for recurrent VTE. Poli et al. reported that residual perfusion defects on lung scintigraphy were not predictive of recurrence [21]. Several differences in study design may account for the different conclusions between this and the present study. Alhadad et al. retrospectively identified residual perfusion defects, when assessed by tomographic V/Q lung scan (SPECT), as a risk factor for VTE recurrences [22] Two additional studies did not find an association between residual obstruction, assessed by computed tomography pulmonary angiography, and recurrent VTE [23], [24]. The use of computed tomography instead of lung scanning makes the comparisons between these studies and the present findings difficult because V/Q scintigraphy seems to be more accurate in detecting RPVO than CTPA [25]–[28]

Interestingly, RPVO remains independently associated with an increased risk for VTE recurrence when patients with extended anticoagulation treatment for CTEPH or RPVO were excluded (table S2).

Residual pulmonary perfusion defects are probably due to unresolved clots in the pulmonary arteries, as observed for residual vein obstruction after DVT. Residual vein obstruction was found to be an independent risk factor of recurrent VTE in a recent patient level meta-analysis [8]. Little is known about the mechanism that leads from residual vascular obstruction to recurrent VTE. It remains unclear if residual obstruction favors *in situ* recurrence or is a surrogate marker of a hypercoagulable state, as suggested by the high risk of contra-lateral recurrent DVT in patients with residual vein obstruction. A recent study provides data about abnormal fibrinogen properties in patients with post thrombotic syndrome after DVT, showing a trend for a denser fibrin network in these patients [26]. Denser clots, composed of thinner fibrin fibers, usually have a lower lysis rate because of restrained accessibility to the fibrinolytic enzyme site. Perfusion defects have not been associated with a pro-coagulant state [12] but could be associated with resistance to fibrinolysis in patients with PE, as previously suggested [27]. Indeed, impaired fibrinolytic capacity has been recently reported in patients with previous PE [28] in patients with RPVO [29] and resistance to lysis is well documented in some patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension [30].

Our study has several strengths. First, it analyzes a large cohort of more than 300 patients with a first episode of PE. Second, it included a long follow-up period and all recurrences were adjudicated. Third, RPVO was assessed by V/Q lung scan using a

standardized and validated score. Last, COPD patients made up only 3% of the cohort, and could not have led to an overestimation of the prevalence of RPVO in our cohort.

The present study also has some limitations. First, it was a single center study and clinicians in charge of patients were not blinded to the V/Q scan results. This explains why some patients with RPVO had prolonged anticoagulant treatment. However, the results were unchanged after adjustment for the duration of anticoagulant therapy. Residual vein obstruction and post phlebotic syndrome have not been assessed in our cohort although they are well documented recurrence risk factors for DVT patients [8]. D-Dimers were not available for all patients and we were not able to compute the various scores proposed for estimating the risk of recurrent VTE [4], [5], [7]. Consequently, we did not assess the potential incremental value of RPVO when combined with existing scores. Last, the time between PE diagnosis and V/Q lung scan varied between patients and could have influenced the relation between RPVO and the risk of VTE recurrence.

**CONCLUSION:**

Residual perfusion defects on V/Q lung scan are observed in approximately 20% of patients after a first episode of PE and is an independent risk factor of VTE recurrence. This new finding needs to be confirmed in other settings before it can be used to select patients at high risk of recurrence.

## **REFERENCES:**

- [1] F. Couturaud, O. Sanchez, G. Pernod, P. Mismetti, P. Jegou, E. Duhamel, K. Provost, C. B. dit Sollier, E. Presles, P. Castellant, F. Parent, P.-Y. Salaun, L. Bressollette, M. Nonent, P. Lorillon, P. Girard, K. Lacut, M. Guégan, J.-L. Bosson, S. Laporte, C. Leroyer, H. Décousus, G. Meyer, D. Mottier, and PADIS-PE Investigators, "Six Months vs Extended Oral Anticoagulation After a First Episode of Pulmonary Embolism: The PADIS-PE Randomized Clinical Trial," *JAMA*, vol. 314, no. 1, pp. 31–40, Jul. 2015.
- [2] G. Agnelli, H. R. Buller, A. Cohen, M. Curto, A. S. Gallus, M. Johnson, U. Masiukiewicz, R. Pak, J. Thompson, G. E. Raskob, J. I. Weitz, and AMPLIFY Investigators, "Oral apixaban for the treatment of acute venous thromboembolism," *N. Engl. J. Med.*, vol. 369, no. 9, pp. 799–808, Aug. 2013.
- [3] A. Iorio, C. Kearon, E. Filippucci, M. Marcucci, A. Macura, V. Pengo, S. Siragusa, and G. Palareti, "Risk of recurrence after a first episode of symptomatic venous thromboembolism provoked by a transient risk factor: a systematic review," *Arch. Intern. Med.*, vol. 170, no. 19, pp. 1710–1716, Oct. 2010.
- [4] M. A. Rodger, S. R. Kahn, P. S. Wells, D. A. Anderson, I. Chagnon, G. Le Gal, S. Solymoss, M. Crowther, A. Perrier, R. White, L. Vickars, T. Ramsay, M. T. Betancourt, and M. J. Kovacs, "Identifying unprovoked thromboembolism patients at low risk for recurrence who can discontinue anticoagulant therapy," *CMAJ Can. Med. Assoc. J. J. Assoc. Medicale Can.*, vol. 179, no. 5, pp. 417–426, Aug. 2008.
- [5] S. Eichinger, G. Heinze, L. M. Jandeck, and P. A. Kyrle, "Risk assessment of recurrence in patients with unprovoked deep vein thrombosis or pulmonary embolism: the Vienna prediction model," *Circulation*, vol. 121, no. 14, pp. 1630–1636, Apr. 2010.
- [6] J. Douketis, A. Tosetto, M. Marcucci, T. Baglin, M. Cushman, S. Eichinger, G. Palareti, D. Poli, R. C. Tait, and A. Iorio, "Patient-level meta-analysis: effect of measurement timing, threshold, and patient age on ability of D-dimer testing to assess recurrence risk after unprovoked venous thromboembolism," *Ann. Intern. Med.*, vol. 153, no. 8, pp. 523–531, Oct. 2010.
- [7] A. Tosetto, A. Iorio, M. Marcucci, T. Baglin, M. Cushman, S. Eichinger, G. Palareti, D. Poli, R. C. Tait, and J. Douketis, "Predicting disease recurrence in patients with previous unprovoked venous thromboembolism: a proposed prediction score (DASH)," *J. Thromb. Haemost. JTH*, vol. 10, no. 6, pp. 1019–1025, Jun. 2012.
- [8] M. P. Donadini, W. Ageno, E. Antonucci, B. Cosmi, M. J. Kovacs, G. Le Gal, P. Ockelford, D. Poli, P. Prandoni, M. Rodger, G. Saccullo, S. Siragusa, L. Young, M. Bonzini, M. Caprioli, F. Dentali, A. Iorio, and J. D. Douketis, "Prognostic significance

of residual venous obstruction in patients with treated unprovoked deep vein thrombosis: a patient-level meta-analysis," *Thromb. Haemost.*, vol. 111, no. 1, pp. 172–179, Jan. 2014.

[9] M. Carrier, M. A. Rodger, P. S. Wells, M. Righini, and G. LE Gal, "Residual vein obstruction to predict the risk of recurrent venous thromboembolism in patients with deep vein thrombosis: a systematic review and meta-analysis," *J. Thromb. Haemost. JTH*, vol. 9, no. 6, pp. 1119–1125, Jun. 2011.

[10] M. Nijkeuter, M. M. C. Hovens, B. L. Davidson, and M. V. Huisman, "Resolution of thromboemboli in patients with acute pulmonary embolism: a systematic review," *Chest*, vol. 129, no. 1, pp. 192–197, Jan. 2006.

[11] M. Miniati, S. Monti, M. Bottai, E. Scoscia, C. Bauleo, L. Tonelli, A. Dainelli, and C. Giuntini, "Survival and restoration of pulmonary perfusion in a long-term follow-up of patients after acute pulmonary embolism," *Medicine (Baltimore)*, vol. 85, no. 5, pp. 253–262, Sep. 2006.

[12] O. Sanchez, D. Helley, S. Couchon, A. Roux, A. Delaval, L. Trinquart, M.-A. Collignon, A.-M. Fischer, and G. Meyer, "Perfusion defects after pulmonary embolism: risk factors and clinical significance," *J. Thromb. Haemost. JTH*, vol. 8, no. 6, pp. 1248–1255, Jun. 2010.

[13] Authors/Task Force Members, S. Konstantinides, A. Torbicki, G. Agnelli, N. Danchin, D. Fitzmaurice, N. Galiè, J. S. R. Gibbs, M. Huisman, M. Humbert, N. Kucher, I. Lang, M. Lankeit, J. Lekakis, C. Maack, E. Mayer, N. Meneveau, A. Perrier, P. Pruszczyk, L. H. Rasmussen, T. H. Schindler, P. Svitil, A. V. Noordegraaf, J. L. Zamorano, M. Zompatori, and Authors/Task Force Members, "2014 ESC Guidelines on the diagnosis and management of acute pulmonary embolism: The Task Force for the Diagnosis and Management of Acute Pulmonary Embolism of the European Society of Cardiology (ESC) Endorsed by the European Respiratory Society (ERS)," *Eur. Heart J.*, Aug. 2014.

[14] S. D. Qanadli, M. El Hajjam, A. Vieillard-Baron, T. Joseph, B. Mesurolle, V. L. Oliva, O. Barré, F. Bruckert, O. Dubourg, and P. Lacombe, "New CT index to quantify arterial obstruction in pulmonary embolism: comparison with angiographic index and echocardiography," *AJR Am. J. Roentgenol.*, vol. 176, no. 6, pp. 1415–1420, Jun. 2001.

[15] G. Meyer, M. A. Collignon, F. Guinet, A. A. Jeffrey, L. Barritault, and H. Sors, "Comparison of perfusion lung scanning and angiography in the estimation of vascular obstruction in acute pulmonary embolism," *Eur. J. Nucl. Med.*, vol. 17, no. 6–8, pp. 315–319, 1990.

[16] PIOPED Investigators, "Value of the ventilation/perfusion scan in acute pulmonary embolism. Results of the prospective investigation of pulmonary embolism diagnosis (PIOPED)," *JAMA*, vol. 263, no. 20, pp. 2753–2759, May 1990.

- [17] P. Prandoni, F. Noventa, A. Ghirarduzzi, V. Pengo, E. Bernardi, R. Pesavento, M. Iotti, D. Tormene, P. Simioni, and A. Pagnan, "The risk of recurrent venous thromboembolism after discontinuing anticoagulation in patients with acute proximal deep vein thrombosis or pulmonary embolism. A prospective cohort study in 1,626 patients," *Haematologica*, vol. 92, no. 2, pp. 199–205, Feb. 2007.
- [18] T. Baglin, J. Douketis, A. Tosetto, M. Marcucci, M. Cushman, P. Kyrle, G. Palareti, D. Poli, R. C. Tait, and A. Iorio, "Does the clinical presentation and extent of venous thrombosis predict likelihood and type of recurrence? A patient-level meta-analysis," *J. Thromb. Haemost. JTH*, vol. 8, no. 11, pp. 2436–2442, Nov. 2010.
- [19] T. Baglin, R. Luddington, K. Brown, and C. Baglin, "Incidence of recurrent venous thromboembolism in relation to clinical and thrombophilic risk factors: prospective cohort study," *Lancet Lond. Engl.*, vol. 362, no. 9383, pp. 523–526, Aug. 2003.
- [20] C. Kearon, S. M. Stevens, and J. A. Julian, "D-Dimer Testing in Patients With a First Unprovoked Venous Thromboembolism," *Ann. Intern. Med.*, vol. 162, no. 9, p. 671, May 2015.
- [21] D. Poli, C. Cenci, E. Antonucci, E. Grifoni, C. Arcangeli, D. Prisco, R. Abbate, and M. Miniati, "Risk of recurrence in patients with pulmonary embolism: predictive role of D-dimer and of residual perfusion defects on lung scintigraphy," *Thromb. Haemost.*, vol. 109, no. 2, pp. 181–186, Feb. 2013.
- [22] A. Alhadad, M. Miniati, H. Alhadad, A. Gottsäter, and M. Bajc, "The value of tomographic ventilation/perfusion scintigraphy (V/PSPECT) for follow-up and prediction of recurrence in pulmonary embolism," *Thromb. Res.*, vol. 130, no. 6, pp. 877–881, Dec. 2012.
- [23] P. L. den Exter, J. van Es, L. J. M. Kroft, P. M. G. Erkens, R. A. Douma, I. C. M. Mos, G. Jonkers, M. M. C. Hovens, M. F. Durian, H. ten Cate, L. F. M. Beenen, P. W. Kamphuisen, M. V. Huisman, and Prometheus Follow-Up Investigators, "Thromboembolic resolution assessed by CT pulmonary angiography after treatment for acute pulmonary embolism," *Thromb. Haemost.*, vol. 114, no. 1, pp. 26–34, Jul. 2015.
- [24] R. Pesavento, A. Visonà, S. Villalta, G. Vescovo, S. Cuppini, G. Beltramello, D. Ceccato, L. Filippi, B. Zalunardo, P. Pauletto, A. D. Pozza, G. De Conti, A. C. Frigo, and P. Prandoni, "Residual pulmonary obstruction and the risk of late complications in patients with pulmonary embolism," *Thromb. Res.*, vol. 137, pp. 228–230, Jan. 2016.
- [25] N. Tunariu, S. J. R. Gibbs, Z. Win, W. Gin-Sing, A. Graham, P. Gishen, and A. Al-Nahhas, "Ventilation-perfusion scintigraphy is more sensitive than multidetector CTPA in detecting chronic thromboembolic pulmonary disease as a treatable cause

of pulmonary hypertension," *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.*, vol. 48, no. 5, pp. 680–684, May 2007.

[26] J. van Es, R. A. Douma, P. W. Kamphuisen, V. E. A. Gerdes, P. Verhamme, P. S. Wells, H. Bounameaux, A. W. A. Lensing, and H. R. Büller, "Clot resolution after 3 weeks of anticoagulant treatment for pulmonary embolism: comparison of computed tomography and perfusion scintigraphy," *J. Thromb. Haemost. JTH*, vol. 11, no. 4, pp. 679–685, Apr. 2013.

[27] F. A. Klok, T. van der Hulle, P. L. den Exter, M. Lankeit, M. V. Huisman, and S. Konstantinides, "The post-PE syndrome: a new concept for chronic complications of pulmonary embolism," *Blood Rev.*, vol. 28, no. 6, pp. 221–226, Nov. 2014.

[28] B. Cosmi, M. Nijkeuter, M. Valentino, M. V. Huisman, L. Barozzi, and G. Palareti, "Residual emboli on lung perfusion scan or multidetector computed tomography after a first episode of acute pulmonary embolism," *Intern. Emerg. Med.*, vol. 6, no. 6, pp. 521–528, Dec. 2011.

[29] A. C. Bouman, H. McPherson, Y. W. Cheung, M. Ten Wolde, H. Ten Cate, R. a. S. Ariëns, and A. J. Ten Cate-Hoek, "Clot structure and fibrinolytic potential in patients with post thrombotic syndrome," *Thromb. Res.*, vol. 137, pp. 85–91, Jan. 2016.

[30] A. P. Cellai, D. Lami, E. Antonucci, C. Fiorillo, M. Becatti, B. Olimpieri, D. Bani, E. Grifoni, C. Cenci, R. Marcucci, L. Mannini, D. Poli, R. Abbate, and D. Prisco, "Fibrinolytic inhibitors and fibrin characteristics determine a hypofibrinolytic state in patients with pulmonary embolism," *Thromb. Haemost.*, vol. 109, no. 3, pp. 565–567, Mar. 2013.

[31] M. Miniati, C. Fiorillo, M. Becatti, S. Monti, M. Bottai, C. Marini, E. Grifoni, B. Formichi, C. Bauleo, C. Arcangeli, D. Poli, P. A. Nassi, R. Abbate, and D. Prisco, "Fibrin resistance to lysis in patients with pulmonary hypertension other than thromboembolic," *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 181, no. 9, pp. 992–996, May 2010.

[32] D. Lami, A. P. Cellai, E. Antonucci, C. Fiorillo, M. Becatti, E. Grifoni, C. Cenci, R. Marcucci, L. Mannini, M. Miniati, R. Abbate, and D. Prisco, "Residual perfusion defects in patients with pulmonary embolism are related to impaired fibrinolytic capacity," *Thromb. Res.*, vol. 134, no. 3, pp. 737–741, Sep. 2014.

[33] T. A. Morris, J. J. Marsh, P. G. Chiles, M. M. Magaña, N.-C. Liang, X. Soler, D. J. Desantis, D. Ngo, and V. L. Woods, "High prevalence of dysfibrinogenemia among patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension," *Blood*, vol. 114, no. 9, pp. 1929–1936, Aug. 2009.

## TABLES AND FIGURES

**Table 1: Characteristics of the study population at onset of the index pulmonary embolism according to recurrent venous thromboembolism during follow-up**

Variable	All (n = 310)	Recurrent VTE		p
		No (n = 244)	Yes (n = 66)	
Age, years, median (25 <sup>th</sup> -75 <sup>th</sup> )	61 (43-74)	59 (39-75)	66 (52-72)	0.34
Male, n (%)	127 (41%)	93 (38%)	34 (52%)	0.067
<b>Comorbid conditions and clinical risk factors for VTE, n (%)</b>				
Chronic cardiovascular disease	58 (19%)	42 (17%)	16 (24%)	0.21
Chronic lung disease	11 (4%)	9 (4%)	2 (3%)	1.0
Family history of VTE	76 (25%)	61 (25%)	15 (23%)	0.75
<b>Risk factor for VTE</b>				
Temporary major risk factor	80 (26%)	69 (11%)	11 (17%)	0.015
Hormonal therapy	53 (17%)	47 (19%)	6 (9%)	
Active cancer	24 (8%)	18 (7%)	6 (10%)	
Unprovoked PE	153 (49%)	110 (45%)	43 (65%)	
<b>Lower limb ultrasound, n (%)</b>				
Proximal DVT	108 (36%)	88 (37%)	20 (31%)	0.67
Distal DVT	40 (13%)	31 (13%)	9 (14%)	
<b>Treatment of the index PE event</b>				
Duration of anticoagulant treatment, months, median (25 <sup>th</sup> -75 <sup>th</sup> )	6.5 (6.1-9.5)	6.5 (6.1-10.8)	6.5 (6.1-7.9)	0.78
Extended anticoagulant treatment	51 (16%)	47 (19%)	4 (6%)	0.0085
Fibrinolysis	10 (5%)	10 (7%)	0 (0%)	0.12
Inferior vena cava filter	9 (5%)	8 (6%)	1 (2%)	0.69
<b>Initial pulmonary vascular obstruction at the time of PE diagnosis, n (%)</b>				
≤ 10%	52 (17%)	43 (18%)	9 (13%)	0.45
> 10%	226 (73%)	173 (71%)	53 (80%)	
NA	32 (10%)	28 (11%)	4 (6%)	
<b>Residual pulmonary vascular obstruction at inclusion on V/Q scan, n (%)</b>				
≤ 10%	250 (81%)	203 (83%)	47 (71%)	0.035
> 10%	60 (19%)	41 (17%)	19 (29%)	

DVT: deep vein thrombosis; PE: pulmonary embolism; VTE: venous thromboembolism; V/Q: ventilation/perfusion

**Table 2. Characteristics of the study population at onset of the index pulmonary embolism according to RPVO at V/Q scan assessment.**

Variable	All (n = 310)	Residual pulmonary vascular obstruction on V/Q lung scan >10%		p
		No (n = 250)	Yes (n = 60)	
Age, years, median (25 <sup>th</sup> -75 <sup>th</sup> )	61 (43-74)	57 (39-73)	71 (58-79)	<0.0001
Male, n (%)	127 (41%)	107 (43%)	20 (33%)	0.19
<b>Comorbid conditions and clinical risk factors for VTE, n (%)</b>				
Chronic cardiovascular disease	58 (19%)	48 (19%)	10 (17%)	0.71
Chronic lung disease	11 (4%)	8 (3%)	3 (5%)	0.46
Risk factor of VTE				
Active cancer	24 (8%)	21 (8%)	3 (5%)	0.11
Major risk factor	80 (26%)	67 (27%)	13 (22%)	
Hormonal use*	53 (17%)	47 (19%)	6 (10%)	
None, unprovoked PE	153 (49%)	115 (46%)	38 (63%)	
Family history of VTE	76 (25%)	64 (26%)	12 (20%)	0.41
<b>Lower limb ultrasound, n (%)</b>				
Proximal DVT	108 (36%)	80 (33%)	28 (48%)	0.094
Distal DVT	40 (13%)	34 (14%)	6 (10%)	
<b>Treatment of the index PE event</b>				
Duration of anticoagulation, months, median (25 <sup>th</sup> -75 <sup>th</sup> )	6.5 (6.1-9.5)	6.4 (6.1-7.9)	7.5 (6.1-40.0)	0.00084
Fibrinolysis	10 (5%)	8 (5%)	2 (6%)	1.0
Inferior vena cava filter	9 (5%)	9 (6%)	0 (0%)	0.21
<b>Initial pulmonary vascular obstruction, n (%)</b>				
≤ 10%	52 (17%)	48 (19%)	4 (7%)	0.012
> 10%	226 (73%)	174 (70%)	52 (87%)	
NA	32 (10%)	28 (11%)	4 (7%)	

\*Either hormonal contraception or hormone replacement therapy

**Table 3: Risk factors for recurrent venous thromboembolism.**

Cox proportional hazards regression					
	n	Unadjusted analysis		Adjusted Analysis	
		HR (95%CI)	P	HR (95%CI)	P
Residual pulmonary vascular obstruction on V/Q lung scan >10%	60 (19%)	1.67 (0.98-2.84)	0.058	1.94 (1.11-3.39)	0.026
Extended anticoagulant treatment	51 (16%)	0.28 (0.10-0.78)	0.0093	0.19 (0.07-0.55)	0.00014
Risk factor for VTE					
- Major risk factor *	80 (26%)	REF	0.0066	REF	0.00051
- Active cancer	24 (8%)	1.63 (0.61-4.42)		2.31 (0.84-6.32)	
- Hormonal therapy <sup>£</sup>	53 (17%)	1.01 (0.37-2.74)		1.27 (0.46-3.52)	
- Unprovoked	153 (49%)	2.63 (1.35-5.11)		3.56 (1.79-7.07)	
Age (years)					
- <45	82 (26%)	REF	0.017	REF	0.019
-45-60	65 (21%)	1.70 (0.76-3.78)		1.29 (0.58-2.90)	
-60-75	86 (28%)	2.65 (1.29-5.44)		2.15 (1.03-4.50)	
- >75	77 (25%)	1.21 (0.52-2.81)		0.79 (0.32-1.92)	
D-dimers					
- <500	140 (59%)	REF	0.44		
- ≥500	99 (41%)	1.24 (0.71-2.18)			

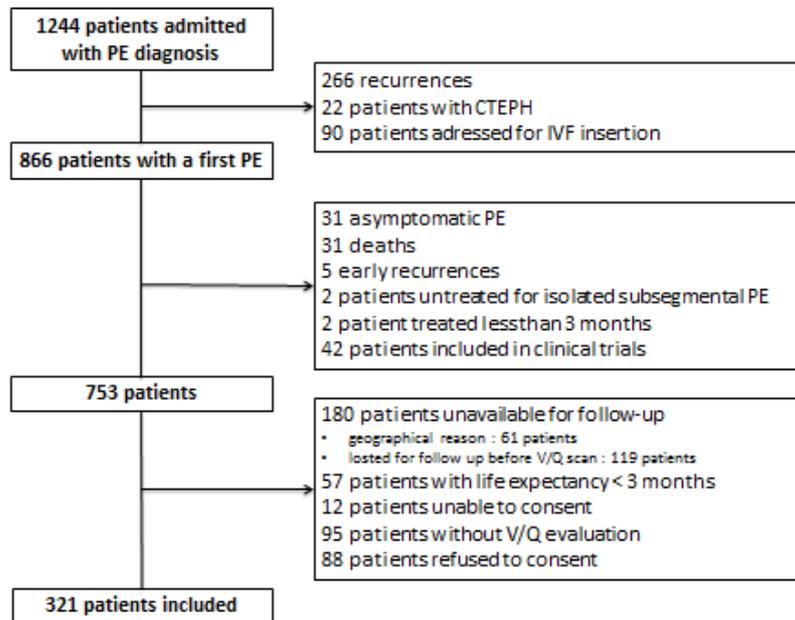
VTE: venous thromboembolism; V/Q: ventilation/perfusion; PE: pulmonary embolism

\* Major risk factors were surgery, trauma, or immobilization in the past three months

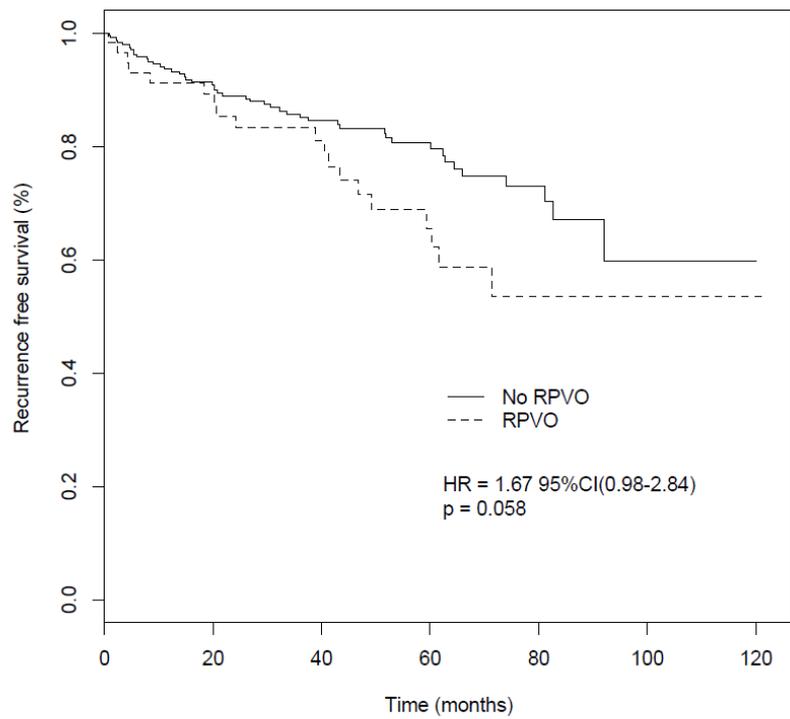
<sup>£</sup> Hormonal therapy: contraception/Hormonal replacement therapy

<sup>µ</sup> Unprovoked PE were PE that occurred in the absence of a major risk factor, cancer, or hormonal therapy

**Figure 1: Flow chart**

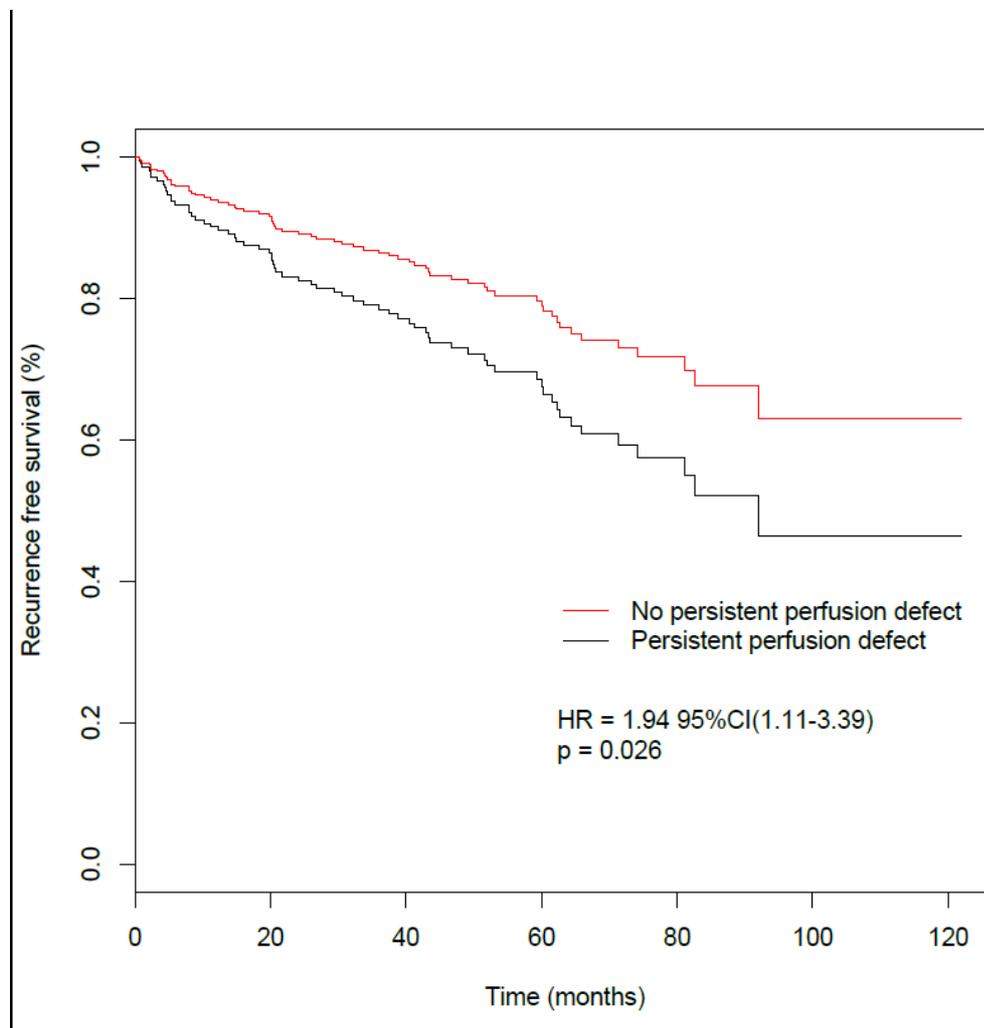


**Figure 2. Kaplan-Meier curves of VTE recurrence-free survival in patients with or without residual pulmonary vascular obstruction.**



RPVO	60	47	36	21	11	0
No RPVO	250	190	141	93	42	9

**Figure 3. Adjusted<sup>£</sup> survival curves for VTE recurrence-free survival depending on the presence or absence of residual pulmonary vascular obstruction.**



<sup>£</sup>Risk of recurrence was adjusted for VTE risk factors (major, minor, cancer or unprovoked), age, and treatment duration in the Cox model analysis”

SUPPLEMENTARY APPENDIX

**Table S1. Independent prognostic factors of recurrent VTE in multivariate analysis (Cox model) among patients with unprovoked VTE (n = 153).**

<b>Cox proportional hazards regression</b>			
		<b>Adjusted Analysis</b>	
	<b>n</b>	<b>HR (95% CI)</b>	<b>P</b>
Residual pulmonary vascular obstruction on V/Q lung scan >10%	38 (25%)	1.84 (0.94-3.63)	0.088
Extended anticoagulant treatment	33 (22%)	0.12 (0.03-0.50)	0.00010
Age (years)			
- <45	28 (18%)	REF	0.040
-45-60	31 (20%)	1.17 (0.94-3.65)	
-60-75	41 (27%)	1.77 (0.70-4.51)	
- >75	53 (35%)	0.53 (0.18-1.55)	

**Table S2. Independent prognostic factors of recurrent VTE in multivariate analysis (Cox model) among patients without extended anticoagulant treatment (n = 259)**

<b>Cox proportional hazards regression</b>			
		<b>Adjusted Analysis</b>	
	<b>n</b>	<b>HR (95% CI)</b>	<b>P</b>
Residual pulmonary vascular obstruction on V/Q lung scan >10%	40 (15%)	2.13 (1.21-3.75)	0.013
Risk factor for VTE			
- Major risk factor	72 (29%)	REF	0.00059
- Active cancer	16 (6%)	1.67 (0.53-5.30)	
- Hormonal therapy	49 (19%)	1.27 (0.45-3.52)	
- Unprovoked	120 (46%)	3.53 (1.77-7.04)	
Age (years)			
- <45	71 (27%)	REF	0.028
-45-60	63 (24%)	1.39 (0.60-3.19)	
-60-75	74 (29%)	2.26 (1.04-4.90)	
- >75	51 (20%)	0.86 (0.34-2.17)	

**Mise au point et validation d'un test combinant étude de la perméabilité et de l'accessibilité de l'épitope  $\beta$ 15-42 de la chaîne B $\beta$  du fibrinogène au sein de la fibrine.**

Session poster « Fibrinogen/fibrin/D-dimer II »  
Congrès de l'ISTH 2015 – Toronto - Canada  
Poster PO201-TUE

### **1. Rationnel**

Les patients atteints d'HTP-TEC associée à une dysfibrinogénémie (fibrinogène San Diego I-V) présentent des caillots résistants à l'action physiologique de la plasmine [107]. La même équipe a montré que la fibrine issue de ces dysfibrinogénémies présentait une désorganisation importante du réseau de fibres associée à d'autres altérations fonctionnelles, notamment une nette diminution de la perméabilité [166]. La fibrine interagit avec les cellules du compartiment endothélial par la séquence  $\beta$ 15-42 de sa chaîne B $\beta$  via deux récepteurs membranaires connus à ce jour, VE-Cadhérine et VLDL récepteur [125], [133]. La dimérisation ou le rapprochement de deux épitopes  $\beta$ 15-42 sont nécessaires à sa liaison aux récepteurs endothéliaux à l'origine de signaux proinflammatoires et proangiogéniques utiles à la résorption du caillot.

### **2. Hypothèse**

Au cours des dysfibrinogénémies associées à l'HTP-TEC et chez certains patients après une EP, les modifications de l'organisation des fibres de la fibrine seraient associées à une accessibilité différente de certaines séquences peptidiques d'intérêts, en particulier l'épitope  $\beta$ 15-42. Une accessibilité modifiée pourrait expliquer une altération des

interactions avec les cellules du compartiment endothélial et la dysrégulation des signaux de réparation des lésions de la paroi vasculaire après une EP pouvant conduire au remodelage de celle-ci.

### **3. Problématique**

Nous ne disposons que de 1mL de plasma congelé pour chacun des patients avec une première embolie pulmonaire de notre cohorte chez qui nous voulions réaliser plusieurs tests fonctionnels du fibrinogène. Pour réaliser toutes les analyses malgré la quantité limitée de solution de fibrinogène purifié (4mg/mL), nous avons décidé de combiner les tests de perméabilité et d'accessibilité de l'épitope  $\beta$ 15-42, en réalisant ce test sur la fibrine utilisée pour la perméabilité.

### **4. Méthodes**

#### **4.1. Fibrinogènes**

Le fibrinogène de deux volontaires sains a été utilisé pour mettre au point la méthode et servir de contrôle pour la validation de celle-ci sur des dysfibrinogénémies associées à l'HTP-TEC. Les fibrinogènes des sujets témoins étaient identiques : homozygotes pour les formes natives des chaînes  $B\beta$  et  $\gamma$  ; et hétérozygotes pour le polymorphisme  $A\alpha$  312 Thr/Ala de la chaîne  $A\alpha$ . Les fibrinogènes de deux patients atteints d'HTP-TEC présentant des mutations préalablement décrites (San Diego III [ $B\beta$  235 Pro/Leu] et San Diego V [ $A\alpha$  554 Arg/His]) ont été utilisés pour valider la technique. Les résultats obtenus sur la fibrine des témoins en milieu isotonique ont servi de contrôles négatifs et ceux obtenus en milieu hypertonique de contrôles positifs pour l'analyse des résultats sur les dysfibrinogénémies [130], [215].

#### 4.2. Polymérisation du fibrinogène et mesure de la perméabilité

La perméabilité a été réalisée selon le protocole décrit dans les méthodes et déjà publié par notre équipe . Le tampon isotonique était le tampon TN (50 nM, NaCl 150nM, pH 7,0) préparé par dilution au 1/10<sup>ième</sup> de la solution mère dans de l'eau ppi stérile. La polymérisation du fibrinogène a été réalisée en condition hypertonique en utilisant un tampon TN hypertonique obtenu par dilution 1/10<sup>ième</sup> de la solution mère du tampon TN (10X) dans une solution saline contenant 50% d'eau ppi stérile et 50% de sérum physiologique 9‰ stérile. La perméabilité a été mesurée sur des gels de fibrine de 300 µL de volume (1mg/mL) obtenus après deux heures d'incubation en présence de thrombine (5ui/mL) et de calcium (100mM) dans des colonnes d'extraction en phase solide dans une chambre humide.

#### 4.3. Marquage des anticorps à l'iode<sup>125</sup>

L'iode<sup>125</sup> (PerkinElmer #NEZ033A) était activé à l'aide d'un tube de Pierce contenant l'activateur de l'iode 125 (Thermo Scientific®) puis incorporé à 150 µg d'anticorps spécifique de la séquence peptidique β15-42. Le pourcentage d'incorporation à l'anticorps était déterminé après séparation de l'I<sup>125</sup> non lié à l'aide d'un filtre séparateur de seuil 30 KDa lors d'une centrifugation et était vérifié pour chacune des mesures d'accessibilité. La radioactivité (en cpm) était mesurée sur 10 µL des solutions pré et post centrifugation à l'aide d'un compteur γ. La formule suivante permettait le calcul du % d'incorporation = (radioactivité post centrifugation / (radioactivité pré-centrifugation - radioactivité post-centrifugation)) x100. Une incorporation >90% était jugée satisfaisante.

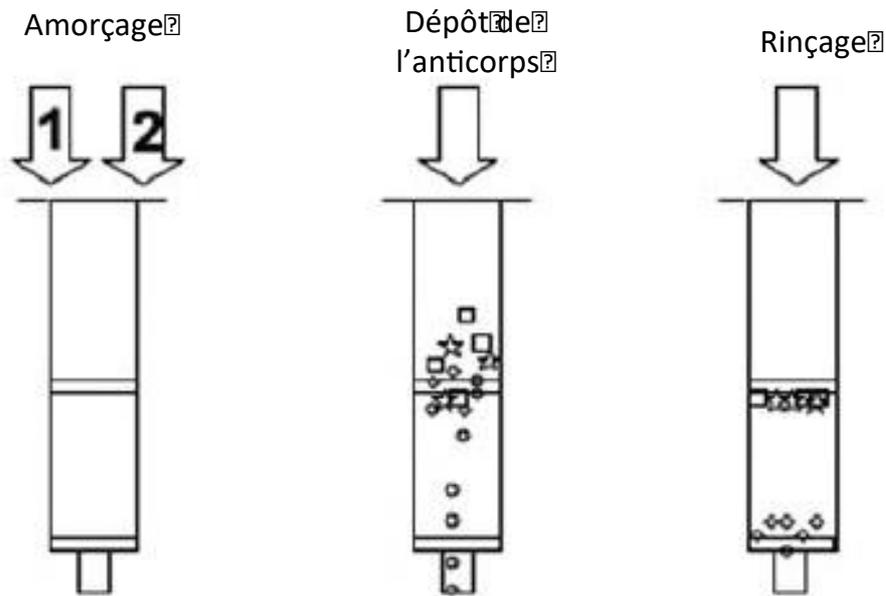
#### 4.4. Anticorps et récepteur utilisés

Deux anticorps ont été utilisés : l'anticorps ZFB (Hybritech Inc ) dirigé contre l'épitope  $\beta$ 15-42 et un anticorps de souris du même isotype IgG1 dirigé contre un antigène murin (MOPC-21, Sigma # M 9269 ). Le récepteur soluble de la VE-Cadhérine (R&D Systems #938-VC-050) a aussi été testé. Les anticorps étaient déposés en excès pour saturer les épitopes puis laver afin de les éliminer. La concentration retenue de ZFB pour l'étude (500  $\mu$ g/mL) a été déterminée sur la base des résultats publiés préalablement par notre équipe [216].

#### 4.5. Mesures de l'accessibilité

Immédiatement après la perméabilité, le tampon de perméation résiduel était pipeté de chaque colonne et le tampon encore présent dans le caillot (figure 25) était drainé spontanément pendant une heure, 100  $\mu$ L d'anticorps ZFB-I<sup>125</sup>, dilué au 1/5<sup>ème</sup> dans un tampon Tris (50mMTris pH7,5 ; 150mM NaCl) + BSA1mg/mL pour une concentration finale de 500  $\mu$ g/mL, étaient déposés dans la colonne sur le caillot. Après 30 minutes d'incubation, le caillot était rincé par 800  $\mu$ L de tampon Tris. La colonne était placée dans un tube hermétique puis la radioactivité (cpm) comptée à l'aide du compteur  $\gamma$ . La quantité totale d'anticorps marqués par l'I<sup>125</sup> fixée à la fibrine était calculée en tenant compte du % d'incorporation de l'iodine 125 à l'anticorps ZFB (quantité de ZFB lié ( $\mu$ g) = radioactivité de la colonne /radioactivité par  $\mu$ g de protéine où radioactivité/  $\mu$ g de protéine = (radioactivité pré-centrifugation x % d'incorporation)/quantité de protéines déposées). Toutes les expériences ont été dupliquées.

**Figure 25. Fixation des anticorps à la fibrine**

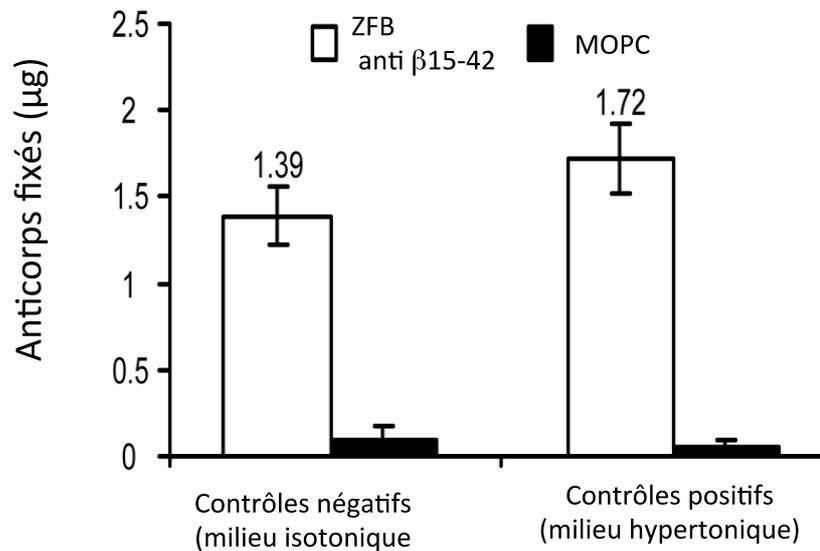


## 5. Résultats

### 5.1. Accessibilité des épitopes $\beta 15-42$ chez les sujets contrôles

La comparaison de la fixation des anticorps ZFB à la fibrine dans les deux conditions montre une accessibilité des épitopes  $\beta 15-42$  majorée de 24% en milieu hypertonique. (figure 26). Le coefficient de variation était de 6,4% (n=7). La très faible fixation d'anticorps murin MOPC correspondant à 2% de celle de l'anticorps ZFB, attestait de la spécificité de la fixation de ce dernier au gel de fibrine. La fixation de MOPC n'était pas affectée par les conditions de polymérisation de la fibrine. Les perméabilités mesurées en condition isotonique et hypertonique montraient une nette réduction de la perméabilité en milieu hypertonique ( $9,6 \pm 1$  Darcy contre  $5,8 \pm 2,4$  Darcy,  $p=0,04$ ).

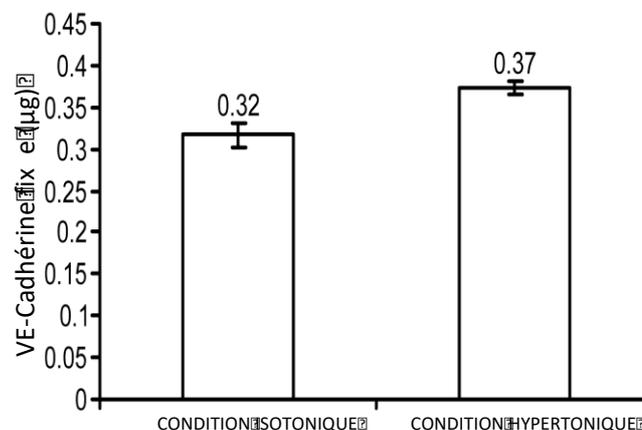
**Figure 26 : liaison de l'anticorps ZFB et de l'anticorps MOPC à la fibrine des sujets selon les conditions de polymérisation (contrôle 1).**



*5.2. Corrélation de l'accessibilité à la fixation de VE-Cadhérine (figure 27)*

Les fibrines des témoins ont été exposées à des récepteurs VE-Cadhérine solubles préalablement marqués à l'Iode<sup>125</sup>. La fixation était augmentée en condition hypertonique. La variation de fixation de VE-Cadhérine était moins importante (15%) que celle mise en évidence pour la fixation de l'anticorps ZFB. Néanmoins, cette différence entre les deux conditions était significative ( $p < 0,05$ ). La fixation de VE-Cadhérine était aussi spécifique, la fixation des anticorps MOPC ne représentait que 13% de celle de VE-Cadhérine.

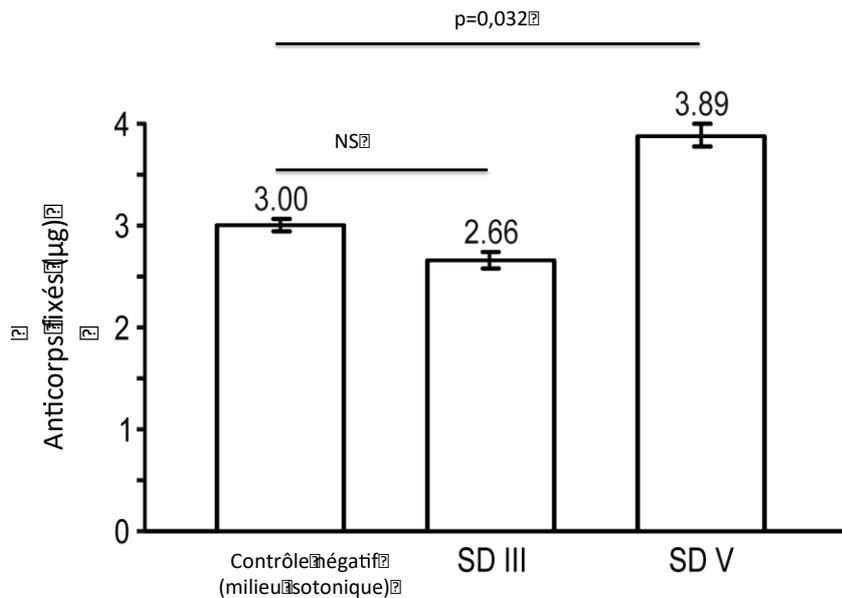
**Figure 27. Fixation de VE-Cadhérine à des fibrines de structure différente.**



5.3. Accessibilité des épitopes  $\beta$ 15-42 chez les patients porteurs de dysfibrinogénémie associée à l'HTP-TEC (figure 28)

L'accessibilité des épitopes  $\beta$ 15-42 était différente pour les deux mutations étudiées. Le fibrinogène San Diego III ne montrait pas d'augmentation de la fixation de ZFB. Le fibrinogène San Diego V montrait une nette augmentation de la fixation de ZFB par rapport au fibrinogène témoin (+36%,  $p=0,032$ ). Le tableau 12 rappelle les principales caractéristiques des fibrinogènes San Diego III et V décrites par Marsh et al [166].

**Figure 28. Accessibilité des épitopes  $\beta$ 15-42 chez les patients présentant des mutations San Diego III et San Diego V**



**Tableau 12. Principales caractéristiques des fibrinogènes San Diego III et V, d'après Morris et al [107]**

	Perméabilité	Diamètre des fibres	Branching	Fixation de ZFB
San Diego III B $\beta$ 235 Pro/Leu	75.5%	122 $\pm$ 3	148 $\pm$ 15	93.3%
San Diego V A $\alpha$ 554 Arg/His	66.4%	116 $\pm$ 4	151 $\pm$ 30	136.6%

## **6. Discussion**

Nous avons donc mis au point une nouvelle méthode d'évaluation de l'accessibilité de l'épitope  $\beta$ 15-42 au sein de la fibrine. Le coefficient de variation pour un même échantillon permet de considérer que les mesures sont homogènes et la technique reproductible [217]. L'augmentation de la fixation des anticorps ZFB dans des fibrines désorganisées polymérisées en milieu hypertonique est cohérente avec des résultats préalablement publiés : le pourcentage d'épitopes  $\beta$ 15-42 exposés à l'anticorps ZFB diminue avec l'organisation de la fibrine sous l'action du cross-linking [216].

La fixation de VE-Cadhérine au sein de la fibrine était significativement augmentée en milieu hypertonique mais de façon moins importante que celle de l'anticorps ZFB. Cette différence peut être expliquée par les modalités d'interaction de l'épitope avec son anticorps ou avec VE-Cadhérine auquel il peut se lier. En effet, la liaison de ZFB se fait avec un seul épitope alors que la fixation de VE-Cadhérine se fait avec des séquences  $\beta$ 15-42 dimérisées [129]. Dans ce sens, Morris et al ont montré que le rapport stoechiométrique de la fixation de ZFB à la séquence N terminale de la chaîne  $\beta$  du fibrinogène était de 1:1. La polymérisation anarchique du fibrinogène en milieu

hypertonique modifie l'organisation des protofibrilles et leur alternance modifiant l'alignement des séquences  $\beta$ 15-42 [215], [218], [219].

L'analyse des fibrinogènes anormaux de patients atteints d'HTP-TEC montre que la seule désorganisation du réseau de fibrine n'est pas systématiquement corrélée à une modification de l'accessibilité de ses épitopes. En effet, alors que les fibrinogènes San Diego III et V ne montrent pas de différences significatives de fonctionnalité [166], l'exposition des séquences  $\beta$ 15-42 semblent différentes. Le fibrinogène San Diego III ne fixe pas plus l'anticorps ZFB, son implication dans la physiopathologie de la maladie thromboembolique chronique pourrait être expliquée par une modification de conformation stérique limitant l'action de la plasmine et donc la persistance du caillot [107]. En effet, l'analyse biochimique de la fibrine de San Diego montre une altération de la fixation du deutérium, une méthode d'évaluation des changements de conformation des protéines, au site de la mutation (B $\beta$  235 Prol/Leu) mais aussi dans le domaine  $\alpha$ C où se fixe le plasminogène et à proximité d'une séquence à haute affinité pour le calcium, cofacteur du facteur XIII [220]. Dans cette hypothèse physiopathologique, la sensibilité du thrombus diminuée à la plasmine serait le mécanisme principal de sa persistance au sein de la vascularisation artérielle pulmonaire. L'augmentation importante de l'accessibilité des épitopes  $\beta$ 15-42 mis en évidence pour le fibrinogène San Diego V est elle un élément en faveur d'une modification des interactions entre la fibrine et le compartiment endothélial au cours de la maladie veineuse thromboembolique chronique. De façon intéressante, le fibrinogène San Diego V a une charge nette négative pouvant altérer sa polymérisation mais ne présente aucune anomalie pouvant modifier autrement la fibrinolyse.

Bien que nous ayons réalisé de multiples tests sur les fibrinogènes, leurs nombres restent limités (deux témoins et deux patients) limitant l'interprétation faute de

données sur la variabilité interindividuelle de la mesure. La seconde limite réside dans la nature des fibrinogènes des témoins qui étaient porteurs du polymorphisme commun A $\alpha$  312 Thr/Ala de la chaîne A $\alpha$  pour lequel il a été décrit des modifications fonctionnelles, en particulier une forte sensibilité au cross-linking par le facteur XIII qui contribue à augmenter l'organisation du réseau de fibrine [153].

## **7. Conclusion**

La combinaison d'un test de perméabilité et de l'analyse de l'accessibilité de l'épitope  $\beta$ 15-42 est une technique permettant de réaliser les deux tests de façon fiable sur un faible volume de plasma. L'accessibilité de cette séquence d'intérêt est une analyse fonctionnelle nouvelle et complémentaire des analyses en microscopie confocale. L'accessibilité différente de l'épitope  $\beta$ 15-42 au sein des dysfibrinogénémies associées à l'HTP-TEC est un argument en faveur de la conjonction de mécanismes multiples dans le développement des lésions de vasculopathie après une embolie pulmonaire.



# CTEPH-Associated Dysfibrinogenemia with Enhanced Accessibility on Fibrin of Ligands for VE-Cadherin

Benjamin Planquette<sup>1,2,3</sup>, Peter Chiles<sup>3</sup>, James Mars<sup>3</sup>, Olivier Sanchez<sup>1,2</sup>, Guy Meyer<sup>1</sup>, Timothy Morris<sup>3</sup>  
 1. Service de pneumologie et de soins intensifs, Hôpital Européen Georges Pompidou, 2. INSERM U1140, PARCC, Paris, France  
 3. Division of Pulmonary, Critical Care and Sleep Medicine, University of California, San Diego Medical Center, San Diego, United States



## Background & Purpose

CTEPH-associated dysfibrinogenemias (fibrinogen<sup>San Diego 1-V</sup>) produce fibrin clots that are resistant to fibrinolysis<sup>1,2</sup>. They also have disordered structures<sup>3</sup> (Fig. 1), although it is unclear how the alterations might influence remodeling of thrombi into vascular scars.



**Figure 1. Disordered fibrin clots derived from CTEPH-associated fibrinogen mutations.** Confocal microscopy demonstrates disorder in the structure of fibrinogen<sup>San Diego</sup> (middle panel) in which plasmin access to the lysine target is limited and fibrinogen<sup>San Diego</sup> (right panel) in which a negative charge impairs to fibrin disrupts polymer formation.

The fibrin  $\beta$ -chain amino terminus ("B knob") binds the endothelial cell transmembrane receptor, VE-cadherin, which has been implicated in vascular remodeling. Fibrin network structure could influence endothelial cell capillary formation.

## Hypothesis

**Fibrin clots derived from CTEPH-associated dysfibrinogenemias have more accessible B-knobs than normal fibrin.**

Prolonged or enhanced B knob accessibility in CTEPH-associated fibrin could modulate endothelial cell response and trigger vascular scarring after pulmonary embolism. This finding would provide one explanation of how acute pulmonary emboli might interact with endothelial cells to promote the vascular scarring characteristic of CTEPH.

## Methods

### VE-cadherin retention in disordered clots

"Normal" fibrin clots were formed with fibrinogen obtained from healthy subjects who had genetically normal fibrinogen. "Disordered clots" were formed under hypertonic conditions, which disrupts polymer formation.

VE-cadherin and a control protein were labeled with <sup>125</sup>I and then percolated through the fibrin clots. The clots were washed and then retained <sup>125</sup>I-labeled antibodies were measured by gamma counting.

### Anti-B knob retention in disordered clots

Normal fibrin clots and disordered fibrin clots were formed as described above.

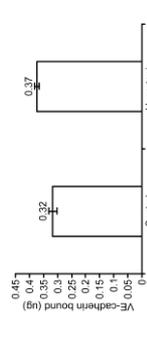
Anti-B knob and isotypic control antibodies were labeled with <sup>125</sup>I and then percolated through the fibrin clots. The clots were washed and then retained <sup>125</sup>I-labeled antibodies were measured by gamma counting.

### Anti-B knob retention in clots derived from patients with CTEPH dysfibrinogenemias

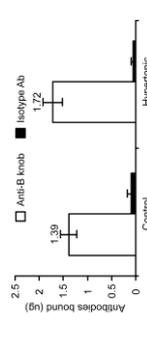
Fibrin clots were formed from CTEPH-associated fibrinogen<sup>San Diego-III</sup> and from fibrinogen<sup>San Diego-V</sup>. Normal fibrin clots (derived from healthy subjects with genetically normal fibrinogen) were used as controls.

<sup>125</sup>I-labeled Anti-B knob and isotypic control antibodies were percolated through the fibrin clots, which were washed and then gamma counted.

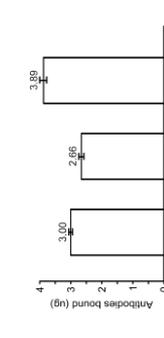
## Results



**Figure 2. VE-cadherin is highly retained in disordered fibrin clots.** Fibrin clots formed under hypertonic conditions retained more VE-cadherin than the fibrin clots formed under isotonic conditions from normal fibrinogen.



**Figure 3. Anti-B knob is highly retained in disordered fibrin clots.** Fibrin clots formed under hypertonic conditions retained more anti-B knob than the fibrin clots formed under isotonic conditions from normal fibrinogen.



**Figure 4. Anti-B knob is highly retained in fibrin clots derived from CTEPH-associated fibrinogen.** Fibrin clots formed under hypertonic conditions retained more anti-B knob than the fibrin clots formed from normal fibrinogen (p = 0.032), while those formed from fibrinogen<sup>San Diego</sup> did not.

## Discussion

Fibrinogen<sup>San Diego-V</sup> forms clots with highly accessible B knobs, which are ligands for VE-cadherin.

The VE-cadherin/B knob interaction may activate endothelial cells and mediate vascular scar formation after acute PE.

Fibrinogen<sup>San Diego-III</sup> may have a different mechanism of clot persistence and scar formation, such as its steric hindrance of the fibrin-tPA binding site.<sup>4</sup>

## Funding

NIH R01HL095088 Deep Vein Thrombosis and Chronic Thrombo-embolic Disease  
 Principle Investigator: Timothy Morris  
 Fondation de Recherche en Santé Respiratoire Appel d'offre 2013

## References

- Morris TA, et al. Fibrin derived from patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension is resistant to lysis. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;173:1270-1275
- Morris TA, et al. High prevalence of dysfibrinogenemia among patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Blood* 2009;114(9):1929-1936
- Mars J, et al. Chronic thromboembolic pulmonary hypertension-associated dysfibrinogenemia exhibits disorganized fibrin structure. *Thrombosis Res* 2013;132(6):729-34
- Morris TA, et al. Structural insights into fibrinogen dynamics using amide hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *Biochemistry* 2013;52(32):5491-502

### **Prediction of Residual Obstruction Manifested after Pulmonary Embolism Treatment (PROMPT)**

Benjamin Planquette, Oliver Sanchez, Guy Meyer, James J. Marsh, Peter G. Chiles, Gregoire Le Gal, Timothy A. Morris

**Etat : manuscrit en reviewing par les co-auteurs**

### **Résumé**

**Introduction :** La persistance de matériel fibrino-cruorique obstruant la vascularisation pulmonaire à distance d'une embolie pulmonaire (EP) est fréquente et associée à la persistance d'une limitation des capacités à l'effort [48]. Ces séquelles vasculaires sont aujourd'hui intégrées au "syndrome post embolie pulmonaire" et sont considérées comme un stade physiopathologique intermédiaire [42] : elles sont un facteur de risque de récurrence de la maladie et un des critères diagnostiques de l'hypertension pulmonaire post-embolique. L'identification précoce, au moment du diagnostic d'EP, de patients à haut risque de développer des séquelles ou un syndrome post EP est une préoccupation quotidienne des cliniciens. Le matériel obstructif au sein de la vascularisation pulmonaire est essentiellement fait de fibrine ; certaines anomalies fonctionnelles du fibrinogène et certaines mutations ont été associées à l'EP ou l'HTP-TEC [107], [162], [164]. L'objectif de ce travail était d'identifier des anomalies du fibrinogène associées aux séquelles après une EP et évaluer le bénéfice à les intégrer à des modèles prédictifs de ces séquelles.

**Méthodes :** Pour cela, nous avons purifié le fibrinogène de deux cohortes de patients présentant une première EP et qui ont été suivies prospectivement et évaluées à l'aide d'une scintigraphie pour rechercher et quantifier les séquelles perfusionnelles. Les analyses du fibrinogène ont été multiples : détection des variants par leur poids

moléculaire et évaluation de l'état de phosphorylation et de sialilation de chacune des chaînes constitutives du fibrinogène en spectrophotométrie couplée à la chromatographie en milieu liquide, étude du temps de lyse, étude de la perméabilité, étude du degré de cross-linking des chaînes du fibrinogène et évaluation de l'accessibilité des épitopes  $\beta$ 15-42.

La prédiction des séquelles perfusionnelles a été réalisée pour chacune des deux cohortes en trois temps : prédiction par les seules données cliniques, prédiction par les seules données du fibrinogène et prédiction par l'ensemble des données cliniques et fibrinogène. Les analyses multivariées ont utilisé le *Akaike Information Criteria* (AIC) qui permet de comparer chacun des modèles de prédiction par rapport aux autres ; le meilleur modèle est celui ayant la valeur d'AIC la plus faible.

**Résultats :** Dans les deux populations testées, l'obstruction vasculaire initiale au diagnostic d'EP et l'âge étaient des critères prédictifs de séquelles alors que le délai diagnostique (entre le premier symptôme d'EP et le diagnostic) ne l'était que pour l'une des deux cohortes. Les AICs des modèles cliniques étaient 106 (cohorte 1) et 177 (cohorte 2). Dans les deux cohortes, seule la proportion de chaîne B $\beta$  du fibrinogène avec un seul résidu acide sialique était associée à la survenue de séquelles perfusionnelles. Le degré de phosphorylation de la chaîne B $\beta$ , le degré de sialilation de la chaîne  $\gamma$  et la proportion de chaîne  $\gamma'$  étaient associés à un risque plus faible de survenue des séquelles dans une cohorte sans que ces résultats soient retrouvés dans la seconde cohorte analysée. Les AICs des modèles « fibrinogène » étaient 93 (cohorte 1) et 136 (cohorte 1). Les analyses multivariées conduites sur l'ensemble des données cliniques et fibrinogène des patients montraient que les modèles avaient de meilleurs AICs : 103 (cohorte 1) et 136 (cohorte 2).

**Conclusion:** Nos résultats sur les données cliniques sont cohérents avec les données disponibles dans la littérature. L'analyse du fibrinogène permet d'améliorer la prédiction des séquelles perfusionnelles dans chacune des deux cohortes et témoigne de l'importance de celui-ci et de la fibrine dans la physiopathologie de la maladie veineuse thromboembolique chronique. L'analyse du fibrinogène améliore la prédiction de survenue des séquelles perfusionnelles après une EP. Ces données doivent être confirmées dans d'autres cohortes avant d'envisager leur utilisation en clinique et développer des stratégies de recherche translationnelle sur la physiopathologie et des options thérapeutiques

## Original Article

### **Fibrinogen properties help predict residual pulmonary vascular obstruction after pulmonary embolism: results from the PROMPT study**

Benjamin Planquette, Oliver Sanchez, James J. Marsh, Peter G. Chiles, Joseph Emmerich, Gregoire Le Gal, Guy Meyer, Timothy A. Morris

Department of Medicine, Division of Pulmonary and Critical Care Medicine, University of California, San Diego, CA

Corresponding author:

Benjamin Planquette, MD

Service de pneumologie et de soins intensifs

Hôpital Européen Georges Pompidou

20 rue Leblanc

75015 Paris

Email: [benjamin.planquetet@aphp.fr](mailto:benjamin.planquetet@aphp.fr)

Phone +33156093460

Fax:+3315609355

Bullet point:

Incremental value of fibrinogen analysis to predict RPVO after PE : results from the PROMPT study

Key words : pulmonary embolism, residual vascular obstruction, fibrinogen, V/Q lung scan

## **Abstract (330 words)**

**Introduction:** Residual pulmonary vascular obstruction (RPVO) occurs frequently after acute pulmonary embolism (PE). RPVO reflects transformation from acute thromboemboli into intravascular scars. RPVO is associated with functional impairment and an increased risk of recurrence. It is an essential step in the development of chronic thromboembolic pulmonary hypertension. Properties of fibrin and fibrinogen implicated in the development of CTEPH may influence the risk of RPVO after acute PE.

**Objective:** Identify clinical characteristics and fibrin/fibrinogen properties predictive of RPVO after acute PE.

**Methods:** We prospectively followed two cohorts of first-time acute PE patients: one enrolled at the time of the diagnosis and one enrolled after long-term treatment. Blood samples were collected and clinical data was recorded at the time of enrollment. Variations in fibrinogen structure were determined by mass spectrometry and functional properties were determined by standardized assays. RPVO was measured by ventilation/perfusion scanning after long-term therapy. An Akaike Information Criteria-based stepwise procedure was used to select the best model to predict RPVO for each cohort using demographic, clinical and fibrinogen-related parameters as candidate predictors. Each model's goodness of fit was evaluated by analysis of deviance.

**Results:** In the cohort enrolled at the time of diagnosis 29/102 subjects (28.4%) had RPVO. RPVO was best predicted ( $p = 0.0022$ ) by a model that included the initial degree of obstruction, days of symptoms before diagnosis, high proportions of monosialylated fibrinogen B-beta chains and low proportions of fibrinogen gamma'. Among the cohort enrolled after long-term treatment, 46/182 (25.3%) of had RPVO. The model that best predicted RPVO ( $p < 0.00001$ ) included the initial degree of obstruction, age, use of thrombolytic drugs, high proportion of monosialylated fibrinogen Bbeta chains, low proportion of phosphorylated Bbeta chains and low proportions of monosialylated gamma chains.

**Conclusion:** RPVO after acute PE appears to be associated with the initial degree of vascular obstruction and monosialylation of fibrinogen beta chains. Less consistent associations were observed between RPVO and delays in presentation, older age, thrombolytic drug use and other post-translational modifications of fibrinogen.

## Introduction

Venous thrombo-embolism is a frequent disease with an annual incidence estimated at 117 cases per 100000 cases (1,2); in which pulmonary embolism (PE) are a third of cases. Post thrombotic syndrome is a well-described complication after deep venous thrombosis (DVT) associated with residual vein thrombosis. The concept of post PE syndrome is now emerging (3) and pools residual pulmonary vascular obstruction (RPVO), recurrence of PE and Chronic Thrombo Embolic Pulmonary Hypertension (CTEPH). About one third of patients after PE present RPVO that has been associated with both impaired physical performance and quality of life (4-6). CTEPH affects 2-3% of patients after PE (7,8) but represents the most severe complication associated with a high morbidity and mortality (9,10). Physiopathology of CTEPH is still unclear but is characterized by persistent unresolved thrombi in the pulmonary arteries causing increased pulmonary vascular resistance (11). RPVO and CTEPH shares similar documented risk factors such as the importance of initial vascular obstruction at the time of PE diagnosis, age and previous VTE events suggesting that RPVO could be an intermediate state between acute PE and CTEPH (4,9). Moreover RPVO has been associated with worse prognosis after PE (12). No association between thrombophilia and RPVO has been identified, focusing attention on fibrinogen and fibrinolytic system (13). In that sense, persistence of fibrin could be explained by resistance to lysis in some CTEPH patients (14) but also in PE patients (15). In CTEPH, five dysfibrinogenemias corresponding to five new gene mutations have been documented (16), and are associated with prolonged lysis rate, altered porosity and a disorganized fibrin network (17,18). Fibrinogen is a complex hexamere of three pairs of different polypeptide chains  $A\alpha$ ,  $B\beta$  and  $\gamma$ , connected by disulfide bridges. Fibrinogen can be glycosylated and phosphorylated:  $A\alpha$  and  $B\beta$  chains can be mono or diphosphorylated,  $B\beta$  et  $\gamma$  can be

mono or disialylated by adjunction of one or two sialic acid.  $\gamma'$  chain is a minor  $\gamma$  chain variant (8%) obtained by alternative splicing of mRNA. All these biochemical changes could influence fibrinogen properties for clotting or lysis (19,20). Prediction of residual vascular obstruction could help in identifying patients with a high risk for post PE syndrome.

The aim of the present study was to evaluate the incremental value of fibrinogen functional analysis in predicting residual vascular obstruction.

## **Methods**

### ***Study design and patients***

This study was a single-center, prospective, observational cohort study conducted on 2 subsets of patients in an academic teaching hospital (Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France). The study was approved by the local ethics committee. All patients provided written informed consent before enrolment. Two groups of patients with PE were recruited.

#### *Pulmonary embolism patients recruited during acute therapy (Cohort 1)*

For the purpose of this study, we enrolled the subgroup of consecutive patients with PE included in the FARIVE study and followed-up at Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France. FARIVE is a French multicentre case-control study carried out between 2003-2009 with the aim of studying the interactions of environmental, genetic and biological risk factors for first VTE and risk of recurrence. The study recruited consecutive inpatients or outpatients treated for a first episode of objectively confirmed DVT and/or PE as previously described (21). The type and duration of long-term therapy was left to the discretion of physician in charge of the patients, but the standard

practice was to treat provoked PE for at least 3 months and unprovoked PE for at least 6 months.

*Pulmonary embolism patients recruited after long-term therapy (Cohort 2)*

This second cohort enrolled consecutive patients aged over 18 years who survived a first objectively confirmed PE, were treated for at least 3 months with anticoagulant (“long-term therapy”) without any recurrence during this period and were followed-up at Hôpital Européen Georges Pompidou between 1999 and 2009 as previously described (4). Subjects enrolled during acute treatment were excluded from duplicate enrollment as outpatients after long-term therapy.

***Outcome: Residual Pulmonary Vascular Obstruction***

For this study, the primary outcome was the persistence of perfusion defects after long-term therapy in both cohorts. All patients in both cohorts underwent a standardized ventilation/perfusion (V/Q) lung scan as previously described (22). Each perfusion scan was compared to ventilation scan to identify mismatched defects and scored according to a pre-specified protocol (23) by an investigator blinded to all other study data. Briefly, each lobe was assigned a weight based on the regional distribution of pulmonary blood flow: right lower lobe, 25%; right middle lobe, 12%; right upper lobe, 18%; left lower lobe, 20%; lingual, 12%; and left upper lobe 13%. For each lobe, a semi-quantitative perfusion score (0, 0.25, 0.5, 0.75 or 1) was estimated from the scintigraphic density in the anterior, posterior and oblique views by comparison with the scintigraphic density of an apparently normally perfused area. Each lobar perfusion score was then calculated by multiplying the weight by the perfusion score. The overall perfusion score was determined by summing the six separate lobar perfusion scores. The residual proportion of vascular obstruction was then calculated as (1 – overall perfusion score)

(23). Residual Pulmonary Vascular Obstruction was defined as a residual vascular obstruction >10%. The 10% threshold corresponds to an amputation of at least two pulmonary segments and to the minimal obstruction defining a high-probability result on diagnostic V/Q lung scans.

### ***Candidate predictors***

#### *Clinical data*

A trained investigator used a standardized data collection tool to record clinical data from the medical record and from a structured interview. Data was collected at the time of study enrollment. Initial pulmonary vascular obstruction on spiral CT or V/Q lung scan was calculated by physicians blind to the clinical characteristics of the patients, using scores previously validated and both highly correlated with the previously described Miller index with pulmonary angiography (23,24).

#### *Blood sample collection*

At the time of study enrollment, blood samples were collected by venipuncture into anticoagulant-containing tubes. Plasma was separated by two consecutive centrifugations and stored at -70°C for analysis. In cohort 1, blood samples were processed identically to cohort 2, with the exception that leukocytes were separated and stored for DNA analysis as part of the FARIVE study protocol.

#### *Fibrinogen purification*

Plasma fibrinogen levels were measured in a clinical laboratory at the time of blood collection, as part of the FARIVE study. The values were extracted from source documents in the patients' medical records.

Fibrinogen was purified from citrated plasma (collected and stored according to the FARIVE protocol) by ethanol precipitation. Because of the small plasma volume available, we developed a modified technique for purification. Plasma was treated with

EtOH to precipitate FGN then exposed to Gelatine Sepharose (GE Helthcare) to remove the fibronectin, resulting in a highly purified sample. The resulting fibrinogen preps were measured using a nanodrop spectrophotometer at A280 for quantity, and subsequently diluted to 4mg/ml. Experiments were performed on the fibrin clots derived from the patients' fibrinogen.<sup>11</sup> Preliminary studies indicated that enough factor XIII co-purifies with fibrinogen during ethanol precipitation to fully cross-link fibrin when clotted in the presence of calcium as judged by SDS PAGE. However, to control for possible variations in the amount of endogenous factor XIII, excess exogenous factor XIII was added in all clotting assays.

#### *Fibrin network structure*

Fibrin clot turbidity is an efficient and highly quantifiable method that reflects fibril dispersal and branching as measured by microscopy.<sup>12</sup> We determined fibrin clot turbidity on all samples, and report it as the primary representation of fibrin network structure. Fibrin clots were formed by combining fibrinogen, factor XIII, thrombin, and calcium chloride as described.<sup>11</sup> In microplate wells 100µl fibrin clots (1mg/ml) were made with plasminogen (20µg/ml) and thrombin (5units/ml) in the presence of Ca<sup>+</sup> (100mM) and allowed to clot for 2hours in a humidity chamber. The clots were then exposed to a mixture of plasminogen (20µg/ml) and TPA (1µg/ml) and immediately read in a plate reader at 405nm 25°C. OD readings were obtained every 10 min for 4 hours. Clot turbidity was defined as the highest achieved OD read at 405nm.

Fibrin clot permeability reflects the tightness with which fibrin polymers are formed. We measured permeability in 300µl fibrin clots (1mg/ml), made with thrombin (5units/ml) in the presence of Ca<sup>+</sup> (100mM). The clots were formed in solid phase extraction columns and allowed to clot for 2 hours in a humidity chamber. Permeation buffer was added to the top of the column and kept at a constant pressure head. For

exactly 1 hour the flow through is collected into pre-weighed tubes and the volume determined by reweighing the tubes after collection. The Darcy constant,  $K_s$ , represents the surface of the clot allowing flow through the network.  $K_s = Q \cdot L \cdot n / t \cdot A \cdot \Delta P$  where  $Q$  = volume collected (ml),  $L$  (clot length) = 1.176 for a 300 $\mu$ l clot  $n$  (viscosity) =  $10^{-3}$ ,  $t$  (collection time) = 3600 sec,  $A$  (cross sectional area) = 0.255 cm for 1-ml column,  $\Delta P$  (pressure differential) = 6374 dyne/cm<sup>2</sup> (6.5 cm H<sub>2</sub>O for a 1-ml column). Thus, organized fibrin networks with large pores will have higher flow (and hence larger  $K_s$ ) compared to disorganized fibrin networks with small pores.

We measured the degree of crosslinking among alpha chains as a reflection of fibrin organization. Fibrinogen samples (1mg/ml final) were clotted for two hours in a humidity chamber with thrombin (5units/ml) in the presence of Ca<sup>+</sup> (100mM). The clots were then reduced and denatured using a LDS/DTT solution for 60 min. The respective FGN sample and reduced/denatured clot were run on SDS PAGE in reducing conditions, loading 2  $\mu$ g per lane and stained using colloidal blue stain. Gels were scanned and densitometry was performed using ImageJ software. The amount of crosslinking was determined as one minus the amount of intact alpha chain in the clotted sample divided by the amount of alpha chain present the original FGN sample.

#### *Resistance to lysis.*

We performed an assay of the fibrin remaining within clots after partial lysis (post-lysis fibrin residua). In microplate wells 100 $\mu$ l fibrin clots (1mg/ml) were made with plasminogen (20 $\mu$ g/ml) and thrombin (5units/ml) in the presence of Ca<sup>+</sup> (100mM) and allowed to clot for 2hours in a humidity chamber.<sup>11</sup> The clots were then exposed to a mixture of plasminogen (20 $\mu$ g/ml) and TPA (1 $\mu$ g/ml) and immediately read in a plate reader at 405nm 25°C. Optical density (OD) at 280 nm was measured every 10 min for 4 hours. Fibrin residua was defined as the OD after 2 hours of lysis divided by the

maximum OD.<sup>11</sup> Lysis rate was estimated by the rate of turbidity decrease during incubation with tPA-plasminogen.<sup>11</sup> In microplate wells 100µl fibrin clots (1mg/ml) were made with plasminogen (20µg/ml) and thrombin (5units/ml) in the presence of Ca<sup>+</sup> (100mM) and allowed to clot for 2hours in a humidity chamber. The clots were then exposed to a mixture of plasminogen (20µg/ml) and TPA (1µg/ml) and immediately read in a plate reader at 405nm 25°C.<sup>11</sup> OD readings were obtained every 10 min for 4 hours. Lysis rate was defined as the rate of decrease in OD per minute during the predominant time period of lysis, in which the rate was linear.<sup>11</sup>

#### *Accessibility of fibrin beta-chain amino terminus "B-knob" neoepitopes*

Iodine Na[<sup>125</sup>I] (0.5mCi) was activated in Pierce pre-coated iodination tubes (Thermo Scientific®) and incorporated into 150 µg of specific antibody against the β15-42 peptide sequence of the N terminal Bβ chain solution per their protocol (Chizzonite). The percent incorporation of I125 to the antibody was determined by separation of the unbound I125 through a 30KDa cut off Centrifree filter (Millipore) in parallel with each binding assay. Radioactivity was counted in 10 µL of pre and post-centrifree® in a γ counter (cpm). Calculation was done as follows percent incorporation = (post-Centrifree cpm/pre-Centrifree cpm) x 100.

Immediately after clot permeability assay, residual permeation buffer was carefully removed from each column and the remainder PB was allowed to drain by gravity. One hundred microliters of 5 fold diluted Previously I125 labeled ZFB were added to the top of the clot in the permeability column and allowed to enter the matrix. When the flow stopped, clots were washed 3 times using 800 µL of TB buffer. The column was counted in a γ counter (cpm). The amount of antibody bound to each fibrin clot was calculated

taking into account the percent incorporation of I125 into the labeled antibody (amount of bound protein ( $\mu\text{g}$ ) = radioactivity count in the column / radioactivity per  $\mu\text{g}$  of protein; radioactivity per  $\mu\text{g}$  of protein = (pre Centrifecpm x percent of incorporation)/amount of protein loaded ( $\mu\text{g}$ )).

#### *Fibrinogen mass variants*

We measured precise fibrinogen masses with liquid chromatography, followed by mass spectrometry. Fifty micro liters of each fibrinogen sample (4mg/ml) was precipitated using 17 microliters of a 50% ethanol/citrate buffer. The sample was centrifuged and the pellet of fibrinogen reconstituted in 200 micro liters tris/urea/DTT buffer and allowed to reduce and denature for 4 hours at 37°C. Acidification to prevent disulfide bonds from reforming was accomplished by the addition of 20 micro liters of 10% trifluoroacetic Acid. The final protein concentration (about 1mg/ml), measured using a nanodrop spectrophotometer ( $A_{280}$ ), was determined for each. Samples were frozen at -70°C and shipped to City of Hope for Liquid Chromatography/Mass Spect Analysis.

Samples were sent to the Mass Spectrometry and Proteomics Core lab at City of Hope, who performed the LC/MS and returned analyzed data in the form of spectra for the alpha chain (65900-66500 amu), beta chain (54000-54700 amu), and gamma chain (48200-48900 amu) of each fibrinogen sample mass range.

For each spectrum the mass of each peak was recorded and peak height (cm) was measured using the Corel Draw program. Spectra were flagged if (1) there were peaks above the spectra baseline whose mass was distinct from peaks observed in the previously tested healthy subjects or (2) there were isoform mass peaks whose proportional height was above the 5th percentile or below the 95th percentile of the spectra in the healthy volunteers.

### *Statistical analysis*

Categorical variables are presented as numbers and percentages, and continuous variables are presented as means  $\pm$  SD. Univariate analyses, based on Chi-squared tests or t-tests, were performed. Akaike Information Criterion (AIC)-based stepwise logistic regression was then used to select the best model predicting RPVO > 10% for each subset of patients using (a) demographic and clinical parameters, (b) Fibrinogen parameters, and (c) combined demographic, clinical and Fibrinogen parameters. The best model is identified by the smallest AIC value. Only subjects with non-missing information on all measures of interest were used in each of the analyses since the same set of subjects was necessary for the process of each model's selection. AIC is a metric which consists of a combination of a model's overall accuracy and a penalty for overfitting, and which allows ranking of competing models. The AIC-based approach avoids selecting models on the basis of apparent significance of the individual terms or global fit, both of which are likely to be over-stated (25). Subjects included into and excluded from each model were compared on sex, age, percent of initial obstruction, and proportion of RPVO > 10%. Deviance based goodness of fit was assessed on each of the three final models.

## Results

### Cohort 1 patients' characteristics (Table 1)

From January 2003 to January 2009, 137 patients were recruited and prospectively followed, 2 were not assessed for RPVO and 6 V/Q lung scans were missing: 129 patients were analyzed. Mean time from PE diagnosis to V/Q Lung scan was  $8.3 \pm 2.5$  months and mean RPVO was  $8.1 \pm 11.7\%$ . Thirty-two patients (23.7%) presented RPVO > 10%.

### Prediction of Residual Pulmonary Vascular Obstruction (RPVO) in Cohort 1 (table 2)

The first step analysis identified the best prediction model for RPVO >10% including only using clinical variables. Three predictors were identified: age (Odds Ratio (OR) 1.023, 95% CI, 0.997-1.049;  $p=0.7703$ ), time from first symptom to diagnosis of PE (OR 1.028; 95% CI, 0.998-1.059;  $p=0.06659$ ) and vascular obstruction at the time of PE diagnosis (OR 1.031; 95% CI, 1.011-1.052;  $p= 0.00235$ ).

Afterwards, all fibrinogen available data were included in the next step analysis to identify the best model that predicts RPVO >10%. The following variables were included in this model: fibrinogen  $\gamma'$  amount (OR 0.61; 95% CI, 0.39-0.97), B $\beta$ -chain mono sialylation amount (OR 1.09; 95% CI, 0.99-1.21) and corrected lysis rate (OR 10.87; 95% CI, 0.35-338.34).

Finally, clinical and fibrinogen data were pooled in the last step analysis. The following variables were associated with the RPVO > 10%: fibrinogen  $\gamma'$  amount (OR 0.64 95% CI, 0.42-0.98), B $\beta$ -chain mono sialylation amount (OR 1.07; 95% CI, 0.99-1.17), initial obstruction (OR 1.04; 95%CI: 1.02-1.06) and time from symptom to diagnosis (OR 1.026; 95% CI, 0.997-1.056).

Cohort 2 patients' characteristics (Table 3)

From January 1999 to January 2009, 185 patients were recruited and prospectively followed, 2 patients were not assessed for RPVO: 183 patients were included in the analysis. Mean time from PE diagnosis to V/Q Lung scan was  $10.9 \pm 3.7$  months and mean RPVO was  $6.8 \pm 12.7$  %. Forty-seven patients (25.6%) present RPVO > 10%.

Prediction of RPVO > 10% in cohort 2 (Table 4).

Clinical variables identified as the strongest predictors for RPVO >10% were age (OR 1.028, 95%CI, 1.005-1.052; p=0.016), thrombolytic therapy (OR 4.93; 95%CI, 0.933-26.04 p=0.06) and vascular obstruction at the time of PE diagnosis (OR 1.02; 95%CI, 1.004-1.037; p= 0.015).

Afterwards, all fibrinogen available data were included in the next step analysis to identify the best model that predicts RPVO >10%. The following variables were included in this model: fibrinogen  $\gamma$  mono sialylation amount (OR 0.94 95%CI, 0.87-1.02), B $\beta$ -chain mono sialylation amount (OR 1.14; 95%CI, 0.103-1.28),  $\beta$ 15-42 N terminal accessibility (OR 0.55. 95%CI, 0.25-1.2) and B $\beta$ -chain phosphorylation amount (OR 0.95; 95%CI, 0.90-1.01).

Finally, clinical and fibrinogen data were pooled in the last step analysis. The following variables were associated with the RPVO > 10%: fibrinogen  $\gamma$  mono sialylation amount (OR 0.92; 95%CI, 0.84-1.01), B $\beta$ -chain mono sialylation amount (OR 1.178; 95%CI, 1.05-1.33), B $\beta$ -chain phosphorylation (OR 0.94; 95%CI, 0.89-1), initial obstruction (OR 1.03; 95%CI, 1.01-1.05), thrombolysis (OR 10.129; 95%CI, 1.74-58.8) and age (OR 1.035; 95%CI, 1.006-1.065).

Implemental value of fibrinogen analysis for RVO prediction among cohorts (Table 5).

In the two populations studied, comparisons of the Akaike Information Criterion among the predictive models demonstrate that models including fibrinogen informations are better predictors of RPVO than those that do not. Interestingly, the best prediction model in cohort 1 was derived exclusively with fibrinogen variables.

In both cohorts, the age and the initial obstruction appear to be very positive predictors. The time between first symptoms and diagnosis of PE was significantly associated with RPVO in cohort-1 patients, but not in the cohort-2. Whereas thrombolysis was a positive predictor of RPVO only in the cohort-2, even after adjusting for the size of the initial obstruction.

*Specific fibrinogen/fibrin characteristics that are the strongest predictors of residual vascular obstruction* (Table 6)

In both population samples, Beta chain mono sialylation is a positive predictor of RPVO. As shown, in table other fibrinogen variables were associated with an increased or a decreased risk for RPVO but those findings were not consistent in between the 2 cohorts. To summarize, increasing proportion monosialylated of B $\beta$ -chain and fibrin lysis rate are predictive of RPVO while high increased amount of  $\gamma$ 'chain, increased B-knob accessibility, increase in B $\beta$ -chain phosphorylation and in amount of  $\gamma$ -chain mono sialylated form protect against RPVO.

## **Discussion**

The present study shows that clinical prediction of RPVO after a first PE can be improved by fibrinogen analysis. RPVO risk increased in older patients and in patients with an important initial obstruction in the two cohorts studied. Fibrinogen sialylation of the B $\beta$  was identified a predictor for RPVO. Model including fibrinogen's analyses

better predicts RPVO than models derived from clinical or clinical and fibrinogen data in one of the two cohort of the study.

Our findings in clinical prediction models are in accordance with previous available data. As showed in two others studies (4,26), age at PE diagnosis and initial vascular obstruction were associated with RPVO in the 2 cohorts of patients. Age was not different among patients with and without RPVO in some other studies but those studies were limited by their small size (13) or the use of CT scan to detect RPVO, that is less sensitive than V/Q lung scan (27,28). Melendez et al also showed that initial obstruction was a strong predictor for RPVO (29). Two others studies identified time from first symptoms of VTE to diagnosis of PE as a predictor for RPVO as we found in cohort 2. In cohort 1, time to diagnosis was shorter (10 days versus 14 days) which can be explained by some differences in the 2 cohorts (4,13). In cohort 1, patients were younger and hormonal therapy more frequent that are two parameters helping in suspecting PE in patients presenting non specific symptoms. Interestingly, time to PE diagnosis can be linked to fibrin clot properties as shown by Siebenlist et al (30): older clots are more resistant to lysis and correlated to  $\gamma$  chains' multimerization induced by factor XIII cross-linking activity. Recently Klok et al identified thrombolysis as an independent predictor for CTEPH that share many other risk factors with RPVO (31). Nevertheless, discrepancies exist with other study (4). Unfortunately, the data concerning the use of fibrinolysis was not available in cohort 1.

The present study is the first that shows a direct clinical benefit for patients by improving RPVO prediction using fibrinogen analysis. Indeed, RPVO progressively appears as an important feature of chronic VTE: RPVO are associated with impaired functional capacities (4), impaired quality of life (6,32), VTE recurrences (26) and are mandatory to diagnose CTEPH. Long-term perfusion defects are frequent after PE

(4,33,34) but only 20% to 25% of patients present significant defects (ie > 10%), that could constitute a new therapeutic target because of worse prognosis. Benefit for early identification of patient for RPVO can be debated.

Our study also highlights the key role of fibrin clot in chronic VTE (11): fibrin properties could delay or limit physiological endogenous fibrinolysis and probably modify other clot resolution mechanisms such as angiogenic and inflammation, driving vascular scars. Dysfibrinogenemias have been identified in CTEPH patients (16). A few studies showed that impaired fibrinolysis exist in PE and CTEPH patients (15) or in patients presenting RPVO (13). None of those studies allows physiopathological hypothesis. Here, we identified in the two cohorts the amount of monosialiated B $\beta$ -chain as a positive predictor of RPVO. Even sialic acid counts for 1% of fibrinogen weight, sialylation modifies fibrin properties by modifying factor XIII calcium dependant cross-linking (36)(19,36). Moreover, asialofibrinogen generates disorganized fibrin network. Martinez et al showed that increased sialylation in liver diseases concerns B $\beta$ -chain in 60% of cases (37) that could explain that amount of monosialiation B $\beta$ -chain was identified as predictor while amount of monosialiation of  $\gamma$  chain was not. Moreover, sialylation of fibrin has already be described in CTEPH patients (Morris 2 ref) and pregnancy, a hypercoagulable state (38) Interestingly, in this study amount of fibrinogen sialylation could be up regulated by fibrates. In cohort 2, we also identified  $\gamma'$  chain amount and  $\beta$ 15-42 N terminal accessibility as protective for RPVO.  $\gamma'$  chain is an important regulator of fibrinogen polymerization and lysis by inhibiting factor XIII and binding a thrombin inhibitor (39). The  $\beta$ 15-42 N terminal sequence of fibrin is only accessible after thrombin activation and binds different endothelial cells' receptors, such VE-Cadherin or VFLR receptor, implicated in enhancing angiogenic, a key mechanism in clot resolution (40).

The present study presents some limitations. Blood samples were collected at the time of RPVO assessment in cohort 2 while samples were collected at the time of the diagnosis of acute PE in cohort 1. These differences could modify fibrinogen properties even if all tests were performed on purified fibrinogen. Co-purification of cross-linked enzymes such as factor XIII or plasminogen, could have affected our results and limit their interpretation. The two sets of patients present different clinical characteristics that could have influence prognosis variable such as time form first VTE symptom to diagnosis as previously discussed. Some data, especially thrombolysis, were missing in cohort 1. Medications were not recorded in the 2 subsets of patients. Lastly, the Akaike method used is really adapted for comparing models but tested many variables for few events. Nevertheless, events/variable ratio is low in our study because we assumed complete predictors availability for all patients rather than performed multiple imputations.

## **Conclusion**

Residual pulmonary vascular obstruction is an important feature of chronic venous thromboembolism and could lead to recurrences and severe disease as CTEPH. Predicting RPVO is improved by fibrinogen specific analysis, highlighting the key role of fibrin(ogen) in chronic VTE mechanisms. Our results need to be confirmed in other larger population.

## References

---

1. Silverstein MD, Heit JA, Mohr DN, Petterson TM, O'Fallon WM, Melton LJ. Trends in the incidence of deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a 25-year population-based study. *Arch Intern Med.* 1998 Mar 23;158(6):585–93.
2. Spencer FA, Emery C, Lessard D, Anderson F, Emani S, Aragam J, et al. The Worcester Venous Thromboembolism study: a population-based study of the clinical epidemiology of venous thromboembolism. *J Gen Intern Med.* 2006 Jul;21(7):722–7.
3. Klok FA, van der Hulle T, den Exter PL, Lankeit M, Huisman MV, Konstantinides S. The post-PE syndrome: a new concept for chronic complications of pulmonary embolism. *Blood Rev.* 2014 Nov;28(6):221–6.
4. Sanchez O, Helley D, Couchon S, Roux A, Delaval A, Trinquart L, et al. Perfusion defects after pulmonary embolism: risk factors and clinical significance. *J Thromb Haemost JTH.* 2010 Jun;8(6):1248–55.
5. den Exter PL, van der Hulle T, Lankeit M, Huisman MV, Klok FA. Long-term clinical course of acute pulmonary embolism. *Blood Rev.* 2013 Jul;27(4):185–92.
6. Klok FA, van Kralingen KW, van Dijk APJ, Heyning FH, Vliegen HW, Kaptein AA, et al. Quality of life in long-term survivors of acute pulmonary embolism. *Chest.* 2010 Dec;138(6):1432–40.
7. Pengo V, Lensing AWA, Prins MH, Marchiori A, Davidson BL, Tiozzo F, et al. Incidence of chronic thromboembolic pulmonary hypertension after pulmonary embolism. *N Engl J Med.* 2004 May 27;350(22):2257–64.
8. Guérin L, Couturaud F, Parent F, Revel M-P, Gillaizeau F, Planquette B, et al. Prevalence of chronic thromboembolic pulmonary hypertension after acute pulmonary embolism. Prevalence of CTEPH after pulmonary embolism. *Thromb Haemost.* 2014 Sep 2;112(3):598–605.
9. Piazza G, Goldhaber SZ. Chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *N Engl J Med.* 2011 Jan 27;364(4):351–60.
10. Lang IM, Madani M. Update on chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Circulation.* 2014 Aug 5;130(6):508–18.
11. Fernandes T, Planquette B, Sanchez O, Morris T. From Acute to Chronic Thromboembolic Disease. *Ann Am Thorac Soc.* 2016 Jul;13 Suppl 3:S207–14.
12. Meneveau N, Ider O, Seronde M-F, Chopard R, Davani S, Bernard Y, et al. Long-term prognostic value of residual pulmonary vascular obstruction at discharge in patients with intermediate- to high-risk pulmonary embolism. *Eur Heart J.* 2013 Mar;34(9):693–701.
13. Lami D, Cellai AP, Antonucci E, Fiorillo C, Becatti M, Grifoni E, et al. Residual perfusion defects in patients with pulmonary embolism are related to impaired fibrinolytic capacity. *Thromb Res.* 2014 Sep;134(3):737–41.
14. Morris TA, Marsh JJ, Chiles PG, Auger WR, Fedullo PF, Woods VL. Fibrin derived from patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension is resistant to lysis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006 Jun 1;173(11):1270–5.
15. Miniati M, Fiorillo C, Becatti M, Monti S, Bottai M, Marini C, et al. Fibrin resistance to lysis in patients with pulmonary hypertension other than thromboembolic. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010 May 1;181(9):992–6.
16. Morris TA, Marsh JJ, Chiles PG, Magaña MM, Liang N-C, Soler X, et al. High prevalence of dysfibrinogenemia among patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Blood.* 2009 Aug 27;114(9):1929–36.
17. Marsh JJ, Chiles PG, Liang N-C, Morris TA. Chronic thromboembolic pulmonary

- hypertension-associated dysfibrinogenemias exhibit disorganized fibrin structure. *Thromb Res.* 2013;132(6):729–34.
18. Marsh JJ, Guan HS, Li S, Chiles PG, Tran D, Morris TA. Structural insights into fibrinogen dynamics using amide hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *Biochemistry (Mosc).* 2013 Aug 13;52(32):5491–502.
  19. Okude M, Yamanaka A, Morimoto Y, Akihama S. Sialic acid in fibrinogen: effects of sialic acid on fibrinogen-fibrin conversion by thrombin and properties of asialofibrin clot. *Biol Pharm Bull.* 1993 May;16(5):448–52.
  20. Morris TA, Marsh JJ, Chiles PG, Kim NH, Noskovack KJ, Magana MM, et al. Abnormally sialylated fibrinogen gamma-chains in a patient with chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Thromb Res.* 2007;119(2):257–9.
  21. Zhu T, Carcaillon L, Martinez I, Cambou J-P, Kyndt X, Guillot K, et al. Association of influenza vaccination with reduced risk of venous thromboembolism. *Thromb Haemost.* 2009 Dec;102(6):1259–64.
  22. Miller RF, O'Doherty MJ. Pulmonary nuclear medicine. *Eur J Nucl Med.* 1992;19(5):355–68.
  23. Meyer G, Collignon MA, Guinet F, Jeffrey AA, Barritault L, Sors H. Comparison of perfusion lung scanning and angiography in the estimation of vascular obstruction in acute pulmonary embolism. *Eur J Nucl Med.* 1990;17(6-8):315–9.
  24. Qanadli SD, El Hajjam M, Vieillard-Baron A, Joseph T, Mesurolle B, Oliva VL, et al. New CT index to quantify arterial obstruction in pulmonary embolism: comparison with angiographic index and echocardiography. *AJR Am J Roentgenol.* 2001 Jun;176(6):1415–20.
  25. [http://ansm.sante.fr/var/ansm\\_site/storage/original/application/5e0d9dde31597a32d4f5c315a7690521.pdf](http://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/5e0d9dde31597a32d4f5c315a7690521.pdf)
  26. Alhadad A, Miniati M, Alhadad H, Gottsäter A, Bajc M. The value of tomographic ventilation/perfusion scintigraphy (V/PSPECT) for follow-up and prediction of recurrence in pulmonary embolism. *Thromb Res.* 2012 Dec;130(6):877–81.
  27. den Exter PL, van Es J, Kroft LJM, Erkens PMG, Douma RA, Mos ICM, et al. Thromboembolic resolution assessed by CT pulmonary angiography after treatment for acute pulmonary embolism. *Thromb Haemost.* 2015 Jul;114(1):26–34.
  28. Pesavento R, Visonà A, Villalta S, Vescovo G, Cuppini S, Beltramello G, et al. Residual pulmonary obstruction and the risk of late complications in patients with pulmonary embolism. *Thromb Res.* 2016 Jan;137:228–30.
  29. Menéndez R, Nauffal D, Cremades MJ. Prognostic factors in restoration of pulmonary flow after submassive pulmonary embolism: a multiple regression analysis. *Eur Respir J.* 1998 Mar;11(3):560–4.
  30. Siebenlist KR, Mosesson MW. Progressive cross-linking of fibrin gamma chains increases resistance to fibrinolysis. *J Biol Chem.* 1994 Nov 11;269(45):28414–9.
  31. Klok FA, Dzikowska-Diduch O, Kostrubiec M, Vliegen HW, Pruszczyk P, Hasenfuß G, et al. Derivation of a clinical prediction score for chronic thromboembolic pulmonary hypertension after acute pulmonary embolism. *J Thromb Haemost JTH.* 2016 Jan;14(1):121–8.
  32. Hogg K, Kimpton M, Carrier M, Coyle D, Forgie M, Wells P. Estimating quality of life in acute venous thrombosis. *JAMA Intern Med.* 2013 Jun 24;173(12):1067–72.
  33. Nijkeuter M, Hovens MMC, Davidson BL, Huisman MV. Resolution of thromboemboli in patients with acute pulmonary embolism: a systematic review. *Chest.* 2006 Jan;129(1):192–7.
  34. van Es J, Douma RA, Kamphuisen PW, Gerdes VEA, Verhamme P, Wells PS, et al.

Clot resolution after 3 weeks of anticoagulant treatment for pulmonary embolism: comparison of computed tomography and perfusion scintigraphy. *J Thromb Haemost JTH*. 2013 Apr;11(4):679–85.

35. Dang CV, Shin CK, Bell WR, Nagaswami C, Weisel JW. Fibrinogen sialic acid residues are low affinity calcium-binding sites that influence fibrin assembly. *J Biol Chem*. 1989 Sep 5;264(25):15104–8.

36. Martinez J, MacDonald KA, Palascak JE. The role of sialic acid in the dysfibrinogenemia associated with liver disease: distribution of sialic acid on the constituent chains. *Blood*. 1983 Jun;61(6):1196–202.

37. Maghzal GJ, Brennan SO, George PM. The sialic acid content of fibrinogen decreases during pregnancy and increases in response to fibrate therapy. *Thromb Res*. 2005;115(4):293–9.

38. Mosesson MW. Fibrinogen and fibrin structure and functions. *J Thromb Haemost JTH*. 2005 Aug;3(8):1894–904.

39. Modarai B, Burnand KG, Humphries J, Waltham M, Smith A. The role of neovascularisation in the resolution of venous thrombus. *Thromb Haemost*. 2005 May;93(5):801–9.

## Tables

**Table 1. Cohort 1 patients' characteristics:**

	Cohort 1 (n=129)	Patients with RVO ≤ 10% (n=97)		Patients with RVO > 10% (n=32)		p
Age, years, mean (SD) <sup>£</sup>	52.4 ± 19	97	50.5 ± 18	32	58.5 ± 21	0.057
Male, n (%)	59 (45.7%)	97	44 (42.7%)	32	15 (46.8%)	0.88
Provoked VTE <sup>μ</sup> n (%)	68 (52.7%)	97	55 (56.7%)	32	13 (40.6%)	0.11
Trauma < 3 months, n (%)	13 (10%)		11 (11.3%)		2 (6.2%)	0.41
Surgery < 3 months, n (%)	16 (12.4%)		13 (13.4%)		3 (9.4%)	0.55
History of cancer, n (%)	4 (3.1%)	97	3 (3%)	32	1 (3.1%)	0.81
Hormonal therapy*, n (%)	33 (25.5%)	97	25 (25.8%)	32	8 (25%)	0.92
Family history of VTE <sup>μ</sup> , n (%)	44 (34.1%)	97	32 (33%)	32	12 (37.5%)	0.93
Time between symptoms and PE diagnosis, days, mean (SD)	10.7 ± 16	93	8.4 ± 14.4	30	17.6 ± 18.8	0.019
Initial pulmonary vascular obstruction, Mean (SD), %	38.2% ± 25.7	74	32.1 ± 23.1	26	55.7 ± 25.1	0.0001
Time from PE Diagnosis to V/Q lung scan, days (SD)	8.36 ± 2.54	97	8.5 ± 2.6	32	7.8 ± 2.2	0.18
RPVO, mean (SD), %	8.1 ± 11.7	97	3.2 ± 2.7	32	22.8 ± 15.8	<0.00001
Length of anticoagulant days mean (SD)	210 ± 81	20	207 ± 82	22	218 ± 25	0.58

\* hormonal therapy : contraceptive and hormone replacement

£ SD : Standard derivation

<sup>μ</sup> VTE : Venous thromboembolism

**Table 2. Models of prediction of RVO >10% in cohort 1**

	Fibrinogen model		Combined model	
	Odds Ratio, 95% CI	p	Odds Ratio, 95% CI	p
Fibrinogen $\gamma'$	0.61 (0.39-0.97)	0,038	0.64 (0.42-0.98)	0.01

B $\beta$ -chain mono sialylation	1.09 (0.99-1.21)	0.65	1.07 (0.99-1.17)	0.1
Corrected lysis rate	10.87 (0.35-338.34)	0.17	-	-
Initial obstruction	1.05 (1.03- 1.08)	0.00003	1.04 (1.02- 1.06)	0.0004
Age			-	-
Days from Sx to Dx			1.026 (0.997-1.056)	0.078

Sx : symptom; Dx: Diagnosis

**Table 3. Cohort 2 patients' characteristics:**

	<b>Cohort 2 (n=183)</b>	<b>Patients with RPVO ≤ 10% (n=136)</b>		<b>Patients with RPVO &gt; 10% (n=47)</b>		<b>p</b>
Age, years, mean (SD) <sup>‡</sup>	61.1 ± 18.6	136	59 ± 19.4	47	67.3 ± 14.3	0.002
Male, n (%)	65 (35.5%)	136	54 (39.7%)	47	11 (23.4%)	0.044
Provoked VTE <sup>μ</sup> n(%)	100 (54.6%)	136	75 (55.8%)	47	25 (53.2%)	0.81
Trauma < 3 months, n (%)	17 (9.2%)	136	14 (10.3%)	47	3 (6.4%)	0.42
Surgery < 3 months, n (%)	33 (18%)	136	25 (18.4%)	47	8 (17%)	0.83
History of cancer, n (%)	22 (12%)	136	18 (13.2%)	47	4 (8.5%)	0.39
Hormonal therapy*	36 (19.6%)	136	29 (21.3%)	47	7 (14.9%)	0.34
Family history of VTE <sup>μ</sup>	36 (19.6%)	136	31 (22.8%)	47	5 (10.6%)	0.12
Time between symptoms and diagnosis, days, mean (SD)	14.1 ± 28.6	132	12.2 ± 25.4	44	19.8 ± 36.3	0.21
Initial vascular obstruction, mean (SD)	34 ± 22.6	135	30.3 ± 21.7	45	45 ± 21.9	0.00002
Time from diagnosis to V/Q lung scan	10.9 ± 3.7	135	11.2 ± 3.7	47	10.2 ± 3.5	0.13
RPVO	6.8 ± 12.7	136	1 ± 2.1	47	23.5 ± 15.6	<0.00001
Length of anticoagulant (days)	232 ± 172	115	230 ± 157	34	236 ± 216	0.89

\* hormonal therapy : contraceptive and hormone replacement

£ SD : Standard derivation

µ VTE : Venous thromboembolism

**Table 4. Models of prediction of RVO >10% in cohort 2**

	Fibrinogen model		Combined model	
	Odds Ratio, 95% CI	p	Odds Ratio, 95% CI	p
B $\beta$ -chain mono sialylation	1.145 (1.027-1.276)	0.014	1.178 (1.047-1.326)	0.0066
$\beta$ 15-42 N terminal accessibility	0.549 (0.251-1.2)	0.13	-	-
B $\beta$ -chain phosphorylation	0.955 (0.903-1.01)	0.1	0.945 (0.891-1.002)	0.057
$\gamma$ -chain mono sialylation	0.937 (0.863-1.018)	0.08	0.923 (0.844-1.01)	0.08
Initial obstruction	1.034 (1.015-1.054)	0.0004	1.027 (1.007-1.046)	0.0068
Age	-		1.035 (1.006-1.065)	0.019
Thrombolysis	-		10.129 (1.745-58.8)	0.01

**Table 5. Comparison of models to predict residual vascular obstruction.**

	Akaike Information Criterion	
	Cohort 2	Cohort 1
Demographic/clinical model	176.57	105.84
Fibrinogen/fibrin model	142.94	93.376 *
Demographic/clinical & fibrinogen/fibrin model	136.43 *	102.71

\* = best model according to AIC value

**Table 6. Fibrinogen predictors among the 2 cohorts of patients**

Fibrin(ogen) property	Subject enrollment	Prediction for RPVO > 10%	Fibrin(ogen) model (p)	Combined model (p)	
B $\beta$ -chain mono sialylation	Cohort 1	POSITIVE	0.05*	0.1	
	Cohort 2		0.01	0.001*	
Corrected lysis rate	Cohort 1		0.1*	ns	
	Cohort 2		ns	ns	
Fibrinogen $\gamma'$	Cohort 1		NEGATIVE	0.01*	0.01
	Cohort 2			ns	ns
$\beta$ 15-42 N terminal accessibility	Cohort 1	ns		ns	
	Cohort 2	0.1		ns	
B $\beta$ -chain phosphorylation	Cohort 1	ns		ns	
	Cohort 2	0.1		0.05*	
$\gamma$ -chain mono sialylation	Cohort 1	ns		ns	
	Cohort 2	0.1		0.05*	

\* best model according to AIC value, ns = non significant

### **Evaluation du taux des cellules endothéliales circulantes et des progéniteurs à la phase aigüe et au décours d'une première embolie pulmonaire.**

Benjamin Planquette, Anne Roche, Nicolas Gendron, Nour Bacha, David Smadja et Olivier Sanchez

Article en cours de rédaction

#### **1. Rationnel**

Les cellules endothéliales circulantes sont considérées comme des marqueurs d'une agression endothéliale et de son renouvellement [167]. Aucune donnée n'est disponible à ce jour dans l'embolie pulmonaire à la phase aigüe alors qu'il a été montré une forte mobilisation de ces cellules dans des situations pathologiques accompagnées d'une agression endothéliale [170], dont l'hypertension pulmonaire [171].

#### **2. Résultats**

##### **2.1. Principales caractéristiques de la population**

Le tableau 13 présente les principales caractéristiques des patients de la cohorte. La prévalence des séquelles perfusionnelles  $\geq 10\%$  était de 19,6% (n=13). L'obstruction résiduelle était de 7,5 %  $\pm$  18,4 pour l'ensemble des patients, de 2,3%  $\pm$  2,9 pour les patients sans séquelles et de 18,4%  $\pm$  7,7 pour les 13 patients présentant des séquelles perfusionnelles ( $p < 0,0001$ ). Aucune différence n'existait entre les patients avec ou sans séquelles dans la nature des traitements anticoagulants reçus; 1 patient a bénéficié d'une thrombolyse.

**Tableau 13. Principales caractéristiques des patients de la cohorte**

Caractéristiques	N=66
Age au diagnostic - années (moyenne ± EC)	58 ± 18
Sexe masculin (n,%)	34 (51%)
Délai diagnostic - jours (moyenne ± EC)	11,3 ± 16,2
Localisation de l'embolie	
- Lobaire	35 (53%)
- Segmentaire	19 (29%)
- Tronculaire	12 (18%)
Obstruction résiduelle (moyenne ± EC)	7,5 % ± 18,4
Séquelles perfusionnelles	13 (19,6%)

Les 23 témoins sélectionnés avec un âge moyen de 33 ± 12 ans, 12 étaient des hommes (52%).

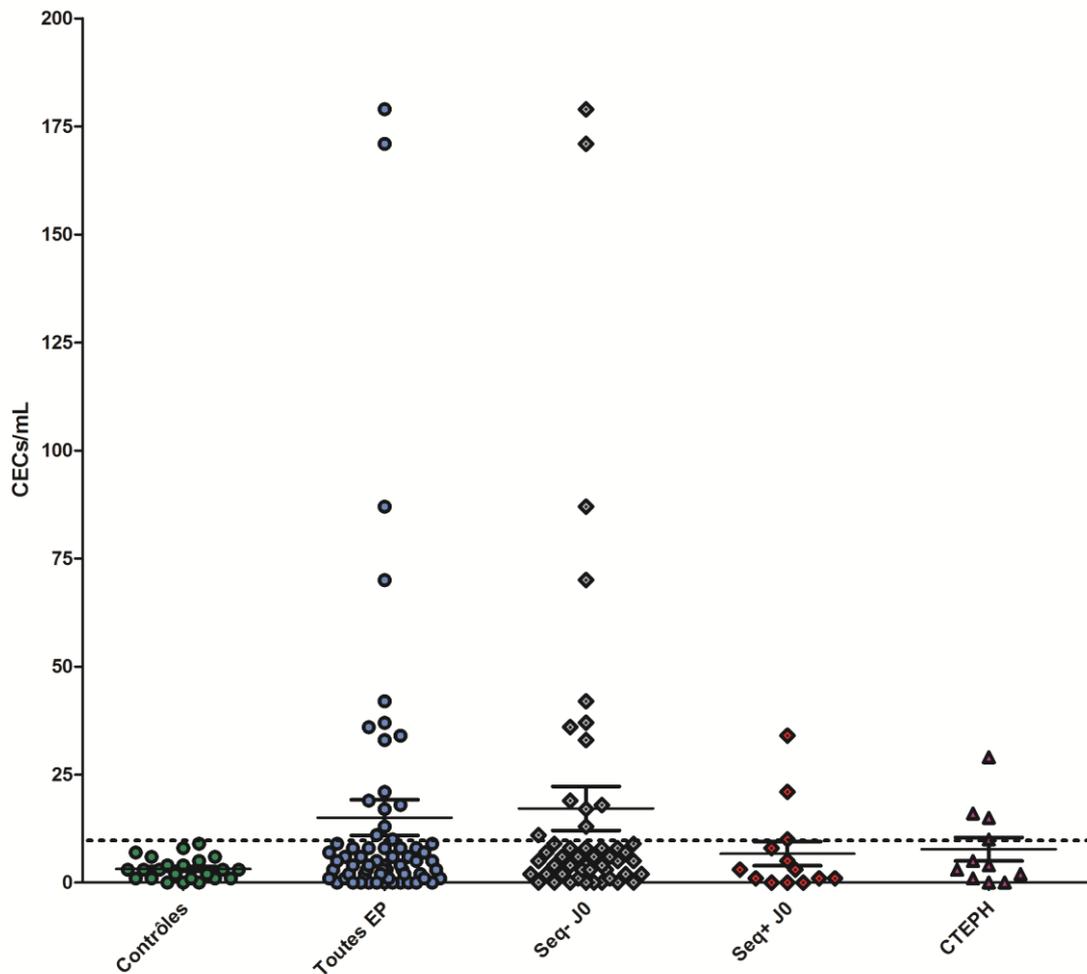
## 2.2. Cellules endothéliales circulantes

Aucune différence significative n'était constatée entre les taux de cellules endothéliales circulantes des témoins sains (3,17± 2,6 cellules/mL) et des patients avec une EP (15,6 ± 33 cellules/mL). Aucune corrélation n'a été retrouvée entre les taux de CEC chez les patients avec une EP et la gravité de celle-ci évaluée par le rapport du ventricule droit sur le ventricule gauche ou le score de sPESI (simplified Pulmonary Embolism Severity Index); Figure 29.

A la phase aigüe de l'EP, les patients qui ne présenteront pas de séquelles ont une élévation significative du taux de CEC par rapport aux témoins (17,2 ± 36 cellules/mL vs 3,17± 2,6 cellules/mL; p=0,04). Le taux de CEC des patients qui présenteront des séquelles n'est pas statistiquement différent de celui des patients qui n'en développeront pas (6,7±10,1 cellules/mL vs 17,2 ± 36 cellules/mL; p=0,23) mais une tendance à la baisse est observée allant dans le même sens que la différence observée entre les patients avec séquelles et les contrôles. Le nombre de patients avec

séquelles est faible et nos manquons certainement de puissance statistique pour montrer une différence entre ces groupes.

**Figure 29. Taux de cellules endothéliales circulantes identifiées en IMS au moment du diagnostic d'EP**



Seq-J0 : patients qui ne présenteront pas de séquelles à J0

Seq+ J0 : patients qui présenteront des séquelles à J0

CTEPH : patients avec une HTP-TEC

Durant le suivi au 3<sup>ème</sup> et au 6<sup>ème</sup> mois, les profils des taux de CEC circulantes chez les patients avec ou sans séquelles sont identiques : les patients sans séquelles avait un taux de CEC plus élevé ( $13,5 \pm 39,8$  cellules/mL et  $7,6 \pm 6,2$  cellules/mL) par rapport aux

patients qui en présenteront ( $20 \pm 65,5$  cellules/mL et  $6,4 \pm 8,6$  cellules/mL) sans que ces différences soient statistiquement significative.

### **3. Discussion**

Notre étude a montré une élévation des CEC à la phase aigue de l'embolie pulmonaire uniquement chez les patients présentant une EP qui ne se complique pas de séquelles. La dysfonction endothéliale est un des mécanismes impliqués dans les phénomènes remodelage vasculaire pulmonaire au cours des maladies vasculaires pulmonaires, en particulier l'HTP-TEC [221], [222]. Un nombre élevé de CEC a été rapporté dans diverses situations cliniques syndrome coronarien aigu, vascularites, syndrome de détresse respiratoire aigu de l'adulte et est considéré être un marqueur d'agression endothéliale [170]. En ce qui concerne l'hypertension artérielle pulmonaire ou le cancer, des élévations des CEC sont plutôt retrouvées en cas de remodelage excessif ou encore d'endothélium hyper prolifératif. Nos résultats montrent que les patients qui développeront un syndrome post EP dont les séquelles sont un stigmate clinique et physiopathologique n'ont pas d'augmentation de CEC à la phase aigue. Leur taux n'est pas non plus modifié au décours de l'EP, ce qui semble cohérent avec un travail préalable de notre équipe [175]. En effet, nous avons montré chez 10 patients avec une HTP-TEC l'absence d'élévation des CEC : les taux de CEC des patients avec séquelles ne semblent pas différents de ceux retrouvés chez les patients avec une HTP-TEC. Ce résultat constitue un aspect singulier de la physiopathologie de la maladie veineuse thromboembolique chronique car les CEC sont élevés au cours de l'hypertension pulmonaire [175] dont elles sont un marqueur pronostic [171], de réponse au traitement et de dégradation clinique [173]. L'absence d'élévation des CEC chez les patients avec séquelles pourrait être interprétée comme une absence de remodelage

endothélial actif chez ces patients. Au contraire, nous pensons qu'il existe une activation endothéliale importante due au thrombus de fibrine formé durant l'EP et que la réaction normale de l'endothélium de générer des CEC comme une réponse réparatrice locale. Nous émettons que l'hypothèse que les patients qui présenteront des séquelles ont une altération importante de ce phénomène de réparation endothéliale. L'hypothèse d'une diminution de mobilisation endothéliale pour recanaliser le thrombus par ces cellules endothéliales mobilisées par le thrombus est possible : alors que la destruction de la fibrine est nécessaire à l'angiogenèse, il a été montré chez les patients avec une HTP-TEC une résistance à la fibrinolyse du caillot [107].

Cette étude a plusieurs limites. La principale limite est son manque de puissance statistique puisque notre cohorte a permis d'identifier 13 patients avec des séquelles perfusionnelles. Une étude sur un effectif plus important permettrait de confirmer les tendances décrites dans notre travail. Par ailleurs, dans la plupart de ces pathologies, l'augmentation des CEC a été associée à une élévation des taux plasmatiques de marqueurs de dysfonction endothéliale incluant le facteur Willebrand, la thrombomoduline soluble, E-sélectine ou encore les molécules d'adhésion comme ICAM-1. Nous allons compléter ce travail en augmentant le nombre de patients inclus, puis en mesurant au niveau plasmatique ces marqueurs de dysfonction vasculaire.

#### **4. Conclusion**

L'étude des cellules endothéliales circulantes et à la phase aiguë de l'embolie pulmonaire met en évidence un dysfonctionnement « endothélial » précoce chez les patients qui développeront des séquelles perfusionnelles, similaire à celui des patients atteints d'HTP-TEC. Nos résultats doivent être confirmés dans une cohorte plus importante et soulignent le rôle probablement central des interactions entre les cellules endothéliales

et/ou leurs progéniteurs et la fibrine dans la physiopathologie de la MTEV dès le premier épisode d'embolie pulmonaire.

## **DISCUSSION**

## **Discussion et perspectives**

---

Après une embolie pulmonaire, la reperfusion *ad integrum* du lit vasculaire est constatée chez une majorité de patients mais près d'un tiers d'entre eux conservent une obstruction vasculaire pulmonaire significative correspondant à une amputation d'au moins 10% de la vascularisation pulmonaire totale. Ces séquelles perfusionnelles sont associées à une altération du pronostic fonctionnel des patients et s'intègrent au cadre nosologique du syndrome post embolie pulmonaire. Cependant, la continuité physiopathologique entre les séquelles et les autres complications du syndrome post embolie pulmonaire, récurrence et HTP-PEC, n'est pas documentée.

Ce travail s'est donc intéressé aux séquelles perfusionnelles après un premier épisode d'embolie pulmonaire. L'ensemble des travaux conduits suggèrent que les séquelles perfusionnelles sont un stade précoce de la maladie thromboembolique chronique en montrant que (1) les séquelles perfusionnelles augmentent le risque de récurrence de maladie veineuse thromboembolique ; (2) que certaines anomalies du fibrinogène sont plus fréquentes chez les patients qui développent des séquelles perfusionnelles et qu'elles pourraient améliorer la prédiction de la survenue de séquelles perfusionnelles et identifier une population de patients à fort risque d'en développer; et (3) qu'il existe une dysrégulation précoce et persistance de la réponse endothéliale à la thrombose endovasculaire chez les patients avec des séquelles comparable à ce qui a été mis en évidence chez les patients avec une HTP-TEC.

### ***Mise en perspective des résultats***

Nos travaux ont montré que la présence de séquelles perfusionnelles  $\geq 10\%$  était un facteur de risque indépendant de présenter une récurrence d'embolie pulmonaire. Il s'agit d'un résultat nouveau qui s'oppose à la plupart des résultats jusqu'à présent publiés

[49], [50], [92]. Notre étude a plusieurs forces : elle a inclus plus de 300 patients avec un premier épisode de MVTE permettant de s'amender de séquelles vasculaires préexistantes et a utilisé la scintigraphie pulmonaire de ventilation-perfusion pour détecter les séquelles. Ce résultat est un argument important pour considérer que la maladie veineuse thromboembolique chronique témoigne de mécanismes physiopathologiques chroniques et continus. Tous les patients présentant des séquelles perfusionnelles ne présenteront pas une récurrence de la maladie ou une HTP-TEC témoignant probablement de l'intrication d'autres facteurs dans la survenue de ces complications. Néanmoins, prévenir la survenue de séquelles paraît aujourd'hui pouvoir devenir un objectif thérapeutique lors de la prise en charge des patients afin de limiter le risque de complications chroniques de la maladie. Dans ce sens, une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques impliqués est une étape importante. Nos travaux montrent l'importance du fibrinogène et de la fibrine dans ces mécanismes. En effet, nous montrons qu'un faible degré de sialylation de la chaîne B $\beta$  du fibrinogène est associé à la survenue de séquelles perfusionnelles. Le degré de sialylation a un impact sur l'agencement des protofibrilles au sein du réseau de fibrine [223] et un faible contenu en acide sialique du fibrinogène a été rapporté dans certains états pro coagulants, comme la grossesse [224]. Notre étude ne montre pas d'association des séquelles à une diminution du taux de lyse de la fibrine par la plasmine contrairement à ce qu'ont rapporté Lami et al [164]. Des différences méthodologiques importantes peuvent expliquer la différence de résultats : Lami et al ont présenté les résultats du temps de lyse brut alors que nous avons rapporté les temps de lyse corrigé, c'est à dire rapporté à l'absorbance initiale, qui est reconnu être le paramètre le plus adapté pour évaluer la fibrinolyse [116]. Nous avons travaillé à partir de fibrinogène purifié alors que Lami et al ont travaillé sur du plasma complet. C'est pourquoi nous pensons que ces

résultats délivrent deux informations complémentaires. Le fibrinogène ne favorise pas les séquelles par la résistance à la lyse. Nous émettons l'hypothèse que la présence de certains « phénotypes » de fibrinogène, comme les fibrines pauvres en acide sialique, modifient les processus de réparation endothéliale. Enfin, la persistance du fibrinogène dans les vaisseaux dont témoigne la résistance à la lyse du caillot issu de plasma complet évoquant l'action d'autres enzymes [225], en particulier le facteur XIII dont certains polymorphismes ont été associés à la maladie veineuse thromboembolique [226]–[228] et dont l'action enzymatique augmente la résistance à la lyse [117], [229]. Les résultats de Lami sont donc un argument pour une maladie multifactorielle à l'origine de « phénotypes » complexes associant différents acteurs de la coagulation/fibrinolyse et de l'angiogenèse dans la survenue de complications chroniques.

Enfin, notre hypothèse d'une interaction entre les cellules du compartiment endothélial et le fibrinogène est supportée par nos résultats d'analyse des cellules endothéliales circulantes à la phase aiguë et au décours d'une première embolie pulmonaire. De façon très intéressante, les patients qui développent des séquelles perfusionnelles ne semblent pas mobiliser pas ces cellules dès la phase aiguë et au décours de l'épisode témoignant d'une probable altération de la réparation endothéliale. De façon intéressante, des résultats similaires ont été retrouvés chez des patients avec une HTP-TEC mais pas chez des patients avec une hypertension pulmonaire d'un autre groupe [175]. Les séquelles seraient un stade précoce favorable à la survenue d'une HTP-TEC et témoigneraient d'une dysfonction endothéliale précoce et persistante. Dans ce sens, Guérin et al avaient montré que les patients avec des séquelles puis une HTP-TEC avaient dès le diagnostic d'embolie pulmonaire des stigmates de lésions vasculaires chroniques [36]. Il semble donc que l'identification d'une population à risque d'en

présenter permettrait de définir un groupe de patients chez qui une thérapie spécifique pourrait être proposée.

### ***Réponse thérapeutique***

Plusieurs options pourraient être envisagées chez les patients à risque de séquelles. La première consisterait à maintenir le traitement anticoagulant dans cette population à risque. Si cette stratégie est efficace pour prévenir les récurrences et améliore le pronostic des patients [81], elle ne semble pas limiter l'incidence des séquelles perfusionnelles qui concernent 30 à 40% des patients après une EP traités par anticoagulants [57]. L'utilisation de la fibrinolyse chez ces patients à risque pourrait être une autre option car elle permet de réduire rapidement la masse de thrombus comme l'attestent plusieurs études ayant comparé la thrombolyse à l'héparine efficace [230]–[232]. Cette stratégie paraît discutable car la fibrinolyse n'a pas été identifiée comme un facteur de risque de séquelles perfusionnelles [48] ou d'HTP-TEC [37] jusqu'aux travaux récents publiés par Klok et al [233]. D'autre part, la fibrinolyse pharmacologique ne permet pas une destruction complète des caillots et son action est limitée dans le temps comme l'attestent les études l'ayant comparé à l'anticoagulation efficace seule [230]–[232] : au 8<sup>ème</sup> jour de traitement par les fibrinolytiques ou les anticoagulants, les résistances vasculaires pulmonaires sont comparables dans les deux groupes de patients témoignant d'une obstruction résiduelle comparable. Enfin, des données de suivi à long terme de l'étude PEITHO [222], soumises pour publication qui a comparé la thrombolyse à l'anticoagulation efficace chez des patients avec des embolies pulmonaires de gravité intermédiaire haute, ne montrent pas de différence d'incidence de l'HTP-TEC dans les deux groupes de patients. Toutefois, aucune analyse des séquelles scintigraphiques n'a été réalisée dans cette étude.

Agir sur la coagulation et sur la fibrinolyse ne semblent donc ni prometteur ni novateur. D'autres options pourraient être envisagées si nos résultats étaient reproduits dans d'autres cohortes et si les interactions fibrine-cellules endothéliales étaient mieux comprises dans ce contexte. Nos résultats identifient l'accessibilité à l'épitope  $\beta$ 15-42 comme une caractéristique fonctionnelle de la fibrine associée à la survenue de séquelles dans l'une de nos deux cohortes. Son rôle est aussi évoqué par nos résultats sur le fibrinogène San Diego V d'un patient souffrant d'HTP-TEC. Cette séquence peptidique de la partie N terminale de la chaîne B $\beta$  du fibrinogène est impliquée dans les interactions avec les cellules du compartiment endothélial. De façon intéressante, un peptide formé par la dimérisation de cette séquence présente des propriétés inhibitrices par compétition pour ses ligands [140]. Les travaux de Petzelbauer et al ont montré que ce peptide limitait la transmigration de leucocytes in vitro et, dans un modèle d'ischémie myocardique chez le rat, et réduisait les lésions d'ischémie reperfusion après un infarctus en limitant l'infiltration par des leucocytes et la taille de la zone ischémisée [206]. Des souris déficientes pour le fibrinogène avaient des infarctus de plus petites tailles que des souris sauvages. Des résultats similaires ont été mis en évidence sur les lésions d'ischémie-reperfusion du rein lors de transplantation d'organe [235]. Par ailleurs, il a été montré que VLDLr avait comme ligand le TFPI, seule protéine de la coagulation qui était augmenté chez les patients avec séquelles dans l'étude de Sanchez et al. [48]. Hembrough et al ont montré que l'action antiproliférative et antiangiogénique du TFPI était liée à son association avec VLDLr [144]. Nous émettons donc l'hypothèse que la réparation endothéliale est en partie altérée après certaines embolies pulmonaires car il existerait un déséquilibre entre les actions de l'épitope  $\beta$ 15-42 et celle du TFPI. Ces résultats confortent aussi notre choix d'étudier les interactions fibrine

– progéniteurs endothéliaux et d'en comprendre les mécanismes afin d'essayer de limiter la survenue de séquelles perfusionnelles

Enfin, nos travaux suggèrent que le contenu en acide sialique de la fibrine influencerait la survenue de séquelles. Il a été montré chez l'homme que les fibrates, usuellement prescrits dans le traitement des hypertriglycémies, augmentaient le contenu en acide sialique de la fibrine [224]. Le mécanisme par lequel les fibrates agissent sur le fibrinogène est inconnu. Néanmoins, il s'agit d'une option thérapeutique simple et ciblée qui pourrait faire l'objet d'un essai randomisé [236]. Il est à noter que les statines ont été testées dans la prévention de l'embolie pulmonaire, néanmoins le nombre de patients à traiter dans une population non sélectionnée était trop important pour que ce traitement s'impose.

Nos données permettent de suspecter que le fibrinogène joue un rôle important dans la dysrégulation endothéliale précoce après une embolie pulmonaire, néanmoins le recrutement de progéniteurs endothéliaux dans le thrombus est un des mécanismes importants de sa résolution. Il a été montré que l'exercice physique permettait à la fois la mobilisation dans le sang de progéniteurs endothéliaux circulants mais aussi modifiait leur capacité proliférative et angiogénique [237], [238]. Par ailleurs, l'exercice améliore les performances à l'effort des patients après une embolie pulmonaire [239]. Aucun mécanisme n'a été identifié pour expliquer cette amélioration des performances après la réhabilitation mais nous émettons l'hypothèse celle-ci soit expliquée par une réduction de l'incidence des séquelles perfusionnelles.

### ***Perspectives de recherche translationnelle***

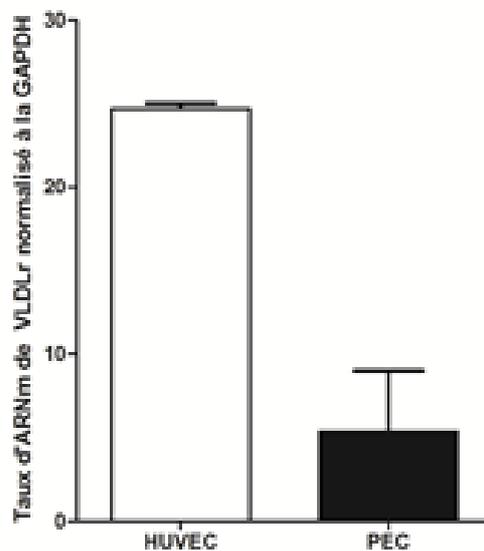
Nous envisageons de valider nos résultats sur la cohorte issue de l'étude PADIS-EP qui a inclus des patients avec un premier épisode d'embolie pulmonaire non provoquée et suivis pendant 5 ans.

Les interactions fibrine-PEC pourraient expliquer en partie de la transition d'une maladie de l'hémostase vers une vasculopathie complexe. Les résultats de l'analyse de l'accessibilité de l'épitope  $\beta$ 15-42 de la dysfibrinogénémie San Diego V et l'identification de cette même mesure comme un des critères prédictifs de séquelles perfusionnelles sont des arguments pour étudier les interactions entre la fibrine, sa séquence  $\beta$ 15-42 et les progéniteurs endothéliaux. Notre principale hypothèse est que la résolution incomplète des thrombus peut moduler la stimulation des PEC et promouvoir le remodelage microvasculaire constaté dans les lésions à l'origine des séquelles après une EP puis d'HTP-TEC par une régulation positive excessive des mécanismes de recrutement des PEC et de leurs actions pro-angiogéniques.

Ce travail aura pour objectif premier de mettre en évidence VLDLr sur les ECFCs et d'en décrire l'expression en fonction de la stimulation par différents facteurs de croissance (VEGF, FGF), cytokines pro inflammatoires (TNF $\alpha$  ou IL-8), de la thrombine et du nombre de passages des ECFCs. Les interactions entre le domaine  $\beta$ 15-42 de la fibrine et le récepteur VLDLr sur les capacités angiogéniques et vasculogéniques des ECFCs seront ensuite étudiées en comparant des ECFCs contrôles à des ECFCs où l'expression de VLDLr aura été inhibée (silencing) ou stimulée, en fonction de nos résultats préliminaires. Pour ce faire, les ECFCs en culture seront traitées par le peptide  $\beta$ 15-42 sous forme de monomère puis dimérisée. Les différentes étapes de la vasculogénèse seront analysées par l'étude de la prolifération cellulaire, de la différenciation des cellules lors de la formation de tubes vasculaires sur Matrigel® in vitro, de la migration des ECFC induite par le VEGF et le SDF-1, de l'adhésion des ECFC et la formation de vaisseaux dans le modèle d'implant de Matrigel® chez la souris Nude. En fonction de nos résultats, des expériences similaires seront réalisées sur des plaques coatées par des gels de fibrine de structure différentes, des fibrines plus ou moins riches en acide

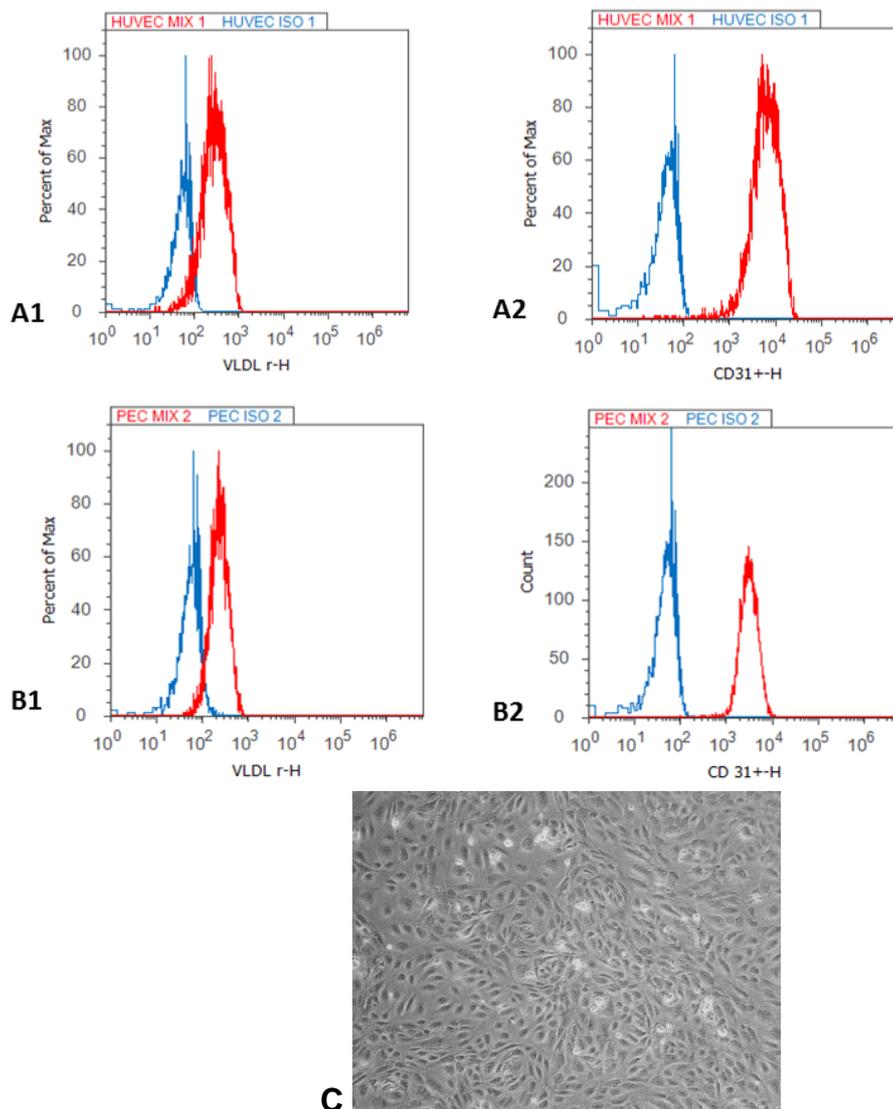
sialique puis de patients de nos cohortes avec une première EP et certaines dysfibrinogénémies San Diego. Nos premiers résultats préliminaires sont encourageants et montrent que le récepteur est exprimé par les ECFCs mais de façon moins importante que les cellules endothéliales (figure 30).

**Figure 30. Résultats préliminaires : expression de l'ARN de VLDLr par les cellules endothéliales (RT-PCT, méthode Taqman®).**



Nous avons aussi montré la présence de VLDL récepteur sur les ECFCs en cytométrie de flux et mis au point le silencing de VLDLr sur les ECFCs en montrant une diminution de l'expression de VLDLr de 55% à 48 heures (figures 31 et 32).

**Figure 31. Expression de VLDLr par les HUVEC et les ECFCs (cytométrie)**

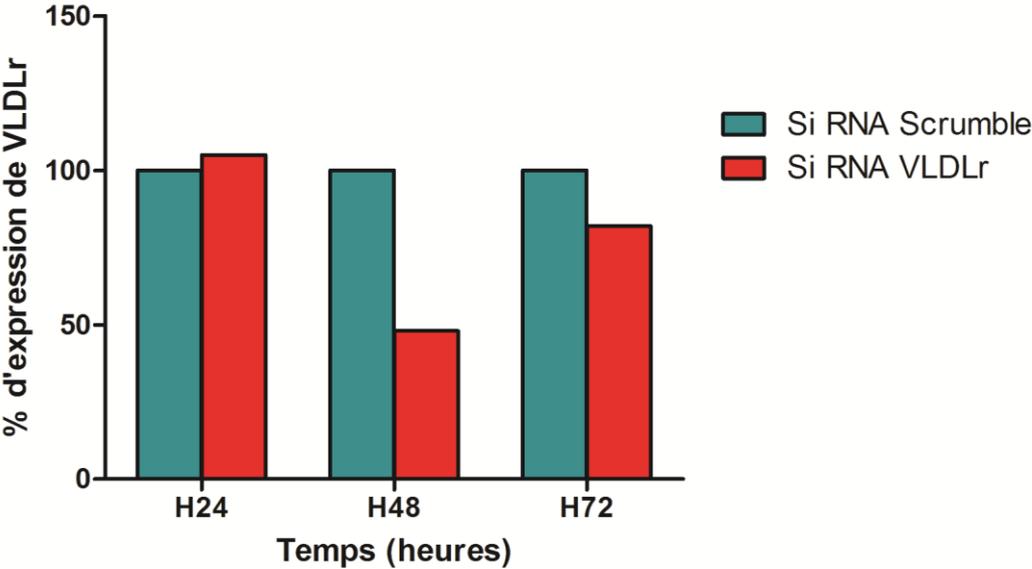


A : HUVEC (cellules endothéliales de cordon ombilical humain), A1 marquage pour VLDLr et A2 marquage pour le CD31.

B : PEC, B1 marquage pour VLDLr et B2 marquage pour le CD31.

C: aspect des PEC en culture (grossissement x 10)

**Figure 32. Silencing de l'expression de VLDLr par les PECs (n=2)**



## **CONCLUSION**

## **Conclusion**

---

Ce travail montre que les séquelles perfusionnelles après une embolie pulmonaire sont associées à une majoration du risque de récurrence de la maladie. Le fibrinogène semble participer à la survenue de ces lésions vasculaires témoignant probablement de lésions de vasculopathie précoce. L'absence de mobilisation de cellules endothéliales circulantes à la phase aiguë et au décours de l'embolie pulmonaire chez les patients qui présenteront des séquelles est un argument en faveur d'une faible régénération de l'endothélium lésé. Des travaux complémentaires afin de confirmer certains de nos résultats et de préciser les mécanismes de l'interaction entre la fibrine et les progéniteurs endothéliaux sont nécessaires pour améliorer notre compréhension de ces lésions fréquentes, invalidantes et associées aux complications chroniques de l'embolie pulmonaire.

## **REFERENCES**

## Références

---

- [1] J. A. Heit, "The epidemiology of venous thromboembolism in the community," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 28, no. 3, pp. 370–372, Mar. 2008.
- [2] A. T. Cohen *et al.*, "Venous thromboembolism (VTE) in Europe. The number of VTE events and associated morbidity and mortality," *Thromb. Haemost.*, vol. 98, no. 4, pp. 756–764, Oct. 2007.
- [3] M. D. Silverstein, J. A. Heit, D. N. Mohr, T. M. Petterson, W. M. O'Fallon, and L. J. Melton, "Trends in the incidence of deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a 25-year population-based study," *Arch. Intern. Med.*, vol. 158, no. 6, pp. 585–593, Mar. 1998.
- [4] F. A. Spencer *et al.*, "The Worcester Venous Thromboembolism study: a population-based study of the clinical epidemiology of venous thromboembolism," *J. Gen. Intern. Med.*, vol. 21, no. 7, pp. 722–727, Jul. 2006.
- [5] E. Oger, "Incidence of venous thromboembolism: a community-based study in Western France. EPI-GETBP Study Group. Groupe d'Etude de la Thrombose de Bretagne Occidentale," *Thromb. Haemost.*, vol. 83, no. 5, pp. 657–660, May 2000.
- [6] M. Nordström, B. Lindblad, D. Bergqvist, and T. Kjellström, "A prospective study of the incidence of deep-vein thrombosis within a defined urban population," *J. Intern. Med.*, vol. 232, no. 2, pp. 155–160, Aug. 1992.
- [7] J. Hippisley-Cox and C. Coupland, "Development and validation of risk prediction algorithm (QThrombosis) to estimate future risk of venous thromboembolism: prospective cohort study," *BMJ*, vol. 343, p. d4656, Aug. 2011.
- [8] A. Delluc *et al.*, "Current incidence of venous thromboembolism and comparison with 1998: a community-based study in Western France," *Thromb. Haemost.*, vol. 116, no. 5, Jul. 2016.
- [9] S. Z. Goldhaber, L. Visani, and M. De Rosa, "Acute pulmonary embolism: clinical outcomes in the International Cooperative Pulmonary Embolism Registry (ICOPER)," *Lancet Lond. Engl.*, vol. 353, no. 9162, pp. 1386–1389, Apr. 1999.
- [10] J. Tsai, K. Abe, S. L. Boulet, M. G. Beckman, W. C. Hooper, and A. M. Grant, "Predictive accuracy of 29-comorbidity index for in-hospital deaths in US adult hospitalizations with a diagnosis of venous thromboembolism," *PloS One*, vol. 8, no. 7, p. e70061, 2013.
- [11] G. Le Gal *et al.*, "A positive compression ultrasonography of the lower limb veins is highly predictive of pulmonary embolism on computed tomography in suspected patients," *Thromb. Haemost.*, vol. 95, no. 6, pp. 963–966, Jun. 2006.
- [12] N. S. Gibson *et al.*, "Further validation and simplification of the Wells clinical decision rule in pulmonary embolism," *Thromb. Haemost.*, vol. 99, no. 1, pp. 229–234, Jan. 2008.
- [13] "Optimum duration of anticoagulation for deep-vein thrombosis and pulmonary embolism. Research Committee of the British Thoracic Society," *Lancet Lond. Engl.*, vol. 340, no. 8824, pp. 873–876, Oct. 1992.
- [14] S. Schulman *et al.*, "A comparison of six weeks with six months of oral anticoagulant therapy after a first episode of venous thromboembolism. Duration of Anticoagulation Trial Study Group," *N. Engl. J. Med.*, vol. 332, no. 25, pp. 1661–1665, Jun. 1995.
- [15] P. Prandoni *et al.*, "The long-term clinical course of acute deep venous thrombosis," *Ann. Intern. Med.*, vol. 125, no. 1, pp. 1–7, Jul. 1996.
- [16] C. Kearon *et al.*, "A comparison of three months of anticoagulation with extended

- anticoagulation for a first episode of idiopathic venous thromboembolism," *N. Engl. J. Med.*, vol. 340, no. 12, pp. 901–907, Mar. 1999.
- [17] T. Baglin, R. Luddington, K. Brown, and C. Baglin, "Incidence of recurrent venous thromboembolism in relation to clinical and thrombophilic risk factors: prospective cohort study," *Lancet Lond. Engl.*, vol. 362, no. 9383, pp. 523–526, Aug. 2003.
- [18] Authors/Task Force Members *et al.*, "2014 ESC Guidelines on the diagnosis and management of acute pulmonary embolism: The Task Force for the Diagnosis and Management of Acute Pulmonary Embolism of the European Society of Cardiology (ESC) Endorsed by the European Respiratory Society (ERS)," *Eur. Heart J.*, Aug. 2014.
- [19] C. Kearon *et al.*, "Antithrombotic Therapy for VTE Disease: CHEST Guideline and Expert Panel Report," *Chest*, vol. 149, no. 2, pp. 315–352, Feb. 2016.
- [20] J. S. Alpert, R. Smith, J. Carlson, I. S. Ockene, L. Dexter, and J. E. Dalen, "Mortality in patients treated for pulmonary embolism," *JAMA*, vol. 236, no. 13, pp. 1477–1480, Sep. 1976.
- [21] M. Miniati *et al.*, "Survival and restoration of pulmonary perfusion in a long-term follow-up of patients after acute pulmonary embolism," *Medicine (Baltimore)*, vol. 85, no. 5, pp. 253–262, Sep. 2006.
- [22] [http://ansm.sante.fr/var/ansm\\_site/storage/original/application/5e0d9dde31597a32d4f5c315a7690521.pdf](http://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/5e0d9dde31597a32d4f5c315a7690521.pdf)
- [23] M. Wartski and M. A. Collignon, "Incomplete recovery of lung perfusion after 3 months in patients with acute pulmonary embolism treated with antithrombotic agents. THESEE Study Group. Tinzaparin ou Heparin Standard: Evaluation dans l'Embolie Pulmonaire Study," *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.*, vol. 41, no. 6, pp. 1043–1048, Jun. 2000.
- [24] G. Simonneau *et al.*, "A comparison of low-molecular-weight heparin with unfractionated heparin for acute pulmonary embolism. The THESEE Study Group. Tinzaparine ou Heparine Standard: Evaluations dans l'Embolie Pulmonaire," *N. Engl. J. Med.*, vol. 337, no. 10, pp. 663–669, Sep. 1997.
- [25] P. D. Stein *et al.*, "Resolution of pulmonary embolism on CT pulmonary angiography," *AJR Am. J. Roentgenol.*, vol. 194, no. 5, pp. 1263–1268, May 2010.
- [26] A. Aghayev *et al.*, "The rate of resolution of clot burden measured by pulmonary CT angiography in patients with acute pulmonary embolism," *AJR Am. J. Roentgenol.*, vol. 200, no. 4, pp. 791–797, Apr. 2013.
- [27] N. Meneveau *et al.*, "Long-term prognostic value of residual pulmonary vascular obstruction at discharge in patients with intermediate- to high-risk pulmonary embolism," *Eur. Heart J.*, vol. 34, no. 9, pp. 693–701, Mar. 2013.
- [28] J. van Es *et al.*, "Clot resolution after 3 weeks of anticoagulant treatment for pulmonary embolism: comparison of computed tomography and perfusion scintigraphy," *J. Thromb. Haemost. JTH*, vol. 11, no. 4, pp. 679–685, Apr. 2013.
- [29] A. Begic, J. Jögi, A. Hadziredzovic, E. Kucukalic-Selimović, S. Begovic-Hadzimuratovic, and M. Bajc, "Tomographic ventilation/perfusion lung scintigraphy in the monitoring of the effect of treatment in pulmonary embolism: serial follow-up over a 6-month period," *Nucl. Med. Commun.*, vol. 32, no. 6, pp. 508–514, Jun. 2011.
- [30] T. E.-P. Investigators, "Oral Rivaroxaban for the Treatment of Symptomatic Pulmonary Embolism," *N. Engl. J. Med.*, vol. 366, no. 14, pp. 1287–1297, Apr. 2012.
- [31] F. A. Klok *et al.*, "Patient outcomes after acute pulmonary embolism. A pooled survival analysis of different adverse events," *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 181, no. 5, pp. 501–506, Mar. 2010.
- [32] J. A. Heit, "Predicting the risk of venous thromboembolism recurrence," *Am. J.*

*Hematol.*, vol. 87 Suppl 1, pp. S63–67, May 2012.

[33] F. Couturaud *et al.*, “Six Months vs Extended Oral Anticoagulation After a First Episode of Pulmonary Embolism: The PADIS-PE Randomized Clinical Trial,” *JAMA*, vol. 314, no. 1, pp. 31–40, Jul. 2015.

[34] S. Schulman *et al.*, “Post-thrombotic syndrome, recurrence, and death 10 years after the first episode of venous thromboembolism treated with warfarin for 6 weeks or 6 months,” *J. Thromb. Haemost. JTH*, vol. 4, no. 4, pp. 734–742, Apr. 2006.

[35] V. Pengo *et al.*, “Incidence of chronic thromboembolic pulmonary hypertension after pulmonary embolism,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 350, no. 22, pp. 2257–2264, May 2004.

[36] L. Guérin *et al.*, “Prevalence of chronic thromboembolic pulmonary hypertension after acute pulmonary embolism. Prevalence of CTEPH after pulmonary embolism,” *Thromb. Haemost.*, vol. 112, no. 3, pp. 598–605, Sep. 2014.

[37] G. Piazza and S. Z. Goldhaber, “Chronic thromboembolic pulmonary hypertension,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 364, no. 4, pp. 351–360, Jan. 2011.

[38] T. Fernandes, B. Planquette, O. Sanchez, and T. Morris, “From Acute to Chronic Thromboembolic Disease,” *Ann. Am. Thorac. Soc.*, vol. 13 Suppl 3, pp. S207–214, Jul. 2016.

[39] I. M. Lang, R. Pesavento, D. Bonderman, and J. X.-J. Yuan, “Risk factors and basic mechanisms of chronic thromboembolic pulmonary hypertension: a current understanding,” *Eur. Respir. J.*, vol. 41, no. 2, pp. 462–468, Feb. 2013.

[40] S. R. Kahn *et al.*, “Determinants of health-related quality of life during the 2 years following deep vein thrombosis,” *J. Thromb. Haemost. JTH*, vol. 6, no. 7, pp. 1105–1112, Jul. 2008.

[41] S. R. Kahn, H. Partsch, S. Vedantham, P. Prandoni, C. Kearon, and Subcommittee on Control of Anticoagulation of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, “Definition of post-thrombotic syndrome of the leg for use in clinical investigations: a recommendation for standardization,” *J. Thromb. Haemost. JTH*, vol. 7, no. 5, pp. 879–883, May 2009.

[42] F. A. Klok, T. van der Hulle, P. L. den Exter, M. Lankeit, M. V. Huisman, and S. Konstantinides, “The post-PE syndrome: a new concept for chronic complications of pulmonary embolism,” *Blood Rev.*, vol. 28, no. 6, pp. 221–226, Nov. 2014.

[43] J. R. Benotti, I. S. Ockene, J. S. Alpert, and J. E. Dalen, “The clinical profile of unresolved pulmonary embolism,” *Chest*, vol. 84, no. 6, pp. 669–678, Dec. 1983.

[44] S. Brunot, O. Corneloup, V. Latrabe, M. Montaudon, and F. Laurent, “Reproducibility of multi-detector spiral computed tomography in detection of sub-segmental acute pulmonary embolism,” *Eur. Radiol.*, vol. 15, no. 10, pp. 2057–2063, Oct. 2005.

[45] S. D. Qanadli *et al.*, “New CT index to quantify arterial obstruction in pulmonary embolism: comparison with angiographic index and echocardiography,” *AJR Am. J. Roentgenol.*, vol. 176, no. 6, pp. 1415–1420, Jun. 2001.

[46] C. J. Bergin *et al.*, “Chronic thromboembolism: diagnosis with helical CT and MR imaging with angiographic and surgical correlation,” *Radiology*, vol. 204, no. 3, pp. 695–702, Sep. 1997.

[47] A. Reichelt, M. M. Hoeper, M. Galanski, and M. Keberle, “Chronic thromboembolic pulmonary hypertension: evaluation with 64-detector row CT versus digital subtraction angiography,” *Eur. J. Radiol.*, vol. 71, no. 1, pp. 49–54, Jul. 2009.

[48] O. Sanchez *et al.*, “Perfusion defects after pulmonary embolism: risk factors and clinical significance,” *J. Thromb. Haemost. JTH*, vol. 8, no. 6, pp. 1248–1255, Jun. 2010.

[49] R. Pesavento *et al.*, “Residual pulmonary obstruction and the risk of late

complications in patients with pulmonary embolism," *Thromb. Res.*, vol. 137, pp. 228–230, Jan. 2016.

[50] P. L. den Exter *et al.*, "Thromboembolic resolution assessed by CT pulmonary angiography after treatment for acute pulmonary embolism," *Thromb. Haemost.*, vol. 114, no. 1, pp. 26–34, Jul. 2015.

[51] PIOPED Investigators, "Value of the ventilation/perfusion scan in acute pulmonary embolism. Results of the prospective investigation of pulmonary embolism diagnosis (PIOPED)," *JAMA*, vol. 263, no. 20, pp. 2753–2759, May 1990.

[52] G. Meyer, M. A. Collignon, F. Guinet, A. A. Jeffrey, L. Barritault, and H. Sors, "Comparison of perfusion lung scanning and angiography in the estimation of vascular obstruction in acute pulmonary embolism," *Eur. J. Nucl. Med.*, vol. 17, no. 6–8, pp. 315–319, 1990.

[53] B. Cosmi, M. Nijkeuter, M. Valentino, M. V. Huisman, L. Barozzi, and G. Palareti, "Residual emboli on lung perfusion scan or multidetector computed tomography after a first episode of acute pulmonary embolism," *Intern. Emerg. Med.*, vol. 6, no. 6, pp. 521–528, Dec. 2011.

[54] R. Golpe, L. A. P. de Llano, O. Castro-Añón, M. Vázquez-Caruncho, C. González-Juanatey, and M. C. Fariñas, "Long-term outcome of patients with persistent vascular obstruction on computed tomography pulmonary angiography 6 months after acute pulmonary embolism," *Acta Radiol. Stockh. Swed.* 1987, vol. 53, no. 7, pp. 728–731, Sep. 2012.

[55] N. Tunariu *et al.*, "Ventilation-perfusion scintigraphy is more sensitive than multidetector CTPA in detecting chronic thromboembolic pulmonary disease as a treatable cause of pulmonary hypertension," *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.*, vol. 48, no. 5, pp. 680–684, May 2007.

[56] Authors/Task Force Members: *et al.*, "2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The Joint Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS) Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT)," *Eur. Heart J.*, Aug. 2015.

[57] M. Nijkeuter, M. M. C. Hovens, B. L. Davidson, and M. V. Huisman, "Resolution of thromboemboli in patients with acute pulmonary embolism: a systematic review," *Chest*, vol. 129, no. 1, pp. 192–197, Jan. 2006.

[58] F. A. Klok, J. E. Tijmensen, M. L. A. HaecK, K. W. van Kralingen, and M. V. Huisman, "Persistent dyspnea complaints at long-term follow-up after an episode of acute pulmonary embolism: results of a questionnaire," *Eur. J. Intern. Med.*, vol. 19, no. 8, pp. 625–629, Dec. 2008.

[59] F. A. Klok, K. W. van Kralingen, A. P. J. van Dijk, F. H. Heyning, H. W. Vliegen, and M. V. Huisman, "Prevalence and potential determinants of exertional dyspnea after acute pulmonary embolism," *Respir. Med.*, vol. 104, no. 11, pp. 1744–1749, Nov. 2010.

[60] B. G. Stevinson, J. Hernandez-Nino, G. Rose, and J. A. Kline, "Echocardiographic and functional cardiopulmonary problems 6 months after first-time pulmonary embolism in previously healthy patients," *Eur. Heart J.*, vol. 28, no. 20, pp. 2517–2524, Oct. 2007.

[61] J. A. Kline, M. T. Steuerwald, M. R. Marchick, J. Hernandez-Nino, and G. A. Rose, "Prospective evaluation of right ventricular function and functional status 6 months after acute submassive pulmonary embolism: frequency of persistent or subsequent elevation in estimated pulmonary artery pressure," *Chest*, vol. 136, no. 5, pp. 1202–1210,

Nov. 2009.

- [62] F. Michard, G. Meyer, M. Wysocki, J. L. Diehl, A. Mercat, and H. Sors, "Cardiorespiratory efficacy of thrombolytic therapy in acute massive pulmonary embolism: identification of predictive factors," *Eur. Respir. J.*, vol. 13, no. 3, pp. 610–615, Mar. 1999.
- [63] C. McCabe *et al.*, "Inefficient exercise gas exchange identifies pulmonary hypertension in chronic thromboembolic obstruction following pulmonary embolism," *Thromb. Res.*, vol. 132, no. 6, pp. 659–665, 2013.
- [64] F. A. Klok *et al.*, "Quality of life in long-term survivors of acute pulmonary embolism," *Chest*, vol. 138, no. 6, pp. 1432–1440, Dec. 2010.
- [65] J. van Es *et al.*, "Quality of life after pulmonary embolism as assessed with SF-36 and PEmb-QoL," *Thromb. Res.*, vol. 132, no. 5, pp. 500–505, Nov. 2013.
- [66] K. Hogg, M. Kimpton, M. Carrier, D. Coyle, M. Forgie, and P. Wells, "Estimating quality of life in acute venous thrombosis," *JAMA Intern. Med.*, vol. 173, no. 12, pp. 1067–1072, Jun. 2013.
- [67] J. A. Heit, M. D. Silverstein, D. N. Mohr, T. M. Petterson, W. M. O'Fallon, and L. J. Melton, "Predictors of survival after deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a population-based, cohort study," *Arch. Intern. Med.*, vol. 159, no. 5, pp. 445–453, Mar. 1999.
- [68] C. Kearon, S. M. Stevens, and J. A. Julian, "D-Dimer Testing in Patients With a First Unprovoked Venous Thromboembolism," *Ann. Intern. Med.*, vol. 162, no. 9, p. 671, May 2015.
- [69] A. Iorio *et al.*, "Risk of recurrence after a first episode of symptomatic venous thromboembolism provoked by a transient risk factor: a systematic review," *Arch. Intern. Med.*, vol. 170, no. 19, pp. 1710–1716, Oct. 2010.
- [70] F. Boutitie *et al.*, "Influence of preceding length of anticoagulant treatment and initial presentation of venous thromboembolism on risk of recurrence after stopping treatment: analysis of individual participants' data from seven trials," *BMJ*, vol. 342, p. d3036, May 2011.
- [71] P. Prandoni *et al.*, "The risk of recurrent venous thromboembolism after discontinuing anticoagulation in patients with acute proximal deep vein thrombosis or pulmonary embolism. A prospective cohort study in 1,626 patients," *Haematologica*, vol. 92, no. 2, pp. 199–205, Feb. 2007.
- [72] T. Baglin *et al.*, "Does the clinical presentation and extent of venous thrombosis predict likelihood and type of recurrence? A patient-level meta-analysis," *J. Thromb. Haemost. JTH*, vol. 8, no. 11, pp. 2436–2442, Nov. 2010.
- [73] J. D. Douketis, C. Kearon, S. Bates, E. K. Duku, and J. S. Ginsberg, "Risk of fatal pulmonary embolism in patients with treated venous thromboembolism," *JAMA*, vol. 279, no. 6, pp. 458–462, Feb. 1998.
- [74] G. Agnelli *et al.*, "Extended oral anticoagulant therapy after a first episode of pulmonary embolism," *Ann. Intern. Med.*, vol. 139, no. 1, pp. 19–25, Jul. 2003.
- [75] M. Di Nisio, N. van Es, and H. R. Büller, "Deep vein thrombosis and pulmonary embolism," *Lancet Lond. Engl.*, Jun. 2016.
- [76] K. Bouillon, M. Bertrand, L. Boudali, P. Ducimetière, R. Dray-Spira, and M. Zureik, "Short-Term Risk of Bleeding During Heparin Bridging at Initiation of Vitamin K Antagonist Therapy in More Than 90 000 Patients With Nonvalvular Atrial Fibrillation Managed in Outpatient Care," *J. Am. Heart Assoc.*, vol. 5, no. 11, Oct. 2016.
- [77] F. A. Spencer *et al.*, "Venous thromboembolism in the elderly. A community-based perspective," *Thromb. Haemost.*, vol. 100, no. 5, pp. 780–788, Nov. 2008.

- [78] S. Schulman, C. Kearon, and Subcommittee on Control of Anticoagulation of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, "Definition of major bleeding in clinical investigations of antihemostatic medicinal products in non-surgical patients," *J. Thromb. Haemost. JTH*, vol. 3, no. 4, pp. 692–694, Apr. 2005.
- [79] F. A. Klok *et al.*, "Prediction of bleeding events in patients with venous thromboembolism on stable anticoagulation treatment," *Eur. Respir. J.*, Jul. 2016.
- [80] C. Kearon *et al.*, "Categorization of patients as having provoked or unprovoked venous thromboembolism: guidance from the SSC of ISTH," *J. Thromb. Haemost. JTH*, vol. 14, no. 7, pp. 1480–1483, Jul. 2016.
- [81] C. Bova, A. Bianco, V. Mascaro, and C. G. A. Nobile, "Extended anticoagulation and mortality in venous thromboembolism. A meta-analysis of six randomized trials," *Thromb. Res.*, vol. 139, pp. 22–28, Mar. 2016.
- [82] G. Palareti *et al.*, "D-dimer testing to determine the duration of anticoagulation therapy," *N. Engl. J. Med.*, vol. 355, no. 17, pp. 1780–1789, Oct. 2006.
- [83] G. Palareti *et al.*, "D-dimer to guide the duration of anticoagulation in patients with venous thromboembolism: a management study," *Blood*, vol. 124, no. 2, pp. 196–203, Jul. 2014.
- [84] M. Verhovsek *et al.*, "Systematic review: D-dimer to predict recurrent disease after stopping anticoagulant therapy for unprovoked venous thromboembolism," *Ann. Intern. Med.*, vol. 149, no. 7, pp. 481–490, W94, Oct. 2008.
- [85] J. Ensor, R. D. Riley, D. Moore, K. I. E. Snell, S. Bayliss, and D. Fitzmaurice, "Systematic review of prognostic models for recurrent venous thromboembolism (VTE) post-treatment of first unprovoked VTE," *BMJ Open*, vol. 6, no. 5, p. e011190, May 2016.
- [86] M. A. Rodger *et al.*, "Identifying unprovoked thromboembolism patients at low risk for recurrence who can discontinue anticoagulant therapy," *CMAJ Can. Med. Assoc. J. Assoc. Medicale Can.*, vol. 179, no. 5, pp. 417–426, Aug. 2008.
- [87] A. Tosetto *et al.*, "Predicting disease recurrence in patients with previous unprovoked venous thromboembolism: a proposed prediction score (DASH)," *J. Thromb. Haemost. JTH*, vol. 10, no. 6, pp. 1019–1025, Jun. 2012.
- [88] M. Marcucci *et al.*, "Risk of recurrence after a first unprovoked venous thromboembolism: external validation of the Vienna Prediction Model with pooled individual patient data," *J. Thromb. Haemost. JTH*, vol. 13, no. 5, pp. 775–781, May 2015.
- [89] P. Prandoni *et al.*, "Residual venous thrombosis as a predictive factor of recurrent venous thromboembolism," *Ann. Intern. Med.*, vol. 137, no. 12, pp. 955–960, Dec. 2002.
- [90] M. P. Donadini *et al.*, "Prognostic significance of residual venous obstruction in patients with treated unprovoked deep vein thrombosis: a patient-level meta-analysis," *Thromb. Haemost.*, vol. 111, no. 1, pp. 172–179, Jan. 2014.
- [91] A. Alhadad, M. Miniati, H. Alhadad, A. Gottsäter, and M. Bajc, "The value of tomographic ventilation/perfusion scintigraphy (V/PSPECT) for follow-up and prediction of recurrence in pulmonary embolism," *Thromb. Res.*, vol. 130, no. 6, pp. 877–881, Dec. 2012.
- [92] D. Poli *et al.*, "Risk of recurrence in patients with pulmonary embolism: predictive role of D-dimer and of residual perfusion defects on lung scintigraphy," *Thromb. Haemost.*, vol. 109, no. 2, pp. 181–186, Feb. 2013.
- [93] G. Simonneau *et al.*, "Updated clinical classification of pulmonary hypertension," *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 54, no. 1 Suppl, pp. S43–54, Jun. 2009.
- [94] C. Becattini *et al.*, "Incidence of chronic thromboembolic pulmonary hypertension after a first episode of pulmonary embolism," *Chest*, vol. 130, no. 1, pp. 172–175, Jul.

2006.

- [95] A. Korkmaz, T. Ozlu, S. Ozsu, Z. Kazaz, and Y. Bulbul, "Long-term outcomes in acute pulmonary thromboembolism: the incidence of chronic thromboembolic pulmonary hypertension and associated risk factors," *Clin. Appl. Thromb. Off. J. Int. Acad. Clin. Appl. Thromb.*, vol. 18, no. 3, pp. 281–288, Jun. 2012.
- [96] F. A. Klok, K. W. van Kralingen, A. P. J. van Dijk, F. H. Heyning, H. W. Vliegen, and M. V. Huisman, "Prospective cardiopulmonary screening program to detect chronic thromboembolic pulmonary hypertension in patients after acute pulmonary embolism," *Haematologica*, vol. 95, no. 6, pp. 970–975, Jun. 2010.
- [97] J. Pepke-Zaba *et al.*, "Chronic thromboembolic pulmonary hypertension (CTEPH): results from an international prospective registry," *Circulation*, vol. 124, no. 18, pp. 1973–1981, Nov. 2011.
- [98] D. Bonderman *et al.*, "Medical conditions increasing the risk of chronic thromboembolic pulmonary hypertension," *Thromb. Haemost.*, vol. 93, no. 3, pp. 512–516, Mar. 2005.
- [99] Natali D, Jais X, Abraham M, et al. Chronic thromboembolic pulmonary hypertension associated with indwelling Port-A-Cath central venous access systems. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 183: A2409.
- [100] D. Bonderman *et al.*, "Role for staphylococci in misguided thrombus resolution of chronic thromboembolic pulmonary hypertension," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 28, no. 4, pp. 678–684, Apr. 2008.
- [101] F. A. Klok, N. van der Bijl, I. C. M. Mos, A. de Roos, L. J. M. Kroft, and M. V. Huisman, "Timing of NT-pro-BNP sampling for predicting adverse outcome after acute pulmonary embolism," *Thromb. Haemost.*, vol. 104, no. 1, pp. 189–190, Jul. 2010.
- [102] W. Yao *et al.*, "Identification of putative endothelial progenitor cells (CD34+CD133+Flk-1+) in endarterectomized tissue of patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension," *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 296, no. 6, pp. L870–878, Jun. 2009.
- [103] I. M. Lang, K. M. Moser, and R. R. Schlegel, "Elevated expression of urokinase-like plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1 during the vascular remodeling associated with pulmonary thromboembolism," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 18, no. 5, pp. 808–815, May 1998.
- [104] K. M. Moser, M. L. Metersky, W. R. Auger, and P. F. Fedullo, "Resolution of vascular steal after pulmonary thromboendarterectomy," *Chest*, vol. 104, no. 5, pp. 1441–1444, Nov. 1993.
- [105] D. Zabini *et al.*, "Angiostatic factors in the pulmonary endarterectomy material from chronic thromboembolic pulmonary hypertension patients cause endothelial dysfunction," *PloS One*, vol. 7, no. 8, p. e43793, 2012.
- [106] M. W. Mosesson, "Fibrinogen and fibrin structure and functions," *J. Thromb. Haemost. JTH*, vol. 3, no. 8, pp. 1894–1904, Aug. 2005.
- [107] T. A. Morris *et al.*, "High prevalence of dysfibrinogenemia among patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension," *Blood*, vol. 114, no. 9, pp. 1929–1936, Aug. 2009.
- [108] R. R. Townsend, E. Hilliker, Y. T. Li, R. A. Laine, W. R. Bell, and Y. C. Lee, "Carbohydrate structure of human fibrinogen. Use of 300-MHz <sup>1</sup>H-NMR to characterize glycosidase-treated glycopeptides," *J. Biol. Chem.*, vol. 257, no. 16, pp. 9704–9710, Aug. 1982.
- [109] J. Martinez, K. A. MacDonald, and J. E. Palascak, "The role of sialic acid in the dysfibrinogenemia associated with liver disease: distribution of sialic acid on the

- constituent chains," *Blood*, vol. 61, no. 6, pp. 1196–1202, Jun. 1983.
- [110] H. R. Gralnick, H. Givelber, and E. Abrams, "Dysfibrinogenemia associated with hepatoma. Increased carbohydrate content of the fibrinogen molecule," *N. Engl. J. Med.*, vol. 299, no. 5, pp. 221–226, Aug. 1978.
- [111] C. V. Dang, C. K. Shin, W. R. Bell, C. Nagaswami, and J. W. Weisel, "Fibrinogen sialic acid residues are low affinity calcium-binding sites that influence fibrin assembly," *J. Biol. Chem.*, vol. 264, no. 25, pp. 15104–15108, Sep. 1989.
- [112] D. A. Meh, K. R. Siebenlist, S. O. Brennan, T. Holyst, and M. W. Mosesson, "The amino acid sequence in fibrin responsible for high affinity thrombin binding," *Thromb. Haemost.*, vol. 85, no. 3, pp. 470–474, Mar. 2001.
- [113] C. Wolfenstein-Todel and M. W. Mosesson, "Carboxy-terminal amino acid sequence of a human fibrinogen gamma-chain variant ( $\gamma'$ )," *Biochemistry (Mosc.)*, vol. 20, no. 21, pp. 6146–6149, Oct. 1981.
- [114] O. V. Gorkun, A. H. Henschen-Edman, L. F. Ping, and S. T. Lord, "Analysis of A alpha 251 fibrinogen: the alpha C domain has a role in polymerization, albeit more subtle than anticipated from the analogous proteolytic fragment X," *Biochemistry (Mosc.)*, vol. 37, no. 44, pp. 15434–15441, Nov. 1998.
- [115] J.-P. Collet *et al.*, "The alphaC domains of fibrinogen affect the structure of the fibrin clot, its physical properties, and its susceptibility to fibrinolysis," *Blood*, vol. 106, no. 12, pp. 3824–3830, Dec. 2005.
- [116] J. W. Weisel, "Structure of fibrin: impact on clot stability," *J. Thromb. Haemost. JTH*, vol. 5 Suppl 1, pp. 116–124, Jul. 2007.
- [117] C. Duval, P. Allan, S. D. A. Connell, V. C. Ridger, H. Philippou, and R. A. S. Ariëns, "Roles of fibrin  $\alpha$ - and  $\gamma$ -chain specific cross-linking by FXIIIa in fibrin structure and function," *Thromb. Haemost.*, vol. 111, no. 5, pp. 842–850, May 2014.
- [118] K. R. Siebenlist and M. W. Mosesson, "Progressive cross-linking of fibrin gamma chains increases resistance to fibrinolysis," *J. Biol. Chem.*, vol. 269, no. 45, pp. 28414–28419, Nov. 1994.
- [119] D. A. Meh, K. R. Siebenlist, and M. W. Mosesson, "Identification and characterization of the thrombin binding sites on fibrin," *J. Biol. Chem.*, vol. 271, no. 38, pp. 23121–23125, Sep. 1996.
- [120] Z. Bagoly, Z. Koncz, J. Hársfalvi, and L. Muszbek, "Factor XIII, clot structure, thrombosis," *Thromb. Res.*, vol. 129, no. 3, pp. 382–387, Mar. 2012.
- [121] M. J. Flick *et al.*, "Leukocyte engagement of fibrin(ogen) via the integrin receptor  $\alpha$ M $\beta$ 2/Mac-1 is critical for host inflammatory response in vivo," *J. Clin. Invest.*, vol. 113, no. 11, pp. 1596–1606, Jun. 2004.
- [122] J. Qi and D. L. Kreutzer, "Fibrin activation of vascular endothelial cells. Induction of IL-8 expression," *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 155, no. 2, pp. 867–876, Jul. 1995.
- [123] J. Qi, D. L. Kreutzer, and T. H. Piela-Smith, "Fibrin induction of ICAM-1 expression in human vascular endothelial cells," *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 158, no. 4, pp. 1880–1886, Feb. 1997.
- [124] C. M. Ripplinger *et al.*, "Inflammation modulates murine venous thrombosis resolution in vivo: assessment by multimodal fluorescence molecular imaging," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 32, no. 11, pp. 2616–2624, Nov. 2012.
- [125] J. Martinez, A. Ferber, T. L. Bach, and C. H. Yaen, "Interaction of fibrin with VE-cadherin," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 936, pp. 386–405, 2001.
- [126] L. A. Sporn, L. A. Bunce, and C. W. Francis, "Cell proliferation on fibrin: modulation by fibrinopeptide cleavage," *Blood*, vol. 86, no. 5, pp. 1802–1810, Sep. 1995.
- [127] T. L. Bach *et al.*, "VE-Cadherin mediates endothelial cell capillary tube formation

- in fibrin and collagen gels," *Exp. Cell Res.*, vol. 238, no. 2, pp. 324–334, Feb. 1998.
- [128] T. L. Bach, C. Barsigian, C. H. Yaen, and J. Martinez, "Endothelial cell VE-cadherin functions as a receptor for the beta15-42 sequence of fibrin," *J. Biol. Chem.*, vol. 273, no. 46, pp. 30719–30728, Nov. 1998.
- [129] S. Gorlatov and L. Medved, "Interaction of fibrin(ogen) with the endothelial cell receptor VE-cadherin: mapping of the receptor-binding site in the NH2-terminal portions of the fibrin beta chains," *Biochemistry (Mosc.)*, vol. 41, no. 12, pp. 4107–4116, Mar. 2002.
- [130] R. Procyk, B. Kudryk, S. Callender, and B. Blombäck, "Accessibility of epitopes on fibrin clots and fibrinogen gels," *Blood*, vol. 77, no. 7, pp. 1469–1475, Apr. 1991.
- [131] T. A. Morris, J. J. Marsh, R. Fagnani, M. Hagan, and K. M. Moser, "Degree of polymer organization decreases the binding of a monoclonal antibody raised against the beta-chain amino terminus of fibrin," *Thromb. Haemost.*, vol. 77, no. 4, pp. 704–709, Apr. 1997.
- [132] S. Yakovlev *et al.*, "Interaction of fibrin with VE-cadherin and anti-inflammatory effect of fibrin-derived fragments," *J. Thromb. Haemost. JTH*, vol. 9, no. 9, pp. 1847–1855, Sep. 2011.
- [133] S. Yakovlev, I. Mikhailenko, C. Cao, L. Zhang, D. K. Strickland, and L. Medved, "Identification of VLDLR as a novel endothelial cell receptor for fibrin that modulates fibrin-dependent transendothelial migration of leukocytes," *Blood*, vol. 119, no. 2, pp. 637–644, Jan. 2012.
- [134] J. Sakai *et al.*, "Structure, chromosome location, and expression of the human very low density lipoprotein receptor gene," *J. Biol. Chem.*, vol. 269, no. 3, pp. 2173–2182, Jan. 1994.
- [135] Y. Li, J. Cam, and G. Bu, "Low-density lipoprotein receptor family: endocytosis and signal transduction," *Mol. Neurobiol.*, vol. 23, no. 1, pp. 53–67, Feb. 2001.
- [136] H. A. Mulhaupt *et al.*, "Expression of very low density lipoprotein receptor in the vascular wall. Analysis of human tissues by in situ hybridization and immunohistochemistry," *Am. J. Pathol.*, vol. 148, no. 6, pp. 1985–1997, Jun. 1996.
- [137] A. Oganessian, L. C. Armstrong, M. M. Migliorini, D. K. Strickland, and P. Bornstein, "Thrombospondins use the VLDL receptor and a nonapoptotic pathway to inhibit cell division in microvascular endothelial cells," *Mol. Biol. Cell*, vol. 19, no. 2, pp. 563–571, Feb. 2008.
- [138] P. C. Stolt and H. H. Bock, "Modulation of lipoprotein receptor functions by intracellular adaptor proteins," *Cell. Signal.*, vol. 18, no. 10, pp. 1560–1571, Oct. 2006.
- [139] I. Ramasamy, "Recent advances in physiological lipoprotein metabolism," *Clin. Chem. Lab. Med.*, vol. 52, no. 12, pp. 1695–1727, Dec. 2014.
- [140] S. Yakovlev and L. Medved, "Interaction of Fibrin with the Very Low Density Lipoprotein Receptor: Further Characterization and Localization of the Fibrin-Binding Site," *Biochemistry (Mosc.)*, vol. 54, no. 30, pp. 4751–4761, Aug. 2015.
- [141] A. Jiang, W. Hu, H. Meng, H. Gao, and X. Qiao, "Loss of VLDL receptor activates retinal vascular endothelial cells and promotes angiogenesis," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 50, no. 2, pp. 844–850, Feb. 2009.
- [142] C.-H. Xia, E. Lu, H. Liu, X. Du, B. Beutler, and X. Gong, "The role of Vldlr in intraretinal angiogenesis in mice," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 52, no. 9, pp. 6572–6579, Aug. 2011.
- [143] D. Yang *et al.*, "SalA attenuates ischemia/reperfusion-induced endothelial barrier dysfunction via down-regulation of VLDL receptor expression," *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, vol. 33, no. 3, pp. 747–757, 2014.

- [144] T. A. Hembrough *et al.*, "Identification and characterization of a very low density lipoprotein receptor-binding peptide from tissue factor pathway inhibitor that has antitumor and antiangiogenic activity," *Blood*, vol. 103, no. 9, pp. 3374–3380, May 2004.
- [145] T. A. Hembrough, J. F. Ruiz, A. E. Papatianassiu, S. J. Green, and D. K. Strickland, "Tissue factor pathway inhibitor inhibits endothelial cell proliferation via association with the very low density lipoprotein receptor," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 15, pp. 12241–12248, Apr. 2001.
- [146] L. Nilsson *et al.*, "VLDL activation of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) expression: involvement of the VLDL receptor," *J. Lipid Res.*, vol. 40, no. 5, pp. 913–919, May 1999.
- [147] A. Stiko-Rahm, B. Wiman, A. Hamsten, and J. Nilsson, "Secretion of plasminogen activator inhibitor-1 from cultured human umbilical vein endothelial cells is induced by very low density lipoprotein," *Arterioscler. Dallas Tex.*, vol. 10, no. 6, pp. 1067–1073, Dec. 1990.
- [148] D.-A. Trégouët *et al.*, "Common susceptibility alleles are unlikely to contribute as strongly as the FV and ABO loci to VTE risk: results from a GWAS approach," *Blood*, vol. 113, no. 21, pp. 5298–5303, May 2009.
- [149] S. Uitte de Willige, M. C. H. de Visser, J. J. Houwing-Duistermaat, F. R. Rosendaal, H. L. Vos, and R. M. Bertina, "Genetic variation in the fibrinogen gamma gene increases the risk for deep venous thrombosis by reducing plasma fibrinogen gamma' levels," *Blood*, vol. 106, no. 13, pp. 4176–4183, Dec. 2005.
- [150] A. M. Carter, A. J. Catto, H. P. Kohler, R. A. Ariëns, M. H. Stickland, and P. J. Grant, "alpha-fibrinogen Thr312Ala polymorphism and venous thromboembolism," *Blood*, vol. 96, no. 3, pp. 1177–1179, Aug. 2000.
- [151] G. Le Gal *et al.*, "Fibrinogen Aalpha-Thr312Ala and factor XIII-A Val34Leu polymorphisms in idiopathic venous thromboembolism," *Thromb. Res.*, vol. 121, no. 3, pp. 333–338, 2007.
- [152] L. J. Rasmussen-Torvik *et al.*, "The association of alpha-fibrinogen Thr312Ala polymorphism and venous thromboembolism in the LITE study," *Thromb. Res.*, vol. 121, no. 1, pp. 1–7, 2007.
- [153] K. F. Standeven, P. J. Grant, A. M. Carter, T. Scheiner, J. W. Weisel, and R. A. S. Ariëns, "Functional analysis of the fibrinogen Aalpha Thr312Ala polymorphism: effects on fibrin structure and function," *Circulation*, vol. 107, no. 18, pp. 2326–2330, May 2003.
- [154] J. M. Curran, K. Fatah-Ardalani, P. Tornvall, S. E. Humphries, and F. R. Green, "A hypothesis to explain the reported association of the alpha-fibrinogen A312 allele with thromboembolic disease," *Thromb. Haemost.*, vol. 85, no. 6, pp. 1122–1123, Jun. 2001.
- [155] J. Suntharalingam *et al.*, "Fibrinogen Aalpha Thr312Ala polymorphism is associated with chronic thromboembolic pulmonary hypertension," *Eur. Respir. J.*, vol. 31, no. 4, pp. 736–741, Apr. 2008.
- [156] J.-F. Li *et al.*, "Fibrinogen A $\alpha$  Thr312Ala polymorphism specifically contributes to chronic thromboembolic pulmonary hypertension by increasing fibrin resistance," *PLoS One*, vol. 8, no. 7, p. e69635, 2013.
- [157] R. E. Baumann and A. H. Henschen, "Human fibrinogen polymorphic site analysis by restriction endonuclease digestion and allele-specific polymerase chain reaction amplification: identification of polymorphisms at positions A alpha 312 and B beta 448," *Blood*, vol. 82, no. 7, pp. 2117–2124, Oct. 1993.
- [158] T. Lisman, P. G. de Groot, J. C. M. Meijers, and F. R. Rosendaal, "Reduced plasma fibrinolytic potential is a risk factor for venous thrombosis," *Blood*, vol. 105, no. 3, pp. 1102–1105, Feb. 2005.

- [159] A. Undas *et al.*, "Altered fibrin clot structure/function in patients with idiopathic venous thromboembolism and in their relatives," *Blood*, vol. 114, no. 19, pp. 4272–4278, Nov. 2009.
- [160] M. Zolcinski, M. Ciesla-Dul, and A. Undas, "Effects of atorvastatin on plasma fibrin clot properties in apparently healthy individuals and patients with previous venous thromboembolism," *Thromb. Haemost.*, vol. 107, no. 6, pp. 1180–1182, Jun. 2012.
- [161] A. Undas, M. Cieřla-Dul, T. Drązkiewicz, and J. Sadowski, "Altered fibrin clot properties are associated with residual vein obstruction: effects of lipoprotein(a) and apolipoprotein(a) isoform," *Thromb. Res.*, vol. 130, no. 3, pp. e184–187, Sep. 2012.
- [162] M. Miniati *et al.*, "Fibrin resistance to lysis in patients with pulmonary hypertension other than thromboembolic," *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 181, no. 9, pp. 992–996, May 2010.
- [163] T. A. Morris, J. J. Marsh, P. G. Chiles, W. R. Auger, P. F. Fedullo, and V. L. Woods, "Fibrin derived from patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension is resistant to lysis," *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 173, no. 11, pp. 1270–1275, Jun. 2006.
- [164] D. Lami *et al.*, "Residual perfusion defects in patients with pulmonary embolism are related to impaired fibrinolytic capacity," *Thromb. Res.*, vol. 134, no. 3, pp. 737–741, Sep. 2014.
- [165] A. Undas, "Fibrin clot properties and their modulation in thrombotic disorders," *Thromb. Haemost.*, vol. 112, no. 1, pp. 32–42, Jul. 2014.
- [166] J. J. Marsh, P. G. Chiles, N.-C. Liang, and T. A. Morris, "Chronic thromboembolic pulmonary hypertension-associated dysfibrinogenemias exhibit disorganized fibrin structure," *Thromb. Res.*, vol. 132, no. 6, pp. 729–734, 2013.
- [167] Y. Lin, D. J. Weisdorf, A. Solovey, and R. P. Hebbel, "Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood," *J. Clin. Invest.*, vol. 105, no. 1, pp. 71–77, Jan. 2000.
- [168] F. Dignat-George, J. Sampol, G. Lip, and A. D. Blann, "Circulating endothelial cells: realities and promises in vascular disorders," *Pathophysiol. Haemost. Thromb.*, vol. 33, no. 5–6, pp. 495–499, Dec. 2003.
- [169] N. Bardin *et al.*, "Soluble CD146, a novel endothelial marker, is increased in physiopathological settings linked to endothelial junctional alteration," *Thromb. Haemost.*, vol. 90, no. 5, pp. 915–920, Nov. 2003.
- [170] K. W. Lee, G. Y. H. Lip, M. Tayebjee, W. Foster, and A. D. Blann, "Circulating endothelial cells, von Willebrand factor, interleukin-6, and prognosis in patients with acute coronary syndromes," *Blood*, vol. 105, no. 2, pp. 526–532, Jan. 2005.
- [171] D. M. Smadja *et al.*, "Circulating endothelial cells: a new candidate biomarker of irreversible pulmonary hypertension secondary to congenital heart disease," *Circulation*, vol. 119, no. 3, pp. 374–381, Jan. 2009.
- [172] M. Lévy *et al.*, "Impaired apoptosis of pulmonary endothelial cells is associated with intimal proliferation and irreversibility of pulmonary hypertension in congenital heart disease," *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 49, no. 7, pp. 803–810, Feb. 2007.
- [173] M. Levy, D. Bonnet, L. Mauge, D. S. Celermajer, P. Gaussem, and D. M. Smadja, "Circulating endothelial cells in refractory pulmonary hypertension in children: markers of treatment efficacy and clinical worsening," *PloS One*, vol. 8, no. 6, p. e65114, 2013.
- [174] T. M. Bull *et al.*, "Circulating endothelial cells in pulmonary hypertension," *Thromb. Haemost.*, vol. 90, no. 4, pp. 698–703, Oct. 2003.
- [175] D. M. Smadja *et al.*, "Distinct patterns of circulating endothelial cells in pulmonary hypertension," *Eur. Respir. J.*, vol. 36, no. 6, pp. 1284–1293, Dec. 2010.

- [176] M. C. Yoder, "Human Endothelial Progenitor Cells," *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, vol. 2, no. 7, Jul. 2012.
- [177] T. Asahara *et al.*, "Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis," *Science*, vol. 275, no. 5302, pp. 964–967, Feb. 1997.
- [178] M. E. Yeager, M. G. Frid, and K. R. Stenmark, "Progenitor cells in pulmonary vascular remodeling," *Pulm. Circ.*, vol. 1, no. 1, pp. 3–16, Mar. 2011.
- [179] R. S. Alphonse *et al.*, "The isolation and culture of endothelial colony-forming cells from human and rat lungs," *Nat. Protoc.*, vol. 10, no. 11, pp. 1697–1708, Nov. 2015.
- [180] J. King *et al.*, "Structural and functional characteristics of lung macro- and microvascular endothelial cell phenotypes," *Microvasc. Res.*, vol. 67, no. 2, pp. 139–151, Mar. 2004.
- [181] D. F. Alvarez, L. Huang, J. A. King, M. K. ElZarrad, M. C. Yoder, and T. Stevens, "Lung microvascular endothelium is enriched with progenitor cells that exhibit vasculogenic capacity," *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 294, no. 3, pp. L419–430, Mar. 2008.
- [182] H. T. Duong, S. C. Erzurum, and K. Asosingh, "Pro-angiogenic hematopoietic progenitor cells and endothelial colony-forming cells in pathological angiogenesis of bronchial and pulmonary circulation," *Angiogenesis*, vol. 14, no. 4, pp. 411–422, Dec. 2011.
- [183] S. Farha *et al.*, "Hypoxia-inducible factors in human pulmonary arterial hypertension: a link to the intrinsic myeloid abnormalities," *Blood*, vol. 117, no. 13, pp. 3485–3493, Mar. 2011.
- [184] N. J. Davie *et al.*, "Hypoxia-induced pulmonary artery adventitial remodeling and neovascularization: contribution of progenitor cells," *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 286, no. 4, pp. L668–678, Apr. 2004.
- [185] M. Toshner *et al.*, "Evidence of dysfunction of endothelial progenitors in pulmonary arterial hypertension," *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 180, no. 8, pp. 780–787, Oct. 2009.
- [186] K. C. Young, E. Torres, K. E. Hatzistergos, D. Hehre, C. Suguhara, and J. M. Hare, "Inhibition of the SDF-1/CXCR4 axis attenuates neonatal hypoxia-induced pulmonary hypertension," *Circ. Res.*, vol. 104, no. 11, pp. 1293–1301, Jun. 2009.
- [187] L. Yan *et al.*, "Bone Marrow-derived Cells Contribute to the Pathogenesis of Pulmonary Arterial Hypertension," *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 193, no. 8, pp. 898–909, Apr. 2016.
- [188] D. M. Smadja *et al.*, "Treprostinil increases the number and angiogenic potential of endothelial progenitor cells in children with pulmonary hypertension," *Angiogenesis*, vol. 14, no. 1, pp. 17–27, Mar. 2011.
- [189] D. M. Smadja *et al.*, "Treprostinil indirectly regulates endothelial colony forming cell angiogenic properties by increasing VEGF-A produced by mesenchymal stem cells," *Thromb. Haemost.*, vol. 114, no. 4, pp. 735–747, Oct. 2015.
- [190] D. B. Cines *et al.*, "Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders," *Blood*, vol. 91, no. 10, pp. 3527–3561, May 1998.
- [191] S. Fujii, H. Sawa, J. E. Saffitz, C. L. Lucore, and B. E. Sobel, "Induction of endothelial cell expression of the plasminogen activator inhibitor type 1 gene by thrombosis in vivo," *Circulation*, vol. 86, no. 6, pp. 2000–2010, Dec. 1992.
- [192] H. Sawa, S. Fujii, and B. E. Sobel, "Augmented arterial wall expression of type-1 plasminogen activator inhibitor induced by thrombosis," *Arterioscler. Thromb. J. Vasc. Biol.*, vol. 12, no. 12, pp. 1507–1515, Dec. 1992.
- [193] S. Alias *et al.*, "Defective angiogenesis delays thrombus resolution: a potential pathogenetic mechanism underlying chronic thromboembolic pulmonary hypertension,"

- Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 34, no. 4, pp. 810–819, Apr. 2014.
- [194] I. Singh *et al.*, “Failure of thrombus to resolve in urokinase-type plasminogen activator gene-knockout mice: rescue by normal bone marrow-derived cells,” *Circulation*, vol. 107, no. 6, pp. 869–875, Feb. 2003.
- [195] R. Di Stefano *et al.*, “Human peripheral blood endothelial progenitor cells synthesize and express functionally active tissue factor,” *Thromb. Res.*, vol. 123, no. 6, pp. 925–930, Apr. 2009.
- [196] D. M. Smadja *et al.*, “Thrombin bound to a fibrin clot confers angiogenic and haemostatic properties on endothelial progenitor cells,” *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 12, no. 3, pp. 975–986, Jun. 2008.
- [197] D. M. Smadja, I. Laurendeau, C. Avignon, M. Vidaud, M. Aiach, and P. Gaussem, “The angiopoietin pathway is modulated by PAR-1 activation on human endothelial progenitor cells,” *J. Thromb. Haemost. JTH*, vol. 4, no. 9, pp. 2051–2058, Sep. 2006.
- [198] D. M. Smadja *et al.*, “PAR-1 activation on human late endothelial progenitor cells enhances angiogenesis in vitro with upregulation of the SDF-1/CXCR4 system,” *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 25, no. 11, pp. 2321–2327, Nov. 2005.
- [199] B. Modarai, K. G. Burnand, B. Sawyer, and A. Smith, “Endothelial progenitor cells are recruited into resolving venous thrombi,” *Circulation*, vol. 111, no. 20, pp. 2645–2653, May 2005.
- [200] E. R. Nuzzolo, M. G. Iachininoto, and L. Teofili, “Endothelial progenitor cells and thrombosis,” *Thromb. Res.*, vol. 129, no. 3, pp. 309–313, Mar. 2012.
- [201] S. Alias and I. M. Lang, “Coagulation and the vessel wall in pulmonary embolism,” *Pulm. Circ.*, vol. 3, no. 4, pp. 728–738, Dec. 2013.
- [202] M. Waltham, K. G. Burnand, M. Collins, and A. Smith, “Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor are found in resolving venous thrombi,” *J. Vasc. Surg.*, vol. 32, no. 5, pp. 988–996, Nov. 2000.
- [203] M. Waltham, K. G. Burnand, M. Collins, C. L. McGuinness, I. Singh, and A. Smith, “Vascular endothelial growth factor enhances venous thrombus recanalisation and organisation,” *Thromb. Haemost.*, vol. 89, no. 1, pp. 169–176, Jan. 2003.
- [204] W. G. Jerome, S. Handt, and R. R. Hantgan, “Endothelial cells organize fibrin clots into structures that are more resistant to lysis,” *Microsc. Microanal. Off. J. Microsc. Soc. Am. Microbeam Anal. Soc. Microsc. Soc. Can.*, vol. 11, no. 3, pp. 268–277, Jun. 2005.
- [205] J. Qi, S. Goralnick, and D. L. Kreutzer, “Fibrin regulation of interleukin-8 gene expression in human vascular endothelial cells,” *Blood*, vol. 90, no. 9, pp. 3595–3602, Nov. 1997.
- [206] P. Petzelbauer *et al.*, “The fibrin-derived peptide Bbeta15-42 protects the myocardium against ischemia-reperfusion injury,” *Nat. Med.*, vol. 11, no. 3, pp. 298–304, Mar. 2005.
- [207] D. G. Chalupowicz, Z. A. Chowdhury, T. L. Bach, C. Barsigian, and J. Martinez, “Fibrin II induces endothelial cell capillary tube formation,” *J. Cell Biol.*, vol. 130, no. 1, pp. 207–215, Jul. 1995.
- [208] S. Yakovlev, I. Mikhailenko, G. Tsurupa, A. M. Belkin, and L. Medved, “Polymerisation of fibrin  $\alpha$ C-domains promotes endothelial cell migration and proliferation,” *Thromb. Haemost.*, vol. 112, no. 6, pp. 1244–1251, Dec. 2014.
- [209] V. Nehls and R. Herrmann, “The configuration of fibrin clots determines capillary morphogenesis and endothelial cell migration,” *Microvasc. Res.*, vol. 51, no. 3, pp. 347–364, May 1996.
- [210] A. Collen, P. Koolwijk, M. Kroon, and V. W. van Hinsbergh, “Influence of fibrin structure on the formation and maintenance of capillary-like tubules by human

- microvascular endothelial cells," *Angiogenesis*, vol. 2, no. 2, pp. 153–165, 1998.
- [211] F. H. Silver, M. C. Wang, and G. D. Pins, "Preparation of fibrin glue: a study of chemical and physical methods," *J. Appl. Biomater. Off. J. Soc. Biomater.*, vol. 6, no. 3, pp. 175–183, 1995.
- [212] J.-P. Collet, C. Lesty, G. Montalescot, and J. W. Weisel, "Dynamic changes of fibrin architecture during fibrin formation and intrinsic fibrinolysis of fibrin-rich clots," *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 24, pp. 21331–21335, Jun. 2003.
- [213] A. Woywodt, U. Erdbruegger, and M. Haubitz, "Circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells after angioplasty: news from the endothelial rescue squad," *J. Thromb. Haemost. JTH*, vol. 4, no. 5, pp. 976–978, May 2006.
- [214] F. Dignat-George, F. Sabatier, A. Blann, and A. Woywodt, "Detection of circulating endothelial cells: CD146-based magnetic separation enrichment or flow cytometric assay?," *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 25, no. 5, pp. e1–2; author reply e3–5, Feb. 2007.
- [215] B. Blombäck, K. Carlsson, B. Hessel, A. Liljeborg, R. Procyk, and N. Aslund, "Native fibrin gel networks observed by 3D microscopy, permeation and turbidity," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 997, no. 1–2, pp. 96–110, Jul. 1989.
- [216] T. A. Morris *et al.*, "Antibodies against the fibrin beta-chain amino-terminus detect active canine venous thrombi," *Circulation*, vol. 96, no. 9, pp. 3173–3179, Nov. 1997.
- [217] G. F. Reed, F. Lynn, and B. D. Meade, "Use of coefficient of variation in assessing variability of quantitative assays," *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, vol. 9, no. 6, pp. 1235–1239, Nov. 2002.
- [218] H. Sato and J. K. Swadesh, "Structural difference between polymerized and non-polymerized fragment X, obtained by plasmin digest of fibrinogen," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 15, no. 6, pp. 323–327, Dec. 1993.
- [219] B. Blombäck and N. Bark, "Fibrinopeptides and fibrin gel structure," *Biophys. Chem.*, vol. 112, no. 2–3, pp. 147–151, Dec. 2004.
- [220] J. J. Marsh, H. S. Guan, S. Li, P. G. Chiles, D. Tran, and T. A. Morris, "Structural insights into fibrinogen dynamics using amide hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry," *Biochemistry (Mosc.)*, vol. 52, no. 32, pp. 5491–5502, Aug. 2013.
- [221] A. Huertas *et al.*, "Immune dysregulation and endothelial dysfunction in pulmonary arterial hypertension: a complex interplay," *Circulation*, vol. 129, no. 12, pp. 1332–1340, Mar. 2014.
- [222] A. Huertas and P. Palange, "Circulating endothelial progenitor cells and chronic pulmonary diseases," *Eur. Respir. J.*, vol. 37, no. 2, pp. 426–431, Feb. 2011.
- [223] M. Okude, A. Yamanaka, Y. Morimoto, and S. Akihama, "Sialic acid in fibrinogen: effects of sialic acid on fibrinogen-fibrin conversion by thrombin and properties of asialofibrin clot," *Biol. Pharm. Bull.*, vol. 16, no. 5, pp. 448–452, May 1993.
- [224] G. J. Maghzal, S. O. Brennan, and P. M. George, "The sialic acid content of fibrinogen decreases during pregnancy and increases in response to fibrate therapy," *Thromb. Res.*, vol. 115, no. 4, pp. 293–299, 2005.
- [225] A. Bini, S. Callender, R. Procyk, B. Blombäck, and B. J. Kudryk, "Flow and antibody binding properties of hydrated fibrins prepared from plasma, platelet rich plasma and whole blood," *Thromb. Res.*, vol. 76, no. 2, pp. 145–156, Oct. 1994.
- [226] N. Komanasin, A. J. Catto, T. S. Futers, A. van Hylckama Vlieg, F. R. Rosendaal, and R. a. S. Ariëns, "A novel polymorphism in the factor XIII B-subunit (His95Arg): relationship to subunit dissociation and venous thrombosis," *J. Thromb. Haemost. JTH*, vol. 3, no. 11, pp. 2487–2496, Nov. 2005.

- [227] V. Schroeder and H. P. Kohler, "New developments in the area of factor XIII," *J. Thromb. Haemost. JTH*, vol. 11, no. 2, pp. 234–244, Feb. 2013.
- [228] Z. Bereczky and L. Muszbek, "Factor XIII and venous thromboembolism," *Semin. Thromb. Hemost.*, vol. 37, no. 3, pp. 305–314, Apr. 2011.
- [229] S. R. Fraser, N. A. Booth, and N. J. Mutch, "The antifibrinolytic function of factor XIII is exclusively expressed through  $\alpha_2$ -antiplasmin cross-linking," *Blood*, vol. 117, no. 23, pp. 6371–6374, Jun. 2011.
- [230] G. Meyer *et al.*, "Effects of intravenous urokinase versus alteplase on total pulmonary resistance in acute massive pulmonary embolism: a European multicenter double-blind trial. The European Cooperative Study Group for Pulmonary Embolism," *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 19, no. 2, pp. 239–245, Feb. 1992.
- [231] N. Meneveau *et al.*, "Streptokinase vs alteplase in massive pulmonary embolism. A randomized trial assessing right heart haemodynamics and pulmonary vascular obstruction," *Eur. Heart J.*, vol. 18, no. 7, pp. 1141–1148, Jul. 1997.
- [232] T. L. Simon, J. M. Stengle, and A. A. Sasahara, "Urokinase in pulmonary embolism," *Lancet Lond. Engl.*, vol. 2, no. 7827, p. 501, Sep. 1973.
- [233] F. A. Klok *et al.*, "External validation of a simple non-invasive algorithm to rule out chronic thromboembolic pulmonary hypertension after acute pulmonary embolism," *Thromb. Res.*, vol. 135, no. 5, pp. 796–801, May 2015.
- [234] G. Meyer *et al.*, "Fibrinolysis for patients with intermediate-risk pulmonary embolism," *N. Engl. J. Med.*, vol. 370, no. 15, pp. 1402–1411, Apr. 2014.
- [235] I. Sørensen *et al.*, "B $\beta$ (15-42) attenuates the effect of ischemia-reperfusion injury in renal transplantation," *J. Am. Soc. Nephrol. JASN*, vol. 22, no. 10, pp. 1887–1896, Oct. 2011.
- [236] R. J. Glynn *et al.*, "A randomized trial of rosuvastatin in the prevention of venous thromboembolism," *N. Engl. J. Med.*, vol. 360, no. 18, pp. 1851–1861, Apr. 2009.
- [237] Y. Guo, R. Peng, Q. Liu, and D. Xu, "Exercise training-induced different improvement profile of endothelial progenitor cells function in mice with or without myocardial infarction," *Int. J. Cardiol.*, vol. 221, pp. 335–341, Oct. 2016.
- [238] R. Emmons, G. M. Niemi, O. Owolabi, and M. De Lisio, "Acute exercise mobilizes hematopoietic stem and progenitor cells and alters the mesenchymal stromal cell secretome," *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985*, vol. 120, no. 6, pp. 624–632, Mar. 2016.
- [239] S. G. Lakoski *et al.*, "The safety and efficacy of early-initiation exercise training after acute venous thromboembolism: a randomized clinical trial," *J. Thromb. Haemost. JTH*, Apr. 2015.

## **TRAVAIL ANNEXE**

## **Annexe**

---

La collaboration internationale mise en place avec l'équipe du professeur Morris, UC San Diego, a été initiée en 2012, La partie fondamentale des travaux présentés ici a été réalisée dans son laboratoire de recherche à l'hôpital d'HillCrest, San Diego de novembre 2013 à février 2015, Pendant cette période, nous avons rédigé, avec le Dr Timothy Fernandes, une revue de la littérature faisant état des connaissances actuelles dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques pouvant expliquer que certains patients développent des séquelles perfusionnelles et une HTP-PE après une embolie pulmonaire, Ce travail a été accepté pour publication dans *Annals of the American Thoracic Society* en juillet 2016,

## From Acute to Chronic Thromboembolic Disease

Timothy Fernandes<sup>1</sup>, Benjamin Planquette<sup>2</sup>, Olivier Sanchez<sup>2</sup>, and Timothy Morris<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Division of Pulmonary and Critical Care Medicine, University of California San Diego, La Jolla, California; and <sup>2</sup>Université Paris Descartes; Service de Pneumologie et Soins Intensifs, Hôpital Européen Georges Pompidou, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris; and Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité Mixte de Recherche en Santé, Paris, France

ORCID ID: 0000-0001-9319-4200 (T.F.).

### Abstract

After achievement of adequate anticoagulation, the natural history of acute pulmonary emboli ranges from near total resolution of vascular perfusion to long-term persistence of hemodynamically consequential residual perfusion defects. The persistence of perfusion defects is necessary, but not sufficient, for the development of chronic thromboembolic pulmonary hypertension (CTEPH). Approximately 30% of patients have persistent defects after 6 months of anticoagulation, but only 10% of those with persistent defects subsequently develop CTEPH. A number of clinical risk factors including increasing age, delay in anticoagulation from symptom onset, and the size of the initial thrombus have been associated with the persistence of

perfusion defects. Likewise, a number of cellular and molecular pathways have been implicated in the failure of thrombus resolution, including impaired fibrinolysis, altered fibrinogen structure and function, increased local or systemic inflammation, and remodeling of the embolic material by neovascularization. Treatment with fibrinolytic agents at the time of initial presentation has not clearly improved the frequency or degree of recovery of pulmonary vascular perfusion. A better understanding of the interplay between clinical risk factors and pathogenic mechanisms may enhance the ability to prevent and treat CTEPH in the future.

**Keywords:** hypertension, pulmonary; pulmonary heart disease; pulmonary embolism; venous thromboembolism

(Received in original form September 20, 2015; accepted in final form December 18, 2015)

*Author Contributions:* All authors made substantial contributions to the conception and design of the article, and participated in drafting or revising it critically for important intellectual content, gave final approval of the version to be published, and agree to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Correspondence and requests for reprints should be addressed to Timothy Fernandes, M.D., Division of Pulmonary, Critical Care and Sleep Medicine, UCSD Healthcare System, 9300 Campus Point Drive, La Jolla, CA 92037. E-mail: tfernandes@ucsd.edu

Ann Am Thorac Soc Vol 13, Supplement 3, pp S207–S214, Jul 2016  
Copyright © 2016 by the American Thoracic Society  
DOI: 10.1513/AnnalsATS.201509-619AS  
Internet address: www.atsjournals.org

After an acute pulmonary embolism, the recovery of perfusion to the affected lung regions can range from near complete return of perfusion to significant residual defects. Persistent perfusion defects occur as thromboemboli are remodeled into intravascular fibrotic scars. The perfusion defects can result in chronic respiratory symptoms, possibly related to increased dead space ventilation. In a minority of patients, the vascular scars can compromise a significant portion of the pulmonary arterial bed and eventually lead to chronic thromboembolic pulmonary hypertension (CTEPH). CTEPH is characterized by precapillary pulmonary hypertension (mean

pulmonary arterial pressure, >25 mm Hg) in patients with abnormal ventilation–perfusion scintigraphy including at least one mismatched segmental perfusion defect, and imaging (such as computed tomography [CT] angiography, magnetic resonance angiography, or catheter-based pulmonary angiography) demonstrating the presence of chronic, organized thrombi in pulmonary arteries after at least 3 months of therapeutic anticoagulation (1).

Most patients evaluated for CTEPH have been previously diagnosed with acute pulmonary embolism, although about one-quarter have not reported a venous thromboembolic event (2). The proportion

of patients who develop CTEPH after acute pulmonary embolism is uncertain, and has been reported to vary between 0.4 and 8.8% (3–9). The different estimates may be due to variations in referral patterns and screening strategies after acute pulmonary embolism, in addition to the difficulties inherent to the diagnosis of CTEPH. The first presentation of CTEPH can sometimes mimic acute pulmonary embolism, explaining the short time in some patients between the recognition of the “acute” thromboembolic event and the development of CTEPH (4). In this review, we discuss the natural history of the resolution and remodeling of acute

pulmonary thromboembolism, review the spectrum of recovery after acute pulmonary embolism and the clinical factors that influence thrombus persistence, and describe the factors (including impaired fibrinolysis, inflammation, and angiogenesis) necessary for thrombus persistence (Figure 1).

**Natural History of Thrombus Resolution**

The principal constituents of acute thromboemboli are impermanent: erythrocytes, which normally survive no more than 2–4 months, and fibrin, which is degraded by plasmin into fibrin degradation products such as D-dimer. Release of D-dimer into the plasma is evident in 80% of patients with acute pulmonary embolism 1 week after diagnosis but in only 40% after 1 month and 13% after 3 months (10). In contrast, residual perfusion defects persist in some patients after 3 months of anticoagulation (11),

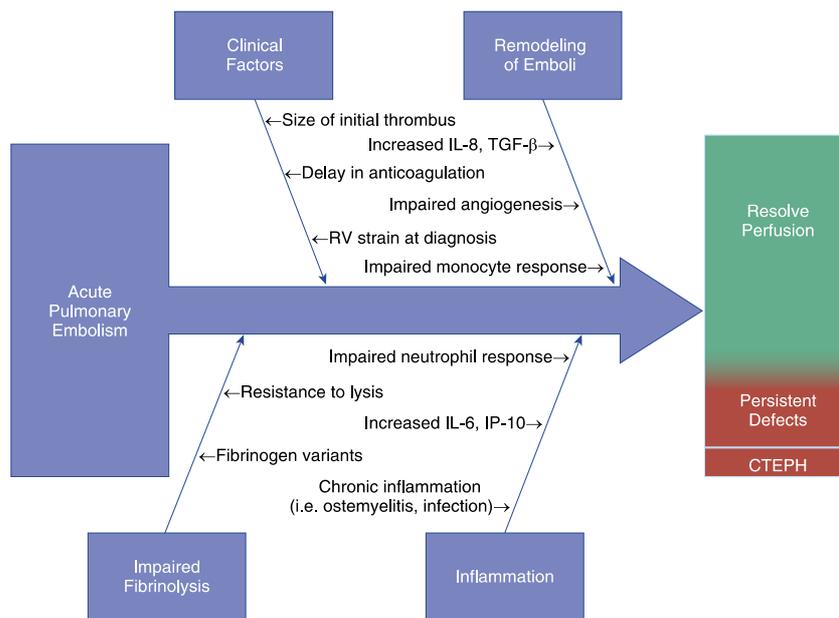
which exceeds the life span of erythrocytes and fibrin. The residual perfusion defects reflect thrombi that have been remodeled into chronic scar tissue.

The extent and rapidity of lung perfusion recovery vary among patients (11–18). Recovery of perfusion may occur as rapidly as 48 hours in some patients (19). In one study, the mean relative decrease in vascular obstruction ranged from 62 to 71% after 3 weeks of treatment, and 36.6% of patients had completely resolved by that time (20). After the initial rapid phase of perfusion recovery during the first few weeks, recovery typically occurs more slowly over about 2–3 months (21, 22).

Early reports suggested that nearly one-half of patients with acute pulmonary embolism have evidence of at least some degree of incomplete perfusion recovery, even several months after the acute event (23–27). A more recent study suggested that 56–69% of patients with acute pulmonary embolism had incomplete resolution after 3 weeks of anticoagulation (20). In a prospective cohort study,

29% of patients with acute pulmonary embolism had perfusion defects in at least two segments (pulmonary vascular obstruction > 10%) during follow-up (median, 12 mo) (28). In another study, the residual pulmonary vascular obstruction 1 year after acute pulmonary embolism did not exceed 15% in 90% of the patients. The lung scan was normal in only 65.1% of the patients (29).

While ventilation–perfusion scanning remains the screening test of choice when evaluating for possible CTEPH (1), CT angiography and lung perfusion scanning identified similar proportions of patients with long-term residual intravascular defects after acute pulmonary embolism. After a mean of 9 months of anticoagulation, CT angiography detected residual defects in 15% (95% confidence interval [CI], 8–25%) of patients, whereas lung perfusion scanning detected residual pulmonary embolism in 28% (95% CI, 19–38%) (27). Age and coexistent pulmonary disease influence the presence of residual pulmonary embolism detected



**Figure 1.** Determinants of the resolution or persistence of chronic thromboemboli disease after acute pulmonary embolism (PE). After acute PE, there are clinical risk factors (including the size of the thrombus and presence of right ventricular [RV] strain), mediators of thrombus remodeling (i.e., IL-8, transforming growth factor [TGF]-β), inflammatory mediators, and defects in fibrinolysis that combine to determine whether the thrombotic material resolves or becomes a collagen-rich vascular scar. About 30% of patients will have persistent defects after acute PE (represented in red), and a minority of these patients develop chronic thromboembolic pulmonary hypertension (CTEPH). IP-10 = IFN-γ-inducible protein-10.

by lung perfusion scanning, but not by CT angiography (27). A more recent study, however, suggested that normalization is more often observed by CT scanning than by lung perfusion scanning (44 vs. 31%, respectively;  $P = 0.04$ ) after 3 weeks of anticoagulant treatment (20).

Patient age, the time interval between symptom onset and diagnosis, the degree of pulmonary vascular obstruction at the onset of pulmonary embolism, and previous venous thromboembolism were independent predictors of persistent perfusion defects (28). In a prospective registry including 416 consecutive patients with intermediate- or high-risk pulmonary embolism who survived the acute phase, residual pulmonary vascular obstruction at discharge was significantly associated with an initial thrombus burden as assessed by multidetector CT angiography (30).

### Clinical and Prognostic Consequences of Residual Perfusion Defects after Acute Pulmonary Embolism

As many as one-half of patients with acute pulmonary embolism suffer from chronic dyspnea afterward (31). The majority of them have coexisting cardiopulmonary diseases that make it difficult to determine the exact role of persistent perfusion defects in their dyspnea (32). Some patients with acute pulmonary embolism will have long-term defects in gas exchange such as elevated dead space-to-tidal volume ratios that are not explained by coexisting diseases (13). Furthermore, patients with perfusion defects are more likely to have dyspnea and higher systolic pulmonary arterial pressures, and achieve shorter distances during 6-minute walk tests than patients with acute pulmonary embolism with full resolution (28). Residual pulmonary vascular obstruction evaluated before hospital discharge in patients with intermediate- to high-risk pulmonary embolism is a powerful prognostic factor for a 6-month outcome (including death, recurrent pulmonary embolism, and the development of signs of heart failure). Residual pulmonary vascular obstruction greater than 35% is associated with an increased risk of adverse events at 6 months (30). Incomplete recovery of perfusion appears to be necessary for the

development of CTEPH, although other factors are likely involved (7, 28).

Incomplete recovery 6 months after acute pulmonary embolism predicts subsequent failure to recover (33). There can be long-term changes in right ventricular (RV) function and other hemodynamics (34). As many as 17% of previously healthy patients with acute pulmonary embolism with no prior cardiopulmonary disease have either RV dilation or RV hypokinesis on echocardiography 6 months after the acute event (35). More than 75% of patients with either RV dysfunction or echocardiographic evidence of pulmonary hypertension at 6 months will have residual vascular obstruction on follow-up CT angiography (36).

### Predisposition to Incomplete Resolution of Acute Thrombus and CTEPH

The original presentations of patients with acute pulmonary embolism who eventually develop CTEPH are similar to the presentations of patients who fully resolved their acute clots (37). There appears to be no association between inherited thrombophilia and persistent pulmonary perfusion defects once acute pulmonary embolism has occurred (28). Similarly, there is no association between inherited thrombophilia and CTEPH (38, 39). However, plasma levels of tissue factor pathway inhibitor at the time of acute pulmonary embolism do appear to be associated with perfusion defects (28), which implicates abnormalities in the thrombotic/fibrinolytic response in the incomplete resolution of pulmonary vascular obstruction. Delay between symptom onset and acute pulmonary embolism diagnosis is associated with persistent perfusion defects (28) and this delay has also been associated with resistance to fibrinolysis (40). Persistent pulmonary defects are associated with markers of impaired fibrinolysis such as prolonged lysis times and elevated plasminogen activator inhibitor-1 levels (41). Likewise, fibrin isolated from some patients with CTEPH is resistant to plasmin-mediated fibrinolysis (42). These findings suggest that impairments in the normal balance between thrombosis and fibrinolysis after acute pulmonary embolism may play a role in persistent perfusion defects and CTEPH.

Acute pulmonary emboli of larger sizes are associated with a higher risk of developing CTEPH (7, 15). In a multivariate regression model of perfusion resolution after acute pulmonary embolism, the size of the original defect was a powerful determinant of the degree of resolution 7–10 days after acute pulmonary embolism, and the size of the perfusion defect at 7–10 days was an even more powerful determinant of perfusion resolution at 6 months (15). Acute pulmonary embolism sufficiently large to present with right ventricular strain is associated with CTEPH (7, 34). Similarly, elevated plasma levels of heart-type fatty acid-binding protein (presumably from right ventricular ischemia) on presentation is associated with CTEPH (43).

There are a number of clinical factors that have been associated with CTEPH development. These include an idiopathic etiology of the acute pulmonary embolism (7, 44), young age at the time of the initial pulmonary embolism (7), the presence of lupus anticoagulant/anti-cardiolipin antibodies (38, 45), elevated clotting factor VIII (46), and previous splenectomy (47). Although all of these conditions have been associated with CTEPH, whether they play a role in thrombus persistence or mediate the development of pulmonary hypertension after persistence is less clear from the available literature.

### Thrombolytic Therapy: Effect on Residual Perfusion Defects and CTEPH

It does not appear that treatment of acute pulmonary embolism with plasminogen-activating medication prevents the development of residual perfusion defects or CTEPH. In several studies, similar proportions of patients with or without perfusion defects or CTEPH received thrombolytic therapy (4, 28). There is no evidence to support the hypothesis that the use of thrombolytic therapy reduces the incidence of CTEPH. Three trials disclosed no difference in lung perfusion recovery after the first few days of therapy among patients with acute pulmonary embolism treated with thrombolytic medications compared with those treated with anticoagulation alone (48–50). Other trials evaluated neither residual perfusion defects nor CTEPH (51–53), or they did not include long-term follow-up of patients (54–60). Only

one study has demonstrated a reduction in echocardiographic evidence of pulmonary hypertension, but these results are difficult to interpret given the extremely high incidence of pulmonary hypertension in both the group that received thrombolytics and those treated with usual care (59).

### Altered Fibrinolysis in CTEPH

Evidence that impaired fibrinolysis leads to chronic thromboembolic disease is mixed. On the one hand, direct inhibition of plasmin with tranexamic acid after acute pulmonary embolism induced chronic thromboembolic vascular obstruction in a canine model (61). However, patients with CTEPH have no abnormalities in the plasma levels of plasminogen or  $\alpha_2$ -antiplasmin (the primary physiological inhibitor of plasmin). In addition, patients with CTEPH do not have high plasma levels of plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1, the primary physiological inhibitor of tissue plasminogen activator [tPA]) or blunted response of tPA to venous occlusion (62). Available data also suggest that endothelial cells from the pulmonary arteries of patients with CTEPH produce normal amounts of tPA and PAI-1 (63).

Factor VIII activity, total tissue factor pathway inhibitor (TFPI), and free TFPI levels are associated with the presence of perfusion defects in univariate logistic regression analysis adjusted for anticoagulant therapy at the time of blood sampling. Inherited thrombophilia and anti-phospholipid antibodies were present in 42 patients (17%) and 26 patients (10%), respectively, and were equally frequent in patients with and without perfusion defects. In multivariate analysis, after adjustment for anticoagulant therapy at the time of blood sampling and predictors of perfusion defects at pulmonary embolism diagnosis, total TFPI was independently associated with the presence of perfusion defects (odds ratio associated with an increase of 10 ng/ml, 1.25; 95% CI, 1.03–1.53;  $P = 0.03$ ) (28). These results are supported by the absence of abnormality of tPA, PAI-1, and thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor in patients with persistent perfusion defects after pulmonary embolism (28).

### Fibrinogen Abnormalities

Fibrin plays an important role in thrombus persistence. Fibrin contains epitopes that

bind to receptors on endothelial cells and modulate the remodeling of thrombi (64). The amino terminus of the beta chain (the fibrin “B-knob”) that is exposed when fibrinogen converts to fibrin has been implicated in angiogenesis (65) and the control of fibroblastic and endothelial cell growth onto fibrin polymers (the first step in organization of the thrombus into scar tissue) (66). Fibrin activates pulmonary artery endothelial cells (67) via vascular endothelial cadherin (68). Fibrin increases IL-8 and causes migration of repair cells along endothelial cells via intercellular adhesion molecule-1 (69) and MAC-1 (70) receptors. The structure of fibrin clots greatly influences vascular endothelial cell growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis (71). Exposure to fibrin modulates the intracellular responses of endothelial cells and pulmonary artery mesenchymal cells (72, 73).

Fibrinogen abnormalities associated with abnormal fibrin structure, delayed fibrinolysis and alterations in remodeling cell ligands have been observed in patients with CTEPH. Some patients with CTEPH have clots formed with purified fibrinogen resistant to plasmin-mediated lysis and, in particular, B-knob removal (42). B knobs are ligands for endothelial cells and other remodeling cells. Their accessibility is associated with the degree of organization of fibrin polymers (74, 75).

Resistance to lysis in some patients with CTEPH is associated with specific genetic mutations and post-translational modifications of fibrinogen (76, 77). CTEPH-associated fibrin(ogen) abnormalities are altered on a molecular level (78), polymerize abnormally and form disorganized thrombi (Figure 2) (79). The disorganized fibrin polymer networks within the thrombi can be resistant to lysis and can alter the accessibility of ligands for remodeling cells.

### Inflammation and Remodeling of Thrombi

Inflammation likely plays a key role in both the resolution of an acute thrombus and the development of CTEPH. The early phase of thrombus resolution is a neutrophil-mediated process is dependent on a number of inflammatory cytokines, including IL-1 $\beta$  and transforming growth factor (TGF)- $\alpha$  (80). Underscoring the importance of neutrophils to the initial

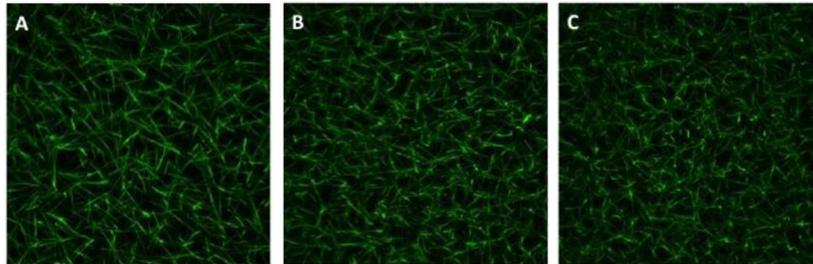
thrombus resolution, neutropenia in a rat model leads to failure of thrombus resolution and three times as much collagen deposition in vessel walls (81). Beyond 1 week after acute thrombosis, this environment shifts from a neutrophil-mediated to a monocyte-driven process with expression of pro-fibrotic growth factors including VEGF and TGF- $\beta$ , leading to increased expression of the collagen I and III genes (82).

Chronic inflammatory changes are observed histologically in the fibrothrombotic material collected from patients with CTEPH during pulmonary endarterectomy (83, 84). Compared with healthy control subjects, several inflammatory cytokines are increased in the plasma of patients with CTEPH, including IL-6, IFN- $\gamma$ -induced protein-10, macrophage inflammatory protein (MIP)-1 $\alpha$ , and RANTES (regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted) (85). Up-regulation of CCL-2 (monocyte chemoattractant protein [MCP]-1) chemokines in plasma and large pulmonary arteries is correlated with elevated pulmonary vascular resistance and CTEPH (86).

Numerous medical conditions associated with chronic inflammation have been associated with CTEPH including ventriculoatrial shunts (for the treatment of hydrocephalus) (59, 60, 87), staphylococcal infection (88), osteomyelitis, and inflammatory bowel disease (59, 60, 87). Circulating levels of C-reactive protein (CRP), a well-characterized inflammatory marker, are elevated in patients with CTEPH (89). Pulmonary endarterectomy results in the rapid normalization of preoperatively elevated tumor necrosis factor- $\alpha$  levels (90). Pulmonary artery endothelial and smooth muscle cells isolated from pulmonary endarterectomy specimens have *in vitro* increased proliferative features with a potential role for CRP through the NF- $\kappa$ B signaling pathway (91, 92).

### Angiogenesis and Vascular Remodeling in the Development of CTEPH

Some investigators have postulated that inadequate endothelial responses to the acute thrombotic material may be responsible for CTEPH (93). IL-8 (94),



**Figure 2.** Disorganized fibrin clots from chronic thromboembolic pulmonary hypertension (CTEPH)-associated dysfibrinogenemias. Fibrin clots were prepared from purified fibrinogen and subjected to laser scanning confocal microscopy. Compared with (A) the fibrin network from normal fibrinogen, the fibrin networks from the CTEPH-associated dysfibrinogenemias (B)  $\text{A}\alpha$  88 Leu/His (fibrinogen<sub>San Diego-IV</sub>) and (C)  $\text{B}\beta$  235 Pro/Leu (fibrinogen<sub>San Diego-III</sub>) exhibit distinctively disorganized structures. The disorganization is associated with resistance to lysis. Original magnification (all micrographs),  $\times 100$ .

VEGF (95–97), and basic fibroblastic growth factor (95) stimulate angiogenesis and may facilitate thrombus resolution (95, 98). It is unclear, however, whether promotion of endothelial function will translate directly into a therapeutic strategy to enhance thrombus resolution (99).

The neovascularization responsible for the slower phase of thrombus resolution may involve recruitment of cells from the circulating blood (100). Monocytes (96) and endothelial progenitor cells (101) may be recruited and form channels within the clot to restore the lumen. Tissue recovered from patients with CTEPH contains mediators that can inhibit angiogenesis (93). Furthermore, the peptide regions of fibrin that have been implicated in the

control of endothelial cell proliferation (the fibrin “B-knobs”) are particularly resistant to lysis in some patients with CTEPH (42). Tissue recovered from patients with CTEPH also contains angiogenic progenitor cells (102).

### Conclusions

The restoration of perfusion after an acute pulmonary embolism exists on a spectrum. The majority of patients restore normal blood flow within weeks of adequate anticoagulation. However, up to one-third of patients may have persistent perfusion defects long after the acute pulmonary embolism; a portion of those with perfusion defects go on to develop

CTEPH. The progression from acute pulmonary embolism to CTEPH is multifactorial, and involves straightforward risk factors such as the magnitude of the acute event. However, there is compelling evidence that imbalances of thrombotic/thrombolytic mechanisms as well as inflammation/remodeling mechanisms can be implicated in the transition from erythrocyte- and fibrin-laden thrombi to the fibrotic intravascular scars characteristic of CTEPH. A better understanding of the interplay between these factors may enhance the ability to prevent and treat CTEPH in the future. ■

**Author disclosures** are available with the text of this article at [www.atsjournals.org](http://www.atsjournals.org).

### References

- Kim NH, Delcroix M, Jenkins DP, Channick R, Darteville P, Jansa P, Lang I, Madani MM, Ogino H, Pengo V, *et al.* Chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2013; 62(25, Suppl):D92–D99.
- Pepke-Zaba J, Delcroix M, Lang I, Mayer E, Jansa P, Ambroz D, Treacy C, D’Armini AM, Morsolini M, Snijder R, *et al.* Chronic thromboembolic pulmonary hypertension (CTEPH): results from an international prospective registry. *Circulation* 2011;124:1973–1981.
- Becattini C, Agnelli G, Pesavento R, Silingardi M, Poggio R, Taliani MR, Ageno W. Incidence of chronic thromboembolic pulmonary hypertension after a first episode of pulmonary embolism. *Chest* 2006;130:172–175.
- Guérin L, Couturaud F, Parent F, Revel MP, Gillaizeau F, Planquette B, Pontal D, Guégan M, Simonneau G, Meyer G, *et al.* Prevalence of chronic thromboembolic pulmonary hypertension after acute pulmonary embolism: prevalence of CTEPH after pulmonary embolism. *Thromb Haemost* 2014;112:598–605.
- Klok FA, van Kralingen KW, van Dijk AP, Heyning FH, Vliegen HW, Huisman MV. Prospective cardiopulmonary screening program to detect chronic thromboembolic pulmonary hypertension in patients after acute pulmonary embolism. *Haematologica* 2010;95:970–975.
- Korkmaz A, Ozlu T, Ozsu S, Kazaz Z, Bulbul Y. Long-term outcomes in acute pulmonary thromboembolism: the incidence of chronic thromboembolic pulmonary hypertension and associated risk factors. *Clin Appl Thromb Hemost* 2012;18:281–288.
- Pengo V, Lensing AW, Prins MH, Marchiori A, Davidson BL, Tiozzo F, Albanese P, Biasiolo A, Pegoraro C, Iliceto S, *et al.*; Thromboembolic Pulmonary Hypertension Study Group. Incidence of chronic thromboembolic pulmonary hypertension after pulmonary embolism. *N Engl J Med* 2004;350:2257–2264.
- Poli D, Grifoni E, Antonucci E, Arcangeli C, Prisco D, Abbate R, Miniati M. Incidence of recurrent venous thromboembolism and of chronic thromboembolic pulmonary hypertension in patients after a first episode of pulmonary embolism. *J Thromb Thrombolysis* 2010;30:294–299.
- Surie S, Gibson NS, Gerdes VE, Bouma BJ, van Eck-Smit BL, Buller HR, Bresser P. Active search for chronic thromboembolic pulmonary hypertension does not appear indicated after acute pulmonary embolism. *Thromb Res* 2010;125:e202–e205.
- Kuruvilla J, Wells PS, Morrow B, MacKinnon K, Keeney M, Kovacs MJ. Prospective assessment of the natural history of positive D-dimer results in persons with acute venous thromboembolism (DVT or PE). *Thromb Haemost* 2003;89:284–287.
- Wartski M, Collignon MA, Tinzaparin ou Heparin Standard: Evaluation dans l’Embolie Pulmonaire (THESEE) Study Group. Incomplete recovery of lung perfusion after 3 months in patients with acute pulmonary embolism treated with antithrombotic agents. *J Nucl Med* 2000;41:1043–1048.

- 12 Palla A, Donnamaria V, Petruzzelli S, Giuntini C. Follow-up of pulmonary perfusion recovery after embolism. *J Nucl Med Allied Sci* 1986;30:23–28.
- 13 Prediletto R, Paoletti P, Fornai E, Perissinotto A, Petruzzelli S, Formichi B, Ruschi S, Palla A, Giannella-Neto A, Giuntini C. Natural course of treated pulmonary embolism: evaluation by perfusion lung scintigraphy, gas exchange, and chest roentgenogram. *Chest* 1990;97:554–561.
- 14 Donnamaria V, Palla A, Petruzzelli S, Carozzi L, Pugliesi O, Giuntini C. Early and late follow-up of pulmonary embolism. *Respiration* 1993;60:15–20.
- 15 Menéndez R, Nauffal D, Cremades MJ. Prognostic factors in restoration of pulmonary flow after submassive pulmonary embolism: a multiple regression analysis. *Eur Respir J* 1998;11:560–564.
- 16 Murphy ML, Bulloch RT. Factors influencing the restoration of blood flow following pulmonary embolization as determined by angiography and scanning. *Circulation* 1968;38:1116–1126.
- 17 Walker RH, Goodwin J, Jackson JA. Resolution of pulmonary embolism. *BMJ* 1970;4:135–139.
- 18 Urokinase Pulmonary Embolism Trial Study Group. The Urokinase Pulmonary Embolism Trial: a national cooperative study. *Circulation* 1973;47(2, Suppl):II-1–II-108.
- 19 James WS III, Menn SJ, Moser KM. Rapid resolution of a pulmonary embolus in man. *West J Med* 1978;128:60–64.
- 20 van Es J, Douma RA, Kamphuisen PW, Gerdes VE, Verhamme P, Wells PS, Bounameaux H, Lensing AW, Büller HR. Clot resolution after 3 weeks of anticoagulant treatment for pulmonary embolism: comparison of computed tomography and perfusion scintigraphy. *J Thromb Haemost* 2013;11:679–685.
- 21 Dalen JE, Banas JS Jr, Brooks HL, Evans GL, Paraskos JA, Dexter L. Resolution rate of acute pulmonary embolism in man. *N Engl J Med* 1969;280:1194–1199.
- 22 Tow DE, Wagner HN Jr. Recovery of pulmonary arterial blood flow in patients with pulmonary embolism. *N Engl J Med* 1967;276:1053–1059.
- 23 Paraskos JA, Adelstein SJ, Smith RE, Rickman FD, Grossman W, Dexter L, Dalen JE. Late prognosis of acute pulmonary embolism. *N Engl J Med* 1973;289:55–58.
- 24 Hall RJ, Sutton GC, Kerr IH. Long-term prognosis of treated acute massive pulmonary embolism. *Br Heart J* 1977;39:1128–1134.
- 25 Sutton GC, Hall RJ, Kerr IH. Clinical course and late prognosis of treated subacute massive, acute minor, and chronic pulmonary thromboembolism. *Br Heart J* 1977;39:1135–1142.
- 26 De Soyza ND, Murphy ML. Persistent post-embolic pulmonary hypertension. *Chest* 1972;62:665–668.
- 27 Cosmi B, Nijkeuter M, Valentino M, Huisman MV, Barozzi L, Palareti G. Residual emboli on lung perfusion scan or multidetector computed tomography after a first episode of acute pulmonary embolism. *Intern Emerg Med* 2011;6:521–528.
- 28 Sanchez O, Helley D, Couchon S, Roux A, Delaval A, Trinquart L, Collignon MA, Fischer AM, Meyer G. Perfusion defects after pulmonary embolism: risk factors and clinical significance. *J Thromb Haemost* 2010;8:1248–1255.
- 29 Miniati M, Monti S, Bottai M, Scoscia E, Bauleo C, Tonelli L, Dainelli A, Giuntini C. Survival and restoration of pulmonary perfusion in a long-term follow-up of patients after acute pulmonary embolism. *Medicine (Baltimore)* 2006;85:253–262.
- 30 Meneveau N, Ider O, Seronde MF, Chopard R, Davani S, Bernard Y, Schiele F. Long-term prognostic value of residual pulmonary vascular obstruction at discharge in patients with intermediate- to high-risk pulmonary embolism. *Eur Heart J* 2013;34:693–701.
- 31 Klok FA, Tijmens JE, Haeck ML, van Kralingen KW, Huisman MV. Persistent dyspnea complaints at long-term follow-up after an episode of acute pulmonary embolism: results of a questionnaire. *Eur J Intern Med* 2008;19:625–629.
- 32 Klok FA, van Kralingen KW, van Dijk APJ, Heyning FH, Vliegen HW, Huisman MV. Prevalence and potential determinants of exertional dyspnea after acute pulmonary embolism. *Respir Med* 2010;104:1744–1749.
- 33 Winebright JW, Gerdes AJ, Nelp WB. Restoration of blood flow after pulmonary embolism. *Arch Intern Med* 1970;125:241–247.
- 34 Ribeiro A, Lindmarker P, Johnsson H, Juhlin-Dannfelt A, Jorfeldt L. Pulmonary embolism: one-year follow-up with echocardiography Doppler and five-year survival analysis. *Circulation* 1999;99:1325–1330.
- 35 Stevinson BG, Hernandez-Nino J, Rose G, Kline JA. Echocardiographic and functional cardiopulmonary problems 6 months after first-time pulmonary embolism in previously healthy patients. *Eur Heart J* 2007;28:2517–2524.
- 36 Golpe R, Pérez-de-Llano LA, Castro-Añón O, Vázquez-Caruncho M, González-Juanatey C, Veres-Racamonde A, Iglesias-Moreira C, Fariñas MC. Right ventricle dysfunction and pulmonary hypertension in hemodynamically stable pulmonary embolism. *Respir Med* 2010;104:1370–1376.
- 37 Fedullo PF, Auger WR, Kerr KM, Rubin LJ. Chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 2001;345:1465–1472.
- 38 Wolf M, Boyer-Neumann C, Parent F, Eschwege V, Jaillet H, Meyer D, Simonneau G. Thrombotic risk factors in pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 2000;15:395–399.
- 39 Moser KM, Auger WR, Fedullo PF. Chronic major-vessel thromboembolic pulmonary hypertension. *Circulation* 1990;81:1735–1743.
- 40 Siebenlist KR, Mosesson MW. Progressive cross-linking of fibrin  $\gamma$  chains increases resistance to fibrinolysis. *J Biol Chem* 1994;269:28414–28419.
- 41 Lami D, Cellai AP, Antonucci E, Fiorillo C, Becatti M, Grifoni E, Cenci C, Marcucci R, Mannini L, Miniati M, et al. Residual perfusion defects in patients with pulmonary embolism are related to impaired fibrinolytic capacity. *Thromb Res* 2014;134:737–741.
- 42 Morris TA, Marsh JJ, Chiles PG, Auger WR, Fedullo PF, Woods VL Jr. Fibrin derived from patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension is resistant to lysis. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;173:1270–1275.
- 43 Lankeit M, Dellas C, Panzenböck A, Skoro-Sajer N, Bonderman D, Olschewski M, Schäfer K, Puls M, Konstantinides S, Lang IM. Heart-type fatty acid-binding protein for risk assessment of chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 2008;31:1024–1029.
- 44 Klok FA, Zondag W, van Kralingen KW, van Dijk APJ, Tamsma JT, Heyning FH, Vliegen HW, Huisman MV. Patient outcomes after acute pulmonary embolism: a pooled survival analysis of different adverse events. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;181:501–506.
- 45 Auger WR, Permpikul P, Moser KM. Lupus anticoagulant, heparin use, and thrombocytopenia in patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension: a preliminary report. *Am J Med* 1995;99:392–396.
- 46 Bonderman D, Turecek PL, Jakowitsch J, Weltermann A, Adlbrecht C, Schneider B, Kneussl M, Rubin LJ, Kyrle PA, Klepetko W, et al. High prevalence of elevated clotting factor VIII in chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Thromb Haemost* 2003;90:372–376.
- 47 Bonderman D, Jakowitsch J, Adlbrecht C, Schemper M, Kyrle PA, Schönauer V, Exner M, Klepetko W, Kneussl MP, Maurer G, et al. Medical conditions increasing the risk of chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Thromb Haemost* 2005;93:512–516.
- 48 Urokinase Pulmonary Embolism Trial Study Group. Urokinase Pulmonary Embolism Trial: phase 1 results: a cooperative study. *JAMA* 1970;214:2163–2172.
- 49 Tibbutt DA, Davies JA, Anderson JA, Fletcher EWL, Hamill J, Holt JM, Thomas ML, Lee G, Miller GAH, Sharp AA, et al. Comparison by controlled clinical trial of streptokinase and heparin in treatment of life-threatening pulmonary embolism. *BMJ* 1974;1:343–347.
- 50 Ly B, Arnesen H, Eie H, Hol R. A controlled clinical trial of streptokinase and heparin in the treatment of major pulmonary embolism. *Acta Med Scand* 1978;203:465–470.
- 51 Dotter CT, Seaman AJ, Rosch J, Porter JM. Streptokinase and heparin in the treatment of pulmonary embolism: a randomized comparison. *Vasc Endovascular Surg* 1979;13:42–52.
- 52 Levine M, Hirsh J, Weitz J, Cruickshank M, Neemeh J, Turpie AG, Gent M. A randomized trial of a single bolus dosage regimen of

- 12 Palla A, Donnamaria V, Petruzzelli S, Giuntini C. Follow-up of pulmonary perfusion recovery after embolism. *J Nucl Med Allied Sci* 1986;30:23–28.
- 13 Prediletto R, Paoletti P, Fornai E, Perissinotto A, Petruzzelli S, Formichi B, Ruschi S, Palla A, Giannella-Neto A, Giuntini C. Natural course of treated pulmonary embolism: evaluation by perfusion lung scintigraphy, gas exchange, and chest roentgenogram. *Chest* 1990;97:554–561.
- 14 Donnamaria V, Palla A, Petruzzelli S, Carozzi L, Pugliesi O, Giuntini C. Early and late follow-up of pulmonary embolism. *Respiration* 1993;60:15–20.
- 15 Menéndez R, Nauffal D, Cremades MJ. Prognostic factors in restoration of pulmonary flow after submassive pulmonary embolism: a multiple regression analysis. *Eur Respir J* 1998;11:560–564.
- 16 Murphy ML, Bulloch RT. Factors influencing the restoration of blood flow following pulmonary embolization as determined by angiography and scanning. *Circulation* 1968;38:1116–1126.
- 17 Walker RH, Goodwin J, Jackson JA. Resolution of pulmonary embolism. *BMJ* 1970;4:135–139.
- 18 Urokinase Pulmonary Embolism Trial Study Group. The Urokinase Pulmonary Embolism Trial: a national cooperative study. *Circulation* 1973;47(2, Suppl):II-1–II-108.
- 19 James WS III, Menn SJ, Moser KM. Rapid resolution of a pulmonary embolus in man. *West J Med* 1978;128:60–64.
- 20 van Es J, Douma RA, Kamphuisen PW, Gerdes VE, Verhamme P, Wells PS, Bounameaux H, Lensing AW, Büller HR. Clot resolution after 3 weeks of anticoagulant treatment for pulmonary embolism: comparison of computed tomography and perfusion scintigraphy. *J Thromb Haemost* 2013;11:679–685.
- 21 Dalen JE, Banas JS Jr, Brooks HL, Evans GL, Paraskos JA, Dexter L. Resolution rate of acute pulmonary embolism in man. *N Engl J Med* 1969;280:1194–1199.
- 22 Tow DE, Wagner HN Jr. Recovery of pulmonary arterial blood flow in patients with pulmonary embolism. *N Engl J Med* 1967;276:1053–1059.
- 23 Paraskos JA, Adelstein SJ, Smith RE, Rickman FD, Grossman W, Dexter L, Dalen JE. Late prognosis of acute pulmonary embolism. *N Engl J Med* 1973;289:55–58.
- 24 Hall RJ, Sutton GC, Kerr IH. Long-term prognosis of treated acute massive pulmonary embolism. *Br Heart J* 1977;39:1128–1134.
- 25 Sutton GC, Hall RJ, Kerr IH. Clinical course and late prognosis of treated subacute massive, acute minor, and chronic pulmonary thromboembolism. *Br Heart J* 1977;39:1135–1142.
- 26 De Soyza ND, Murphy ML. Persistent post-embolic pulmonary hypertension. *Chest* 1972;62:665–668.
- 27 Cosmi B, Nijkeuter M, Valentino M, Huisman MV, Barozzi L, Palareti G. Residual emboli on lung perfusion scan or multidetector computed tomography after a first episode of acute pulmonary embolism. *Intern Emerg Med* 2011;6:521–528.
- 28 Sanchez O, Helley D, Couchon S, Roux A, Delaval A, Trinquart L, Collignon MA, Fischer AM, Meyer G. Perfusion defects after pulmonary embolism: risk factors and clinical significance. *J Thromb Haemost* 2010;8:1248–1255.
- 29 Miniati M, Monti S, Bottai M, Scoscia E, Bauleo C, Tonelli L, Dainelli A, Giuntini C. Survival and restoration of pulmonary perfusion in a long-term follow-up of patients after acute pulmonary embolism. *Medicine (Baltimore)* 2006;85:253–262.
- 30 Meneveau N, Ider O, Seronde MF, Chopard R, Davani S, Bernard Y, Schiele F. Long-term prognostic value of residual pulmonary vascular obstruction at discharge in patients with intermediate- to high-risk pulmonary embolism. *Eur Heart J* 2013;34:693–701.
- 31 Klok FA, Tijmens JE, Haec ML, van Kralingen KW, Huisman MV. Persistent dyspnea complaints at long-term follow-up after an episode of acute pulmonary embolism: results of a questionnaire. *Eur J Intern Med* 2008;19:625–629.
- 32 Klok FA, van Kralingen KW, van Dijk APJ, Heyning FH, Vliegen HW, Huisman MV. Prevalence and potential determinants of exertional dyspnea after acute pulmonary embolism. *Respir Med* 2010;104:1744–1749.
- 33 Winebright JW, Gerdes AJ, Nelp WB. Restoration of blood flow after pulmonary embolism. *Arch Intern Med* 1970;125:241–247.
- 34 Ribeiro A, Lindmarker P, Johnsson H, Juhlin-Dannfelt A, Jorfeldt L. Pulmonary embolism: one-year follow-up with echocardiography Doppler and five-year survival analysis. *Circulation* 1999;99:1325–1330.
- 35 Stevinson BG, Hernandez-Nino J, Rose G, Kline JA. Echocardiographic and functional cardiopulmonary problems 6 months after first-time pulmonary embolism in previously healthy patients. *Eur Heart J* 2007;28:2517–2524.
- 36 Golpe R, Pérez-de-Llano LA, Castro-Añón O, Vázquez-Caruncho M, González-Juanatey C, Veres-Racamonde A, Iglesias-Moreira C, Fariñas MC. Right ventricle dysfunction and pulmonary hypertension in hemodynamically stable pulmonary embolism. *Respir Med* 2010;104:1370–1376.
- 37 Fedullo PF, Auger WR, Kerr KM, Rubin LJ. Chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 2001;345:1465–1472.
- 38 Wolf M, Boyer-Neumann C, Parent F, Eschwege V, Jaillet H, Meyer D, Simonneau G. Thrombotic risk factors in pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 2000;15:395–399.
- 39 Moser KM, Auger WR, Fedullo PF. Chronic major-vessel thromboembolic pulmonary hypertension. *Circulation* 1990;81:1735–1743.
- 40 Siebenlist KR, Mosesson MW. Progressive cross-linking of fibrin  $\gamma$  chains increases resistance to fibrinolysis. *J Biol Chem* 1994;269:28414–28419.
- 41 Lami D, Cellai AP, Antonucci E, Fiorillo C, Becatti M, Grifoni E, Cenci C, Marcucci R, Mannini L, Miniati M, et al. Residual perfusion defects in patients with pulmonary embolism are related to impaired fibrinolytic capacity. *Thromb Res* 2014;134:737–741.
- 42 Morris TA, Marsh JJ, Chiles PG, Auger WR, Fedullo PF, Woods VL Jr. Fibrin derived from patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension is resistant to lysis. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;173:1270–1275.
- 43 Lankeit M, Dellas C, Panzenböck A, Skoro-Sajer N, Bonderman D, Olschewski M, Schäfer K, Puls M, Konstantinides S, Lang IM. Heart-type fatty acid-binding protein for risk assessment of chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 2008;31:1024–1029.
- 44 Klok FA, Zondag W, van Kralingen KW, van Dijk APJ, Tamsma JT, Heyning FH, Vliegen HW, Huisman MV. Patient outcomes after acute pulmonary embolism: a pooled survival analysis of different adverse events. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;181:501–506.
- 45 Auger WR, Permpikul P, Moser KM. Lupus anticoagulant, heparin use, and thrombocytopenia in patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension: a preliminary report. *Am J Med* 1995;99:392–396.
- 46 Bonderman D, Turecek PL, Jakowitsch J, Weltermann A, Adlbrecht C, Schneider B, Kneussl M, Rubin LJ, Kyrle PA, Klepetko W, et al. High prevalence of elevated clotting factor VIII in chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Thromb Haemost* 2003;90:372–376.
- 47 Bonderman D, Jakowitsch J, Adlbrecht C, Schemper M, Kyrle PA, Schönauer V, Exner M, Klepetko W, Kneussl MP, Maurer G, et al. Medical conditions increasing the risk of chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Thromb Haemost* 2005;93:512–516.
- 48 Urokinase Pulmonary Embolism Trial Study Group. Urokinase Pulmonary Embolism Trial: phase 1 results: a cooperative study. *JAMA* 1970;214:2163–2172.
- 49 Tibbutt DA, Davies JA, Anderson JA, Fletcher EWL, Hamill J, Holt JM, Thomas ML, Lee G, Miller GAH, Sharp AA, et al. Comparison by controlled clinical trial of streptokinase and heparin in treatment of life-threatening pulmonary embolism. *BMJ* 1974;1:343–347.
- 50 Ly B, Arnesen H, Eie H, Hol R. A controlled clinical trial of streptokinase and heparin in the treatment of major pulmonary embolism. *Acta Med Scand* 1978;203:465–470.
- 51 Dotter CT, Seaman AJ, Rosch J, Porter JM. Streptokinase and heparin in the treatment of pulmonary embolism: a randomized comparison. *Vasc Endovascular Surg* 1979;13:42–52.
- 52 Levine M, Hirsh J, Weitz J, Cruickshank M, Neemeh J, Turpie AG, Gent M. A randomized trial of a single bolus dosage regimen of

- 91 Wynants M, Quarck R, Ronisz A, Alfaro-Moreno E, Van Raemdonck D, Meyns B, Delcroix M. Effects of C-reactive protein on human pulmonary vascular cells in chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 2012;40:886–894.
- 92 Wynants M, Vengethasamy L, Ronisz A, Meyns B, Delcroix M, Quarck R. NF- $\kappa$ B pathway is involved in CRP-induced effects on pulmonary arterial endothelial cells in chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2013;305:L934–L942.
- 93 Zabini D, Nagaraj C, Stacher E, Lang IM, Nierlich P, Klepetko W, Heinemann A, Olschewski H, Bálint Z, Olschewski A. Angiostatic factors in the pulmonary endarterectomy material from chronic thromboembolic pulmonary hypertension patients cause endothelial dysfunction. *PLoS One* 2012;7:e43793.
- 94 Henke PK, Wakefield TW, Kadell AM, Linn MJ, Varma MR, Sarkar M, Hawley A, Fowlkes JB, Strieter RM. Interleukin-8 administration enhances venous thrombosis resolution in a rat model. *J Surg Res* 2001;99:84–91.
- 95 Waltham M, Burnand KG, Collins M, Smith A. Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor are found in resolving venous thrombi. *J Vasc Surg* 2000;32:988–996.
- 96 Waltham M, Burnand KG, Collins M, McGuinness CL, Singh I, Smith A. Vascular endothelial growth factor enhances venous thrombus recanalization and organisation. *Thromb Haemost* 2003;89:169–176.
- 97 Waltham M, Burnand K, Fenske C, Modarai B, Humphries J, Smith A. Vascular endothelial growth factor naked DNA gene transfer enhances thrombus recanalization and resolution. *J Vasc Surg* 2005;42:1183–1189.
- 98 Modarai B, Burnand KG, Humphries J, Waltham M, Smith A. The role of neovascularisation in the resolution of venous thrombus. *Thromb Haemost* 2005;93:801–809.
- 99 Varma MR, Moaveni DM, Dewyer NA, Varga AJ, Deatrick KB, Kunkel SL, Upchurch GR Jr, Wakefield TW, Henke PK. Deep vein thrombosis resolution is not accelerated with increased neovascularization. *J Vasc Surg* 2004;40:536–542.
- 100 Modarai B, Burnand KG, Sawyer B, Smith A. Endothelial progenitor cells are recruited into resolving venous thrombi. *Circulation* 2005;111:2645–2653.
- 101 Modarai B, Humphries J, Burnand KG, Gossage JA, Waltham M, Wadoodi A, Kanaganayagam GS, Afuwape A, Paleolog E, Smith A. Adenovirus-mediated VEGF gene therapy enhances venous thrombus recanalization and resolution. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:1753–1759.
- 102 Yao W, Firth AL, Sacks RS, Ogawa A, Auger WR, Fedullo PF, Madani MM, Lin GY, Sakakibara N, Thistlethwaite PA, et al. Identification of putative endothelial progenitor cells (CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>Flk-1<sup>+</sup>) in endarterectomized tissue of patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2009;296:L870–L878.

## Résumé

---

**Titre :** Séquelles perfusionnelles après une embolie pulmonaire : pronostic, prédiction et mécanisme physiopathologiques

**Mots clés:** embolie pulmonaire, obstruction vasculaire résiduelle, pronostic, fibrinogène, dysfonction endothéliale, angiogenèse

**Résumé:** Au décours d'une première embolie pulmonaire (EP), certains patients présentent un syndrome post EP : un tiers des patients ont une obstruction persistante de la vascularisation pulmonaire, associée à la persistance d'une dyspnée et une limitation des performances à l'effort. Certains patients présenteront une récurrence d'EP ou, plus rarement, une hypertension pulmonaire, dont les séquelles perfusionnelles sont un critère diagnostique indispensable. Le rôle et la physiopathologie des séquelles perfusionnelles au cours du syndrome post EP est inconnue. Ce travail a mis en évidence l'existence d'un risque majoré de récurrence d'EP (odds ratio 1,9) chez les patients présentant des séquelles perfusionnelles >10% à la vascularisation pulmonaire. L'analyse des propriétés fonctionnelles du fibrinogène purifié à partir du plasma de patients suivis pour une première EP améliore la prédiction de séquelles perfusionnelles confirmant le rôle clé de celui-ci dans la physiopathologie de la maladie. Ainsi, une forte proportion de chaîne B $\beta$  porteuse d'un seul résidu acide sialique majoré le risque de séquelles. L'étude des cellules endothéliales circulantes à la phase aiguë et après une EP montre que les patients qui développeront des séquelles mobilisent peu de cellules endothéliales, témoignant d'une forte altération des processus de réparation de l'endothélium pulmonaire. L'interaction de la fibrine avec les progéniteurs endothéliaux dans cette anomalie de la régulation est possible : les progéniteurs expriment le récepteur VLDLr dont l'épitope  $\beta$ 15-42 de la fibrine est un ligand impliqué dans la régulation du cycle cellulaire et l'inhibition de l'angiogenèse.

**Title:** Pulmonary vascular sequels after pulmonary embolism: prognosis, prediction and physiopathology

**Key-words:** pulmonary embolism, residual vascular obstruction, prognosis, fibrinogen, endothelial dysfunction, angiogenesis

**Abstract:** Post Pulmonary Embolism (PE) syndrome is not rare after PE: one third of the patients present residual pulmonary vascular obstruction (RPVO) traducing sequels associated with increased dyspnea and impaired exercise capacity. Some of these patients will suffer PE recurrence or, more rarely, chronic thromboembolic pulmonary hypertension, whose one the diagnosis criteria is persistent perfusion defect. Prognosis value and mechanisms underlying vascular sequels are still unclear. The present work shows that RPVO > 10% after a first PE is associated with an increased risk for venous thromboembolism recurrence (odds ratio 1.9). Secondly, fibrinogen properties were investigated in PE patients. Patients with RPVO >10% presented more monosialiated B $\beta$ chain form. Prediction models for RPVO that include fibrinogen analysis were more accurate than those without fibrinogen data; This results highlights the key role of fibrin in the pathophysiology of chronic venous thromboembolism. Interestingly, the present work shows that patient who will present RPVO had an impaired endothelial cells mobilization. Compared to patients without RPVO, patients with RPVO had lower circulating endothelial cells at the acute phase of PE. This endothelial dysfunction is probably triggered by endothelial progenitors that expressed the very low density lipoprotein receptor (VLDLr), implicated in the inhibition of angiogenesis and able to bind the  $\beta$ 15-42 N terminal sequence of the fibrin B $\beta$  chain.