THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

École doctorale : CSV- Chimie et Sciences du Vivant

Spécialité : Physiologie-Physiopathogies-Pharmacologie

Unité de recherche : Biologie et Biotechnologie pour la Santé

Fonction du récepteur ALK1 dans l'endothélium adulte : Vers de nouvelles thérapies pour la maladie de Rendu-Osler

Functions of the ALK1 receptor in the adult endothelium: Toward New Therapies for Rendu-Osler Disease

Présentée par :

Yasmin RIDA

Direction de thèse :

Sabine BAILLY DIRECTRICE DE RECHERCHE, INSERM	Directrice de thèse
Nicolas RICARD Chargé de recherche, INSERM	Co-encadrant de thèse

Rapporteurs :

Julie GAVARD
DIRECTRICE DE RECHERCHE, Université Nantes

Johanne POISSON
MAITRESSE DE CONFERENCES, Université Paris Cité

Thèse soutenue publiquement le **18 novembre 2025**, devant le jury composé de :

Sabine BAILLY, DIRECTRICE DE RECHERCHE, Université Grenoble Alpes	Directrice de thèse
Nicolas RICARD, CHARGE DE RECHERCHE, Université Grenoble Alpes	Co-encadrant de thèse
Julie GAVARD, DIRECTRICE DE RECHERCHE, Université Nantes	Rapporteure
Johanne POISSON, MAITRESSE DE CONFERENCES, Université Paris Cité	Rapporteure
Ly TU, INGENIEUR DE RECHERCHE, Université Paris Saclay	Examinateur
Thomas DECAENS, PROFESSEUR, CHU Grenoble Alpes	Président

Remerciements

Je souhaite tout d'abord exprimer ma profonde gratitude aux membres du jury pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant d'évaluer ce travail de thèse. Je remercie chaleureusement **Dr Julie Gavard, Dr Johanne Poisson, Dr Ly Tu et Pr Thomas Decaens** pour le temps consacré à la lecture attentive de ce manuscrit, pour la pertinence de leurs remarques et pour l'intérêt porté à mes travaux.

Je tiens également à remercier sincèrement les membres de mon **Comité de Suivi Individuel (CSI)**, **Dr Émilie Boncoeur**, **Dr Bénédicte Elena-Herrmann** et **Dr Béatrice Eymin**, pour leurs conseils avisés, leurs retours constructifs et leur accompagnement tout au long de ces trois années de doctorat.

Ce travail a été financé par l'**Agence Nationale de la Recherche (ANR)**, que je remercie vivement pour son soutien.

J'ai eu l'opportunité de réaliser ma thèse au sein de l'**équipe BAL**, dont le dynamisme, l'excellence scientifique et la richesse des échanges offrent un environnement de travail particulièrement stimulant.

Je souhaite exprimer ma plus profonde reconnaissance à mes directeurs de thèse, **Dr Sabine Bailly** et **Dr Nicolas Ricard**, pour la confiance qu'ils m'ont accordée. Leur expertise scientifique, leur rigueur, leur disponibilité et la qualité de leur encadrement ont été déterminantes pour la réussite de ce travail. Leurs conseils, leur accompagnement attentif et leur engagement constant ont largement contribué à mon développement scientifique et personnel. Je me considère chanceuse d'avoir pu réaliser ce travail sous leur direction.

Je souhaite adresser mes sincères remerciements au **Dr Agnès Castan** pour son aide précieuse et ses conseils scientifiques et techniques tout au long de ce travail. Je remercie **Pr Emmanuelle Tillet** pour ses retours scientifiques, la richesse de nos échanges et son implication active lors des discussions d'équipe. Mes remerciements vont également à **Dr Claire Bouvard** pour ses conseils avisés, ainsi qu'à **Aude Salomon**, pour son aide lors de nombreuses manipulations expérimentales.

Un merci tout particulier à **Léa Vialet**, avec qui j'ai partagé le bureau durant cette thèse. Merci du fond du cœur pour ton écoute, ta gentillesse et tous les moments partagés, qu'ils aient été stressants ou joyeux. Ta présence a énormément compté pour moi tout au long de ce doctorat. Je te souhaite le meilleur pour la suite et une très belle soutenance de thèse l'année prochaine, que je suis certaine tu réussiras brillamment.

Je remercie chaleureusement **Mathilde Labrosse** et **Louane Despas**, doctorantes de l'équipe BAL, pour leur entraide et leur bonne humeur. Je remercie tout particulièrement **Léa Beurier-Soulat** pour son aide précieuse, notamment au cours des derniers mois.

À toute l'équipe BAL, je tiens à vous dire à quel point ces années passées à vos côtés ont compté pour moi. Bien au-delà du travail scientifique, ce sont les échanges, la solidarité, les

rires et les moments partagés au quotidien, au laboratoire comme en dehors, qui ont rendu cette aventure si unique. Vous avez profondément marqué mon parcours de doctorat, et je garderai de cette équipe des souvenirs précieux. J'espère sincèrement que nous resterons en contact pour longtemps.

Je tiens également à remercier les **bioinformaticiens de l'équipe IMAC**, **Dr Laurent Guyon** et **Dr Dzenis Koca**, pour leur expertise et leur contribution essentielle à l'analyse et à l'interprétation des données de single-cell.

Je remercie **Dr Sophie Dupuis-Girod** pour la mise à disposition de lames de patients, apportant une dimension clinique précieuse à ce projet.

Je remercie l'ensemble des membres de l'**équipe BioSanté** pour leur accueil et pour l'environnement de travail stimulant qui a marqué ces années de doctorat.

Je remercie toutes les personnes ayant contribué, de près ou de loin, à ce travail, notamment pour leur aide technique, administrative ou logistique, sans laquelle cette thèse n'aurait pu être menée à bien.

Enfin, j'exprime toute ma reconnaissance à ma famille. À mes parents, pour leur amour inconditionnel, leurs sacrifices et leur soutien constant tout au long de mon parcours académique. Ce travail leur est dédié. À mes proches, pour leur patience, leurs encouragements et leur présence précieuse dans les moments de doute comme dans les moments de joie.

À toutes et à tous, merci infiniment.

Table des matières

Liste des figures 8
Table des abréviations 10
Résumé de thèse 13
Thesis Summary 15
Introduction 16
Chapitre 1 : Le système vasculaire 16
1.1. Mécanismes de Formation du système vasculaire 20
1.1.1. La vasculogenèse 21
1.1.2. L'angiogenèse 22
1.2. Le système lymphatique 25
1.3. Quiescence vasculaire : Un état dynamique et actif 25
1.4. Vieillissement du système vasculaire 26
1.5. Hétérogénéité endothéliale : spécialisation organotypique et zonation fonctionnelle intra-organe 27
1.6. RNAseq : un outil pour comprendre l'hétérogénéité endothéliale 29
1.7. Principales voies régulatrices de la stabilité vasculaire 31
1.7.1. Voie VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) 32
1.7.2. Voie Notch 34
1.7.3. Voie des Angiopoïétines 35
1.7.4. Voie PDGF (Platelet Derived Growth Factor) 36
1.7.5. Voie des Sémaphorines 37
1.7.6. Voie BMP9/10/ALK1 39
1.7.7. La famille TGF-β (Transforming Growth Factor ß) 39
1.7.7.1. Ligands de la famille TGFβ 39
1.7.7.2. Récepteurs TGFβ 41
1.7.7.3. Voies de signalisation 42
1.7.7.3.1. Voie canonique SMAD-dépendante 42
1.7.7.3.2. Voie non canonique 44
Chapitre 2 : Maladie de Rendu-Osler ou Télangiectasie Hémorragique Héréditaire (HHT) 45
2.1. Etiologie de la maladie 45

2.2. Manifestations cliniques et symptômes de l'HHT 46
2.2.1. Télangiectasies 46
2.2.2. Epistaxis 48
2.2.3. Malformations artérioveineuses plus larges dans certains organes 49
2.3. Dysrégulation immunitaire associée à l'HHT 50
2.4. Critères de diagnostic (Curaçao) et hypothèse du second Hit 51
2.5. Traitement de la maladie HHT 52
2.5.1. Traitements actuels 52
2.5.2. Futurs traitements 53
Chapitre 3 : BMP9/BMP10 /ALK1 : quiescence vasculaire et malformations artérioveineuses au cœur de la maladie HHT 55
3.1. Sites d'expression du récepteur ALK1 55
3.2. Découverte et caractérisation des ligands d'ALK1 56
3.3. Rôle de la voie BMP9/BMP10/ALK1 dans l'induction de la quiescence vasculaire *in vitro* 57
3.3.1. Rôle sur la prolifération et la migration des cellules endothéliales 57
3.4. Modèles *in vivo* pour l'étude du rôle d'ALK1 dans le remodelage vasculaire et la formation des malformations artérioveineuses associées à l'HHT 58
3.4.1. Souris hétérozygotes 60
3.4.2. Modèles murins conditionnels : délétion spécifique dans un type cellulaire, constitutive ou inductible 63
3.4.2.1. Postnatal 63
3.4.2.2. Souris adultes 67
Chapitre 4 : Organisation et vascularisation hépatique 69
4.1. Organisation anatomique et vascularisation du foie 69
4.2. Matrice extracellulaire hépatique : une structure peu dense au service des fonctions hépatiques 71
4.3. Organisation cellulaire 72
4.3.1. Les hépatocytes 72
4.3.2. Les cellules étoilées du foie 73
4.3.3. Les cellules de Kupffer 74
4.3.4. Les cellules endothéliales spécialisées du foie 74
4.3.4.1. Régulation du tonus vasculaire hépatique 75
4.3.4.2. Fonction de clairance 75

4.3.4.3. Perméabilité hydrodynamique et moléculaire exceptionnelle 76
4.3.4.4. Les LSEC au cœur de la communication intercellulaire : inhibition de l'activation des HSC et modulation des fonctions hépatocytaires 76
4.3.4.4.1. Interactions LSEC – HSC 76
4.3.4.4.2. Interactions LSEC – Hépatocytes 77
4.4. Zonation hépatique 77
4.4.1. Rôle des LSEC dans l'établissement et le maintien de la zonation hépatique ... 79
4.4.2. Mécanismes de régulation de la zonation hépatique : Voie Wnt/β-caténine ... 80
4.5. Répartition spatiale des fonctions métaboliques le long de l'axe portocentral 83
4.5.1. Gestion zonale de l'ammoniac 83
4.5.2. Détoxification des xénobiotiques 83
4.5.3. Métabolisme des glucides 83
4.5.4. Métabolisme des lipides 84
4.6. Altérations pathologiques de l'endothélium sinusoïdal : de la capillarisation des LSEC à la fibrose hépatique 84
4.6.1. Capillarisation des LSEC 84
4.6.2. Effets de la capillarisation des LSEC sur l'activation des HSC 85
4.7. Vieillissement hépatique : altérations vasculaires et dysfonction des LSEC 87
4.8. La voie de signalisation BMP9/10/ALK1 : un régulateur central de l'identité sinusoïdale des LSEC 89
4.8.1. Rôle de la voie BMP9/10/ ALK1 dans le maintien de l'identité des LSEC et l'homéostasie hépatique 89
4.8.2. Effet de cette voie sur la zonation hépatique 92
Objectifs 93
Chapitre 5 : Résultats et méthodologies 94
5.1. Article de thèse 94
5.2. Résultats supplémentaires 146
5.2.1. Analyse comparative des fonctions biologiques entre endothélium hépatique et pulmonaire 147
5.2.2. Analyse fonctionnelle de la phosphorylation oxydative dans les cellules endothéliales du foie et des poumons 149
5.2.3. Sénescence des cellules endothéliales des poumons des souris *Alk1*^{iECKO} 152
5.2.4. Spécificité organotypique des gènes régulés par ALK1 153
5.2.5. Augmentation de la perméabilité vasculaire dans les poumons de la souris *Alk1*^{iECKO} 156

Chapitre 6 : Discussion générale 158
6.1. Capillarisation et perte des fenestrations des LSEC 158
6.2. Zonation hépatique 159
6.3. Conséquences de la perte de zonation hépatique sur le métabolisme hépatique 159
6.4. Organotypie et implications thérapeutiques de l'imatinib 160
6.5. Expression d'ALK1 versus localisation des phénotypes 162
6.6. Effet de la délétion d'*Alk1* sur les poumons 162
Chapitre 7 : Perspectives 163
7.1. Réversion des effets de la Sema3A afin de déterminer le rôle de Sema3A sur la perte des fenestrations des LSEC ou de la perméabilité pulmonaire 163
7.2. Surexpression du facteur de transcription *Gata4* afin d'étudier son implication suite à la perte d'*Alk1* sur le phénotype hépatique 163
7.3. Réalisation d'un RNA-seq bulk dans les cellules endothéliales du foie, de cerveau et des poumons afin d'étudier l'effet organotypique d'ALK1 164
7.4. Effet de la délétion d'*Alk1* sur l'inflammation pulmonaire 164
Références 166

Liste des figures

Figure 1. Circulation systémique et pulmonaire. 17
Figure 2. Schéma du réseau vasculaire. 18
Figure 3. Structure des vaisseaux sanguins. 19
Figure 4. Différents types d'endothélium : continu, fenestré et sinusoïdal adaptés à la perméabilité vasculaire propre à chaque tissu. 20
Figure 5. Vasculogenèse : première étape de formation du système vasculaire lors du développement embryonnaire. 22
Figure 6. Angiogenèse par intussusception. 23
Figure 7. Angiogenèse par bourgeonnement. 24
Figure 8. Zonation intra-organe et spécialisation des endothéliums. 29
Figure 9. Hétérogénéité endothéliale inter-organes visualisée par UMAP. 31
Figure 10. Principaux acteurs contrôlant l'angiogenèse et la quiescence vasculaire. 32
Figure 11. Voie de signalisation Notch. 35
Figure 12. Voie PDGFB-PDGFRB. 37
Figure 13. Sema3A augmente la perméabilité endothéliale en déstabilisant la VE-cadhérine. 39
Figure 14. Arbre phylogénétique de la famille du TGF-β. 40
Figure 15. Représentation schématique des étapes de synthèse et de maturation de BMP9 et BMP10. 41
Figure 16. Domaines fonctionnels caractéristiques des différentes classes de protéines SMAD. 43
Figure 17. Signalisation canonique et non canonique de TGFβ. 44
Figure 18. Voie BMP9/10/ALK1 et mutations associées à l'HHT. 46
Figure 19. Malformations artérioveineuses (MAV) : caractéristiques de l'HHT. 48
Figure 20. Diagnostic de l'HHT selon les 4 critères de Curaçao. 52
Figure 21. Cibles thérapeutiques des médicaments anti-angiogéniques évalués dans l'HHT. 54
Figure 22. La délétion d'*Alk1* entraîne une létalité embryonnaire précoce liée à un défaut de remodelage vasculaire. 60
Figure 23. Phénotypes vasculaires cutanés et viscéraux chez les souris *Alk1* +/- comparables à ceux des patients atteints d'HHT. 61
Figure 24. La délétion d'*Alk1* dans les cellules endothéliales entraîne une létalité post-natale précoce (à P5) avec des malformations artérioveineuses dans des organes vitaux. 63
Figure 25. Développement du plexus vasculaire dans les rétines de souris C57BL/6. 64
Figure 26. La délétion d'*Alk1* (à P4), d'endogline (à P2) ou la neutralisation des ligands (à P3) (anti-BMP9/10) entraîne des malformations artérioveineuses dans la rétine des souris nouveau nées. 65
Figure 27. La délétion d'*Alk1* induit des hémorrhagies pulmonaires à P6. 66
Figure 28. Fibrose hépatique dans le foie des souris Bmp9/10 double KO. 68
Figure 29. Localisation anatomique du foie dans l'organisme. 69
Figure 30. Organisation et vascularisation du foie. 71

Figure 31. Organisation cellulaire du lobule hépatique. 73
Figure 32. Faible expression de Pdfgb dans l'endothélium hépatique. 77
Figure 33. Zonation hépatique. 78
Figure 34. Wnt/β-Caténine régulateur central de la zonation hépatique. 81
Figure 35. Réponse cellulaire à une lésion hépatique : capillarisation des LSEC, activation des HSC et recrutement immunitaire. 86
Figure 36. Les cellules étoilées du foie constituent la principale source de matrice extracellulaire, notamment de collagène. 87
Figure 37. Perte des fenestrations des LSEC dans le foie des souris *Bmp9*-KO, et restauration ex vivo par l'administration de BMP9. 90
Figure 38. Représentation schématique d'une alvéole. 146
Figure 39. Cartographie transcriptionnelle des cellules pulmonaires et caractérisation des sous-populations endothéliales. 147
Figure 40. Analyse d'enrichissement de gènes (GSEA) des cellules endothéliales : LSEC et gCap. 148
Figure 41. Régulation opposée des gènes des complexes de la chaîne de transport d'électrons dans les LSEC et les gCap suite à la délétion d'*Alk1*. 148
Figure 42. Analyse fonctionnelle de la phosphorylation oxydative dans les cellules endothéliales. 150
Figure 43. Diminution de la taurine et de l'hypotaurine dans les cellules endothéliales des souris *Alk1*^{iECKO}. 151
Figure 44. Sénescence des cellules endothéliales pulmonaires chez les souris *Alk1*^{iECKO} 153
Figure 45. Régulation organotypique d'ALK1 entre les cellules endothéliales hépatiques et pulmonaires. 155
Figure 46. La délétion d'*Alk1* induit une augmentation de la perméabilité pulmonaire. 157
Figure 47. Prévention de l'activation des cellules étoilées par inhibition de PDGFRβ via l'injection d'imatinib. 161
Figure 48. Effets de la délétion d'*Alk1* dans les cellules endothéliales adultes. 165

Tableau 1. Invalidation des Gènes *Alk1*, *Eng* et *Bmp9/10*, et conséquence sur le développement vasculaire. 59

Table des abréviations

ACAD : Acyl-CoA Déshydrogénase
aCap : Capillaires Aérocytes
ACC : Acétyl-CoA Carboxylase
ACKR1 : Atypical Chemokine Receptor 1
ActRIIA : Activin Receptor Type IIA
ACVRL1 : Activin A Receptor Like Type 1
ADN : Acide Désoxyribonucléique
ALK1 : Activin receptor-Like Kinase 1
ALK1ecd : Domaine Extracellulaire Soluble d'ALK1
AMH : Anti-Müllerian Hormone
AMHR : Anti-Müllerian Hormone Receptor
Ang : Angiopoiétine
APC : Adenomatous Polyposis Coli
APLNR : Apelin Receptor
ARG1 : Arginase 1
ARNt : Acide Ribonucléique de Transfert
ASL : Argininosuccinate Lyase
ASS1 : Argininosuccinate Synthétase 1
AT1 : Cellules Alvéolaires de Type 1
ATAC-seq : Assay for Transposase-Accessible Chromatin using sequencing
ATP : Adénosine Triphosphate
BMP : Bone Morphogenetic Protein
BMPR : Bone Morphogenetic Protein Receptor
CA4 : Carbonic Anhydrase 4
CCL : C-C Motif Chemokine Ligand
CDH5 : Cadhérine 5
CE : Cellule endothéliale
CEBPA : CCAAT-Enhancer Binding Protein Alpha
ChIP-seq : Chromatin Immunoprecipitation followed by sequencing
CK1 : Casein Kinase 1
CLEC4M : C-Type Lectin Domain Family 4 Member M
c-MAF : avian musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog
Co-SMAD : SMAD Commun
COX : Cyclooxygénase
CPS1 : Carbamoyl Phosphate Synthétase 1
CPT1 : Carnitine Palmitoyltransférase 1
Cre : Recombinase de Cyclisation
CXCL12 : C-X-C Motif Chemokine Ligand 12
CXCR4 : C-X-C Motif Chemokine Receptor 4
Cyp2e1 : Cytochrome P450 2E1
DLL4 : Delta-like 4
DMLA : Dégénérescence maculaire liée à l'âge
DSS : Dextran Sulfate de Sodium
EDNRB : Endothelin-Receptor Type B
Efnb : Ephrin-B
EGF : Facteur de Croissance Épidermique
EndMT : Transition endothélio-mésenchymateuse
Eng : Endoglinee
NOS : endothelial Nitric Oxide Synthase
ERK : Extracellular Signal-Regulated Kinase
ERT2 : Récepteur de l'œstrogène T2
ESS : Epistaxis Severity Score
ETV2 : ETS Variant Transcription Factor 2
F2RL3 : Coagulation Factor II Receptor-Like 3
FAS : Fatty Acid Synthase
FCCP : Carbonyle Cyanure p-Trifluorométhoxyphénylhydrazone
FGF : Fibroblast Growth Factor
FGFR : Fibroblast Growth Factor Receptor
FKBP12 : FK506-binding Protein 12
GATA4 : GATA-binding protein 4
gCap : Capillaires généraux pulmonaires
GDF : Growth Differentiation Factor
GPR : G Protein-Coupled Receptor
GS : Glutamine synthétase

GSEA : Gene Set Enrichment Analysis
GSK3β : Glycogen Synthase Kinase 3 beta
HB-EGF : Heparin-Binding EGF-like Growth Factor
HEY1 : Hes-related bHLH Transcription Factor 1
HGF : Hepatocyte Growth Factor
HHT : Télangiectasie hémorrhagique héréditaire
HLA : Human Leukocyte Antigen
HMVEC : Cellules Endothéliales Microvasculaires Humaines
HNF4α : Hepatocyte Nuclear Factor 4 alpha
HSC : Cellules étoilées du foie
HUVEC : Cellules Endothéliales de la Veine Ombilicale Humaine
ICAM-1 : Intercellular Adhesion Molecule 1
IL : Interleukine
I**-SMAD :** SMAD Inhibiteur
JP : Polypose Juvénile
KLF2 : Kruppel-Like Factor 2
KO : Knock Out
LEF : Lymphoid Enhancer Factor
LOF : Loss of Function
LRG1 : Leucine-Rich Alpha-2-Glycoprotein 1
LSEC : Liver Sinusoidal Endothelial Cell
LysM : Lysozyme M
LYVE-1 : Lymphatic Vessel Endothelial Hyaluronan Receptor 1
MAML : Mastermind-like
MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase
MAV : Malformations artérioveineuses
MCP : Monocyte Chemoattractant Protein
MEC : Matrice extracellulaire
MEIS2 : Meis homeobox 2
MIF : Macrophage Migration Inhibitory Factor
MMPs : Métalloprotéases Matricielles
MRC1 : Mannose Receptor C-Type 1
Myh : Myosin Heavy Chain
NADPH : Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (reduced)
NAFLD : Non-Alcoholic Fatty Liver Disease
NF-κB : Nuclear Factor Kappa B
NG2 : Neuron-Glial Antigen 2
NICD : Notch Intracellular Domain
NK : Natural Killer
NO : Monoxyde d'azote
NRP : Neuropiline
OCR : Oxygen Consumption Rate
P : Jour postnatal
PDGF : Platelet derived Growth Factor
PDGFR : Platelet-Derived Growth Factor Receptor
PECAM1 : Platelet Endothelial Cell Adhesion
PEPCK : Phosphoenolpyruvate Carboxykinase
PF4 : Platelet Factor 4
PI3K : Phosphoinositide 3-Kinase
PK: Protéine Kinase
PlGF : Placental Growth Factor
PLVAP : Plasmalemma Vesicle-Associated Protein
PP2A : Protein Phosphatase 2A
RAMP : Receptor Activity-Modifying Protein
RBPJk (CSL) : Facteur de transcription Notch
RGCC : Regulator of Cell Cycle
RhBg : Rh Blood Group B Glycoprotein
ROS : Reactive Oxygen Species
R-SMAD : Receptor-Regulated SMAD
RSPO3 : R-spondine 3
SASP : Senescence-Associated Secretory Phenotype
SA-βGal : Senescence-Associated β-Galactosidase
ScRNAseq : Single cell RNA sequencing

SM22α : Smooth Muscle 22 alpha
SMAD : Suppressor of Mothers Against Decapentaplegic
SOX18 : SRY-box transcription factor 18
STAB : Stabiline
TAB : TAK1-binding Protein
TAK1 : TGF-β Activated Kinase 1
TBX2 : T-box transcription factor 2
TCF : T-cell Factor
TCF4 : T-cell factor 4
TF : Transcription Factor
TGFBR : Transforming Growth Factor Beta Receptor
TGFβ : Transforming Growth Factor β
Tie : Récepteur des angiopoïétines
TIMPs : Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteases
TNF : Tumor Necrosis Factor
TSLP : Thymic Stromal Lymphopoietin
UMAP : Uniform Manifold Approximation and Projection
VCAM-1 : Vascular Cell Adhesion Molecule 1
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR : Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
VLDL : Very Low-Density Lipoprotein
vSMCs : Cellules Musculaires Lisses vasculaires
WT : Wild type
α-SMA : Alpha-Smooth Muscle Actin
γH2AX : Phosphorylated H2A Histone Family Member X
SLC6A6 : Solute Carrier Family 6 Member 6

Résumé de thèse

L'Activin receptor-like kinase 1 (ALK1) est un récepteur de la famille TGF-β principalement exprimé par les cellules endothéliales et joue un rôle crucial dans le maintien de la quiescence vasculaire. Des mutations de perte de fonctions du récepteur *Alk1* sont à l'origine d'une maladie vasculaire rare, la télangiectasie hémorragique héréditaire (HHT) également connue sous le nom de maladie de Rendu-Osler. Cette maladie se caractérise par des malformations artérioveineuses (MAV), notamment au niveau du foie, du cerveau et des poumons, des épistaxis sévères et dans les cas les plus graves une insuffisance cardiaque nécessitant une transplantation hépatique. Les traitements actuels se limitent à la gestion des symptômes, sans solution curative. Cette maladie s'aggrave avec l'âge pour obtenir une pénétrance de 100% vers 50 ans.

L'originalité de mon projet de thèse est d'étudier le rôle d'ALK1 dans la quiescence vasculaire chez la souris adulte contrairement à la majorité des études réalisées dans la souris nouveau-née. Pour cela, j'ai utilisé des souris âgées de 2 mois chez lesquelles j'ai induit une délétion spécifique d'*Alk1* dans les cellules endothéliales (Cre recombinase sous le contrôle d'un promoteur spécifique) par injection de tamoxifène (*Alk1*^{iECKO}*)*. Ces souris meurent rapidement 8 jours après délétion d'*Alk1*, présentant des hémorragies pulmonaires sévères.

Afin d'identifier les mécanismes moléculaires responsables de ces phénotypes, une analyse de single cell RNA sequencing (scRNAseq) sur les deux principaux organes affectés dans la maladie HHT (foie et poumons) a été réalisée sur des souris WT et *Alk1*^{iECKO}. Dans le cadre de ma thèse, je me suis principalement concentrée sur le foie, un organe central du métabolisme et de la régulation systémique, dont la vascularisation se distingue par une organisation et des fonctions uniques.

Ce travail m'a permis de mettre en évidence, pour la première fois, que la délétion d'*Alk1* chez des souris adultes induit une capillarisation des cellules endothéliales sinusoïdales hépatiques et la disparition de leurs fenestrations, ce qui perturbe profondément la communication intercellulaire dans le foie. La délétion d'*Alk1* réduit l'expression endothéliale des gènes Wnt ciblant les hépatocytes péricentraux, entraînant une désorganisation de la zonation, tout en augmentant l'expression des gènes *Pdgfb* et *Lrg1* agissant sur les cellules étoilées hépatiques, favorisant leur activation et conduisant au développement d'une fibrose. En parallèle, la diminution de l'expression de c-Kit dans l'endothélium accélère le vieillissement vasculaire dans le foie, ce qui compromet la fonction endothéliale. J'ai également montré que la perte d'un seul allèle d'*Alk1* chez la souris adulte suffit à induire partiellement ce phénotype et que cette perte de zonation endothéliale et hépatocytaire est également observée dans les foies de patients atteints de la maladie HHT.

En conclusion, mes résultats montrent que la délétion d'*Alk1* dans l'endothélium murin adulte induit des phénotypes hépatiques sévères, affectant à la fois des fonctions autocrines et

paracrines du foie, et mettent en lumière, grâce à l'analyse scRNAseq, de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles, telles que c-Kit et PDGFB, susceptibles de jouer un rôle dans les malformations vasculaires hépatiques observées chez les patients atteints de la maladie HHT.

Thesis Summary

Activin receptor-like kinase 1 (ALK1) is a receptor of the TGF-β family mainly expressed by endothelial cells and plays a crucial role in maintaining vascular quiescence. Loss-of-function mutations in the *Alk1* receptor cause a rare vascular disease known as hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT), or Rendu-Osler disease. This disease is characterized by arteriovenous malformations (AVMs), particularly in the liver, brain, and lungs, severe epistaxis, and, in the most serious cases, heart failure requiring liver transplantation. Current treatments are limited to symptom management, with no curative solution. This disease worsens with age, reaching 100% penetrance around the age of 50.

The originality of my thesis lies in investigating the role of ALK1 in maintaining vascular quiescence in adult mice, in contrast to the majority of studies which have been conducted in neonatal mice. To do this, I used 2-month-old mice, in which I induced specific deletion of *Alk1* in endothelial cells (Cre recombinase under the control of a specific promoter) by injection of tamoxifen (*Alk1*^{iECKO}). These mice die quickly, eight days after *Alk1* deletion, and exhibit severe pulmonary hemorrhages.

To identify the molecular mechanisms underlying these phenotypes, we performed single-cell RNA sequencing (scRNAseq) on the two primary organs affected in HHT, the liver and lungs, in WT and *Alk1*^{iECKO} mice. I primarily focused on the liver, a central organ in metabolism and systemic regulation, notable for its uniquely organized vasculature and specialized functions.

My work demonstrates, for the first time that *Alk1* deletion in adult mice, induces capillarization of LSECs and loss of their fenestrations, profoundly disrupting intercellular communication in the liver. Endothelial expression of Wnt genes targeting pericentral hepatocytes is reduced, leading to zonation defects, while expression of *Pdgfb* and *Lrg1* genes targeting hepatic stellate cells are increased, promoting their activation and subsequent development of fibrosis. In parallel, decreased endothelial c-Kit expression accelerates vascular aging in the liver, impairing endothelial function. I also showed that loss of a single *Alk1* allele in adult mice is sufficient to induce significant alterations in endothelial and hepatocyte zonation, that I was also able to observe in livers from HHT patients.

In conclusion, my results demonstrate that *Alk1* deletion in adult endothelium induces severe hepatic phenotypes, affecting both autocrine and paracrine liver functions, and reveal, through scRNAseq analysis, novel potential therapeutic targets such as c-Kit and PDGFB, which may contribute to liver vascular malformations observed in HHT patients.

Introduction

Ma thèse porte surtout sur l'étude du rôle du récepteur ALK1, membre de la famille TGFβ (Transforming Growth Factor β), dans l'endothélium adulte et son implication dans la physiopathologie d'une maladie vasculaire rare, la télangiectasie hémorragique héréditaire (HHT) ou maladie de Rendu Osler, qui touche principalement le foie. Pour cela, je présente tout d'abord l'organisation du système vasculaire, les principales voies de signalisation dans l'endothélium, je décris ensuite les caractéristiques cliniques et physiopathologiques de la maladie étudiée, avant de détailler les particularités de la vascularisation hépatique, afin de mieux comprendre l'impact potentiel de ce récepteur dans ce contexte pathologique en m'appuyant principalement sur l'approche de single-cell RNAseq.

Chapitre 1 : Le système vasculaire

Le système vasculaire assure la survie et le bon fonctionnement de tous les tissus en leur apportant les nutriments, l'oxygène et les signaux moléculaires nécessaires, tout en facilitant l'élimination des déchets métaboliques. Au-delà de cette fonction de transport, il joue un rôle central dans la plupart des processus physiologiques, notamment le maintien de l'homéostasie, le trafic cellulaire, la réponse immunitaire, l'adaptation aux stress métaboliques, ainsi que la régulation de la température corporelle.

Ce transport est assuré par deux circuits distincts mais complémentaires : la circulation systémique et la circulation pulmonaire.

La circulation systémique débute au niveau du ventricule gauche, d'où le sang riche en oxygène est éjecté dans l'aorte avant d'être distribué à l'ensemble des organes et tissus périphériques. Après avoir délivré son oxygène et ses nutriments aux cellules et récupéré les déchets métaboliques, le sang appauvri en oxygène retourne au cœur par les veines caves pour rejoindre l'oreillette droite.

La circulation pulmonaire, quant à elle, commence lorsque ce sang pauvre en oxygène est propulsé du ventricule droit vers les poumons via les artères pulmonaires. Dans les capillaires pulmonaires, il est réoxygéné au contact des alvéoles et débarrassé du dioxyde de carbone. Le sang ainsi oxygéné retourne ensuite au cœur par les veines pulmonaires, rejoignant l'oreillette gauche, complétant ainsi le cycle (Figure 1).

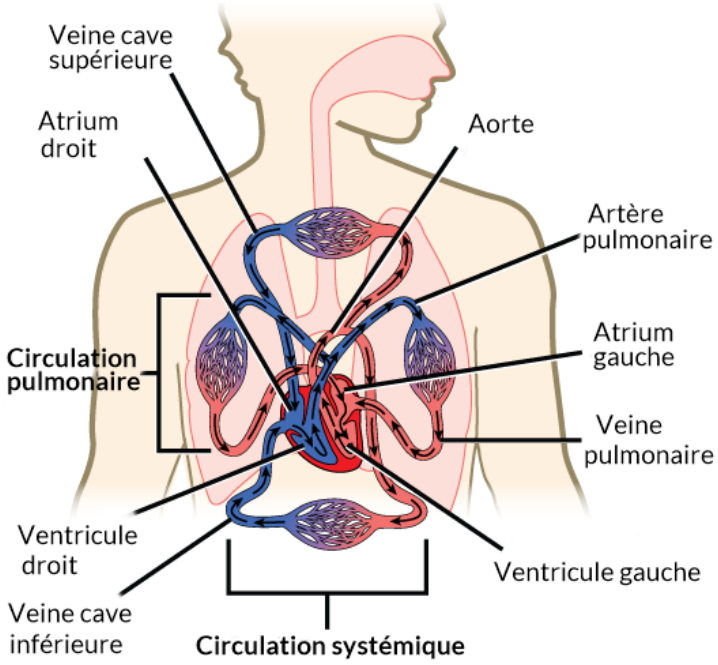


Figure 1. Circulation systémique et pulmonaire.

Le système vasculaire sanguin est constitué de deux circuits distincts : la circulation pulmonaire, qui assure l'oxygénation du sang et l'élimination du dioxyde de carbone (CO_2) au niveau des poumons, et la circulation systémique, qui distribue le sang riche en oxygène et nutriments vers l'ensemble des tissus vascularisés de l'organisme, grâce à l'action de pompage rythmique du cœur.

(https://es.pinterest.com/pin/643874077965054867/).

Sur le plan structural, le système vasculaire est composé de cinq types de vaisseaux :

- Les artères : de gros calibre, débutent à la sortie des ventricules cardiaques, se ramifient progressivement en artérioles et conduisent le sang oxygéné sous haute pression du cœur vers les tissus périphériques, à l'exception des artères pulmonaires et ombilicales, qui acheminent du sang pauvre en oxygène. Les artères possèdent une paroi élastique leur permettant d'amortir la pression d'éjection du sang et de maintenir un flux continu.

- Artérioles : ramifications des artères de plus petit calibre, jouant un rôle essentiel dans la régulation du tonus vasculaire en réponse aux variations du flux sanguin. C'est à ce niveau que la pression sanguine diminue rapidement car les artérioles présentent une grande résistance à l'écoulement sanguin.

- Capillaires : plus petits vaisseaux de la circulation, sièges des échanges gazeux, nutritifs et métaboliques entre le sang et les tissus. L'accès au réseau capillaire se fait par l'intermédiaire de sphincters précapillaires, qui sont composés de cellules musculaires lisses qui se contractent ou se dilatent pour assurer une irrigation sanguine suffisante aux besoins des tissus.

- Veinules : petits vaisseaux postcapillaires qui récupèrent le sang appauvri en oxygène après les échanges tissulaires.

- Veines : formées par la convergence des veinules, elles ramènent le sang désoxygéné vers le cœur. Leur structure est adaptée à ce rôle, avec la présence fréquente de valves anti-reflux facilitant le drainage veineux (Figure 2).

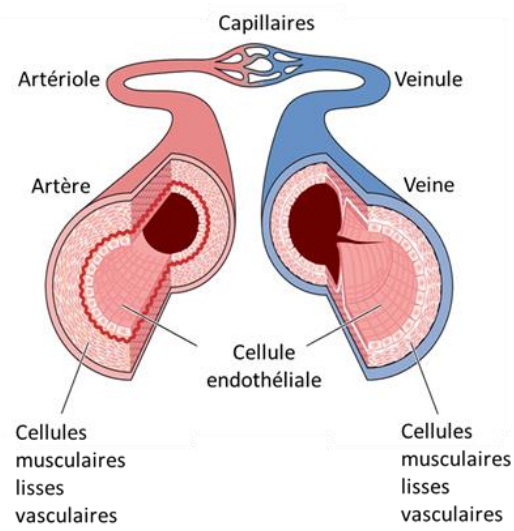


Figure 2. Schéma du réseau vasculaire.

Représentation des différentes structures vasculaires : artère et artériole (en rouge), veine et veinule (en bleu), connectées par un lit capillaire. Paroi vasculaire composée de cellules endothéliales et de cellules musculaires lisses.

(https://www.aquaportail.com/dictionnaire/definition/14750/cellule-endotheliale)

Pour assurer leurs fonctions spécifiques dans la circulation, les cinq types de vaisseaux sanguins présentent des caractéristiques structurales distinctes, notamment en termes de diamètre luminal et d'architecture pariétale. À l'exception des capillaires, la paroi des vaisseaux est classiquement constituée de trois couches concentriques :

- La tunique interne, aussi appelée intima, est formée d'un endothélium constitué d'une monocouche de cellules endothéliales polarisées, en contact direct avec le flux sanguin, reposant sur une membrane basale.
- La tunique moyenne ou média est composée de couches concentriques de cellules musculaires lisses vasculaires (vSMCs), entourées d'une matrice extracellulaire (MEC) riche en collagène (types I et III), en élastine et en protéoglycanes. Cette couche confère aux vaisseaux leur résistance mécanique et leur capacité de vasomotricité.
- La tunique externe ou adventice, est constituée de tissu conjonctif lâche contenant des fibroblastes, du collagène et des fibres élastiques. Elle participe à l'ancrage des vaisseaux dans les tissus environnants et assure leur intégrité structurelle (Figure 3).

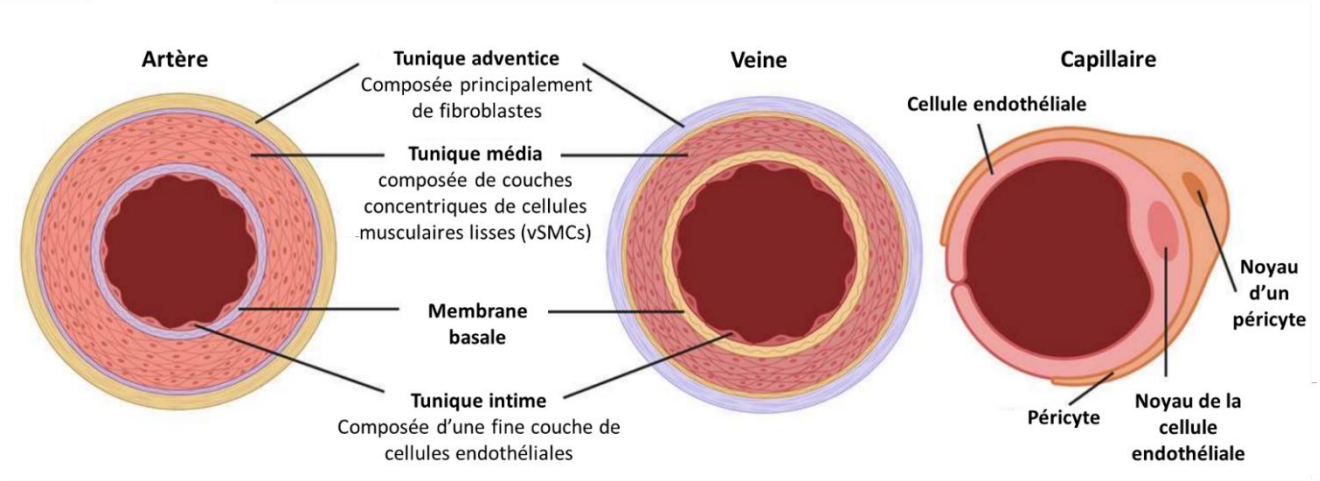


Figure 3. Structure des vaisseaux sanguins.

Composition des trois types principaux de vaisseaux sanguins. De gauche à droite : une artère, une veine et un capillaire. Figure adaptée de [1].

La proportion relative de ces couches varie selon la localisation et le type du vaisseau [2]. En effet, les artères, en particulier celles proches du cœur, présentent une paroi épaisse et riche en fibres élastiques, leur permettant d'amortir les variations de pression induites par la contraction cardiaque. Les artères plus distales sont davantage muscularisées afin de réguler finement le débit sanguin. À l'inverse, les veines présentent une paroi plus fine, adaptée à un flux sanguin de basse pression. Les artérioles et les veinules, de plus petit calibre, conservent la structure trilaminaire, mais avec des couches media et adventice très réduites.

Les capillaires, quant à eux, se distinguent par leur extrême finesse : leur paroi est formée d'une couche de cellules endothéliales entourée d'une lame basale mais ils sont dépourvus de média et d'adventice et partiellement recouvert par des péricytes, cellules contractiles jouant un rôle dans la stabilisation vasculaire, le contrôle du débit local et diverses fonctions spécifiques selon le tissu (Figure 3).

Selon leur degré de perméabilité et les exigences métaboliques des tissus qu'ils irriguent, les capillaires peuvent être classés en trois grandes catégories : continus, fenestrés ou sinusoïdaux (Figure 4). Cette diversité structurelle reflète l'organotypie endothéliale, c'est-à-dire la capacité de l'endothélium vasculaire à s'adapter morphologiquement et fonctionnellement au contexte tissulaire physiologique [3].

Les capillaires continus dotés de jonctions serrées assurent un contrôle strict de la perméabilité vasculaire. Seules de petites molécules hydrophiles, telles que l'eau et les ions, peuvent traverser la paroi endothéliale. Ce type de capillaire est majoritaire dans les organes où un contrôle strict des échanges moléculaires est primordial, notamment dans le cerveau (où ils constituent la barrière hémato-encéphalique), les muscles squelettiques et les poumons.

Les capillaires fenestrés se distinguent par la présence de pores transcellulaires (fenestrae) au sein de l'endothélium, permettant le passage de molécules de plus grande taille tout en

conservant une lame basale continue. Ces fenestrae sont souvent couvertes d'un diaphragme protéique, structure spécialisée jouant un rôle clé dans la régulation de la perméabilité sélective, en contrôlant notamment le passage de petites protéines, d'enzymes, de stéroïdes, ainsi que de l'eau et des ions. La protéine PLVAP (Plasmalemma Vesicle-Associated Protein), spécifiquement exprimée par les cellules endothéliales fenestrées constitue un composant structural majeur de ce diaphragme [4]. Ce type de capillaire est typiquement retrouvé dans les organes à forte activité de filtration, d'absorption ou de sécrétion, tels que les glomérules rénaux, les villosités intestinales, les glandes endocrines ou encore les plexus choroïdes (Figure 4).

Enfin, les capillaires sinusoïdaux se caractérisent par un endothélium composé de cellules endothéliales discontinues, souvent dépourvues de jonctions serrées, et dotées de larges fenestrations. Leur lame basale est aussi discontinue voire absente, ce qui autorise le libre passage non seulement de macromolécules, mais aussi de cellules entières, telles que les cellules immunitaires. Ces capillaires sont typiquement présents dans des organes impliqués dans des échanges moléculaires et cellulaires massifs, notamment le foie, la moelle osseuse et la rate [5, 6].

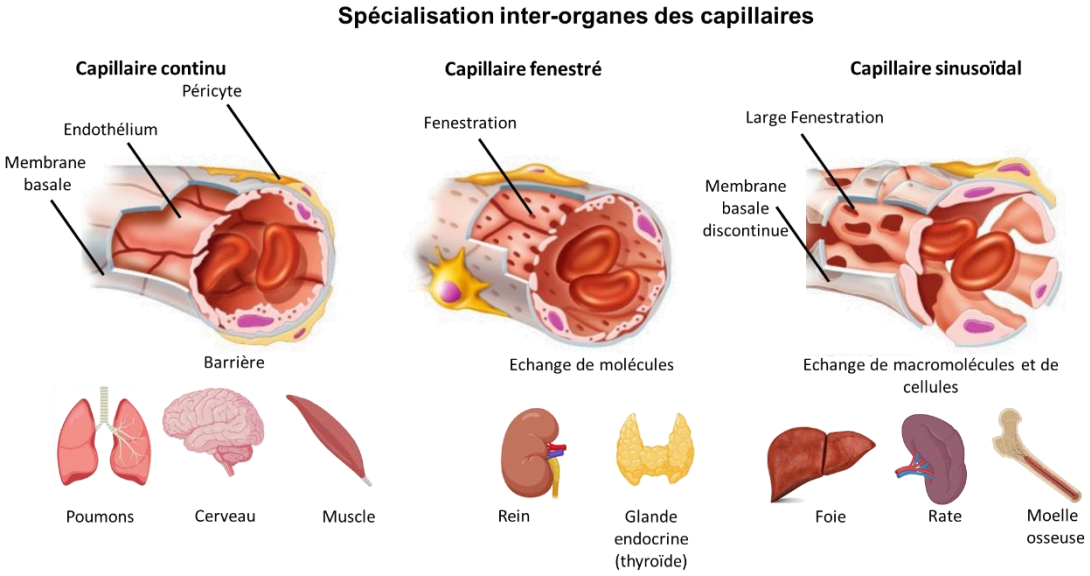


Figure 4. Différents types d'endothélium : continu, fenestré et sinusoïdal adaptés à la perméabilité vasculaire propre à chaque tissu [3] .

1.1. Mécanismes de Formation du système vasculaire

Après avoir décrit la diversité structurale des capillaires qui reflète l'adaptabilité tissulaire de l'endothélium, il est essentiel de comprendre les mécanismes responsables de l'émergence et de l'organisation du système vasculaire. Bien qu'ils présentent des caractéristiques très variées selon leur localisation et leur spécialisation, la formation des vaisseaux repose sur des mécanismes communs et conservés impliquant deux processus interdépendants :

- La vasculogenèse, qui correspond à la différenciation de cellules progénitrices en cellules endothéliales et à l'assemblage de ces dernières en plexus vasculaires primitifs,
- L'angiogenèse, qui désigne la croissance de nouveaux vaisseaux à partir de vaisseaux existants.

Ces processus sont finement contrôlés par un ensemble coordonné de voies de signalisation, qui régulent la morphogenèse, la spécialisation fonctionnelle, ainsi que la maturation et la stabilité du réseau vasculaire tout au long du développement embryonnaire, mais aussi dans certains contextes physiologiques ou pathologiques chez l'adulte.

1.1.1. La vasculogenèse

La vasculogenèse constitue la première étape de formation du système vasculaire lors du développement embryonnaire (Figure 5).

Sous l'influence combinée de facteurs tels que le BMP4 (Bone morphogenetic protein 4), la signalisation Notch, Wnt, et le facteur de transcription ETV2 (ETS Variant Transcription Factor 2), des cellules du mésoderme se spécialisent en hémangioblastes, précurseurs communs des lignées endothéliales et hématopoïétiques. Ces dernières migrent vers le sac vitellin où elles se regroupent en amas appelés îlots sanguins dont les cellules périphériques, les angioblastes, se différencient en cellules endothéliales tandis que les cellules centrales donnent naissance aux précurseurs hématopoïétiques. La fusion progressive de ces îlots, sous l'action du VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), engendre la formation du plexus vasculaire primitif. La migration et la différenciation des angioblastes entraîne également la formation de deux structures vasculaires intra-embryonnaires : l'aorte dorsale et la veine cardinale (Figure 5) [5].

Dans certaines régions embryonnaires qui ne reçoivent pas de migration d'angioblastes comme le cerveau, c'est l'angiogenèse qui prend le relais pour assurer l'établissement du réseau vasculaire [7].

Le plexus vasculaire primitif, encore instable et dépourvu d'organisation hiérarchique, subit rapidement plusieurs processus de remodelage et de maturation. Ces étapes sont gouvernées par des interactions complexes entre cellules endothéliales, matrice extracellulaire et cellules de soutien (comme les péricytes, les cellules musculaires vasculaires lisses), ainsi que par des signaux de croissance notamment FGF2 (Fibroblast Growth Factor) et TGF-β1. Ce remodelage permet la transition d'un réseau vasculaire homogène vers une architecture hiérarchisée, comprenant des artères, des veines et des capillaires [2, 5, 8].

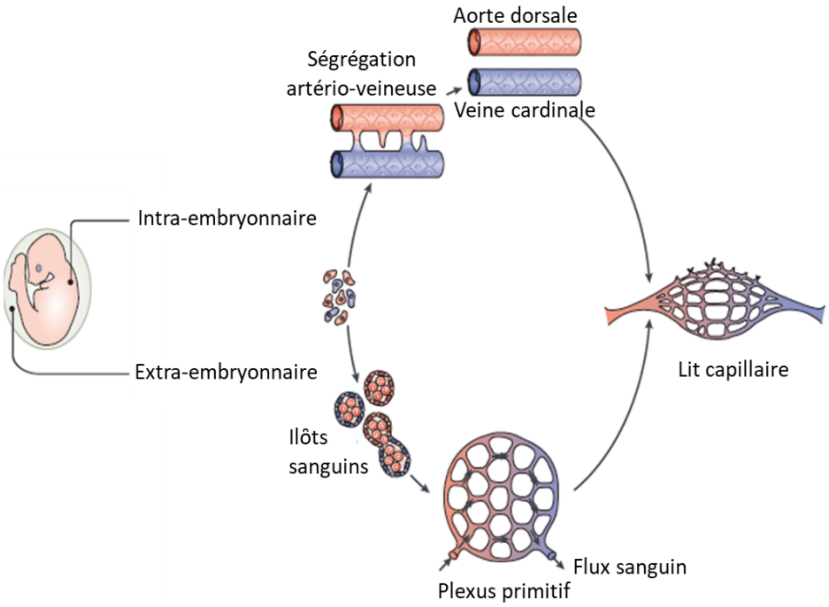


Figure 5. Vasculogenèse : première étape de formation du système vasculaire lors du développement embryonnaire.

Figure adaptée de [2].

1.1.2. L'angiogenèse

L'angiogenèse intervient immédiatement après la mise en place du plexus vasculaire primitif issu de la vasculogenèse et constitue un mécanisme fondamental pour l'expansion, le remodelage et la maturation du réseau vasculaire embryonnaire. L'angiogenèse correspond à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants. Ce processus se poursuit activement au cours du développement embryonnaire et la croissance, puis de façon plus restreinte chez l'adulte, dans des contextes spécifiques comme la cicatrisation, le cycle menstruel, la grossesse ou encore dans certaines pathologies comme les cancers, la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA), la rétinopathie diabétique… L'angiogenèse repose principalement sur deux mécanismes : le bourgeonnement (sprouting) et la division longitudinale (intussusception).

L'angiogenèse par intussusception permet l'expansion rapide du réseau vasculaire par la division longitudinale d'un vaisseau préexistant, sans formation de bourgeons. Ce processus débute par l'invagination de cellules endothéliales situées sur des parois opposées du vaisseau, qui migrent l'une vers l'autre jusqu'à établir un contact central, formant ainsi un pilier intraluminal. Par la suite, leurs jonctions intercellulaires se réorganisent, créant une structure cylindrique contenant une perforation centrale. Cet espace est ensuite envahi par des péricytes et des myofibroblastes, qui y déposent de la matrice extracellulaire, stabilisant le pilier. La formation répétée de tels piliers, suivie de leur fusion, conduit à la scission progressive du vaisseau en deux conduits distincts (Figure 6).

Ce mode d'angiogenèse a initialement été décrit dans les réseaux vasculaires pulmonaires et musculaires, où il permet une adaptation fine aux variations métaboliques et mécaniques, notamment en réponse à l'activité physique ou à la croissance tissulaire [9].

Les mécanismes moléculaires ainsi que les voies de signalisation impliquées dans ce processus sont encore mal connus.

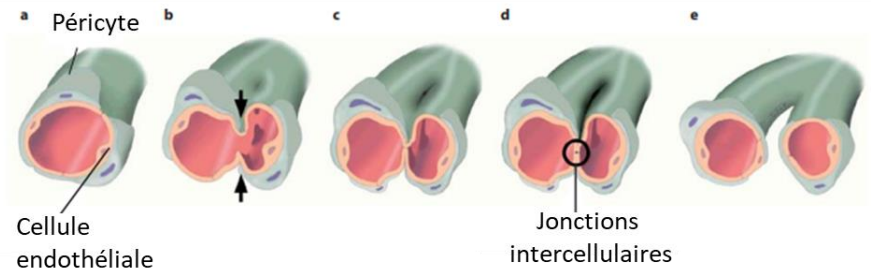


Figure 6. Angiogenèse par intussusception.

Illustration schématique d'un petit capillaire entouré de péricytes (a) en cours d'angiogenèse intussusceptive. Les parois opposées du capillaire commencent à migrer l'une vers l'autre (b), formant un pilier intraluminal (c), tandis que les jonctions cellulaires entre les cellules endothéliales se réorganisent (d). La croissance progressive du pilier entraîne ensuite la division du vaisseau sanguin en deux nouveaux capillaires. Figure adaptée de [9].

L'angiogenèse par bourgeonnement, en revanche, est bien mieux étudiée, et ses mécanismes moléculaires sont mieux connus. Elle est initiée par des signaux pro-angiogéniques, principalement le VEGFA, libéré en réponse à l'hypoxie. Le VEGFA se lie à son récepteur VEGFR2 exprimé sur les cellules endothéliales, induisant la spécialisation d'une cellule en cellule ''tip'' (tip cell), hautement migratrice, qui émet de longs filopodes guidés par le gradient de VEGF. Cette cellule ''tip'' explore l'environnement extracellulaire, dirigeant l'extension du bourgeon vasculaire.

Les cellules voisines adoptent un phénotype ''stalk'' (stalk cells), sous l'effet de la signalisation Notch/DLL4 déclenchée par l'expression de DLL4 (Delta-like 4) sur la cellule ''tip'' (Figure 7). L'activation du récepteur Notch sur les cellules adjacentes inhibe leur propre différenciation en cellules ''tip'', assurant ainsi une organisation hiérarchique du bourgeon. Les cellules ''stalks'' prolifèrent, forment la lumière vasculaire et sécrètent des enzymes telles que les métalloprotéases matricielles (MMPs), facilitant la dégradation de la matrice extracellulaire et la progression du bourgeon.

Une fois que deux cellules ''tip'' provenant de bourgeons adjacents se rencontrent, elles fusionnent par anastomose, connectant les nouveaux segments vasculaires et établissant un flux sanguin. La maturation des nouveaux vaisseaux implique ensuite le recrutement de cellules périvasculaires (péricytes et cellules musculaires lisses) sous contrôle des signaux PDGFB/PDGFRβ, TGF-β, et Angiopoïétine-1/Tie2.

Enfin, les vaisseaux néoformés acquièrent une identité artérielle ou veineuse sous l'influence combinée de facteurs génétiques et mécaniques (le flux). Une forte signalisation VEGFA/Notch en présence de flux pulsatile favorise l'expression de marqueurs artériels comme EphrinB2, Dll4, et Notch1, tandis que l'inhibition de Notch par COUP-TFII favorise une spécification veineuse marquée par l'expression d'EphB4. Ce processus de spécialisation est crucial pour établir un réseau hiérarchisé et fonctionnel composé d'artères, de capillaires et de veines [2, 10, 11].

Une fois ce réseau établi, le système vasculaire entre dans un état de quiescence, caractérisé par une faible prolifération cellulaire, une stabilité structurale et une activité métabolique adaptée aux besoins spécifiques du tissu. Ce programme de quiescence endothéliale est activement maintenu par des signaux moléculaires spécifiques, garantissant l'intégrité vasculaire et la fonction spécialisée de l'endothélium [12].

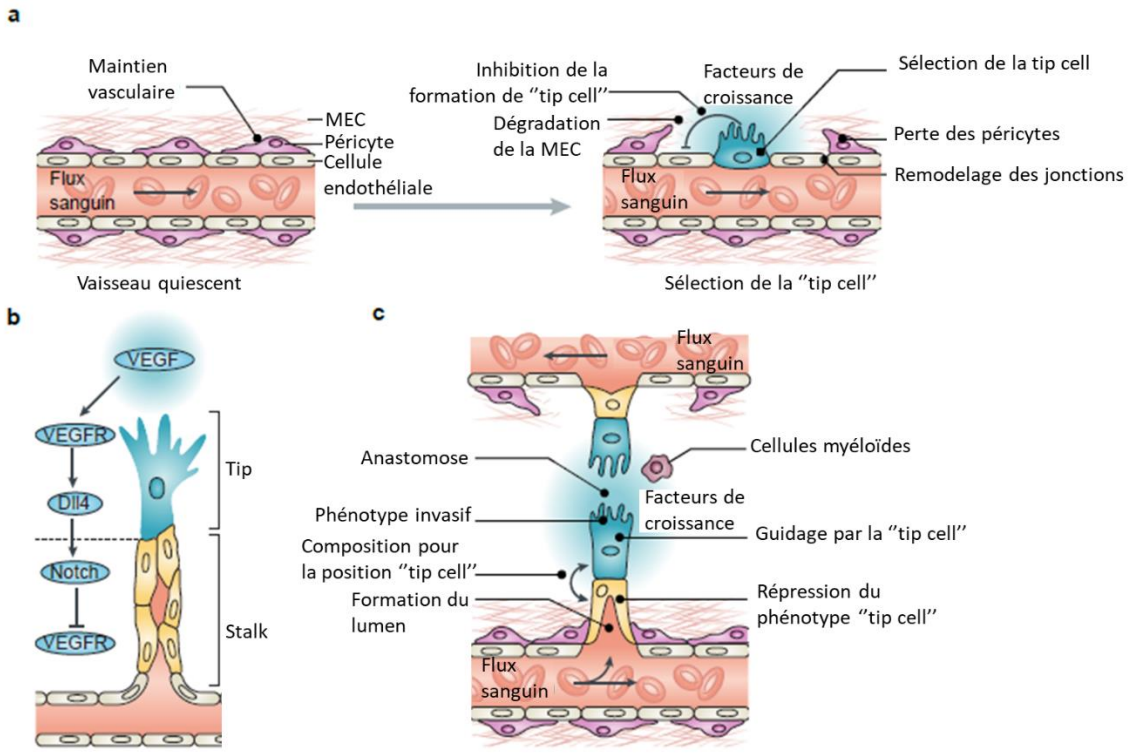


Figure 7. Angiogenèse par bourgeonnement.

(a) Du vaisseau quiescent à la sélection de la ''tip cell''. (b) Mécanismes impliqués dans la compétition pour la position ''tip cell''. (c) Fusion des bourgeons et formation de la lumière. MEC : Matrice extracellulaire. Figure adaptée de [2].

1.2. Le système lymphatique

En parallèle du système vasculaire, le système lymphatique remplit des fonctions complémentaires indispensables. Composé d'un réseau hiérarchisé de vaisseaux lymphatiques, des ganglions lymphatiques et des organes lymphoïdes (rate, thymus et amygdale), il participe au drainage des fluides interstitiels, au transport des cellules immunitaires vers les ganglions lymphatiques, et joue un rôle central dans l'absorption des lipides au niveau intestinal.
Bien qu'étroitement lié au réseau vasculaire sanguin, il constitue un système distinct, doté de structures, de fonctions et de mécanismes de développement spécifiques.

Ce système assure également la surveillance immunitaire en permettant la reconnaissance et la neutralisation des agents pathogènes. Par des ganglions lymphatiques, il assure une surveillance de la lymphe (un liquide clair issu du plasma sanguin filtré à travers les capillaires, contenant des globules blancs, des déchets cellulaires et des lipides absorbés) et facilite la mobilisation des lymphocytes, contribuant ainsi à la défense de l'organisme. Par ailleurs, la circulation lymphatique participe à l'équilibre des fluides corporels, en retournant progressivement les excès de liquide interstitiel vers la circulation sanguine, ce qui prévient l'apparition d'œdèmes [13].

1.3. Quiescence vasculaire : Un état dynamique et actif

La quiescence vasculaire est essentielle au maintien de l'homéostasie organique. Cette quiescence n'est pas un simple repos, mais un état hautement dynamique où les cellules endothéliales, bien que non prolifératives, restent métaboliquement actives, recevant des signaux mécaniques, endocrines, autocrines et paracrines spécifiques à chaque tissu [12].

La signalisation FGF joue un rôle crucial dans l'induction et le maintien de cette quiescence endothéliale. En particulier, la liaison des ligands FGF aux récepteurs tyrosine kinases FGFR1 à FGFR4, active des voies de signalisation intracellulaires majeures, notamment PI3K–AKT et MAPK/ERK. Ces cascades contribuent à la stabilisation des jonctions cellulaires, à la prévention de l'inflammation et à la préservation de l'identité endothéliale [12].

Des études ont démontré que l'inhibition transitoire de la signalisation FGF chez des souris adultes (via l'expression systémique d'un récepteur soluble FGFR1 (sFGFR1) capable de neutraliser un large spectre de ligands FGF) entraîne une désorganisation des jonctions adhérentes, marquée par la phosphorylation de la VE-cadhérine, une protéine transmembranaire spécifique de l'endothélium impliquée dans l'adhésion cellule-cellule. Cette phosphorylation altère son interaction avec la β-caténine, une protéine adaptatrice liant VE-cadhérine au cytosquelette, conduisant à la déstabilisation des jonctions endothéliales. Cette altération structurelle favorise l'hyperperméabilité vasculaire et aboutit à des hémorragies pulmonaires et myocardiques, soulignant le rôle essentiel de la signalisation FGF

dans le maintien de l'intégrité vasculaire [14]. En parallèle, la signalisation FGF agit comme un frein à la transition endothélio-mésenchymateuse (EndMT), un processus au cours duquel les cellules endothéliales perdent l'expression de gènes endothéliaux clés et acquièrent des caractéristiques mésenchymateuses, telles qu'une migration accrue et une prolifération augmentée. De cette façon, FGF contribue à préserver l'identité endothéliale et à maintenir la quiescence vasculaire [12, 15]. La signalisation FGF est aussi régulée par les forces de cisaillement, un flux laminaire maintient FGFR1, tandis qu'un flux perturbé réduit son expression, favorisant l'EndMT, l'inflammation et la progression de l'athérosclérose [16].

Plusieurs autres voies de signalisation participent également au maintien de la quiescence endothéliale, notamment les voies VEGF, Angiopoïétine et ALK1/BMP9/10. Leur rôle spécifique dans la régulation de la stabilité vasculaire sera discuté plus en détail un peu plus loin dans ce chapitre.

1.4. Vieillissement du système vasculaire

Bien que le système vasculaire adopte un état de quiescence après sa maturation, cette stabilité n'est pas définitive. Avec l'avancée en âge, l'endothélium et la paroi vasculaire subissent des altérations structurelles et fonctionnelles progressives. Ce processus, connu sous le nom de vieillissement vasculaire, réduit la capacité des vaisseaux à s'adapter aux stimuli physiologiques et entraîne l'apparition de diverses pathologies cardiovasculaires [17].

L'un des mécanismes clés du vieillissement vasculaire réside dans le déséquilibre progressif entre les médiateurs vasodilatateurs et vasoconstricteurs produits par l'endothélium. Ce déséquilibre se manifeste principalement par une réduction de la biodisponibilité du monoxyde d'azote (NO), un vasodilatateur produit par l'enzyme NO synthase endothéliale (eNOS), parallèlement à une augmentation des vasoconstricteurs dérivés de la cyclooxygénase (COX). Cette rupture de l'équilibre entre vasodilatation et vasoconstriction contribue à une perte de la régulation du tonus vasculaire [17].

La diminution du NO résulte en grande partie d'une production accrue d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), notamment du superoxyde généré par la NADPH (Nicotinamide Adenine Dinucletotide Phosphate) oxydase, dont l'expression et l'activité augmentent avec l'âge. Ce stress oxydatif est renforcé par l'élévation du facteur de nécrose tumorale alpha (TNF-α) au cours du vieillissement, qui stimule la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF-β, IL-1β, IL-17, IL-6) et active la voie NF-κB (Nuclear Factor Kappa B), exacerbant l'inflammation, la perméabilité vasculaire et l'adhésion leucocytaire.

Ce microenvironnement pro-oxydant et inflammatoire accélère la sénescence des cellules endothéliales, caractérisée par un arrêt irréversible du cycle cellulaire. Cette sénescence accroît également la sensibilité à l'apoptose, compromettant la capacité de régénération endothéliale, déjà réduite avec l'âge [17, 18].

Ces altérations entraînent une perte progressive de l'homéostasie vasculaire, favorisant l'apparition de pathologies cardiovasculaires telles que l'athérosclérose, l'hypertension artérielle et les complications du diabète. La dysfonction endothéliale liée à l'âge est également associée à des maladies dégénératives non cardiovasculaires, notamment les troubles cognitifs (maladie d'Alzheimer), les atteintes rénales, la rétinopathie, l'ostéoporose, les perturbations du rythme circadien ainsi qu'une augmentation marquée de la fibrose et de la cirrhose hépatique avec l'âge [17–19].

Ainsi, le vieillissement vasculaire repose sur un cercle vicieux dans lequel stress oxydatif, inflammation et sénescence endothéliale se renforcent mutuellement, compromettant durablement la fonction vasculaire [17, 18].

Grunewald et al. ont démontré que le vieillissement est également associé à une insuffisance de la signalisation du VEGF, principalement due à augmentation de VEGFR1. Cette altération entraîne une diminution de la densité vasculaire et par conséquent de la perfusion et de l'oxygénation tissulaire, ainsi qu'un dysfonctionnement mitochondrial et des perturbations métaboliques. Ces effets touchent particulièrement les organes métaboliquement actifs comme le foie, le tissu adipeux et les muscles squelettiques, et s'accompagnent d'une perte tissulaire significative au niveau des os et du tissu adipeux sous-cutané. Les auteurs ont montré qu'une surexpression de VEGF permet d'augmenter l'espérance de vie des souris suggérant ainsi un rôle central du VEGF dans la régulation du vieillissement [20].

1.5. Hétérogénéité endothéliale : spécialisation organotypique et zonation fonctionnelle intra-organe

Les capillaires assurent des fonctions hautement spécialisées selon l'organe auquel ils appartiennent. Ils constituent la population la plus hétérogène des cellules endothéliales, caractérisée par des profils d'expression de marqueurs de surface strictement spécifiques à chaque tissu. Cette spécialisation organotypique peut expliquer en partie la diversité des réponses vasculaires face aux stress pathologiques [21]. Ainsi, certaines maladies cardiovasculaires ciblent préférentiellement des territoires vasculaires spécifiques. Par exemple, les complications vasculaires du diabète, telles que la rétinopathie, la néphropathie ou encore la cardiomyopathie diabétique, affectent principalement les vaisseaux de la rétine, du rein, du cœur et du cerveau. À l'inverse, les vaisseaux d'organes comme des poumons, du foie ou de l'intestin semblent globalement moins sensibles [22]. Également, certaines maladies vasculaires rares, telles que la télangiectasie hémorragique héréditaire (HHT), touchent principalement les vaisseaux du foie, du cerveau et des poumons, soulignant ainsi la variabilité organo-spécifique de la vulnérabilité vasculaire [23].

En plus de cette spécificité entre les différents organes (inter-organe), dans certains, le réseau capillaire sanguin présente une organisation structurée reposant sur la coexistence de sous-populations endothéliales distinctes qui se distinguent par une hétérogénéité et par des

fonctions spécifiques. Cette organisation hiérarchisée et fonctionnelle du réseau microvasculaire intra-organique est désignée sous le terme de zonation vasculaire. Comme la diversité inter-organes, les cellules endothéliales localisées dans différentes zones d'un même organe exercent aussi des fonctions métaboliques, immunitaires, inflammatoires ou angiocrines hautement spécialisées, reflétant une adaptation fine aux besoins locaux [3, 6, 24].

Les interactions entre les cellules endothéliales et les cellules périvasculaires, telles que les cellules musculaires lisses, inflammatoires et péricytaires, ainsi qu'avec les cellules parenchymateuses distinctes comme les hépatocytes du foie, les podocytes du rein ou d'autres types cellulaires, contribuent à établir un microenvironnement unique propre à chaque organe assurant des réponses spécifiques.

Cette adaptation endothéliale aux spécificités tissulaires est induite par des gènes spécifiques et par des combinaisons particulières de facteurs de transcription (TF). Par exemple, dans les poumons, 2 populations de cellules endothéliales des capillaires alvéolaires présentent des caractéristiques distinctes : les aérocytes (aCap), spécialisés dans les échanges gazeux et le trafic des leucocytes, une population unique au tissu pulmonaire, et les capillaires généraux (gCap), impliqués dans la régulation du tonus vasomoteur et jouant un rôle de cellules souches ou progénitrices dans l'homéostasie et la réparation capillaire. Les cellules aCap expriment des marqueurs spécifiques tels que CAR4 (Carbonic anhydrase), EDNRB (Endothelial-Receptor type B) tandis que les cellules gCap sont caractérisées par l'expression du récepteur de l'apeline (APLNR). Les facteurs de transcription TBX2 (T-box transcription factor 2), TCF4 (T cell Factor 4) et SOX18 (SRY-box transcription factor 18) sont particulièrement enrichis dans ces capillaires (Figure 8) [25, 26].

De même, dans les cellules endothéliales sinusoïdales hépatiques, les TF : GATA4 (GATA binding protein 4), c-MAF (avian musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog) et MEIS2 (Meis homeobox2) sont fortement exprimés, contribuant au maintien de l'homéostasie hépatique, du métabolisme et du trafic inflammatoire (Figure 8).

Par ailleurs, dans cet organe, les cellules endothéliales proches de la veine porte expriment des signaux angiocrines tels que HGF (Hepatocyte Growth Factor), BMP2 et BMP6, qui contrôlent des fonctions métaboliques spécifiques, distinctes de celles modulées par Wnt2, Wnt9b et RSPO3 (Rspondin3), principalement exprimés par les CE situées à proximité de la veine centrale. Cette zonation déterminée par des programmes transcriptionnels spécifiques entraîne une sécrétion localisée de signaux angiocrines. Elle assure une régulation précise des fonctions métaboliques, immunitaires, ainsi que de la régénération, propres à chaque zone [27].

Les signaux biomécaniques jouent également un rôle central dans la spécialisation vasculaire. Parmi eux figurent le stress de cisaillement, la pression exercée par le flux sanguin, la viscosité du sang ainsi que les propriétés viscoélastiques de la matrice extracellulaire [3].

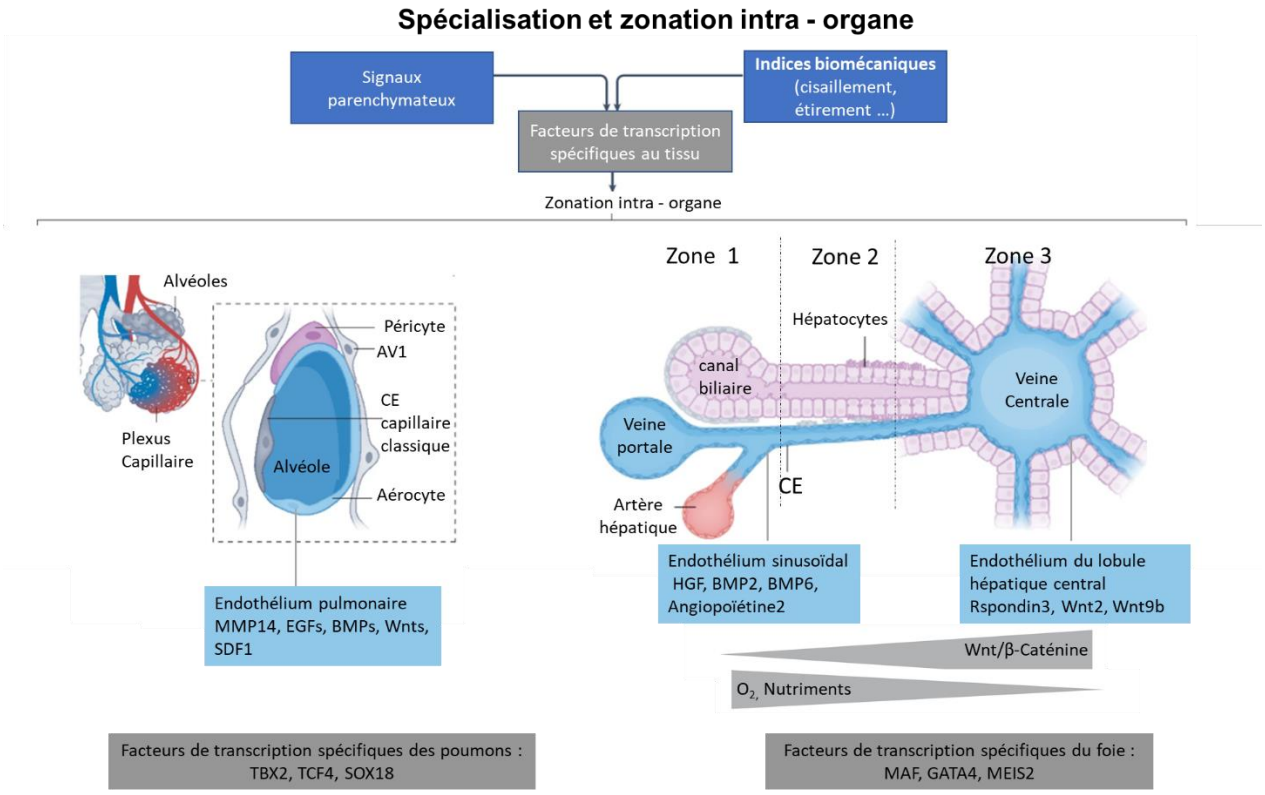


Figure 8. Zonation intra-organe et spécialisation des endothéliums.

La spécialisation et la zonation intra-organique des cellules endothéliales (CE) sont régulées par l'expression de facteurs de transcription spécifiques aux tissus (ex. : TBX2, TCF4, SOX18 dans le poumon; MAF, GATA4, MEIS2 dans le foie). En fonction de leur position dans l'organe, les CE secrètent des signaux angiocrines spécifiques. Dans le foie, les CE proches de la veine porte produisent HGF, BMP2 et BMP6, tandis que celles situées près de la veine centrale sécrètent Wnt2, Wnt9b et RSPO3, contrôlant la zonation hépatique. Dans le poumon, la sécrétion de MMP14, EGF, BMP et Wnt par les CE contribue à la réparation alvéolaire [3].

1.6. RNAseq : un outil pour comprendre l'hétérogénéité endothéliale

L'hétérogénéité transcriptionnelle des cellules endothéliales a d'abord été étudiée par des approches de séquençage d'ARN en vrac (bulk RNAseq), appliquées soit à des tissus entiers [28], soit à des compartiments vasculaires isolés [29]. Ces travaux visaient à caractériser les signatures moléculaires spécifiques des lits vasculaires propres à chaque organe. Cependant, plusieurs limitations techniques ont rapidement émergé. En effet, dans certains organes, comme le cerveau ou le rein, l'isolement des CE s'est révélé particulièrement difficile en raison de leur forte intégration dans un microenvironnement complexe, où elles sont étroitement associées aux cellules périvasculaires et à une matrice extracellulaire dense. Cette difficulté a souvent conduit à une récupération incomplète ou biaisée des cellules endothéliales. De plus,

la contamination des cellules endothéliales lymphatiques a fréquemment obscurci l'interprétation des profils d'expression issus de ces approches globales.

Malgré ces limites, certaines études combinant le bulk RNAseq et l'immunohistochimie ont permis d'identifier des signatures vasculaires inter-organe. En revanche, identifier les signatures moléculaires intra-organe et la zonation des cellules endothéliales dans un même organe restait très difficile avec ces technologies [3].

Afin de contourner ce problème, les chercheurs ont eu recours au single cell RNAseq (scRNAseq) qui a permis de cartographier l'hétérogénéité endothéliale et la diversité vasculaire au sein des organes, en permettant une analyse précise à l'échelle unicellulaire. Les premières tentatives, notamment le projet Tubula Muris, ont appliqué cette approche à l'ensemble des cellules des tissus sans enrichissement préalable en cellules endothéliales. Ces études ont toutefois abouti à une récupération très limitée de cellules endothéliales, en raison de l'efficacité variable des digestions enzymatiques sans tri préalable et du rendement modeste des premières plateformes scRNAseq ce qui a compliqué l'étude de l'hétérogénéité vasculaire [3, 30].

Pour enrichir les cellules endothéliales avant l'analyse, des méthodes de tri cellulaire (tri FACS) ont ensuite été utilisées ce qui a permis d'isoler spécifiquement les CEs qui expriment des marqueurs universels VE-cadhérine (CDH5) et CD31 (PECAM1), tout en excluant cellules hématopoïétiques (CD45). Ces approches ont permis à Kalucka et al. de réaliser le premier atlas transcriptionnel des cellules endothéliales murines à l'échelle de l'organisme [31]. L'analyse par scRNAseq a ensuite permis de distinguer les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins de celles du système lymphatique, en fonction de signatures transcriptomiques spécifiques ce qui n'était pas possible avec le bulk RNAseq.

Ces études ont révélé la complexité de la zonation endothéliale intra-organe et ont permis d'identifier des signatures moléculaires spécifiques des différentes sous-populations vasculaires, confirmant ainsi l'hétérogénéité marquée des capillaires (Figure 9) [32]. L'analyse des jeux de données issus de projets tels que Tabula Sapiens [32] a notamment permis de définir des ensembles de gènes caractéristiques des principaux sous-types endothéliaux vasculaires:

Capillaires : CA4, RGCC, HEY1, F2RL3
Artères : GJA4, GJA5, SEMA3G, NOTCH4
Veines : ACKR1, VCAM1
Sinusoïdes (foie, rate) : STAB1, STAB2, MRC1

Ces approches ont ainsi permis de mieux comprendre la spécificité vasculaire, aussi bien entre les organes qu'au sein d'un même tissu. Elles se sont révélées particulièrement utiles dans le

foie, où la zonation vasculaire est étroitement liée aux fonctions métaboliques hépatiques, comme l'ont mis en évidence plusieurs études récentes [27, 33].

Par ailleurs, le développement d'outils d'analyse in silico, tels que CellChat, NicheNet ou Connectome, a considérablement facilité l'étude des interactions cellule-cellule à partir des données transcriptomiques unicellulaires [34]. Ces outils permettent la prédiction des interactions ligand–récepteur et la reconstruction des réseaux de communication intercellulaire ainsi que les voies de signalisation impliquées dans les fonctions endothéliales et la pathogenèse de nombreuses maladies.

De plus, ces analyses ont permis l'identification de nouvelles sous-populations endothéliales la caractérisation des dynamiques de différenciation et de mieux comprendre leurs origines, leurs transitions et leurs rôles dans le développement, le vieillissement et dans divers contextes pathologiques [35].

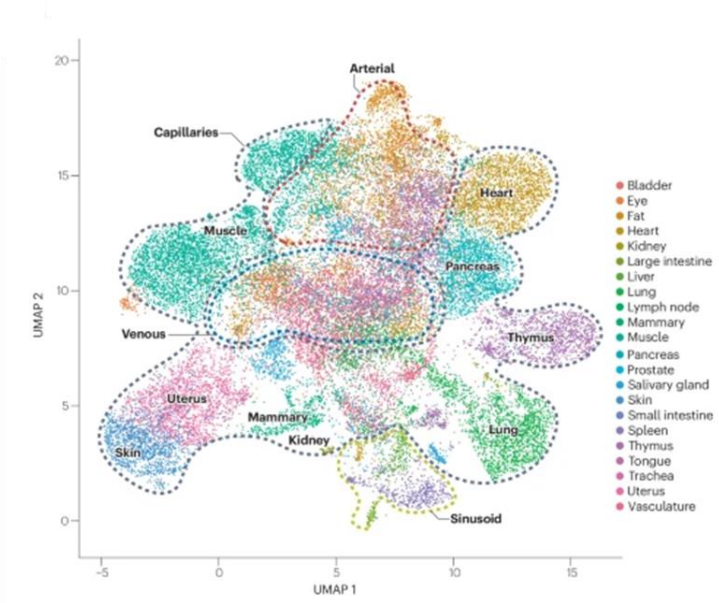


Figure 9. Hétérogénéité endothéliale inter-organes visualisée par UMAP.

Représentation UMAP des cellules endothéliales issues de l'atlas scRNAseq Tabula Sapiens, classées par organe ou tissu, illustrant la grande diversité de la spécialisation capillaire spécifique aux organes, reflétée par des différences transcriptionnelles marquées [32].

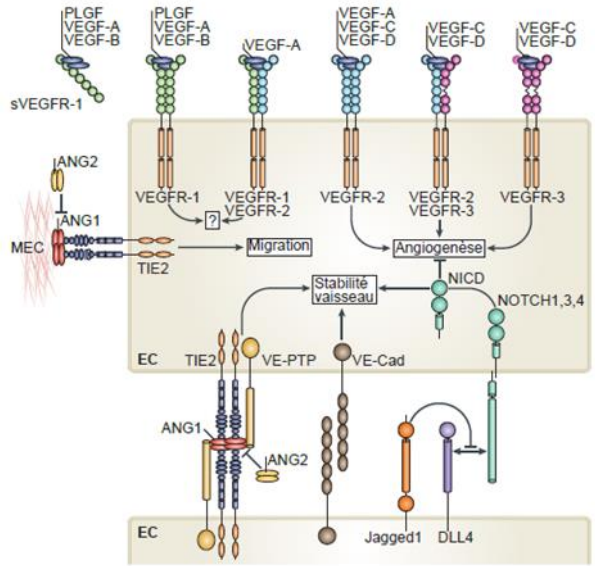
1.7. Principales voies régulatrices de la stabilité vasculaire

L'établissement du système vasculaire, sa maturation et son maintien nécessitent l'intervention de voies de signalisation spécifiques. Ces voies sont également essentielles à la formation d'un endothélium fonctionnel (Figure 10A), à la stabilisation des cellules endothéliales, au recrutement des cellules périvasculaires et au maintien d'un endothélium quiescent (Figure 10B). Parmi les plus impliquées figurent les voies FGF, VEGF, Angiopoïétine/Tie2, PDGFB, TGF-β, Notch, Wnt/β-caténine et Sémaphorines. Cette section présente les principales cascades moléculaires impliquées dans l'équilibre du système vasculaire en conditions physiologiques et pathologiques.

1.7.1. Voie VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)

La voie VEGF constitue le moteur principal et indispensable à la génération du système vasculaire. La famille VEGF comprend cinq membres : VEGFA, VEGFB, VEGFC et VEGFD et le PlGF (Placental Growth Factor) qui peuvent se lier avec différentes affinités à des récepteurs tyrosine Kinase : VEGFR1 à 3 (Figure 10). Deux co-récepteurs, NRP1 (neuropiline 1) et NRP2, peuvent également renforcer la signalisation.

A



B

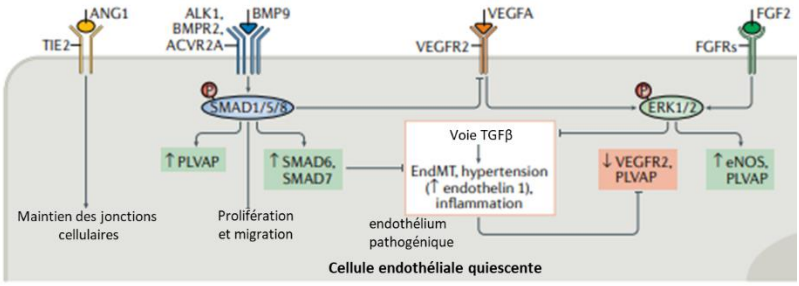


Figure 10. Principaux acteurs contrôlant l'angiogenèse et la quiescence vasculaire.

Figure adaptée de [2], [12].

VEGFA, ligand de VEGFR2, est le membre principal de cette famille comme l'indiquent les phénotypes létaux des souris hétérozygotes pour *Vegfa* [36] ou homozygotes pour *Vegfr2* [37]. Ces souris présentent des défauts sévères de vasculogenèse et d'hématopoïèse confirmant que cette voie est indispensable dès les premiers stades du développement endothélial.

En réponse à l'hypoxie, VEGFA est produit sous plusieurs isoformes ($VEGF_{121}$, $VEGF_{165}$, $VEGF_{189}$ et $VEGF_{206}$), chacune jouant un rôle spécifique dans l'angiogenèse : les isoformes solubles sont essentiellement responsables de l'élargissement des vaisseaux sanguins tandis que les isoformes liées à la matrice extracellulaire favorisent une augmentation du nombre de vaisseaux. Le VEGFA paracrine sert à augmenter le nombre de branchements en revanche le VEGFA autocrine maintient l'homéostasie des vaisseaux [38].

Par ailleurs, la signalisation VEGFA/VEGFR2 déclenche une cascade de signaux intracellulaires qui contrôlent des processus essentiels tels que la prolifération, la migration, la survie des cellules endothéliales et la formation de nouvelles structures vasculaires.

VEGFA peut également se lier avec une plus haute affinité à VEGFR1. Par contre ce récepteur a une faible activité tyrosine kinase servant comme un récepteur de leurre (Decoy receptor) qui capte VEGFA limitant ainsi son interaction avec VEGFR2 et modulant finement l'intensité du signal angiogénique [39]. Cette régulation est cruciale pour éviter une angiogenèse excessive ou désorganisée.

VEGFC, quant à lui, peut se lier à VEGFR3 ainsi qu'à VEGFR2, et joue un rôle clé à la fois dans l'angiogenèse et la lymphangiogenèse. Au cours du développement vasculaire, sa signalisation via VEGFR3 est essentielle pour les phases précoces de la formation des vaisseaux sanguins, en particulier pour l'émergence des cellules en position de ''tip'', qui guident la croissance des bourgeons vasculaires [40]. En outre, VEGFC avec VEGFD sont indispensables à l'établissement et au maintien du réseau lymphatique grâce à leur interaction spécifique avec VEGFR3, qui régule la prolifération et la migration des cellules endothéliales lymphatiques [41].

VEGFB se lie spécifiquement au récepteur VEGFR1. Il ne joue pas un rôle direct dans l'angiogenèse classique, mais intervient principalement dans la régulation du métabolisme des cellules endothéliales, notamment en facilitant l'absorption et le transport des acides gras [42]. Toutefois, Li et al. ont démontré que VEGFB possède une activité angiogénique restreinte, essentiellement limitée au tissu myocardique ischémique [43].

Bien connue pour son rôle dans l'angiogenèse, la voie VEGF est aussi indispensable au maintien de la quiescence. Dans l'endothélium adulte, le VEGF agit non pas pour stimuler la prolifération, mais pour préserver l'intégrité structurelle et fonctionnelle des cellules endothéliales dans un état stable, adapté aux besoins spécifiques de chaque organe. Par exemple, dans le glomérule rénal, les podocytes sécrètent en continu du VEGFA pour maintenir les fenestrations des cellules endothéliales capillaires. Des études chez la souris ont montré que la diminution du VEGFA entraîne une perte progressive des fenestrations, une endothéliose (gonflement cellulaire), un épaississement de la membrane basale et une insuffisance rénale terminale avec syndrome néphrotique [44]. Un phénomène similaire est observé dans les glandes endocrines, comme le pancréas et la thyroïde, où la perturbation de la voie VEGFA entraîne également une disparition des fenestrations des capillaires [45, 46].

Ces résultats soulignent l'importance d'un équilibre précis du signal VEGF pour maintenir la spécialisation fenestrée de l'endothélium.

De plus, dans les poumons de rats adultes, l'inhibition de la voie VEGF (en bloquant VEGFR2) entraîne une apoptose des cellules alvéolaires et le développement d'un emphysème (une pathologie caractérisée par la destruction des alvéoles pulmonaires, ce qui réduit la surface d'échange gazeux et entraîne une difficulté respiratoire progressive) [47]. Cette voie participe également à la régulation de la pression artérielle via la production de NO (vasodilatateur), ainsi son inhibition favorise l'apparition d'une hypertension [12, 48].

En conclusion, la voie VEGF équilibre finement la dynamique vasculaire : elle stimule l'angiogenèse lorsque de nouveaux vaisseaux sont nécessaires, en conditions physiologiques (Cycle menstruel, cicatrisation…), et la quiescence vasculaire en maintenant la stabilité et la fonctionnalité des vaisseaux existants. Ce double rôle est essentiel pour assurer une vascularisation adaptée aux besoins tissulaires et préserver l'intégrité vasculaire.

1.7.2. Voie Notch

Cette voie de signalisation comprend quatre récepteurs transmembranaires (Notch1 à Notch4) et cinq ligands transmembranaires répartis en deux familles principales : les ligands Delta-like (Dll1, Dll3, Dll4) et les ligands Jagged (Jagged1, Jagged2). Ces protéines assurent une signalisation par interaction directe entre cellules adjacentes, dite transactivation, où un ligand exprimé sur une cellule émettrice se lie au récepteur Notch d'une cellule voisine. Cela induit le clivage du récepteur Notch, aboutissant à la libération de son domaine intracellulaire (NICD, Notch Intracellular Domain). Le NICD migre ensuite dans le noyau, où il forme un complexe transcriptionnel avec la protéine RBPJk (CSL) et le coactivateur MAML (Mastermind-like), régulant l'expression de gènes cibles essentiels au développement vasculaire. Comme mentionné précédemment, la signalisation Notch joue un rôle fondamental dans le contrôle du bourgeonnement vasculaire et la spécification artérioveineuse.

Par ailleurs, la stimulation par le facteur VEGFA induit l'expression de Dll4 principalement dans les cellules de pointe du bourgeon vasculaire (tip). Par interaction avec Notch1 sur les cellules adjacentes (stalk), la voie Notch limite la sensibilité de ces dernières au VEGFA en réprimant l'expression de VEGFR2 et en favorisant celle de VEGFR1 limitant ainsi sa différenciation en cellule ''tip'' [49] (Figure 11).

D'autre part, le ligand Jagged1, exprimé majoritairement dans les cellules ''stalk'', agit en compétiteur de la liaison Dll4/Notch. Par son interaction modulée par les enzymes de glycosylation dites fringes, Jagged1 inhibe la signalisation Notch dans ces cellules, favorisant ainsi leur prolifération et le bourgeonnement vasculaire. En dehors des cellules ''stalk'' la voie de signalisation Notch induit la quiescence vasculaire [50] et dans les cellules murales la signalisation DLL4/Notch entraîne la maturation des vaisseaux et leur stabilisation [38].

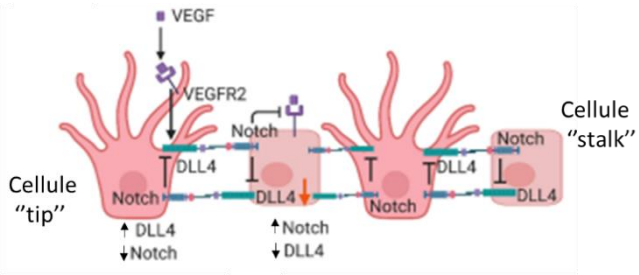


Figure 11. Voie de signalisation Notch.

Chez les cellules endothéliales de type ''tip'', la signalisation induite par le VEGF stimule l'expression de DLL4, laquelle active la voie de signalisation Notch1. En revanche, dans les cellules endothéliales de type ''stalk'', l'activation de Notch inhibe la différenciation vers un phénotype de cellule ''tip''. Figure adapté de [49].

1.7.3. Voie des Angiopoïétines

Cette voie joue un rôle central dans la régulation de la maturation, de la stabilisation et de la plasticité des vaisseaux sanguins, en agissant principalement sur les cellules périvasculaires et endothéliales. Elle repose sur l'interaction entre les récepteurs tyrosine kinase Tie1 et Tie2 et leurs ligands, les angiopoïétines. Chez les mammifères, les deux principaux ligands fonctionnels sont angiopoïétine-1 (Ang1) et angiopoïétine-2 (Ang2), qui exercent des effets antagonistes sur le système vasculaire [51].

Dans un endothélium quiescent, caractéristique des vaisseaux matures et fonctionnels, l'activité du récepteur tyrosine kinase Tie2 est principalement stimulée par son ligand Ang1, produit par les cellules périvasculaires telles que les péricytes et les cellules musculaires lisses. L'activation de Tie2 par Ang1 renforce la stabilité des jonctions endothéliales, réduit la perméabilité vasculaire et favorise l'attachement des cellules endothéliales à la matrice extracellulaire.

En revanche, lors de l'activation de l'angiogenèse, qui survient notamment dans des contextes comme l'hypoxie, la cicatrisation ou les situations inflammatoires, l'expression d'Ang2 est fortement induite par les cellules endothéliales. Ang2 agit alors comme un antagoniste en bloquant la liaison Ang1 et Tie2 [51].

Ang2 favorise la déstabilisation vasculaire en inhibant Tie2, ce qui conduit à une augmentation de la perméabilité vasculaire, au détachement des cellules murales, à la rupture des jonctions cellulaires et à l'activation des cellules endothéliales. Ce qui favorise la prolifération, la migration et le bourgeonnement endothélial, étapes initiales de l'angiogenèse [2, 51].

Le récepteur Tie1 est un récepteur orphelin qui pourrait agir comme un régulateur négatif de l'activité Tie2.

1.7.4. Voie PDGF (Platelet Derived Growth Factor)

PDGF ou facteur de croissance dérivé de plaquettes peut exister sous quatre membres : PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C et PDGF-D qui s'associent pour former des homodimères ou des hétérodimères (PDGF-AB) et peuvent se fixer à 2 récepteurs tyrosines Kinases PDGFRα et PDGFRβ.

PDGF-B, principalement sécrété par les cellules endothéliales, joue un rôle central dans la stabilisation des néovaisseaux en agissant comme un puissant facteur chimiotactique pour les cellules murales (péricytes et cellules musculaires lisses) exprimant PDGFRβ.

La liaison de PDGF-B à PDGFRβ déclenche l'autophosphorylation du récepteur et active plusieurs voies de signalisation intracellulaire majeures, notamment PI3K/AKT, RAS/MAPK conduisant à la prolifération, la migration, la survie et l'accolement des cellules murales recrutées (péricytes et cellules musculaires lisses) (Figure 12) [52]. Cette signalisation est indispensable à la maturation vasculaire, comme le montrent les modèles murins dans lesquels la délétion de *Pdgfb* ou de *Pdgfrβ* entraîne une perte de la couverture péricytaire, du soutien mural et par conséquent des anomalies vasculaires sévères caractérisées notamment par une dilatation des vaisseaux [53]. Par ailleurs, des mutations de perte de fonction (LOF) dans les gènes *PDGFB* et *PDGFRβ* entraînent la formation de dépôts de calcium dans les microvaisseaux, un phénomène observé aussi bien chez la souris que chez l'humain [54]. La perte constitutive de Pdgfb chez l'adulte entraîne une réduction marquée de la densité péricytaire au niveau du système nerveux central, compromettant l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique. Cette altération favorise l'activation endothéliale, l'expression de molécules d'adhésion leucocytaire, et l'infiltration de cellules immunitaires, contribuant à une inflammation neurovasculaire chronique et à une sensibilité accrue aux pathologies auto-immunes [55]. En outre, la perte de *Pdgfb* endothélial a été associée à la formation de malformations artérioveineuses (MAV), en lien avec un recrutement péricytaire insuffisant, un remodelage vasculaire anormal et une perte de l'organisation artério-veineuse, conduisant à la formation de shunts vasculaires pathologiques [56].

Dans les organes caractérisés par un endothélium fenestré et une faible couverture murale comme le foie, l'expression de PDGF-B est normalement réprimée par des facteurs de transcription tels que Gata4, ce qui limite le recrutement péricytaire [57].

La dérégulation de l'axe PDGF-B/PDGFRβ est impliquée dans diverses pathologies. Dans les rétinopathies diabétiques, la délétion hétérozygote de *Pdgfb* entraîne une perte de péricytes favorisant une dégénérescence des capillaires et une néovascularisation pathologique [58]. Dans plusieurs cancers, l'activation anormale de l'axe PDGF-B/PDGFRβ, par amplification génique, surexpression ou mutations activatrices, favorise la prolifération cellulaire, la survie tumorale, ainsi que la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (angiogenèse), contribuant

ainsi à la progression tumorale [59]. L'expression anormale de PDGF-B pourrait également contribuer au développement de la fibrose et de l'athérosclérose [59].

Des traitements ciblant spécifiquement l'axe PDGF-B/PDGFRβ ont été développés, notamment des inhibiteurs de tyrosine kinase tels que imatinib, sunitinib ou pazopanib, capables d'inhiber la phosphorylation et l'activation de PDGFRβ. Ces molécules ont démontré une certaine efficacité dans plusieurs types de cancers et font actuellement l'objet d'essais cliniques chez des patients atteints de tumeurs solides [60–62]. Par ailleurs, ces inhibiteurs présentent un intérêt thérapeutique dans les pathologies fibrotiques, où l'axe PDGF-B/PDGFRβ joue un rôle central. L'inhibition de cette voie permet de limiter l'activation phénotypique et la prolifération des fibroblastes, ainsi que la synthèse excessive de matrice extracellulaire, éléments déterminants dans l'initiation et la progression du processus fibrotique [63, 64].

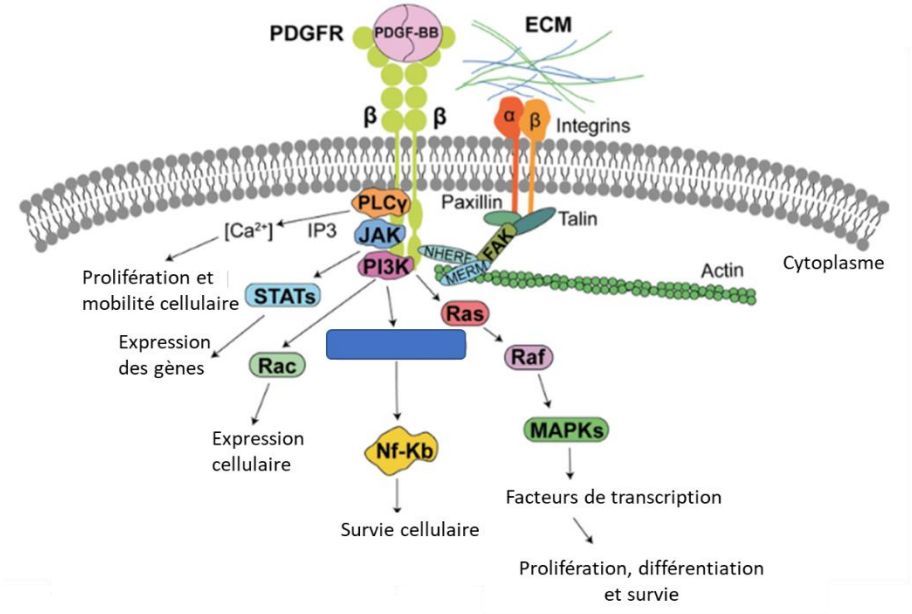


Figure 12. Voie PDGFB-PDGFRB.

Schéma illustrant les principales voies de signalisation intracellulaires déclenchées par la liaison du facteur de croissance PDGF-B à son récepteur PDGFRβ. Cette interaction conduit à l'activation de cascades de signalisation majeures régulant divers processus cellulaires tels que la prolifération, la migration, la survie et la différenciation (Figure adaptée de [65]).

1.7.5. Voie des Sémaphorines

Les sémaphorines forment une grande famille de glycoprotéines qui ont été initialement identifiées pour leur rôle dans le guidage axonal au sein du système nerveux [66]. Cependant, les sémaphorines joue également un rôle crucial dans la régulation de l'angiogenèse, de la perméabilité et du remodelage vasculaire. Sur la base de leur structure et de leur origine, les sémaphorines sont classées en huit groupes, allant des classes 1 à 7, ainsi que la classe V, cette

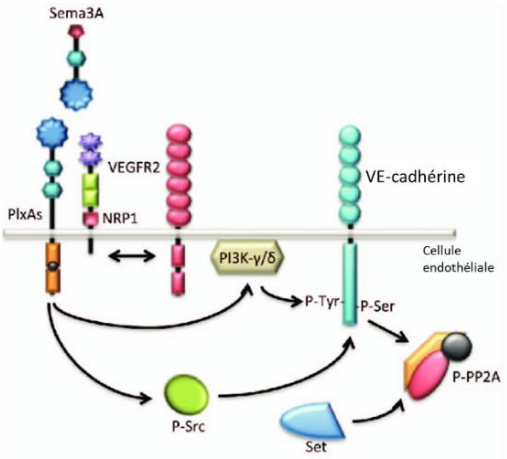
dernière étant spécifique des virus. Les classes 1 et 2 sont propres aux invertébrés, tandis que les classes 3 à 7 sont présentes chez les vertébrés.

Parmi ces différentes classes, la classe 3 (Sema3) est la seule famille de sémaphorines sécrétées chez les vertébrés et constitue l'une des plus étudiées dans le contexte vasculaire. Les membres de cette classe exercent leurs effets principalement via les récepteurs neuropilines (NRP1 et NRP2) associés aux récepteurs de la famille des plexines [67]. La spécificité de la liaison entre les différentes Sema3 et leurs récepteurs est bien caractérisée : Sema3A interagit spécifiquement avec NRP1, tandis que SemaF se lie préférentiellement à NRP2. Sema3C possède la capacité de se fixer aux deux neuropilines. En revanche, Sema3E constitue une exception car elle peut se lier directement à Plexine D1 sans nécessiter l'implication d'un corécepteur de type neuropiline.

Parmi les Sema3, la Sema3A joue un rôle central dans la régulation vasculaire. Sema3A est reconnue comme un puissant facteur anti-angiogénique, notamment par sa capacité à inhiber la migration et la prolifération des cellules endothéliales. Ce rôle s'exerce en grande partie par compétition avec le VEGF-A pour la liaison au récepteur NRP1, ce qui inhibe la formation du complexe VEGF-A/NRP1/VEGFR2 et bloque la signalisation pro-angiogénique. Toutefois, il est important de noter que Sema3A et VEGF-A ne se lient pas au même site sur NRP1, ce qui suggère des mécanismes de régulation distincts malgré leur affinité commune pour ce récepteur. Ainsi, Sema3A agit comme un frein physiologique à la croissance des vaisseaux sanguins dans différents contextes, incluant la néovascularisation tumorale [68].

En plus de son rôle anti-angiogénique, Sema3A est également un régulateur important de la perméabilité vasculaire (Figure 13). Elle induit la phosphorylation de la VE-cadhérine, une molécule clé des jonctions adhérentes endothéliales, ce qui conduit à son internalisation et à la dissociation des complexes de jonction. Cette désorganisation des jonctions intercellulaires augmente la perméabilité vasculaire et altère la fonction barrière de l'endothélium [69, 70].

A



B

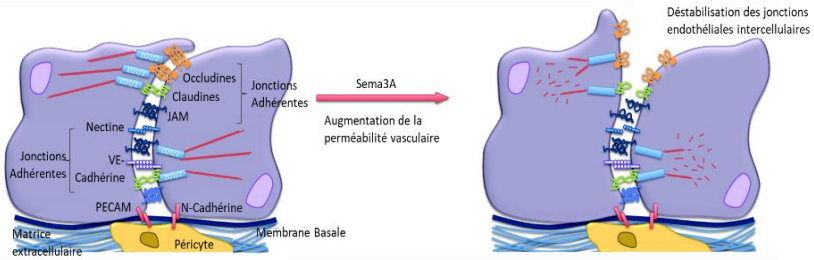


Figure 13. Sema3A augmente la perméabilité endothéliale en déstabilisant la VE-cadhérine.

(a) L'activation des récepteurs PlxA1 et NRP1 par Sema3A déclenche les voies PI3K-γ/δ et Src, conduisant à la phosphorylation et à la déstabilisation de la VE-cadhérine. Dans les cellules endothéliales quiescentes, VE-cadhérine est associée à la phosphatase PP2A, dont l'inactivation par Src pourrait contribuer à la rupture des jonctions adhérentes.
(b) Effet de la Sema3A sur l'organisation des jonctions intercellulaires endothéliales. Figure adaptée de [71].

Plus récemment, un rôle clé de Sema3A dans le vieillissement vasculaire et la dénervation cardiaque a été mis en évidence [72]. Sema3A bien connue pour ses propriétés répulsives vis-à-vis des fibres nerveuses, joue un rôle central dans le couplage neurovasculaire en modulant l'extension ou la répulsion des axones. Au cours du vieillissement, une augmentation marquée de l'expression de Sema3A a été observée dans les cellules endothéliales cardiaques, en lien avec une diminution de l'expression du microARN *miR-145*, un régulateur négatif post-transcriptionnel de *Sema3A*. Cette dérégulation favorise la dénervation du cœur, en perturbant la guidance des fibres nerveuses cardiaques, ce qui conduit à une diminution progressive de l'innervation cardiaque, à une altération de la variabilité de la fréquence cardiaque et à une vulnérabilité accrue aux arythmies [72].

En 2024, la Sema3A a été décrite comme un régulateur clé de l'endothélium fenestré. Le traitement des cellules endothéliales sinusoïdales du foie avec de Sema3A, a été associée à une perte significative de fenestrations, altérant ainsi la porosité endothéliale. Cette défenestration perturbe les échanges vasculaires et contribue à la dysfonction microvasculaire, en particulier dans les contextes de stéatose hépatique et de vieillissement [73].

1.7.6. Voie BMP9/10/ALK1

Les protéines morphogénétiques osseuses 9 et 10 (BMP9 et BMP10) ainsi que leur récepteur ALK1 appartiennent à la superfamille des facteurs de croissance transformants β (TGF-β) [74].

Cette signalisation joue un rôle clé dans le maintien de la quiescence et de l'intégrité des cellules endothéliales, notamment en inhibant leur prolifération et leur migration. Cette voie est indispensable au maintien de l'homéostasie vasculaire et sera décrite plus en détail dans le chapitre 3.

1.7.7. La famille TGF-β (Transforming Growth Factor ß)

1.7.7.1. Ligands de la famille TGFβ

La superfamille TGFβ regroupe un ensemble de 33 cytokines identifiées chez les mammifères et impliquées dans le contrôle de multiples fonctions biologiques essentielles (Figure 14). Ces ligands peuvent réguler la différenciation cellulaire, la prolifération, l'adhésion, la migration, la survie, la communication intercellulaire, ainsi que le remodelage de la matrice

extracellulaire. Ils jouent un rôle central dans le développement embryonnaire, le maintien de l'homéostasie et la réparation tissulaire. Pratiquement toutes les cellules de l'organisme expriment, ou sont capables de répondre à, au moins un membre de cette superfamille [75].

Sur le plan structurel, tous les membres de la superfamille TGFβ possèdent un motif conservé appelé ''nœud cystéine'' (cysteine knot), leur conférant une stabilité et une conformation caractéristiques. La classification actuelle les regroupe en deux grandes sous-familles, selon la similarité de séquence et leurs voies de signalisation :

- La sous-famille TGFβ, qui inclut les trois isoformes TGFβ1, TGFβ2 et TGFβ3, ainsi que les activines (A et B), nodal, la myostatine et plusieurs facteurs GDF (Growth Differentiation Factor).
- La sous-famille BMP, qui regroupe les protéines BMP (BMP2 à BMP10 et BMP15), les hormones anti-müllérienne (AMH) ainsi que des autres GDF.

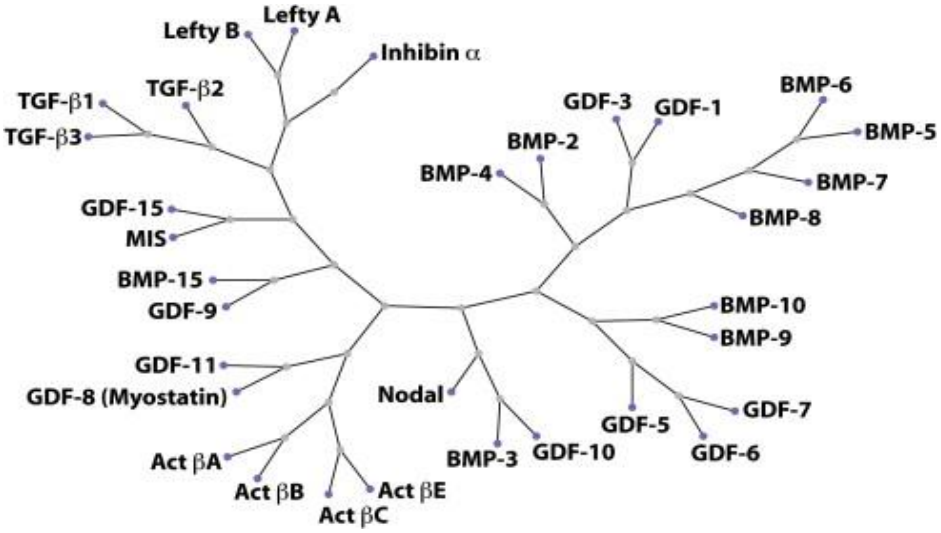


Figure 14. Arbre phylogénétique de la famille du TGF-β [76] .

Bien qu'elles soient majoritairement sécrétées sous forme d'homodimères, diverses combinaisons hétérodimériques de ces ligands ont également été identifiées, avec des fonctions biologiques démontrées [75].

Parmi les BMP, BMP9 et BMP10 constituent un sous-groupe fonctionnellement atypique, spécialisé dans la régulation de l'intégrité et de la quiescence vasculaire. BMP10 est majoritairement produit par les cardiomyocytes de l'oreillette droite du cœur et plus faiblement par les cellules étoilées du foie, tandis que la principale source de BMP9 correspond aux cellules étoilées hépatiques (Figure 15) [74].

Comme tous les membres de la famille TGF-β, BMP9 et BMP10 sont synthétisés sous forme de pré-pro protéines comprenant : un peptide signal qui dirige la protéine vers la voie sécrétoire, un pro-domaine N-terminal, impliqué dans le repliement correct et la stabilité du ligand et un domaine mature C-terminal, qui est le fragment actif capable d'interagir avec les

récepteurs. Le clivage protéolytique entre le pro-domaine et le domaine mature s'effectue par des convertases de type furine au niveau d'un site de clivage conservé de type Arg-X-X-Arg.

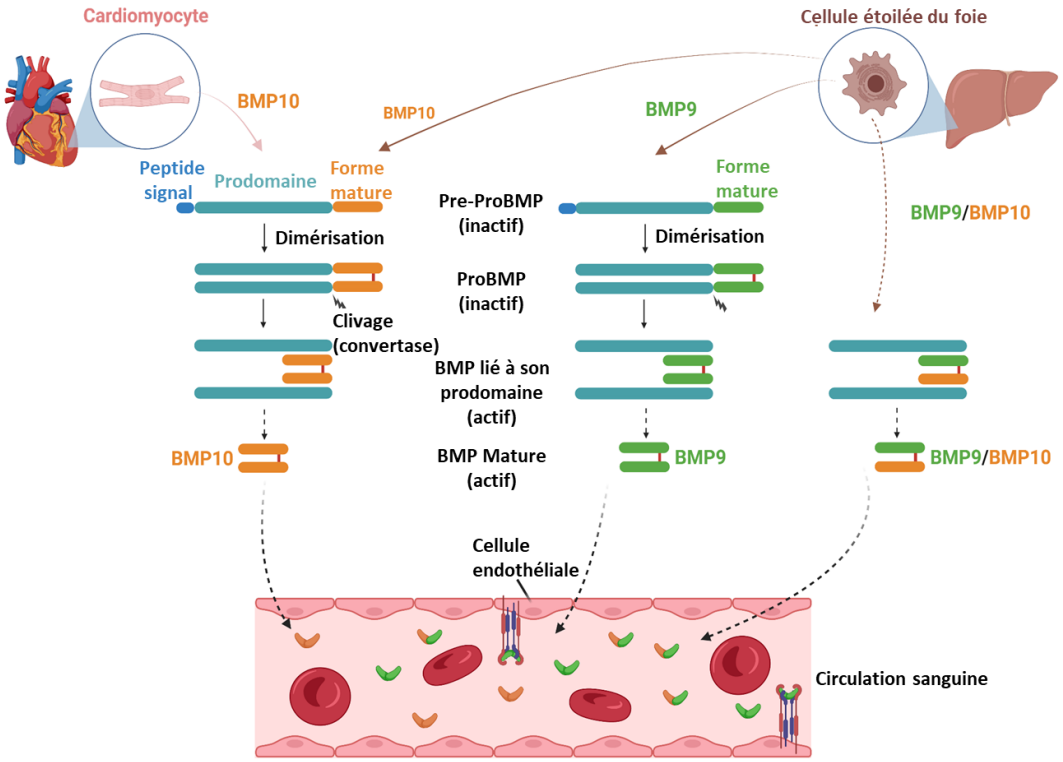


Figure 15. Représentation schématique des étapes de synthèse et de maturation de BMP9 et BMP10.

BMP9 est principalement produit par les cellules étoilées hépatiques (HSC), tandis que BMP10 est majoritairement synthétisé par le cœur, et en moindre quantité par les HSC. La biosynthèse débute par la dimérisation de précurseurs inactifs, suivie d'un clivage enzymatique par des convertases. Ce processus génère deux formes actives : la BMP liée à son prodomaine et la forme mature. Ces deux formes sont fonctionnellement actives dans le cas de BMP9 et BMP10. Une fois activés, les BMP sont libérés dans la circulation sanguine et exercent leurs effets via des récepteurs spécifiques exprimés à la surface des cellules endothéliales. Figure réalisée avec Biorender.

1.7.7.2. Récepteurs TGFβ

Les ligands de la superfamille TGFβ exercent leurs effets biologiques par l'activation d'un complexe de récepteurs transmembranaires, constitués de deux récepteurs de type I et de deux récepteurs de type II, tous deux pourvus d'une activité sérine/thréonine kinase. À ces récepteurs s'ajoutent des co-récepteurs dits de type III, dépourvus d'activité enzymatique intrinsèque, mais indispensables à l'amplification ou à la modulation de la signalisation de certains ligands.

Chez les mammifères, cette famille comprend sept récepteurs de type I, appelés activin receptor-like kinases (ALK1 à ALK7), et cinq récepteurs de type II : ActRIIA (Activin Receptor

Type IIA), ActRIIB, BMPRII (Bone Morphogenetic Protein Receptor II), AMHRII (Anti-Müllerian Hormone Receptor II) et TGFBRII (Transforming Growth Factor Beta Receptor II). Tous partagent une organisation structurale similaire : une large région extracellulaire riche en résidus cystéine (contenant notamment une cystéine box proche de la région transmembranaire), un domaine transmembranaire unique, et un domaine intracellulaire à activité kinase.

Le domaine kinase des récepteurs de type I se distingue par la présence d'un motif conservé appelé boîte GS (Glycine-Serine box), situé en amont du domaine catalytique. Cette région, caractérisée par la répétition de motifs SGSGSG, constitue le site de phosphorylation par les récepteurs de type II, indispensable à l'activation du récepteur de type I et à l'initiation de la signalisation intracellulaire [77].

Les récepteurs de type III sont le betaglycan (TGFBR3) et l'endogline (ENG/CD105). Bien qu'ils soient dépourvus de domaine kinase, ils jouent un rôle crucial dans la modulation de la signalisation. Betaglycan augmente la sensibilité cellulaire aux trois isoformes de TGFβ, tandis que l'endogline intervient spécifiquement dans la signalisation induite par BMP9 et BMP10, notamment dans les cellules endothéliales. Ces co-récepteurs stabilisent les complexes ligand-récepteur et modulent leur affinité.

1.7.7.3. Voies de signalisation

Chaque ligand de la superfamille TGFβ interagit avec des combinaisons spécifiques de récepteurs de type I et de type II qui activent principalement deux grandes voies de signalisation intracellulaire :

La voie canonique, médiée par la phosphorylation des SMAD (Suppressor of Mothers Against Decapentaplegic) réceptrices (R-SMAD),

Les voies non canoniques, indépendante des SMAD.

1.7.7.3.1. Voie canonique SMAD-dépendante

Les SMAD constituent une famille de facteurs de transcription essentiels à la transduction du signal des récepteurs de la superfamille TGFβ. Chez les mammifères, huit protéines SMAD ont été identifiées et classées en trois groupes fonctionnels : les SMAD régulatrices (R-SMAD : SMAD1, 2, 3, 5 et 8), la co-médiatrice (co-SMAD : Smad4) et les SMAD inhibitrices (I-SMAD : SMAD6 et 7). Les R-SMAD et la co-SMAD partagent une organisation structurelle similaire, comprenant deux domaines hautement conservés : le domaine MH1 (N-terminal), impliqué dans la liaison à l'ADN, de la translocation nucléaire, et le domaine MH2 (C-terminal), responsable des interactions avec les récepteurs de type I, avec les autres SMAD et des interactions avec diverses protéines de liaison à l'ADN et de l'activation transcriptionnelle des SMAD (Figure 16).

Ces deux domaines sont reliés par une région variable. Les R-SMAD possèdent en outre un motif terminal SSXS (Ser-Ser-X-Ser) qui constitue le site de phosphorylation par les récepteurs de type I activés. En revanche, les I-SMAD présentent une structure distincte, dépourvue du domaine MH1 et du motif SSXS, bien que le domaine MH2 soit partiellement conservé. Cette particularité leur permet d'interagir avec les récepteurs de type I en compétition avec les R-SMAD, tout en échappant à la phosphorylation, agissant ainsi comme inhibiteurs endogènes de la signalisation.

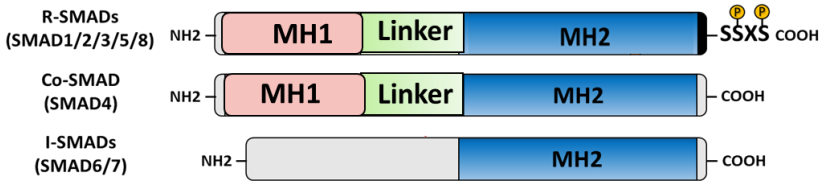


Figure 16. Domaines fonctionnels caractéristiques des différentes classes de protéines SMAD.

Figure réalisée avec powerpoint.

Suite à la fixation d'un dimère TGFβ (ou BMP) sur le complexe récepteur transmembranaire, le récepteur de type II, dont l'activité kinase est constitutive, phosphoryle le récepteur de type I qui à son tour s'active et phosphoryle les R-SMAD (au niveau de leur motif C-terminal SSXS). Cette phosphorylation induit l'activation du domaine kinase du récepteur de type I, qui cible ensuite des SMAD régulateurs (R-SMAD) spécifiques, en fonction du type de ligand engagé. Dans le cas des BMP, les récepteurs de type I (tels qu'ALK1, ALK2, ALK3 ou ALK6) phosphorylent SMAD1, SMAD5 et SMAD8 (alors que ce sont les SMAD2 et SMAD3 qui sont phosphorylés lors de la liaison du TGFβ). Une fois activés, ces R-SMAD forment un complexe avec SMAD4, le médiateur commun de la voie, qui permet leur accumulation dans le noyau. Le complexe SMAD nucléaire interagit avec divers cofacteurs transcriptionnels, activateurs ou répresseurs (Figure 17). Ce mécanisme canonique est finement contrôlé par les I-SMAD (SMAD6 et SMAD7), qui assurent un rétrocontrôle négatif de la signalisation en inhibant la phosphorylation des R-SMAD ou en empêchant leur interaction avec SMAD4 [77].

Parmi les récepteurs de type I, ALK1 se distingue par son expression dans les cellules endothéliales et son affinité sélective pour BMP9 et BMP10. Son implication dans la pathologie vasculaire rare Rendu-Osler lui confère un intérêt particulier [23]. ALK1, ainsi que les mécanismes de signalisation en aval activés par BMP9/10, seront abordés en détail dans un chapitre ultérieur dédié à la voie BMP9/10/ALK1, en lien direct avec la physiopathologie de la maladie de Rendu-Osler encore appelée HHT.

1.7.7.3.2. Voie non canonique

En parallèle de la voie canonique SMAD-dépendante, les ligands de la superfamille TGFβ peuvent également activer des voies dites non canoniques, indépendantes des SMAD (Figure 17). Celles-ci incluent notamment les cascades MAPK (ERK, JNK, p38), la voie PI3K/AKT, les protéines G de type Rho-like, ainsi que la signalisation NF-κB via l'activation de complexes tels que TAK1/TAB1. L'activation de ces voies peut se faire de manière autonome ou en synergie avec la signalisation SMAD, permettant une modulation fine des réponses cellulaires en termes d'intensité, de durée et de spécificité. Ces signalisations alternatives jouent un rôle déterminant dans la régulation de processus fondamentaux tels que la prolifération, la survie, l'apoptose, la migration ou encore la différenciation cellulaire. Cependant, les mécanismes permettant l'activation des voies de signalisation SMAD-indépendantes sont encore mal connus et varient selon le type cellulaire [78].

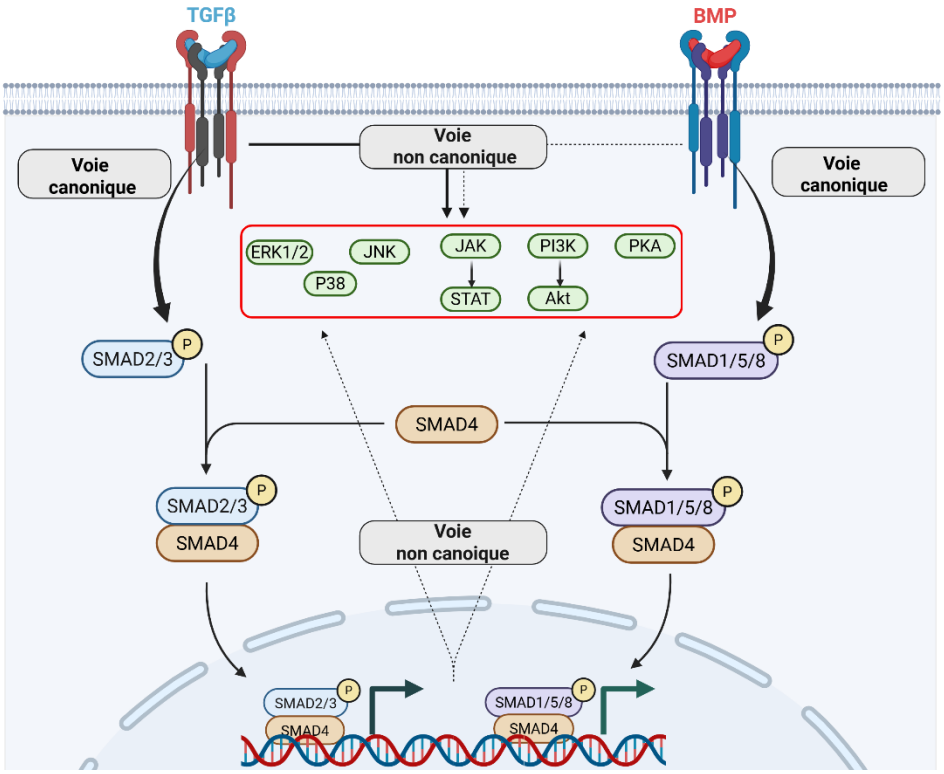


Figure 17. Signalisation canonique et non canonique de TGFβ.

Schéma illustrant les mécanismes de signalisation intracellulaire activés par les récepteurs TGFβ et BMP. La voie canonique implique la phosphorylation des protéines SMAD (SMAD2/3 pour TGFβ et SMAD1/5/8 pour BMP) qui s'associent à SMAD4 et migrent vers le noyau pour réguler la transcription génique. Parallèlement, des voies non canoniques mobilisent diverses kinases (ERK1/2, JNK, P38, JAK, PI3K, PKA) et facteurs de transcription (STAT, Akt) pour moduler les réponses cellulaires indépendamment des SMAD. Figure réalisée avec Biorender.

Chapitre 2 : Maladie de Rendu-Osler ou Télangiectasie Hémorragique Héréditaire (HHT)

Le système vasculaire repose sur un équilibre fin entre la prolifération, la perméabilité, la différenciation et la stabilité des cellules endothéliales, comme développé dans le premier chapitre. Cet équilibre délicat est régulé par plusieurs voies de signalisation, notamment celles impliquant VEGF, Notch, Ang/Tie2, PDGF-B et BMP9/BMP10/ALK1, qui jouent un rôle central dans le maintien de l'homéostasie vasculaire. Toute perturbation de ces mécanismes peut entraîner des anomalies structurales ou fonctionnelles de l'endothélium, conduisant à diverses pathologies vasculaires. Parmi celles-ci, la maladie de Rendu-Osler, également appelée télangiectasie hémorragique héréditaire (HHT), constitue un exemple de pathologie génétique résultant d'une altération de la signalisation BMP9/10/ALK1. Cette affection se caractérise par la formation anormale de connexions vasculaires directes entre artères et veines, appelées malformations artérioveineuses (MAV), et illustre les conséquences d'une dérégulation de la quiescence endothéliale sur l'architecture vasculaire. Le chapitre suivant aborde donc les bases génétiques de l'HHT, ses manifestations cliniques et les approches thérapeutiques actuelles.

2.1. Etiologie de la maladie

HHT est une maladie génétique vasculaire rare à transmission autosomique dominante, touchant environ 1 personne sur 5 000 à 8 000 dans le monde [79]. Elle est principalement due à des mutations dans des gènes clés de la voie de signalisation BMP9/10-ENG-ALK1-SMAD4, essentielle à l'homéostasie vasculaire (Figure 18).

La mutation d'*ENG* codant pour le co-récepteur endogline et d'*ACVRL1* codant pour le récepteur ALK1, responsables respectivement des formes HHT1 (OMIM #187300) et HHT2 (OMIM #600376) représentent environ 90 % des cas diagnostiqués [80, 81]. Ces altérations génétiques comprennent des mutations non-sens, des délétions, des duplications, des variants d'épissage, ainsi que de nombreuses mutations faux-sens réparties sur l'ensemble des séquences codantes de ces gènes [82].

Une minorité de cas (2 %) est associé à des mutations dans le gène *SMAD4*, facteur de transcription impliqué dans la transduction du signal. Les mutations *SMAD4* entraînent un syndrome combiné de HHT et de polypose juvénile (JP-HHT ; OMIM #175050), caractérisé par la survenue conjointe de polypes gastro-intestinaux et de lésions vasculaires [83]. À ce jour, plus de 26 mutations différentes ont été décrites chez des patients atteints de JP-HHT, la majorité étant des mutations faux-sens ou des délétions, principalement localisées dans le domaine MH2 de SMAD4, indispensable à sa fonction transcriptionnelle [84].

Plus récemment, des mutations du gène *GDF2* (codant pour BMP9), associées à une forme rare appelée HHT5 (OMIM #615506), ont été identifiées chez quelques patients présentant un phénotype atypique de l'HHT. Cependant, en raison du faible nombre de cas rapportés et de caractéristiques cliniques parfois atypiques de l'HHT, son implication est encore débattue [85], [86]. A ce jour un seul cas correspond à HHT présente une mutation du gène *GDF2* [85].

Enfin, d'autres gènes comme *DROSHA*, impliqué dans la biogenèse des microARN ou plus récemment *RASA1 et EPHB4* , ont été décrits dans l'HHT ou dans une pathologie proche de l'HHT appelée syndrome Capillary malformation-arteriovenous-malformation (CM-AVM) [87, 88].

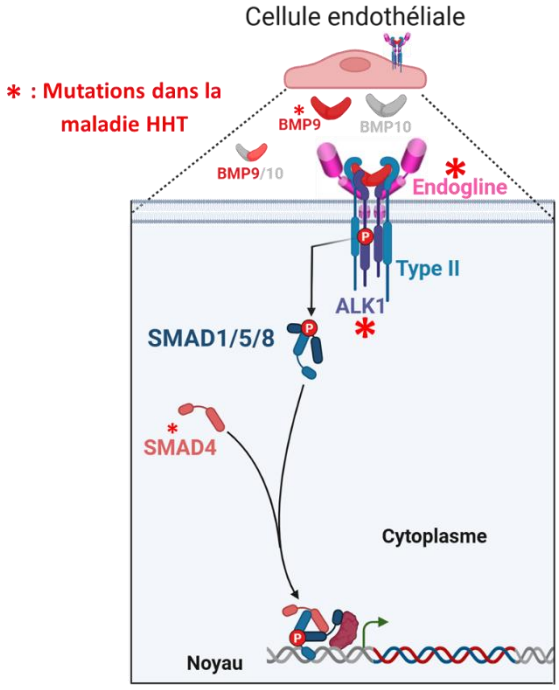


Figure 18. Voie BMP9/10/ALK1 et mutations associées à l'HHT.

HHT est causée par des mutations de perte de fonction (LOF) dans ENG, ALK1, SMAD4, et plus rarement BMP9 (indiquées par des astérisques rouges) (Figure réalisée avec Biorender).

2.2. Manifestations cliniques et symptômes de l'HHT

Les mutations à l'origine de l'HHT entraînent une fragilité vasculaire systémique affectant divers organes vitaux. Ainsi, une grande diversité de manifestations cliniques est observée chez les patients.

2.2.1. Télangiectasies

Les télangiectasies représentent une forme superficielle des malformations vasculaires caractéristiques de l'HHT. Elles apparaissent comme de petites lésions vasculaires rougeâtres, planes sur la peau et les muqueuses. Ces lésions sont visibles principalement au niveau des lèvres, de la langue, du visage, des doigts, de la cavité buccale, de la muqueuse nasale et du tractus gastro-intestinal [23, 87] (Figure 19).

Cliniquement, ces lésions sont reconnaissables par leur blanchiment à la pression (test de diascopie), suivi d'un remplissage progressif une fois la pression relâchée. Leur paroi mince, leur proximité avec la surface, et leur structure anormale les rendent vulnérables aux ruptures [89]. Elles apparaissent progressivement au cours de la vie, 30 % des patients déclarent leur apparition avant l'âge de 20 ans, et environ deux tiers avant 40 ans. Ces télangiectasies peuvent entraîner des saignements au moindre traumatisme local, en raison de leur structure vasculaire altérée et fragile.

Sur le plan histologique, les télangiectasies correspondent à des dilatations focales des veinules postcapillaires, caractérisées par un élargissement de leur lumière, avec une extension progressive vers les capillaires normaux adjacents, aboutissant à des connexions directes avec des artérioles dilatées. Ces altérations structurelles, responsables d'un flux sanguin accéléré et d'une fragilité accrue des parois vasculaires, sont qualifiées de malformations artérioveineuses. Par ailleurs, des infiltrats lymphocytaires périvasculaires ont été observés, suggérant une possible participation du système immunitaire local dans le développement ou la progression de ces anomalies [90].

Dans la cavité nasale, elles sont responsables des épistaxis fréquentes menant à une anémie ferriprive. Dans le tractus gastro-intestinal, elles peuvent être à l'origine d'hémorragies chroniques, plus fréquentes après 50 ans, aggravant ainsi l'anémie [23].

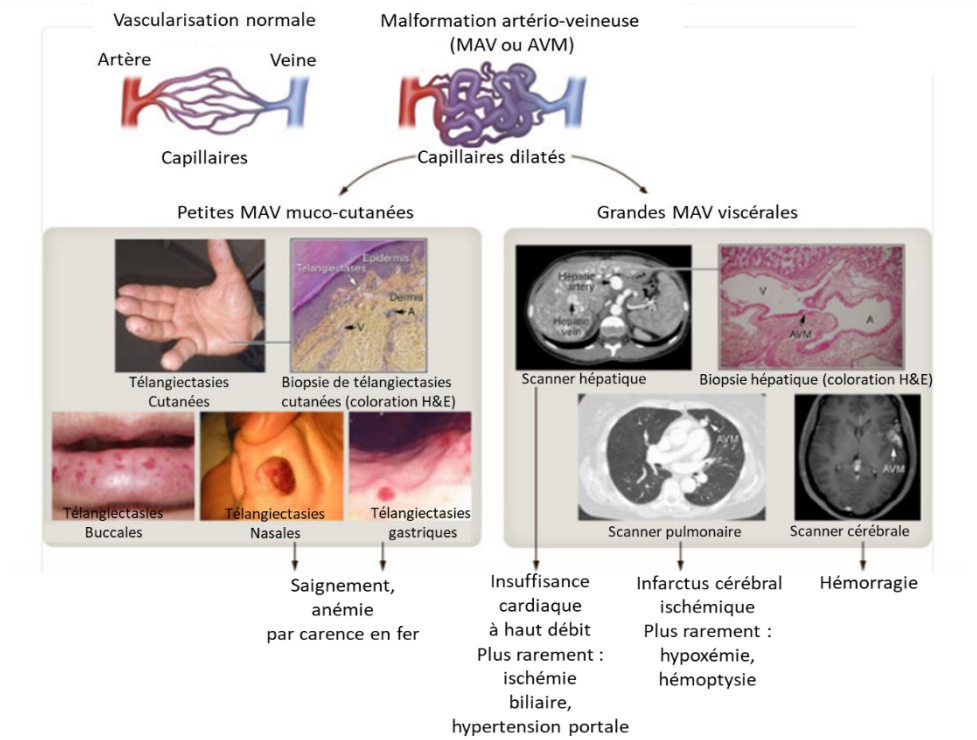


Figure 19. Malformations artérioveineuses (MAV) : caractéristiques de l'HHT.

Dans HHT, des dilatations des veinules post-capillaires (indiquées par V sur les images) englobent progressivement les capillaires normaux et établissent une connexion directe avec des artérioles dilatées (indiquées par A), entraînant la formation de MAV, la muscularisation des gros vaisseaux et la dilatation des réseaux capillaires, souvent entourés de cellules inflammatoires.
Au niveau microvasculaire, les MAV apparaissent sous forme de télangiectasies muco-cutanées (lèvres, pulpe des doigts, langue, muqueuse nasale et digestive), responsables d'épistaxis et d'anémie ferriprive.
Au niveau macrovasculaire, les MAV hépatiques provoquent une insuffisance cardiaque à débit élevé, plus rarement une ischémie biliaire ou une hypertension portale ; les MAV pulmonaires peuvent induire un infarctus cérébral ischémique ou un abcès cérébral, et plus rarement une hypoxémie ou une hémoptysie (Figure adaptée de [87]).

2.2.2. Epistaxis

L'épistaxis (saignement de nez) constitue le symptôme le plus fréquent et souvent le plus précoce dans l'HHT, affectant plus de 90 % des patients [23]. Sa fréquence, sa durée et sa sévérité varient largement d'un individu à l'autre, mais aussi au cours de la vie d'un même patient avec une aggravation progressive dans le temps. Les épisodes évoluent de simples saignements nasaux occasionnels et spontanément résolutifs à des hémorragies prolongées et répétées pouvant entraîner une anémie aiguë ou chronique et altérer la qualité de vie.

Ces saignements sont dus à des télangiectasies fragiles au niveau de la muqueuse nasale. Ces lésions vasculaires, de forme variable (ponctiforme, linéaire ou plus diffuse), sont particulièrement vulnérables à la rupture, notamment en raison de la fonction de la muqueuse

nasale dans l'humidification et le réchauffement de l'air inspiré, ce qui la rend sujette à la dessiccation. Les zones les plus fréquemment atteintes sont situées dans la partie antérieure des fosses nasales, notamment au niveau du septum nasal et des cornets moyens et inférieurs où convergent plusieurs artères et où le flux sanguin est élevé. Ce site est aussi exposé à des traumatismes fréquents (frottements, mouchages) [23].

L'âge moyen d'apparition des épistaxis est d'environ 12 ans, avec des cas rapportés dès l'âge de 5 ans. Avant l'âge de 20 ans, plus de la moitié des patients ont déjà expérimenté des épisodes d'épistaxis, dont la fréquence et l'intensité ont tendance à s'accentuer avec l'âge.

Certaines variations saisonnières peuvent également influencer la sévérité des saignements. De nombreux patients rapportent une exacerbation des épisodes pendant l'hiver, période durant laquelle l'air sec assèche davantage la muqueuse nasale. En moyenne, les patients atteints de l'HHT présentent environ 18 épisodes d'épistaxis par mois, avec une durée moyenne de 7,5 minutes par épisode [91].

Face à cette variabilité, un outil standardisé a été développé : l'Epistaxis Severity Score (ESS). Ce score, validé par Hoag et al. en 2010, repose sur six paramètres cliniques (fréquence, durée, intensité des saignements, anémie, transfusion, recours médical). Il permet d'obtenir un score de 0 à 10, facilitant l'évaluation de la sévérité de l'épistaxis et le suivi thérapeutique [92].

2.2.3. Malformations artérioveineuses plus larges dans certains organes

Dans des organes vitaux, des malformations artérioveineuses plus larges se développent notamment dans les poumons, le foie et le cerveau aggravant la vie des patients.

Les MAV pulmonaires touchent au moins la moitié des patients, avec une prévalence encore plus élevée chez les patients porteurs de mutations du gène *ENG* [93]. Ces anomalies forment un shunt anormal entre les artères et les veines pulmonaires, contournant ainsi le lit capillaire pulmonaire où se déroulent normalement les échanges gazeux et la filtration. Elles peuvent être uniques ou multiples, focales ou diffuses, et se développent principalement avant l'adolescence tardive, avec une progression limitée à l'âge adulte. Ces shunts entraînent une hypoxémie par contre les symptômes respiratoires sont rares au moment du diagnostic [23], [94] (Figure 19). Leur principal risque réside dans les complications qu'elles génèrent : en plus des risques d'hémorragies pulmonaires, elles favorisent le passage d'emboles ou de bactéries vers la circulation systémique, ce qui expose à un risque élevé d'accidents vasculaires cérébraux ischémiques et d'abcès cérébraux [93].

Les malformations artérioveineuses hépatiques sont très fréquentes dans HHT, avec une prévalence supérieure à 74 % majoritairement chez les patients portant la mutation *ACVRL1*. Trois types de shunts hépatiques peuvent se former : artérioveineux (entre l'artère hépatique et la veine hépatique), artério-portaux (entre l'artère hépatique et la veine porte), et porto-veineux (entre la veine porte et la veine hépatique). Ces atteintes hépatiques sont étroitement

liées à l'âge, avec une symptomatologie qui apparaît généralement autour de 50 ans. L'âge moyen au moment du diagnostic est estimé à 48 ans [95].

Ces shunts peuvent entraîner des complications cliniques variées : une insuffisance cardiaque à haut débit, une hypertension portale, des ischémies biliaires ou mésentériques, une encéphalopathie hépatique, voire des anomalies régénératives hépatiques comme l'hyperplasie nodulaire régénérative. Ces complications peuvent conduire à envisager une transplantation hépatique comme seule option thérapeutique [87] (Figure 19).

Par ailleurs, 20% des patients atteints de l'HHT développent des MAV au niveau du système nerveux central, en particulier chez les porteurs de mutations du gène *ENG* [96]. Les MAV cérébrales et médullaires, moins fréquentes et souvent asymptomatiques, apparaissent avant la naissance, bien que certains patients puissent présenter des maux de tête, des migraines ou des déficits neurologiques, le plus souvent transitoires. Elles peuvent néanmoins entraîner des complications graves, telles que des accidents vasculaires cérébraux hémorragiques ou des crises épileptiques. Bien que ces hémorragies soient rares, leur rupture peut avoir des conséquences sévères, conduisant à un handicap ou au décès [23, 87].

2.3. Dysrégulation immunitaire associée à l'HHT

Au-delà des complications vasculaires bien établies, des anomalies immunologiques ont été décrites chez les patients atteints de l'HHT. Une étude menée par Guilhem et al., a mis en évidence une lymphopénie significative touchant principalement les lymphocytes T CD4+, T CD8+ et les cellules NK (Natural Killer). Parallèlement, une élévation modérée des immunoglobulines G et A a été observée, sans perturbation des taux de lymphocytes B et avec une baisse significative des taux d'immunoglobulines M qui pourrait être corrélée à la survenue d'infections sévères, notamment chez les patients présentant des MAV pulmonaires, connues pour favoriser le passage de micro-organismes vers la circulation systémique [97], [98]. Par ailleurs, un apport en fer élevé et prolongé, fréquemment nécessaire chez les patients atteints de l'HHT en raison d'une anémie ferriprive chronique, pourrait induire un stress oxydatif excessif [99]. Ce stress, en générant des espèces réactives de l'oxygène, est susceptible d'altérer l'intégrité de l'ADN lymphocytaire et de contribuer au développement d'une lymphopénie également induite par un exercice physique intense où l'excès de stress oxydatif provoque également une apoptose lymphocytaire [100].

2.4. Critères de diagnostic (Curaçao) et hypothèse du second Hit

Le diagnostic clinique de la maladie HHT repose sur les critères de Curaçao, validés par le comité scientifique de la Fondation Internationale de l'HHT. Ces critères sont au nombre de quatre : (1) Épistaxis spontanées; (2) Présence de télangiectasies multiples (lèvres, cavité buccale, doigts, nez); (3) MAV ou télangiectasies viscérales (notamment pulmonaires, hépatiques, cérébrales, médullaires ou digestives); (4) Antécédents familiaux de l'HHT [101] (Figure 20).

Un diagnostic est considéré comme certain lorsque trois critères sur quatre sont présents. Il est jugé possible en présence de deux critères, et improbable si moins de deux critères sont réunis.

L'application de ces critères est fiable chez l'adulte, notamment dans les formes cliniquement typiques. En revanche, leur sensibilité est plus faible chez l'enfant, chez qui les signes caractéristiques (épistaxis, télangiectasies) peuvent être absents ou d'apparition tardive. Dans ces contextes, ainsi que dans les formes familiales incomplètes, le recours à une analyse génétique ciblée est recommandé. Celle-ci permet d'identifier une mutation pathogène dans l'un des trois gènes majeurs impliqués dans l'HHT (*ENG, ACVRL1/ALK1, SMAD4*), confirmant ainsi le diagnostic et facilitant le dépistage familial [102, 103].

La recherche d'une mutation familiale connue est particulièrement utile pour exclure le diagnostic chez les apparentés asymptomatiques ne la portant pas, ou au contraire pour initier une stratégie de dépistage précoce des complications chez les porteurs.

Il est important de souligner que les manifestations cliniques de l'HHT varient considérablement, y compris entre individus porteurs d'une même mutation au sein d'une même famille. Cette hétérogénéité phénotypique a contribué à la formulation de l'hypothèse du second hit [104], qui sera développée plus en détail au chapitre 3. Selon cette hypothèse, la mutation germinale (*ENG, ACVRL1, SMAD4*) prédispose l'endothélium à des lésions vasculaires qui nécessitent l'intervention d'un second événement génétique, environnemental ou inflammatoire. Cette hypothèse permettrait d'expliquer la variabilité d'expression clinique observée entre individus porteurs d'une même mutation, la pénétrance incomplète chez certains apparentés, ainsi que la survenue tardive ou segmentaire des lésions.

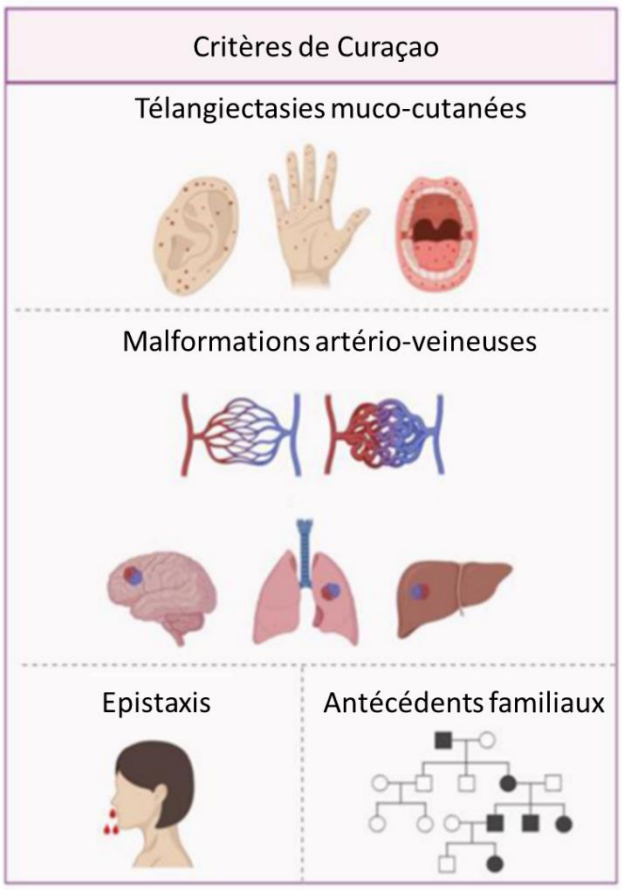


Figure 20. Diagnostic de l'HHT selon les 4 critères de Curaçao.

Ces critères comprennent : la présence de télangiectasies muco-cutanées (oreilles, mains, nez, bouche et tube digestif), des malformations artérioveineuses dans des organes viscéraux tels que le cerveau, les poumons et le foie, des épistaxis récurrentes, et des antécédents familiaux de la maladie. (Figure adaptée de [101]).

2.5. Traitement de la maladie HHT

Les traitements actuellement proposés visent principalement à réduire la fréquence et l'intensité des manifestations hémorragiques en particulier les épistaxis et les saignements digestifs, sans toutefois corriger les anomalies vasculaires. Ces approches ne sont donc pas curatives et ne permettent pas de restaurer une vascularisation normale.

2.5.1. Traitements actuels

Les épisodes d'épistaxis, fréquents et souvent prolongés chez les patients atteints de l'HHT, peuvent avoir un impact psychosocial majeur. Ils sont également une cause importante d'anémie ferriprive. La prise en charge repose sur une approche graduée, adaptée à la sévérité des symptômes et aux besoins spécifiques de chaque patient.

En première ligne, des mesures locales visent à protéger et hydrater la muqueuse nasale, notamment par des lavages au sérum physiologique, l'application de pommades grasses et l'éviction des facteurs irritants [102]. En cas de persistance des saignements, un traitement par acide tranexamique administré par voie orale peut être proposé, son efficacité a été démontrée par des essais contrôlés [105]. En troisième ligne, des traitements interventionnels peuvent être proposés, tels que la photocoagulation laser (Nd:YAG ou diode), la

radiofréquence... Ces approches offrent un soulagement temporaire, mais nécessitent souvent des répétitions.

Par ailleurs, afin de compenser les pertes sanguines chroniques, une supplémentation en fer, voire des transfusions de globules rouges, peut s'avérer nécessaire.

La prise en charge des MAV pulmonaires vise à prévenir les complications hémorragiques ou emboliques graves. Leur traitement repose principalement sur l'embolisation percutanée, qui permet d'occlure les communications artérioveineuses tout en préservant le parenchyme pulmonaire [23, 106].

Dans les cas de complications hépatiques graves, la transplantation hépatique orthotopique peut être envisagée [107].

2.5.2. Futurs traitements

Les avancées récentes dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques de la maladie, notamment grâce aux modèles précliniques et aux essais cliniques, ont ouvert la voie à de nouvelles stratégies thérapeutiques. Celles-ci visent principalement à corriger l'angiogenèse pathologique, caractéristique de l'HHT, par l'utilisation de traitements anti-angiogéniques ciblant des voies de signalisation clés, telles que le VEGF (Figure 21) [87].

Le bévacizumab, un anticorps monoclonal anti-VEGF, représente la molécule la plus prometteuse à ce jour. Des études ont montré que l'administration intraveineuse de bévacizumab permet une réduction significative de la fréquence et de la gravité des épistaxis, une amélioration de l'anémie, ainsi qu'une diminution des besoins transfusionnels et des apports en fer (Figure 21) [108, 109]. Son efficacité a également été rapportée dans les formes sévères de MAV hépatiques, avec une amélioration du débit cardiaque et des signes d'insuffisance hépatique chez certains patients [110, 111].

Cependant, malgré ces résultats encourageants, l'administration intraveineuse de bévacizumab reste complexe, nécessitant des perfusions répétées et pouvant s'accompagner d'effets secondaires importants. Ainsi, les chercheurs sont orientés vers d'autres agents anti-angiogéniques, en particulier les inhibiteurs oraux de tyrosine kinases, capables d'agir sur les récepteurs VEGF et d'autres voies pro-angiogéniques. Parmi ces traitements, le pazopanib a également montré des résultats prometteurs dans la prise en charge des saignements liés à HHT [112]. Quant au nintédanib, qui cible les récepteurs du facteur de croissance plaquettaire (PDGF) et du VEGF, il a été utilisé chez un patient atteint d'HHT2 souffrant également de fibrose pulmonaire, avec des résultats encourageants, notamment une réduction significative du score de gravité des épistaxis [23, 113].

Par ailleurs, les dérèglements de la voie PI3K/AKT/mTOR, impliquée dans la survie et la prolifération des cellules endothéliales, ont été identifiés comme un mécanisme clé dans la formation des malformations vasculaires de l'HHT [114]. En conséquence, des inhibiteurs de

cette voie, notamment le sirolimus (rapamycine), ont été testés avec succès chez certains patients, entraînant également une réduction des épistaxis, une amélioration des taux d'hémoglobine et une diminution des besoins en transfusion [115, 116]. Des essais cliniques ont démontré que le tacrolimus, en administration topique ou systémique, pouvait également restaurer l'activité de la voie BMP, en particulier en réactivant la signalisation ALK1/ENG dépendante, altérée chez les patients atteints de l'HHT [117]. Le tacrolimus libère les récepteurs ALK1 de leur inhibiteur (en se liant à la FKBP12), permettant ainsi la phosphorylation des protéines SMAD1/5/8 et la reprise de la différenciation endothéliale normale [118]. Un cas clinique récent a rapporté qu'un traitement oral à faible dose de tacrolimus a permis une amélioration des épistaxis chez un patient atteint de l'HHT2 [119].

D'autres molécules, ont également été explorées : La thalidomide [117] et la pomalidomide [120], ont montré des résultats prometteurs grâce à leur effet anti-angiogénique. De nouveaux agents, tels que le VAD044, inhibiteur d'AKT et le buparlisib, un inhibiteur de PI3K, sont en cours d'évaluation. L'aflibercept, un piégeur de VEGF, ainsi que l'anticorps anti-Ang2 LC10, ciblent spécifiquement la voie VEGF/Angiopoïétine et représentent également des pistes thérapeutiques prometteuses [87].

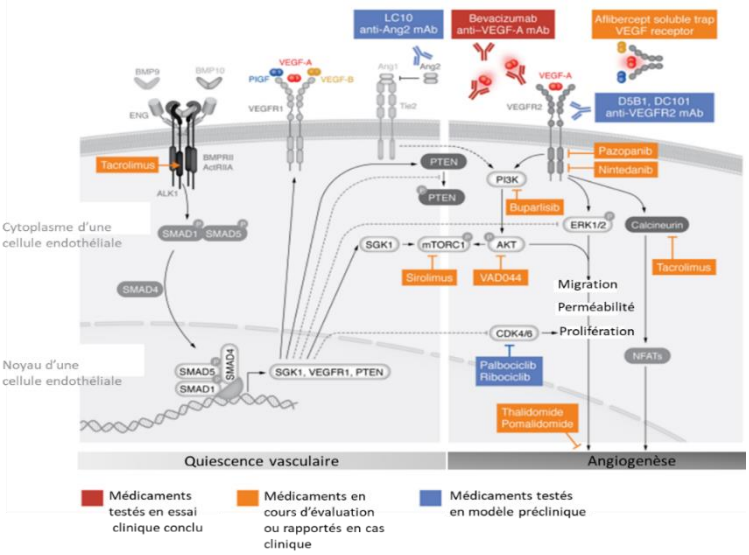


Figure 21. Cibles thérapeutiques des médicaments anti-angiogéniques évalués dans l'HHT.

Les traitements ciblent principalement la voie VEGFA, via des anticorps neutralisants (bévacizumab) ou des récepteurs solubles pièges (aflibercept). Certains inhibiteurs de tyrosine kinase (pazopanib, nintedanib) bloquent plusieurs récepteurs (VEGFR, PDGFR, FGFR, c-KIT). Des inhibiteurs des voies intracellulaires (PI3K/AKT : VAD044 ; mTOR : sirolimus ; calcineurine : tacrolimus) ainsi que des agents immunomodulateurs (thalidomide, pomalidomide) ont également été évalués chez des patients HHT. D'autres candidats, tels que les anticorps anti-Ang2 (LC10) ou les inhibiteurs de CDK4/6 (palbociclib, ribociclib), n'ont pour l'instant été testés qu'en préclinique (Figure adaptée de [87]).

Chapitre 3 : BMP9/BMP10 /ALK1 : quiescence vasculaire et malformations artérioveineuses au cœur de la maladie HHT

Comme évoqué dans le chapitre précédent, les altérations de la voie de signalisation ALK1 jouent un rôle central dans la physiopathologie de la maladie HHT. Ces mutations perturbent la quiescence vasculaire et favorisent le développement de MAV, l'une des manifestations cliniques majeures de la maladie.

Dans ce chapitre, je présenterai les différents modèles animaux développés pour l'étude des mécanismes pathogéniques de l'HHT. Une attention particulière sera portée aux modèles ciblant spécifiquement la voie ALK1, dont les mutations sont à l'origine de l'HHT. Ces modèles constituent des outils expérimentaux indispensables pour mieux comprendre le rôle de cette voie dans le maintien de l'intégrité vasculaire, ainsi que dans la formation et la progression des anomalies vasculaires propres à cette pathologie.

3.1. Sites d'expression du récepteur ALK1

Le rôle d'ALK1 dans la physiopathologie de l'HHT a été progressivement élucidé grâce à des recherches approfondies menées depuis les années 1990.

En 1996, Panchenko et ses collaborateurs ont été les premiers à mettre en évidence l'expression restreinte d'*Alk1* dans les cellules endothéliales tapissant les vaisseaux sanguins de la plupart des organes des rats adultes (Poumons, Aorte, Veine Cave …) [121]. La même année, Johnson D.W. a identifié des mutations du gène *ACVRL1*, codant pour ALK1, chez des patients atteints de la maladie HHT2 [81].

En 1997, Roelen A.J. et ses collègues ont analysé l'expression de l'ARNm d'*Alk1* à différents stades du développement embryonnaire de la souris. ALK1 est détecté à partir de E6,5 dans l'embryon. À E7,5-E8,5, son expression est localisée aux sites de vasculogenèse dans les tissus embryonnaires et extra-embryonnaires, notamment dans les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins et des cellules trophoblastiques. Une forte expression d'ALK1 est retrouvée dans l'endothélium vasculaire de nombreux tissus entre E9,5 et E12,5 [122]. En revanche, dans l'endothélium adulte quiescent, son expression est réduite. Par ailleurs, elle est plus marquée dans les artères et prédominante dans les poumons par rapport au foie [123, 124].

ALK1 interagit avec son corécepteur l'endogline, dont l'expression, lors des premiers stades de l'angiogenèse, suit un profil similaire à celui d'ALK1, montrant une coopération fonctionnelle essentielle au développement du réseau vasculaire. Par contre, dans

l'endothélium adulte, l'endogline est majoritairement retrouvée dans les veines et plus faiblement exprimée dans les cellules endothéliales des poumons, des intestins, du cerveau et de la peau, tandis qu'elle demeure élevée dans le foie [125].

En dehors des cellules endothéliales, l'endogline est également exprimée par diverses cellules du système immunitaire, telles que les macrophages, les lymphocytes T et les mastocytes. De plus, ALK1 est retrouvé dans les macrophages résidents du foie, appelés cellules de Kupffer [126] et a été décrite dans le système nerveux central [127].

3.2. Découverte et caractérisation des ligands d'ALK1

ALK1 a été identifié comme un récepteur appartenant à la famille du TGFβ. Des études préliminaires ont suggéré une possible interaction entre ALK1 et ALK5, en particulier grâce à des expériences utilisant des récepteurs chimériques associant le domaine extracellulaire d'ALK1 au domaine intracellulaire d'ALK5. Ces récepteurs hybrides ont montré une activation de la voie Smad2/3 en réponse au TGFβ1, au TGFβ3, ainsi qu'au sérum humain [128]. Cependant, l'utilisation d'un anticorps anti-TGFβ n'a pas inhibé l'action du sérum, suggérant la présence d'un ligand différent du TGFβ dans le sérum. Des recherches ultérieures, notamment celles de Seki et al., ont révélé que l'expression d'ALK1 est principalement localisée dans les cellules endothéliales, tandis qu'ALK5 est majoritairement exprimé dans les cellules musculaires lisses. Cette localisation cellulaire spécifique remettait en question la possibilité d'une interaction directe entre *Alk1* et *Alk5* in vivo [129]. Par ailleurs, l'équipe de Paul Oh a observé un phénotype vasculaire sévère chez des souris invalidées pour *Alk1*, suite à l'expression de la recombinase Cre sous le contrôle du promoteur d'*Alk1 ''L1''* qui est activé après E10,5 et dont son expression est variable en fonction de l'organe : forte dans les cellules endothéliales des poumons, des intestins, du placenta et du sac vitellin, plus faible dans les cellules endothéliales du cerveau, du cœur et du rein et nulle dans le foie, la peau et les membres. En revanche, l'invalidation d'*Alk5* via ce même promoteur n'a entraîné aucun phénotype apparent, renforçant l'idée que ces deux récepteurs remplissent des fonctions distinctes dans le développement vasculaire et que le TGF-β ne peut pas être le ligand principal d'ALK1 [130].
En 2007, notre équipe a démontré que BMP9 et BMP10, et non TGFβ, activent l'élément de réponse aux BMP (BRE) du promoteur d'*ID1*. Cette activation est inhibée par la délétion d'*ALK1*, confirmant que BMP9 et BMP10 sont les ligands spécifiques de ce récepteur. De plus, l'inhibition simultanée des récepteurs BMPRII et ActRIIA bloque cette réponse, mettant en évidence leur coopération essentielle avec ALK1 pour transduire le signal induit par BMP9/10 [131]. En effet, un dimère d'ALK1 s'associe à un dimère de BMPRII, d'ActRIIA ou d'ActRIIB pour se lier à BMP9 ou BMP10 et initier la signalisation intracellulaire. L'endogline agit comme un co-récepteur amplifiant la signalisation et n'est pas indispensable à l'activation de cette voie de signalisation. Ce résultat a été par la suite confirmé par le groupe de P ten Dijke [132].

BMP9 présente une forte affinité pour ALK1 et ActRIIA, mais une affinité plus faible pour BMPRII et encore plus faible pour ActRIIB. En revanche, BMP10 présente la même affinité pour ces trois récepteurs de type II. L'expression de BMPRII est significativement plus élevée dans l'endothélium par rapport aux récepteurs ActRIIA et ActRIIB.

C'est ainsi que les chercheurs ont pu aboutir à la caractérisation de la voie de signalisation d'ALK1, déjà présentée dans le chapitre 1 (Figure 17).

Dans un second temps, les chercheurs se sont intéressés à son rôle dans l'induction de la quiescence vasculaire, en commençant par des études *in vitro*, avant de développer divers modèles animaux pour explorer ses fonctions *in vivo*.

3.3. Rôle de la voie BMP9/BMP10/ALK1 dans l'induction de la quiescence vasculaire *in vitro*

Les cellules endothéliales, bien que présentant des morphologies variées selon leur localisation et leurs fonctions spécifiques dans les différents tissus, partagent une caractéristique essentielle : leur maintien dans un état de quiescence chez l'adulte. Ce phénomène est crucial pour préserver la stabilité et l'intégrité des vaisseaux sanguins dans des conditions physiologiques normales. La quiescence endothéliale se caractérise par une prolifération et une migration cellulaires limitées ou absentes.

Le maintien de cet état de quiescence est activement régulé par des voies de signalisation spécifiques, parmi lesquelles la voie BMP9/BMP10/ALK1 joue un rôle prépondérant [12].

3.3.1. Rôle sur la prolifération et la migration des cellules endothéliales

En 2002, Lamouille et al. ont démontré que l'activation d'ALK1 (obtenue à l'aide d'une forme mutée constitutivement active) inhibait la migration et la prolifération des cellules endothéliales microvasculaires humaines dérivées du derme (HMVEC-d), des poumons (HMVEC-l), de la veine ombilicale humaine (HUVEC) et de cellules endothéliales microvasculaires humaines (HMEC-1) [133]. En 2007, David et al. ont montré que BMP9 inhibe la migration et la prolifération des HMVEC-d. L'ajout de BMP9 (10 ng/mL) réduit la migration des HMVEC-d dans un test de fermeture de blessure. De plus, l'ajout de la forme extracellulaire soluble d'ALK1 (ALK1ecd) bloque cette inhibition, indiquant que ces effets du BMP9 sont spécifiquement médiés par ALK1. Concernant la prolifération, le traitement au BMP9 a diminué la croissance des HMVEC-d, et cette inhibition a également été neutralisé par l'ajout d'ALK1ecd, confirmant le rôle inhibiteur d'ALK1 sur la prolifération [131].

En 2008, Li B et al. ont confirmé l'effet inhibiteur d'ALK1 sur la prolifération et la migration des cellules endothéliales des capillaires rétiniens humains, validant ainsi son rôle régulateur négatif dans l'angiogenèse rétinienne [134] .

Bien que longtemps débattu, le rôle d'ALK1 dans l'inhibition de la régulation de la prolifération et de la migration des cellules endothéliales est maintenant l'hypothèse principale [135].

3.4. Modèles *in vivo* pour l'étude du rôle d'ALK1 dans le remodelage vasculaire et la formation des malformations artérioveineuses associées à l'HHT

Les données *in vitro* ont clairement révélé l'implication d'ALK1 dans la régulation de la quiescence vasculaire et des fonctions endothéliales. Cependant, ces résultats, bien que fondamentaux, ne peuvent saisir la complexité des interactions biologiques et des processus physiopathologiques dans un organisme vivant. C'est pourquoi il est crucial d'étudier le rôle d'ALK1 *in vivo*, où l'intégrité des tissus et la dynamique cellulaire peuvent être observées dans leur contexte physiologique plus réel.

Suite à la découverte du rôle en tant que facteur causal dans l'HHT, les chercheurs ont développé des modèles animaux de délétion de ce gène, de son corécepteur ou de l'inhibition de ses ligands afin de mieux comprendre les complications pathologiques associées à cette maladie.

En 2000, Oh et al. ont développé un modèle murin homozygote *Alk1 -/-* (Tableau 1). Chez ces embryons, la vasculogenèse initiale s'effectue normalement, ce qui suggère qu'*Alk1* n'est pas requis pour la formation du plexus vasculaire primitif. Toutefois, à partir des stades E10,5 à E11,5, des anomalies vasculaires sévères apparaissent, caractérisées par une fusion excessive des plexus capillaires en vaisseaux dilatés, une surexpression de facteurs pro-angiogéniques, ainsi qu'un déficit du recrutement des cellules musculaires lisses périvasculaires [136] (Figure 22). De plus, ces souris développent des MAV caractérisées par la formation de shunts directs entre les artères et les veines, perturbant ainsi la circulation sanguine normale et contribuant aux anomalies vasculaires létales observées à ce stade du développement [137]. Les souris *Eng -/-* présentent des phénotypes létaux similaires [138, 139].

Génotype	Méthodes / Cre utilisée	Age d'étude	Phénotype	Références
Alk1 -/- ; Eng -/-	Délétion homozygote transmise par la lignée germinale	E10,5-11,5	Létal, anomalies vasculaires sévères, déficit de recrutement des vSMC	[136–140]
Alk1 +/- ; Eng +/-	Délétion hétérozygote transmise par la lignée germinale	Postnatal +Adultes	Viable Télangiectasies (foie, nez, peau, Intestins) Saignements de nez Faible diminution du recouvrement de vSMC	[140–143]
(L1-Cre) *Alk1 $^{flox/flox}$* (*Rosa26 -Cre^{ER}*) *Alk1 $^{flox/flox}$*	Constitutif : *L1-Cre* (CE) Inductible : *R26-Cre^{ER}* (toutes les cellules)	Postnatal Adultes	Postnatal : Mortalité à P5 + AVM poumons, cerveaux, tractus gastro-intestinal Adultes : Mortalité 9 à 21 jours après délétion + Hémorragies pulmonaires, gastro-intestinales + AVM après blessures	[144]
(Cdh5-Cre^{ERT2}) Eng$^{flox/flox}$	Inductible : *Cdh5-Cre^{ERT2}* (CE)	Postnatal Adultes	Postnatal : AVM dans la rétine, faible recouvrement péricytaire, prolifération des CE + perte de marqueurs artériels et veineux Adultes : Veines sous-cutanées élargies, adjacentes aux Matrigel plugs contenant VEGF et FGF.	[145]
(Cdh5-Cre^{ERT2}) Alk1$^{flox/flox}$	Inductible : *Cdh5-Cre^{ERT2}* (CE)	Postnatal Adultes	Postnatal : Mortalité après 48h + AVM dans la rétine, faible recouvrement péricytaire, prolifération des CE, perte de marqueurs artériels, hémorrhagies pulmonaires. Adultes : mortalité après 11 jours + hémorragies intestinales sans effet sur la vascularisation rétinienne.	[146]
BMP9 -/- + Anti BMP10 en postnatal		Postnatal	Hypervascularisation dans la rétine	[147]
(Bmx(PAC)-Cre^{ERT2}) Alk1$^{flox/flox}$	Inductible : *Bmx(PAC)-Cre^{ERT2}* (CE artérielle)	Postnatal (P7, P13, P19)	Microhémorragies cérébrales multifocales, Vaisseaux tortueux et dilatés, perte du marqueur artériel *Efnb2,* désorganisation des cellules musculaires lisses	[148]
(Cdh5-Cre^{ERT2}) Alk1$^{flox/flox}$	Inductible : *Cdh5-Cre^{ERT2}* (CE) + Injection BMP9/10 (Postnatal P2 à P5)	Postnatal	AVM dans le tractus gastro-intestinal et la rétine	[114]
(SM22α-Cre) Eng $^{flox/flox}$	Inductible : *SM22α-Cre* (vSMC + CE)	Postnatal	AVM cérébrales, spinales et intestinales, mortalité >50% avant 6 semaines	[149]
WT	Transfert des anticorps anti-BMP9/10 au nouveau-né via l'allaitement après injection maternelle.	Postnatal	Hypervascularisation anormale de la rétine	[150]
(Scl-Cre^{ER}) Alk1 $^{flox/flox}$ *(Scl-Cre^{ER}) Eng $^{flox/flox}$*	Inductible : *Scl-Cre^{ER}* (CE)	Adultes	Mortalité entre 9 et 10 jours, AVM dans les zones blessées	[151]
(Pdgfb-Cre^{ER}) Alk1 $^{flox/flox}$	Inductible : *Pdgfb-Cre^{ER} (*CE)	Adultes	MAV cérébrales après stimulation par le VEGF, hémorragies pulmonaires	[152]

Tableau 1. Invalidation des Gènes Alk1, Eng et Bmp9/10, et conséquence sur le développement vasculaire.

(Ce tableau ne présente qu'une sélection de modèles animaux décrits dans le document et n'est pas exhaustif).

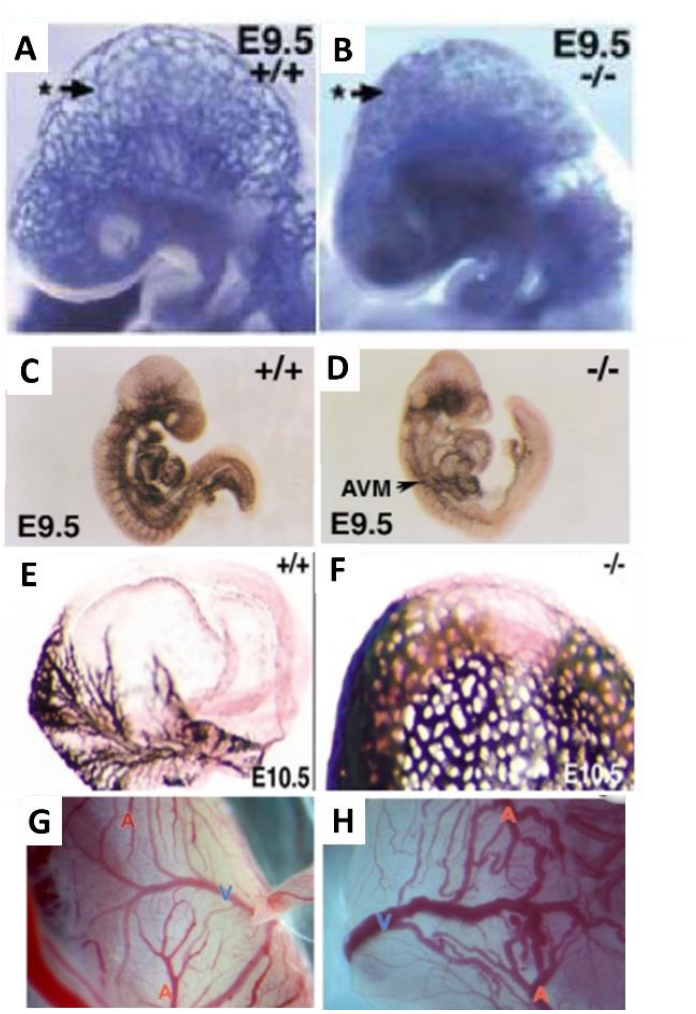


Figure 22. La délétion d'Alk1 entraîne une létalité embryonnaire précoce liée à un défaut de remodelage vasculaire.

A,B : Vascularisation de la région céphalique : absence de réseau capillaire chez les embryons Alk1 -/- [136].
C,D : Shunt artérioveineux accompagné d'une dilatation de la veine cardinale commune (CCV) chez les embryons Alk1 -/- [137].
E,F : L'injection d'encre dans les sacs vitellins révèle un réseau artériel bien structuré chez les embryons WT, Cependant chez les embryons Alk1 -/-, le développement vasculaire est bloqué au stade de plexus capillaire primaire [137].
G, H : Dans le sac vitellin témoin, les artères et les veines sont bien séparées par un réseau de capillaires. En revanche, chez les embryons Alk1 -/- , ce réseau capillaire est perturbé, entraînant une connexion anormale entre les artères et les veines accompagnée d'une dilatation des vaisseaux [130].

3.4.1. Souris hétérozygotes

En 2003, pour surmonter la létalité embryonnaire observée chez les souris homozygotes, les chercheurs ont eu recours à des modèles hétérozygotes. Les souris *Alk1 +/-* sont viables mais développent des lésions vasculaires dans plusieurs organes (Tableau 1). Les premières manifestations se caractérisent par l'apparition des anomalies vasculaires cutanées, notamment des télangiectasies dans le lit des ongles, caractérisées par une rougeur accrue et des hémorragies sous les ongles. Certaines souris présentent également des vaisseaux dilatés au niveau des pattes et des oreilles. Des anomalies vasculaires muco-cutanées sont également identifiées, en particulier des télangiectasies de la langue et de la muqueuse orale, associées parfois à des saignements spontanés des gencives (Figure 23 A, C, F). Outre les atteintes externes, des souris *Alk1 +/-* développent des MAV et des lésions hémorragiques dans plusieurs organes internes, notamment les poumons, la rate, l'intestin et le cerveau. Ces lésions se caractérisent par la présence de vaisseaux dilatés aux parois fines, fréquemment associés à des foyers hémorragiques et à une fibrose tissulaire. L'implication hépatique est particulièrement marquée chez 8/47 des souris *Alk1 +/-*, avec une dilatation sinusoïdale et,

dans certains cas, une hypertrophie hépatique sévère associée à une hémorragie chronique (Figure 23 K). Par ailleurs, ces souris présentent des saignements gastro-intestinaux récurrents [141]. Bien que ces symptômes soient similaires à ceux observés chez les patients atteints de l'HHT, ils ne sont observés que chez 40 % des cas et n'apparaissent qu'à partir de 7 mois, ce qui pourrait correspondre à l'apparition tardive des symptômes chez les patients.

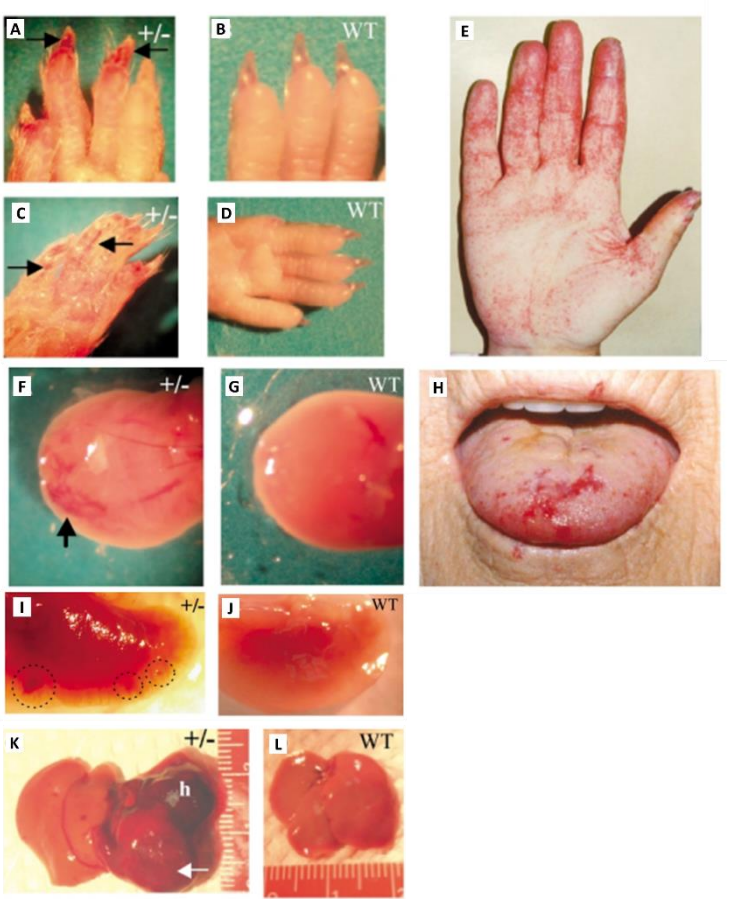


Figure 23. Phénotypes vasculaires cutanés et viscéraux chez les souris Alk1 +/- comparables à ceux des patients atteints d'HHT.

Télangiectasies dans le lit des ongles, de la langue des souris Alk1+/- (A, C, F), WT (B, D, G) et chez les patients HHT (E, H) Lésions vasculaires chez les poumons des souris Alk1 +/-. Présence de zones hémorragiques dans les poumons d'une souris hétérozygote Alk1 +/- (indiqués par des cercles) (I) et absents dans les poumons des souris WT (J). Une hépatomégalie, et des foyers hémorragiques sont visibles dans un lobe hépatique anormal (flèche blanc) d'une souris Alk1 +/- (K, L) [141].

Les souris hétérozygotes pour le gène Endogline *(Eng +/-)* présentent un phénotype vasculaire comparable. Ces souris, bien que viables, développent des anomalies vasculaires avec des veinules postcapillaires dilatées et des parois vasculaires anormales souvent dépourvues de cellules musculaires lisses conduisent à une tendance aux hémorragies chroniques, de la même manière que chez les patients HHT. Il est essentiel de souligner que le fond génétique joue un rôle déterminant dans l'expression du phénotype HHT chez les souris hétérozygotes. Ainsi, chez les souris avec un fond génétique 129/Ola, 50 % des souris *Eng +/-* présentent des télangiectasies dès l'âge de 7 mois et 30 % manifestent des épisodes d'épistaxis. En revanche, sur un fond mixte C57BL/6 – 129/Ola, seuls 4 sur 227 animaux montrent des saignements de nez, et 14 sur 227 des télangiectasies. Enfin, dans un contexte génétique combinant CD1 – C57BL/6 – 129/Ola, aucune souris ne présente de symptômes cliniques [140, 142]. Ces

observations indiquent que le fond 129/Ola est particulièrement sensible aux perturbations induites par l'haploinsuffisance d'Endogline, suggérant ainsi que des facteurs génétiques modificateurs influencent également la gravité de la maladie chez les patients.

Au-delà des facteurs génétiques, les chercheurs ont également examiné l'impact des facteurs environnementaux sur l'évolution de la maladie. Ainsi, Xu et al., Hao et al. ont montré que des souris hétérozygotes pour *Eng* et *Alk1*, âgées de 8 à 10 semaines et issues du fond génétique C57BL/6 qui ne présentent généralement aucune anomalie vasculaire avant plusieurs mois, ont développé une dysplasie cérébrovasculaire après administration locale dans leur cerveau de vecteurs viraux codant le VEGF, tandis que les souris de type sauvage (WT) traitées avec les mêmes vecteurs ont montré une angiogenèse normale [153, 154]. Ces résultats suggèrent que des facteurs environnementaux, tels que l'activation excessive du VEGF qui peut être due à des facteurs tels que l'ischémie, le traumatisme, l'inflammation et les tumeurs, peuvent exacerber les défauts vasculaires associés à l'haploinsuffisance. De plus, l'inflammation induite par le dextran sulfate de sodium (DSS) entraîne une colite chronique avec une angiogenèse anormale, caractérisée par une prolifération excessive et désorganisée des vaisseaux sanguins chez les souris *Eng +/-,* tandis que les WT retrouvent progressivement un état normal après la phase aigue [155].

En se basant sur ces observations, les auteurs ont commencé à introduire l'hypothèse du second hit qui implique que la mutation germinale (premier hit) prédispose l'endothélium à des anomalies vasculaires, qui ne se développent que sous l'effet de facteurs supplémentaires (second hit), environnemental ou génétique. Cela est d'autant plus pertinent que des patients présentant la même mutation peuvent manifester des symptômes très variables, suggérant que des éléments extérieurs influencent la sévérité et l'évolution de la maladie. Toutefois, le modèle murin hétérozygote s'est révélé insuffisant pour l'étude des mécanismes physiopathologiques liés à HHT, en raison de la faible fréquence et de l'apparition tardive des phénotypes vasculaires. Pour surmonter ces limites, les chercheurs ont généré des souris présentant une délétion génique spécifique à un type cellulaire, de manière inductible ou constitutive, ce qui permet un contrôle spatio-temporel précis de l'inactivation du gène.

En effet, dans les modèles inductibles, la Cre recombinase, est fusionnée au domaine modifié du récepteur aux œstrogènes (Cre-ERT2) et exprimée sous le contrôle d'un promoteur spécifique à un type cellulaire. Cette enzyme est activée par le tamoxifène qui se lie à ERT2 (Récepteur de l'œstrogène T2), cela induit un changement de localisation de l'enzyme Cre qui est transloquée dans le noyau, lui permettant de cliver spécifiquement le gène flanqué entre deux sites loxP. Ainsi, l'injection du tamoxifène permet d'induire la délétion spécifique et à un âge défini.

3.4.2. Modèles murins conditionnels : délétion spécifique dans un type cellulaire, constitutive ou inductible

3.4.2.1. Postnatal

En 2009, Park et al. ont réalisé une délétion spécifique du gène *Alk1* floxé entre 2 sites *loxP* dans les cellules endothéliales, en utilisant le système L1-Cre, correspondant au promoteur d'*Alk1*, actif spécifiquement dans l'endothélium, est exprimé à un stade tardif de l'embryogenèse (vers E10,5). Cette inactivation ciblée a conduit à une mortalité précoce des souris, autour du cinquième jour postnatal (P5). Les auteurs ont procédé à l'injection de latex bleu dans le ventricule gauche du cœur des souris à P3, afin d'évaluer la structure du réseau vasculaire. En conditions physiologiques, ce traceur reste confiné au compartiment artériel et ne traverse pas les capillaires. Ainsi, la présence de latex dans les veines ou dans des zones vasculaires anormalement dilatées révèle l'existence de shunts artérioveineux, indiquant une communication pathologique entre les compartiments artériel et veineux, typique des malformations observées dans la HHT.

Chez ces souris présentant une délétion ciblée d'*Alk1* dans l'endothélium, les vaisseaux situés à la surface du cerveau, dans les poumons et au niveau du tractus gastro-intestinal apparaissent dilatés, désorganisés et tortueux (Figure 24). La diffusion du latex dans les veines de ces organes confirme la présence de shunts artérioveineux suite à la délétion d'*Alk1* [144].

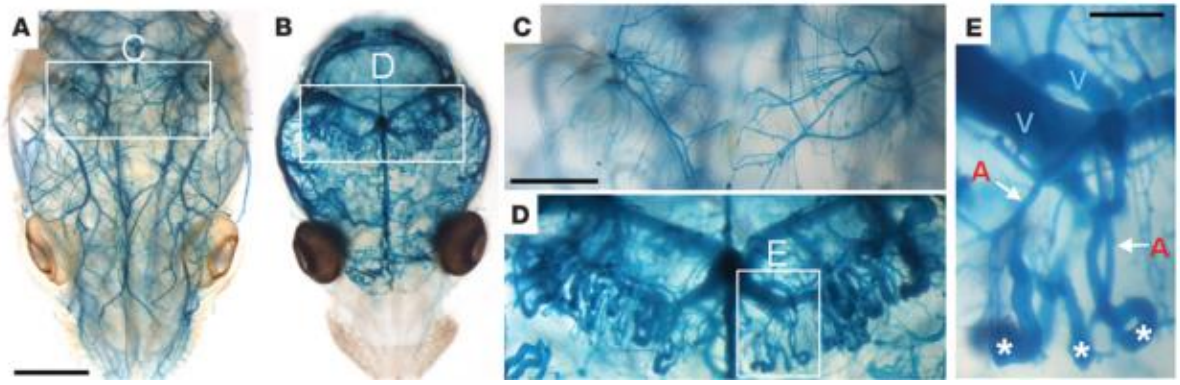


Figure 24. La délétion d'Alk1 dans les cellules endothéliales entraîne une létalité post-natale précoce (à P5) avec des malformations artérioveineuses dans des organes vitaux.

Diffusion du latex dans les veines du cerveaux des souris (L1-Cre) Alk1 $^{flox/flox}$ (B, D, E) avec formations des shunts signalés par des astérisques (E) alors que chez les WT (A, C) le colorant reste confiné dans les artères [144].

Ces observations ont révélé les conséquences majeures de la perte d'*Alk1* sur l'architecture vasculaire, mettant en lumière la nécessité d'approfondir la compréhension des mécanismes impliqués.

Pour cela en 2010, Mahmoud et al. ont développé un modèle murin dans lequel la délétion du gène est induite par injection de tamoxifène.

Ils ont tout d'abord étudié le rôle de l'endogline dans l'endothélium. Ils ont utilisé des souris transgéniques exprimant la Cre recombinase sous le contrôle du promoteur *Cdh5(PAC)-Cre^{ERT2}* (Tableau 1). *Cdh5* code pour la VE-cadhérine (Cadhérine 5), une protéine d'adhérence spécifiquement exprimée par les cellules endothéliales. Ce promoteur assure donc une expression ciblée de la Cre recombinase exclusivement dans l'endothélium après injection de tamoxifène. Ils ont utilisé le modèle de rétine néonatale, largement reconnu pour l'étude de l'angiogenèse postnatale. Les vaisseaux rétiniens se forment dès le premier jour de vie (P1) autour du nerf optique, puis s'étendent radialement vers la périphérie jusqu'au huitième jour (P8), formant un réseau vasculaire structuré, caractérisé par une alternance régulière d'artères et de veines, séparées par un réseau capillaire (Figure 25).

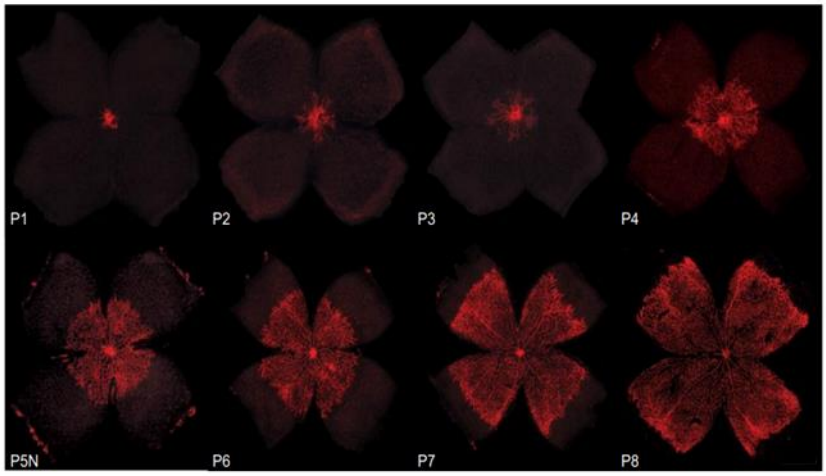


Figure 25. Développement du plexus vasculaire dans les rétines de souris C57BL/6.

Marquage isolectine B4 de l'endothélium de rétine des souris de P1 à P8. Le plexus s'étend radialement de la tête du nerf optique vers la périphérie de la rétine à P8 [156].

Chez les souris inductible *(Cdh5-Cre^{ERT2}) Eng$^{flox/flox}$*, ce développement vasculaire est profondément perturbé. Les auteurs ont confirmé un retard d'angiogenèse, une prolifération excessive des cellules endothéliales, ainsi qu'un élargissement anormal des veines. Par ailleurs, les connexions artérioveineuses présentaient un phénotype veineux et une muscularisation accrue (à partir de P6) indiquant une altération des processus de spécification et de maturation vasculaire [145].

Ce groupe a ensuite reproduit l'étude chez des souris invalidées pour *Alk1* et a révélé un phénotype comparable, avec la présence de MAV exprimant le marqueur veineux *EphB4* (Figure 26). Néanmoins, une réduction significative de la phosphorylation de Smad1/5 n'a été observée que dans les rétines inductible *(Cdh5-Cre^{ERT2}) Alk1$^{flox/flox}$*, ce qui soutient l'idée que l'endogline joue principalement un rôle de corécepteur facilitant l'interaction des ligands BMP9/10 avec ALK1, plutôt que d'intervenir directement dans la transduction du signal [146].

En 2012, notre équipe a exploré l'effet de l'inhibition de ses principaux ligands, BMP9 et BMP10. À cette fin, un anticorps neutralisant BMP10 a été administré en période postnatale

à des souris *Bmp9 -/-*.Cette double inhibition des ligands d'ALK1, a révélé un défaut marqué de remodelage vasculaire postnatal au niveau de la rétine, se traduisant par une expansion radiale vasculaire réduite et une densité vasculaire accrue [147] (Figure 26). Ce phénotype est également observé chez les souris nouveau-nées dont les mères ont reçu une injection d'anticorps neutralisants dirigés contre BMP9 et BMP10, transmis aux souriceaux par voie trans-mammaire, c'est-à-dire via le lait maternel pendant l'allaitement [150].

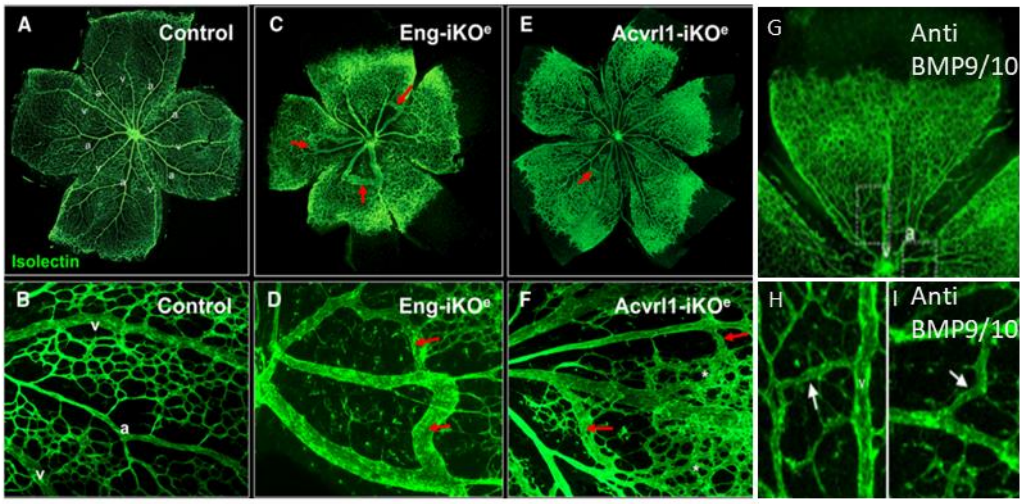


Figure 26. La délétion d'Alk1 (à P4), d'endogline (à P2) ou la neutralisation des ligands (à P3) (anti-BMP9/10) entraîne des malformations artérioveineuses dans la rétine des souris nouveau nées.

Marquage isolectine des rétines des souris à P7 montrant un développement normal du plexus vasculaire où les artères et les veines sont liés par des capillaires, et des connexions anormales entre artères et veines générant de multiples MAV (flèches rouges et blancs) suite à la délétion d'endogline, d'Alk1 dans les cellules endothéliales ou inactivation de Bmp9 et Bmp10. Figure adaptée de [145, 146, 150].

Ces résultats confirment le rôle central du récepteur ALK1, de ses cofacteurs, ainsi que ses ligands BMP9 et BMP10, dans la régulation fine de l'angiogenèse postnatale. Leur perturbation, que ce soit au niveau du récepteur, du co-récepteur ou des ligands, entraîne des anomalies similaires du développement vasculaire, notamment au niveau de la rétine, un modèle très sensible pour l'étude du remodelage vasculaire.

Les études sur la rétine ont permis de mettre en lumière les premiers rôles de la signalisation d'ALK1 dans le remodelage vasculaire postnatal, tandis que d'autres travaux ont révélé son importance cruciale dans la vascularisation des organes vitaux [144]. De leur côté, Zhang et al. ont utilisé le système *Bmx(PAC)-Cre^{ERT2}* pour induire spécifiquement la délétion d'*Alk1* dans les cellules endothéliales artérielles. Après administration de tamoxifène aux jours postnataux P2 et P5, plusieurs phénotypes pathologiques ont été observés à différents stades : des microhémorragies cérébrales multifocales dès P7, une perte du marqueur artériel *Efnb2* à P13, ainsi que des vaisseaux tortueux et dilatés, et une désorganisation des cellules musculaires

lisses à P19 [148]. Cela est renforcé par les travaux d'Ola et al., qui ont observé des MAV intestinales dès P5 chez des souris invalidées pour *Alk1* (par injection de tamoxifène de P0 à P5) spécifiquement dans les cellules endothéliales (*Cdh5-Cre*^{ERT2}), soulignant l'importance critique de cette voie de signalisation dans la prévention des dérégulations vasculaires postnatales [114]. De manière complémentaire, Chalot et al. ont montré que la létalité précoce des souris invalidées pour *Alk1* est liée à l'apparition de microhémorragies pulmonaires [146] (Figure 27).

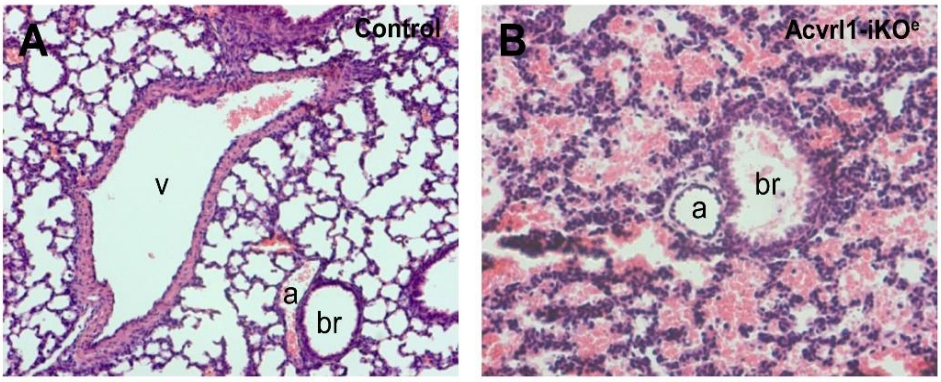


Figure 27. La délétion d'Alk1 induit des hémorrhagies pulmonaires à P6.

La coloration H&E révèle une diffusion de sang dans les alvéoles pulmonaires des souris Alk1 KO, traduisant une fuite vasculaire anormale.(a : artère, v : veine, br : bronchioles) [146].

Parallèlement, l'importance du co-récepteur endogline a été illustrée par une étude utilisant le promoteur *SM22α-Cre*, ciblant à la fois les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses. Cette délétion combinée entraîne la formation de MAV dans le cerveau postnatal, la moelle épinière et les intestins, conduisant à une mortalité élevée (plus de 50 % avant 6 semaines) [149] (Tableau 1). Afin de montrer l'importance des ligands dans cette voie de signalisation, l'administration postnatale d'anticorps neutralisants dirigés contre BMP9 et BMP10 à P5 a suffi à induire la formation des MAV dans le tractus gastro-intestinal [114]. Des études ont également mis en évidence l'implication des effecteurs intracellulaires de la voie ALK1. En particulier, la délétion postnatale induite de *Smad4* dans les cellules endothéliales chez la souris entraîne la formation des MAV, soulignant le rôle central de ce facteur de transcription dans la pathogenèse des MAV en tant qu'effecteur en aval du signal BMP9/10/ALK1 [157].

Ces travaux soulignent le rôle indispensable de la voie ALK1 dans l'établissement d'un réseau vasculaire fonctionnel dès les premiers jours de vie, et suggère qu'un déséquilibre précoce de cette signalisation peut compromettre l'intégrité vasculaire de plusieurs organes vitaux, contribuant à la formation des MAV observées dans HHT.

3.4.2.2. Souris adultes

Les modèles de souris nouveau-nées jouent un rôle crucial dans la compréhension des mécanismes de l'angiogenèse, ainsi que dans les premières étapes du remodelage vasculaire et la formation des MAV. Cependant les symptômes de la maladie et les complications vasculaires, s'aggravent avec l'âge d'où l'importance des modèles adultes pour explorer l'évolution de la pathologie dans un endothélium mature. Ces modèles permettent d'étudier l'interaction complexe entre les facteurs génétiques et environnementaux, ainsi que l'impact progressif des anomalies vasculaires sur les organes vitaux à long terme dans l'endothélium adulte.

Park et al. ont été les premiers à explorer la délétion ubiquitaire d'*Alk1* chez des souris adultes où les réseaux vasculaires sont déjà formés. La délétion inductible d'*Alk1* (*Rosa26-Cre^{ER}*) chez les souris âgées de 2 mois entraîne leur mort entre 9 et 21 jours [144]. Ces souris présentent des signes cliniques évocateurs d'hémorragies internes et d'anémie, tels que des extrémités pâles, une baisse de la pression partielle en oxygène (pO_2), des selles foncées, des hémorragies intestinales et pulmonaires avec une dilatation des veines et artères pulmonaires. Dans un autre volet de l'étude, des souris adultes ont été soumises à des blessures en plus de la délétion d'*Alk1*. Dans les zones lésées, des jonctions artérioveineuses directes se forment, caractérisées par des vaisseaux tortueux et dilatés. En revanche, aucune anomalie n'était observée chez les souris témoins blessées. Ces résultats confirment l'hypothèse du second hit, qui suggère que l'apparition des MAV résulte de l'interaction entre une prédisposition génétique, ici la délétion homozygote d'*Alk1*, et un facteur environnemental, tel que la présence de blessures [144].

En parallèle, une étude souligne l'implication d'*Alk1* dans la régulation de la perméabilité vasculaire chez des souris adultes dans les cellules endothéliales. A l'aide du bleu d'Evans (colorant lié à l'albumine ; en condition normale, il reste à l'intérieur des vaisseaux sanguins, sans diffusion vers les tissus environnants), une extravasation marquée est observée dans les rétines des souris dépourvues d'*Alk1*, traduisant une altération importante de la barrière endothéliale [158].
Notre équipe a ensuite induit la double délétion de BMP9/10 chez les souris adultes. Ils ont utilisé un modèle combinant une invalidation constitutive de *Bmp9* (*Bmp9 -/-*) et une délétion inductible de *Bmp10* dans toutes les cellules, grâce à l'expression ubiquitaire de *CreERT2* sous le contrôle du promoteur *Rosa26*. Ces souris présentent des anomalies vasculaires systémiques significatives, affectant divers organes vitaux [159]. Au niveau cardiaque, les souris double knock-out (DKO) présentent une hypertrophie associée à une insuffisance cardiaque. Dans les poumons, les auteurs mettent en évidence une accumulation d'hémosidérine, signalant des microhémorragies fréquentes. De plus, une splénomégalie est observée, en parallèle, une fibrose hépatique est mise en évidence par coloration au Sirius Red (Figure 28), un marqueur spécifique de la matrice extracellulaire et du dépôt de collagène dans le foie. Des anomalies vasculaires, notamment des dilatations capillaires, sont également

détectées dans le cerveau, bien que moins prononcées [159]. Afin de mieux caractériser les dérèglements vasculaires systémiques, ils ont injecté des billes fluorescent de 45 µm dans le ventricule gauche. Ces dernières sont trop grosses pour passer à travers les petits vaisseaux de souris WT. En revanche, chez les souris avec la double délétion, ces billes traversaient anormalement la circulation systémique et s'accumulaient dans les poumons, ce qui indique la présence de shunts artérioveineux ou de dilatations importantes permettant aux billes de traverser la circulation systémique.

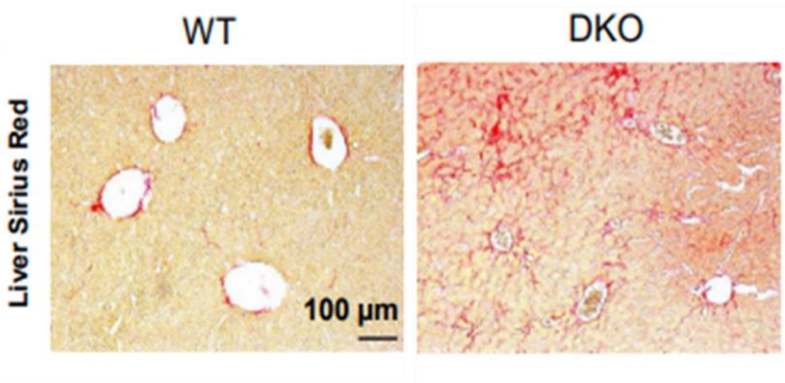


Figure 28. Fibrose hépatique dans le foie des souris Bmp9/10 double KO.

Coloration Sirius red révèle une augmentation significative de la fibrose périvasculaire hépatique chez les souris Bmp9/10 double KO [159].

Ces modèles adultes constituent des outils précieux pour modéliser les signes cliniques majeurs d'HHT ainsi que pour analyser l'hypothèse du second hit. Chen et al. ont reproduit des AVMs dans le cerveau, l'intestin grêle et les poumons en ciblant spécifiquement les cellules endothéliales adultes à l'aide du promoteur *Pdgfb-Cre*^{ERT2}. L'induction de la délétion d'*Alk1* a été combinée à une stimulation locale par VEGF, un facteur pro-angiogénique, afin de mimer un stress environnemental et ainsi déclencher la formation des MAV, conformément au modèle du second hit [152]**.** Également, l'injection sous cutanée de matrigel, une matrice extracellulaire riche en facteurs angiogénique (bFGF, VEGF), chez les souris adultes invalidées pour endogline dans les cellules endothéliales induit un élargissement anormal des veines à proximité du Matrigel enrichi, phénomène absent dans les WT, ce qui confirme qu'une lésion ou une stimulation pro-angiogénique, est nécessaire pour révéler le phénotype pathologique, en accord avec le modèle du second hit [145]. En outre, la neutralisation du VEGF dans ce modèle murin a permis non seulement de prévenir l'apparition des malformations artérioveineuses, mais également de restaurer une architecture vasculaire plus normale [160].
D'autre part, l'inactivation d'*Alk1* dans d'autres types cellulaires vasculaires tels que les macrophages (*LysM-Cre*), les cellules musculaires lisses et les péricytes (*Myh11*-Cre^{ERT2} **;** *NG2*-Cre) n'induit aucun phénotype, soulignant le rôle central des cellules endothéliales dans la genèse des malformations vasculaires caractéristiques de l'HHT.

Au cours de ma thèse, je me suis plus particulièrement intéressée au rôle du récepteur ALK1 dans la vascularisation du foie qui est l'organe le plus touché chez les patients atteints de la forme HHT1. Cet organe présente de plus des caractéristiques vasculaires uniques.

Chapitre 4 : Organisation et vascularisation hépatique

Le foie est un organe vital qui joue un rôle central dans l'homéostasie de l'organisme, assurant un lien étroit entre système vasculaire et voies métaboliques. Sa vascularisation unique lui confère une capacité exceptionnelle à filtrer le sang, métaboliser les nutriments, et éliminer les toxines. Contrairement à d'autres organes, le foie possède un réseau capillaire particulier, les sinusoïdes, bordé par des cellules endothéliales sinusoïdales (LSEC) hautement spécialisées.

Les malformations artérioveineuses hépatiques sont très fréquentes chez les patients HHT (<30% HHT1 (*ENG*), > 70% HHT2 (*ACVRL1*) et environ 40% pour les patients porteurs de mutations *SMAD4*), entrainant dans de nombreux cas une insuffisance cardiaque [23]. Le rôle d'ALK1 dans la régulation de l'intégrité vasculaire hépatique reste encore largement méconnu. Dans ce chapitre, je décris d'abord la vascularisation hépatique normale, l'organisation zonale du foie et ses fonctions métaboliques, avant d'aborder les mécanismes de fibrose et les données récentes impliquant la signalisation ALK1 dans la physiopathologie hépatique.

4.1. Organisation anatomique et vascularisation du foie

Le foie, le deuxième organe volumineux après la peau, est un organe vital de grande taille, situé dans la cavité abdominale supérieure droite en position sous diaphragmatique qui représente 2% du poids corporel.

Chez la souris comme chez l'humain, il est constitué de plusieurs lobes, quatre principaux chez l'homme (droit, gauche, carré et caudé) et protégé par la cage thoracique, et en lien étroit avec plusieurs structures anatomiques majeures, notamment le diaphragme au-dessus, l'estomac, le duodénum, le rein droit et le côlon transverse (Figure 29).

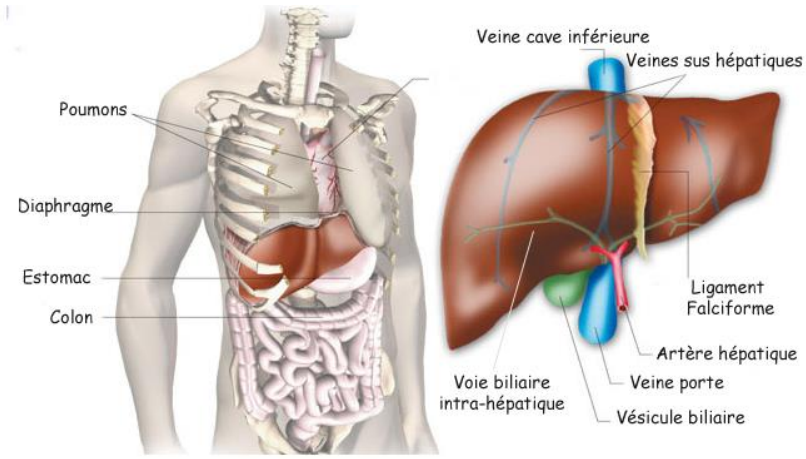


Figure 29. Localisation anatomique du foie dans l'organisme.

(monhepatogastro.net)

Le foie est caractérisé par sa vascularisation particulière. La veine porte hépatique draine le sang provenant de la totalité du système digestif (intestin grêle et côlon, estomac, pancréas, rate) vers le foie. Ce sang représente environ 75 % de l'apport sanguin hépatique et est chargé de nutriments, de toxines, de produits de dégradation, mais aussi de médiateurs hormonaux et de bactéries issues de la flore intestinale.

L'artère hépatique assure environ 25 % du débit sanguin et fournit l'oxygène nécessaire aux cellules hépatiques. Ces deux apports fusionnent à l'intérieur du foie dans un réseau capillaire spécialisé : les sinusoïdes hépatiques. Ensuite le sang mélangé est progressivement drainé vers les veines centrales, puis collecté par les veines sus-hépatiques, qui se jettent dans la veine cave inférieure.

Le foie comprend également un réseau biliaire chargé du transport de la bile, un fluide complexe composé principalement de sels biliaires (issus de la transformation du cholestérol), de phospholipides tels que la lécithine, de cholestérol libre, de pigments biliaires notamment la bilirubine (provenant de la dégradation de l'hémoglobine) ainsi que de l'eau, d'électrolytes et de diverses substances à éliminer, telles que des toxines ou des médicaments métabolisés par le foie. Le rôle principal de la bile est d'émulsionner les graisses dans l'intestin, facilitant ainsi leur digestion et leur absorption. Contrairement au sang, qui afflue vers le foie pour y être filtré et traité, la bile suit un trajet opposé : produite par le foie, elle s'écoule vers l'extérieur. Elle transite d'abord par de petits canaux intra-hépatiques, qui se rejoignent progressivement pour former le canal hépatique commun, puis le canal cholédoque, par lequel elle est déversée dans le duodénum, au début de l'intestin grêle, où elle remplit sa fonction digestive.

Histologiquement, les lobes du foie sont organisés en unités fonctionnelles appelées lobules hépatiques, généralement de forme hexagonale. À chaque angle de ces lobules, on retrouve une triade portale, composée de trois structures principales : une branche de la veine porte, une branche de l'artère hépatique et un canal biliaire (Figure 30).

Les branches de la veine porte et de l'artère hépatique déversent leur sang dans les sinusoïdes hépatiques, un réseau de capillaires spécialisés propre au foie. Ces sinusoïdes traversent le lobule hépatique en direction de la veine centrale (ou veine centrolobulaire), située en son centre. C'est à ce niveau que le sang, après avoir été filtré au contact des cellules hépatiques, est collecté. Les veines centrales de chaque lobule se drainent ensuite dans des veinules collectrices, qui convergent progressivement pour former les veines hépatiques. Ces dernières s'abouchent à la veine cave inférieure, permettant ainsi le retour du sang filtré vers la circulation systémique.

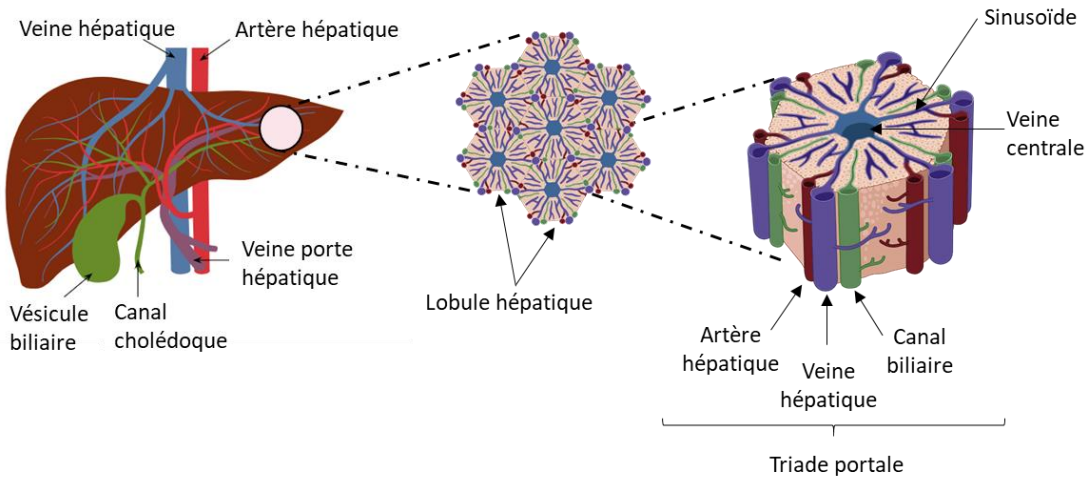


Figure 30. Organisation et vascularisation du foie.

Les lobes du foie sont structurés en lobules hépatiques, unités de forme hexagonale organisées autour d'une veine centrolobulaire. À chaque sommet du lobule se trouve une triade portale, composée d'une branche de la veine porte (en bleu), d'une branche de l'artère hépatique (en rouge) et d'un canal biliaire (en vert). Le sang circule des espaces périportaux vers la veine centrale en empruntant un réseau de sinusoïdes, tandis que la bile est collectée en sens inverse, en direction des canaux biliaires situés au niveau des triades (Figure réalisée avec Biorender).

4.2. Matrice extracellulaire hépatique : une structure peu dense au service des fonctions hépatiques

Le sang circulant dans les sinusoïdes traverse une paroi fine et perméable, soutenue par une MEC peu dense, caractéristique du foie sain. Bien qu'elle ne représente qu'environ 3 % de la masse hépatique, la MEC joue un rôle central dans l'architecture du tissu et dans la régulation des interactions entre les cellules et leur environnement. Sa faible densité, combinée aux fenestrations de l'endothélium sinusoïdal, permet des échanges bidirectionnels rapides de macromolécules entre le compartiment vasculaire et les cellules hépatiques.

Elle est principalement composée d'un assemblage de macromolécules incluant différents types de collagène, les glycoprotéines comme la laminine, la fibronectine et les protéoglycanes.

En plus de fournir une charpente architecturale, la MEC régule des processus cellulaires fondamentaux tels que la prolifération, la migration, l'adhérence, la survie et la différenciation des cellules hépatiques [161, 162]. Ces fonctions sont médiées par des interactions spécifiques entre les composants de la MEC et les récepteurs cellulaires, notamment les intégrines, qui transmettent des signaux intracellulaires influençant le comportement cellulaire.

La faible densité de la MEC dans le foie est maintenue grâce aux enzymes présentes dans la matrice, notamment les métallo-protéases matricielles ou MMPs (Matrix Metalloproteases) et leurs inhibiteurs TIMPs (Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteases) [163] .

Dans des conditions pathologiques, l'accumulation anormale de MEC entraîne la perte de la structure fenestrée des sinusoïdes, perturbe leur perméabilité, modifie l'architecture vasculaire et altère ainsi les fonctions hépatiques [164].

4.3. Organisation cellulaire

Le foie constitue un organe central de l'homéostasie systémique dont l'efficacité repose sur une architecture cellulaire stratifiée et des réseaux de communication intercellulaire étroitement régulés. Cette organisation permet non seulement l'exécution synchronisée des fonctions métaboliques, de détoxification et de synthèse, mais assure également une réponse coordonnée aux stimuli hémodynamiques, immunitaires.

4.3.1. Les hépatocytes

Les hépatocytes constituent la population cellulaire majoritaire du foie, représentant environ 60 à 70 % du nombre total de cellules et près de 80 % du volume cellulaire hépatique [165]. Ces cellules épithéliales hautement polarisées sont organisées en mono ou bicouches, unies par des jonctions serrées au niveau de leur pôle apical, où elles délimitent les canalicules biliaires. Leur pôle basal est orienté vers l'espace de Disse, un compartiment extracellulaire entre les hépatocytes et les cellules endothéliales sinusoïdales, et il est recouvert de microvillosités qui s'étendent jusqu'à proximité des fenestrations endothéliales facilitant les échanges bidirectionnels de nutriments, de xénobiotiques, de protéines plasmatiques et de produits du métabolisme hépatocytaire (Figure 31).

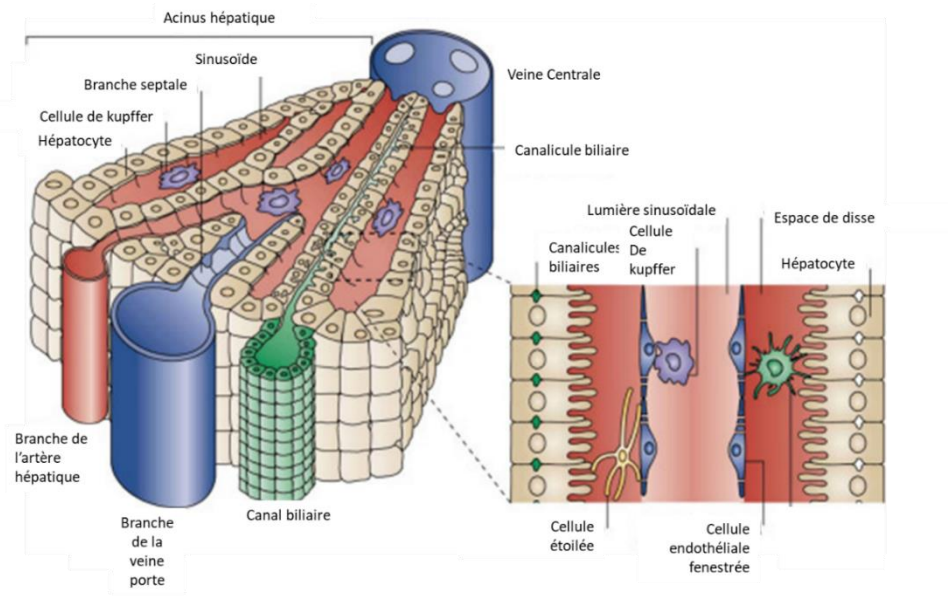


Figure 31. Organisation cellulaire du lobule hépatique.

Schéma illustrant la circulation sanguine au sein du lobule hépatique, depuis les branches de la veine porte et de l'artère hépatique jusqu'à la veine centrale, via la lumière des sinusoïdes. Ces sinusoïdes sont bordés par des cellules endothéliales sinusoïdales fenestrées (LSEC) reposant sur une membrane basale discontinue. Des macrophages résidents, les cellules de Kupffer, sont intercalés le long de cet endothélium spécialisé. Dans l'espace de Disse, situé entre les hépatocytes et l'endothélium sinusoïdal, résident les cellules étoilées hépatiques quiescentes. Ces dernières produisent les ligands BMP9 et BMP10, qui activent le récepteur ALK1 exprimé par les LSEC afin de maintenir leur phénotype quiescent et leur spécialisation vasculaire (Figure adaptée de [166]).

Le long de l'axe portocentral, les hépatocytes considérés comme principaux acteurs métaboliques du foie, présentent une hétérogénéité fonctionnelle connue sous le nom de zonation métabolique, déterminée par des gradients physiologiques en oxygène, nutriments, hormones et facteurs morphogénétiques. Cette organisation spatiale est en grande partie orchestrée par les LSEC dont les signaux angiocrines en particulier les voies Wnt/β-caténine, participent activement au maintien de l'identité zonale des hépatocytes (sera détaillé plus tard). Les hépatocytes ont une faible prolifération en condition basale, mais une forte capacité régénérative après perte tissulaire.

4.3.2. Les cellules étoilées du foie

Les cellules étoilées hépatiques (Hepatic Stellate Cells, HSC) sont localisées dans l'espace de Disse (Figure 31). Dans un foie sain, elles présentent un phénotype quiescent, non prolifératif, caractérisé par une faible activité de synthèse de matrice, une morphologie étoilée et une accumulation de gouttelettes cytoplasmiques riches en rétinoïdes. Cette fonction de stockage de vitamine A, constitue la caractéristique la plus distinctive des HSC, elles seules sont responsables de stockage de plus de 70 % des réserves de rétinol [167]. Les HSC exercent également un rôle paracrine essentiel dans le maintien de la quiescence vasculaire. Elles

constituent la source hépatique des ligands BMP9 et BMP10 qui activent le récepteur ALK1 présent à la surface des LSEC [168].

Bien que traditionnellement non considérées comme des cellules immunitaires, les HSC expriment des molécules impliquées dans la présentation antigénique (HLA-I, HLA-II, CD1b, CD1c) ainsi que des co-stimulateurs des lymphocytes T (CD40, CD80). Leur expression est fortement induite en réponse aux cytokines pro-inflammatoires, suggérant un rôle potentiel des HSC dans la modulation immunitaire en contexte pathologique [169]. Les HSC sont hautement sensibles à leur environnement biochimique et mécanique. Des signaux pathologiques (stress oxydatif, des dérivés microbiens, signaux pro-inflammatoires ou pro-fibrotiques…) peuvent déclencher leur activation et leur différenciation progressive en myofibroblastes un processus clé dans l'initiation des pathologies hépatiques [170] (sera développé plus tard dans ce chapitre).

4.3.3. Les cellules de Kupffer

Les cellules de Kupffer ou macrophages résidents du foie sont localisées dans la lumière sinusoïdale (Figure 31). Elles constituent la première ligne de défense immunitaire face aux bactéries, endotoxines et produits microbiens dérivés du tractus gastro-intestinal, qui parviennent au foie par l'intermédiaire de la circulation portale. En plus de leurs fonctions immunitaires, les cellules de Kupffer participent activement à la régulation de l'homéostasie sanguine, notamment en contrôlant les niveaux de fer, de cholestérol et de bilirubine. Elles assurent, par exemple, la dégradation des hématies sénescentes, permettant la libération du fer et sa réutilisation ou son stockage [171]. Elles contribuent également au métabolisme du cholestérol intracellulaire [172] et participent à la clairance de la bilirubine libre, évitant son accumulation toxique dans le compartiment plasmatique. Les cellules de Kupffer expriment, de façon surprenante, certains marqueurs endothéliaux comme ALK1 et VE-Cadhérine [126].

4.3.4. Les cellules endothéliales spécialisées du foie

La paroi des sinusoïdes hépatiques est tapissée par des cellules hautement spécialisées : les cellules endothéliales sinusoïdales hépatiques (LSEC) qui représentent environ 15 à 20 % des cellules du foie, bien qu'elles ne constituent qu'environ 3 % du volume total hépatique [173]. Elles sont localisées entre le flux sanguin sinusoïdal et l'espace de Disse (Figure 31), cette localisation unique place les LSEC en interface directe entre le sang circulant et les hépatocytes, ce qui facilite les échanges bidirectionnels de macromolécules et de signaux. Ces cellules possèdent des caractéristiques morphologiques uniques, notamment la présence de fenestrations regroupées en plaques criblées (sieves plates), l'absence de membrane basale avec une expression spécifique de récepteurs « éboueurs » (scavengers). Ces propriétés structurales font des LSEC les cellules endothéliales les plus perméables du corps humain.

L'identité unique des LSEC distincte de celle des endothéliums capillaires classiques, repose sur un programme transcriptionnel spécifique contrôlé par plusieurs facteurs de transcription

clés. Des données issues d'analyses transcriptomiques unicellulaires (scRNAseq) réalisées chez la souris dans différents lits vasculaires ont confirmé que l'expression de *Gata4* est hautement spécifique des LSEC [31]. Géraud et al. ont développé un modèle murin conditionnel dans lequel *Gata4* est délété spécifiquement dans les LSEC à l'aide de promoteur *Stab2-Cre (stabilin-2)*. Ces souris présentent une dédifférenciation des sinusoïdes hépatiques dès les stades précoces du développement embryonnaire (dès E10.5). Ainsi, GATA4 apparait indispensable à l'établissement du phénotype discontinu des LSEC [174]. Mais ce n'est pas le seul, d'autres facteurs de transcription (C-MAF, MEIS2) ont également été identifiés pour leur capacité à réguler l'expression de gènes caractéristiques du phénotype sinusoïdal, notamment *Clec4m, Mrc1, Gpr182 ou Stabiline-1* [175].

Dans un foie sain, les LSEC remplissent plusieurs fonctions critiques

4.3.4.1. Régulation du tonus vasculaire hépatique

En réponse aux variations du débit sanguin hépatique, notamment après les repas ou lors d'une augmentation du stress de cisaillement, les LSEC permettent la régulation du tonus vasculaire, contribuant ainsi au maintien d'une basse pression portale. Cette régulation est en partie assurée par l'activation de facteurs de transcription endothéliaux spécifiques, en particulier KLF2 (Kruppel-like factor 2), qui induit l'expression d'agents vasodilatateurs notamment l'oxyde nitrique (NO) par l'enzyme eNOS (endothelial nitric oxide synthase). Plusieurs études ont montré que les LSEC représentent la principale source hépatique de NO, soulignant leur rôle central dans le contrôle local de la résistance vasculaire intra-hépatique [176, 177].

4.3.4.2. Fonction de clairance

Les LSEC sont idéalement situées pour surveiller les constituants du sang. Elles expriment à leur surface des récepteurs de type scavenger tels que Stabilin-1, Stabilin-2, le récepteur du mannose (MRC1), et FcγRIIb2 (CD32b), qui assurent une clairance endocytaire extrêmement efficace. En effet, les LSEC éliminent du plasma un large éventail de molécules, incluant les lipoprotéines oxydées, les complexes immuns circulants, les fragments d'ADN extracellulaire, les glycoprotéines altérées, les produits microbiens intestinaux comme le lipopolysaccharide (LPS) et certaines cytokines. Ainsi, elles assurent une épuration physique par endocytose constitutive, sans nécessité d'activation inflammatoire préalable. Les molécules captées sont internalisées dans des vésicules, puis dirigés vers les endosomes précoces et les lysosomes pour dégradation. Par cette activité, les LSEC contribuent directement à la régulation de la réponse immunitaire hépatique et à la tolérance vis-à-vis des antigènes d'origine intestinale [178].

4.3.4.3. Perméabilité hydrodynamique et moléculaire exceptionnelle

Les fenestrations des LSEC leur confèrent une perméabilité exceptionnellement élevée. Ces structures permettent non seulement la diffusion passive de petites molécules (glucose, acides aminés, ions), mais aussi le passage de macromolécules telles que les protéines plasmatiques, les lipoprotéines, les résidus de chylomicrons, les exosomes et de nombreux médicaments. Grâce à cette perméabilité, l'espace de Disse fonctionne comme une extension dynamique du compartiment plasmatique, rendant les constituants du sang directement accessibles aux hépatocytes et aux cellules environnantes [179].

Les LSEC assurent également un transport transcellulaire actif par transcytose, processus impliqué notamment dans le transfert bidirectionnel de protéines plasmatiques, d'immunoglobulines, de lipides et de facteurs de croissance sans dégradation, optimisant ainsi leur distribution locale.

Tous ces mécanismes, perméabilité fenestrée, transcytose et endocytose sélective, font des LSEC les acteurs de filtration, de transport ciblé et d'épuration plasmatique, contribuant ainsi à la régulation de l'environnement métabolique et immunitaire du foie [180].

Le maintien de l'homéostasie hépatique repose sur une coopération dynamique entre les différents types cellulaires du foie, assurant le maintien de leur spécialisation fonctionnelle. À ce titre, les LSEC occupent une position stratégique : elles modulent à la fois les fonctions des hépatocytes et le maintien de la quiescence des HSC.

4.3.4.4. Les LSEC au cœur de la communication intercellulaire : inhibition de l'activation des HSC et modulation des fonctions hépatocytaires

4.3.4.4.1. Interactions LSEC – HSC

Dans leur état différencié, les LSEC sécrètent des médiateurs tels que l'oxyde nitrique (NO), via l'enzyme eNOS, ainsi que HB-EGF (heparin-binding EGF-like growth factor), qui agissent de manière paracrine pour inhiber l'activation des HSC en myofibroblastes pro-fibrogéniques [181]. L'endothélium hépatique se caractérise par une faible expression de PDGF-B, un facteur majeur de l'activation des HSC, contribuant ainsi à préserver leur état quiescent [57]. Cette particularité est confirmée par les analyses scRNAseq de Kalucka et al. réalisées sur des cellules endothéliales [31] (Figure 32).

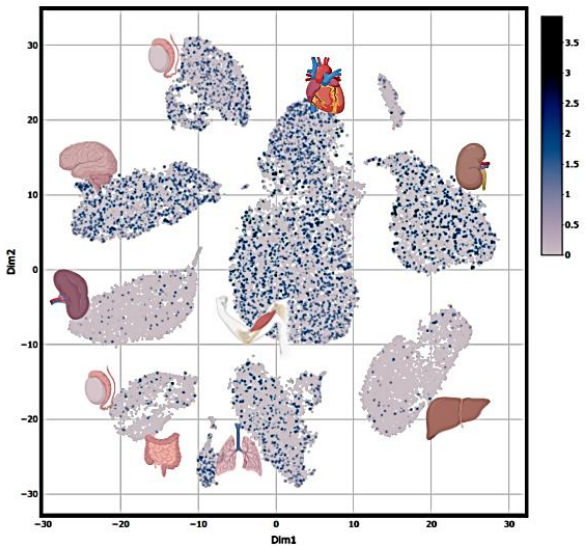


Figure 32. Faible expression de Pdfgb dans l'endothélium hépatique.

UMAP représentant les cellules endothéliales provenant de divers organes humains (données de [31]). Chaque point correspond à une cellule, colorée selon le niveau d'expression du gène Pdfgb. Les illustrations d'organes indiquent l'origine des cellules dans l'espace UMAP. Une échelle de couleurs à droite reflète l'intensité d'expression normalisée de Pdgfb.

4.3.4.4.2. Interactions LSEC – Hépatocytes

Bien que les hépatocytes puissent réguler la prolifération des LSEC (via GATA3 et Ramp2) [182], les LSEC exercent en retour un contrôle essentiel sur les fonctions métaboliques des hépatocytes. Parmi celles-ci figure le métabolisme du fer : Les LSEC constituent une source majeure de BMP2 et BMP6 induisant l'expression de l'hepcidine dans les hépatocytes, considérée comme régulateur central du métabolisme du fer.

Des études récentes ont démontré que l'invalidation de *Bmp2* spécifiquement dans les LSEC, à l'aide du promoteur *Stab2-Cre*, conduit à une diminution significative de l'expression hépatocytaire d'hepcidine, avec une surcharge hépatique et systémique en fer [183]. De plus, Colucci et al. ont montré que la sécrétion de BMP2 par les LSEC est régulée de manière autocrine par TGFβ [184]. De cette façon, les cellules du foie coopèrent de manière coordonnée pour maintenir l'homéostasie systémique du fer.

Cependant, leur rôle le plus crucial s'exerce dans la régulation de la zonation hépatique, un processus fondamental assurant la spécialisation métabolique des hépatocytes selon leur position au sein du lobule.

4.4. Zonation hépatique

Grâce à son organisation vasculaire unique et à la diversité de ses types cellulaires, le foie est responsable des fonctions métaboliques, immunitaires et détoxifiantes indispensables. Toutefois, ces fonctions ne sont pas réparties uniformément à travers l'organe. Au contraire, il existe une répartition spatiale précise des activités métaboliques selon un axe reliant la veine

porte à la veine péricentrale. Cette organisation, appelée zonation hépatique divise le foie en trois zones : la zone 1, également appelée zone périportale, la zone 2, intermédiaire, et la zone 3, ou zone péricentrale [185]. Cette organisation reflète une spécialisation fonctionnelle des cellules en fonction de leur localisation au sein du lobule hépatique (Figure 33).

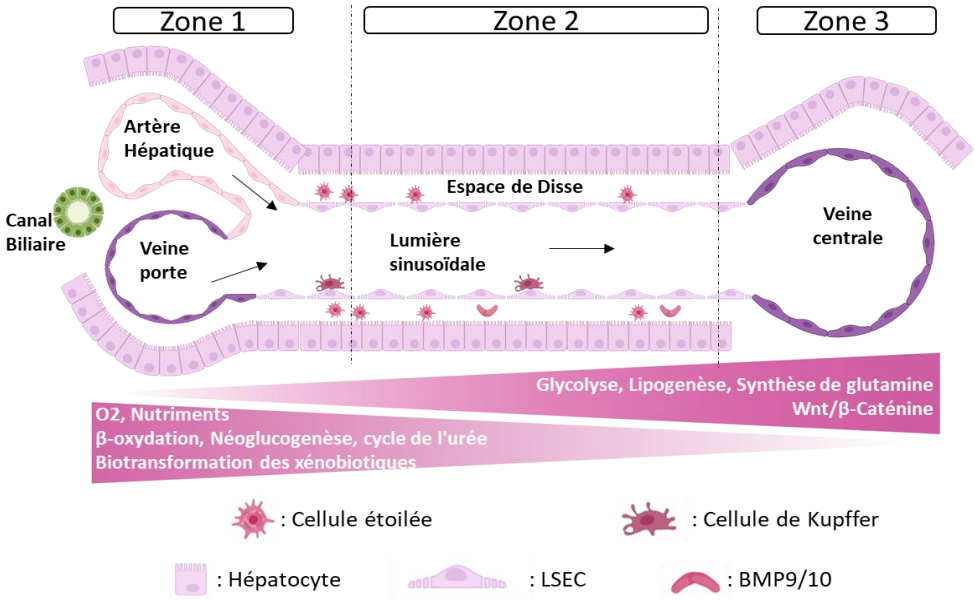


Figure 33. Zonation hépatique.

Représentation schématique de la zonation hépatique le long de l'axe porto-central. La zone périportale (zone 1), est fortement oxygénée et spécialisée dans les fonctions anaboliques telles que la néoglucogenèse, la β-oxydation des acides gras et le cycle de l'urée. À l'inverse, la zone péricentrale (zone 3), plus hypoxique et située autour de la veine péricentrale, est impliquée dans la glycolyse, la lipogenèse de novo, la biotransformation des xénobiotiques. Cette organisation spatiale repose sur l'expression zonée d'enzymes spécifiques, permettant au foie d'assurer une régulation fine et adaptative du métabolisme en réponse aux variations physiologiques. Il est intéressant de noter que les ligands d'ALK1, BMP9 et BMP10 sont produits par les cellules étoilées permettant ainsi une activation locale du récepteur endothélial ALK1. (Figure réalisée avec Biorender).

Une des premières hypothèses émises pour expliquer ce phénomène repose sur la dynamique du flux sanguin. En effet, le sang circulant dans les sinusoïdes résulte d'un mélange entre le sang riche en oxygène de l'artère hépatique et le sang chargé en nutriments issu de la veine porte. Ce mélange initialement bien oxygéné subit, au fil de sa progression dans les sinusoïdes, une désoxygénation progressive, créant un gradient d'oxygène marqué entre les zones périportale et péricentrale, en raison notamment de la faible pression en oxygène mesurée au niveau des veines centrales.

Par ailleurs, le sang perfuse les hépatocytes de manière séquentielle, c'est-à-dire en suivant un trajet ordonné depuis la périphérie du lobule vers son centre. Ce passage progressif induit une évolution continue de la composition du sang (en oxygène, hormones, nutriments,

xénobiotiques...), de sorte que les cellules notamment les hépatocytes, selon leur position dans le lobule hépatique, sont exposés à des microenvironnements distincts et ensuite des fonctions spécifiques [186].

Braeuning et al. ont confirmé cette spécialisation fonctionnelle en réalisant l'une des premières analyses transcriptionnelles de l'expression génique en fonction de la localisation des hépatocytes au sein du lobule hépatique. En séparant les hépatocytes périportaux et péricentraux à l'aide d'une perfusion collagénase/digitonine, ils ont mis en évidence 198 gènes exprimés différemment, dont 20 validés par RT-PCR [187]. McEnerney et al. ont utilisé la microdissection par capture laser (utilise un faisceau laser pour découper et isoler avec précision des zones spécifiques d'un tissu) afin d'isoler plus précisément les hépatocytes des zones périportale et péricentrale avant d'effectuer un séquençage de l'ARN (bulk RNA-seq). L'analyse transcriptomique leur a permis d'identifier 139 gènes exprimés différemment entre la zone 1 (périportale) et la zone 3 (péricentrale), 68 gènes sont exprimés exclusivement en zone 1 et 52 en zone 3 confirmant l'exposition de ces 2 zones à des microenvironnements très distincts. Parmi les gènes fortement exprimés en zone 3, la glutamine synthétase (GS) se distingue comme un marqueur canonique de cette région [185].

Le séquençage de l'ARN à cellule unique (scRNAseq) a facilité l'étude de la zonation hépatique, en offrant la possibilité d'analyser l'expression transcriptomique globale de milliers de cellules individuelles, tout en permettant de reconstituer leur position spatiale le long de l'axe porto-central [188, 189]. Ces approches ont permis de cartographier les profils d'expression génique des principales populations cellulaires du foie et d'identifier des signatures transcriptionnelles et fonctionnelles caractéristiques de leur localisation zonale [33].

4.4.1. Rôle des LSEC dans l'établissement et le maintien de la zonation hépatique

Les LSEC constituent les principales cellules régulatrices de la zonation hépatique, en adoptant des phénotypes, structures et fonctions distincts selon leur localisation dans le lobule hépatique.

Cela s'explique en partie par l'expression spécifique des ligands de la voie Wnt/β-Caténine (Wnt2 et wnt9b), ainsi que ses régulateurs, tels que RSPO3, par les LSEC de la veine centrale [190, 191].

RSPO3 potentialise la signalisation Wnt en inhibant les E3 ubiquitine ligases ZNRF3 et RNF43, qui normalement limitent la signalisation Wnt en induisant l'internalisation des récepteurs membranaires. En stabilisant ces récepteurs à la membrane, RSPO3 augmente la sensibilité des hépatocytes péricentraux aux signaux Wnt [191, 192]. Ces molécules agissent sur leurs récepteurs situés sur les hépatocytes péricentraux, activant ainsi la voie Wnt/β-caténine [193].

Pour mieux comprendre le rôle de la signalisation Wnt dans la zonation hépatique, Ma et al. ont induit une délétion spécifique du gène *Wls* (nécessaire à la sécrétion des protéines Wnt) dans les cellules endothéliales chez la souris et ont observé une perte presque complète de l'expression des marqueurs typiques des hépatocytes péricentraux (GS, Cyp2e1). Inversement, E-cadhérine, normalement exprimée en zone périportale, s'étendait anormalement vers les régions péricentrales [194]. Un phénotype similaire a été observé après délétion ubiquitaire de Rspo3 [191]. Cette communication intercellulaire étroite entre les LSEC et les hépatocytes constitue un mécanisme indispensable à l'organisation fonctionnelle du foie.

4.4.2. Mécanismes de régulation de la zonation hépatique : Voie Wnt/β-caténine

La voie de signalisation Wnt/β-caténine est aujourd'hui reconnue comme l'un des principaux régulateurs de la zonation hépatique. Elle est activée de manière restreinte dans les hépatocytes péricentraux, contrôlant ainsi l'expression de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme hépatique [195, 196].

En l'absence de signal Wnt (comme dans la zone périportale), la β-caténine cytoplasmique est dégradée par un complexe destructeur composé de GSK3β, CK1, APC et Axine. Ce complexe phosphoryle la β-caténine, entraînant sa reconnaissance par le système ubiquitine-protéasome et sa dégradation. Lorsqu'un ligand Wnt se fixe sur un récepteur Frizzled et son corécepteur LRP5/6 (comme dans la zone péricentrale), le complexe destructeur est inhibé. La β-caténine migre dans le noyau et active la transcription de gènes cibles via les facteurs de transcription de la famille TCF/LEF (Figure 34A).

Cadoret et al., ont montré que la GS est régulée par la β-caténine [195]. Chez la souris, la délétion de β-caténine dans les hépatocytes induit une perte d'expression péricentrale de la GS, soulignant le rôle central de cette voie dans l'établissement et le maintien de la zonation métabolique hépatique [196]. En outre, l'étude de Benhamouche et al. a confirmé que la β-caténine active est restreinte aux hépatocytes péricentraux, tandis que son inhibiteur, APC (Adenomatous Polyposis Coli), est exprimé de manière prédominante dans les hépatocytes périportaux (Figure 34B, D).

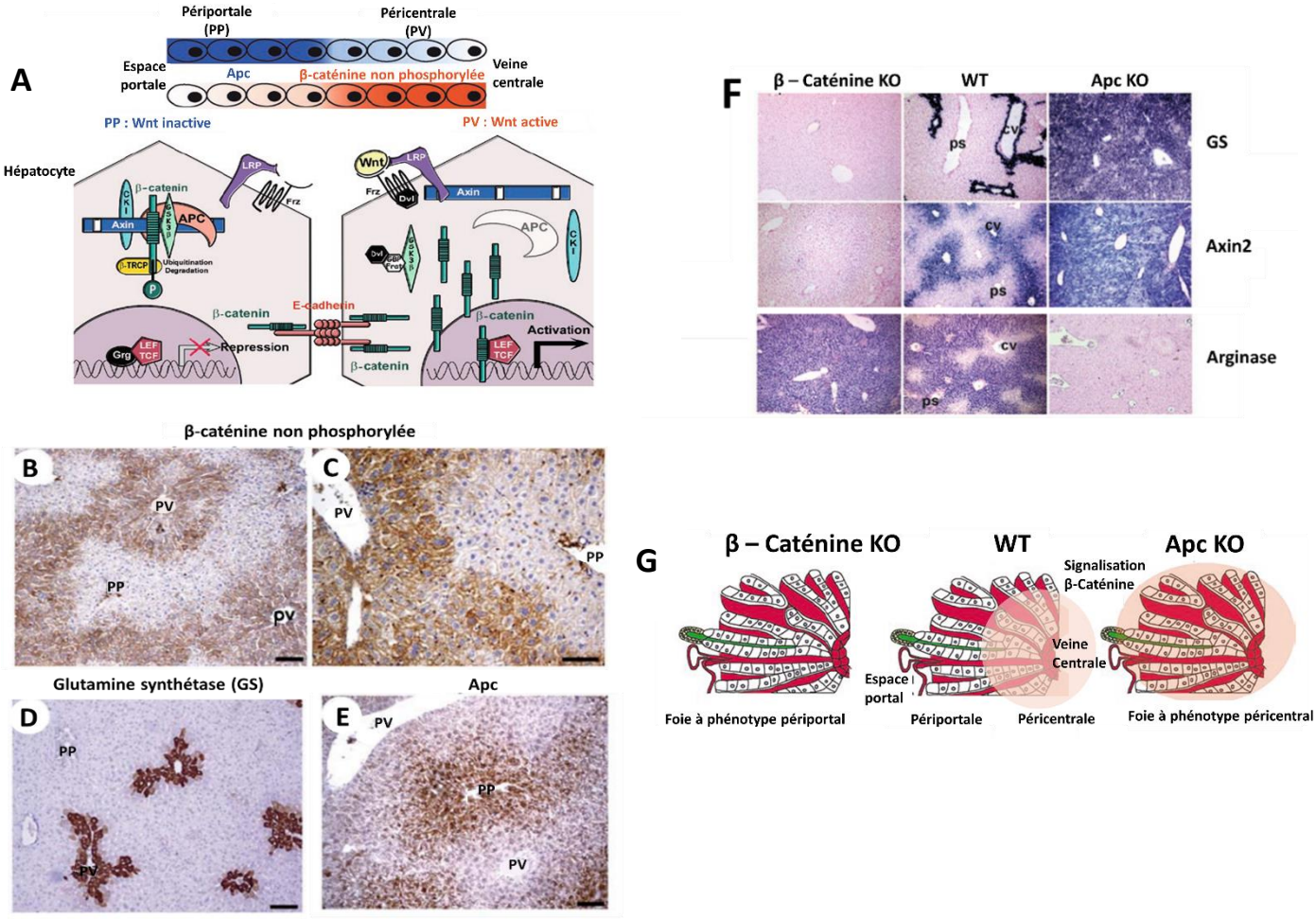


Figure 34. Wnt/ß-Caténine régulateur central de la zonation hépatique.

(A) Schéma du modèle de signalisation Wnt dans le foie. Dans la zone périportale (PP), en l'absence de signal Wnt, la ß-caténine cytoplasmique est ciblée par un complexe destructeur composé de GSK3ß, CK1, APC et Axine. Ce complexe phosphoryle la ß-caténine, conduisant à sa reconnaissance par le système ubiquitine-protéasome et à sa dégradation. Dans la zone péricentrale (PV), la fixation d'un ligand Wnt sur le récepteur Frizzled et son corécepteur LRP5/6 inhibe le complexe destructeur. La ß-caténine s'accumule alors dans le cytoplasme, migre vers le noyau, et active la transcription de gènes cibles via les facteurs de transcription TCF/LEF. À la membrane plasmique, la ß-caténine est également associée à l'E-cadhérine au sein des jonctions adhérentes. (B, C) Immunomarquage de la ß-caténine non phosphorylée montrant sa localisation dans les hépatocytes péricentraux. (D) Immunomarquage d'APC, un inhibiteur clé de la voie Wnt/ß-caténine, localisé préférentiellement dans la zone périportale. (E) Expression de la glutamine synthétase (GS), une cible transcriptionnelle de la ß-caténine, restreinte aux hépatocytes péricentraux. (F) Analyse immunohistochimique de l'expression de GS, Axine2 (gène cible de la voie Wnt) et Arginase1 (marqueur de la zone périportale) dans des foies de souris ß-caténine KO, WT et Apc KO. L'inactivation de la ß-caténine inhibe l'expression des marqueurs péricentraux (GS, Axine2), tandis que l'inactivation d'APC entraîne une extension de leur expression vers les zones périportales. (G) Schéma illustrant les altérations de la zonation hépatique selon les génotypes : Chez la souris ß-caténine KO, le foie présente un phénotype périportal. Chez la souris Apc KO, la signalisation Wnt est activée dans l'ensemble du lobule hépatique, conduisant à un phénotype péricentral étendu. (Figure adaptée de [197]).

Cette organisation régule l'expression zonée de gènes métaboliques spécifiques : les gènes périportaux tels que *Cps1*, *Arginase1* (impliqués dans le cycle de l'urée) sont activés en absence de signalisation Wnt, tandis que les gènes péricentraux tels que *Glul* (codant pour la GS), *RhBg* et *Axine2* (associés à la synthèse de glutamine) sont induits par l'activation de la β-caténine. Chez les souris déficientes pour *Apc*, les auteurs observent une activation progressive de la voie β-caténine dans l'ensemble du parenchyme hépatique, aboutissant à une expression étendue des gènes péricentraux et à la répression des gènes périportaux (Figure 34F, G). Cette dérégulation engendre une altération sévère du métabolisme de l'ammoniac et conduit à la mort rapide des animaux.

Ainsi, l'activation de la voie Wnt impose un programme transcriptomique péricentral à tout le lobule du foie, tandis que son inhibition dans un foie normal (par surexpression hépatique du facteur antagoniste *Dkk1*) entraîne une conversion des hépatocytes péricentraux vers un phénotype périportal [193]**.** L'invalidation de *Wnt2* et *Wnt9b* dans les cellules endothéliales hépatiques, entraîne un phénotype similaire [198].

Cette voie apparaît comme un gardien essentiel de l'architecture fonctionnelle du foie, en maintenant une signalisation Wnt restreinte à la zone péricentrale via l'expression d'APC au pôle opposé.

Outre la voie Wnt, d'autres facteurs ont également été impliqués dans le maintien de la zonation hépatique.

Des travaux récents ont mis en évidence le rôle de signaux hormonaux systémiques dans le contrôle de la zonation hépatique, notamment une hormone pancréatique sécrétée par les cellules α des îlots de Langerhans, le glucagon. Il présente un gradient de concentration décroissant le long de l'axe portocentral, similaire à celui de l'oxygène, le glucagon principalement présent dans la zone périportale active des cascades de signalisation intracellulaires, notamment la voie Ras/MAPK, impliquée dans la régulation de l'expression de gènes métaboliques. Chez des souris déficientes en glucagon, on observe une désorganisation des profils de zonation, marquée par une diminution de l'expression de gènes périportaux et une extension aberrante de l'expression de la GS. La réinjection de glucagon permet de restaurer la zonation normale, mettant en évidence un équilibre antagoniste entre les voies glucagon/Ras-MAPK et Wnt/β-caténine, essentiel au maintien de la compartimentation fonctionnelle lobulaire [199]. D'autres déterminants moléculaires, indépendants des voies hormonales, participent également à l'établissement de la zonation hépatique. C'est le cas de DICER, une endoribonucléase essentielle à la biogenèse des microARN, dont l'inactivation dans les hépatocytes conduit à une désorganisation marquée des profils d'expression génique zonée. De même, le facteur de transcription HNF4α (Hepatocyte Nuclear Factor 4α), connu pour son rôle central dans la maintien de l'identité fonctionnelle des hépatocytes, joue également un rôle important dans la spécification régionale des fonctions métaboliques au sein du lobule hépatique [200, 201].

4.5. Répartition spatiale des fonctions métaboliques le long de l'axe portocentral

C'est dans ce contexte de zonation fonctionnelle que le foie accomplit ses principales fonctions physiologiques qui sont distribuées de façon spécifique et localisée tout au long de l'axe portocentral, en fonction des gradients d'oxygène, de nutriments et de signaux hormonaux.

4.5.1. Gestion zonale de l'ammoniac

Un exemple pertinent de cette spécialisation métabolique hépatique est la répartition spatiale des voies métaboliques impliquées dans la gestion de l'ammoniac. Dans la zone 1, le cycle de l'urée est activement engagé dans la détoxification de l'ammoniac, principalement via l'expression localisée d'enzymes clés telles que carbamoyl phosphate synthase 1 (CPS1), Arginosuccinate syntase (ASS1), Argininosuccinate lyase (ASL), Arginase 1 (ARG1). Ce processus, dépendant d'un environnement riche en oxygène, permet la conversion efficace de l'ammoniac en urée, excrétée ensuite par les reins. À l'inverse, dans la zone 3, où l'oxygène est moins disponible et où le cycle de l'urée est inactif, l'ammoniac résiduel est pris en charge par la GS pour le convertir en glutamine. Cette organisation spatiale illustre particulièrement la complémentarité et la spécificité métabolique entre les zones portales et centrales du lobule hépatique, assurant une élimination efficace de l'ammoniac tout en adaptant les fonctions métaboliques aux gradients micro-environnementaux [202].

4.5.2. Détoxification des xénobiotiques

Le foie est spécifiquement impliqué dans la détoxification des composés exogènes (xénobiotiques), notamment les médicaments, les toxines environnementales et les produits du microbiote. Cette fonction repose sur un ensemble d'enzymes de biotransformation exprimées de manière zonée, en particulier dans les hépatocytes péricentraux (zone 3). Cette région est enrichie en enzymes, principalement les cytochromes P450 (tels que CYP1A2, CYP2E1, CYP3A4 chez l'humain), responsables de l'oxydation, de l'hydroxylation des substrats lipophiles. Cette spécialisation zonée rend la zone péricentrale particulièrement vulnérable aux hépatotoxiques. En conditions de stress oxydatif ou de surcharge métabolique, cette zone est souvent la première à présenter des lésions histologiques [203].

4.5.3. Métabolisme des glucides

Le foie est largement impliqué dans la régulation de la glycémie, assurant à la fois le stockage du glucose sous forme de glycogène lors des périodes postprandiales et la libération de glucose par glycogénolyse ou néoglucogenèse pendant le jeune. Ces fonctions sont spécifiquement réparties : la néoglucogenèse a lieu principalement dans la zone périportale, la plus oxygénée, tandis que la glycolyse prédomine dans la zone péricentrale. Cette spécialisation est rendue possible par l'expression zonée des enzymes clés telles que la

phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK) qui est fortement exprimées en zone 1, alors que les enzymes glycolytiques (telles que la glucokinase) sont en zone 3. Cette répartition spécifique permet au foie de répondre avec précision et adaptabilité aux besoins énergétiques de l'organisme [204].

4.5.4. Métabolisme des lipides

Comme pour les glucides, le métabolisme des lipides est finement orchestré selon la localisation zonale des hépatocytes.

La β-oxydation des acides gras, voie catabolique essentielle à la production d'énergie, est principalement localisée en zone périportale (zone 1), condition favorable à l'oxydation mitochondriale. À l'inverse, la lipogenèse de novo, qui consiste à synthétiser des acides gras à partir de précurseurs glucidiques, est majoritairement restreinte à la zone péricentrale (zone 3), moins oxygénée mais plus riche en facteurs favorisant l'anabolisme, tels que l'insuline.

Cette répartition repose sur l'expression différentielle des enzymes clés dans chaque zone : AAC (acétyl-CoA carboxylase), FAS (fatty acid synthase) sont enrichies en zone 3, favorisant la lipogenèse, tandis que les enzymes de la β-oxydation : ACAD (acyl-CoA déshydrogénase) ou CPT1 (carnitine palmitoyltransférase), sont plus abondantes en zone 1. De plus, la zone 3 est également impliquée dans l'estérification des acides gras et la synthèse des triglycérides, ainsi que dans l'assemblage des lipoprotéines de très basse densité (VLDL), contribuant à l'exportation des lipides vers la circulation périphérique [205] (Figure 33).

4.6. Altérations pathologiques de l'endothélium sinusoïdal : de la capillarisation des LSEC à la fibrose hépatique

4.6.1. Capillarisation des LSEC

La structure hautement spécialisée de l'endothélium hépatique est particulièrement vulnérable aux agressions chroniques.

Des conditions pathologiques telles que la stéatohépatite non alcoolique (NASH), les hépatites virales chroniques (VHB, VHC), l'alcoolisme ou l'exposition à des toxines comme le tétrachlorure de carbone (CCl_4) induisent une inflammation prolongée, un stress oxydatif, ainsi qu'un remodelage vasculaire. Ces signaux délétères perturbent profondément l'identité des LSEC et altèrent leur phénotype différencié [206–208]. En effet, les LSEC subissent une transformation progressive, perdent leurs fenestrations caractéristiques, expriment des marqueurs de l'endothélium capillaire continu en plus de la formation d'une membrane basale continue. Elles produisent anormalement le PDGF-B qui joue un rôle majeur dans l'activation des HSC (les principaux effecteurs de la fibrogenèse hépatique via leur production massive de MEC).

Ce processus, désigné sous le terme de capillarisation ou dédifférenciation des LSEC, reflète une perte de leur identité sinusoïdale spécialisée [209].

Au-delà de cette altération morphologique, la perte des fenestrations des LSEC perturbe profondément les échanges bidirectionnels entre le sang et les hépatocytes, éléments clés de la physiologie hépatique. Dans le contexte de la stéatose hépatique non alcoolique, la capillarisation des LSEC altère leur perméabilité et entrave le transfert des VLDL produites par les hépatocytes vers le compartiment vasculaire. Cela favorise la rétention hépatocytaire de cholestérol et de triglycérides, contribuant à l'accumulation lipidique intracellulaire caractéristique de la stéatose. Ce phénomène est aggravé par une hypoxie locale induite par la perte de fenestrations, exacerbant ainsi le stress métabolique et les lésions hépatiques [210].

En plus de leur perte de fonction de barrière permissive, les LSEC capillarisées acquièrent un phénotype pro-inflammatoire, commencent à secréter des cytokines (TNF-α, IL-1β et MCP-1), ainsi que des molécules d'adhérence telles que VCAM-1 et ICAM-1 ce qui favorise le recrutement et l'infiltration des cellules immunitaires mais aussi l'activation secondaire des cellules de Kupffer résidentes. Ces macrophages, activés par les signaux des LSEC altérées, renforcent l'inflammation chronique en produisant davantage de médiateurs pro-inflammatoires [210–212] (Figure 35).

Au-delà de ces altérations, les LSEC perdent leurs capacités à capturer et à endocyter diverses particules circulantes, incluant les lipoprotéines oxydées, les complexes immuns et les débris cellulaires entraînant une accumulation de composés toxiques dans le microenvironnement hépatique et une aggravation du stress oxydatif. La régulation vasomotrice intra-hépatique est également perturbée due à la réduction de la production de NO, un vasodilatateur clé, tout en augmentant celle de l'endothéline-1, un vasoconstricteur, contribuant ainsi à l'élévation de la pression portale caractéristique des maladies chroniques du foie [209].

4.6.2. Effets de la capillarisation des LSEC sur l'activation des HSC

La perte du phénotype sinusoïdal des LSEC, en particulier de leur capacité immunomodulatrice et leur transition vers un état pro-inflammatoire, crée un microenvironnement propice à l'activation des HSC. Par ailleurs, la réduction de la production de NO par les LSEC capillarisées représente une altération fonctionnelle majeure, dans la mesure où ce médiateur exerce des effets paracrines, inhibiteurs directs, sur les cellules stellaires hépatiques. Laurie et al. ont démontré que la co-culture des HSC avec des LSEC capillarisées (obtenues *in vitro* ou isolées de rats cirrhotiques) induit une augmentation de l'expression de l'alpha-smooth muscle actin (α-SMA), marqueur d'activation des HSC. En revanche, en présence de LSEC normales, les HSC conservent leur état quiescent [213]. Une fois activées, les HSC deviennent myofibroblastes producteurs de composants de la MEC notamment le collagène, la fibronectine et les protéoglycanes. Cette production excessive et déséquilibrée de la MEC conduit à une accumulation progressive de tissu fibreux, favorisant la formation d'une lame basale continue

sous l'endothélium sinusoïdal, ce qui entrave davantage les échanges entre le sang et les hépatocytes, amplifie les dysfonctionnements métaboliques et perturbe l'homéostasie hépatique. L'ensemble de ces modifications structurelles et fonctionnelles provoque une rigidification du tissu hépatique, caractéristique principale de la fibrose hépatique consolidant l'état pathologique (Figure 35).

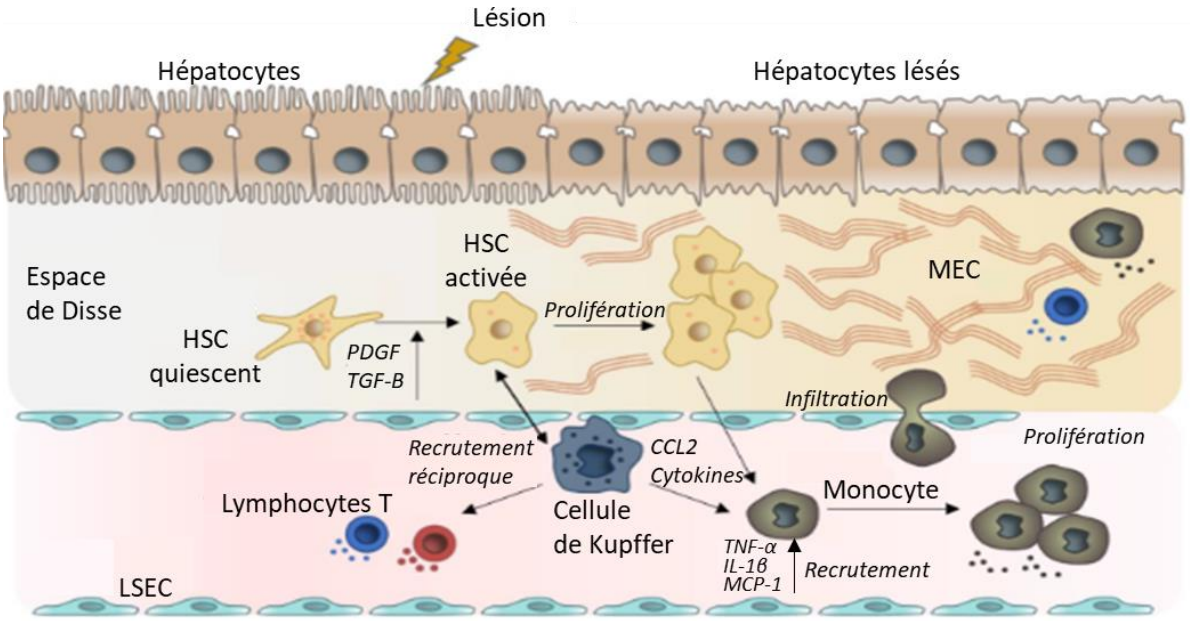


Figure 35. Réponse cellulaire à une lésion hépatique : capillarisation des LSEC, activation des HSC et recrutement immunitaire.

Suite à une lésion hépatique, les LSEC capillarisées sécrètent des signaux pro-inflammatoire et pro-fibrotique (PDGF-B, TGF-β, cytokines, molécules d'adhérence) qui activent les cellules étoilées hépatiques (HSC) et favorisent le recrutement immunitaire. Les HSC activées prolifèrent et produisent de la matrice extracellulaire, contribuant à la fibrose. Les cellules de Kupffer et les lymphocytes T participent également à l'amplification de la réponse inflammatoire et fibrotique via la sécrétion de médiateurs immunitaires et la modulation de l'infiltrat cellulaire (Figure adaptée de [214]).

Dans leur modèle murin de fibrose hépatique induite par le CCl_4, Mederacke et al. ont utilisé des souris transgéniques exprimant un rapporteur fluorescent (Col-GFP) sous le contrôle du promoteur de Col1a1, permettant d'identifier les cellules productrices de collagène. La triple colocalisation entre Col-GFP, l'α-SMA et du traceur tdTomato exprimé spécifiquement dans les HSC via le système *LratCre* a ainsi confirmé que ces dernières représentent la principale source de myofibroblastes responsables de la production de matrice extracellulaire, notamment de collagène [215] (Figure 36).

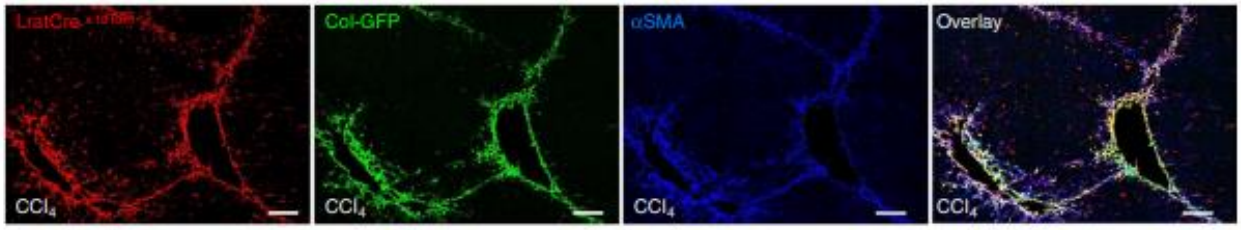


Figure 36. Les cellules étoilées du foie constituent la principale source de matrice extracellulaire, notamment de collagène.

Images de microscopie confocale réalisées sur du foie des souris transgéniques exprimant un rapporteur fluorescent Col-GFP, sous le contrôle du promoteur Col1a1, permettant d'identifier les cellules productrices de collagène (Figure adaptée de [215]).

De nombreux travaux expérimentaux ont mis en évidence le rôle central de la capillarisation des LSEC dans la progression de la fibrose hépatique.

Dans des modèles murins de NASH, de fibrose induite par le CCl_4 ou de cirrhose, la disparition des fenestrations, la formation d'une lame basale et l'adoption d'un phénotype capillaire par les LSEC sont systématiquement corrélées à l'activation des HSC et à l'accumulation excessive de matrice extracellulaire [180, 209, 216]. Des études ont également confirmé la présence d'un endothélium sinusoïdal dédifférencié chez des patients atteints de maladies chroniques du foie, caractérisé par une surexpression de molécules d'adhérence (VCAM-1, ICAM-1), et inflammatoire et de marqueurs endothéliaux capillaires, corrélée à l'apparition de fibrose [217, 218].

Ces données positionnent la capillarisation des LSEC comme un événement précoce et clé dans les pathologies du foie.

Toutefois, les mécanismes moléculaires qui contrôlent cette transition endothéliale et leur impact sur la communication intercellulaire restent largement méconnus. En particulier, la voie de signalisation BMP9/10/ALK1 mérite une investigation approfondie. Cette voie est considérée comme un régulateur clé du phénotype des LSEC. Son rôle dans la prévention de la capillarisation et de la fibrose est également important.

4.7. Vieillissement hépatique : altérations vasculaires et dysfonction des LSEC

Avec l'âge, le foie subit des altérations vasculaires progressives qui affectent profondément sa structure et ses fonctions. Des études d'imagerie par échographie ont montré une réduction du volume hépatique pouvant atteindre 20 à 40 % chez les personnes âgées [219]. Même en l'absence de pathologie clinique déclarée, l'âge induit une reprogrammation fonctionnelle et transcriptionnelle de l'ensemble des compartiments cellulaires hépatiques. Ce processus affecte la microcirculation sinusoïdale, désorganise les flux métaboliques, perturbe les réseaux de communication intercellulaire et modifie les réponses immunitaires

locales. Ces transformations contribuent à une fragilisation globale de l'organe, le rendant plus vulnérable aux agressions métaboliques, toxiques ou inflammatoires [220].

Les LSEC représentent une cible précoce du vieillissement vasculaire du foie, entraînant une dysrégulation microvasculaire liée à l'âge.

En effet, elles subissent une pseudocapillarisation, se traduisant par une perte progressive de leurs fenestrations, la formation partielle d'une lame basale, ainsi qu'une diminution de l'expression de marqueurs sinusoïdaux spécifiques tels que LYVE-1, et de marqueurs endothéliaux comme la VE-cadhérine [19].

Parallèlement, les LSEC âgées expriment anormalement un ensemble de gènes associés à la sénescence cellulaire, incluant IL-1α, IL-1β, p16, p21, p27, p53 et CCL2. Cette sénescence a aussi été confirmée par immunofluorescence, révélant une colocalisation des cellules positives à SA-βgal avec les LSEC exprimant VE-cadhérine, désignant ces dernières comme les principaux contributeurs à la sénescence vasculaire associée au vieillissement hépatique [19].

De plus, une diminution transcriptionnelle globale des gènes caractéristiques des sous-types endothéliaux hépatiques (cellules artérielles, capillaires et veineuses) est observée chez les souris âgés, indiquant une perte globale de l'identité endothéliale [19]. En outre, l'expression de l'enzyme eNOS est significativement diminuée avec l'âge. Cette altération pourrait contribuer à une diminution du débit sanguin sinusoïdal mais aussi perturbations de la microcirculation hépatique et surtout des déséquilibres métaboliques [220].

Ce remodelage s'accompagne également d'une reprogrammation zonale des LSEC, avec une perte spécifique des marqueurs péricentraux, en particulier c-Kit (CD117), un récepteur tyrosine kinase essentiel au maintien de la zonation hépatique [188].

La diminution de l'expression de c-Kit au sein des LSEC péricentrales est associée à l'activation de la voie CEBPA/CXCR4 et au recrutement de cellules inflammatoires, notamment des macrophages et des neutrophiles. Cette cascade pro-inflammatoire contribue à l'aggravation de l'inflammation hépatique, mais également à la progression de la stéatose et de la fibrose, en particulier dans les modèles murins de NASH.

Fait remarquable, la restauration expérimentale de c-Kit dans les LSEC âgées permet d'inverser partiellement ces altérations, soulignant le rôle central de cette voie dans le maintien de l'intégrité sinusoïdale et de l'homéostasie vasculaire hépatique au cours du vieillissement [19].

Par ailleurs, le vieillissement s'accompagne d'une augmentation de la polyploïdie hépatocytaire, d'une diminution du nombre et des capacités fonctionnelles des mitochondries, ainsi que d'une baisse des niveaux d'ATP. Cette altération bioénergétique est associée à une régression du réticulum endoplasmique lisse, compromettant la synthèse des protéines microsomales. Par ailleurs, la proportion relative d'hépatocytes dans le parenchyme

hépatique tend à diminuer avec l'âge, reflet d'une altération à la fois quantitative et fonctionnelle de cette population cellulaire [219, 221, 222].

Dans ce contexte, Lin et ses collaborateurs ont montré que, chez les souris âgées, l'activation des HSC, principales productrices de la MEC, est à l'origine d'une fibrose anormale du foie. En effet, les gènes associés à la MEC sont fortement surexprimés dans ces HSC âgées, révélant l'activation d'un programme transcriptionnel favorisant la fibrose [220].
Ces HSC agées expriment par ailleurs un large éventail de ligands, certains agissant sur les cellules endothéliales (*Wnt4, Wnt2, Sema3d, Gdf2, Bmp5*), tandis que d'autres ciblent diverses cellules immunitaires (*Tslp, Pf4, Mif, Cxcl12 et Ccl6*), notamment les cellules dendritiques, les cellules de Kupffer, les macrophages dérivés des monocytes, ainsi que les lymphocytes B et T [220].

L'analyse des interactions ligand-récepteur met en lumière une augmentation significative des signaux provenant des HSC en lien avec l'âge et l'inflammation, ce qui traduit une réorganisation fonctionnelle de ces cellules dans le cadre du vieillissement [220].

4.8. La voie de signalisation BMP9/10/ALK1 : un régulateur central de l'identité sinusoïdale des LSEC

Des études récentes ont déjà commencé à s'intéresser au rôle fondamental de la voie BMP9/10/ALK1 dans la préservation du phénotype sinusoïdal des LSEC. Alors que le chapitre précédent a établi l'importance de cette voie dans le maintien de l'homéostasie vasculaire et de la quiescence endothéliale, il est désormais crucial de s'intéresser à ses fonctions spécifiques dans le foie. En effet, au-delà de son rôle général dans la stabilité vasculaire, la signalisation ALK1 apparaît comme un régulateur central de l'identité des LSEC, en particulier dans la prévention de leur capillarisation. De plus, des travaux récents suggèrent qu'elle pourrait également intervenir dans le contrôle de la zonation métabolique hépatique, en modulant les interactions entre les LSEC et les hépatocytes. Une meilleure compréhension de ces mécanismes pourrait ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques.

4.8.1. Rôle de la voie BMP9/10/ ALK1 dans le maintien de l'identité des LSEC et l'homéostasie hépatique

L'implication de la voie BMP9 dans le maintien de l'identité des LSEC a été mise en évidence pour la première fois, en 2019, par notre équipe**.** En utilisant des souris déficientes en *Bmp9*, sur un fond génétique *129-Ola*, ils ont observé une série de modifications structurelles et moléculaires caractéristiques d'une capillarisation progressive des LSEC [223].

Les LSEC de ces souris présentaient une perte des fenestrations (Figure 37A), un dépôt anormal de collagène IV traduisant un épaississement de la membrane basale, ainsi qu'une expression accrue de CD34, marqueur typique d'un endothélium continu.

Sur le plan transcriptionnel, ces altérations étaient associées à une diminution notable de l'expression de plusieurs gènes signature des LSEC différenciées, notamment *Lyve1, Stab1, Stab2, eNos, Maf, Plvap,* ainsi que du facteur de transcription clé *Gata4*, indispensable à la spécification sinusoïdale [224]. Ces observations traduisent une perte de l'identité moléculaire des LSECs en l'absence de BMP9.

Fait remarquable, le traitement des LSEC isolées chez des souris avec du BMP9 a induit une restauration partielle des structures fenestrées, accompagnée d'une augmentation de l'expression de *Gata4* et de *Plvap*, deux régulateurs clés de l'identité endothéliale sinusoïdale suggérant que ce ligand exerce un effet direct sur les LSEC probablement via ALK1, contribuant au maintien de leur état différencié [223] (Figure 37B).

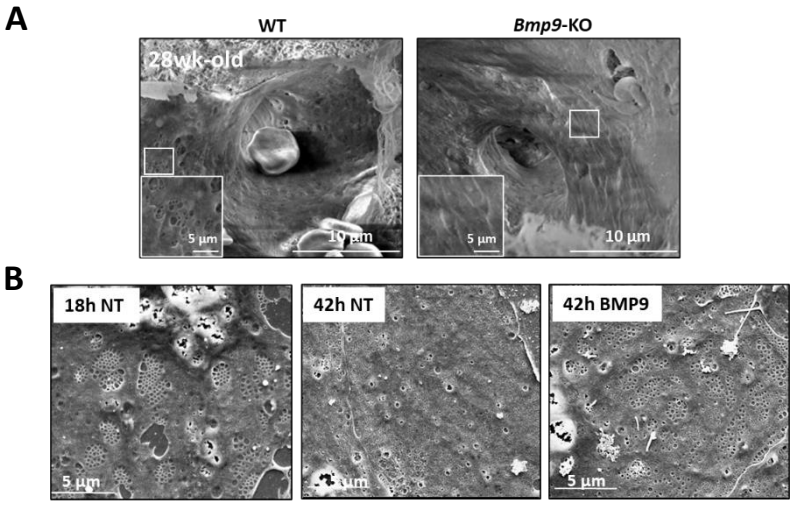


Figure 37. Perte des fenestrations des LSEC dans le foie des souris Bmp9-KO, et restauration ex vivo par l'administration de BMP9 [223] *.*

(A) Images en microscopie électronique à balayage (MEB) de tissus hépatiques provenant de souris adultes 129/Ola WT et Bmp9-KO adultes. Les petits encadrés délimitent des zones fenestrées de l'endothélium sinusoïdal, présentées avec un plus fort grossissement dans les encadrés agrandis correspondants.
(B) LSEC isolées de souris 129/Ola WT adultes mises en culture en présence ou non de BMP9 (10 ng/ml) pendant 18 h ou 42 h.

Une analyse transcriptomique réalisée par notre équipe sur ces souris a confirmé le rôle clé de BMP9 dans la spécialisation sinusoïdale des LSEC [225].

En 2021, Winkler et al. ont exploré les conséquences de la délétion de *Gata4* dans les cellules endothéliales hépatiques, en utilisant un promoteur (*Clec4g-icre*). Afin de mieux caractériser les altérations moléculaires, ils ont combiné des approches d'ATAC-seq (Assay for Transposase-Accessible Chromatin using sequencing) et de cartographie des marques épigénétiques actives par ChIP-seq (Chromatin Immunoprecipitation followed by sequencing). L'ATAC-seq leur a permis d'identifier les régions du génome où la chromatine devenait plus

ou moins accessible, reflet de changements dans la régulation des gènes, tandis que le ChIP-seq a mis en évidence les sites associés à des promoteurs actifs.

Ces analyses ont révélé une réorganisation profonde du profil épigénétique dans les LSEC dépourvues de *Gata4*, avec une perte d'accessibilité dans les régions associées aux gènes sinusoïdaux et un gain d'accessibilité dans celles liées à un phénotype capillaire. De plus, une activation des cellules étoilées hépatiques a été observée, soulignant un lien fonctionnel entre la perte d'identité endothéliale et l'induction d'un environnement pro-fibrogène [57].

Ces données et d'autres [174, 224] placent GATA4 comme un régulateur transcriptionnel central de l'identité sinusoïdale des LSEC. Étant donné que GATA4 a été identifié comme une cible transcriptionnelle de BMP9, ces observations suggèrent que la voie BMP9/10/ALK1 joue un rôle essentiel dans le maintien du phénotype sinusoïdal et dans la prévention de la capillarisation pathologique de l'endothélium hépatique.

En 2023, Schmid et al. ont étudié le rôle crucial de la signalisation ALK1 dans l'établissement de l'identité des LSEC ainsi que dans l'homéostasie vasculaire et métabolique du foie. Les auteurs ont utilisé un modèle murin dans lequel la délétion d'*Alk1* est spécifique et constitutive des LSEC grâce à l'utilisation du promoteur *Stab2* (*Stab2-iCreF3*) [226]. L'analyse transcriptomique par bulk RNA-seq a révélé une reprogrammation profonde de l'endothélium hépatique, caractérisée par un profil pro-angiogénique, avec activation de voies associées à la prolifération et à l'angiogenèse (ex. Apelin, PI3K-Akt, Myc) et une identité endothéliale continue marquant une perte d'organotypie et une transition vers un endothélium vasculaire activé [226].

Lorsque j'ai débuté ma thèse, très peu d'études s'étaient intéressées au rôle d'ALK1 et à sa signalisation en particulier dans le foie des souris adultes. Le modèle de Schmid et al., dans lequel la délétion d'*Alk1* est constitutive dès la naissance, reflète certains aspects de la physiopathologie des patients atteints d'HHT, chez lesquels la mutation est présente dès le développement embryonnaire [226]. Cependant, ce modèle ne permet pas de dissocier les effets liés au développement de ceux observés à l'âge adulte, ce qui complique l'interprétation des mécanismes pathogéniques actifs dans les tissus matures. Par ailleurs, les analyses transcriptomiques réalisées, reposaient principalement sur des approches de bulk RNAseq, qui, en agrégeant les signaux de l'ensemble des cellules, masquent l'hétérogénéité cellulaire et limitent la compréhension fine des altérations propres à chaque sous-type endothélial.

En 2024, au début de ma troisième année de thèse, une nouvelle étude a exploré le rôle des ligands d'ALK1, *Bmp9/10*, dans le foie. En utilisant un modèle de souris adultes double knock-out constitutives pour *Bmp9/10* dans les cellules étoilées hépatiques, les auteurs ont confirmé la perte d'identité des cellules endothéliales sinusoïdales hépatiques (LSEC), notamment via la diminution de l'expression de marqueurs tels que *Gata4* et *Maf*, et une dédifférenciation vers un phénotype de cellules endothéliales continues. Cette étude s'est appuyée sur des

analyses en bulk RNAseq. De plus, les auteurs ont mis en évidence une fibrose hépatique chez ces souris, caractérisée par une accumulation accrue de matrice extracellulaire [227].

Ainsi, la signalisation BMP9/BMP10/ALK1 est indispensable à la régulation de l'identité sinusoïdale.

En effet, la distribution spatiale des fonctions hépatocytaires, notamment l'expression péricentrale de gènes régulés par la voie Wnt/β-caténine, tels que *Glul*, *Cyp2e1* ou *Axin2*, dépend de la production localisée de *Wnt2*, *Wnt9b* et *Rspo3* par les LSEC péricentrales [190]. La perturbation de l'identité des LSEC et de leur programme transcriptionnel pourrait donc altérer leur capacité à émettre ces signaux angiocrines, affectant ainsi le couplage structurel et fonctionnel avec les hépatocytes. Dans ce contexte, il reste à déterminer dans quelle mesure la signalisation ALK1 contribue à l'organisation spatiale et fonctionnelle du parenchyme hépatique, notamment à travers le contrôle de la zonation métabolique.

4.8.2. Effet de cette voie sur la zonation hépatique

Dans le modèle murin de délétion spécifique d'*Alk1* dans l'endothélium hépatique, Schmid et al. ont mis en évidence que la perte du programme sinusoïdal des LSEC est corrélée à une altération de la signalisation Wnt/β-Caténine hépatocytaire et à une désorganisation de la zonation portocentrale [226]. De manière concordante, Winkler et al. ont montré qu'une capillarisation des LSEC induite par l'invalidation de *Gata4* conduit à une perturbation similaire de la zonation et à l'apparition d'une fibrose (diminution de l'expression de *Wnt2, Wnt9b, Rspo3*) [57]. Ces observations soutiennent l'idée que la capillarisation des LSEC altère la communication vasculo-parenchymateuse, en compromettant la transmission de signaux nécessaires à la spécialisation zonale des hépatocytes.

Ces observations ont été renforcées en 2024 par les travaux de Zhao et al., qui ont montré, chez les souris *Bmp9/10* double KO, une désorganisation de la zonation hépatique, en lien avec une altération de la signalisation Wnt/β-caténine et des dysfonctionnements métaboliques, notamment liés au fer [227].

Il est donc probable que la signalisation BMP9/10/ALK1 préserve à la fois l'identité moléculaire des LSEC et les conditions physiques requises pour un microenvironnement permissif à la diffusion des signaux angiocrines contrôlant les fonctions du parenchyme hépatique. Cependant, les mécanismes cellulaires et transcriptionnels précis par lesquels cette voie orchestre l'homéostasie de l'endothélium hépatique adulte restent à élucider.

Cela souligne l'importance de développer un modèle de délétion inductible spécifique aux cellules endothéliales chez l'adulte, permettant de décortiquer les effets de la perte d'*Alk1* chez les souris adultes. Par ailleurs, des approches de transcriptomique à cellule unique (scRNAseq) apparaissent essentielles pour saisir l'hétérogénéité des réponses endothéliales et caractériser finement les altérations propres à chaque sous-type cellulaire.

Objectifs

Le récepteur ALK1, principalement exprimé à la surface des cellules endothéliales, joue un rôle essentiel dans la régulation de la quiescence et de l'homéostasie vasculaire. Activé par ses ligands BMP9 et BMP10, il contrôle finement la prolifération, la migration des cellules endothéliales. Des mutations du gène codant pour ALK1, et de son corécepteur endogline, sont responsables d'environ 90 % des cas de la maladie de Rendu-Osler ou HHT. Cette pathologie rare touche plusieurs organes, et en particulier le foie pour les mutations d'*ACVRL1* et les poumons pour les mutations d'*ENG*. Les atteintes vasculaires hépatiques sévères conduisent, dans un grand nombre de cas, à une défaillance cardiaque nécessitant dans les cas les plus graves la nécessité d'une transplantation hépatique.

La maladie tend à s'aggraver avec l'âge, période où les premières manifestations cliniques significatives apparaissent. Pourtant, la grande majorité des études existantes se sont concentrées sur des modèles néonataux, laissant largement inexploré le rôle d'ALK1 dans un contexte adulte. Ce point est crucial, car le vieillissement endothélial modifie profondément les propriétés des cellules vasculaires, altère la signalisation et peut amplifier les effets délétères d'une perte d'ALK1. C'est pourquoi nous avons choisi d'induire la délétion d'*Alk1* spécifiquement dans les cellules endothéliales de souris adultes âgées de deux mois, afin d'étudier les conséquences de cette perte dans un système vasculaire déjà mature.

Je me suis intéressée dans un premier temps aux effets de la délétion d'*Alk1* sur l'homéostasie du foie, un organe clé du métabolisme et de la régulation systémique, dont la vascularisation est unique par sa structure et ses fonctions.

J'ai cherché à comprendre comment la perturbation de cette voie influence non seulement la quiescence vasculaire et la zonation hépatique, mais aussi la communication entre les cellules endothéliales sinusoïdales et les autres acteurs du microenvironnement hépatique.

J'ai également exploré si l'absence d'*Alk1* pouvait mimer ou accélérer certains aspects du vieillissement vasculaire, amplifiant ainsi les altérations structurelles et fonctionnelles de l'endothélium.

Ce travail fait l'objet d'un article qui sera bientôt soumis.

Je me suis également intéressée aux poumons de ces souris délétés pour *Alk1*. Une analyse scRNAseq a également été réalisée. Par faute de temps je n'ai pu que débuter cette exploration. Ces premiers résultats préliminaires sont présentés dans une deuxième partie.

Chapitre 5 : Résultats et méthodologies

5.1. Article de thèse

ALK1 in adult endothelium maintains liver homeostasis by preventing premature aging

Yasmin Rida[1], Dzenis Koca[1], Agnès Desroches-Castan[1], Aude Salomon[1], Emmanuelle Tillet[1], Léa Beurier-Soulat[1], Léa Vialet[1], Nicolas Chaumontel[1], Alexandre Guillhem[2], Sophie Dupuis-Girod[1,2], Laurent Guyon[1], Sabine Bailly[1], Nicolas Ricard[1].

[1]Biosanté unit U1292, INSERM, Grenoble Alpes University, CEA, F-38000 Grenoble, France. [2]Hospices Civils de Lyon, National HHT Reference Center and Genetics Department, F-69677 Bron

Corresponding author: Nicolas Ricard, nicolas.ricard@inserm.fr

The authors have declared that no conflict of interest exists.

Abstract

In Hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT), severe liver vascular malformations are associated with mutations in the ACVRL1 gene encoding the receptor ALK1 (activin receptor-like kinase 1) expressed mostly on endothelial cells. These vascular malformations increase with age with a full penetrance around fifty years. To address the molecular mechanisms behind hepatic vascular malformations related with ALK1 loss-of-function, we induced *Alk1* deletion in adult mice using the VE-cadherin endothelial promoter. We found that *Alk1* endothelial deletion in adult mice leads to lethality within 8 days with lungs, intestine and liver defects. scRNAseq analysis of the whole liver showed that ALK1 plays a key role in adult mice in the maintenance of LSEC zonation identity and fenestration and liver intercellular signaling. LSEC expression of Wnt genes targeting pericentral hepatocytes is reduced, disrupting hepatocyte zonation (*Glul and Ass1*) while expression of *Pdgfb* and *Lrg1* genes targeting HSC are increased, promoting fibrosis. *Alk1* deletion also reduces pericentral endothelium-derived Kit expression, accelerating vascular aging across the whole liver. We could further show that loss of one *Alk1* allele in adult mice is sufficient to induce significant alterations in LSEC and hepatocyte zonation which is also altered in livers from HHT patients. We believe that our data demonstrate a key role of ALK1 in the maintenance of adult endothelium, providing insight into the late-onset vascular defects characteristic of the disease.

Introduction

The liver is in charge of vital physiological functions such as metabolic regulation of lipids, glucose and iron, immune surveillance, xenobiotic and toxin detoxifications, plasma protein synthesis, and bile secretion (1). The main cell types involved in these functions are hepatocytes, the primary parenchymal cells of the liver, endothelial cells (EC), hepatic stellate cells (HSC), and resident macrophages called Kupffer cells (KC). The architecture of the liver is highly organized in units called lobules. The vascular system of each lobule in unique as there is a dual blood supply with oxygen-rich blood coming from the hepatic artery and nutrient-rich blood coming from the portal vein. Both supplies merge into capillaries called sinusoids, lined by specialized EC called liver sinusoidal EC (LSEC) (2). Sinusoids are the site of exchanges between blood and hepatocytes. Then, the blood is drained into the central vein. In the space between EC and hepatocytes, known as the space of Disse, reside HSC. These mesenchymal cells store vitamin A and, in the case of liver injury, can become activated to produce extracellular matrix. On the luminal side of the sinusoids are KC, which are responsible for immune surveillance and phagocytosing foreign particles, bacteria, and old red blood cells.

A key feature of the liver functional organization is its zonation along the sinusoids following an axis from portal side to central side (3). This zonation is driven by gradients of oxygen, nutrients, hormones, and signaling molecules (4). As blood flows from the oxygen-rich periportal region to the oxygen-poor pericentral region, hepatocytes adapt their metabolic functions. For example, periportal hepatocytes are highly active in oxidative metabolism, while pericentral hepatocytes specialize in glycolysis and detoxification of xenobiotics. This zonation isn't limited to hepatocytes. LSEC also exhibit a zonated phenotype with distinct roles in regulating immune response and maintaining vascular integrity. LSEC are key contributors to the zonation of the hepatocytes through the secretion of angiocrine signaling molecules like Wnt. For example, secretions of Wnt2 and Wnt9b by EC on the central side are key to induce central hepatocyte phenotypes (5). This intricate cozonation between LSEC and hepatocytes ensure a cohesive unit, with the metabolic activities of hepatocytes being precisely regulated and supported by the specialized functions of the surrounding LSEC (6).

Capillary EC are highly heterogenous, exhibiting organ-specific features (7). LSEC are no exception presenting several key features that distinguish them from endothelial cells in other organs (8). First, LSEC present numerous small, transcellular pores called fenestrations, allowing for direct passage of molecules between the sinusoidal blood and the Space of Disse, where hepatocyte microvilli reside. This high porosity, combined with the absence of a continuous basement membrane, makes LSEC the most permeable EC in the body. Second, LSEC are exceptionally active scavenger cells, possessing a high number of endocytic receptors on their surface. Third, LSEC are part of the unique hepatic immune environment, which is characterized by a state of ‘’immune tolerance”. LSEC can also act as antigen-presenting cells. Upon injury and aging, LSEC lose their specific identity, including their fenestrations and gain a continuous basement membrane, in a process called capillarization (8). Capillarized LSEC

modify their angiocrine signaling, affecting hepatocyte functions, and harboring proinflammatory and profibrotic phenotypes. Capillarization of LSECs is thought to be an early event in various liver pathologies, whereas pseudocapillarization occurs with aging and is characterized by milder structural alterations and partial loss of fenestrations (9, 10).

Thus, identifying key molecular players responsible for LSEC identity establishment and maintenance are critical to prevent or treat liver diseases. GATA4 is a transcription factor highly express in LSEC. Deletion of *Gata4* in EC in mouse embryos, neonates or adults leads to loss of LSEC specific markers, and capillarization of LSEC (11). Upstream signaling pathways regulating *Gata4* expression are less defined. Activin-receptor like kinase 1, ALK1, is a receptor of the Bone morphogenetic protein (BMP) family. ALK1 ligands are BMP9 and BMP10 which are both secreted by HSC and cardiomyocytes for BMP10 (12). ALK1 is specifically expressed in EC and, in liver, is also expressed in KC. Recently, several evidences show the critical roles of this pathway in LSEC differentiation. First, constitutive deletion of *Bmp9* in a 129/Ola genetic background affects LSEC differentiation and fenestration (13). Second, constitutive deletion of *Alk1* in LSEC prevents correct LSEC differentiation, without affecting LSEC fenestration but affects LSEC and hepatocyte co-zonation (14). Third, constitutive deletion of *Bmp9* and *Bmp10* in HSC of C57Bl6 mice also affect LSEC differentiation, hepatocyte zonation, and KC specification (15). While BMP9-10/ALK1 signaling seem critical for the establishment of LSEC identity, nothing is known about the roles of this pathway in the maintenance of LSEC identity in adult mice and subsequent hepatocyte zonation and liver homeostasis.

Heterozygous loss-of-function mutations in *ACVRL1* (activin A receptor-like type 1), encoding ALK1, together with mutations in its co-receptor endoglin, are found in a rare vascular disease called Hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT) (16). HHT is characterized by telangiectasia, vascular malformations (VM) and bleeding. Telangiectasia occur on mucocutaneous surfaces such as skin, the gastrointestinal tract and buccal mucosa. VMs occur in internal organs such as the liver, lung and brain. The severity, age of onset and locations of the vascular lesions are variable. Hepatic VMs are seen in up to 74% of HHT patients, whereas only 8% are symptomatic at diagnosis. Liver VMs typically present as small diffuse lesions throughout the liver rather than discrete large VMs (17) . Three types of intrahepatic shunting can be seen (18): (1) hepatic artery to hepatic veins; (2) hepatic artery to portal veins and (3) portal veins to hepatic veins, leading to different and potentially overlapping clinical features including portal hypertension (PH) and high-output heart failure (HOHF). Bevacizumab, an anti-VEGF monoclonal antibody, has been shown to be effective in reducing cardiac output whilst liver transplantation is the only curative option for liver VMs (16, 19). Hepatic VMs are more common and tend to be more severe in patients with *ACVRL1* mutations. Notably, hepatic VMs in HHT increase with age and the mean age of liver VMs is 48 years and is more frequent in women (16). Thus, we hypothesized that ALK1 is critical in maintaining liver vascular homeostasis in adulthood.

To address this question, we deleted endothelial *Alk1* in adult mice. We performed single cell RNA sequencing (scRNAseq) on liver tissues from these mice seven days after *Alk1* deletion, generating a comprehensive molecular atlas of the effects of *Alk1* deletion in all liver cell types. We found that LSEC identity is rapidly lost following *Alk1* deletion (generation of a continuous endothelium, loss of EC fenestration), affecting hepatocyte functions such as detoxification, and activating HSC. We identified profound alterations in cell-cell communications, with a decrease in Wnt signaling from LSEC to hepatocytes, and a gain in PDGF-B and LRG1 signaling from LSEC to HSC, as well as an increase in Semaphorin3A (Sema3A). Interestingly, we also showed that loss of one *Alk1* allele in adult mice was sufficient to induce significant alterations in LSEC and hepatocyte zonation which was also altered in livers from HHT patients carrying heterozygous *ACVRL1* mutations.

Material and methods

Animal models

Alk1$^{fl/fl}$ mice (20) were crossed with Cdh5-CreERT2 mice (21) (CreERT2 under the control of the endothelial-specific Cdh5 promoter) to generate Cdh5-CreERT2; *Alk1*$^{fl/fl}$ animals. Cdh5Cre-ERT2 *Alk1*$^{lox/WT}$ mice were also used.

For endothelial cell lineage tracing, Rosa26-ZsGreen reporter mice were obtained from Jackson laboratory and crossed with Cdh5-CreERT2 mice to generate Cdh5-CreERT2; ZsGreen animals.

Tamoxifen was dissolved in corn oil (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) to a final concentration of 10 mg/mL. Deletion of *Alk1* was induced in 2-month-old Cdh5-CreERT2; *Alk1*$^{fl/fl}$ (hereafter denoted *Alk1*^{iECKO}) mice by intraperitoneal injection of tamoxifen (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) (50 mg/kg) once daily for 3 consecutive days. WT mice were 2-month-old *Alk1*$^{fl/fl}$ mice injected with similar doses of tamoxifen.

Genotypes were confirmed by PCR analysis of genomic DNA extracted from tail biopsies, using primers specific for the floxed *Alk1* allele, the CreERT2, and the ZsGreen reporter.

All animal procedures were approved by the CEA ethics committee and the French Ministry of Higher Education and Research, and conducted in accordance with institutional guidelines formulated by the European Community for the Use of Experimental Animals (agreement APAFIS 45896-2023111317017897).

Human materials from liver transplantation

We analyzed liver samples of seven patients with HHT who had undergone liver transplantation and compared them to four archival, disease-free liver tissue. Informed signed consent from liver transplant candidates were obtained from all patients for the use of

explanted livers for diagnostic and scientific studies. The study received Bioethics agreement (DC-2023-5693).

Histological and immunofluorescence procedures

Liver and lung tissues from 2-month-old mice euthanized by CO_2 inhalation were fixed overnight in 4% paraformaldehyde at 4°C, dehydrated through graded ethanol and xylene, embedded in paraffin, and sectioned at 5 µm. Hematoxylin–eosin (H&E) and Masson's trichrome staining (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) were performed on deparaffinized sections according to standard protocols. For Perls Prussian blue staining, sections were incubated for 30 min in a 1:1 mixture of 2% potassium ferrocyanide and 2% hydrochloric acid, rinsed, and counterstained with 1% neutral red for 15 s; hemosiderin deposits appeared blue and nuclei red. For immunofluorescence, rehydrated sections were permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS, underwent appropriate antigen unmasking, blocked with 5% BSA, and incubated overnight at 4°C with primary antibodies (Table 1), followed by fluorophore-conjugated secondary antibodies for 1 h at room temperature. Images were acquired using a Zeiss Apotome fluorescence microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany) and analyzed with ImageJ software (NIH, Bethesda, MD).

Human liver biopsy specimens collected post-surgically from explanted livers were fixed in buffered formalin, processed, embedded in paraffin, sectioned at 4 µm, and subjected to the same staining protocols as murine tissues.

Fluorescent microbeads

Fluorescent 45-µm microspheres (Polysciences, Inc.) were injected into the left ventricular chamber of mice anesthetized with 4% isoflurane. Euthanasia was performed via intraperitoneal injection of hexagon (180 mg/kg), followed by organ harvest. Fluorescent beads trapped within the tissue vasculature were then visualized using a Zeiss Axiobserver microscope.

Liver cell isolation for scRNAseq

Following euthanasia of mice by CO_2 inhalation, cardiac perfusion was performed with 5 mL of ice-cold PBS to flush the circulatory system and remove residual blood. The liver was excised, placed in cold serum-free DMEM, and finely minced. Tissue digestion was carried out in 20 mL of collagenase/dispase (Sigma-Aldrich) solution (1.5 mg/mL) supplemented with DNase I (Sigma-Aldrich) (0.1 mg/mL) in PBS at 37°C for 20 minutes, followed by homogenization through 12 passages with a cannula. The suspension was filtered through a 40 µm filter, diluted with PBS BSA 1% to a final volume of 50 mL, and centrifuged at 350 × g for 5 minutes and resuspended in PBS (-/-). In order to remove most hepatocytes, suspension was centrifuge at 50g for 5 min once and supernatant was used. Cells were then centrifuged to be resuspended in 300 µL BSA 0.5% in PBS, and counted with trypan blue, and diluted to 106 cells/mL in PBS BSA 0.5%.

scRNA-seq

Individual cell droplets were done using 10x Genomics Chromium. Single-cell RNA-seq libraries were prepared using the Chromium Single Cell 3' assay according to the manufacturer's protocol. Libraries were sequenced on an Illumina platform at the ProfileXpert sequencing facility, Université Claude Bernard Lyon 1.

scRNA-seq data analysis

scRNAseq was performed on cells from four WT and four *Alk1*^{iECKO} mice. Raw UMIs (unique molecular identifiers) matrices were processed using the 'Seurat v4' package in R (22). Initial quality control (QC) was performed using the 'miQC' framework for R (23) combined with visual inspection of expression distributions. Cells with a posterior probability >0.5 of being low-quality (as determined by miQC) or expressing fewer than 500 genes were excluded. Data were normalized using the 'SCTransform' pipeline. To correct for batch effects across samples/mice, data were integrated following Seurat's canonical correlation analysis (CCA)-based procedure for SCTransform-normalized data.

The integrated dataset was used for clustering and visualization of major cell populations. Cell identities were assigned based on canonical marker gene expression. Each major cell type was then subset and reclustered using the same workflow. Subclusters were annotated using canonical markers, and putative doublets (cells co-expressing mutually exclusive lineage markers) were removed. A second round of QC was applied within each major lineage, removing cells with fewer than 1000 detected genes. This two-step QC approach prevented the exclusion of legitimate low-RNA cell types in the first pass, while improving stringency in the refined analysis. QC did not pass from one WT scRNAseq and was discarded from the rest of the analysis.

Differential gene expression between wild-type (WT) and knockout (*Alk1*^{iECKO}) cells was assessed for each cell type and subtype using Seurat's 'FindMarkers' function (Supp table 1-6). Functional interpretation of differentially expressed genes was performed with gene set enrichment analysis (GSEA), implemented in the 'clusterProfiler' package (24). Gene sets were retrieved using the 'msigdbr' package for R (species = Mus musculus, accessed 25/08/2022).

LSEC isolation

Anti-rat magnetic beads (50 µL) (11035, Invitrogen) were washed in PBS containing 1% BSA and incubated with 5 µL of rat anti-mouse CD31 antibody (BD553370, Becton Dickinson) on a rotator overnight at 4°C. Beads were subsequently washed with PBS containing 1% BSA and stored at 4°C until use.

Following tissue digestion (as described in the liver cell isolation section), cell suspensions were centrifuged, washed, and resuspended in PBS (-/-). Antibody-coated magnetic beads were added to the cell suspension and incubated on a rotator at room temperature for 20

minutes. The beads, binding CD31-expressing cells, were then washed at least eight times with PBS containing 1% BSA to obtain purified LSECs.

RTqPCR

RNA was extracted from whole liver tissue or isolated LSECs using the NucleoSpin RNA kit (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's protocol. 500 ng of RNA was reverse-transcribed into cDNA using the iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad) on a T100 thermal cycler (Bio-Rad). Reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR) was then performed using SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad) in a CFX96 Real-Time System (Bio-Rad). Data analysis was conducted utilizing the CFX Manager Software V3.1 (Bio-rad), then gene expression levels were calculated utilizing $2^{-\Delta Ct}$ method with *Rpl13a* or *Hprt* as the reference housekeeping gene. All primer sequences used for RT-qPCR were pre-designed using primer blast tool and purchased from Sigma (Table 2).

Western Blot

Protein extracts were prepared from whole liver tissue lysed in a Tris-based lysis buffer supplemented with a protease inhibitor cocktail and phosphatase inhibitor cocktails 2 and 3 (Sigma-Aldrich). Equal amounts of protein (40 µg) were separated by SDS–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) on 4–20% precast protein gels (Bio-Rad) and transferred onto nitrocellulose membranes using the Mini Trans-Blot system (Bio-Rad). Membranes were blocked with InstantBlock buffer (Sigma) and subsequently probed with primary antibodies against c-Kit (Cell signaling 3074, Dilution: 1/1000) or β-actin (Sigma, A5441; Dilution: 1/5000). Following incubation with HRP-conjugated secondary antibodies, membranes were developed using enhanced chemiluminescence (ECL; Bio-Rad) or SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific™). Images were acquired with a ChemiDoc™ Imaging System (Bio-Rad), and chemiluminescent signal intensity was quantified using Image Lab Software version 6.0.1 (Bio-Rad).

Scanning electron microscopy

Livers were collected from mice perfused with a fixative solution containing 2.5% glutaraldehyde and 2% paraformaldehyde (PFA). Tissue sections of 300 µm thickness were obtained using a vibratome and subsequently fixed in 2.5% glutaraldehyde and 2% PFA for 2 hours at room temperature. After washing, samples underwent post-fixation in 1% osmium tetroxide (OsO_4) for 1 hour. Following this step, the sections were dehydrated through a graded ethanol series, then immersed in hexamethyldisilazane (HMDS) and allowed to dry at room temperature. Dried samples were mounted on aluminum stubs using conductive adhesive tape and sputter-coated with a thin layer of platinum to ensure conductivity for scanning electron microscopy (Ultra55A Zeiss).

Ammonium concentration

Ammonium concentration in urine was quantified using the Ammonium Assay Kit from Abcam (ab83360) following manufacturer instructions.

Statistical analysis

Graphs and statistical analyses were generated using GraphPad Prism software. Data were analyzed using either Mann–Whitney, one-way ANNOVA tests or unpaired t-test with Welch's correction and were considered as significant when P-value <0.05 (*), <0.01 (**), and <0.001 (***). For each experiment, n and statistical tests used are indicated in the figure legends.

Results

Endothelial Alk1 deletion in adult mice results in lethality with hemorrhages in the lungs and GI tracts and liver injury

To assess ALK1 functions in the quiescent adult endothelium, we used inducible endothelial knock-out *Alk1* mice obtained by crossing mice carrying a tamoxifen inducible Cre recombinase under the promoter of VE-Cadherin (Cdh5Cre-ERT2 strain) with *Alk1*$^{lox/lox}$ mice. Adult (2-month-old) mice were injected with tamoxifen for three consecutive days. Endothelial *Alk1* KO mice (hereafter denoted *Alk1*^{iECKO}) died in about 1 to 2 weeks post tamoxifen injection (Figure 1A). While the exact cause of death is difficult to determine, bleeding was frequently found in lungs and in intestines including caecum (Figure 1B). We collected organs 7 days after the first tamoxifen injection, and found siderophages, corresponding to iron-loaded macrophages marked by Perls Prussian blue staining on lung sections of *Alk1*^{iECKO} mice further supporting that pulmonary bleeding started few days before tissue collection (Figure 1B). All the following experiments were done in adult (2-month-old) mice and analyzed 7 days post tamoxifen injections, unless stated otherwise.

We next assessed whether *Alk1* deletion in adult mice resulted in arteriovenous (AV) shunts or capillary dilation by injecting fluorescent beads into the left ventricle. In WT mice these beads are stuck in the capillary beds of systemic organs but in presence of AVs or dilated vessels, they can reach the pulmonary circulation (25). We found that in several *Alk1*^{iECKO} mice (6/12) fluorescent beads could be detected in the lungs but not in WT mice, suggesting the presence of systemic AV or dilated capillaries (Figure 1C).

As liver is one of the most affected organs in HHT patients carrying *ACVRL1* mutations (16), we performed histology on liver sections from WT and *Alk1*^{iECKO} mice. We found signs of hepatocyte suffering as seen by whitish areas after hematoxylin eosin (H&E) staining, suggesting necrosis (Figure 1D). We also found immune cells infiltration in liver from *Alk1*^{iECKO} mice (arrows, Figure 1D). Nuclei of some hepatocytes, but not of endothelial cells, detected using podocalyxin staining, showed pyknosis (arrowheads, Figure 1D) and were positive for γ-H2AX (H2A histone, family member X) further suggesting hepatocyte injury (Figure 1D).

Altogether, these results showed that deletion of endothelial *Alk1* in quiescent vasculature induces liver injury beyond endothelial cells in less than 1 week.

Endothelial Alk1 deficiency in adult mice leads to swift loss of LSEC differentiation and zonation, as well as stellate cell activation and fibrotic remodeling.

To investigate how *Alk1* inactivation on endothelial cells affected liver homeostasis, we performed single cell RNA sequencing (scRNAseq) on the liver of adult *Alk1*^{iECKO} mice versus *Alk1*$^{lox/lox}$ control mice, collected 7 days after tamoxifen injection (Supp. Figure 1A). A high number of hepatocytes were discarded by a light centrifuge in order to be able to detect all the different cell types of the liver. We sequenced 7538 cells from WT mice and 3651 cells from *Alk1*^{iECKO} mice. UMAP visualization revealed clusters of endothelial cells, hepatocytes, stellate cells, Kupffer cells, cholangiocytes and different immune cells (Figure 2A) based on markers published in (26). We focused first on endothelial cells. In liver, capillary endothelial cells are zonated along the hepatocytes. Blood supply arrives through the portal side of the vasculature, then go through the capillary beds called sinusoids, and exits the liver by the central vein (Supp Figure 1B). We were able to subcluster endothelial cells into 5 clusters going from portal vein endothelial cells (EC_PV), then 3 clusters of liver sinusoidal endothelial cells (LSEC _L1-L3), to central vein endothelial cells (EC_CV) (Supp Figure 1B, Figure 2B). Unintegrated clustering of LSEC showed that LSEC from *Alk1*^{iECKO} mice have a transcriptomic signature different from LSEC from WT mice as both genotypes showed almost no overlap in clustering (Figure 2C). In our mouse model, Cre activation deletes exons 4 and 5 of *Alk1* (20). We and other could not detect this deletion by sequencing RNA from 3' end (14). Thus, we assessed the efficiency of *Alk1* deletion by evaluating already published ALK1 target genes in the different endothelial clusters. It is interesting to note that the ALK1 signaling pathway in endothelial cells seemed to be zonated, with a higher activity on the portal vein side (Supp. Figure 1C). We found that all ALK1's target genes were downregulated in *Alk1*^{iECKO} mice in all the zones when compared to control mice (Supp. Figure 1C). *Apln*, a known gene repressed by ALK1 signaling, expressed at a relatively low level in WT LSEC, was found increased in *Alk1*^{iECKO} mice (Supp. Figure 1C). Altogether, this clearly demonstrated the efficiency of *Alk1* invalidation in *Alk1*^{iECKO} mice.

LSECs are highly specialized endothelial cells in the liver, exhibiting distinct zonation patterns from the portal vein, via LSEC to the central vein (Figure 2B). This can be easily illustrated by a heatmap delineating three subclasses of capillary endothelial cells (portal, LSEC, central) within the five different clusters of endothelial cells (Figure 2D). This unique zonation can be lost through capillarization, a process observed in the context of chronic liver disease and aging, wherein LSEC revert to a more generic continuous endothelial cell state. We found that portal vein endothelial cell markers were mildly affected by *Alk1* deletion (Figure 2D). However, LSEC markers and central vein endothelial cell markers were dramatically decreased following *Alk1* deletion (Figure 2D). Notably, we observed that continuous endothelial markers usually not or lowly expressed in LSEC such as extracellular matrix components

(*Collagen 4, Fibronectin 1*), endomucin (*Emcn*) and *Pdgfb*, were increased following *Alk1* deletion while LSEC specific markers such as Lyve1, a marker typically exclusive to lymphatic endothelial cells in other organs but expressed in vascular capillary ECs in liver, was decreased (Figure 2D). Lyve1 and endomucin dysregulations could be confirmed at the protein level by immunostainings (Figure 2E). These dysregulations occurred very rapidly as differences could be already observed as soon as 2 days after the first tamoxifen injection (Supp Figure 2). Upregulation of extracellular matrix proteins such as collagen IV and fibronectin following *Alk1* deletion could also be validated at the protein levels (Figure 2F). LSEC express a trio of key transcription factors (TF) (GATA4, MEIS2, C-MAF) that orchestrate their organotypic differentiation (6). Interestingly, we found that these three TFs were downregulated in *Alk1*^{iECKO} mice (Figure 2D). A critical structural characteristic of LSEC is their fenestrations, which enable efficient exchange between plasma and hepatocytes. We found that *Alk1* invalidation induced a loss of LSEC fenestration (Figure 2G). Both VEGF and BMP9 signaling are important for LSEC fenestration maintenance (13, 27). We found that *Kdr*, coding for the receptor VEGFR2, is downregulated in LSEC from *Alk1*^{iECKO} mice (Supp Figure 3A) suggesting that VEGF signaling might also be reduced in *Alk1*^{iECKO} mice. Together, these results show that ALK1 is critical for the maintenance of liver LSEC specific characteristics in adult mice.

Endothelial Alk1 deficiency leads to altered angiocrine factor expressions

Angiocrine factors, which are the secreted ligands by endothelial cells, play key roles in organ homeostasis acting both as autocrine and paracrine factors (6). Using a gene ontology regrouping secreted ligands (GO:0048018), we found that several angiocrine factors are affected by ALK1 invalidation (Supp table 7).

Pdgfb was the most upregulated ligand in LSEC (Figure 3A). PDFG-BB is a key factor for pericytes recruitment and is expressed in most endothelial cells but not normally in LSEC (11). Interestingly, *Lrg1*, encoding a less well characterized secreted glycoprotein known to be involved in angiogenesis and TGFß signaling (28), was also significantly upregulated in LSEC (Figure 3A). Both ligands are known to initiate fibrosis (29, 30). *Pdgfb* and *Lrg1* mRNA upregulation in *Alk1*^{iECKO} versus WT mice could be confirmed by RT-qPCR in another cohort of isolated LSEC (Figure 3B).

The factor Semaphorin 3A (Sema3A) was also found highly upregulated in *Alk1*^{iECKO} mice when compared to WT mice as well as Sema3F and Sema3D (Figure 3A, Supp Figure 3B). This increase in *Sema3A* expression was validated at the mRNA level by RT-qPCR on isolated LSEC and at the protein level by immunostaining on liver section of *Alk1*^{iECKO} (Figure 3C and 3D). Interestingly, the mRNA levels of neuropilin1 (Nrp1) and plexin C (PlxnC1), two semaphorin receptors were strongly reduced in *Alk1*^{iECKO} versus WT mice (Supp Figure 3B), consistent with multiple mechanisms of desensitization upon hyperstimulation (31–33). This suggested autocrine signaling could be involved in LSEC capillarization as Sema3A induces loss of LSEC fenestration (32).

Bmp2 and *Bmp6* expressions, which play key roles in liver iron homeostasis via hepcidin regulation (34–36), were found to be strongly reduced in *Alk1*^{iECKO} versus WT mice (Figure 2D and 3A), while hepcidin mRNA levels in hepatocytes and whole liver were strongly reduced (Supp Figure 3C).

This analysis also identified several members of the Wnt family (*Wnt2, Wnt9b and Rspo3*) to be strongly reduced in *Alk1*^{iECKO} *versus* WT mice (Figure 2D and 3A). Interestingly, Wnt ligands display a pronounced zonated expression pattern in LSEC, with predominant localization adjacent to the central vein (Figure 2D) where they contribute to hepatocyte zonation through the upregulation of pericentral hepatocyte-specific genes including *Glul*, whose expression was found greatly decreased in hepatocytes (Supp Figure 3D). These data support that *Alk1* deletion might affect hepatocyte zonation. Altogether, these results show that LSEC specification and zonation require ALK1 signaling to be maintain in adulthood and consequently *Alk1* invalidation leads to a rapid switch from LSEC sinusoidal identity to a more continuous generic endothelial cell identity.

It was recently published that following *Gata4* invalidation, chromatin remodeling allows *Myc* expression which induces *Pdgfb* and collagen IV expressions (11). Analysis by RT-qPCR of mRNA expression within the liver confirmed the *Gata4* mRNA decreased and showed an increase in *Myc* mRNA expression in parallel with *Pdgfb* mRNA expression (Figure 3E). Together these data support the hypothesis that loss of *Alk1* reduces *Gata4* expression which in turn increases *Myc* expression, thereby inducing *Pdgfb* expression.

PDGF-BB and LRG1 are known to activate hepatic stellate cells (HSC) (29, 30). Activated HSC become positive for smooth muscle actin (SMA) and secrete extracellular matrix, a process found in aging liver and initiating liver fibrosis (37). We thus tested SMA expression in *Alk1*^{iECKO} mice and found a dramatic increase in SMA positive staining on liver sections from *Alk1*^{iECKO} mice when compared to WT mice which do not express SMA apart around arteries (Figure 3F). We found that SMA positive cells were positive for desmin (an HSC marker) but negative for the endothelial marker podocalyxin, supporting that HSC are the cells positive for SMA (Supp Figure 4). Interestingly, we found liver perivascular fibrosis, as shown by blue staining following Masson's trichrome staining on liver sections of *Alk1*^{iECKO} mice but not on WT mice (Figure 3G). Together these results show that ALK1 signaling in endothelial cells is critical in adult mice to maintain stellate cells quiescence and liver fibrosis.

Alk1 loss in endothelial cells causes a premature hepatic aging signature

Kit, encoding the type III receptor tyrosine kinase c-Kit, is normally expressed by EC on the central side in liver (38). We found that pericentral *Kit* mRNA expression is strongly decreased in *Alk1*^{iECKO} compared to WT mice (Figure 2D) and this decrease was validated at the protein level in liver lysates (Figure 4A). Invalidation of endothelial *Kit* was recently shown to induce loss of LSEC and pericentral markers (38), as found here in *Alk1*^{iECKO}. We created a gene ontology signature on genes upregulated and downregulated from bulk RNAseq data of *Kit*-

KO LSEC from Duan et al. (38), by selecting genes with a log2 fold change greater than 1.5. As scRNAseq detects less genes than bulk RNAseq, we removed genes with no expression in our data. The signatures of gene upregulated or downregulated in *Kit*-KO LSEC were composed of 507 and 38 genes, respectively. The number of genes in the set of downregulated genes in *Kit*-KO LSEC was too low to perform significant gene set enrichment analysis (GSEA). However, we used GSEA to evaluate our scRNAseq data in LSEC against the upregulated LSEC *Kit*-KO signature genes and found a significant correlation, with a normalized enrichment score (NES) of 2.70, in *Alk1*^{iECKO} LSEC (Figure 4B). We visualized this correlation using a heatmap of the three LSEC clusters which showed a greater correlation on the LSEC portal side with about 65% of upregulated and downregulated in this cluster (LSEC-L1, Supp Figure 5A). Altogether, our data support that following Alk1 invalidation, LSEC presents a signature found in *Kit*-KO LSEC.

Invalidation of endothelial *Kit* was associated with premature aging on hepatic EC (38). Thus, we hypothesized that as *Alk1* invalidation reduces *Kit* expression, loss of *Alk1* could induce premature aging of hepatic vasculature. To test this hypothesis, we compared bulk RNAseq data from Duan et al. who identified differentially expressed genes in LSEC from aged (2-year-old) versus young (8-week-old) mice (38). This led to a gene signature of 296 up-regulated genes. GSEA of our LSEC scRNAseq data against this aging signature showed a significant correlation, with a normalized enrichment score (NES) of 2.36 (Figure 4C). Notably, 80% of the genes upregulated in aged LSECs (38) were found increased in the portal side LSECs (LSEC_L1) cluster (Supp Figure 5B). Using the same selection threshold on downregulated genes in aged LSEC, we obtained 62 genes. About 50% of these genes were downregulated in the LSEC_L1 cluster on the portal side (Supp Figure 5B). Duan et al. showed that *Cdkn1a* (p21) and *Cdkn2a* (p16) mRNA expressions were increased in aged LSEC (38), indicating cell cycle arrest and senescent burden. In other works, the sirtuin key protective pathway was found decreased in aged or senescent endothelial cells (39–41). In line with these data, our scRNAseq analysis showed that *Cdkn1a* and *Cdkn2a* mRNA expressions were increased in *Alk1*^{iECKO} mice compared to WT mice, while *Sirt2* mRNA expression was decreased (Figure 4D). These results show that LSEC are predisposed to senescence following *Alk1* invalidation, further validating the aging hypothesis.

Analysis of our scRNAseq data also showed an increase in *Cdkn1a* mRNA expression in hepatocytes in *Alk1*^{iECKO} mice compared to WT mice (Figure 4E). Using the same approach but this time with scRNAseq data comparing hepatocytes from old (2-year-old) versus young (3-month-old) mice (42), we found using GSEA that hepatocytes from *Alk1*^{iECKO} mice also presented a signature of premature aging for both up-regulated and down-regulated genes (Figure 4F-H). This was also the cases in Kupffer cells from *Alk1*^{iECKO} mice (Supp Figure 5C). Together these data suggest that deletion of *Alk1* in adult endothelial cells induces hepatic aging beyond endothelial cells.

Hepatocyte zonation is greatly affected in Alk1^{iECKO} mice

Hallmark analysis of our scRNAseq data on hepatocytes from *Alk1*^{iECKO} mice showed an increase in hypoxia, and a decrease in glycolysis and xenobiotic metabolism (Figure 5A). These functions are zonated, with hypoxia and glycolysis higher on the central vein side, while enzymes involved in detoxification varied in expression along the portal to central axis (43). Given that endothelial zonation is essential for the establishment of hepatocyte zonation, we hypothesized that *Alk1* loss may disrupt hepatocyte zonation. Indeed, we found that *Wnt2*, *Wnt9b* and *Rspo3* mRNA expression on the central side were strongly reduced in *Alk1*^{iECKO} mice (Figure 2D) and that accordingly the Wnt/β-catenin pathway was predicted to be downregulated in hepatocytes from *Alk1*^{iECKO} mice (arrow, Figure 5A).

Using our scRNAseq data, we clustered hepatocytes into 7 subclusters, from cluster 1 on the portal side to cluster 7 on the central side (H1-H7) (Figure 5B). We found that hepatocyte markers on both portal and central sides were downregulated in hepatocytes from *Alk1*^{iECKO} mice when compared to WT mice (Figure 5C). Among them, *Glul* encoding glutamine synthetase (GS), an enzyme strongly expressed in pericentral hepatocytes and involved in the detoxification of ammonia, was strongly downregulated (arrow, Figure 5C). This decrease could be validated at the protein level on liver sections (Figure 5D). Ammonia degradation is also performed in the periportal hepatocytes through urea cycle. The expression of *Ass1* (encoding Argininosuccinate Synthase 1 (ASS1)), an enzyme involved in the urea cycle, which is more expressed on the portal side was also found downregulated in periportal hepatocytes at both mRNA and protein levels in *Alk1*^{iECKO} mice (arrow, Figure 5C and 5E). We hypothesized that GS and ASS1 downregulations could affect the degradation of neurotoxic ammonia and thus measured ammonia concentration in urines that we found significantly higher in *Alk1*^{iECKO} mice compared to WT mice (Figure 5F). Altogether, our results show that loss of endothelial *Alk1* affected co-zonation of LSEC and hepatocytes.

Kupffer cell identity is compromised following Alk1 deletion

Taking advantage of our whole liver scRNAseq data, we next looked whether other hepatic cell subtypes would be affected by the loss of *Alk1*. We found that Kupffer cells gene signature was altered in *Alk1*^{iECKO} mice compared to WT mice. Indeed, most of the specific markers expressed by these cells were downregulated (*Clec4f, Vsig4, Timd4*) (Figure 6A). Using immunofluorescence, we validated at the protein level that the downregulation of VSIG4 in liver sections of *Alk1*^{iECKO} mice. The pan-macrophage marker F4/80 was also found decreased (Figure 6B).

Kupffer cells express macrophage markers, such as F4/80, but also specific markers, such as *Clec4f* and *Vsig4*, and also, surprisingly, endothelial cell markers including *Alk1* and *Cdh5* (26, 44). As we used *Cdh5* promoter to control the Cre expression, it is possible that our strategy deleted also *Alk1* expression in Kupffer cells. As previously shown, the 3' sequencing from 10x genomics does not allow to detect *Alk1* deletion (14) so we were unable to determine whether

our *Cdh5* promoter approach led to a deletion of *Alk1* in Kupffer cells. To address this, we analyzed the regulation of known BMP/ALK1 target genes in Kupffer cells in our scRNAseq data. We didn't find any difference in *Id1*, *Smad6*, *Smad7* and *Bmpr2* mRNA expressions between WT and *Alk1*^{iECKO} Kupffer cells, apart *Id3* mRNA expression which was found down-regulated (Supp Figure 6). This result is different from the work of Zhao et al. that used a Kupffer specific promoter *Clec4f* to delete *Alk1* and found a significant reduction in *Id1* and *Id3* mRNA expressions (45). To go further, we crossed Cdh5-Cre ERT2 mice with a ZsGreen reporter mice to visualize cells where Cre recombination occurred. Cdh5-Cre ERT2 ZsGreen mice showed a strong green fluorescent staining in liver endothelium as seen with podocalyxin (arrows, Figure 6C), whereas minimal to no staining was found in VSIG4 positive Kupffer cells (Figure 6C). Together, these results would suggest that Cdh5Cre ERT2 efficiently targets endothelial cells, but not Kupffer cells. Although further studies will be necessary to clearly determine whether ALK1 signaling directly or indirectly is critical for the maintenance of Kupffer cell identity, our data, at this stage, suggest that endothelial *Alk1* deletion induces loss of Kupffer identity in a non-cell autonomous manner.

Alk1^{iECKO} mice present liver lymphocytes infiltrate

H&E histology of liver sections *Alk1*^{iECKO} mice showed an inflammatory/immune cell infiltration process with a decrease in VSIG4 and F4/80 staining (Figures 1D, 6B). Thus, we looked at mRNA levels of chemoattractant chemokines in our scRNAseq data to identify which cell types could participate to this recruitment. We found that hepatic stellate cells and Kupffer cells from *Alk1*^{iECKO} mice upregulated *Cxcl13* mRNA expression when compared to WT mice (Figure 7A). CXCL13 is a potent lymphocyte B attractant (46, 47). In addition, endothelial cells from *Alk1*^{iECKO} mice upregulated *Il15*, known to activate T-cells (48, 49) (Figure 7A) and *Ccl4*, known to induce leukocyte invasion (50), was upregulated in Kupffer cells (Figure 7A). On the contrary, anti-inflammatory and immune tolerance interleukins *Il10* and *Il34* (51, 52) were both downregulated in Kupffer cells and hepatic stellate cells (Figure 7A). Lymphocyte infiltration could be validated on liver sections of *Alk1*^{iECKO} mice using CD3, a T-cell marker, and CD45R, a B-cell marker (Figure 7B). Our data thus support that the loss of endothelial Alk1 in adult mice creates an inflammatory/immune environment.

LSEC identity and hepatocyte zonation are altered in Alk1$^{iEC+/-}$ mice and HHT patients

We next wondered if some of the features identified in the liver of adult *Alk1*^{iECKO} homozygous mice would occur in *Alk1* heterozygous (*Alk1*$^{iEC+/-}$) mice. To this end, we induced deletion of one allele of *Alk1* by injecting tamoxifen in adult Cdh5Cre-ERT2 *Alk1*$^{lox/WT}$ mice (2-month-old) and collected livers 12 weeks later. Immunostainings for the LSEC marker Lyve1 and the continuous endothelium marker endomucin, showed a decrease of Lyve1 expression and an increase of endomucin expression in *Alk1*$^{iEC+/-}$ mice compared to control mice (Figure 8A). These changes were intermediate compared to *Alk1*^{iECKO} homozygous mice (Figure 8A). We also found that the expression levels of the hepatocyte zonation marker, glutamine synthetase (GS), were decreased in *Alk1*$^{iEC+/-}$ mice but again to a lesser extent than in *Alk1*^{iECKO} mice (Figure

8A). These results showed that loss of one *Alk1* allele is enough to induce significant alterations in LSEC and hepatocyte phenotypes.

We next addressed whether this loss of endothelial and hepatocyte zonation could be detected on liver sections from HHT patients carrying *ACVRL1* mutations obtained after liver transplantations. We found that Lyve1 expression was dramatically reduced in liver section from HHT patients when compared to controls, suggesting a loss of LSEC identity (Figure 8B). GS pericentral expression was also altered in HHT patients when compared to controls (Figure 8C). However, we found that some patients showed a decrease in GS expression (n=4/7), while others showed a widespread GS expression (n=3/7) instead of an expression pattern restricted to pericentral hepatocytes (Figure 8C). This result showed that hepatocyte zonation is altered in HHT patients, but that these alterations vary between patients. Lastly, using CD3 immunostaining, we found a perivascular lymphocyte T infiltration around an arteriovenous shunt in liver sections of an HHT patient (Figure 8D).

Discussion

Our findings identify ALK1 signaling as a master regulator of the maintenance of LSEC identity and liver homeostasis in adult mice. This study is the first scRNAseq analysis of the whole liver after endothelial *Alk1* deletion in adult mice. It shows that *Alk1* loss results in premature liver aging that will impact liver homeostasis at many different cellular levels, affecting not only LSEC identity and zonation, but also hepatocytes, Kupffer cells, stellate cells and immune cells. These endothelial and hepatocyte zonation defects are also visible in liver sections of HHT patients. Together these results could provide new insights in the molecular mechanisms involved in the development of liver malformations in HHT.

Alk1 deletion has been extensively studied in newborn mice where angiogenesis is active (53). It was shown that postnatal endothelial *Alk1* deletion leads to rapid death of the pups and formations of AVM in the retinal angiogenesis model. The effect of *Alk1* deletion in adult mice has been much less studied. It was found that total *Alk1* deletion in adult mice leads to an early lethality with vascular malformations in small intestine, pulmonary and uterine vessels but the liver and the underlying molecular mechanisms were not studied (54). Here, using an inducible endothelial specific VE-cadherin promoter, we demonstrate that ALK1 does not only play a role in the angiogenic state but that it is necessary to maintain vascular homeostasis of at least the liver and lungs.

Our scRNAseq study identified ALK1 signaling as a master regulator of LSEC identity and zonation. It is interesting to note that LSEC' *Alk1* expression but also *Bmpr2*, and key ALK1 signaling factors (*Id1, Id3, Smad6, Smad7*) follow LSEC zonation with a higher expression level toward the portal vein side. However, this zonation is not linked to ALK1 response as the loss of Alk1 seems to mostly affect the central vein side (Figure 2D). Our data showed that *Alk1* deletion leads to a rapid shift from the terminal differentiated LSEC phenotypes toward a continuous endothelium. This is marked by the loss of specific LSEC markers such as *Lyve1* and

Gata4, with the synthesis of a continuous basement membrane, disappearance of LSEC fenestrations, and expression of endothelial markers such as *Emcn* and *Pdgfb* corresponding to a more generic endothelial phenotype.

The central vein EC marker C-kit was strongly decreased in *Alk1*^{iECKO} LSEC. Interestingly, we found a high similarity between the genes affected by *Alk1* deletion in our study and the ones affected by *Kit* deletion (38). Duan et al. showed that endothelial *Kit* deletion in adult mice induced loss of LSEC identity, inflammation, and senescence within 2 weeks, and that the dysregulated genes were highly similar to the ones affected in aging (38). We thus compared the list of genes affected in LSEC by *Alk1* deletion with the ones affected by aging (38) and found a high similarity. Interestingly, this aging transcriptional signature was also found in hepatocytes and KC from *Alk1*^{iECKO} mice when compared with the data published by Lin et al (42). Our transcriptomic data also showed an increase in the expression levels of the cell cycle inhibitors *Cdkn1a* and *Cdkn2a*, and a decrease in *Sirt2* expression levels, as well as a proinflammatory signature. These changes are hallmark of a senescent phenotype, even if we could not detect senescent cells using β-galactosidase activity staining probably due to the short timing between *Alk1* deletion and tissue collection, preventing the full spectra of senescence. Altogether, these observations show that deleting *Alk1* in endothelial cells induces premature aging signature in liver. This is highly interesting knowing that liver manifestations in HHT patients increase with age and are not symptomatic before 50 years old (16).

It is also interesting to note that while we found a decrease in *Kit* expression in LSEC invalidated for *Alk1* during adulthood, Drapé et al found that *Alk1* deletion in newborn mice induces brain AVM trigger by c-Kit positive endothelial cells (55). Together, these findings show that ALK1 functions are different between organs and between development stages. This observation highlights the need to carefully choose the correct organ and time of *Alk1* deletion induction in order to identify relevant pharmaceutical targets to treat vascular malformations found in HHT patients.

We found that *Alk1* deletion in adult endothelial cells lead to the loss of LSEC fenestration. This result differs with the work of Schmid et al. who found that a constitutive deletion of *Alk1* in LSEC prevents LSEC specific marker expressions without affecting LSEC fenestration (14). This discrepancy might be due to genetic compensation in their constitutive *Alk1* deletion model, which does not occur in our inducible *Alk1* deletion model. Another difference in the affected genes between these 2 models is the expression level of *Kdr*, coding for VEGFR2, which is found unaffected in the constitutive *Alk1* deletion, whereas our data indicate a significant decrease in *Kdr* expression which could further support the loss of LSEC fenestration as VEGF has been shown, together with BMP9, to be important for LSEC fenestration maintenance (27).

Deletion of *Alk1* in endothelial cells induces profound changes in the expression of LSEC angiocrine factors which can affect the phenotype of neighboring cells but also endothelial

cells. This scRNAseq study revealed the overexpression of Sema3A in *Alk1*^{iECKO} LSEC which is normally not expressed by these cells under physiological conditions. Accordingly to our results, Sema3A was found to be increased in LSEC in three models of liver cirrhosis, associated with LSEC capillarization (56). Sema3A was also found to be highly express in senescent EC in aged hearts (57) and to induce senescence in neighboring cells (58). Very recently, Sema3A was shown to induce loss of LSECs fenestration and could maybe be involved in the loss of LSEC fenestrations observed in *Alk1*^{iECKO} LSEC (32). Sema3A has also been involved in endothelial lung permeability and might thus play a role in the development of lung hemorrhages observed in *Alk1*^{iECKO} (59). It will be very interesting to test these different possibilities in the future using blocking antibodies of the Sema3A pathway.

In addition to Sema3A, LSEC from *Alk1*^{iECKO} mice expressed LRG1 and PDGF-B. LRG1 is a secreted glycoprotein which has emerged as a significant vasculopathic protein, stimulating defective angiogenesis, and destabilizing the existing vasculature (60). In liver pathologies, circulating LRG1 levels were elevated in mouse models of liver fibrosis and in patients with fatty liver and cirrhosis (29). In these pathologies, LSEC are a source of LRG1, which activates HSC promoting hepatic fibrosis (29). LRG1 is also overexpressed in aged LSEC compared to young LSEC (38). PDGF-B is expressed by most EC but not in LSEC from healthy liver. However, when expressed in LSEC it has been involved in hepatic fibrosis by directly activating HSC (30). We thus believe that LRG1 and PDGF-B overexpression could be involved in HSC activation and fibrosis observed in liver from *Alk1*^{iECKO} mice and perivascular fibrosis described in liver from HHT patients (13). It is interesting to note that PDGF-B produced by most endothelial cells plays a key role in pericyte recruitment and its loss has recently been shown to be involved in postnatal retinal AVM formation (61). This further highlights the organotypic roles of these angiocrine factors and the difficulty to target these pathways to treat patients.

Loss of *Alk1* also strongly reduced the angiocrine factors Wnt2, Wnt9b, and Rspo3. Interestingly, c-Kit positive LSEC have been shown to regulate hepatocyte zonation in a Wnt2-dependent manner (39) and could thus explain the downregulation of these factors in response to Alk1 deletion. These Wnt ligands are angiocrine factors expressed by zonated LSEC on the central side where they induce cozonation of hepatocytes, who then express genes such as *Glul* encoding Glutamine synthetase (GS) (5). Accordingly, we found a strong decrease in GS expression in *Alk1*^{iECKO} mice and an intermediate effect in heterozygous *Alk1*$^{iEC+/-}$mice. In line with this result, we found that GS zonated expression was strongly altered in liver sections from HHT patients, showing in some livers a loss of pericentral expression while on the contrary in other patients a higher GS expression. Schmid et al. also found LSEC and hepatocyte zonation dysregulation in mice deleted for *Alk1* specifically in hepatic endothelial cells and showed that these defects worsened with age (1-month-old versus 6-month-old mice) (14). They also found a loss of GS expression in few HHT liver sections from HHT patients but did not observe a GS delocalization as we did in some of these patients. We do not know the reason for these differences between HHT patients but it could be interesting in the future to test whether this could be due to different types of shunts

(arteriovenous, arterioportal, portovenous) (18). GS is involved in ammonia detoxification by transforming ammonia into glutamine. We found a significant increase in ammonia in urines from *Alk1*^{iECKO} mice, showing that ammonia detoxification is impaired in these mice. Interestingly, some HHT patients present hyperammonaemia with neurological symptoms called hepatic encephalopathy (62, 63). A correlation was found between the severity of hepatic HHT symptoms and the circulating ammonia in HHT patients (62). While the molecular mechanism was unknown, we propose that in HHT patients with liver involvement, cozonation between LSEC and hepatocytes is lost with impaired GS expression, leading to defective ammonia detoxification.

We found that loss of endothelial *Alk1* lead to lymphocyte infiltration in livers. Interestingly, lymphocyte infiltration was described around cutaneous telangiectasia in HHT patients (64). This lymphocyte infiltration could be a cause of the lymphopenia found in HHT patients and putting them at risk for infection (65). KC loss of identity could also be involved in the inflammation and lymphocyte infiltration. Indeed, one of the most downregulated gene in KC is *Vsig4*. VSIG4 was found to be involved in inhibiting T-cell activation (66) and inducing T-cell tolerance (67, 68). In addition, lymphoid neogenesis was found in aged liver (69).

It was interesting to note that inducible heterozygous endothelial *Alk1* deletion in adult mice was sufficient to detect a liver vascular phenotype with dysregulation of endothelial and hepatocyte zonation. This phenotype was not as strong as the one induces by the loss of homozygous *Alk1* deletion but suggested that deletion of already one allele is sufficient to affect liver homeostasis which could be the premise of the development of liver VMs. The molecular mechanisms leading to the development of VMs in HHT patients are still not clearly identified. Recent works show that loss of one *ALK1, SMAD4* or *ENG* allele in endothelial cells from HHT patients seem to have limited effect on BMP9 response (70–72). In line with these results, it has been proposed the need of at least a second hit which could be inflammation, angiogenesis or genetic (73). This latter has recently been validated by the presence of a second somatic mutations in some HHT vascular lesions among which liver VMs (74, 75). However, the percentage of EC with this loss of heterozygosity are rare, thus the role of ECs carrying biallelic HHT gene mutations in the development and expansion of VMs remains unclear. Studies in mosaic *Alk1*^{iECKO} and *Eng*^{iECKO} models have shown that within AVMs, proliferation of WT ECs can increase due to neighboring ECs with biallelic LOF (76, 77). Our model showing profound changes in secreted ligands from *Alk1* knock out EC could explain how a small population of EC carrying mutations in both *Alk1* allele could affect the neighboring heterozygous EC, initiating a cascade of endothelial and other cell types dysfunctions.

Together our data support that ALK1 signaling acts as a central regulator to prevent a profibrotic environment from LSEC. Interestingly, circulating BMP9 is decreased in patients with severe cirrhosis, with hepatopulmonary syndrome related to compensated cirrhosis, portal hypertension, and in related rat models (78). This observation underlines that restoring

a functional BMP9-ALK1 signaling may be beneficial not only to HHT patients but also to patients with these chronic liver diseases.

Altogether, our work using a new model of *Alk1* deletion in adult endothelium to perform liver scRNAseq analysis brings strong new insights into the role of ALK1 in the maintenance of organ homeostasis and highlights the key role of ALK1 signaling in endothelial identity and in the expression of zonated angiocrine factors that maintains liver homeostasis. We propose that very early, loss of *Alk1* will lead to a dysregulation of liver zonation that will lead to perivascular fibrosis, immune cell recruitment, and dysregulated hepatic detoxification that will slowly affect the whole liver. Our scRNAseq analysis also highlights several new therapeutic targets (c-Kit, PDGF-B, Semaphorin 3A) which may lead to vascular malformation in HHT patients.

AUTHORS CONTRIBUTION:

Material preparation, experimentations, data collection and analyses were performed by Y Rida, N Ricard, A Desroches-Castan, A Salomon, L Beurier-Soulat, L Vialet, N Chaumontel. scRNAseq was performed by S Croze and J Lachuer (ProfileXpert, www.profilexpert.fr). scRNAseq bioinformatic analyses were performed by D Koça and N Ricard with the help of L Guyon. E Tillet helped for electron microscopy. S Dupuis-Girod and A. Guilhem provided human materials from HHT patients and helped in the discussion. Y Rida, S Bailly and N Ricard wrote the manuscript with the help of all authors.

ACKNOWLEDGMENTS:

The authors thank Soumalamaya Bama and Charlène Magallon for their help in the maintenance of the mouse colony.

FUNDING

This work was funded by the National Institute for Health and Medical Research (INSERM), the University of Grenoble-Alpes, by the CEA (commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives DRF/IRIG/DS), the Fondation pour la Recherche Médicale (EQU202003010188), the Association Maladie de Rendu-Osler (AMRO/HHT France), the H2020-msca-ITN-2018 (V.A. Cure-84316) and the French National Agency for research (ANR) grant no. ANR-07-PCVI-0038 (Enquire). The authors thank the animal facility platform supported by GRAL, a program of the Chemistry Biology Health (CBH) Graduate School of University Grenoble Alpes (ANR-17-EURE-003).

References

1. Kalra A, et al. Physiology, Liver. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025.

2. Cogger VC, et al. Three-dimensional structured illumination microscopy of liver sinusoidal endothelial cell fenestrations. J Struct Biol. 2010;171(3):382–388.

3. Porat-Shliom N. Compartmentalization, cooperation, and communication: The 3Cs of Hepatocyte zonation. Current Opinion in Cell Biology. 2024;86:102292.

4. Kietzmann T. Liver Zonation in Health and Disease: Hypoxia and Hypoxia-Inducible Transcription Factors as Concert Masters. Int J Mol Sci. 2019;20(9):2347.

5. Hu S, et al. Single-cell spatial transcriptomics reveals a dynamic control of metabolic zonation and liver regeneration by endothelial cell Wnt2 and Wnt9b. Cell Rep Med. 2022;3(10):100754.

6. Gomez-Salinero JM, Redmond D, Rafii S. Microenvironmental determinants of endothelial cell heterogeneity. Nat Rev Mol Cell Biol. 2025;26(6):476–495.

7. Kalucka J, et al. Single-Cell Transcriptome Atlas of Murine Endothelial Cells. Cell. 2020;180(4):764-779.e20.

8. Poisson J, et al. Liver sinusoidal endothelial cells: Physiology and role in liver diseases. Journal of Hepatology. 2017;66(1):212–227.

9. Maeso-Díaz R, et al. Effects of aging on liver microcirculatory function and sinusoidal phenotype. Aging Cell. 2018;17(6):e12829.

10. Le Couteur DG, et al. Liver, ageing and disease. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. [published online ahead of print: July 28, 2025]. https://doi.org/10.1038/s41575-025-01099-z.

11. Winkler M, et al. Endothelial GATA4 controls liver fibrosis and regeneration by preventing a pathogenic switch in angiocrine signaling. J Hepatol. 2021;74(2):380–393.

12. Desroches-Castan A, et al. BMP9 and BMP10: Two close vascular quiescence partners that stand out. Dev Dyn. 2022;251(1):178–197.

13. Desroches-Castan A, et al. Bone Morphogenetic Protein 9 Is a Paracrine Factor Controlling Liver Sinusoidal Endothelial Cell Fenestration and Protecting Against Hepatic Fibrosis. Hepatology. 2019;70(4):1392–1408.

14. Schmid CD, et al. ALK1 controls hepatic vessel formation, angiodiversity, and angiocrine functions in hereditary hemorrhagic telangiectasia of the liver. Hepatology. [published online ahead of print: July 1, 2022]. https://doi.org/10.1002/hep.32641.

15. Zhao D, et al. GDF2 and BMP10 coordinate liver cellular crosstalk to maintain liver health. Elife. 2024;13:RP95811.

16. Hermann R, et al. Hereditary haemorrhagic telangiectasia. Nat Rev Dis Primers. 2025;11(1):1.

17. Kelly C, et al. Hepatic manifestations of hereditary haemorrhagic telangiectasia. Liver Int. 2024;44(9):2220–2234.

18. Garcia-Tsao G. Liver involvement in hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT). J Hepatol. 2007;46(3):499–507.

19. Al Tabosh T, et al. Hereditary hemorrhagic telangiectasia: from signaling insights to therapeutic advances. J Clin Invest. 2024;134(4):e176379.

20. Park SO, et al. ALK5- and TGFBR2-independent role of ALK1 in the pathogenesis of hereditary hemorrhagic telangiectasia type 2. Blood. 2008;111(2):633–642.

21. Sörensen I, Adams RH, Gossler A. DLL1-mediated Notch activation regulates endothelial identity in mouse fetal arteries. Blood. 2009;113(22):5680–5688.

22. Hao Y, et al. Dictionary learning for integrative, multimodal and scalable single-cell analysis. Nat Biotechnol. 2024;42(2):293–304.

23. Hippen AA, et al. miQC: An adaptive probabilistic framework for quality control of single-cell RNA-sequencing data. PLOS Computational Biology. 2021;17(8):e1009290.

24. Wu T, et al. clusterProfiler 4.0: A universal enrichment tool for interpreting omics data. The Innovation. 2021;2(3):100141.

25. Bouvard C, et al. Different cardiovascular and pulmonary phenotypes for single- and double-knock-out mice deficient in BMP9 and BMP10. Cardiovasc Res. 2022;118(7):1805–1820.

26. Guilliams M, et al. Spatial proteogenomics reveals distinct and evolutionarily conserved hepatic macrophage niches. Cell. 2022;185(2):379-396.e38.

27. May D, et al. A Transgenic Model for Conditional Induction and Rescue of Portal Hypertension Reveals a Role of VEGF-Mediated Regulation of Sinusoidal Fenestrations. PLoS ONE. 2011;6(7):e21478.

28. Wang X, et al. LRG1 promotes angiogenesis by modulating endothelial TGF-β signalling. Nature. 2013;499(7458):306–311.

29. Ojha U, et al. Endothelial RUNX3 controls LSEC dysfunction and angiocrine LRG1 signaling to prevent liver fibrosis. Hepatology. 2025;81(4):1228–1243.

30. Kocabayoglu P, et al. β-PDGF receptor expressed by hepatic stellate cells regulates fibrosis in murine liver injury, but not carcinogenesis. J Hepatol. 2015;63(1):141–147.

31. Piper M, et al. Endocytosis-dependent desensitization and protein synthesis–dependent resensitization in retinal growth cone adaptation. Nat Neurosci. 2005;8(2):179–186.

32. Eberhard D, et al. Semaphorin-3A regulates liver sinusoidal endothelial cell porosity and promotes hepatic steatosis. Nat Cardiovasc Res. 2024;3(6):734–753.

33. Romi E, et al. ADAM metalloproteases promote a developmental switch in responsiveness to the axonal repellant Sema3A. Nat Commun. 2014;5(1):4058.

34. Andriopoulos Jr B, et al. BMP6 is a key endogenous regulator of hepcidin expression and iron metabolism. Nat Genet. 2009;41(4):482–487.

35. Meynard D, et al. Lack of the bone morphogenetic protein BMP6 induces massive iron overload. Nat Genet. 2009;41(4):478–481.

36. Koch P-S, et al. Angiocrine Bmp2 signaling in murine liver controls normal iron homeostasis. Blood. 2017;129(4):415–419.

37. Friedman SL. The Cellular Basis of Hepatic Fibrosis – Mechanisms and Treatment Strategies. New England Journal of Medicine. 1993;328(25):1828–1835.

38. Duan J-L, et al. Age-related liver endothelial zonation triggers steatohepatitis by inactivating pericentral endothelium-derived C-kit. Nat Aging. 2023;3(3):258–274.

39. Duan J-L, et al. Shear stress-induced cellular senescence blunts liver regeneration through Notch-sirtuin 1-P21/P16 axis. Hepatology. 2022;75(3):584–599.

40. Zhang Y, et al. Sirtuin 2 deficiency aggravates ageing-induced vascular remodelling in humans and mice. Eur Heart J. 2023;44(29):2746–2759.

41. Ye Y, et al. SIRT2 counteracts primate cardiac aging via deacetylation of STAT3 that silences CDKN2B. Nat Aging. 2023;3(10):1269–1287.

42. Lin Y, et al. Single-cell transcriptome analysis of aging mouse liver. FASEB J. 2024;38(4):e23473.

43. Manco R, Itzkovitz S. Liver zonation. Journal of Hepatology. 2021;74(2):466–468.

44. Blériot C, et al. A subset of Kupffer cells regulates metabolism through the expression of CD36. Immunity. 2021;54(9):2101-2116.e6.

45. Zhao D, et al. ALK1 signaling is required for the homeostasis of Kupffer cells and prevention of bacterial infection. J Clin Invest. 2022;132(3). https://doi.org/10.1172/JCI150489.

46. Legler DF, et al. B cell-attracting chemokine 1, a human CXC chemokine expressed in lymphoid tissues, selectively attracts B lymphocytes via BLR1/CXCR5. J Exp Med. 1998;187(4):655–660.

47. Gunn MD, et al. A B-cell-homing chemokine made in lymphoid follicles activates Burkitt's lymphoma receptor-1. Nature. 1998;391(6669):799–803.

48. McInnes IB, et al. The role of interleukin-15 in T-cell migration and activation in rheumatoid arthritis. Nat Med. 1996;2(2):175–182.

49. Liu K, et al. IL-15 mimics T cell receptor crosslinking in the induction of cellular proliferation, gene expression, and cytotoxicity in CD8+ memory T cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99(9):6192–6197.

50. Menten P, Wuyts A, Van Damme J. Macrophage inflammatory protein-1. Cytokine Growth Factor Rev. 2002;13(6):455–481.

51. Ouyang W, O'Garra A. IL-10 Family Cytokines IL-10 and IL-22: from Basic Science to Clinical Translation. Immunity. 2019;50(4):871–891.

52. Hu X, et al. The multifactorial roles of IL-34 in immune responses. Annals of Blood. 2020;5(0). https://doi.org/10.21037/aob.2019.12.05.

53. Tual-Chalot S, Oh P, Arthur HM. Mouse Models of Hereditary Haemorrhagic Telangiectasia: Recent Advances and Future Challenges. Front Genet. 2015;6. https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00025.

54. Park SO, et al. Real-time imaging of de novo arteriovenous malformation in a mouse model of hereditary hemorrhagic telangiectasia. J Clin Invest. 2009;119(11):3487–3496.

55. Drapé E, et al. Loss of endothelial ALK1 signaling induces the emergence of a KIT+ angiogenic endothelial cluster driving brain arteriovenous malformations. bioRxiv: The Preprint Server for Biology. 2025.

56. Manicardi N, et al. Transcriptomic Profiling of the Liver Sinusoidal Endothelium during Cirrhosis Reveals Stage-Specific Secretory Signature. Cancers (Basel). 2021;13(11):2688.

57. Wagner JUG, et al. Aging impairs the neurovascular interface in the heart. Science. 2023;381(6660):897–906.

58. Oubaha M, et al. Senescence-associated secretory phenotype contributes to pathological angiogenesis in retinopathy. Sci Transl Med. 2016;8(362):362ra144.

59. Le Guelte A, et al. Semaphorin 3A elevates endothelial cell permeability through PP2A inactivation. J Cell Sci. 2012;125(Pt 17):4137–4146.

60. Dritsoula A, et al. The disruptive role of LRG1 on the vasculature and perivascular microenvironment. Front Cardiovasc Med. 2024;11:1386177.

61. Lin Y, et al. Role of endothelial PDGFB in arterio-venous malformations pathogenesis. Angiogenesis. 2024;27(2):193–209.

62. Bloom PP, et al. Ammonia Predicts Hepatic Involvement and Pulmonary Hypertension in Patients With Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. Clin Transl Gastroenterol. 2020;11(1):e00118.

63. Kawabata H, et al. Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia Induced Portosystemic Encephalopathy: A Case Report and Literature Review. Intern Med. 2021;60(10):1541–1545.

64. Guilhem A, et al. Pro-angiogenic changes of T-helper lymphocytes in hereditary hemorrhagic telangiectasia. Front Immunol. 2023;14:1321182.

65. Guilhem A, et al. Immunological abnormalities associated with hereditary haemorrhagic telangiectasia. Journal of internal medicine. 2013;274. https://doi.org/10.1111/joim.12098.

66. Vogt L, et al. VSIG4, a B7 family–related protein, is a negative regulator of T cell activation. J Clin Invest. 2006;116(10):2817–2826.

67. Jung K, et al. Protective role of V-set and immunoglobulin domain-containing 4 expressed on kupffer cells during immune-mediated liver injury by inducing tolerance of liver T- and natural killer T-cells. Hepatology. 2012;56(5):1838–1848.

68. Shin W, et al. V-set and Ig domain-containing 4 (VSIG4)-expressing hepatic F4/80+ cells regulate oral antigen-specific responses in mouse. Eur J Immunol. 2018;48(4):632–643.

69. Singh P, et al. Lymphoid neogenesis and immune infiltration in aged liver. Hepatology. 2008;47(5):1680–1690.

70. Al Tabosh T, et al. Impact of heterozygous ALK1 mutations on the transcriptomic response to BMP9 and BMP10 in endothelial cells from hereditary hemorrhagic telangiectasia and pulmonary arterial hypertension donors. Angiogenesis. 2024;27(2):211–227.

71. Despas L, et al. Development of a functional assay for the characterisation of SMAD4 variants from the French haemorrhagic hereditary telangiectasia cohort. J Med Genet. 2025;jmg-2025-110797.

72. Orlova VV, et al. Vascular defects associated with hereditary hemorrhagic telangiectasia revealed in patient-derived isogenic iPSCs in 3D vessels on chip. Stem Cell Reports. 2022;17(7):1536–1545.

73. Bernabeu C, et al. Potential Second-Hits in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. J Clin Med. 2020;9(11):3571.

74. DeBose-Scarlett E, Marchuk DA. The Role of Somatic Mutation in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia Pathogenesis. J Clin Med. 2025;14(13):4479.

75. DeBose-Scarlett E, et al. Somatic mutations in arteriovenous malformations in hereditary hemorrhagic telangiectasia support a bi-allelic two-hit mutation mechanism of pathogenesis. Am J Hum Genet. 2024;111(10):2283–2298.

76. Jin Y, et al. Endoglin prevents vascular malformation by regulating flow-induced cell migration and specification through VEGFR2 signalling. Nat Cell Biol. 2017;19(6):639–652.

77. Shaligram SS, et al. Bone Marrow-Derived Alk1 Mutant Endothelial Cells and Clonally Expanded Somatic Alk1 Mutant Endothelial Cells Contribute to the Development of Brain Arteriovenous Malformations in Mice. Transl Stroke Res. 2022;13(3):494–504.

78. Robert F, et al. Disrupted BMP-9 Signaling Impairs Pulmonary Vascular Integrity in Hepatopulmonary Syndrome. Am J Respir Crit Care Med. 2024;210(5):648–661.

Figure Legends

Figure 1: Endothelial *Alk1* deletion in adult mice results in rapid lethality with hemorrhages in the lungs and GI tracts and liver injury

(A) Kaplan-Meier survival curve of wild-type WT (n = 6) and *Alk1*^{iECKO} (n = 6) mice over several days following tamoxifen injection. (B) Representative hematoxylin and eosin (H&E) staining and Perls Prussian blue staining of lung sections from WT and *Alk1*^{iECKO} mice, 7 days post-tamoxifen injection and representative macroscopic images of intestines (caecum). (C) Representative photomicrographs of lung sections from WT and *Alk1*^{iECKO} mice injected with 45-µm fluorescent beads in the left cardiac ventricle (n = 12 per genotype). Quantification was performed by blinded scoring from 0-5. (D) Representative H&E and immunofluorescence staining with anti-podocalyxin, anti-γH2AX antibodies and Hoechst of liver sections from WT and *Alk1*^{iECKO} mice. Arrowheads indicate hepatocyte injury with pyknosis and arrows indicate inflammatory/immune cell infiltration (WT, n = 5; *Alk1*^{iECKO}, n = 7). Data were analyzed using the Mann–Whitney test. $P < 0.05$ (*).

Figure 2: Liver single-cell RNA sequencing reveals that endothelial ALK1 is critical to maintain LSEC specific identity, zonation and fenestration

(A) UMAP visualization of liver cell populations obtained by single-cell RNA-seq from WT (n = 3) and *Alk1*^{iECKO} (n = 4) mice. The analysis revealed distinct clusters corresponding to endothelial cells, hepatocytes, fibroblast/stellate cells, Kupffer cells, cholangiocyte, and various immune cell types (neutrophil, B-Cell, T-Cell, dendritic cells (DC), macrophage, monocyte) identified based on established marker genes. (B) UMAP of WT liver endothelial cells (EC) showing five transcriptionally defined clusters along the porto-central axis: EC_PV (portal vein), LSEC_L1–L3 (liver sinusoidal EC), and EC_CV (central vein). (C) Unintegrated UMAP of LSEC from WT (red) and *Alk1*^{iECKO} (green) mice. (D) Heatmap showing the expression of zone-specific endothelial genes from the portal to the central vein in WT and *Alk1*^{iECKO} mice. (E and F) Representative immunofluorescence staining of LYVE1 and endomucin, collagen IV, and fibronectin in liver sections from WT and *Alk1*^{iECKO} mice. Positive staining area was quantified using ImageJ and normalized to the number of nuclei (5 images analyzed per mouse). Data were analyzed using the Mann–Whitney test. $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**). (G) Representative scanning electron microscopy of liver sections from WT (n = 7) and *Alk1*^{iECKO} (n = 5) mice. Quantification of fenestration density and average fenestration area was performed using ImageJ (5 images analyzed per mouse). Data were analyzed using an unpaired t-test with Welch's correction. $P < 0.05$ (*), $P < 0.001$ (***).

Figure 3: Endothelial *Alk1* deletion in adult mice leads to profibrotic ligand secretion from LSEC

(A) Volcano plot for upregulated (green) and downregulated (red) ligands in LSEC from WT versus *Alk1*^{iECKO} mice scRNAseq analysis. (B) RT-qPCR analysis of *Pdgfb* and *Lrg1* mRNA expressions in LSEC normalized to *Hprt* and *Rpl13a* mRNA levels, respectively, and expressed as $2^{-\Delta Ct}$ (WT, n = 4; *Alk1*^{iECKO}, n = 4). (C) RT-qPCR analysis of *Sema3a* mRNA expression in LSEC, normalized to *Hprt* mRNA levels and expressed as $2^{-\Delta Ct}$ (WT, n = 4; *Alk1*^{iECKO}, n = 4). (D) Representative immunofluorescence staining of Sema3A and CD31 in liver sections from WT (n = 5) and *Alk1*^{iECKO} (n = 5) mice. Sema3A positive staining area was quantified using ImageJ and normalized to the number of nuclei (4 images analyzed per mouse). (E) RT-qPCR analysis

of *Gata4, Myc* and *Pdgfb* mRNA expressions in total liver RNA extracts, normalized to *Hprt* mRNA levels and expressed as $2^{-\Delta Ct}$ (WT, n = 5; *Alk1*^{iECKO}, n = 5). (F) Representative immunofluorescence staining of smooth muscle actin (SMA) in liver sections from WT (n = 6) and *Alk1*^{iECKO} (n = 8) mice. Positive staining area was quantified using ImageJ and normalized to the number of nuclei (7 images analyzed per mouse). (G) Representative Masson's trichrome histochemical staining of liver sections from WT (n = 6) and *Alk1*^{iECKO} (n = 5) mice. Statistical analyses were performed using Mann–Whitney test. $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**).

Figure 4: Endothelial *Alk1* deletion in adult mice induces premature hepatic aging signature

(A) Representative western blot showing c-Kit expression in liver lysates from WT and *Alk1*^{iECKO} mice (n = 5 per genotype). β-Actin was used as a loading control. Data were analyzed using the Mann–Whitney test. $P < 0.01$ (**). (B) GSEA showing significant enrichment (normalized enrichment score, NES = 2.70) of the signature of upregulated genes in *Kit*-KO LSEC (38) within the transcriptomic profile of LSEC from *Alk1*^{iECKO} versus WT mice. (C) GSEA showing significant enrichment (NES = 2.36) of the signature of upregulated genes in aged LSEC (38) within the transcriptomic profile of LSEC from *Alk1*^{iECKO} versus WT mice. (D) mRNA expression of *Cdkn1a*, *Cdkn2a*, *Sirt2* in LSEC quantified by scRNAseq in individual WT and *Alk1*^{iECKO} mice. (E) mRNA expression of *Cdkn1a* in hepatocytes quantified by scRNAseq in individual WT and *Alk1*^{iECKO} mice. (F and G) GSEA showing significant enrichment of the signature of upregulated genes (F) and downregulated genes (G) in aged hepatocytes within the transcriptomic profile of hepatocytes from *Alk1*^{iECKO} versus WT mice. (H) Heatmaps showing log2 fold changes (FC) in hepatocytes of *Alk1*^{iECKO} mice versus WT mice of key upregulated genes (left) and downregulated genes (right) found in aged hepatocytes.

Figure 5: Endothelial *Alk1* deletion in adult mice greatly affects hepatocyte zonation

(A) Barplot showing the 30 most significant Hallmarks identified by GSEA on hepatocytes from scRNAseq of WT versus *Alk1*^{iECKO} mice. Each bar represents a pathway, with positive normalized enrichment scores (NES) indicating activated processes (red) and negative NES (blue) indicating repressed processes. (B) UMAP of liver hepatocytes showing seven transcriptionally defined clusters (H1-H7) along the porto-central axis. (C) Heatmap showing expression of hepatocyte zonation markers from the portal (H1) to central vein (H7) regions in WT and *Alk1*^{iECKO} mice. (D and E) Representative immunofluorescence staining of glutamine synthetase (GS) (WT n = 5; *Alk1*^{iECKO} n = 7) (D) and argininosuccinate synthase 1 (ASS1) (n = 5 per genotype) (E) in liver sections from WT and *Alk1*^{iECKO} mice. Positive staining area was quantified using ImageJ and normalized to the number of nuclei (4 images per mouse). Data were analyzed using the Mann–Whitney test. $P < 0.01$ (**). (F) Ammonium concentration in urine samples from WT mice (n = 4) and *Alk1*^{iECKO} mice (n = 10). Data were analyzed using the Mann–Whitney test. $P < 0.05$ (*).

Figure 6: *Alk1* deletion in adult mice compromises Kupffer cell identity

(A) Dot plot showing the expression of markers significantly downregulated in Kupffer cells from *Alk1*^{iECKO} mice compared to WT from scRNAseq analysis. Dot size indicates the percentage of cells expressing each gene; color scale represents the average expression level. (B) Representative immunofluorescence staining of VSIG4 and F4/80 in liver sections from WT (n = 5) and *Alk1*^{iECKO} (n = 5) mice. (C) Representative immunofluorescence staining of liver sections from *Cdh5* CreERT2 ZsGreen mice. ZsGreen fluorescence marks cells with Cre

activation. Immunostaining was performed for podocalyxin (endothelial marker, white) and VSIG4 (Kupffer cell marker, red). Arrows indicate co-localization of Podocalyxin and ZsGreen.

Figure 7: Endothelial *Alk1* deletion in adult mice shows lymphocyte infiltration in liver

(A) Dot plot of chemoattractant chemokine gene expression across hepatic cell population in WT and *Alk1*^{iECKO} mice from scRNAseq analysis. Dot size indicates the percentage of cells expressing each gene; color scale represents the average expression level. (B) Representative immunofluorescence staining of CD3 (T cells, green), CD45R (B cells, red), and podocalyxin (endothelial cells, white) in liver sections from WT (n = 5) and *Alk1*^{iECKO} (n = 5) mice.
Selected areas are shown at higher magnification. Quantification of positive cells outside the vasculature (4 images per mouse) using ImageJ. Data analyzed with the Mann–Whitney test. $P < 0.01$ (**).

Figure 8: LSEC and hepatocyte zonation are altered in *Alk1*$^{iEC+/-}$ mice and in HHT-2 patients

(A) Representative immunofluorescence staining of Lyve1, endomucin, and glutamine synthetase (GS) in liver sections from *Alk1*$^{iEC+/-}$ (n = 4) and WT (n = 5) mice. Positive staining area was quantified using ImageJ, normalized to nuclei number (4 images per mouse), and analyzed by one way ANOVA. $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**), $P < 0.001$ (***). (B) Representative immunofluorescence staining of Lyve 1 in liver sections from controls (n = 4) and patients with HHT (n = 4). LYVE1 positive staining area was quantified using ImageJ, normalized to cell number using ImageJ. (C) Representative immunofluorescence staining of GS in liver sections from controls (n = 4) and patients with HHT (n = 7). (D) Representative Immunofluorescence staining of CD3 (T-cell, green) and SMA (smooth muscle actin, red) in livers from a patient with HHT.

Legends to Supplementary Figures

Supplementary figure 1: Experimental timeline for scRNAseq of liver from WT and *Alk1*^{iECKO} mice

(A) Schematic representation of the protocol: Two-month-old WT (n=4) and *Alk1*^{iECKO} (n=4) mice received tamoxifen injections on three consecutive days d0, d1, and d2. At day 7, tissues were collected and subjected to enzymatic digestion to obtain single-cell suspensions. Following centrifugation (5 min at 50 g) to discard most hepatocytes, the supernatant was processed using the 10x Genomics Chromium for single-cell droplet generation. (B) Schematic representation of the hepatic sinusoidal architecture and metabolic zonation. (C) Heatmap showing the expression of *Alk1* target genes across endothelial cell clusters EC_PV (portal vein), LSEC_L1–L3 (liver sinusoidal EC), and EC_CV (central vein) in WT and *Alk1*^{iECKO} mice (*Acvrl1*, ALK1; *Bmpr2*, Bone morphogenetic receptor 2; *Eng*, endoglin; *Apln*, apelin).

Supplementary figure 2: Kinetics of Lyve1 loss and endomucin gain post tamoxifen injection in liver sections of WT and *Alk1*^{iECKO} adult mice.

Representative immunofluorescence staining of Lyve 1 and endomucin in liver sections obtained at day D2, D4, and D6 post-tamoxifen injection in *Alk1*^{iECKO} adult mice and at D6 in WT mice. Positive staining area was quantified using ImageJ and normalized to the number of nuclei (5 images per mouse, n=2 mice for each day).

Supplementary figure 3: mRNA expression levels in WT and *Alk1*^{iECKO} adult mice

mRNA expression obtained from scRNAseq analysis (each dot represents a mouse) in (A) LSEC, *Kdr* (VEGFR2) and (B) *Sema3F*, *Sema3D*, *Nrp1* (neuropilin1) and *Plxnc1* (plexin C1) and (C) hepatocytes *Hamp and Hamp2* (hepcidin) in WT and *Alk1*^{iECKO} adult mice.
RT-qPCR analysis of *Hamp2* mRNA expressions in total liver normalized to *Hprt* mRNA levels and expressed as $2^{-\Delta Ct}$ (WT, n = 3; *Alk1*^{iECKO}, n = 3). (D) mRNA expression of *Glul* in hepatocytes quantified by scRNAseq in individual WT and *Alk1*^{iECKO} mice.

Supplementary Figure 4: Endothelial *Alk1* deletion in adult mice leads to hepatic stellate cell activation

Representative immunostaining staining of desmin (hepatic stellate cells, green), podocalyxin (endothelial cells, light blue), and SMA (smooth muscle actin, red) in liver sections from *Alk1*^{iECKO} mice that shows that SMA is expressed in hepatic stellate cells.

Supplementary Figure 5: Endothelial *Alk1* in adult mice causes premature hepatic aging signature in LSEC and Kupffer cells

(A) Heatmap showing the expression of 507 upregulated and 38 downregulated genes from *Kit*-KO LSECs (38) in the 3 clusters of LSEC from WT and *Alk1*^{iECKO} mice. (B) Heatmap showing the expression of 296 upregulated and 62 downregulated genes from aged LSECs (38) in the 3 clusters of LSEC from WT and *Alk1*^{iECKO} mice. (C) GSEA showing significant normalized enrichment score (NES) of the signature of upregulated (46 genes) and downregulated (46 genes) genes in aged Kupffer cells (42) within the transcriptomic profile of Kupffer cell from *Alk1*^{iECKO} versus WT mice.

Supplementary Figure 6: mRNA expression levels from RNAseq analysis in Kupffer cells of WT and *Alk1*^{iECKO} adult mice

mRNA expression of ALK1 target genes obtained from scRNAseq analysis in Kupffer cells (*Bmpr2*, *Id1*, *Id3*, *Smad6* and *Smad7)* from WT and *Alk1*^{iECKO} adult mice.

Supplementary Table 1 : Genes upregulated in endothelial cells

The p_val column shows the raw p-value of the Wilcoxon rank-sum test, while p_val_adj represents the adjusted p-value after multiple testing correction. avg_log2FC indicates the average log 2 fold change between the two groups (*Alk1*^{iECKO} vs WT). pct.1 and pct.2 represent the proportion of cells expressing the gene in the *Alk1*^{iECKO} group and WT group, respectively.

Supplementary Table 2 : Genes Downregulated in endothelial cells

The p_val column shows the raw p-value of the Wilcoxon rank-sum test, while p_val_adj represents the adjusted p-value after multiple testing correction. avg_log2FC indicates the average log 2 fold change between the two groups (*Alk1*^{iECKO} vs WT). pct.1 and pct.2 represent the proportion of cells expressing the gene in the *Alk1*^{iECKO} group and WT group, respectively.

Supplementary Table 3 : Genes upregulated in Hepatocytes

The p_val column shows the raw p-value of the Wilcoxon rank-sum test, while p_val_adj represents the adjusted p-value after multiple testing correction. avg_log2FC indicates the average log 2 fold change between the two groups (*Alk1*^{iECKO} vs WT). pct.1 and pct.2 represent the proportion of cells expressing the gene in the *Alk1*^{iECKO} group and WT group, respectively.

Supplementary Table 4 : Genes downregulated in Hepatocytes

The p_val column shows the raw p-value of the Wilcoxon rank-sum test, while p_val_adj represents the adjusted p-value after multiple testing correction. avg_log2FC indicates the average log 2 fold change between the two groups (*Alk1*^{iECKO} vs WT). pct.1 and pct.2 represent the proportion of cells expressing the gene in the *Alk1*^{iECKO} group and WT group, respectively.

Supplementary Table 5 : Genes upregulated in Kupffer cells

The p_val column shows the raw p-value of the Wilcoxon rank-sum test, while p_val_adj represents the adjusted p-value after multiple testing correction. avg_log2FC indicates the average log 2 fold change between the two groups (*Alk1*^{iECKO} vs WT). pct.1 and pct.2 represent the proportion of cells expressing the gene in the *Alk1*^{iECKO} group and WT group, respectively.

Supplementary Table 6 : Genes dowregulated in Kupffer cells

The p_val column shows the raw p-value of the Wilcoxon rank-sum test, while p_val_adj represents the adjusted p-value after multiple testing correction. avg_log2FC indicates the average log 2 fold change between the two groups (*Alk1*^{iECKO} vs WT). pct.1 and pct.2 represent the proportion of cells expressing the gene in the *Alk1*^{iECKO} group and WT group, respectively.

Supplementary Table 7 : Angiocrine factors upregulated and downregulated following *Alk1* invalidation

The p_val column shows the raw p-value of the Wilcoxon rank-sum test, while p_val_adj represents the adjusted p-value after multiple testing correction. avg_log2FC indicates the average log 2 fold change between the two groups (*Alk1*^{iECKO} vs WT). pct.1 and pct.2 represent the proportion of cells expressing the gene in the *Alk1*^{iECKO} group and WT group, respectively.

Target	Company	Reference	Dilution	Unmasking Conditions
γH2Ax	Cell Signaling	9718	1/500	20min in TAE 0,5x
Lyve1	R&D Systems	AF2125	1/200	20min in TAE 0,5x
Endomucin	Santa - Cruz	Sc-65495	1/100	20min in Citrate
Collagen IV	Abcam	ab19808	1/500	20min in TAE 0,5x
Fibronectin	Abcam	Ab2033	1/100	20min in Citrate
Smooth muscle actin (SMA)	Sigma-Aldrich	C6198	1/200	20min in TAE 0,5x
CD31	R&D Systems	AF3628	1/100	20min in Citrate
Semaphorin 3A	Novus Biologicals	NBP3-12939	1/500	20min in Citrate
Glutamine synthetase (GS)	Sigma-Aldrich	G2781	1/1000	20min in Citrate
Argininosuccinate synthase 1 (ASS1)	Abcam	ab170952	1/100	20min in Citrate
VSIG4	Abcam	ab252933	1/200	ProteinaseK
F4/80	Invitrogen	14-4801-82	1/50	ProteinaseK
CD3	Dako/Agilent	A0452	1/200	20min in TAE 0,5x
CD45R	eBioscience/Invitrogen	14-0452-82	1/100	20min in TAE 0,5x
Podocalyxin	R&D systems	AF1556	1/200	20min in TAE 0,5x

Table 1: Antibodies list

Citrate (Invitrogen, REF: 005000), TAE (Promega, REF : V4271), Proteinase K (Sigma-Aldrich, REF : 21627)

Target Gene	GenBank sequences	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
Pdgfb	NM_001411620.1	TGA AAT GCT GAG CGA CCA CT	CAG CCC CAT CTT CAT CTA CGG
Myc	NM_010849.4	CGC GAT CAG CTC TCC TGA AA	GCT GTA CGG AGT CGT AGT CG
Gata4	NM_001310610.1	ATG CCT GTG GCC TCT ATC AC	GCT TCC GTT TTC TGG TTT GA
Sema3A	NM_009152.4	TGT ACT CTG GAA CTG CTG CG	TCT CTG GGA TGA GAT GGG CA
Hamp2	NM_183257.4	GCG ATC CCA ATG CAG AAG AGA	CAC AAC AGA TAC CAC AGG AGG
Lrg1	NM_029796.2	ATG ACA ACC AGT TGG TCG GG	GCG TGC TGG ACA GAG AGT TA
Hprt	NM_01355602	GGT TAA GCA GTA CAG CCC CA	TCC AAC ACT TCG AGA GGT CC
Rpl13a	NM_009438.5	CCC TCC ACC CTA TGA CAA GA	TTC TCC TCC AGA GTG GCT GT

Table 2: Primers list

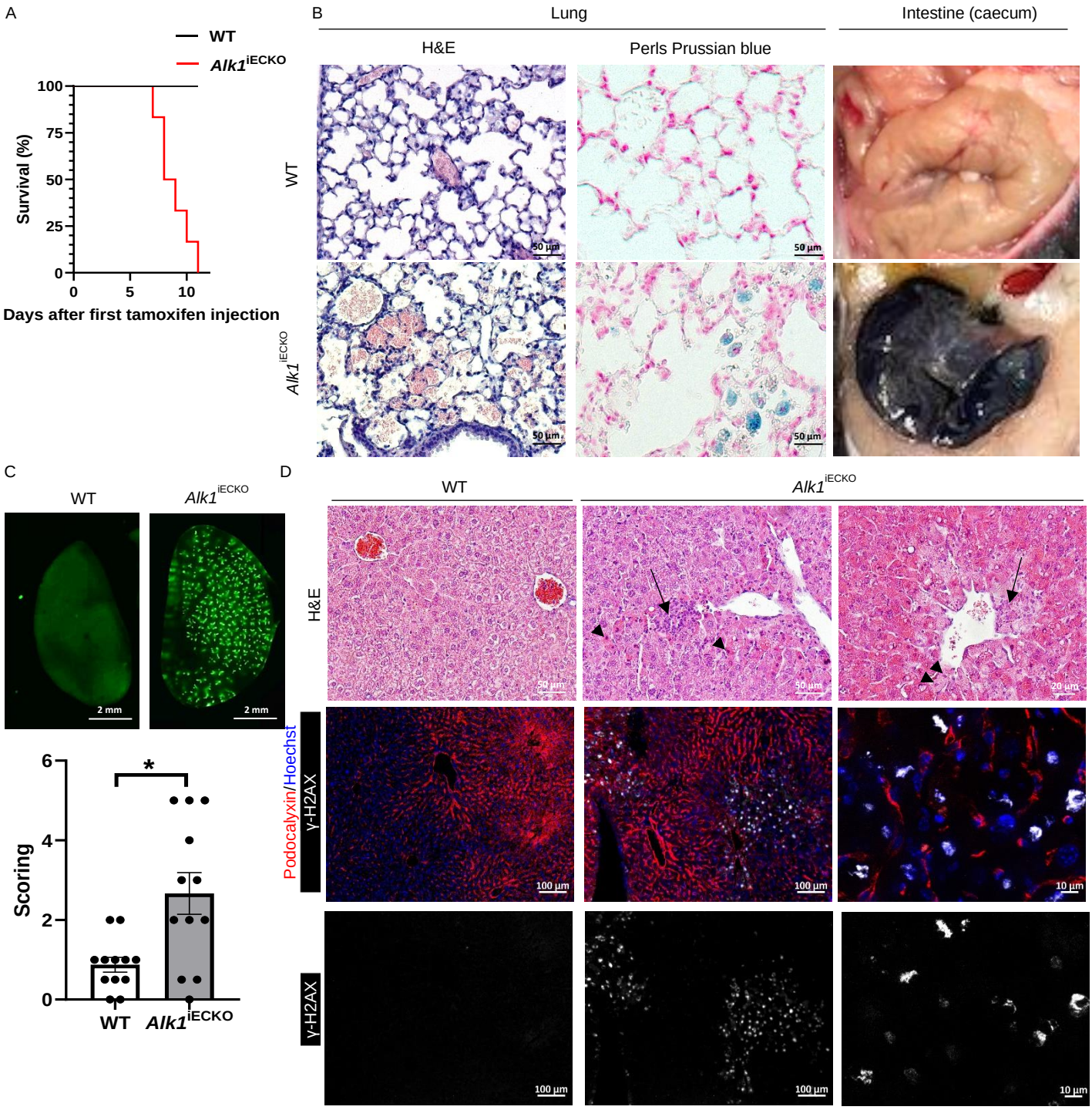


Figure 1: Endothelial *Alk1* deletion in adult mice results in rapid lethality with hemorrhages in the lungs and GI tracts and liver injury

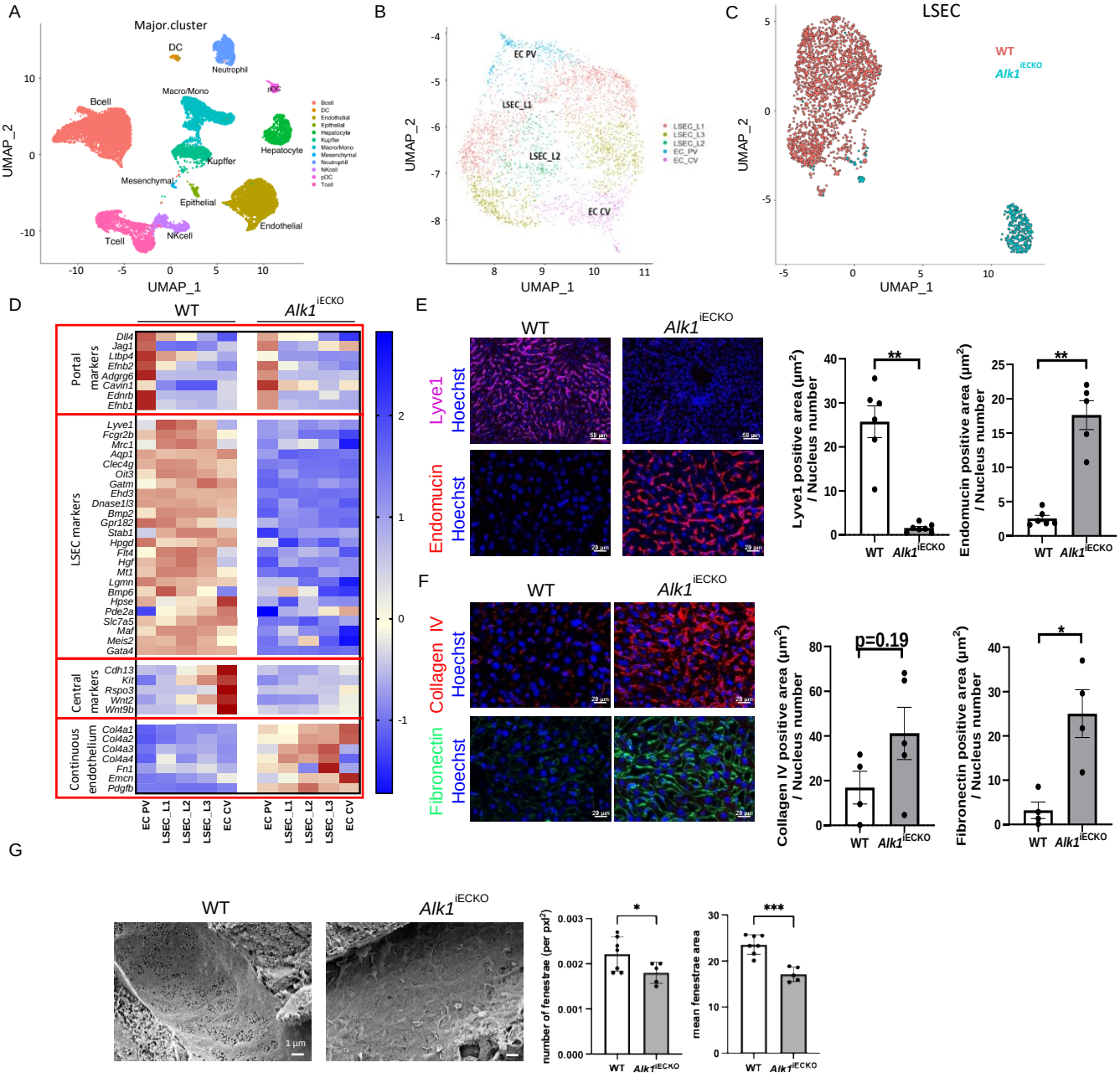


Figure 2: Liver single-cell RNA sequencing reveals that endothelial ALK1 is critical to maintain LSEC specific identity, zonation and fenestration

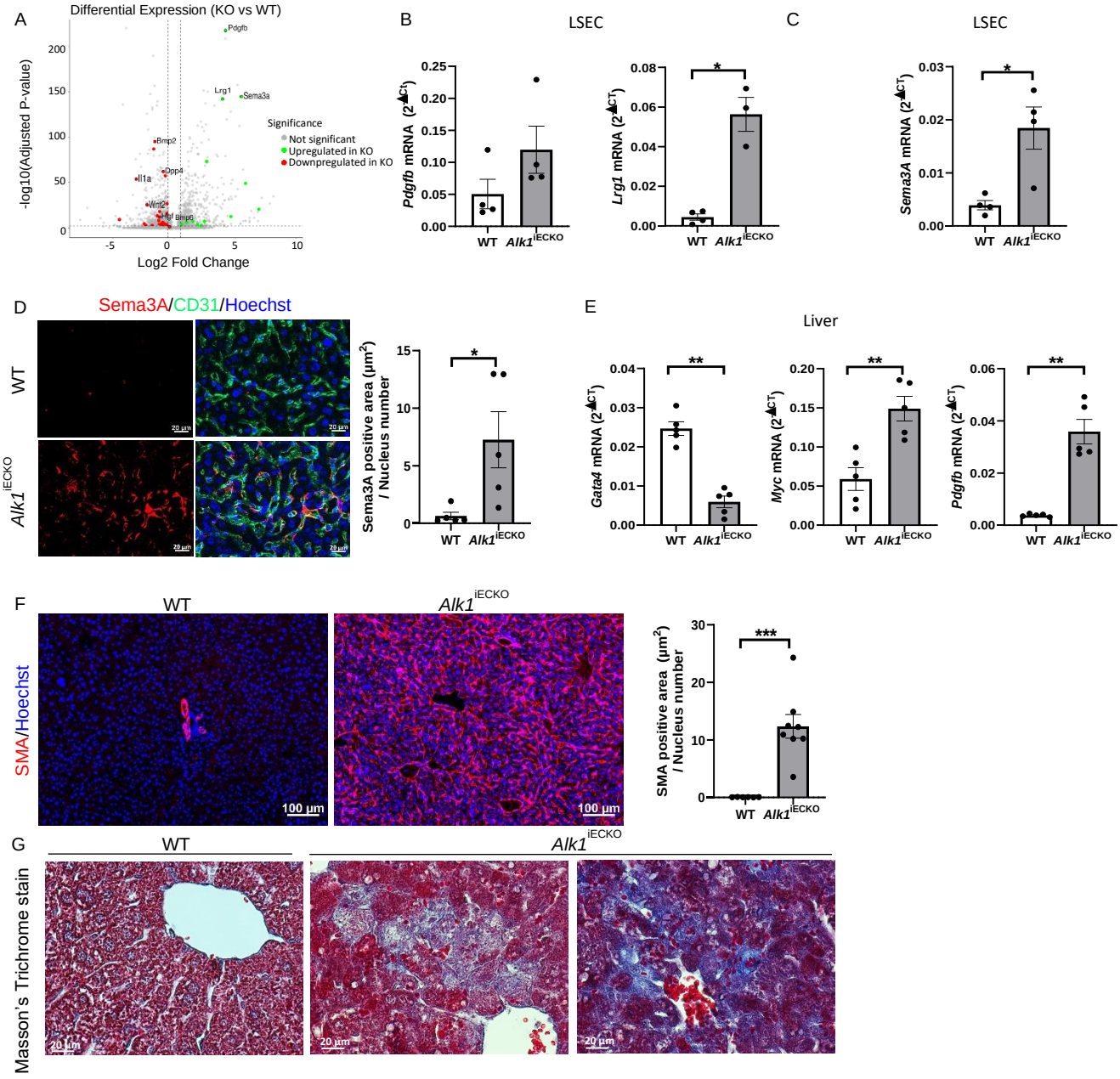


Figure 3: Endothelial *Alk1* deletion in adult mice leads to profibrotic ligand secretion from LSEC

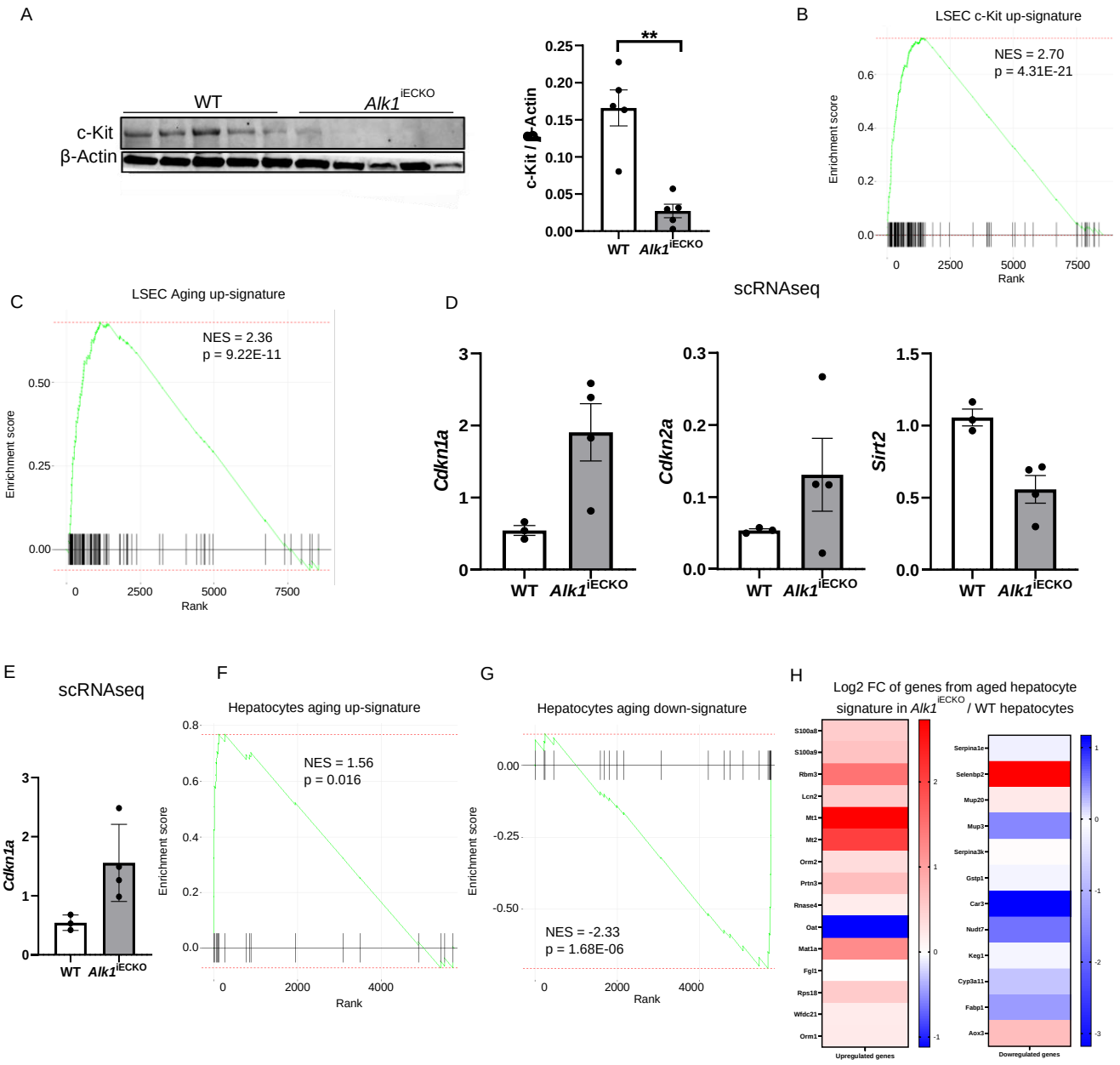


Figure 4: Endothelial *Alk1* deletion in adult mice induces premature hepatic aging signature

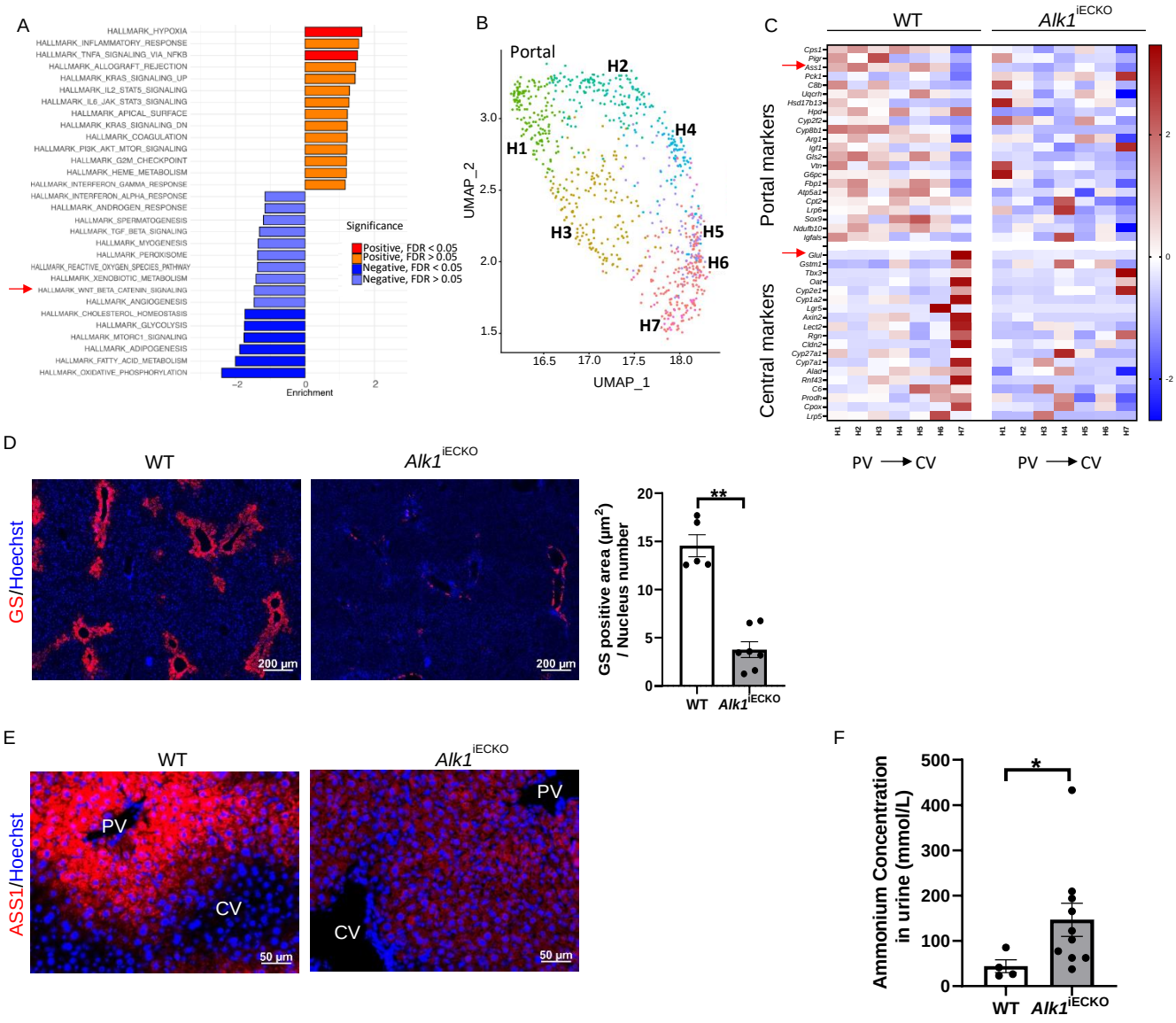


Figure 5: Endothelial *Alk1* deletion in adult mice greatly affects hepatocyte zonation

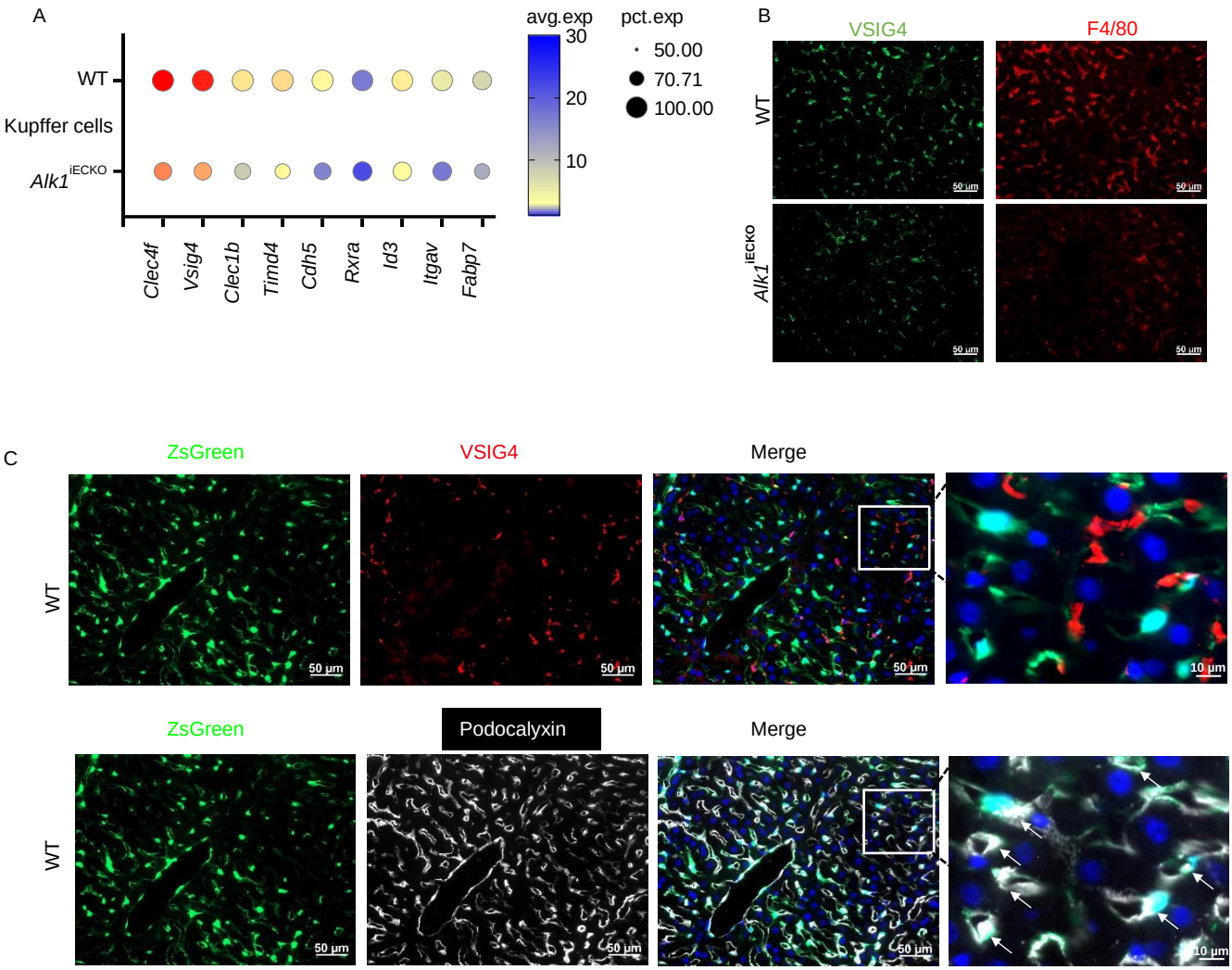


Figure 6: *Alk1* deletion in adult mice compromises Kupffer cell identity

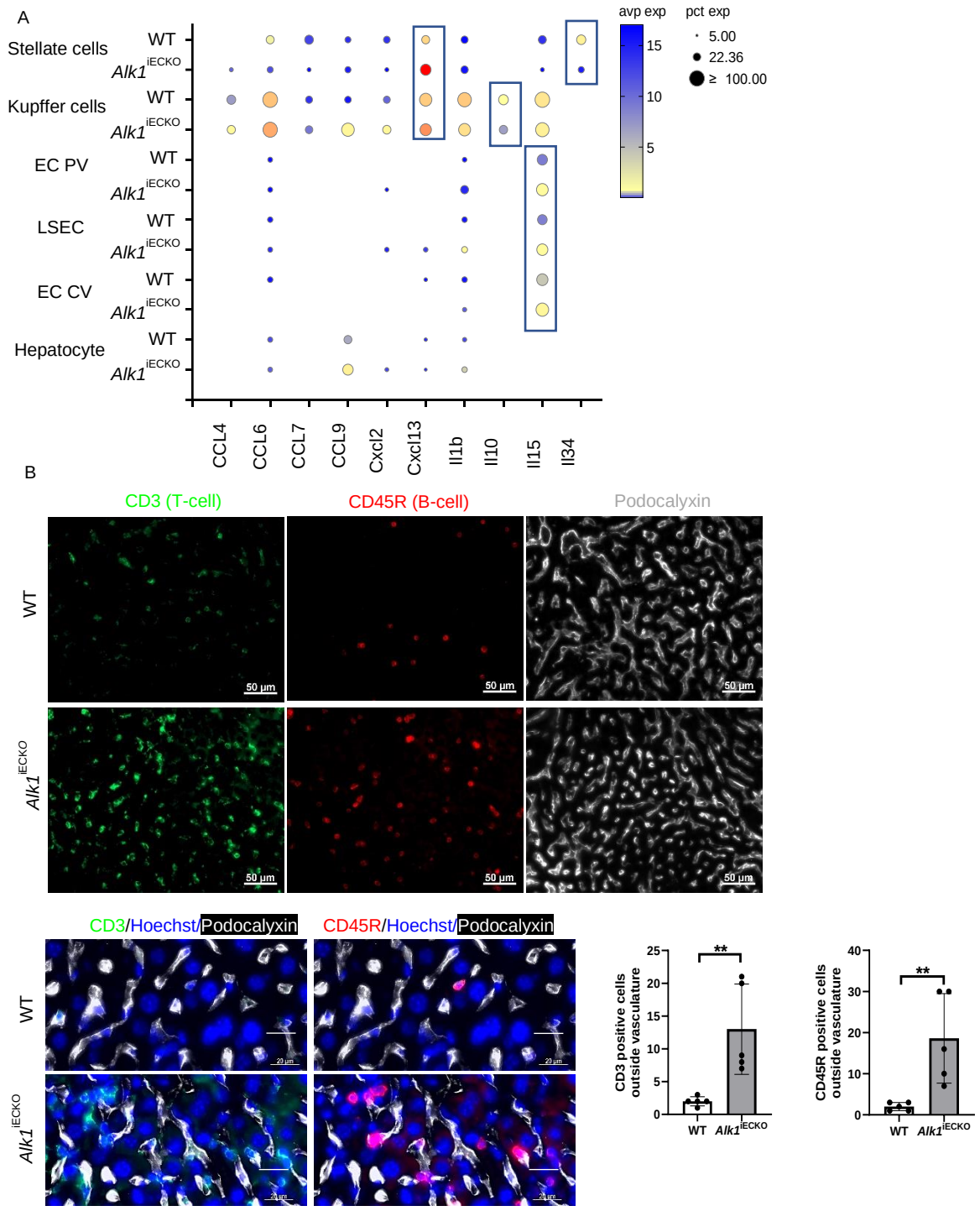


Figure 7: Endothelial *Alk1* deletion in adult mice shows lymphocyte infiltration in liver

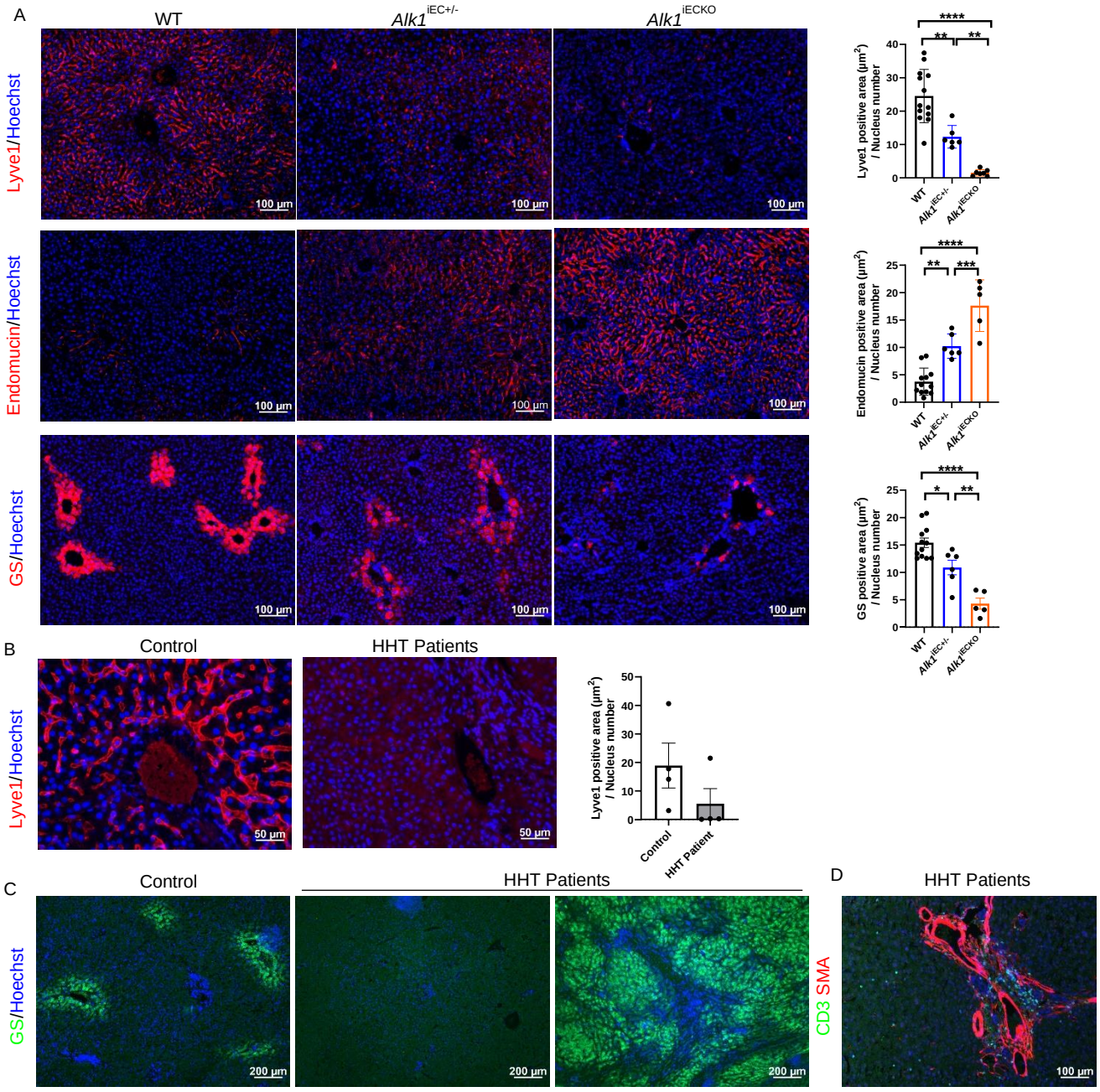
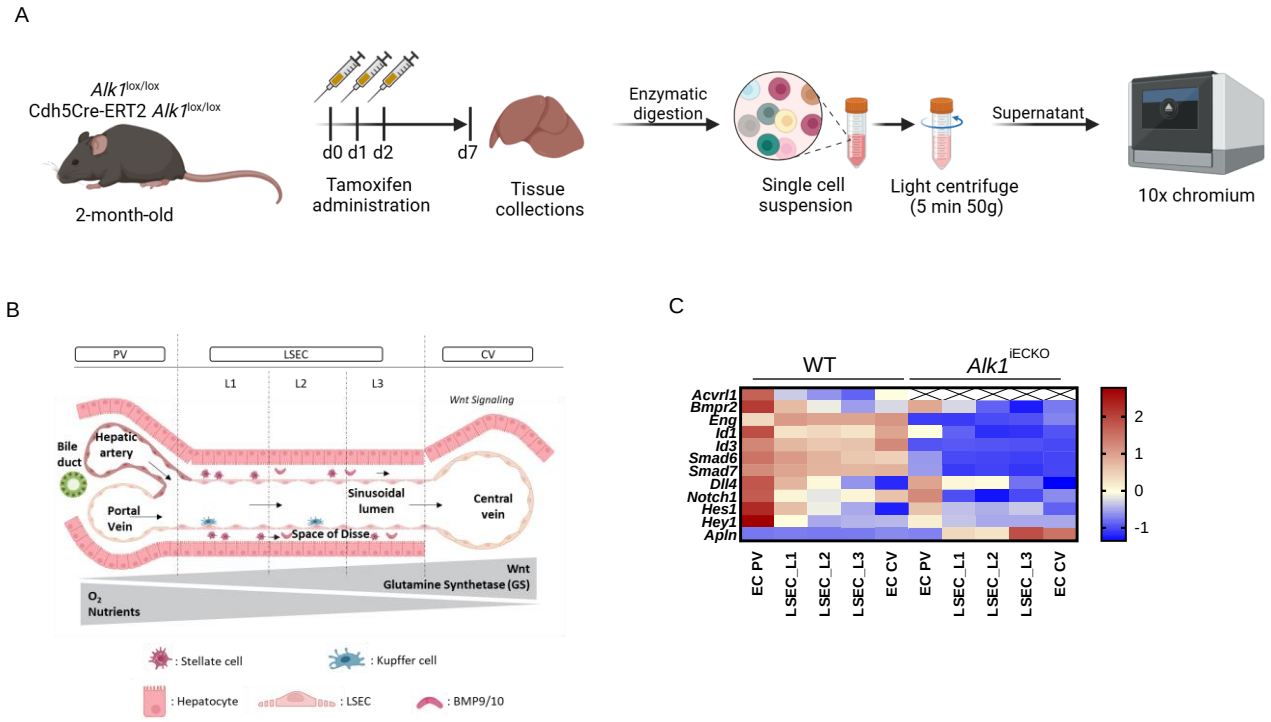
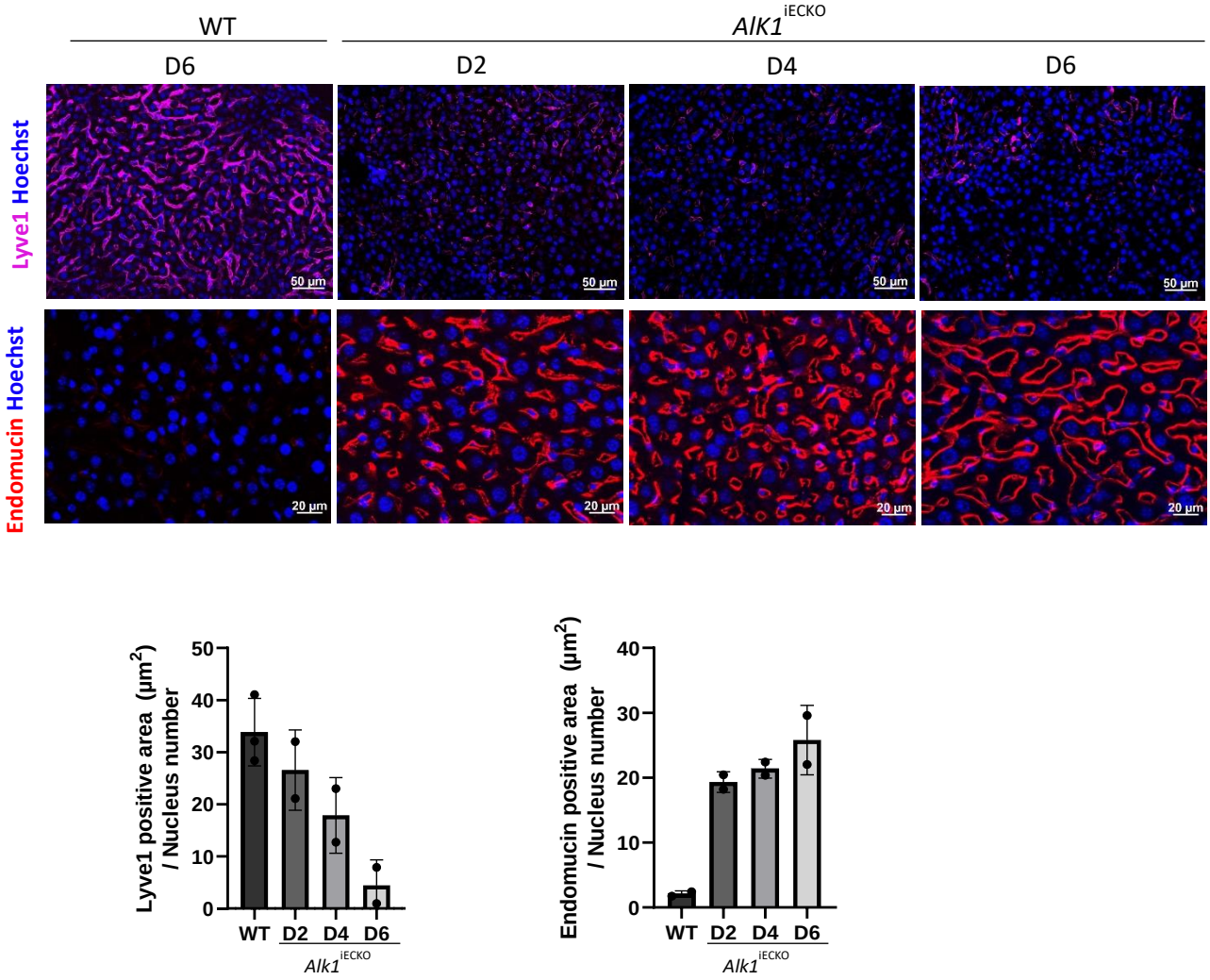


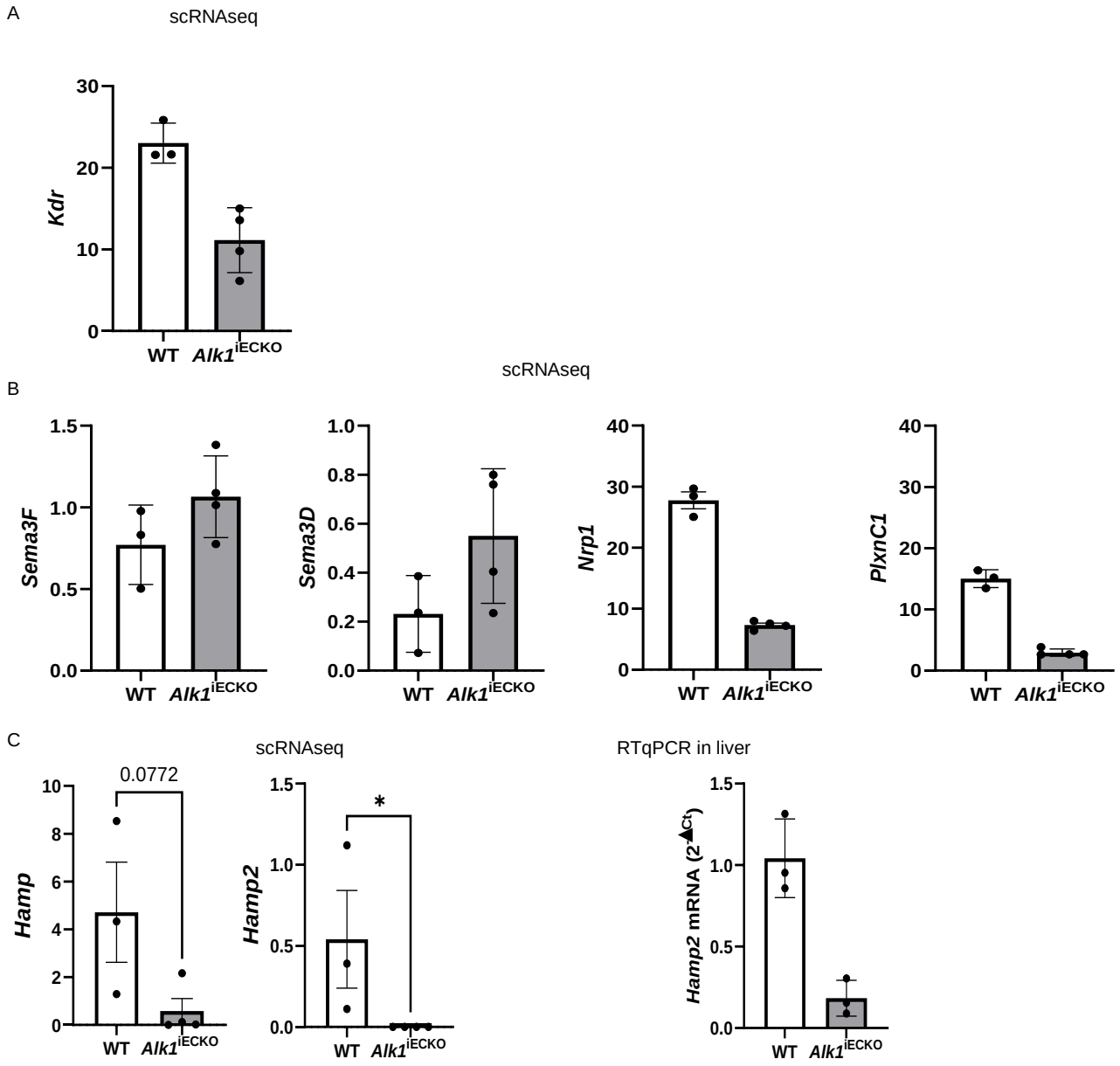
Figure 8: LSEC and hepatocyte zonation are altered in *Alk1*$^{iEC+/-}$ mice and in HHT-2 patients



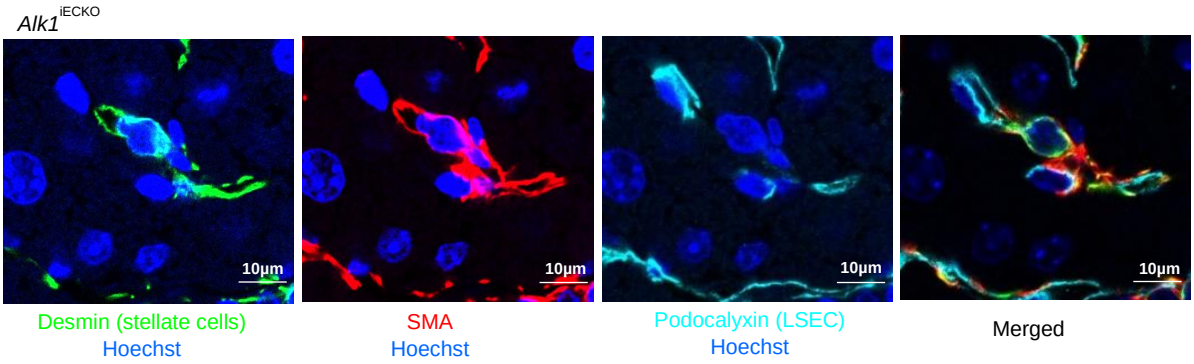
Supplementary figure 1: Experimental timeline for scRNAseq of liver from WT and *Alk1*^{iECKO} mice



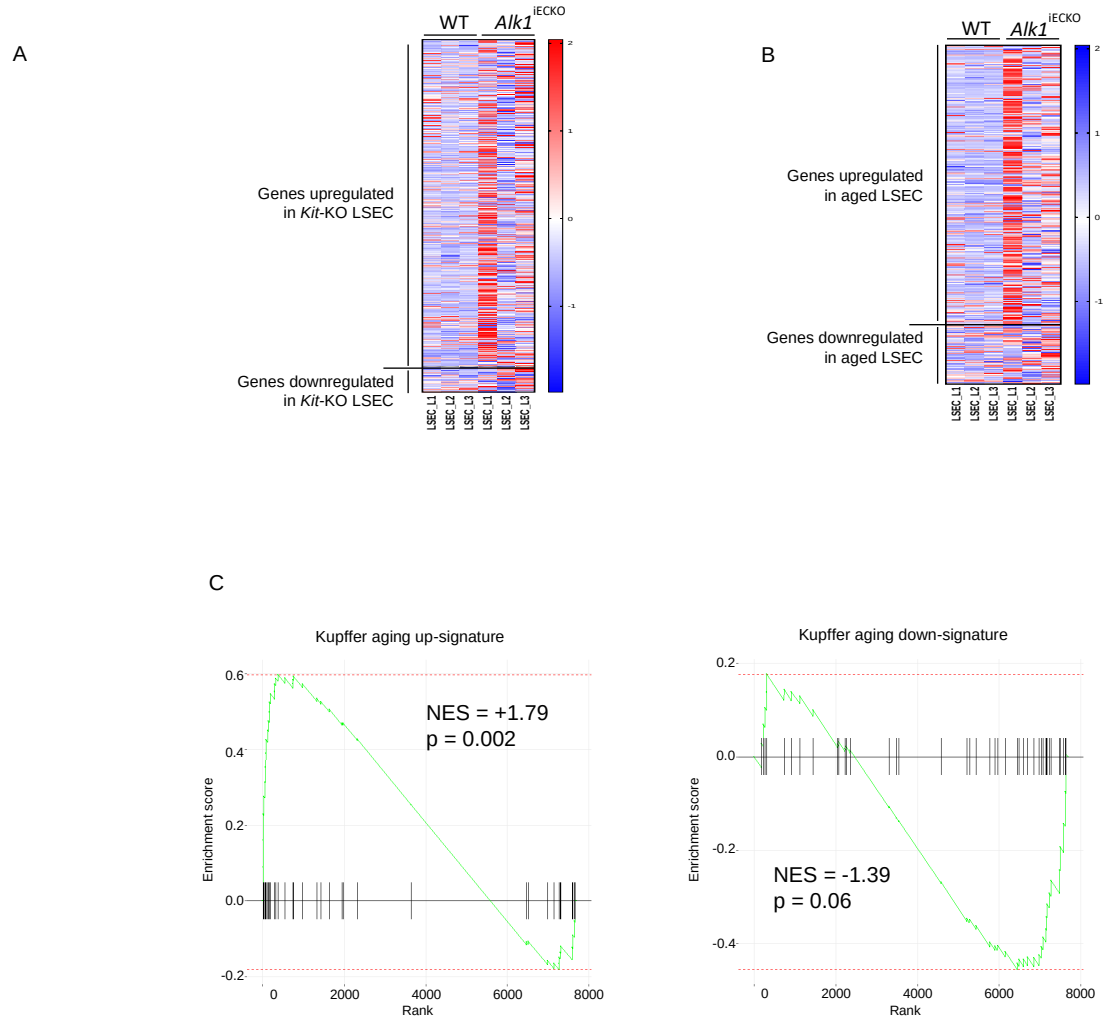
Supplementary figure 2: Kinetics of Lyve1 loss and endomucin gain post tamoxifen injection in liver sections of WT and *Alk1*^{iECKO} adult mice.



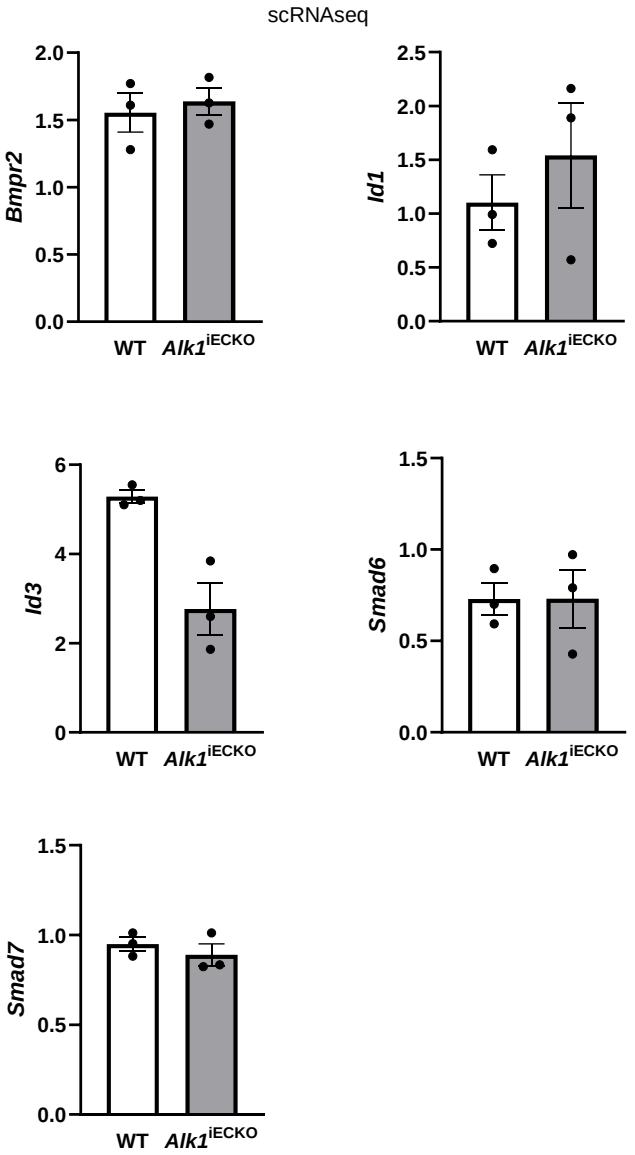
Supplementary figure 3: mRNA expression levels in WT and *Alk1*^{iECKO} adult mice



Supplementary Figure 4: Endothelial *Alk1* deletion in adult mice leads to hepatic stellate cell activation



Supplementary Figure 5: Endothelial *Alk1* in adult mice causes premature hepatic aging signature in LSEC and Kupffer cells



Supplementary Figure 6: mRNA expression levels from RNAseq analysis in Kupffer cells of WT and *Alk1*^{iECKO} adult mice

	p_val	avg_log2FC	pct.1	pct.2	p_val_adj
Zbtb16	0	9.39943831180682	0.716	0.005	0
Rflnb	0	6.78533015313473	0.671	0.035	0
Apln	1.28971711029582e-75	6.37492849848145	0.157	0.01	2.82925242485594e-71
Spaar	1.11651530128981e-69	5.98038352614392	0.1	0.001	2.44929961643945e-65
Sema3a	2.70245653116469e-198	5.80922757112464	0.362	0.018	5.92837889241599e-194
Emp1	9.27038307568795e-81	5.6605396796356	0.125	0.003	2.03364393531367e-76
Grrp1	2.59135425330409e-139	5.28216038436044	0.233	0.008	5.68465382547317e-135
Slc10a6	1.52417313756699e-270	5.27112741180431	0.513	0.032	3.34357861188071e-266
Angptl4	1.12908631219997e-65	5.23006351786255	0.117	0.005	2.47687664307308e-61
Cavin3	2.21829829486967e-92	5.13979324703194	0.172	0.008	4.86628096945559e-88
Depp1	1.2426611862008e-199	5.08753220572207	0.335	0.012	2.7260258441687e-195
Csf2rb	7.18552262596367e-264	4.7830495773838	0.493	0.028	1.57628809845765e-259
Pdgfb	0	4.7092269040145	0.718	0.079	0
Jag2	4.54454022561156e-51	4.63423924675734	0.106	0.007	9.96935789292408e-47
Gprc5b	1.10012177696536e-135	4.58218796175704	0.268	0.016	2.41333714212891e-131
Itga3	2.19304386746514e-119	4.57869764955345	0.237	0.014	4.81088033205828e-115
Ltc4s	1.62549625070829e-253	4.51294719671136	0.685	0.106	3.56585112517877e-249
Sulf2	3.77636101964976e-92	4.42094801298743	0.176	0.009	8.28420316880568e-88
Csf2rb2	9.28737445938767e-222	4.39907504319769	0.509	0.049	2.03737133515587e-217
Adamts5	4.40408162900337e-123	4.30936989225308	0.333	0.039	9.66123386954469e-119
2810029C07Rik	1.53977484554782e-51	4.24504040793623	0.104	0.006	3.37780407867826e-47
Gda	7.29620972284264e-41	4.1735182910966	0.125	0.016	1.60056952689999e-36
Prnp	9.88426010071818e-98	4.14116196357846	0.198	0.012	2.16831013829455e-93
Rgcc	6.20239183888378e-63	4.11736209546675	0.16	0.015	1.36061869769594e-58
Rab11fip5	1.79106306402498e-60	4.1027598662376	0.127	0.008	3.9290550435516e-56
Kcng2	9.21059049091493e-65	4.01968823150098	0.129	0.007	2.02052723599201e-60
Lrg1	3.27539759447458e-176	4.0063115294156	0.573	0.104	7.18523970299888e-172
Emid1	6.48716302299192e-51	3.98385866112277	0.129	0.012	1.42308895235374e-46
Ablim2	1.3301027609459e-64	3.96167691820234	0.133	0.008	2.91784642668701e-60
Cyb561	8.11001314721834e-86	3.82891505265101	0.211	0.019	1.77909358410529e-81
Adamts6	8.38017052264566e-205	3.75280908851799	0.656	0.121	1.83835800755278e-200
Gpr143	2.38840767661238e-83	3.73059833655289	0.217	0.022	5.23944992018458e-79
Apol9b	1.01722205074573e-45	3.68035634212356	0.108	0.009	2.23148001272092e-41
D5Ertd615e	6.6847319949015e-52	3.64368126145762	0.184	0.029	1.46642965772154e-47
Elmo1	9.83849391021743e-90	3.59985804070449	0.387	0.085	2.1582704090844e-85
1200007C13Rik	7.7608834683229e-56	3.57873253117471	0.188	0.028	1.70250500644599e-51
Tmem255a	3.5207590188633e-57	3.47726674297191	0.155	0.017	7.72348905968041e-53
Ston2	4.77781653949842e-45	3.43648543036314	0.174	0.03	1.04810961426977e-40
Per2	2.38089841515485e-56	3.38805670373821	0.2	0.032	5.22297685332518e-52
Thrsp	1.86508856868694e-118	3.38504190306647	0.479	0.105	4.09144479312855e-114
Syne3	5.11247021310488e-30	3.28150093236975	0.1	0.014	1.12152259064882e-25
Cmklr1	4.03260353333811e-36	3.26395794291308	0.104	0.012	8.84632237108382e-32
Myo19	1.26056003699791e-80	3.23957008157598	0.272	0.041	2.76529055316231e-76

Supplementary table 1 : Genes upregulated in endothelial cells

	p_val	avg_log2FC	pct.1	pct.2	p_val_adj
Slc26a10	5.30780621664372e-51	-5.97656036218924	0.006	0.348	1.16437344974513e-46
Gm14964	4.1922771650275e-15	-5.72620053842326	0	0.114	9.19659841692084e-11
Hs6st3	3.45288155536525e-13	-5.12010296620394	0.008	0.114	7.57458626800475e-09
Gpc1	6.1637276548305e-21	-4.99670707323389	0.006	0.166	1.35213693564017e-16
Ackr4	3.96776415988506e-35	-4.58521544584086	0.01	0.266	8.70408423753985e-31
Clec4g	2.1258154496397e-251	-4.49080964559924	0.342	0.974	4.66340135187462e-247
Id3	5.6386492331844e-199	-4.31218866161384	0.137	0.888	1.23695048228366e-194
Ackr1	5.34272376963158e-36	-4.3080806000608	0.018	0.282	1.17203331334408e-31
9530020I12Rik	5.17590730051165e-19	-3.84954822670535	0.018	0.173	1.13543878451324e-14
Gm19461	1.80931963855386e-17	-3.7349577569118	0.018	0.162	3.96910449109559e-13
Gm37896	4.96506058916168e-12	-3.57325389238089	0.01	0.109	1.0891853414444e-07
Il1a	6.20875596022968e-124	-3.46404024608382	0.141	0.742	1.36201479499558e-119
Tox2	2.77169478473192e-18	-3.36674404452954	0.035	0.192	6.08026684926641e-14
Igsf23	1.56021954901599e-21	-3.3494288064517	0.027	0.204	3.42265362467638e-17
Cenpa	7.8245275905072e-42	-3.21328508910964	0.072	0.379	1.71646661752956e-37
Hic1	2.04950580932839e-30	-3.19836514047187	0.053	0.295	4.4960008939237e-26
Rgs10	4.77657569489706e-17	-3.1434008083263	0.033	0.181	1.04783741018957e-12
Smad6	6.74786854086522e-137	-3.10170531919303	0.266	0.814	1.4802799218096e-132
Aass	5.17078346090979e-155	-3.09368633273084	0.149	0.834	1.13431476781978e-150
Gm30938	1.411681020165e-46	-3.08350633176878	0.078	0.41	3.09680465393596e-42
Hspa1b	1.32136612518169e-16	-3.07596434820942	0.076	0.231	2.89868086881108e-12
Esrrb	9.96301508119095e-21	-3.05485283658148	0.057	0.238	2.18558661836086e-16
Plppr5	9.75191578794831e-16	-3.02403005066314	0.033	0.173	2.13927776640222e-11
Slc39a8	2.50824228796012e-141	-2.9607009029652	0.294	0.83	5.50233110709812e-137
Gna14	5.78541288030692e-46	-2.95962057549543	0.041	0.373	1.26914602355293e-41
Id2	6.94251497226945e-85	-2.95064625490251	0.1	0.595	1.52297950946675e-80
Gramd1c	2.16077204575396e-23	-2.87644814618175	0.035	0.23	4.74008563677047e-19
Hspa1a	1.82892434681441e-17	-2.85253066867764	0.037	0.191	4.01211133960677e-13
Fcna	8.48340565086784e-12	-2.8512415967907	0.029	0.135	1.86100469763088e-07
Ckap2l	9.18154677974754e-13	-2.8463079827793	0.018	0.129	2.01415591707322e-08
Tiam1	1.68340216252081e-59	-2.83456298639831	0.09	0.49	3.69287932392191e-55
Fabp1	2.3185994838599e-17	-2.79775083783771	0.031	0.182	5.08631168774346e-13
Ctnna3	2.10170655383164e-17	-2.76280768586944	0.031	0.182	4.61051366714047e-13
Ldlr	1.8420980662524e-41	-2.75898737964321	0.051	0.36	4.04101052793789e-37
Tpbgl	2.66900013586194e-98	-2.69086420386721	0.237	0.721	5.85498559804033e-94
Itga8	5.79737960131052e-100	-2.68932986666784	0.211	0.738	1.27177116313949e-95
Hk2	2.48859600508098e-13	-2.67578225808123	0.008	0.116	5.45923305634615e-09
C1qtnf6	9.47713620252018e-18	-2.66982197739463	0.045	0.204	2.07899936874685e-13
Ftl1-ps1	7.81747406056462e-09	-2.59519875660086	0.022	0.103	0.000171491928466606
Gm10605	3.41353066304474e-33	-2.58559712686823	0.082	0.349	7.48826221552124e-29
Hbb-bs	1.57867407724594e-05	-2.54757919819217	0.123	0.067	0.346313732325441
Fabp5	2.44440876093298e-76	-2.54038344189092	0.266	0.682	5.36229949885869e-72
Lypd6	7.39336181693072e-13	-2.47127327493992	0.01	0.116	1.62188178178009e-08

Supplementary table 2 : Genes downregulated in endothelial cells

	p_val	avg_log2FC	pct.1	pct.2	p_val_adj
S100g	1.0799000843479e-100	10.7915580699998	0.432	0.001	2.368976815034e-96
Spink1	8.13318305012223e-67	5.91049005090338	0.327	0.007	1.78417636570531e-62
Hsd3b1	1.48414488127627e-27	5.86271364075813	0.141	0.004	3.25576862605575e-23
Eif4ebp3	4.93240271276489e-84	4.03326456854033	0.608	0.071	1.08202118309923e-79
Rgs16	1.17071484387988e-37	3.99132941997213	0.211	0.009	2.56819715301928e-33
Mt2	1.77131398289646e-91	3.84774885859705	0.704	0.101	3.88573148427997e-87
Selenbp2	1.34242487954295e-40	3.66806966986211	0.402	0.071	2.94487745825338e-36
Serpina7	3.68685121414123e-39	3.62209770359953	0.266	0.021	8.08784550846161e-35
Mt1	1.22478632686169e-95	3.41720717259136	0.965	0.412	2.68681376523648e-91
Gm33543	8.85729006704661e-23	3.12992139073495	0.186	0.021	1.94302372200801e-18
Defb1	1.05908656565026e-26	3.01892659239974	0.196	0.018	2.32331819906698e-22
Tstd1	1.13322214257254e-36	2.99795076239251	0.382	0.069	2.48594941416138e-32
Enpp2	9.88929519287843e-19	2.81057229664682	0.191	0.031	2.16941468646174e-14
Pla2g12a	7.6713959207867e-30	2.74905424611271	0.271	0.037	1.68287412314298e-25
Igfbp1	1.31383255249458e-30	2.71168537943587	0.302	0.046	2.88215447040737e-26
Socs2	4.34082564170924e-34	2.71028703786783	0.357	0.061	9.52246921021757e-30
Rbm3	1.23041022086323e-61	2.54629035428713	0.739	0.206	2.69915090150768e-57
Gm43305	1.62394384656454e-13	2.54453523571804	0.101	0.01	3.56244561620863e-09
Zbtb16	2.45939943567199e-16	2.54040621982845	0.156	0.023	5.39518454203365e-12
Fmo2	4.24660007084314e-09	2.51593233978455	0.106	0.021	9.3157665754086e-05
Dntt	2.84748125410222e-12	2.45253443825717	0.126	0.021	6.24651962712404e-08
Sult1a1	9.01223427553773e-85	2.44087770594537	0.955	0.571	1.97701383302471e-80
Cep85	1.26484004325717e-08	2.40278562140381	0.141	0.039	0.000277467960289326
Gfra1	7.38848344168645e-17	2.35205776635681	0.206	0.042	1.62081161260276e-12
Cp	1.44193940045377e-27	2.32262526163205	0.513	0.169	3.16318246277543e-23
Cdkn1a	2.40185406386209e-35	2.30848112293357	0.492	0.124	5.26894725989427e-31
Noct	3.8881229727939e-09	2.30767018079583	0.131	0.032	8.52937536541798e-05
Dsg1c	4.11272474226536e-12	2.28875724319207	0.161	0.036	9.02208426710752e-08
Fkbp5	1.40003835453557e-23	2.2172973730246	0.261	0.046	3.07126413834468e-19
Gm19950	3.89981836689981e-12	2.20086814818401	0.161	0.035	8.55503155146812e-08
Cyp2c39	7.43025769696218e-29	2.19630270221742	0.422	0.108	1.62997563098259e-24
Apoa1	4.73308339723647e-43	2.1939543879293	0.925	0.585	1.03829650485176e-38
Nr1i3	3.05509735272994e-26	2.14121432204454	0.332	0.07	6.70196706268367e-22
Nlrp12	1.7326983872441e-28	2.12235663206876	0.402	0.098	3.80102045209737e-24
Gm31583	1.93713586976916e-08	2.04769732058109	0.106	0.023	0.00042494949575126
Ip6k2	2.69895760487999e-07	2.04108075250373	0.121	0.034	0.00592070329782524
Gm5096	2.26573149664489e-37	2.03649406655341	0.633	0.225	4.97033518418991e-33
Cebpd	2.76533327189247e-11	2.00736568272183	0.121	0.021	6.06631159855051e-07
Retreg1	5.61097899124497e-19	1.94169527650123	0.342	0.105	1.23088046130941e-14
Gm14325	4.25332844152974e-07	1.93879580601197	0.121	0.035	0.00933052660218379
Rbp1	2.39282109998364e-36	1.92395310185326	0.658	0.236	5.24913164703412e-32
Hsd17b13	2.56646264368372e-19	1.91209480826425	0.372	0.12	5.63004910144898e-15
2010003K11Rik	1.80505589509114e-14	1.89766348566891	0.181	0.037	3.95975111706144e-10

Supplementary table 3 : Genes upregulated in hepatocytes

	p_val	avg_log2FC	pct.1	pct.2	p_val_adj
Hamp	5.84834480591362e-14	-5.92715551297078	0.015	0.255	1.28295140007327e-09
Car3	2.18162966289002e-71	-5.08422056965724	0.131	0.829	4.78584099148184e-67
Pde4d	2.72256193065244e-06	-4.21286420076577	0.02	0.135	0.0597248410727226
Cyp2c69	1.23063929068373e-08	-4.17093164940203	0.025	0.185	0.00026996534119729
Hdac9	7.57493046368547e-08	-3.97988991218044	0.03	0.179	0.00166171249581868
Fcna	1.47457033691921e-08	-3.91785962941524	0.015	0.17	0.000323476494809968
Lrrc8d	6.13454333096143e-07	-3.90852067964443	0.035	0.169	0.0134573477051301
Saa2	1.19098501745936e-26	-3.90429097844287	0.206	0.567	2.61266383280059e-22
Folr2	3.90930012966117e-06	-3.63295641092259	0.02	0.133	0.0857583169443771
Glul	0.919155250043001	-3.60991407688889	0.216	0.197	1
Cd5l	1.17694351448406e-21	-3.50604345955553	0.131	0.479	2.58186098772369e-17
C1qc	7.12206209798991e-14	-3.39843814886396	0.05	0.304	1.56236676243605e-09
Gngt2	9.10056634428046e-05	-3.37230557092689	0.015	0.1	1
Vsig4	1.0226863732398e-08	-3.33404679674672	0.075	0.251	0.000224346709697615
Nudt7	1.90843565036957e-39	-3.21063637656086	0.231	0.674	4.18653528621573e-35
Dio1	9.87844457869029e-05	-3.20747861654243	0.02	0.107	1
Acly	1.85473588889683e-21	-3.20048716896437	0.186	0.509	4.06873411947299e-17
Sult2a5	4.04952110792934e-32	-3.10454225127522	0.075	0.554	8.8834344544646e-28
Clec4f	6.06747040926999e-19	-2.97663693352442	0.095	0.43	1.33102098368156e-14
mt-Nd3	2.26818126140664e-31	-2.92537114309557	0.191	0.637	4.97570923314775e-27
Plpp3	0.0115494230323773	-2.79890830012546	0.05	0.105	1
Ifi27l2a	1.17045538451415e-06	-2.73077356579688	0.075	0.217	0.0256762797700869
Cfp	4.21705585397307e-05	-2.72241787815372	0.055	0.164	0.925095542686072
Sult5a1	0.000328424560913243	-2.67636891113526	0.035	0.119	1
Fyb	0.00128870398443628	-2.62911165365532	0.05	0.126	1
Thrsp	1.54851203436369e-46	-2.60726583838442	0.568	0.834	3.39697084978362e-42
Lst1	0.000115198234957828	-2.56673964644487	0.02	0.106	1
Id1	0.000155177520931068	-2.52873852392821	0.055	0.152	1
Lgmn	1.02046085210241e-09	-2.52798649761512	0.121	0.322	2.23858497125706e-05
Fasn	6.25094721327072e-14	-2.51783845309197	0.256	0.483	1.3712702901752e-09
Nat8f2	5.15958897047465e-09	-2.50859345541462	0.106	0.293	0.000113185903245302
C1qa	1.56545639985239e-15	-2.48745381723746	0.121	0.416	3.4341417043562e-11
Sult2a8	2.75031498729245e-10	-2.47718959407775	0.065	0.273	6.03336598762344e-06
Grn	1.35164043464986e-05	-2.47459238004055	0.141	0.267	0.29650936214914
Rnf213	0.0131571440515438	-2.42851006212554	0.065	0.122	1
Scd1	2.34493105686786e-11	-2.40599795869721	0.332	0.512	5.14407525945103e-07
Csad	2.91372765778148e-14	-2.39279009195809	0.327	0.522	6.39184436287524e-10
mt-Nd1	1.4285727727282e-48	-2.38666888936675	0.322	0.884	3.13386009153386e-44
Ucp2	0.000702783202830573	-2.37975253557025	0.04	0.119	1
Ptprj	0.000309414353464981	-2.37541224486927	0.065	0.159	1
Ctsc	1.79634346920549e-09	-2.32796123291895	0.106	0.308	3.94063866839609e-05
mt-Co2	2.77315510106998e-53	-2.31419047566001	0.422	0.939	6.08347034521721e-49
Mndal	2.38071685916931e-05	-2.29251776341965	0.035	0.142	0.522257857395972

Supplementary table 4 : Genes downregulated in hepatocytes

	p_val	avg_log2FC	pct.1	pct.2	p_val_adj
Hbb-bs	0.00170946123553996	6.70157649462082	0.152	0.097	1
Ddit4	1.65486752881492e-95	5.89020032095036	0.375	0.017	3.6302828979613e-91
Gm22146	4.66866522017887e-25	5.04130705897735	0.104	0.005	1.02416508935064e-20
Chil3	2.23891219308422e-15	4.89644186958497	0.107	0.018	4.91150167796886e-11
Fhit	3.02205750379792e-35	4.79685716038427	0.202	0.025	6.62948754608149e-31
Gm43305	2.59701864506051e-47	4.36342802127949	0.28	0.038	5.69707980166923e-43
Gm15675	1.95385995222006e-72	4.33092152219847	0.494	0.102	4.28618257718514e-68
Ms4a4a	1.87949986585717e-52	4.03317050361966	0.256	0.022	4.12305885573087e-48
Gm49838	1.12270648433456e-22	3.83635346748828	0.125	0.014	2.46288121468473e-18
Ccl9	2.23400022221234e-34	3.63455611066658	0.342	0.099	4.9007262874672e-30
Gm42031	3.52752632844486e-19	3.58253414554763	0.134	0.022	7.73833450670948e-15
Lepr	1.50572261905071e-32	3.42361723638138	0.42	0.161	3.30310370941154e-28
Fkbp5	2.40855057843434e-85	3.37269337669637	0.792	0.471	5.28363740391141e-81
Gm48099	7.44921769715358e-37	3.24577880784116	0.378	0.111	1.63413488622458e-32
Airn	3.82273987451246e-21	3.09748982298769	0.202	0.05	8.38594446271799e-17
Sh3pxd2b	1.15976115959512e-67	3.0511610835425	0.479	0.099	2.54416805580382e-63
Mmp14	1.02736455396951e-55	3.03243387715638	0.473	0.12	2.25372962204291e-51
Tagln	1.61239850768682e-26	3.02650959841165	0.167	0.023	3.53711860631257e-22
Ebf1	2.81114891045892e-09	2.91194640124575	0.107	0.032	6.16681736487374e-05
Atp8b4	1.45836981202021e-08	2.89111602473683	0.101	0.031	0.000319922585662873
Gas7	2.03773935041597e-14	2.76549632484336	0.14	0.035	4.47018881300751e-10
Sell	3.49782514261635e-13	2.75796562731086	0.223	0.09	7.67317901535748e-09
Adgrg6	1.19645904918687e-21	2.75295747860367	0.304	0.112	2.62467221620124e-17
Gm26917	1.10016384242435e-24	2.65395477170958	0.842	0.726	2.41342942112629e-20
Mrap	1.59508535174489e-29	2.58074679852972	0.196	0.03	3.49913873612276e-25
Gm19951	4.13290638564836e-62	2.51863771895539	0.905	0.717	9.0663567381968e-58
Ccnd3	5.05450486426421e-53	2.47887239555043	0.717	0.453	1.10880673207364e-48
Cxcr4	1.38271390659751e-08	2.46346300144504	0.125	0.044	0.000303325949690297
Hist1h2ap	0.270412023059658	2.43653217964225	0.119	0.106	1
Ipcef1	6.81969041324302e-16	2.27985107555768	0.158	0.039	1.49603548595312e-11
Gda	4.35975767037688e-20	2.26575640617745	0.217	0.059	9.56400040150576e-16
Arhgap22	5.37088639569197e-15	2.26108050394672	0.107	0.018	1.17821134862295e-10
Tgfb3	9.59238354922854e-15	2.24943517694817	0.185	0.058	2.10428117919426e-10
Glis3	9.19354603986744e-14	2.24663759071955	0.137	0.034	2.01678819476572e-09
Sorl1	2.54461855161014e-06	2.23623820187943	0.158	0.078	0.0558212971666716
Lars2	6.52804221456021e-57	2.20305532413264	0.985	0.926	1.43205662060807e-52
Klf9	2.35603122067662e-30	2.1720759557354	0.512	0.266	5.1684256887983e-26
Apoa1	4.2416223333251e-12	2.09852540978849	0.205	0.08	9.30484691261527e-08
Marco	1.50314628337022e-43	2.0885189325768	0.854	0.743	3.29745200182924e-39
Hp	2.47808076495832e-12	2.07470243834629	0.271	0.127	5.43616577408906e-08
Socs2	1.27836394440068e-07	2.07157878766659	0.19	0.093	0.00280434698483178
Cd55	9.92303162902529e-37	2.02692651554113	0.69	0.463	2.17681544845928e-32
Ighm	0.000548889713019232	2.02135622362024	0.173	0.112	1

Supplementary table 5 : Genes upregulated in Kupffer cells

	p_val	avg_log2FC	pct.1	pct.2	p_val_adj
Clec4g	3.26715831151209e-15	-4.75627436895049	0.009	0.179	7.16716518796408e-11
Ptgis	7.61053583567619e-34	-4.0432459434361	0.042	0.388	1.66952324627229e-29
Tcim	3.29591035954593e-14	-3.72235345331395	0.021	0.188	7.23023855573591e-10
Aqp1	1.31654162342186e-08	-3.70566809172169	0.015	0.118	0.000288809735930054
Cd209f	4.39816506100328e-09	-3.47617395729607	0.024	0.137	9.6482546943229e-05
Plxna4	4.13379283475466e-31	-3.23798808828051	0.086	0.43	9.06830134160131e-27
Gbp2b	6.68021857832135e-42	-2.9484146250125	0.095	0.512	1.46543954952635e-37
Cd207	9.20802273698547e-13	-2.85318815790378	0.116	0.298	2.0199639478125e-08
Dscaml1	9.04092710964383e-07	-2.84908966330019	0.021	0.106	0.0198330818004257
Kcnq1	4.20470700114783e-24	-2.82782451999229	0.065	0.348	9.22386574841799e-20
Ass1	7.21865977640962e-06	-2.82456739019927	0.033	0.114	0.158355739515098
Igfbp7	1.50043226800138e-09	-2.78334692820013	0.06	0.197	3.29149826631463e-05
Fabp1	6.13494652060744e-13	-2.68155547636723	0.036	0.204	1.34582321822565e-08
Hist3h2ba	3.0719268059828e-07	-2.6370308423734	0.018	0.106	0.00673888583428446
H2-Eb1	2.03620581378812e-44	-2.49086449266488	0.271	0.662	4.466824693707e-40
Gm26802	2.45121587065595e-16	-2.43943045289672	0.077	0.293	5.37723225545797e-12
Gm26542	2.05909632837685e-12	-2.36363260722291	0.101	0.279	4.51703961556031e-08
A330032B11Rik	1.17555950075999e-05	-2.36093827364475	0.03	0.106	0.257882487681719
Cryba4	9.39275822566323e-10	-2.35742850886179	0.036	0.164	2.06048937196374e-05
Slc15a2	1.54180070008073e-21	-2.35237457233569	0.027	0.275	3.3822481957671e-17
Srcin1	1.34292364853696e-08	-2.34829511304032	0.018	0.123	0.000294597160779552
Gm13684	1.57829619023494e-07	-2.32290327686361	0.048	0.155	0.0034623083525184
Art2b	2.20376603518836e-12	-2.29156968656676	0.048	0.213	4.83440155139271e-08
Dnase1l3	1.22922870586481e-14	-2.28737867221029	0.11	0.325	2.69655901205564e-10
Klrc1	1.13252923348584e-11	-2.19115650695187	0.027	0.173	2.48442937949789e-07
Gm39556	8.84207804236089e-15	-2.18724040289342	0.083	0.283	1.93968666015271e-10
Bloc1s3	5.66120143964878e-09	-2.1574085601773	0.051	0.179	0.000124189775981575
Sv2c	1.65214436255914e-13	-2.12420171518765	0.027	0.193	3.62430908814599e-09
Gm15655	9.16136034759703e-06	-2.11978836476016	0.039	0.121	0.200972761945236
Serf1	8.26293763724611e-06	-2.11552305204533	0.054	0.143	0.181264062948268
Grik3	1.97385840271868e-11	-2.10663038452187	0.027	0.172	4.33005317804397e-07
Cd74	3.09744505140045e-54	-2.09838528040965	0.625	0.889	6.79486520925717e-50
Lxn	7.53218908086286e-06	-2.09201627010686	0.033	0.112	0.165233631866889
Ltc4s	1.13828138802432e-16	-2.08822979598296	0.06	0.277	2.49704788090895e-12
Gm11464	5.41181361179908e-05	-2.08537903350431	0.039	0.11	1
Ost4	1.23240064067873e-29	-2.08246134175087	0.167	0.497	2.70351728545692e-25
E030030I06Rik	1.87556755143385e-05	-2.08036017363704	0.039	0.118	0.411443253758043
Klhl13	8.08090875551811e-10	-2.07612677664119	0.062	0.204	1.77270895369801e-05
Ikzf2	3.94855520253303e-07	-2.06295278819417	0.027	0.121	0.00866194554779671
Patl2	9.49667148674666e-06	-2.06186927713653	0.027	0.102	0.208328482404761
Kcna2	6.8580332614636e-51	-2.03730052486226	0.375	0.763	1.50444675656727e-46
Spef1	1.75650609295917e-06	-2.02478494780214	0.024	0.109	0.0385324741612454
Gm48321	0.000224487623786378	-2.01277013714265	0.045	0.112	1

Supplementary table 6 : Genes Downregulated in Kupffer cells

	p_val	avg_log2FC	pct.1	pct.2	p_val_adj	Ligands
Apln	1.29E-75	6.374928498	0.157	0.01	2.83E-71	TRUE
Sema3a	2.70E-198	5.809227571	0.362	0.018	5.93E-194	TRUE
Pdgfb	0	4.709226904	0.718	0.079	0	TRUE
Jag2	4.54E-51	4.634239247	0.106	0.007	9.97E-47	TRUE
Lrg1	3.28E-176	4.006311529	0.573	0.104	7.19E-172	TRUE
Il1a	6.21E-124	-3.464040246	0.141	0.742	1.36E-119	TRUE
Ccn2	2.37E-124	2.941630249	0.444	0.076	5.20E-120	TRUE
Vegfc	1.34E-12	-2.31096369	0.027	0.141	2.94E-08	TRUE
Wnt2	3.42E-51	-2.293421703	0.227	0.572	7.49E-47	TRUE
Pdgfa	5.85E-22	1.857036634	0.147	0.042	1.28E-17	TRUE
Bmp2	7.39E-137	-1.70766945	0.759	0.96	1.62E-132	TRUE
Igf1	5.23E-08	-1.680074628	0.039	0.122	0.001146313	TRUE
Fbn1	5.64E-11	-1.633571576	0.043	0.155	1.24E-06	TRUE
Ttr	1.56E-08	-1.497917279	0.033	0.117	0.000341245	TRUE
Mif	2.87E-11	-1.49064972	0.127	0.259	6.29E-07	TRUE
Vegfb	1.56E-11	-1.403322898	0.149	0.283	3.43E-07	TRUE
Manf	1.01E-39	-1.34494842	0.409	0.664	2.22E-35	TRUE
Jag1	4.90E-10	1.218622073	0.202	0.107	1.08E-05	TRUE
Tnfsf13	8.64E-08	-1.203211516	0.155	0.262	0.001895436	TRUE
Il15	8.44E-16	1.186260176	0.505	0.362	1.85E-11	TRUE
Hgf	9.12E-30	-1.185882352	0.532	0.73	2.00E-25	TRUE
Adm	0.000380865	1.126417531	0.282	0.22	1	TRUE
Cxcl9	6.36E-16	-1.083250647	0.362	0.547	1.40E-11	TRUE
Metrnl	1.54E-06	-1.080817951	0.119	0.209	0.033797198	TRUE
Il16	9.30E-18	-1.040263849	0.256	0.45	2.04E-13	TRUE
Hbegf	1.54E-19	-1.028060922	0.266	0.473	3.38E-15	TRUE
Pf4	0.007146908	-1.026834204	0.115	0.157	1	TRUE
Cklf	6.89E-06	-0.988671735	0.119	0.2	0.151174555	TRUE
Sema3d	0.028249202	0.976130749	0.198	0.166	1	TRUE
Gmfg	8.84E-23	-0.9265863	0.384	0.618	1.94E-18	TRUE
Dpp4	6.12E-94	-0.919907562	0.873	0.961	1.34E-89	TRUE
Nenf	2.53E-14	-0.916850042	0.393	0.546	5.55E-10	TRUE
Tnfsf12	2.81E-12	-0.855857041	0.337	0.489	6.17E-08	TRUE
Cdc42ep2	5.68E-22	-0.810877712	0.505	0.695	1.25E-17	TRUE
Il33	0.002250303	-0.776801912	0.067	0.113	1	TRUE
Sema6b	4.42E-12	0.771553571	0.489	0.356	9.70E-08	TRUE
Flrt2	6.34E-06	-0.729952224	0.119	0.21	0.139092588	TRUE
Enho	2.52E-06	0.715340098	0.299	0.212	0.055192783	TRUE
Cxcl16	1.74E-20	-0.700886245	0.573	0.741	3.81E-16	TRUE
Rabep2	0.001350113	0.642545124	0.29	0.231	1	TRUE
Cmtm8	8.79E-35	-0.631610675	0.775	0.907	1.93E-30	TRUE
Hdgfl3	1.40E-12	-0.616853536	0.499	0.632	3.06E-08	TRUE
Osgin1	0.010936406	-0.597975981	0.078	0.116	1	TRUE

Sema6a	3.10E-40	-0.591298991	0.922	0.955	6.80E-36	TRUE
Fgf1	4.17E-05	0.579971118	0.536	0.483	0.914142014	TRUE
Cxcl10	8.20E-05	-0.576601445	0.309	0.409	1	TRUE
Tgfa	4.92E-08	-0.528068483	0.254	0.377	0.001078558	TRUE
Csf1	2.03E-08	-0.493357602	0.468	0.608	0.00044583	TRUE
Bmp6	1.34E-11	-0.47557737	0.687	0.829	2.95E-07	TRUE
Lrpap1	0.000120627	-0.466621607	0.38	0.458	1	TRUE
Pdgfd	0.004668105	0.418621647	0.695	0.713	1	TRUE
Cmtm7	0.054877421	0.398371864	0.389	0.357	1	TRUE
Gmfb	2.28E-07	-0.374201483	0.532	0.652	0.005003509	TRUE
Tnfsf10	1.62E-10	-0.373116088	0.599	0.742	3.56E-06	TRUE
Sema4c	0.063958011	0.369302041	0.491	0.469	1	TRUE
Il1b	0.193272866	0.36413218	0.082	0.102	1	TRUE
Gpi1	6.47E-06	-0.358912068	0.519	0.614	0.141857666	TRUE
Flt3l	0.142876014	-0.349405462	0.108	0.129	1	TRUE
Nampt	0.031993859	0.319902385	0.611	0.621	1	TRUE
Hmgb1	1.20E-06	-0.269602393	0.853	0.927	0.026251504	TRUE
Copa	1.62E-07	-0.265363544	0.679	0.786	0.003559656	TRUE
Sema6d	3.15E-06	-0.259518625	0.769	0.853	0.069145458	TRUE
Inhbb	0.170941728	-0.24881438	0.272	0.3	1	TRUE
Hdgf	0.062100702	-0.22850607	0.436	0.477	1	TRUE
Ntf3	0.396058577	0.21550375	0.241	0.263	1	TRUE
Sema3f	0.151168927	0.18846549	0.616	0.616	1	TRUE
Sema4b	0.755869478	0.181436998	0.407	0.43	1	TRUE
Hmgb2	1.65E-05	-0.16248066	0.421	0.513	0.362458327	TRUE
Gfer	0.843070813	-0.15988495	0.112	0.114	1	TRUE
Kitl	0.008182089	-0.159695704	0.62	0.679	1	TRUE
Aimp1	0.163219838	-0.149233992	0.37	0.4	1	TRUE
Gas6	0.992659473	0.14689499	0.701	0.759	1	TRUE
Rabep1	0.228556328	0.140871534	0.751	0.776	1	TRUE
Cmtm3	0.03913884	-0.117470742	0.56	0.629	1	TRUE
Ccl25	0.452681947	0.109157353	0.262	0.276	1	TRUE
Crlf2	0.792950752	0.106903654	0.313	0.311	1	TRUE
Ccl6	0.003768652	0.082678815	0.061	0.102	1	TRUE
Fbrs	0.969066404	0.077848771	0.299	0.296	1	TRUE
Alkbh1	0.27848766	-0.049963125	0.237	0.26	1	TRUE
Tgfb1	0.599989624	0.036537322	0.767	0.84	1	TRUE
a	0.983114748	-0.018735704	0.117	0.115	1	TRUE
App	0.566913309	0.016823533	0.955	0.958	1	TRUE
Grn	0.512287554	0.016810013	0.732	0.797	1	TRUE
Zfp106	0.860104263	-0.00512021	0.534	0.544	1	TRUE

Supplementary table 7 : Angiocrine factors upregulated and downregulated following *Alk1* invalidation

5.2. Résultats supplémentaires

Le poumon est un organe particulièrement affecté dans HHT, notamment par le développement de malformations artério-veineuses pulmonaires (PAVMs). Ces malformations contournent partiellement la microcirculation et augmentent le risque d'infarctus cérébral ou d'embolie paradoxale [23].

Le lit capillaire pulmonaire est hautement spécialisé et se compose de deux sous-populations distinctes : les aérocytes (aCap), spécifiques du poumon et localisés au contact immédiat des alvéoles, dédiés aux échanges gazeux, et les capillaires généraux (gCap) qui partagent certaines propriétés avec d'autres cellules endothéliales. Les analyses scRNA-seq du Tabula Muris [30] montrent que ces populations possèdent des signatures transcriptionnelles spécifiques : les aCap expriment des gènes liés à l'adhésion et à la séquestration leucocytaire, tandis que les gCap expriment des composants du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II et des enzymes impliquées dans la régulation vasomotrice. Les deux types cellulaires contribuent différemment à l'homéostasie (Figure 38).

Les aCap et gCap communiquent bidirectionnellement : les aCap sécrètent des ligands (*Apelin, Kit ligand*) ciblant les gCap, qui à leur tour produisent des facteurs (*Endothelin-1, VEGF-A*) agissant sur les aCap. Ces populations interagissent également avec d'autres cellules pulmonaires, telles que les cellules alvéolaires type 1 (AT1) et les péricytes, coordonnant les échanges gazeux, la vasomotricité et la régénération. Cette organisation fonctionnelle illustre l'adaptation du réseau capillaire pulmonaire à la double exigence d'efficacité des échanges gazeux et de plasticité vasculaire [25].

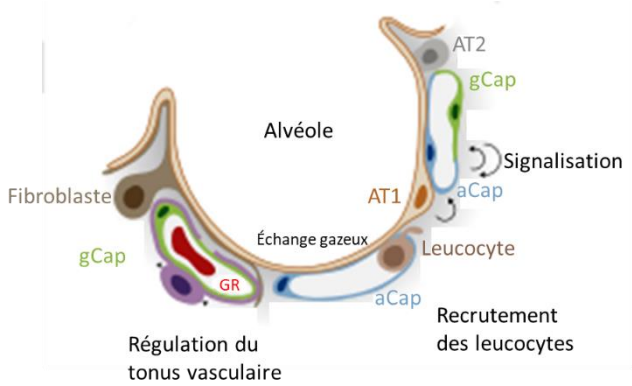


Figure 38. Représentation schématique d'une alvéole.
gCap : capillaires généraux ; aCap : Aérocytes; AT1,2 : Pneumocyte de type I, II ; GR : Globule rouge. Figure adaptée de [25].

Pour mieux comprendre le rôle d'ALK1 dans l'endothélium, nous avons réalisé une analyse single-cell des poumons sur les mêmes souris (WT versus souris *Alk1*^{iECKO}) que celles utilisées pour l'étude scRNAseq du foie. Cette approche comparative entre foie et poumon permet d'évaluer de manière plus globale les effets de la perte d'ALK1 sur deux organes fortement affectés dans HHT et sur deux lits vasculaires différents.

La représentation UMAP illustre les différents types cellulaires du tissu pulmonaire qui ont été caractérisés dans cette analyse incluant les cellules endothéliales, épithéliales, immunitaires et mésenchymateuses (Figure 39A).

Nous nous sommes ensuite concentrés sur les cellules endothéliales, en réalisant un sous-clustering spécifique. Cette analyse a mis en évidence plusieurs sous-populations, parmi lesquelles les capillaires aCap et gCap (Figure 39B).

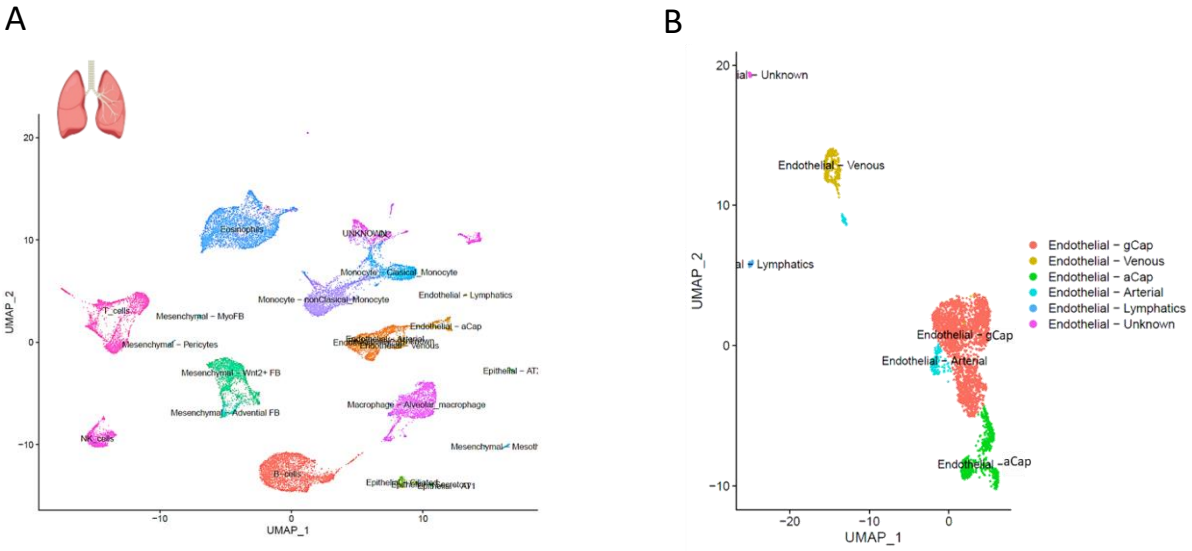


Figure 39. Cartographie transcriptionnelle des cellules pulmonaires et caractérisation des sous-populations endothéliales.

(A) Représentation UMAP de l'ensemble des cellules pulmonaires, chaque cluster correspondant à une identité cellulaire distincte définie par l'expression génique.
(B) Sous-clustering des cellules endothéliales révélant l'hétérogénéité et les différentes populations endothéliales.

5.2.1. Analyse comparative des fonctions biologiques entre endothélium hépatique et pulmonaire

Afin d'explorer plus en détail les fonctions affectées, nous avons réalisé une analyse d'enrichissement de gènes (GSEA) à partir des données de scRNAseq des cellules endothéliales pulmonaires (spécifiquement les cellules gCap, qui étaient les plus nombreuses) de manière similaire à celle réalisée pour le foie. La comparaison entre les deux organes a révélé qu'après la délétion d'*Alk1*, les voies inflammatoires, incluant TNFα/NF-κB, IL6-JAK-STAT3, sont significativement enrichies et augmentées dans les deux organes. En revanche, les fonctions métaboliques présentent une régulation opposée surtout la phosphorylation oxydative qui est diminuée dans les LSEC, alors qu'elle apparaissait fortement augmentée dans les cellules endothéliales pulmonaires (Figure 40). Cette tendance se reflète également au niveau des

gènes des complexes de transport d'électrons, diminués dans les cellules endothéliales hépatiques et augmentés dans les cellules endothéliales pulmonaires (Figure 41).

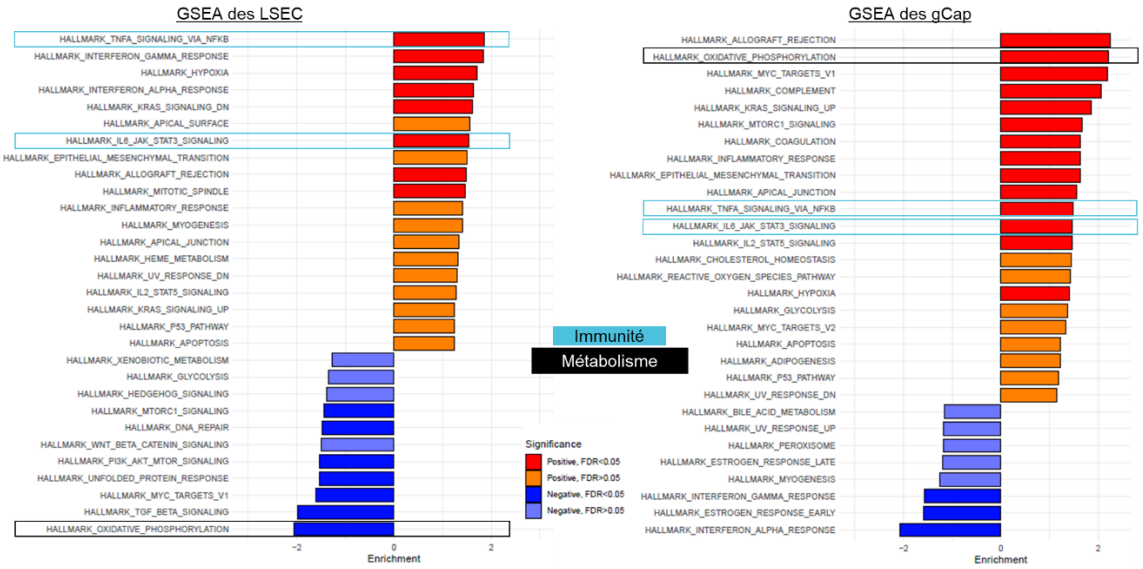


Figure 40. Analyse d'enrichissement de gènes (GSEA) des cellules endothéliales : LSEC et gCap.

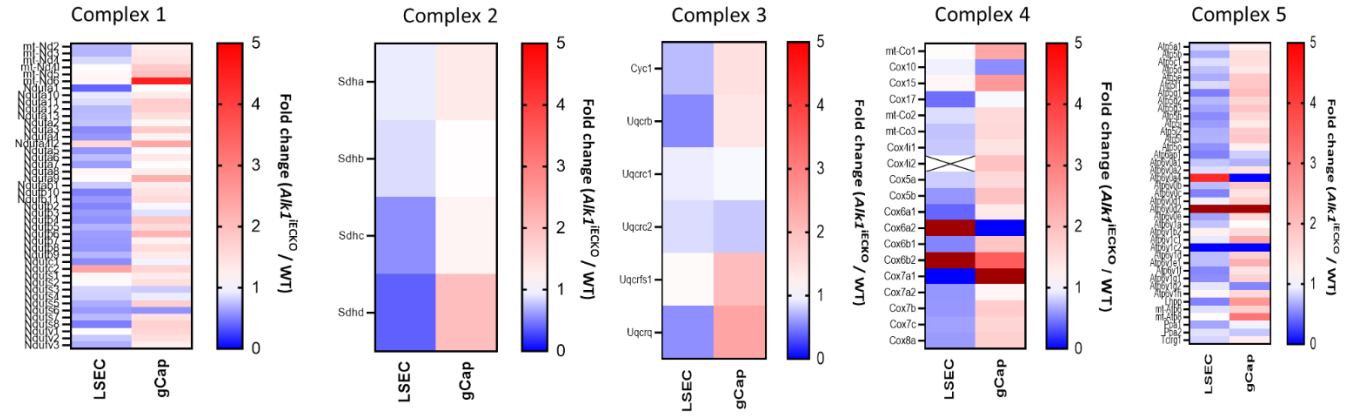


Figure 41. Régulation opposée des gènes des complexes de la chaîne de transport d'électrons dans les LSEC et les gCap suite à la délétion d'Alk1.

Heatmap représentant le fold change (Alk1^{iECKO} / WT) des gènes des différents complexes de la chaîne de transport d'électrons dans les LSEC et les gCap.

5.2.2. Analyse fonctionnelle de la phosphorylation oxydative dans les cellules endothéliales du foie et des poumons

Pour valider les résultats obtenus par scRNA-seq, et en particulier la spécificité d'ALK1 selon l'organe, nous nous sommes focalisés sur la régulation du métabolisme énergétique, en analysant spécifiquement la phosphorylation oxydative. Ce processus mitochondrial produit de l'ATP à partir de l'oxydation de substrats énergétiques (glucose, acides gras, acides aminés) grâce au transfert d'électrons le long de la chaîne respiratoire (composée de plusieurs complexes) et à la consommation d'oxygène. Pour évaluer directement l'activité mitochondriale, nous avons étudié en temps réel la consommation d'oxygène (OCR) reflétant la capacité des mitochondries à produire de l'ATP via la phosphorylation oxydative et permettant ainsi d'estimer l'efficacité de la chaîne respiratoire grâce à la technologie du lecteur Seahorse (Agilent). Cette analyse a été réalisé en collaboration avec l'IAB (Institut pour l'Avancée des Biosciences) à Grenoble.

Pour ce faire, nous avons isolés des cellules endothéliales chez les souris WT et *Alk1*^{iECKO}. Ces cellules sont ensuite mises en culture et ensemencées dans les plaques Seahorse (20 000 cellules par puits).

L'OCR est d'abord mesuré à l'état basal, puis différentes molécules sont ajoutées pour perturber la respiration mitochondriale (Figure 42). L'oligomycine est ajoutée pour inhiber l'ATP synthase, ce qui bloque la phosphorylation oxydative et réduit la consommation d'oxygène. Ainsi, l'OCR mesuré représente principalement la consommation d'oxygène pour la production d'ATP (par soustraction du taux d'oligomycine de la valeur de base). L'ajout de FCCP (Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone) stimule la chaîne respiratoire, induisant la consommation maximale d'oxygène (OCR maximal). En introduisant la roténone et l'antimycine A, la chaîne respiratoire est bloquée, entraînant une réduction de la consommation d'oxygène et permettant de mesurer la respiration non mitochondriale. Cependant, ces résultats n'étaient pas reproductibles.

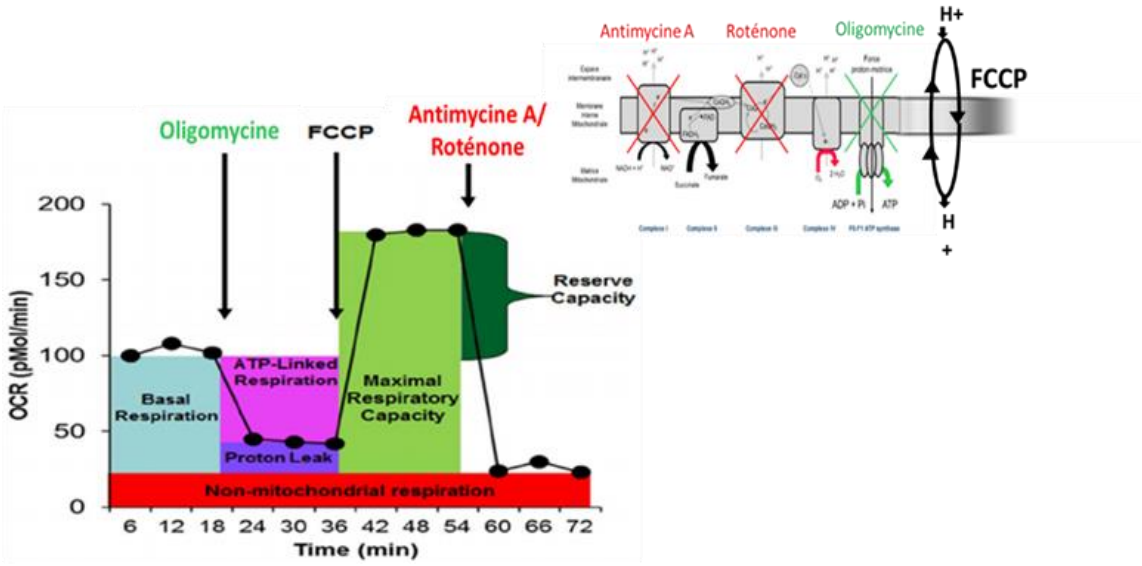


Figure 42. Analyse fonctionnelle de la phosphorylation oxydative dans les cellules endothéliales.

Schéma illustrant les principaux paramètres de la consommation d'oxygène (OCR) de la respiration mitochondriale par approche Seahorse. Les injections de molécules modulant les complexes de la chaîne respiratoire permettent d'évaluer la phosphorylation oxydative et la capacité maximale de respiration des cellules.

Par conséquence, nous avons eu recours à une approche alternative, la résonance magnétique nucléaire (RMN), sur la plateforme GEMELI (Grenoble Équipe de Métabolomique et Lipidomique en Santé), en collaboration avec l'IAB (Institut pour l'Avancée des Biosciences) à Grenoble. La RMN permet une identification précise des métabolites et une quantification relative dans les échantillons, facilitant une comparaison plus fiable des profils métaboliques entre les souris WT et *Alk1*^{iECKO}. Pour cette analyse, 9 souris de chaque génotype ont été euthanasiées, les cellules endothéliales du foie et des poumons ont été isolées (par la méthode des billes magnétiques couplées à l'anticorps CD31) et cultivées jusqu'à confluence, puis le métabolisme a été arrêté par ajout de méthanol avant de procéder aux analyses.

Dans les cellules endothéliales des poumons, aucun métabolite (parmi les 35 métabolites identifiés: Lysine, Glycero-3-phosphocholine, Creatine phosphate, Aspartate, ATP / ADP, Taurine, Ethanol, Valine, Choline, Hypotaurine, Glutamate, Acetate, Alanine, Citrate, Lactate, O-phosphoethanolamine, Phenylalanine, Succinate, Leucine, Tyrosine, Threonine, Glycine, Creatine, Histidine, Glutamine, Pyruvate, Formate, Fructose, Glucose, Pyroglutamate, O-phosphocholine, Methionine, Isoleucine, Myo-inositol, Sarcosine) ne présente de différence significative entre les souris WT et *Alk1*^{iECKO}. En revanche, au niveau des cellules endothéliales du foie, nous avons identifié cinq métabolites (Sarcosine, O-phosphocholine, Myo-inositol, taurine et hypotaurine) présentant des différences significatives entre les deux groupes, nous nous sommes particulièrement intéressés à la taurine et à l'hypotaurine (Figure 43).

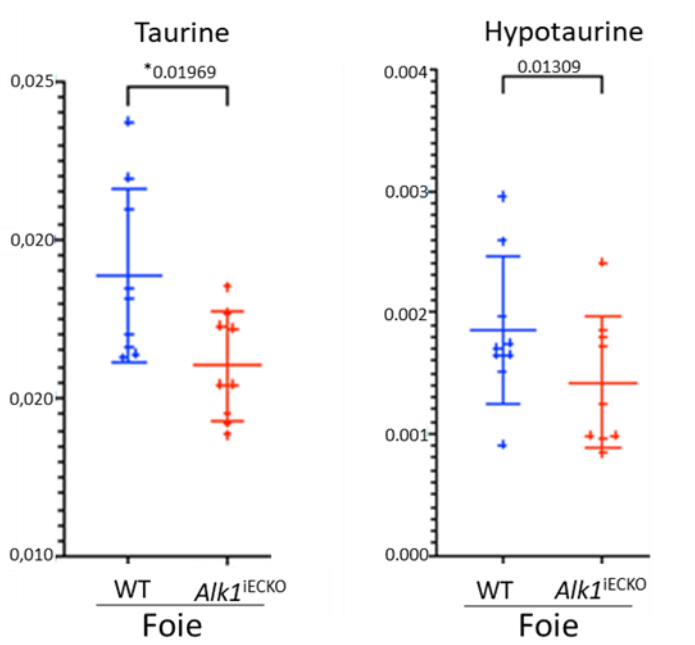


Figure 43. Diminution de la taurine et de l'hypotaurine dans les cellules endothéliales des souris Alk1^{iECKO}.

Résonance magnétique nucléaire (RMN) sur des LSEC de souris WT et Alk1^{iECKO} (n=9). La comparaison statistique entre les souris Alk1^{iECKO} et WT a été réalisée à l'aide du test paramétrique de Welch ANOVA (p-value ≤ 0,05).*

La taurine, un acide aminé non essentiel principalement synthétisé dans le foie et produit également par l'oxydation de l'hypotaurine, joue un rôle crucial en tant que constituant de l'ARNt mitochondrial. Une déficience en taurine peut altérer l'expression des protéines mitochondriales essentielles au bon fonctionnement de la chaîne de transport des électrons. De plus, la taurine stimule les réponses contre le stress oxydatif, renforce la stabilité des membranes et réduit l'inflammation [228]. Le traitement des rats avec de la taurine a montré une diminution de la fibrose hépatique, de l'activation des cellules étoilées et du stress oxydatif [229]. Dans les foies des souris déficientes pour le récepteur de taurine (TAUT, Slc6a6), il est observé une forte diminution des niveaux de taurine dans les LSEC, associée à une augmentation de la fibrose hépatique et de l'activation des cellules étoilées. Dans le

travail de Al Tabosh et al. [230], réalisé au laboratoire, il est montré une diminution significative du récepteur de taurine *SLC6A6* dans les HUVEC isolées de patients atteints d'HHT présentant des mutations d'*ALK1*.

Ces résultats suggèrent qu'une diminution de la taurine, un antioxydant, dans les LSEC des souris *Alk1*^{iECKO} pourrait augmenter le stress oxydatif [228], comme l'indiquent les niveaux élevés de γH2AX.

Nous avons réalisé plusieurs expériences pour évaluer le stress oxydatif, y compris l'analyse de l'activité enzymatique des complexes de la chaîne de transport des électrons, des immunofluorescences détectant les dommages à l'ADN, et des RTqPCR pour divers gènes de la chaîne de transport des électrons, mais sans succès.

En conclusion, nous n'avons pas pu confirmer les résultats issus de l'analyse single-cell sur le métabolisme. Cette divergence pourrait s'expliquer, au moins en partie, par la nécessité de mettre en culture les cellules endothéliales pour réaliser les analyses fonctionnelles. Or, la mise en culture entraîne souvent une perte partielle ou totale de leur état différencié, ainsi que des adaptations métaboliques propres aux conditions in vitro, qui peuvent masquer ou modifier les profils observés in vivo.

Nous prévoyons alors d'administrer de la taurine aux souris pour déterminer si cela réduit les dommages à l'ADN et potentiellement l'activation des cellules étoilées.

5.2.3. Sénescence des cellules endothéliales des poumons des souris *Alk1*^{iECKO}

Le vieillissement endothélial est fréquemment associé à la sénescence cellulaire, un processus qui peut être aussi induit par le stress oxydatif ainsi que l'inflammation vasculaire [231]. Nos analyses en single-cell ont mis en évidence une activation des gènes associés à la sénescence (Senescence-Associated Secretory Phenotype : SASP) [232] dans les cellules endothéliales pulmonaires, avec un fold change significatif dans les cellules *Alk1*^{iECKO} par rapport aux WT (Figure 44A), suggérant que la délétion d'*Alk1* pourrait favoriser la sénescence mais également accélérer le vieillissement endothélial dans les poumons des souris adultes comme c'est le cas dans le foie. Pour cela, nous avons utilisé la coloration Sudan Black, qui marque en bleu la lipofuscine, un agrégat de protéines, lipides et métaux oxydés s'accumulant dans les cellules sénescentes. Cette approche a révélé que plusieurs vaisseaux pulmonaires des souris *Alk1*^{iECKO} étaient tapissés de cellules sénescentes, phénotype absent chez les souris WT (Figure 44B), suggérant que la perte d'*Alk1* pourrait induire un vieillissement prématuré dans l'endothélium pulmonaire.

Nous avons également réalisé plusieurs tests de β-galactosidase pour évaluer la sénescence, mais sans obtenir de résultats concluants.

A

Sécrétome induit par la sénescence

Genes	FC gCap
Inhba	56.0
Ccl3	10.8
Fas	0.7
Gdf15	25.5
Il15	0.9
Spp1	12.5
Serpine1	21.7
Tnfrsf1a	0.7

B

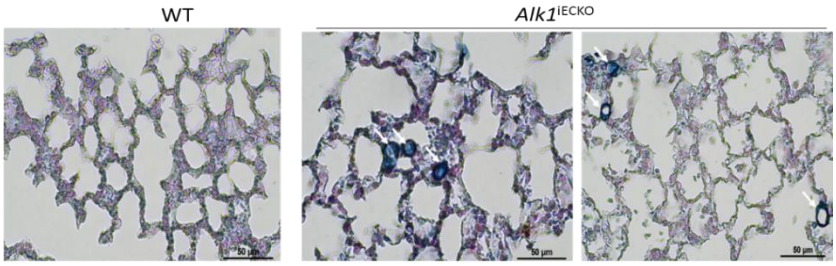


Figure 44. Sénescence des cellules endothéliales pulmonaires chez les souris Alk1^{iECKO}.

(A) Tableau montrant le fold change (Alk1^{iECKO} /WT) des gènes associés à l'induction de la sénescence dans les cellules endothéliales identifiées dans un sécrétome induit par la sénescence [232].
(B) Coloration au Sudan Black mettant en évidence l'accumulation de lipofuscine dans les cellules endothéliales pulmonaires des souris Alk1^{iECKO} (n=5), indicatrice de sénescence cellulaire.

5.2.4. Spécificité organotypique des gènes régulés par ALK1

Les cellules endothéliales adoptent une morphologie et une organisation spécifiques à chaque organe. Cette spécialisation se manifeste également par un profil d'expression génétique distinct, qui régule les propres fonctions aux tissus [23], [31]. Nous avons ensuite utilisé nos données de scRNAseq réalisées sur les cellules endothéliales du foie et du poumon pour étudier la corrélation des effets de la délétion d'*Alk1* entre ces deux types cellulaires endothéliaux très différents (sinusoïde versus endothélium continu) correspondant à deux organes affectés chez les patients HHT. Pour cela, une analyse comparative des gènes différentiellement exprimés a été réalisée en représentant sur l'axe des abscisses le log fold change des gènes dans les LSEC (foie) des souris *Alk1*^{iECKO} par rapport aux souris WT et sur l'axe des ordonnées le log fold change des gènes dans les cellules gCap (poumons) (Figure 45A).

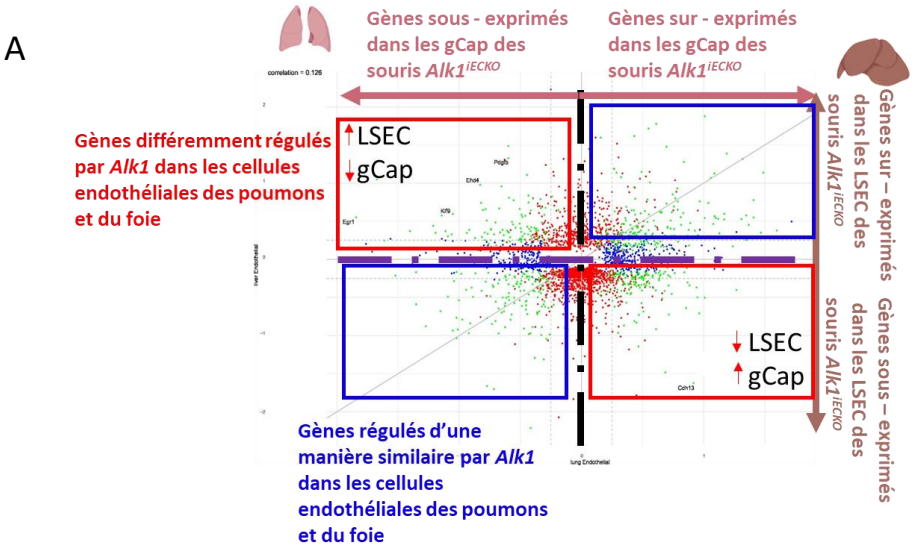
Cette analyse de corrélation donne un coefficient de corrélation r=0,126 suggérant une corrélation relativement faible montrant un nombre important de gènes régulés différentiellement en réponse à la délétion d'*Alk1* entre les cellules endothéliales du foie et des poumons.

Parmi ces gènes différentiellement régulés entre le foie et les poumons, les plus significatifs sont : *Ehd4* (facteur de transcription impliqué dans le trafic vésiculaire), *Klf9* (facteur de transcription associé au stress oxydatif et au métabolisme), *Egr1* (facteur de transcription précoce lié à l'inflammation) et *Pdgfb* (normalement pas exprimé dans les LSEC (figure 34)) qui sont augmentés dans les LSEC mais diminués dans les gCap. À l'inverse, *Cdh13* (cadhérine dépourvue du domaine cytoplasmique caractéristique des autres cadhérines, non impliquée dans l'adhésion cellulaire mais protège les cellules endothéliales contre le stress oxydatif) montre une diminution dans les LSEC et une augmentation dans les gCap.

Pour valider ces observations, des analyses de RT-qPCR ont été réalisées directement sur des cellules endothéliales isolées de souris WT et *Alk1*^{iECKO}, sans mise en culture, afin d'éviter les

phénomènes de différenciation et la perte de spécificité tissulaire. Les résultats ont confirmé la tendance observée en single-cell, même si les différences n'atteignent pas la significativité statistique, avec une régulation opposée des gènes entre les cellules endothéliales du foie et des poumons, suggérant ainsi une spécificité d'action d'ALK1 selon l'organe susceptible de contribuer à la variabilité et à la sévérité des manifestations de l'HHT. Il apparaît donc pertinent d'approfondir cette compréhension de la spécificité tissulaire en réalisant une analyse RNAseq en bulk sur les organes principalement affectés par l'HHT notamment le cerveau, les poumons et le foie.

A



B

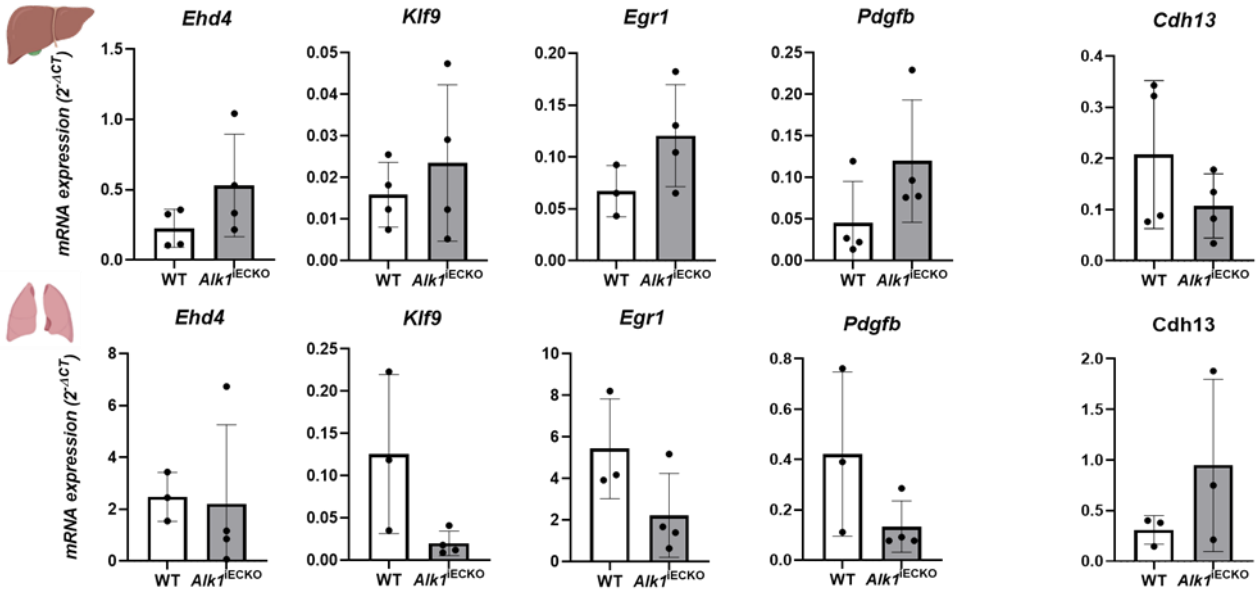


Figure 45. Régulation organotypique d'ALK1 entre les cellules endothéliales hépatiques et pulmonaires.

(A) Graphe représentant la comparaison de l'expression des gènes obtenues par l'analyse des données de scRNAseq entre LSEC et cellules gCap après délétion d'Alk1. Chaque point correspond à un gène, avec l'axe des abscisses indiquant le log fold change des gènes dans les LSEC et l'axe des ordonnées le log fold change des gènes dans les cellules gCap.
(B) RT-qPCR de l'expression de différents gènes dans les cellules endothéliales du foie et des poumons, normalisée par rapport au gène de référence Rpl13a.

5.2.5. Augmentation de la perméabilité vasculaire dans les poumons de la souris *Alk1*^{iECKO}

Le PDGFB joue un rôle essentiel dans le recrutement des péricytes [143]. Ainsi, sa diminution observée dans les gCap des souris invalidées pour *Alk1* pourrait entraîner une perte du soutien périvasculaire, une fragilisation des capillaires et une augmentation de la perméabilité vasculaire [56] et expliquer en partie les hémorrhagies observées chez les souris *Alk1*^{iECKO}.

Il est également intéressant de noter que la Sema3A , que l'on trouve augmentée dans les LSEC des souris délétés pour *Alk1* (Figure 3 A et C de l'article) est connue pour augmenter la perméabilité vasculaire en affaiblissant les jonctions endothéliales [69]. Étant une molécule sécrétée, l'augmentation de la Sema3A observée dans les LSEC pourrait également contribuer à l'altération de la barrière endothéliale des poumons.

Pour évaluer l'impact de la délétion d'*Alk1* sur la perméabilité vasculaire, nous avons injecté de la cadavérine fluorescente (cadavérine-A555, 1 kDa, 5 µg/g), un marqueur qui ne peut normalement pas traverser le lit vasculaire (n=2 WT, n=3 KO). Deux heures après l'injection, les animaux ont été perfusés en intra-cardiaque avec du PBS, puis fixés avec du PFA 4 %. Une fluorescence pulmonaire intense a été observée chez les souris *Alk1*^{iECKO} par rapport aux souris WT (Figure 46A). Ce phénotype a été confirmé par analyse histologique, qui a révélé une localisation périvasculaire de la cadavérine, suggérant une altération spécifique de la barrière vasculaire pulmonaire chez les souris *Alk1*^{iECKO} (Figure 46B). Nous avons également évalué la perméabilité vasculaire chez une souris *Alk1*^{iECKO} (n = 1) par rapport à des souris WT (n=2) à l'aide du bleu d'Evans, un colorant qui a une forte affinité pour l'albumine sérique (60 kDa) et qui, après injection intraveineuse, reste normalement confiné aux vaisseaux sanguins, son accumulation tissulaire reflète une altération de la barrière endothéliale. Les souris ont été anesthésiées et injectées par voie rétro-orbitaire avec 100 µL de bleu d'Evans à 2 % dans du PBS. Dix minutes plus tard, elles ont été sacrifiées, la cage thoracique est ouverte et les poumons sont lavés par perfusion du ventricule droit avec 10 mL de PBS après incision de l'oreillette gauche. Le poumon a été découpé et placé dans du formamide (1 mL/100 mg de tissu) et incubé à 37 °C pendant 24 h. L'homogénat a ensuite été centrifugé à 12 000 g pendant 20 min et l'absorbance du surnageant mesurée à 620 nm.

Les poumons de la souris *Alk1*^{iECKO} montrent une augmentation de l'absorbance, suggérant une perméabilité vasculaire accrue, bien que ces observations nécessitent d'être confirmées sur un plus grand nombre d'animaux.

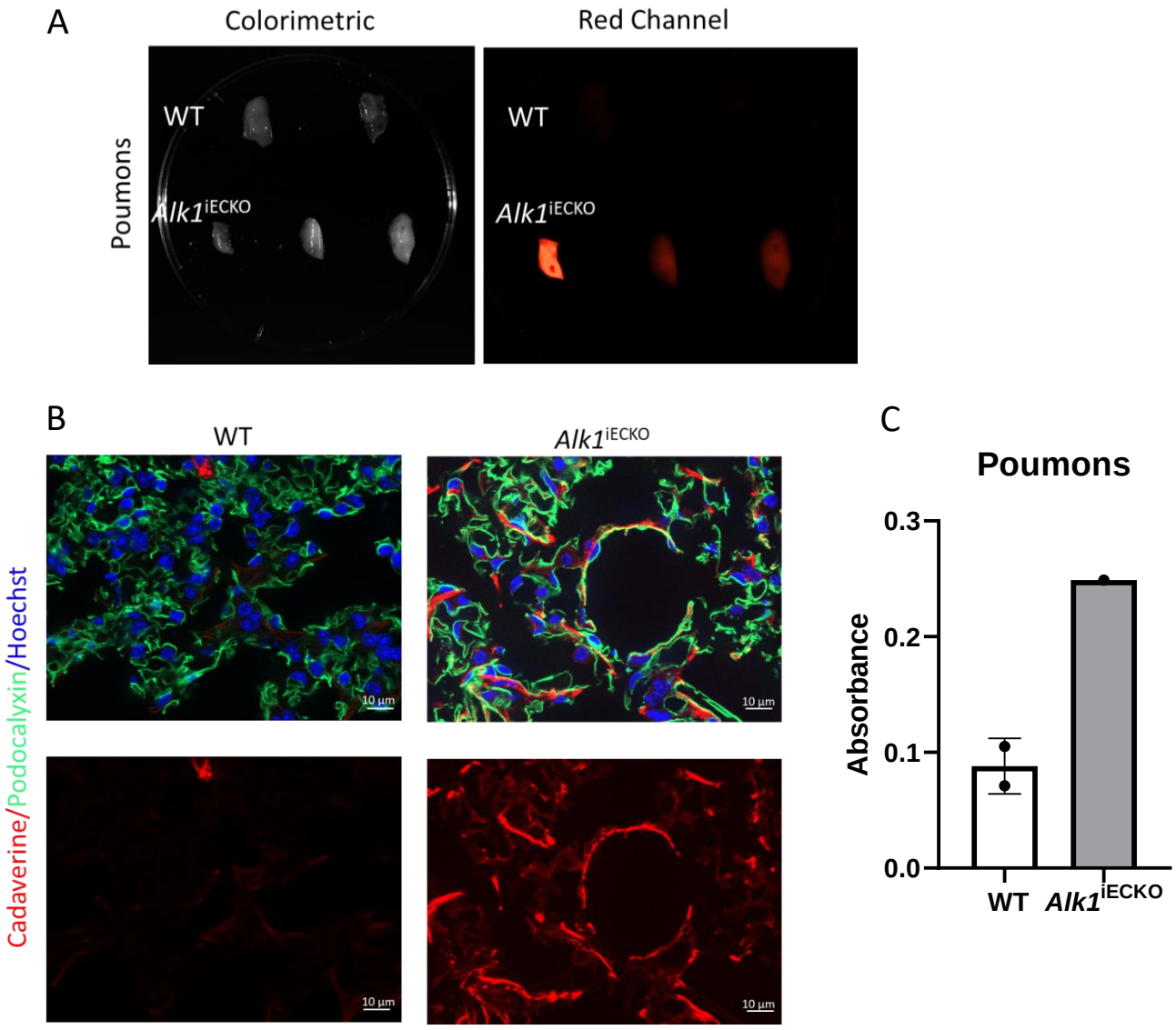


Figure 46. La délétion d'Alk1 induit une augmentation de la perméabilité pulmonaire.

(A, B) Des souris adultes WT (n=2) et Alk1^{iECKO} (n=3) ont reçu 7 jours après injection de tamoxifène, une injection intraveineuse de Cadaverine à 5 ug/g. 2h après l'injection, les vaisseaux ont été lavés et fixés, puis les poumons ont été prélevés. (A) Image d'un lobe pulmonaire capturée au ChemiDoc. (B) Images d'immunofluorescence sur coupes cryo (10 µm) de poumons de souris WT (n=2) et Alk1^{iECKO} (n=3). Les cellules endothéliales sont marquées en vert avec l'anticorps anti-podocalyxine et la cadavérine injectée est visualisée en rouge. Les images ont été acquises via le microscope à fluorescence Zeiss Apotome (Zeiss, Oberkochen, Allemagne) et le logiciel Zen (Zeiss). (B) Des souris adultes WT (n=2), et Alk1^{iECKO} (n=1) ont reçu une injection intraveineuse d'Evans Blue 7 jours après injection de tamoxifène. Après fixation des poumons et incubation dans du formamide pendant une nuit, l'absorbance du colorant libéré a été mesurée à 620 nm.

Chapitre 6 : Discussion générale

Cette section a pour objectif d'approfondir certains aspects restés inexplorés dans la discussion principale de l'article, ainsi que de développer davantage des points qui n'avaient été mentionnés que brièvement.

6.1. Capillarisation et perte des fenestrations des LSEC

Mes travaux ont permis de démontrer, pour la première fois chez la souris adulte dans un modèle inductible, que la délétion d'*Alk1* endothélial entraîne une capillarisation rapide des LSEC (dès J2), une perte de la zonation hépatique, ainsi qu'une activation des cellules étoilées, conduisant à une fibrose hépatique.

Ces résultats confirment les observations de Desroches-Castan et al. [223], obtenues dans un modèle de souris *Bmp9* KO constitutif sur un fond génétique 129/Ola, identifié par notre groupe pour être plus sensible que le fond C57BL/6 [233] utilisé dans mon étude. De manière concordante, Schmid et al. [226] ont également rapporté une capillarisation des LSEC dans un modèle de délétion constitutive d'*Alk1* spécifiquement dans les cellules endothéliales hépatiques. Au cours de ma thèse, après avoir caractérisé ces phénotypes chez des souris adultes, une étude réalisée par Zhao et al. a également montré une capillarisation des LSEC en délétant les ligands d'ALK1 (BMP9/10) de manière constitutive dans les cellules étoilées via le promoteur *Lrat* (*Bmp9/10* dKO) [227].

Les souris *Alk1*^{iECKO} présentent une perte marquée de fenestrations dans les LSEC, un phénotype également observé chez les *Bmp9* KO 129/Ola [223], mais absent dans le modèle de Schmid et al. [226]. Cela pourrait s'expliquer par la nature constitutive de leur modèle, qui laisse le temps à des mécanismes de compensation de s'installer. À l'inverse, dans notre modèle *Alk1*^{iECKO}, la délétion est induite à l'âge adulte et entraîne une mortalité rapide, ne laissant pas la possibilité à des mécanismes compensatoires d'agir.

Plvap, classiquement associée à la fenestrations [234], est augmentée dans les LSEC de notre modèle *Alk1*^{iECKO}, tandis que chez les souris 129/Ola *Bmp9* KO [223], une diminution de son expression a été observée. Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que PLVAP est également augmentée dans toutes les zones des foies cirrhotiques [235]. Étant donné que nos souris présentent une fibrose hépatique, l'augmentation de PLVAP pourrait être une conséquence de la fibrose. Plvap est également surexprimé dans les LSEC sénescentes et favorise le recrutement leucocytaire, contribuant à l'inflammation [236], ce qui pourrait également être corrélé avec nos résultats suggérant une accélération du vieillissement et une augmentation de l'inflammation consécutive à la délétion d'*Alk1*.

Chez les patients atteints de l'HHT, aucune étude n'a spécifiquement évalué les fenestrations des LSEC. Cela souligne l'importance d'étudier ce phénotype, compte tenu de leur rôle crucial

dans l'homéostasie hépatique, et pourrait permettre l'identification de molécules régulant leur structure et leur fonction.

Il est important de souligner que les niveaux de BMP9 et BMP10 (analyse scRNAseq) sont comparables entre les souris WT et *Alk1*^{iECKO}, indiquant que la synthèse de ces ligands n'est pas altérée, malgré l'activation des cellules étoilées, principales sources hépatiques de ces ligands.

6.2. Zonation hépatique

Grâce à nos analyses de scRNA-seq, permettant une caractérisation détaillée des altérations transcriptionnelles spécifiques aux cellules, nous avons pu démontrer que la perte d'*Alk1* dans l'endothélium adulte entraîne une diminution spécifique des ligands Wnt au niveau péricentral, conduisant à la perte de la zonation hépatique. La voie Wnt est également altérée dans les modèles de délétion d'*Alk1* dans l'endothélium hépatique (*Alk1*$^{HEC-KO}$) [226] et de délétion de Bmp9/10 dans les cellules étoilées (*Lrat Bmp9/10* dKO) [227]. Nos résultats confirment et étendent les observations de Winkler et al., qui avaient induit la délétion de *Gata4* spécifiquement dans les LSEC et montré que cela induisait une fibrose via l'activation de Myc qui entraîne l'expression du PDGFB [57].

Une étude récente a montré que l'expression de *Wnt2* peut être modulée par la voie Notch via c-Kit [33]. Dans nos données, les ligands de Notch (Figure supplémentaire 1C) et c-Kit sont diminués après délétion d'*Alk1*, et des études *in vitro* ont démontré que la signalisation BMP9/ALK1 induit l'expression des cibles de la voie Notch [237]. Ces éléments supportent l'hypothèse que la diminution de *Wnt2* pourrait résulter d'un effet indirect médié par la voie Notch/c-Kit, plutôt que d'une régulation directe par ALK1. Etant donné que l'expression d'ALK1 est sensible au flux sanguin, une diminution de *Wnt2* pourrait aussi résulter d'un effet indirect lié à l'altération des forces hémodynamiques [238].

Il reste à déterminer si, au-delà des LSEC, la perturbation de la zonation hépatique pourrait également résulter de l'activation des cellules étoilées. Des travaux récents montrent que, en plus des LSEC péricentraux, les cellules étoilées participent à la régulation de la zonation via *Rspo3*, dont l'expression diminue après activation, suggérant un rôle de ces cellules dans la perte de zonation [192]. Dans nos souris *Alk1*^{iECKO}, l'expression d'ARNm de *Rspo3* n'est pas modifiée dans les cellules étoilées, alors que *Wnt2* est diminué. Cependant, cette hypothèse doit être interprétée avec prudence, car très peu de cellules étoilées ont été identifiées dans nos analyses single-cell.

6.3. Conséquences de la perte de zonation hépatique sur le métabolisme hépatique

La dérégulation de la voie Wnt induit la diminution de la glutamine synthétase (GS) principalement impliquée dans le métabolisme de l'urée. La GS agit comme une seconde

barrière en captant l'ammoniac résiduel et en le convertissant, avec le glutamate, en glutamine. Cette réaction permet non seulement de prévenir l'hyperammoniémie toxique, mais aussi de produire de la glutamine, un métabolite central qui circule vers d'autres organes (intestin, rein, cerveau, muscle, système immunitaire) où il sert à la fois de carburant énergétique, de précurseur indispensable pour la synthèse des nucléotides, des neurotransmetteurs et d'antioxydants comme le glutathion, il est aussi impliqué dans la prolifération des hépatocytes, la régulation du volume cellulaire, les défense immunitaires [239], d'où la nécessité d'étudier l'effet d'ALK1 sur le métabolisme hépatique. Cela pourrait être réalisé en effectuant une étude des métabolites par RMN sur le foie entier, puisque les analyses précédentes n'avaient été faites que sur les cellules endothéliales isolées. Cette étude serait d'autant plus intéressante que la délétion d'*Alk1* perturbe plusieurs voies métaboliques, comme le révèlent les analyses de scRNseq, notamment le métabolisme des glucides, des acides gras, la phosphorylation oxydative, ainsi que le métabolisme du fer. En effet, la délétion d'*Alk1* induit aussi la diminution de l'expression de BMP2/6 dans les LSEC, combinée à une diminution de l'hepcidine dans les hépatocytes ce qui pourrait entraîner une accumulation anormale de fer. Cette surcharge pourrait favoriser un stress oxydatif hépatocytaire, susceptible d'expliquer en partie l'augmentation observée de γH2AX, marqueur de dommages à l'ADN. De plus, plusieurs travaux ont montré qu'une telle dérégulation du métabolisme du fer peut contribuer à l'activation des cellules étoilées en myofibroblastes, accentuant ainsi la fibrose hépatique. Un dépôt de fer anormal a été observé chez les souris *Lrat Bmp9/10* dKO suggérant que la signalisation ALK1 pourrait constituer un régulateur essentiel important de l'homéostasie du fer [227]. Tout cela renforce l'importance d'une étude métabolique du foie entier par RMN sur souris *Alk1*^{iECKO}, afin de mieux caractériser les altérations métaboliques induites par la délétion d'*Alk1*.

6.4. Organotypie et implications thérapeutiques de l'imatinib

Duan et al. ont montré qu'avec l'âge, les souris présentent une capillarisation des LSEC accompagnée d'une diminution de c-Kit, associée à une perturbation de la zonation hépatique et à la sénescence endothéliale [19]. De manière concordante, nos données révèlent que la délétion d'*Alk1* entraîne une baisse de c-Kit et s'accompagne d'un phénotype de vieillissement des LSEC. Cette diminution de c-Kit est spécifique du foie car Drapé et al. montrent que la délétion d'*Alk1* dans le cerveaux de souris nouveau-nées induit une augmentation de c-Kit responsable des MAVs cérébrales ce qui suggère un rôle spécifique d'ALK1 selon l'organe et/ou en fonction du temps [240]. Chez les souris *Alk1*^{iECKO}, nous avons observé un passage anormal de billes fluorescentes à travers les capillaires, aboutissant dans les poumons (Figure 1C, article). Cependant, nous n'avons pas encore caractérisé ces altérations vasculaires pour déterminer s'il s'agit de dilatations des vaisseaux ou de shunts. Cela est d'autant plus pertinent qu' ALK1 joue un rôle clé dans la polarisation des cellules endothéliales en réponse au flux sanguin, permettant leur orientation correcte et le remodelage vasculaire [241]. Il devient donc essentiel d'étudier ces altérations afin de mieux comprendre les mécanismes sous-

jacents en injectant du latex blue, un traceur vasculaire permettant de visualiser le réseau artériel et veineux. Ce produit est normalement trop visqueux pour traverser le lit capillaire et reste confiné aux artères, tandis que la présence de MAVs permet son passage dans les veines.

Chez les souris *Alk1*^{iECKO}, *Pdgfb* est augmenté dans les LSEC favorisant l'activation des cellules étoilées hépatiques et la progression de la fibrose hépatique. En revanche, *Pdgfb* est diminué dans les cellules endothéliales pulmonaires, renforçant l'hypothèse d'une régulation tissulaire spécifique des gènes cibles d'*Alk1* et de la dépendance du contexte vasculaire pour sa fonction angiocrine. Cette réduction pourrait entraîner une diminution de la couverture péricytaire des capillaires des poumons, contribuant ainsi à la fragilité vasculaire et au risque accru d'hémorragies observées chez les souris *Alk1*^{iECKO}.

Drapé et al., ont injecté des souris *Alk1*^{iECKO} avec l'imatinib [240]. En effet, l'imatinib est un inhibiteur sélectif de tyrosine kinase notamment cKit et PDGFR. Dans leurs modèles de nouveau-nés, ils ont montré que l'inhibition de cKit par l'imatinib permettait de réverser la formation des MAVs [240]. Dans notre modèle adulte *Alk1*^{iECKO}, *Pdgfb* est augmenté dans le foie, donc l'injection d'imatinib pourrait inhiber l'activation des cellules étoilées en bloquant son interaction avec PDGFRβ (Récepteur de type tyrosine kinase) présent à leur membrane, ce qui permettrait de réduire la fibrose et, par conséquent, d'améliorer la fonction hépatique ouvrant ainsi des perspectives thérapeutiques chez les patients atteints de HHT (Figure 47). Cependant dans notre modèles c-Kit est déjà diminué dans le foie et PDGFB dans les poumons des souris *Alk1*^{iECKO} donc le blocage de leurs récepteurs par l'imatinib pourrait d'avantage aggraver le phénotype.

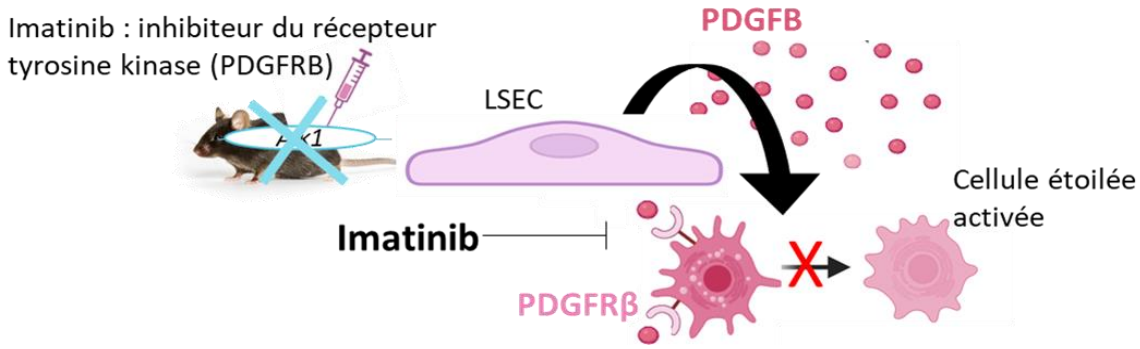


Figure 47. Prévention de l'activation des cellules étoilées par inhibition de PDGFRβ via l'injection d'imatinib.

Pour prévenir l'inactivation de ces récepteurs par l'imatinib nous pourrions, injecter une forme soluble du récepteur du PDGF-B (PDGFRβ-Fc un récepteur de fusion conçu pour se lier avec une haute affinité à PDGFB) et ainsi inhiber son interaction avec ses récepteurs sur les cellules étoilées. Cette stratégie permettrait de préserver c-Kit, déjà diminué, mais pas PDGFB dans les poumons.

6.5. Expression d'ALK1 versus localisation des phénotypes

Comme déjà rapporté, la majorité des phénotypes liés à la délétion d'*Alk1* se manifeste au niveau des zones centrolobulaires, alors même qu'*Alk1* est plus fortement exprimé dans la région périportale. Ce paradoxe n'a pas encore reçu d'explication définitive, mais plusieurs hypothèses peuvent être avancées. (1) L'activation d'ALK1 pourrait être moins efficace dans la zone périportale en raison de l'expression de son co-récepteur, l'endogline, plus élevée du côté central. (2) La signalisation Notch, fortement active dans cette région (Figure supplémentaire 1C de l'article), pourrait compenser partiellement la perte d'*Alk1* et en atténuer les conséquences. (3) le microenvironnement périportal, caractérisé par une teneur plus élevée en oxygène et en substrats métaboliques, pourrait protéger les cellules endothéliales contre le stress et la dysfonction. À l'inverse, les régions midzonale et centrale, soumises à un flux hémodynamique plus variable et à un stress oxydatif plus important, pourraient être dépourvues de tels mécanismes compensatoires (surtout la voie Notch active du côté périportal), ce qui peut expliquer la sévérité accrue du phénotype observé dans ces zones. Enfin, (4) il est possible que les zones où ALK1 est le moins exprimé soient les plus sensibles à sa perte, expliquant la localisation péricentrale des phénotypes.

6.6. Effet de la délétion d'*Alk1* sur les poumons

En 2025, durant la moitié de ma troisième année de thèse, un article a été publié utilisant le même modèle de souris que le nôtre et ils se sont intéressés au tissu pulmonaire [35] . Ils ont réalisé le test d'Evans blue et, comme nous, ont montré que la délétion d'*Alk1* entraîne une augmentation de la perméabilité vasculaire pulmonaire.

Ils ont aussi réalisé une analyse scRNAseq sur les cellules endothéliales de poumons qui a révélée l'émergence d'une nouvelle population de cellules endothéliales lymphatiques dérivées des cellules artérielles, également observée dans les poumons de patients HHT2. Cette activation de la voie VEGF-C/FLT4 (VEGFR3), conduisant à l'induction de SOX17 et MDM2, puis à l'activation de PROX1, facteur clé de l'identité lymphatique. Cette transition artério-lymphatique serait responsable des MAV pulmonaires chez les souris *Alk1*^{iECKO}. Dans nos analyses, nous n'avons pas détecté l'apparition de cette nouvelle population. Nous avons toutefois constaté, conformément à leurs observations, une augmentation de VEGFR3 dans les poumons des souris *Alk1*^{iECKO} mais pas de Sox17 et d'autres marqueurs lymphatiques ce qui pourrait suggérer un début de signalisation vers la plasticité endothéliale, sans toutefois indiquer une transition artério-lymphatique complète.

Chapitre 7 : Perspectives

Ce travail soulève plusieurs points intéressants qu'il serait important de valider. Je présente ici mes perspectives de la suite de ce projet, ainsi que les expériences qui me semblent essentielles à réaliser pour le poursuivre.

7.1. Réversion des effets de la Sema3A afin de déterminer le rôle de Sema3A sur la perte des fenestrations des LSEC ou de la perméabilité pulmonaire

L'augmentation de Sema3A pourrait contribuer aux hémorragies pulmonaires (figure 1C, article) comme le suggère la perméabilité accrue observée lors du test à la cadavérine dans les poumons des souris *Alk1*^{iECKO} (figure 46, résultats supplémentaires). Au niveau hépatique, cette élévation pourrait également favoriser la perte de fenestrations des LSEC [73]. Afin de mieux caractériser le rôle de Sema3A, nous avons obtenu auprès de Genentech un anticorps anti-Nrp1 spécifique, capable de bloquer l'interaction de la Sema3A avec Nrp1 sans interférer avec la liaison au VEGF. Des souris seront injectées avec cet anticorps ou avec une IgG contrôle. Nous prévoyons ensuite d'évaluer les effets de ce traitement par microscopie électronique à balayage (SEM) pour quantifier les fenestrations des LSEC chez les 2 groupes et voir si cela rétablit la perte de fenestrations. Ces essais sont actuellement en cours d'optimisation et n'ont pas encore produit de résultats exploitables. Nous allons également faire des tests de perméabilité vasculaire (cadavérine et Evan's Blue) afin de déterminer si l'inhibition de Sema3A réduit les hémorragies pulmonaires.

7.2. Surexpression du facteur de transcription *Gata4* afin d'étudier son implication suite à la perte d'*Alk1* sur le phénotype hépatique

Gata4 est un facteur de transcription clé de l'identité des LSEC et une cible de BMP9 [57, 223]. Sa délétion dans les LSEC induit une capillarisation des LSEC et une activation des cellules étoilées, via la stimulation de Myc, qui augmente l'expression de *Pdgfb* et active ainsi les cellules étoilées, favorisant la fibrose [57]. Il serait donc intéressant de surexprimer *Gata4* chez les souris *Alk1*^{iECKO} à l'aide d'un adénovirus et tester si on réverse le phénotype hépatique suite à la perte d'*Alk1*. Après restauration de *Gata4*, nous mesurerons les niveaux d'expression de *Myc* et de *Pdgfb*, qui devraient être réprimés par Gata4, dans des LSEC fraîchement isolées ainsi que dans des échantillons de foie de souris. Nous évaluerons également si la surexpression de *Gata4* diminue l'activation des cellules étoilées hépatiques et par la suite la fibrose.

7.3. Réalisation d'un RNA-seq bulk dans les cellules endothéliales du foie, de cerveau et des poumons afin d'étudier l'effet organotypique d'ALK1

Notre étude de scRNAseq nous a permis de caractériser l'hétérogénéité des cellules endothéliales hépatiques et d'identifier des sous-populations spécifiques. Nous envisageons de compléter ces données par du bulk RNA-seq sur les cellules endothéliales isolées des trois organes (foie, poumon, cerveau) spécifiquement touchés dans la maladie HHT. Cette approche permettra d'obtenir un profil transcriptionnel plus exhaustif et quantitatif, de comparer de manière robuste les signatures organo-spécifiques et de valider les tendances identifiées en single-cell. L'intégration des deux jeux de données offrira ainsi une vision à la fois globale (bulk) et individuelle (single-cell) plus précise des programmes transcriptionnels endothéliaux selon l'organe.

7.4. Effet de la délétion d'*Alk1* sur l'inflammation pulmonaire

Nos analyses scRNA-seq (Figure 41) mettent en évidence une augmentation des processus inflammatoires pulmonaires suite à la délétion d'*Alk1*. Il est bien connu que l'inflammation peut favoriser une lymphangiogenèse, notamment via l'induction de VEGFR3 [242], ce qui suggère un lien fonctionnel entre inflammation et remodelage vasculaire dans ce contexte. Cependant, les mécanismes inflammatoires activés dans les poumons après perte d'*Alk1* restent encore mal caractérisés. À ce titre, un projet de thèse actuellement en cours au laboratoire vise à approfondir spécifiquement le rôle de l'inflammation pulmonaire dans ce modèle. Les premières données confirment l'activation d'une voie de signalisation pro-inflammatoire, également retrouvée chez les patients HHT, ce qui confère à ces travaux une forte pertinence translationnelle.

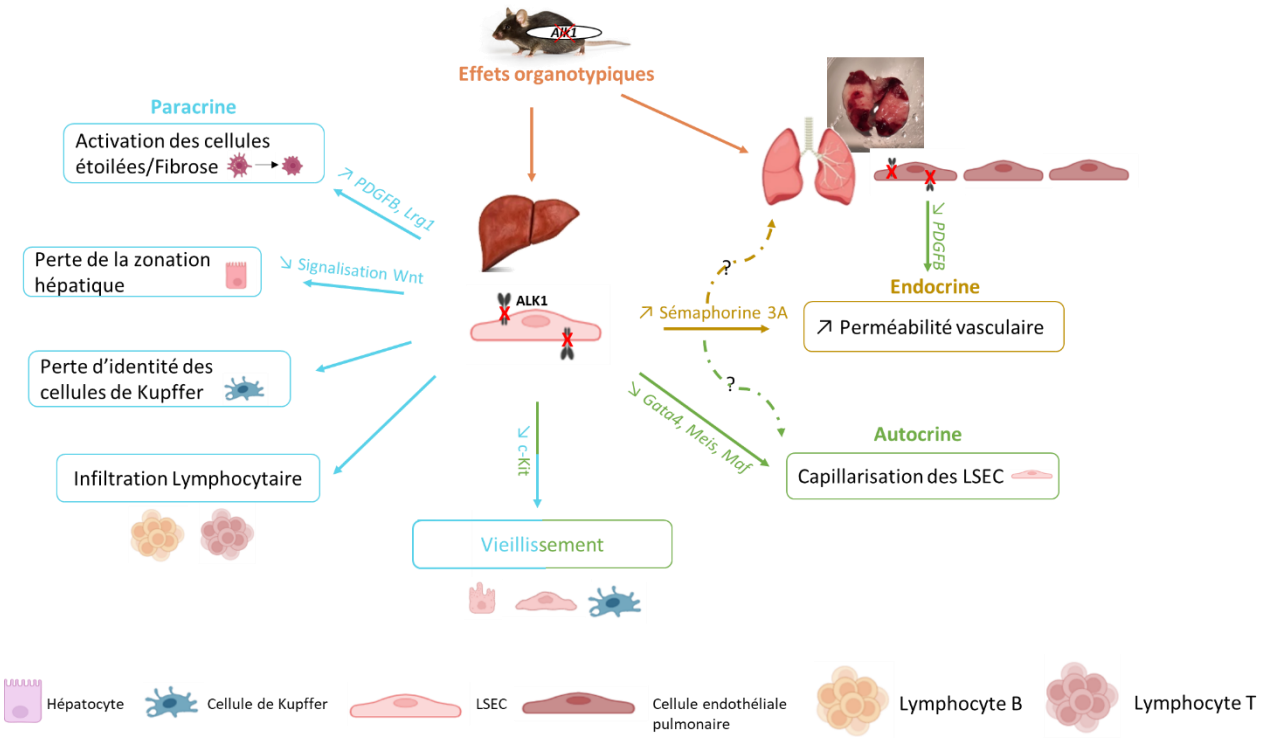


Figure 48. Effets de la délétion d'Alk1 dans les cellules endothéliales adultes.

La délétion d'Alk1 dans les cellules endothéliales adultes entraîne des effets organotypiques. Dans le foie, elle provoque : des effets paracrines avec activation des cellules stellaires hépatiques, liée à l'augmentation de l'expression de Pdgfb et Lrg1; une perturbation de la zonation hépatique due à une diminution de la signalisation Wnt; une perte d'identité des cellules de Kupffer ; une infiltration lymphocytaire ; une accélération du vieillissement cellulaire touchant non seulement les LSEC, mais aussi les hépatocytes et les cellules de Kupffer. Des effets autocrines sont observés, notamment la capillarisation des LSEC, ainsi que des effets endocrines, avec une augmentation de la sécrétion de Sema3A, susceptible de contribuer à la perte des fenestrations et/ou à l'augmentation de la perméabilité vasculaire dans les poumons. À l'inverse, Pdgfb est diminué dans les poumons, ce qui pourrait entraîner une réduction du recouvrement péricytaire.

Références

1. Jouda H, Larrea Murillo L, Wang T (2022) Current Progress in Vascular Engineering and Its Clinical Applications. Cells 11:493. https://doi.org/10.3390/cells11030493

2. Herbert SP, Stainier DYR (2011) Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis. Nat Rev Mol Cell Biol 12:551–564. https://doi.org/10.1038/nrm3176

3. Gomez-Salinero JM, Redmond D, Rafii S (2025) Microenvironmental determinants of endothelial cell heterogeneity. Nat Rev Mol Cell Biol 26:476–495. https://doi.org/10.1038/s41580-024-00825-w

4. Denzer L, Muranyi W, Schroten H, Schwerk C (2023) The role of PLVAP in endothelial cells. Cell Tissue Res 392:393–412. https://doi.org/10.1007/s00441-023-03741-1

5. Potente M, Mäkinen T (2017) Vascular heterogeneity and specialization in development and disease. Nat Rev Mol Cell Biol 18:477–494. https://doi.org/10.1038/nrm.2017.36

6. Augustin HG, Koh GY (2017) Organotypic vasculature: From descriptive heterogeneity to functional pathophysiology. Science 357:eaal2379. https://doi.org/10.1126/science.aal2379

7. Mancuso MR, Kuhnert F, Kuo CJ (2008) Developmental Angiogenesis of the Central Nervous System. Lymphat Res Biol 6:173–180. https://doi.org/10.1089/lrb.2008.1014

8. Oh S-Y, Kim JY, Park C (2015) The ETS Factor, ETV2: a Master Regulator for Vascular Endothelial Cell Development. Mol Cells 38:1029–1036. https://doi.org/10.14348/molcells.2015.0331

9. De Spiegelaere W, Casteleyn C, Van den Broeck W, Plendl J, Bahramsoltani M, Simoens P, Djonov V, Cornillie P (2012) Intussusceptive angiogenesis: a biologically relevant form of angiogenesis. J Vasc Res 49:390–404. https://doi.org/10.1159/000338278

10. Carmeliet P (2000) Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. Nat Med 6:389–395. https://doi.org/10.1038/74651

11. Ribatti D, Vacca A, Nico B, Roncali L, Dammacco F (2001) Postnatal vasculogenesis. Mech Dev 100:157–163. https://doi.org/10.1016/s0925-4773(00)00522-0

12. Ricard N, Bailly S, Guignabert C, Simons M (2021) The quiescent endothelium: signalling pathways regulating organ-specific endothelial normalcy. Nat Rev Cardiol 18:565–580. https://doi.org/10.1038/s41569-021-00517-4

13. Hu Z, Zhao X, Wu Z, Qu B, Yuan M, Xing Y, Song Y, Wang Z (2024) Lymphatic vessel: Origin, heterogeneity, biological functions and therapeutic targets. Signal Transduct Target Ther 9:9. https://doi.org/10.1038/s41392-023-01723-x

14. Murakami M, Nguyen LT, Zhang ZW, Moodie KL, Carmeliet P, Stan RV, Simons M (2008) The FGF system has a key role in regulating vascular integrity. J Clin Invest 118:3355–3366. https://doi.org/10.1172/JCI35298

15. Dejana E, Hirschi KK, Simons M (2017) The molecular basis of endothelial cell plasticity. Nat Commun 8:14361. https://doi.org/10.1038/ncomms14361

16. Chen P-Y, Qin L, Baeyens N, Li G, Afolabi T, Budatha M, Tellides G, Schwartz MA, Simons M Endothelial-to-mesenchymal transition drives atherosclerosis progression. J Clin Invest 125:4514–4528. https://doi.org/10.1172/JCI82719

17. Herrera MD, Mingorance C, Rodríguez-Rodríguez R, Alvarez de Sotomayor M (2010) Endothelial dysfunction and aging: an update. Ageing Res Rev 9:142–152. https://doi.org/10.1016/j.arr.2009.07.002

18. Higashi Y, Kihara Y, Noma K (2012) Endothelial dysfunction and hypertension in aging. Hypertens Res 35:1039–1047. https://doi.org/10.1038/hr.2012.138

19. Duan J-L, Liu J-J, Ruan B, Ding J, Fang Z-Q, Xu H, Song P, Xu C, Li Z-W, Du W, Xu M, Ling Y-W, He F, Wang L (2023) Age-related liver endothelial zonation triggers steatohepatitis by inactivating pericentral endothelium-derived C-kit. Nat Aging 3:258–274. https://doi.org/10.1038/s43587-022-00348-z

20. Grunewald M, Kumar S, Sharife H, Volinsky E, Gileles-Hillel A, Licht T, Permyakova A, Hinden L, Azar S, Friedmann Y, Kupetz P, Tzuberi R, Anisimov A, Alitalo K, Horwitz M, Leebhoff S, Khoma OZ, Hlushchuk R, Djonov V, Abramovitch R, Tam J, Keshet E (2021) Counteracting age-related VEGF signaling insufficiency promotes healthy aging and extends life span. Science 373:eabc8479. https://doi.org/10.1126/science.abc8479

21. Trimm E, Red-Horse K (2023) Vascular endothelial cell development and diversity. Nat Rev Cardiol 20:197–210. https://doi.org/10.1038/s41569-022-00770-1

22. Li Y, Liu Y, Liu S, Gao M, Wang W, Chen K, Huang L, Liu Y (2023) Diabetic vascular diseases: molecular mechanisms and therapeutic strategies. Signal Transduct Target Ther 8:152. https://doi.org/10.1038/s41392-023-01400-z

23. Hermann R, Shovlin CL, Kasthuri RS, Serra M, Eker OF, Bailly S, Buscarini E, Dupuis-Girod S (2025) Hereditary haemorrhagic telangiectasia. Nat Rev Dis Primer 11:1. https://doi.org/10.1038/s41572-024-00585-z

24. Nolan DJ, Ginsberg M, Israely E, Palikuqi B, Poulos MG, James D, Ding B-S, Schachterle W, Liu Y, Rosenwaks Z, Butler JM, Xiang J, Rafii A, Shido K, Rabbany SY, Elemento O, Rafii S (2013) Molecular signatures of tissue-specific microvascular endothelial cell

heterogeneity in organ maintenance and regeneration. Dev Cell 26:204–219. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.06.017

25. Gillich A, Zhang F, Farmer CG, Travaglini KJ, Tan SY, Gu M, Zhou B, Feinstein JA, Krasnow MA, Metzger RJ (2020) Capillary cell-type specialization in the alveolus. Nature 586:785–789. https://doi.org/10.1038/s41586-020-2822-7

26. Vila Ellis L, Cain MP, Hutchison V, Flodby P, Crandall ED, Borok Z, Zhou B, Ostrin EJ, Wythe JD, Chen J (2020) Epithelial Vegfa specifies a distinct endothelial population in the mouse lung. Dev Cell 52:617-630.e6. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.01.009

27. Inverso D, Shi J, Lee KH, Jakab M, Ben-Moshe S, Kulkarni SR, Schneider M, Wang G, Komeili M, Vélez PA, Riedel M, Spegg C, Ruppert T, Schaeffer-Reiss C, Helm D, Singh I, Boutros M, Chintharlapalli S, Heikenwalder M, Itzkovitz S, Augustin HG (2021) A spatial vascular transcriptomic, proteomic, and phosphoproteomic atlas unveils an angiocrine Tie–Wnt signaling axis in the liver. Dev Cell 56:1677-1693.e10. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2021.05.001

28. Reyfman PA, Walter JM, Joshi N, Anekalla KR, McQuattie-Pimentel AC, Chiu S, Fernandez R, Akbarpour M, Chen C-I, Ren Z, Verma R, Abdala-Valencia H, Nam K, Chi M, Han S, Gonzalez-Gonzalez FJ, Soberanes S, Watanabe S, Williams KJN, Flozak AS, Nicholson TT, Morgan VK, Winter DR, Hinchcliff M, Hrusch CL, Guzy RD, Bonham CA, Sperling AI, Bag R, Hamanaka RB, Mutlu GM, Yeldandi AV, Marshall SA, Shilatifard A, Amaral LAN, Perlman H, Sznajder JI, Argento AC, Gillespie CT, Dematte J, Jain M, Singer BD, Ridge KM, Lam AP, Bharat A, Bhorade SM, Gottardi CJ, Budinger GRS, Misharin AV (2019) Single-Cell Transcriptomic Analysis of Human Lung Provides Insights into the Pathobiology of Pulmonary Fibrosis. Am J Respir Crit Care Med 199:1517–1536. https://doi.org/10.1164/rccm.201712-2410OC

29. Barry DM, McMillan EA, Kunar B, Lis R, Zhang T, Lu T, Daniel E, Yokoyama M, Gomez-Salinero JM, Sureshbabu A, Cleaver O, Di Lorenzo A, Choi ME, Xiang J, Redmond D, Rabbany SY, Muthukumar T, Rafii S (2019) Molecular determinants of nephron vascular specialization in the kidney. Nat Commun 10:5705. https://doi.org/10.1038/s41467-019-12872-5

30. Schaum N, Karkanias J, Neff NF, May AP, Quake SR, Wyss-Coray T, Darmanis S, Batson J, Botvinnik O, Chen MB, Chen S, Green F, Jones RC, Maynard A, Penland L, Pisco AO, Sit RV, Stanley GM, Webber JT, Zanini F, Baghel AS, Bakerman I, Bansal I, Berdnik D, Bilen B, Brownfield D, Cain C, Chen MB, Chen S, Cho M, Cirolia G, Conley SD, Darmanis S, Demers A, Demir K, de Morree A, Divita T, du Bois H, Dulgeroff LBT, Ebadi H, Espinoza FH, Fish M, Gan Q, George BM, Gillich A, Green F, Genetiano G, Gu X, Gulati GS, Hang Y, Hosseinzadeh S, Huang A, Iram T, Isobe T, Ives F, Jones RC, Kao KS, Karnam G, Kershner AM, Kiss BM, Kong W, Kumar ME, Lam JY, Lee DP, Lee SE, Li G, Li Q, Liu L, Lo A, Lu W-J, Manjunath A, May AP, May KL, May OL, Maynard A, McKay M, Metzger RJ, Mignardi M, Min D, Nabhan AN, Neff NF, Ng KM, Noh J, Patkar R, Peng WC, Penland L, Puccinelli R, Rulifson EJ, Schaum N, Sikandar SS, Sinha R, Sit RV, Szade K, Tan W, Tato C, Tellez K, Travaglini KJ, Tropini C, Waldburger L, van Weele LJ, Wosczyna MN, Xiang J, Xue S, Youngyunpipatkul J, Zanini F, Zardeneta ME, Zhang F, Zhou L,

Bansal I, Chen S, Cho M, Cirolia G, Darmanis S, Demers A, Divita T, Ebadi H, Genetiano G, Green F, Hosseinzadeh S, Ives F, Lo A, May AP, Maynard A, McKay M, Neff NF, Penland L, Sit RV, Tan W, Waldburger L, Youngyunpipatkul J, Batson J, Botvinnik O, Castro P, Croote D, Darmanis S, DeRisi JL, Karkanias J, Pisco AO, Stanley GM, Webber JT, Zanini F, Baghel AS, Bakerman I, Batson J, Bilen B, Botvinnik O, Brownfield D, Chen MB, Darmanis S, Demir K, de Morree A, Ebadi H, Espinoza FH, Fish M, Gan Q, George BM, Gillich A, Gu X, Gulati GS, Hang Y, Huang A, Iram T, Isobe T, Karnam G, Kershner AM, Kiss BM, Kong W, Kuo CS, Lam JY, Lehallier B, Li G, Li Q, Liu L, Lu W-J, Min D, Nabhan AN, Ng KM, Nguyen PK, Patkar R, Peng WC, Penland L, Rulifson EJ, Schaum N, Sikandar SS, Sinha R, Szade K, Tan SY, Tellez K, Travaglini KJ, Tropini C, van Weele LJ, Wang BM, Wosczyna MN, Xiang J, Yousef H, Zhou L, Batson J, Botvinnik O, Chen S, Darmanis S, Green F, May AP, Maynard A, Pisco AO, Quake SR, Schaum N, Stanley GM, Webber JT, Wyss-Coray T, Zanini F, Beachy PA, Chan CKF, de Morree A, George BM, Gulati GS, Hang Y, Huang KC, Iram T, Isobe T, Kershner AM, Kiss BM, Kong W, Li G, Li Q, Liu L, Lu W-J, Nabhan AN, Ng KM, Nguyen PK, Peng WC, Rulifson EJ, Schaum N, Sikandar SS, Sinha R, Szade K, Travaglini KJ, Tropini C, Wang BM, Weinberg K, Wosczyna MN, Wu SM, Yousef H, Barres BA, Beachy PA, Chan CKF, Clarke MF, Darmanis S, Huang KC, Karkanias J, Kim SK, Krasnow MA, Kumar ME, Kuo CS, May AP, Metzger RJ, Neff NF, Nusse R, Nguyen PK, Rando TA, Sonnenburg J, Wang BM, Weinberg K, Weissman IL, Wu SM, Quake SR, Wyss-Coray T, The Tabula Muris Consortium, Overall coordination, Logistical coordination, Organ collection and processing, Library preparation and sequencing, Computational data analysis, Cell type annotation, Writing group, Supplemental text writing group, Principal investigators (2018) Single-cell transcriptomics of 20 mouse organs creates a Tabula Muris. Nature 562:367–372. https://doi.org/10.1038/s41586-018-0590-4

31. Kalucka J, de Rooij LPMH, Goveia J, Rohlenova K, Dumas SJ, Meta E, Conchinha NV, Taverna F, Teuwen L-A, Veys K, García-Caballero M, Khan S, Geldhof V, Sokol L, Chen R, Treps L, Borri M, de Zeeuw P, Dubois C, Karakach TK, Falkenberg KD, Parys M, Yin X, Vinckier S, Du Y, Fenton RA, Schoonjans L, Dewerchin M, Eelen G, Thienpont B, Lin L, Bolund L, Li X, Luo Y, Carmeliet P (2020) Single-Cell Transcriptome Atlas of Murine Endothelial Cells. Cell 180:764-779.e20. https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.01.015

32. Tabula Sapiens Consortium*, Jones RC, Karkanias J, Krasnow MA, Pisco AO, Quake SR, Salzman J, Yosef N, Bulthaup B, Brown P, Harper W, Hemenez M, Ponnusamy R, Salehi A, Sanagavarapu BA, Spallino E, Aaron KA, Concepcion W, Gardner JM, Kelly B, Neidlinger N, Wang Z, Crasta S, Kolluru S, Morri M, Tan SY, Travaglini KJ, Xu C, Alcántara-Hernández M, Almanzar N, Antony J, Beyersdorf B, Burhan D, Calcuttawala K, Carter MM, Chan CKF, Chang CA, Chang S, Colville A, Culver RN, Cvijović I, D'Amato G, Ezran C, Galdos FX, Gillich A, Goodyer WR, Hang Y, Hayashi A, Houshdaran S, Huang X, Irwin JC, Jang S, Juanico JV, Kershner AM, Kim S, Kiss B, Kong W, Kumar ME, Kuo AH, Li B, Loeb GB, Lu W-J, Mantri S, Markovic M, McAlpine PL, de Morree A, Mrouj K, Mukherjee S, Muser T, Neuhöfer P, Nguyen TD, Perez K, Puluca N, Qi Z, Rao P, Raquer-McKay H, Schaum N, Scott B, Seddighzadeh B, Segal J, Sen S, Sikandar S, Spencer SP, Steffes LC, Subramaniam VR, Swarup A, Swift M, Van Treuren W, Trimm E, Veizades S, Vijayakumar S, Vo KC, Vorperian SK, Wang W, Weinstein HNW, Winkler J, Wu TTH, Xie J, Yung AR, Zhang Y, Detweiler AM, Mekonen H, Neff NF, Sit RV, Tan M, Yan J, Bean

GR, Charu V, Forgó E, Martin BA, Ozawa MG, Silva O, Toland A, Vemuri VNP, Afik S, Awayan K, Botvinnik OB, Byrne A, Chen M, Dehghannasiri R, Gayoso A, Granados AA, Li Q, Mahmoudabadi G, McGeever A, Olivieri JE, Park M, Ravikumar N, Stanley G, Tan W, Tarashansky AJ, Vanheusden R, Wang P, Wang S, Xing G, Dethlefsen L, Ezran C, Gillich A, Hang Y, Ho P-Y, Irwin JC, Jang S, Leylek R, Liu S, Maltzman JS, Metzger RJ, Phansalkar R, Sasagawa K, Sinha R, Song H, Swarup A, Trimm E, Veizades S, Wang B, Beachy PA, Clarke MF, Giudice LC, Huang FW, Huang KC, Idoyaga J, Kim SK, Kuo CS, Nguyen P, Rando TA, Red-Horse K, Reiter J, Relman DA, Sonnenburg JL, Wu A, Wu SM, Wyss-Coray T (2022) The Tabula Sapiens: A multiple-organ, single-cell transcriptomic atlas of humans. Science 376:eabl4896. https://doi.org/10.1126/science.abl4896

33. Duan J-L, Zhou Z-Y, Ruan B, Fang Z-Q, Ding J, Liu J-J, Song P, Xu H, Xu C, Yue Z-S, Han H, Dou G-R, Wang L (2022) Notch-Regulated c-Kit-Positive Liver Sinusoidal Endothelial Cells Contribute to Liver Zonation and Regeneration. Cell Mol Gastroenterol Hepatol 13:1741–1756. https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2022.01.019

34. Raredon MSB, Yang J, Garritano J, Wang M, Kushnir D, Schupp JC, Adams TS, Greaney AM, Leiby KL, Kaminski N, Kluger Y, Levchenko A, Niklason LE (2022) Computation and visualization of cell–cell signaling topologies in single-cell systems data using Connectome. Sci Rep 12:4187. https://doi.org/10.1038/s41598-022-07959-x

35. Yang Y, Wu X, Zhao Y, Zhang D, Zhang L, Cai X, Ji J, Jing Z, Boström KI, Yao Y (2025) Arterial-Lymphatic-Like Endothelial Cells Appear in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia 2 and Contribute to Vascular Leakage and Arteriovenous Malformations. Circulation 151:299–317. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.124.070925

36. Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ, Moore MW (1996) Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. Nature 380:439–442. https://doi.org/10.1038/380439a0

37. Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, Schuh AC (1995) Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. Nature 376:62–66. https://doi.org/10.1038/376062a0

38. Carmeliet P, Jain RK (2011) Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. Nature 473:298–307. https://doi.org/10.1038/nature10144

39. Shibuya M (2011) Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis. Genes Cancer 2:1097–1105. https://doi.org/10.1177/1947601911423031

40. Tvorogov D, Anisimov A, Zheng W, Leppänen V-M, Tammela T, Laurinavicius S, Holnthoner W, Heloterä H, Holopainen T, Jeltsch M, Kalkkinen N, Lankinen H, Ojala PM, Alitalo K (2010) Effective Suppression of Vascular Network Formation by Combination of Antibodies Blocking VEGFR Ligand Binding and Receptor Dimerization. Cancer Cell 18:630–640. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.11.001

41. Tammela T, Alitalo K (2010) Lymphangiogenesis: Molecular Mechanisms and Future Promise. Cell 140:460–476. https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.045

42. Hagberg CE, Falkevall A, Wang X, Larsson E, Huusko J, Nilsson I, van Meeteren LA, Samen E, Lu L, Vanwildemeersch M, Klar J, Genove G, Pietras K, Stone-Elander S, Claesson-Welsh L, Ylä-Herttuala S, Lindahl P, Eriksson U (2010) Vascular endothelial growth factor B controls endothelial fatty acid uptake. Nature 464:917–921. https://doi.org/10.1038/nature08945

43. Li X, Tjwa M, Van Hove I, Enholm B, Neven E, Paavonen K, Jeltsch M, Juan TD, Sievers RE, Chorianopoulos E, Wada H, Vanwildemeersch M, Noel A, Foidart J-M, Springer ML, von Degenfeld G, Dewerchin M, Blau HM, Alitalo K, Eriksson U, Carmeliet P, Moons L (2008) Reevaluation of the role of VEGF-B suggests a restricted role in the revascularization of the ischemic myocardium. Arterioscler Thromb Vasc Biol 28:1614–1620. https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.158725

44. Eremina V, Sood M, Haigh J, Nagy A, Lajoie G, Ferrara N, Gerber H-P, Kikkawa Y, Miner JH, Quaggin SE (2003) Glomerular-specific alterations of VEGF-A expression lead to distinct congenital and acquired renal diseases. J Clin Invest 111:707–716. https://doi.org/10.1172/JCI17423

45. D'Hoker J, De Leu N, Heremans Y, Baeyens L, Minami K, Ying C, Lavens A, Chintinne M, Stangé G, Magenheim J, Swisa A, Martens G, Pipeleers D, van de Casteele M, Seino S, Keshet E, Dor Y, Heimberg H (2013) Conditional Hypovascularization and Hypoxia in Islets Do Not Overtly Influence Adult β-Cell Mass or Function. Diabetes 62:4165–4173. https://doi.org/10.2337/db12-1827

46. Jang JY, Choi SY, Park I, Park DY, Choe K, Kim P, Kim YK, Lee B, Hirashima M, Kubota Y, Park J, Cheng S, Nagy A, Park YJ, Alitalo K, Shong M, Koh GY (2017) VEGFR2 but not VEGFR3 governs integrity and remodeling of thyroid angiofollicular unit in normal state and during goitrogenesis. EMBO Mol Med 9:750–769. https://doi.org/10.15252/emmm.201607341

47. Kasahara Y, Tuder RM, Taraseviciene-Stewart L, Le Cras TD, Abman S, Hirth PK, Waltenberger J, Voelkel NF (2000) Inhibition of VEGF receptors causes lung cell apoptosis and emphysema. J Clin Invest 106:1311–1319. https://doi.org/10.1172/JCI10259

48. Facemire CS, Nixon AB, Griffiths R, Hurwitz H, Coffman TM (2009) Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 (Vegfr2) Controls Blood Pressure by Regulating Nitric Oxide Synthase Expression. Hypertension 54:652–658. https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.129973

49. Akil A, Gutiérrez-García AK, Guenter R, Rose JB, Beck AW, Chen H, Ren B (2021) Notch Signaling in Vascular Endothelial Cells, Angiogenesis, and Tumor Progression: An Update and Prospective. Front Cell Dev Biol 9:. https://doi.org/10.3389/fcell.2021.642352

50. Sun J-X, Dou G-R, Yang Z-Y, Liang L, Duan J-L, Ruan B, Li M-H, Chang T-F, Xu X-Y, Chen J-J, Wang Y-S, Yan X-C, Han H (2021) Notch activation promotes endothelial quiescence by repressing MYC expression via miR-218. Mol Ther Nucleic Acids 25:554–566. https://doi.org/10.1016/j.omtn.2021.07.023

51. Fagiani E, Christofori G (2013) Angiopoietins in angiogenesis. Cancer Lett 328:18–26. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.08.018

52. Smyth LCD, Highet B, Jansson D, Wu J, Rustenhoven J, Aalderink M, Tan A, Li S, Johnson R, Coppieters N, Handley R, Narayan P, Singh-Bains MK, Schweder P, Turner C, Mee EW, Heppner P, Correia J, Park TI-H, Curtis MA, Faull RLM, Dragunow M (2022) Characterisation of PDGF-BB:PDGFRβ signalling pathways in human brain pericytes: evidence of disruption in Alzheimer's disease. Commun Biol 5:235. https://doi.org/10.1038/s42003-022-03180-8

53. Hellström M, Kalén M, Lindahl P, Abramsson A, Betsholtz C (1999) Role of PDGF-B and PDGFR-β in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. Development 126:3047–3055. https://doi.org/10.1242/dev.126.14.3047

54. Keller A, Westenberger A, Sobrido MJ, García-Murias M, Domingo A, Sears RL, Lemos RR, Ordoñez-Ugalde A, Nicolas G, da Cunha JEG, Rushing EJ, Hugelshofer M, Wurnig MC, Kaech A, Reimann R, Lohmann K, Dobričić V, Carracedo A, Petrović I, Miyasaki JM, Abakumova I, Mäe MA, Raschperger E, Zatz M, Zschiedrich K, Klepper J, Spiteri E, Prieto JM, Navas I, Preuss M, Dering C, Janković M, Paucar M, Svenningsson P, Saliminejad K, Khorshid HRK, Novaković I, Aguzzi A, Boss A, Le Ber I, Defer G, Hannequin D, Kostić VS, Campion D, Geschwind DH, Coppola G, Betsholtz C, Klein C, Oliveira JRM (2013) Mutations in the gene encoding PDGF-B cause brain calcifications in humans and mice. Nat Genet 45:1077–1082. https://doi.org/10.1038/ng.2723

55. Török O, Schreiner B, Schaffenrath J, Tsai H-C, Maheshwari U, Stifter SA, Welsh C, Amorim A, Sridhar S, Utz SG, Mildenberger W, Nassiri S, Delorenzi M, Aguzzi A, Han MH, Greter M, Becher B, Keller A (2021) Pericytes regulate vascular immune homeostasis in the CNS. Proc Natl Acad Sci U S A 118:e2016587118. https://doi.org/10.1073/pnas.2016587118

56. Lin Y, Gahn J, Banerjee K, Dobreva G, Singhal M, Dubrac A, Ola R (2023) Role of endothelial PDGFB in arterio-venous malformations pathogenesis. Angiogenesis 27:193. https://doi.org/10.1007/s10456-023-09900-w

57. Winkler M, Staniczek T, Kürschner SW, Schmid CD, Schönhaber H, Cordero J, Kessler L, Mathes A, Sticht C, Neßling M, Uvarovskii A, Anders S, Zhang X, von Figura G, Hartmann D, Mogler C, Dobreva G, Schledzewski K, Géraud C, Koch P-S, Goerdt S (2021) Endothelial GATA4 controls liver fibrosis and regeneration by preventing a pathogenic switch in angiocrine signaling. J Hepatol 74:380–393. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.08.033

58. Hammes H-P, Lin J, Renner O, Shani M, Lundqvist A, Betsholtz C, Brownlee M, Deutsch U (2002) Pericytes and the Pathogenesis of Diabetic Retinopathy. Diabetes 51:3107–3112. https://doi.org/10.2337/diabetes.51.10.3107

59. Demoulin J-B, Essaghir A (2014) PDGF receptor signaling networks in normal and cancer cells. Cytokine Growth Factor Rev 25:273–283. https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2014.03.003

60. Schmitt J, Matei D (2008) Platelet-Derived Growth Factor Pathway Inhibitors in Ovarian Cancer. Clin Ovarian Cancer 1:120–126. https://doi.org/10.3816/COC.2008.n.013

61. Mathew P, Thall PF, Jones D, Perez C, Bucana C, Troncoso P, Kim S-J, Fidler IJ, Logothetis C (2004) Platelet-Derived Growth Factor Receptor Inhibitor Imatinib Mesylate and Docetaxel: A Modular Phase I Trial in Androgen-Independent Prostate Cancer. J Clin Oncol 22:3323–3329. https://doi.org/10.1200/JCO.2004.10.116

62. Kontovinis LF, Papazisis KT, Touplikioti P, Andreadis C, Mouratidou D, Kortsaris AH (2009) Sunitinib treatment for patients with clear-cell metastatic renal cell carcinoma: clinical outcomes and plasma angiogenesis markers. BMC Cancer 9:1–10. https://doi.org/10.1186/1471-2407-9-82

63. Abdollahi A, Li M, Ping G, Plathow C, Domhan S, Kiessling F, Lee LB, McMahon G, Gröne H-J, Lipson KE, Huber PE (2005) Inhibition of platelet-derived growth factor signaling attenuates pulmonary fibrosis. J Exp Med 201:925–935. https://doi.org/10.1084/jem.20041393

64. Kim Y, Fiel MI, Albanis E, Chou HI, Zhang W, Khitrov G, Friedman SL (2012) Anti-fibrotic activity and enhanced interleukin-6 production by hepatic stellate cells in response to imatinib mesylate. Liver Int 32:1008–1017. https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2012.02806.x

65. University Hospital Zurich, ZKF, Division of Plastic Surgery and Hand Surgery, Sternwartstrasse 14, 8091 Zurich, Switzerland., Evrova O, Buschmann J (2017) In vitro and in vivo effects of PDGF-BB delivery strategies on tendon healing: a review. Eur Cell Mater 34:15–39. https://doi.org/10.22203/eCM.v034a02

66. Eichmann A, Noble FL, Autiero M, Carmeliet P (2005) Guidance of vascular and neural network formation. Curr Opin Neurobiol 15:108–115. https://doi.org/10.1016/j.conb.2005.01.008

67. Gu C, Yoshida Y, Livet J, Reimert DV, Mann F, Merte J, Henderson CE, Jessell TM, Kolodkin AL, Ginty DD (2005) Semaphorin 3E and Plexin-D1 Control Vascular Pattern Independently of Neuropilins. Science 307:265–268. https://doi.org/10.1126/science.1105416

68. Jiao B, Liu S, Tan X, Lu P, Wang D, Xu H (2021) Class-3 semaphorins: Potent multifunctional modulators for angiogenesis-associated diseases. Biomed Pharmacother 137:111329. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111329

69. Le Guelte A, Galan-Moya E-M, Dwyer J, Treps L, Kettler G, Hebda JK, Dubois S, Auffray C, Chneiweiss H, Bidere N, Gavard J (2012) Semaphorin 3A elevates endothelial cell permeability through PP2A inactivation. J Cell Sci jcs.108282. https://doi.org/10.1242/jcs.108282

70. Acevedo LM, Barillas S, Weis SM, Göthert JR, Cheresh DA (2008) Semaphorin 3A suppresses VEGF-mediated angiogenesis yet acts as a vascular permeability factor. Blood 111:2674–2680. https://doi.org/10.1182/blood-2007-08-110205

71. Treps L, Le Guelte A, Gavard J (2013) Emerging roles of Semaphorins in the regulation of epithelial and endothelial junctions. Tissue Barriers 1:e23272. https://doi.org/10.4161/tisb.23272

72. Wagner JUG, Tombor LS, Malacarne PF, Kettenhausen L-M, Panthel J, Kujundzic H, Manickam N, Schmitz K, Cipca M, Stilz KA, Fischer A, Muhly-Reinholz M, Abplanalp WT, John D, Mohanta SK, Weber C, Habenicht AJR, Buchmann GK, Angendohr S, Amin E, Scherschel K, Klöcker N, Kelm M, Schüttler D, Clauss S, Günther S, Boettger T, Braun T, Bär C, Pham M-D, Krishnan J, Hille S, Müller OJ, Bozoglu T, Kupatt C, Nardini E, Osmanagic-Myers S, Meyer C, Zeiher AM, Brandes RP, Luxán G, Dimmeler S (2023) Aging impairs the neurovascular interface in the heart. Science 381:897–906. https://doi.org/10.1126/science.ade4961

73. Eberhard D, Balkenhol S, Köster A, Follert P, Upschulte E, Ostermann P, Kirschner P, Uhlemeyer C, Charnay I, Preuss C, Trenkamp S, Belgardt B-F, Dickscheid T, Esposito I, Roden M, Lammert E (2024) Semaphorin-3A regulates liver sinusoidal endothelial cell porosity and promotes hepatic steatosis. Nat Cardiovasc Res 3:734–753. https://doi.org/10.1038/s44161-024-00487-z

74. Desroches-Castan A, Tillet E, Bouvard C, Bailly S (2022) BMP9 and BMP10: Two close vascular quiescence partners that stand out. Dev Dyn Off Publ Am Assoc Anat 251:178–197. https://doi.org/10.1002/dvdy.395

75. Tie Y, Tang F, Peng D, Zhang Y, Shi H (2022) TGF-beta signal transduction: biology, function and therapy for diseases. Mol Biomed 3:45. https://doi.org/10.1186/s43556-022-00109-9

76. Hinck AP (2012) Structural studies of the TGF-βs and their receptors – insights into evolution of the TGF-β superfamily. FEBS Lett 586:1860–1870. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.05.028

77. Massagué J, Gomis RR (2006) The logic of TGFbeta signaling. FEBS Lett 580:2811–2820. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.04.033

78. Zhang YE (2017) Non-Smad Signaling Pathways of the TGF-β Family. Cold Spring Harb Perspect Biol 9:a022129. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022129

79. Robert F, Desroches-Castan A, Bailly S, Dupuis-Girod S, Feige J-J (2020) Future treatments for hereditary hemorrhagic telangiectasia. Orphanet J Rare Dis 15:4. https://doi.org/10.1186/s13023-019-1281-4

80. McAllister KA, Grogg KM, Johnson DW, Gallione CJ, Baldwin MA, Jackson CE, Helmbold EA, Markel DS, McKinnon WC, Murrel J, McCormick MK, Pericak-Vance MA, Heutink P, Oostra BA, Haitjema T, Westerman CJJ, Porteous ME, Guttmacher AE, Letarte M, Marchuk DA (1994) Endoglin, a TGF-β binding protein of endothelial cells, is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type 1. Nat Genet 8:345–351. https://doi.org/10.1038/ng1294-345

81. Johnson DW, Berg JN, Baldwin MA, Gallione CJ, Marondel I, Yoon S-J, Stenzel TT, Speer M, Pericak-Vance MA, Diamond A, Guttmacher AE, Jackson CE, Attisano L, Kucherlapati R, Porteous MEM, Marchuk DA (1996) Mutations in the activin receptor–like kinase 1 gene in hereditary haemorrhagic telangiectasia type 2. Nat Genet 13:189–195. https://doi.org/10.1038/ng0696-189

82. Shovlin CL, Simeoni I, Downes K, Frazer ZC, Megy K, Bernabeu-Herrero ME, Shurr A, Brimley J, Patel D, Kell L, Stephens J, Turbin IG, Aldred MA, Penkett CJ, Ouwehand WH, Jovine L, Turro E (2020) Mutational and phenotypic characterization of hereditary hemorrhagic telangiectasia. Blood 136:1907–1918. https://doi.org/10.1182/blood.2019004560

83. Gallione CJ, Repetto GM, Legius E, Rustgi AK, Schelley SL, Tejpar S, Mitchell G, Drouin E, Westermann CJJ, Marchuk DA (2004) A combined syndrome of juvenile polyposis and hereditary haemorrhagic telangiectasia associated with mutations in MADH4 (SMAD4). Lancet Lond Engl 363:852–859. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)15732-2

84. Wooderchak WL, Spencer Z, Crockett DK, McDonald J, Bayrak-Toydemir P (2010) Repository of SMAD4 Mutations: Reference for Genotype/ Phenotype Correlation. J Data Min Genomics Proteomics 01: https://doi.org/10.4172/2153-0602.1000101

85. Balachandar S, Graves TJ, Shimonty A, Kerr K, Kilner J, Xiao S, Slade R, Sroya M, Alikian M, Curetean E, Thomas E, McConnell VPM, McKee S, Boardman-Pretty F, Devereau A, Fowler TA, Caulfield MJ, Alton EW, Ferguson T, Redhead J, McKnight AJ, Thomas GA, Consortium GER, Aldred MA, Shovlin CL (2022) Identification and validation of a novel pathogenic variant in GDF2 (BMP9) responsible for hereditary hemorrhagic telangiectasia and pulmonary arteriovenous malformations. Am J Med Genet A 188:959–964. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.62584

86. Wooderchak-Donahue WL, McDonald J, O'Fallon B, Upton PD, Li W, Roman BL, Young S, Plant P, Fülöp GT, Langa C, Morrell NW, Botella LM, Bernabeu C, Stevenson DA, Runo JR, Bayrak-Toydemir P (2013) *BMP9* Mutations Cause a Vascular-Anomaly

Syndrome with Phenotypic Overlap with Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. Am J Hum Genet 93:530–537. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.07.004

87. Al Tabosh T, Al Tarrass M, Tourvieilhe L, Guilhem A, Dupuis-Girod S, Bailly S Hereditary hemorrhagic telangiectasia: from signaling insights to therapeutic advances. J Clin Invest 134:e176379. https://doi.org/10.1172/JCI176379

88. Essemilaire A, Bracard S, Goffinet L, Schmutz J-L, Bursztejn A-C (2021) Syndrome Capillary Malformation- Arteriovenous-Malformation (CM-AVM) : revue de la littérature. Ann Dermatol Vénéréologie - FMC 1:A207–A208. https://doi.org/10.1016/j.fander.2021.09.142

89. McDonald J, Stevenson DA (1993) Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. In: Adam MP, Feldman J, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Amemiya A (eds) GeneReviews®. University of Washington, Seattle, Seattle (WA)

90. Braverman IM, Keh A, Jacobson BS (1990) Ultrastructure and Three-Dimensional Organization of the Telangiectases of Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. J Invest Dermatol 95:422–427. https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12555569

91. AAssar OS, Friedman CM, White RI (1991) The natural history of epistaxis in hereditary hemorrhagic telangiectasia. The Laryngoscope 101:977–980. https://doi.org/10.1288/00005537-199109000-00008

92. Hoag JB, Terry P, Mitchell S, Reh D, Merlo CA (2010) An epistaxis severity score for hereditary hemorrhagic telangiectasia. The Laryngoscope 120:838–843. https://doi.org/10.1002/lary.20818

93. Shovlin CL (2014) Pulmonary Arteriovenous Malformations. Am J Respir Crit Care Med 190:1217–1228. https://doi.org/10.1164/rccm.201407-1254CI

94. Hessels J, Kroon S, Vorselaars VVM, Boerman S, Mager JJ, Post MC (2023) Evolution of Pulmonary Arteriovenous Malformations: The Role of Contrast Echocardiography. Chest 163:669–677. https://doi.org/10.1016/j.chest.2022.11.005

95. Kelly C, Buscarini E, Manfredi G, Gregory S, Heneghan MA (2024) Hepatic manifestations of hereditary haemorrhagic telangiectasia. Liver Int Off J Int Assoc Study Liver 44:2220–2234. https://doi.org/10.1111/liv.16008

96. Brinjikji W, Iyer VN, Wood CP, Lanzino G (2017) Prevalence and characteristics of brain arteriovenous malformations in hereditary hemorrhagic telangiectasia: a systematic review and meta-analysis. J Neurosurg 127:302–310. https://doi.org/10.3171/2016.7.JNS16847

97. Guilhem A, Malcus C, Clarivet B, Plauchu H, Dupuis-Girod S (2013) Immunological abnormalities associated with hereditary haemorrhagic telangiectasia. J Intern Med 274:351–362. https://doi.org/10.1111/joim.12098

98. Guilhem A, Portalès P, Dupuis-Girod S, Rivière S, Vincent T (2021) Altered expressions of CXCR4 and CD26 on T-helper lymphocytes in hereditary hemorrhagic telangiectasia. Orphanet J Rare Dis 16:511. https://doi.org/10.1186/s13023-021-02139-y

99. Mani Tiwari AK, Mahdi AA, Chandyan S, Zahra F, Godbole MM, Jaiswar SP, Srivastava VK, Singh Negi MP (2011) Oral iron supplementation leads to oxidative imbalance in anemic women: A prospective study. Clin Nutr 30:188–193. https://doi.org/10.1016/j.clnu.2010.08.001

100. Tanimura Y, Shimizu K, Tanabe K, Otsuki T, Yamauchi R, Matsubara Y, Iemitsu M, Maeda S, Ajisaka R (2008) Exercise-Induced Oxidative DNA Damage and Lymphocytopenia in Sedentary Young Males. Med Sci Sports Exerc 40:1455. https://doi.org/10.1249/MSS.0b013e31817242cf

101. Albiñana V, Cuesta AM, de Rojas-P I, Gallardo-Vara E, Recio-Poveda L, Bernabéu C, Botella LM (2020) Review of Pharmacological Strategies with Repurposed Drugs for Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia Related Bleeding. J Clin Med 9:1766. https://doi.org/10.3390/jcm9061766

102. Faughnan ME, Mager JJ, Hetts SW, Palda VA, Lang-Robertson K, Buscarini E, Deslandres E, Kasthuri RS, Lausman A, Poetker D, Ratjen F, Chesnutt MS, Clancy M, Whitehead KJ, Al-Samkari H, Chakinala M, Conrad M, Cortes D, Crocione C, Darling J, de Gussem E, Derksen C, Dupuis-Girod S, Foy P, Geisthoff U, Gossage JR, Hammill A, Heimdal K, Henderson K, Iyer VN, Kjeldsen AD, Komiyama M, Korenblatt K, McDonald J, McMahon J, McWilliams J, Meek ME, Mei-Zahav M, Olitsky S, Palmer S, Pantalone R, Piccirillo JF, Plahn B, Porteous MEM, Post MC, Radovanovic I, Rochon PJ, Rodriguez-Lopez J, Sabba C, Serra M, Shovlin C, Sprecher D, White AJ, Winship I, Zarrabeitia R (2020) Second International Guidelines for the Diagnosis and Management of Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. Ann Intern Med 173:989–1001. https://doi.org/10.7326/M20-1443

103. McDonald J, Bayrak-Toydemir P, DeMille D, Wooderchak-Donahue W, Whitehead K (2020) Curaçao diagnostic criteria for hereditary hemorrhagic telangiectasia is highly predictive of a pathogenic variant in *ENG* or *ACVRL1* (HHT1 and HHT2). Genet Med 22:1201–1205. https://doi.org/10.1038/s41436-020-0775-8

104. Bernabeu C, Bayrak-Toydemir P, McDonald J, Letarte M (2020) Potential Second-Hits in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. J Clin Med 9:3571. https://doi.org/10.3390/jcm9113571

105. Gaillard S, Dupuis-Girod S, Boutitie F, Rivière S, Morinière S, Hatron P-Y, Manfredi G, Kaminsky P, Capitaine A-L, Roy P, Gueyffier F, Plauchu H, ATERO Study Group (2014) Tranexamic acid for epistaxis in hereditary hemorrhagic telangiectasia patients: a European cross-over controlled trial in a rare disease. J Thromb Haemost JTH 12:1494–1502. https://doi.org/10.1111/jth.12654

106. Müller-Hülsbeck S, Marques L, Maleux G, Osuga K, Pelage J-P, Wohlgemuth WA, Andersen PE (2020) CIRSE Standards of Practice on Diagnosis and Treatment of

Pulmonary Arteriovenous Malformations. Cardiovasc Intervent Radiol 43:353–361. https://doi.org/10.1007/s00270-019-02396-2

107. Dumortier J, Dupuis-Girod S, Valette P-J, Valent A, Guillaud O, Saurin J-C, Hervieu V, Robinson P, Plauchu H, Paliard P, Boillot O, Scoazec J-Y (2019) Recurrence of Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia After Liver Transplantation: Clinical Implications and Physiopathological Insights. Hepatology 69:2232. https://doi.org/10.1002/hep.30424

108. Iyer VN, Apala DR, Pannu BS, Kotecha A, Brinjikji W, Leise MD, Kamath PS, Misra S, Begna KH, Cartin-Ceba R, DuBrock HM, Krowka MJ, O'Brien EK, Pruthi RK, Schroeder DR, Swanson KL (2018) Intravenous Bevacizumab for Refractory Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia-Related Epistaxis and Gastrointestinal Bleeding. Mayo Clin Proc 93:155–166. https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2017.11.013

109. Al-Samkari H, Kasthuri RS, Parambil JG, Albitar HA, Almodallal YA, Vázquez C, Serra MM, Dupuis-Girod S, Wilsen CB, McWilliams JP, Fountain EH, Gossage JR, Weiss CR, Latif MA, Issachar A, Mei-Zahav M, Meek ME, Conrad M, Rodriguez-Lopez J, Kuter DJ, Iyer VN (2021) An international, multicenter study of intravenous bevacizumab for bleeding in hereditary hemorrhagic telangiectasia: the InHIBIT-Bleed study. Haematologica 106:2161–2169. https://doi.org/10.3324/haematol.2020.261859

110. Mitchell A, Adams LA, MacQuillan G, Tibballs J, vanden Driesen R, Delriviere L (2008) Bevacizumab reverses need for liver transplantation in hereditary hemorrhagic telangiectasia. Liver Transpl 14:210–213. https://doi.org/10.1002/lt.21417

111. Dupuis-Girod S, Ginon I, Saurin J-C, Marion D, Guillot E, Decullier E, Roux A, Carette M-F, Gilbert-Dussardier B, Hatron P-Y, Lacombe P, Lorcerie B, Rivière S, Corre R, Giraud S, Bailly S, Paintaud G, Ternant D, Valette P-J, Plauchu H, Faure F (2012) Bevacizumab in Patients With Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia and Severe Hepatic Vascular Malformations and High Cardiac Output. JAMA 307:948–955. https://doi.org/10.1001/jama.2012.250

112. Faughnan ME, Gossage JR, Chakinala MM, Oh SP, Kasthuri R, Hughes CCW, McWilliams JP, Parambil JG, Vozoris N, Donaldson J, Paul G, Berry P, Sprecher DL (2019) Pazopanib may reduce bleeding in hereditary hemorrhagic telangiectasia. Angiogenesis 22:145–155. https://doi.org/10.1007/s10456-018-9646-1

113. Kovacs-Sipos E, Holzmann D, Scherer T, Soyka MB (2017) Nintedanib as a novel treatment option in hereditary haemorrhagic telangiectasia. BMJ Case Rep 2017:bcr2017219393. https://doi.org/10.1136/bcr-2017-219393

114. Ola R, Dubrac A, Han J, Zhang F, Fang JS, Larrivée B, Lee M, Urarte AA, Kraehling JR, Genet G, Hirschi KK, Sessa WC, Canals FV, Graupera M, Yan M, Young LH, Oh PS, Eichmann A (2016) PI3 kinase inhibition improves vascular malformations in mouse models of hereditary haemorrhagic telangiectasia. Nat Commun 7:13650. https://doi.org/10.1038/ncomms13650

115. Faughnan M (2025) Low-dose Sirolimus for Nosebleeds in HHT: a Phase II Pilot Study. clinicaltrials.gov

116. Skaro AI, Marotta PJ, McAlister VC (2006) Regression of cutaneous and gastrointestinal telangiectasia with sirolimus and aspirin in a patient with hereditary hemorrhagic telangiectasia. Ann Intern Med 144:226–227. https://doi.org/10.7326/0003-4819-144-3-200602070-00030

117. Invernizzi R, Quaglia F, Klersy C, Pagella F, Ornati F, Chu F, Matti E, Spinozzi G, Plumitallo S, Grignani P, Olivieri C, Bastia R, Bellistri F, Danesino C, Benazzo M, Balduini CL (2015) Efficacy and safety of thalidomide for the treatment of severe recurrent epistaxis in hereditary haemorrhagic telangiectasia: results of a non-randomised, single-centre, phase 2 study. Lancet Haematol 2:e465–e473. https://doi.org/10.1016/S2352-3026(15)00195-7

118. Albiñana V, Sanz-Rodríguez F, Recio-Poveda L, Bernabéu C, Botella LM (2011) Immunosuppressor FK506 Increases Endoglin and Activin Receptor-Like Kinase 1 Expression and Modulates Transforming Growth Factor-β1 Signaling in Endothelial Cells. Mol Pharmacol 79:833–843. https://doi.org/10.1124/mol.110.067447

119. Sommer N, Droege F, Gamen K, Geisthoff U, Gall H, Tello K, Richter M, Deubner L, Schmiedel R, Hecker M, Spiekerkoetter E, Wirsching K, Seeger W, Ghofrani H, Pullamsetti S (2018) Treatment with low-dose tacrolimus inhibits bleeding complications in a patient with hereditary hemorrhagic telangiectasia and pulmonary arterial hypertension. Pulm Circ 9:2045894018805406. https://doi.org/10.1177/2045894018805406

120. Al-Samkari H, Kasthuri RS, Iyer VN, Pishko AM, Decker JE, Weiss CR, Whitehead KJ, Conrad MB, Zumberg MS, Zhou JY, Parambil J, Marsh D, Clancy M, Bradley L, Wisniewski L, Carper BA, Thomas SM, McCrae KR (2024) Pomalidomide for Epistaxis in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. N Engl J Med 391:1015–1027. https://doi.org/10.1056/NEJMoa2312749

121. Panchenko MP, Williams MC, Brody JS, Yu Q (1996) Type I receptor serine-threonine kinase preferentially expressed in pulmonary blood vessels. Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol. https://doi.org/10.1152/ajplung.1996.270.4.L547

122. Roelen BAJ, van Rooijen MA, Mummery CL (1997) Expression of ALK-1, a type 1 serine/threonine kinase receptor, coincides with sites of vasculogenesis and angiogenesis in early mouse development. Dev Dyn 209:418–430. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0177(199708)209:4<418::AID-AJA9>3.0.CO;2-L

123. Hwan Kim Y, Vu P-N, Choe S, Jeon C-J, Arthur HM, Vary CPH, Lee YJ, Oh SP (2020) Overexpression of Activin Receptor-Like Kinase 1 in Endothelial Cells Suppresses Development of Arteriovenous Malformations in Mouse Models of Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. Circ Res 127:1122–1137. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.119.316267

124. Corti P, Young S, Chen C-Y, Patrick MJ, Rochon ER, Pekkan K, Roman BL (2011) Interaction between alk1 and blood flow in the development of arteriovenous malformations. Dev Camb Engl 138:1573–1582. https://doi.org/10.1242/dev.060467

125. Galaris G, Montagne K, Thalgott JH, Goujon GJPE, van den Driesche S, Martin S, Mager H-JJ, Mummery CL, Rabelink TJ, Lebrin F (2021) Thresholds of Endoglin Expression in Endothelial Cells Explains Vascular Etiology in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia Type 1. Int J Mol Sci 22:8948. https://doi.org/10.3390/ijms22168948

126. Zhao D, Yang F, Wang Y, Li S, Li Y, Hou F, Yang W, Liu D, Tao Y, Li Q, Wang J, He F, Tang L ALK1 signaling is required for the homeostasis of Kupffer cells and prevention of bacterial infection. J Clin Invest 132:e150489. https://doi.org/10.1172/JCI150489

127. Vernersson E, Khoo NKS, Henriksson ML, Roos G, Palmer RH, Hallberg B (2006) Characterization of the expression of the ALK receptor tyrosine kinase in mice. Gene Expr Patterns 6:448–461. https://doi.org/10.1016/j.modgep.2005.11.006

128. Lux A, Attisano L, Marchuk DA (1999) Assignment of Transforming Growth Factor β1 and β3 and a Third New Ligand to the Type I Receptor ALK-1*. J Biol Chem 274:9984–9992. https://doi.org/10.1074/jbc.274.15.9984

129. Seki T, Hong K-H, Oh SP (2006) Nonoverlapping expression patterns of ALK1 and ALK5 reveal distinct roles of each receptor in vascular development. Lab Invest 86:116–129. https://doi.org/10.1038/labinvest.3700376

130. Park SO, Lee YJ, Seki T, Hong K-H, Fliess N, Jiang Z, Park A, Wu X, Kaartinen V, Roman BL, Oh SP (2008) ALK5- and TGFBR2-independent role of ALK1 in the pathogenesis of hereditary hemorrhagic telangiectasia type 2. Blood 111:633–642. https://doi.org/10.1182/blood-2007-08-107359

131. David L, Mallet C, Mazerbourg S, Feige J-J, Bailly S (2006) Identification of BMP9 and BMP10 as functional activators of the orphan activin receptor-like kinase 1 (ALK1) in endothelial cells. Blood 109:1953–1961. https://doi.org/10.1182/blood-2006-07-034124

132. Scharpfenecker M, van Dinther M, Liu Z, van Bezooijen RL, Zhao Q, Pukac L, Löwik CWGM, ten Dijke P (2007) BMP-9 signals via ALK1 and inhibits bFGF-induced endothelial cell proliferation and VEGF-stimulated angiogenesis. J Cell Sci 120:964–972. https://doi.org/10.1242/jcs.002949

133. Lamouille S, Mallet C, Feige J-J, Bailly S (2002) Activin receptor–like kinase 1 is implicated in the maturation phase of angiogenesis. Blood 100:4495–4501. https://doi.org/10.1182/blood.V100.13.4495

134. Li B, Yin W, Hong X, Shi Y, Wang H-S, Lin S-F, Tang S-B (2008) Remodeling Retinal Neovascularization by ALK1 Gene Transfection In Vitro. Invest Ophthalmol Vis Sci 49:4553–4560. https://doi.org/10.1167/iovs.07-0995

135. David L, Feige J-J, Bailly S (2009) Emerging role of bone morphogenetic proteins in angiogenesis. Cytokine Growth Factor Rev 20:203–212. https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2009.05.001

136. Oh SP, Seki T, Goss KA, Imamura T, Yi Y, Donahoe PK, Li L, Miyazono K, ten Dijke P, Kim S, Li E (2000) Activin receptor-like kinase 1 modulates transforming growth factor-β1 signaling in the regulation of angiogenesis. Proc Natl Acad Sci 97:2626–2631. https://doi.org/10.1073/pnas.97.6.2626

137. Urness LD, Sorensen LK, Li DY (2000) Arteriovenous malformations in mice lacking activin receptor-like kinase-1. Nat Genet 26:328–331. https://doi.org/10.1038/81634

138. Li DY, Sorensen LK, Brooke BS, Urness LD, Davis EC, Taylor DG, Boak BB, Wendel DP (1999) Defective Angiogenesis in Mice Lacking Endoglin. Science 284:1534–1537. https://doi.org/10.1126/science.284.5419.1534

139. Arthur HM, Ure J, Smith AJH, Renforth G, Wilson DI, Torsney E, Charlton R, Parums DV, Jowett T, Marchuk DA, Burn J, Diamond AG (2000) Endoglin, an Ancillary TGFβ Receptor, Is Required for Extraembryonic Angiogenesis and Plays a Key Role in Heart Development. Dev Biol 217:42–53. https://doi.org/10.1006/dbio.1999.9534

140. Bourdeau A, Dumont DJ, Letarte M (1999) A murine model of hereditary hemorrhagic telangiectasia. J Clin Invest 104:1343–1351

141. Srinivasan S, Hanes MA, Dickens T, Porteous MEM, Oh SP, Hale LP, Marchuk DA (2003) A mouse model for hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT) type 2. Hum Mol Genet 12:473–482. https://doi.org/10.1093/hmg/ddg050

142. Torsney E, Charlton R, Diamond AG, Burn J, Soames JV, Arthur HM (2003) Mouse model for hereditary hemorrhagic telangiectasia has a generalized vascular abnormality. Circulation 107:1653–1657. https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000058170.92267.00

143. Lebrin F, Srun S, Raymond K, Martin S, van den Brink S, Freitas C, Bréant C, Mathivet T, Larrivée B, Thomas J-L, Arthur HM, Westermann CJJ, Disch F, Mager JJ, Snijder RJ, Eichmann A, Mummery CL (2010) Thalidomide stimulates vessel maturation and reduces epistaxis in individuals with hereditary hemorrhagic telangiectasia. Nat Med 16:420–428. https://doi.org/10.1038/nm.2131

144. Park SO, Wankhede M, Lee YJ, Choi E-J, Fliess N, Choe S-W, Oh S-H, Walter G, Raizada MK, Sorg BS, Oh SP (2009) Real-time imaging of de novo arteriovenous malformation in a mouse model of hereditary hemorrhagic telangiectasia. J Clin Invest 119:3487–3496. https://doi.org/10.1172/JCI39482

145. Mahmoud M, Allinson KR, Zhai Z, Oakenfull R, Ghandi P, Adams RH, Fruttiger M, Arthur HM (2010) Pathogenesis of arteriovenous malformations in the absence of endoglin. Circ Res 106:1425–1433. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.211037

146. Tual-Chalot S, Mahmoud M, Allinson KR, Redgrave RE, Zhai Z, Oh SP, Fruttiger M, Arthur HM (2014) Endothelial Depletion of Acvrl1 in Mice Leads to Arteriovenous Malformations Associated with Reduced Endoglin Expression. PLoS ONE 9:e98646. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098646

147. Ricard N, Ciais D, Levet S, Subileau M, Mallet C, Zimmers TA, Lee S-J, Bidart M, Feige J-J, Bailly S (2012) BMP9 and BMP10 are critical for postnatal retinal vascular remodeling. Blood 119:6162–6171. https://doi.org/10.1182/blood-2012-01-407593

148. Zhang X, Jacobs KA, Raygor KP, Li S, Li J, Wang RA (2024) Arterial endothelial deletion of Alk1 causes epistaxis and cerebral microhemorrhage with aberrant arteries and defective smooth muscle coverage. 2024.11.25.622742

149. Choi E-J, Chen W, Jun K, Arthur HM, Young WL, Su H (2014) Novel Brain Arteriovenous Malformation Mouse Models for Type 1 Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. PLOS ONE 9:e88511. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088511

150. Ruiz S, Zhao H, Chandakkar P, Chatterjee PK, Papoin J, Blanc L, Metz CN, Campagne F, Marambaud P (2016) A mouse model of hereditary hemorrhagic telangiectasia generated by transmammary-delivered immunoblocking of BMP9 and BMP10. Sci Rep 6:37366. https://doi.org/10.1038/srep37366

151. Garrido-Martin EM, Nguyen H-L, Cunningham TA, Choe S, Jiang Z, Arthur HM, Lee Y-J, Oh SP (2014) Common and Distinctive Pathogenetic Features of Arteriovenous Malformations in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia 1 and Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia 2 Animal Models—Brief Report. Arterioscler Thromb Vasc Biol 34:2232–2236. https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.303984

152. Chen W, Sun Z, Han Z, Jun K, Camus M, Wankhede M, Mao L, Arnold T, Young WL, Su H (2014) De novo cerebrovascular malformation in the adult mouse after endothelial Alk1 deletion and angiogenic stimulation. Stroke 45:900–902. https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.113.003655

153. Xu B, Wu YQ, Huey M, Arthur HM, Marchuk DA, Hashimoto T, Young WL, Yang G-Y (2004) Vascular endothelial growth factor induces abnormal microvasculature in the endoglin heterozygous mouse brain. J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab 24:237–244. https://doi.org/10.1097/01.WCB.0000107730.66603.51

154. Hao Q, Zhu Y, Su H, Shen F, Yang G-Y, Kim H, Young WL (2010) VEGF Induces More Severe Cerebrovascular Dysplasia in Eng+/− than in Alk1+/− Mice. Transl Stroke Res 1:197–201. https://doi.org/10.1007/s12975-010-0020-x

155. Jerkic M, Peter M, Ardelean D, Fine M, Konerding MA, Letarte M (2010) Dextran sulfate sodium leads to chronic colitis and pathological angiogenesis in Endoglin heterozygous mice. Inflamm Bowel Dis 16:1859–1870. https://doi.org/10.1002/ibd.21288

156. Stahl A, Connor KM, Sapieha P, Chen J, Dennison RJ, Krah NM, Seaward MR, Willett KL, Aderman CM, Guerin KI, Hua J, Löfqvist C, Hellström A, Smith LEH (2010) The Mouse Retina as an Angiogenesis Model. Invest Ophthalmol Vis Sci 51:2813–2826. https://doi.org/10.1167/iovs.10-5176

157. Ola R, Künzel SH, Zhang F, Genet G, Chakraborty R, Pibouin-Fragner L, Martin K, Sessa W, Dubrac A, Eichmann A (2018) SMAD4 Prevents Flow Induced Arteriovenous Malformations by Inhibiting Casein Kinase 2. Circulation 138:2379–2394. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.118.033842

158. Akla N, Viallard C, Popovic N, Lora Gil C, Sapieha P, Larrivée B (2018) BMP9 (Bone Morphogenetic Protein-9)/Alk1 (Activin-Like Kinase Receptor Type I) Signaling Prevents Hyperglycemia-Induced Vascular Permeability. Arterioscler Thromb Vasc Biol 38:1821–1836. https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.118.310733

159. Bouvard C, Tu L, Rossi M, Desroches-Castan A, Berrebeh N, Helfer E, Roelants C, Liu H, Ouarné M, Chaumontel N, Mallet C, Battail C, Bikfalvi A, Humbert M, Savale L, Daubon T, Perret P, Tillet E, Guignabert C, Bailly S (2021) Different cardiovascular and pulmonary phenotypes for single- and double-knock-out mice deficient in BMP9 and BMP10. Cardiovasc Res 118:1805–1820. https://doi.org/10.1093/cvr/cvab187

160. Han C, Choe S, Kim YH, Acharya AP, Keselowsky BG, Sorg BS, Lee Y-J, Oh SP (2014) VEGF neutralization can prevent and normalize arteriovenous malformations in an animal model for hereditary hemorrhagic telangiectasia 2. Angiogenesis 17:823–830. https://doi.org/10.1007/s10456-014-9436-3

161. Zhu C, Coombe DR, Zheng MH, Yeoh GCT, Li L (2013) Liver progenitor cell interactions with the extracellular matrix. J Tissue Eng Regen Med 7:757–766. https://doi.org/10.1002/term.1470

162. Hernandez-Gea V, Friedman SL (2011) Pathogenesis of liver fibrosis. Annu Rev Pathol 6:425–456. https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011110-130246

163. Iredale JP (1997) Tissue inhibitors of metalloproteinases in liver fibrosis. Int J Biochem Cell Biol 29:43–54. https://doi.org/10.1016/S1357-2725(96)00118-5

164. Kamm DR, McCommis KS (2022) Hepatic stellate cells in physiology and pathology. J Physiol 600:1825–1837. https://doi.org/10.1113/JP281061

165. Du Y, Li N, Long M (2018) Chapter 6 - Liver sinusoid on a chip. In: Doh J, Fletcher D, Piel M (eds) Methods in Cell Biology. Academic Press, pp 105–134

166. Adams DH, Eksteen B (2006) Aberrant homing of mucosal T cells and extra-intestinal manifestations of inflammatory bowel disease. Nat Rev Immunol 6:244–251. https://doi.org/10.1038/nri1784

167. Blaner WS, O'Byrne SM, Wongsiriroj N, Kluwe J, D'Ambrosio DM, Jiang H, Schwabe RF, Hillman EMC, Piantedosi R, Libien J (2009) Hepatic stellate cell lipid droplets: A

specialized lipid droplet for retinoid storage. Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Biol Lipids 1791:467–473. https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2008.11.001

168. Tillet E, Ouarné M, Desroches-Castan A, Mallet C, Subileau M, Didier R, Lioutsko A, Belthier G, Feige J-J, Bailly S (2018) A heterodimer formed by bone morphogenetic protein 9 (BMP9) and BMP10 provides most BMP biological activity in plasma. J Biol Chem 293:10963–10974. https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.002968

169. Viñas O, Bataller R, Sancho-Bru P, Ginès P, Berenguer C, Enrich C, Nicolás JM, Ercilla G, Gallart T, Vives J, Arroyo V, Rodés J (2003) Human hepatic stellate cells show features of antigen-presenting cells and stimulate lymphocyte proliferation. Hepatol Baltim Md 38:919–929. https://doi.org/10.1053/jhep.2003.50392

170. Tsuchida T, Friedman SL (2017) Mechanisms of hepatic stellate cell activation. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 14:397–411. https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.38

171. Gammella E, Buratti P, Cairo G, Recalcati S (2014) Macrophages: central regulators of iron balance. Metallomics 6:1336–1345. https://doi.org/10.1039/c4mt00104d

172. Wang Y, van der Tuin S, Tjeerdema N, van Dam AD, Rensen SS, Hendrikx T, Berbée JFP, Atanasovska B, Fu J, Hoekstra M, Bekkering S, Riksen NP, Buurman WA, Greve JW, Hofker MH, Shiri-Sverdlov R, Meijer OC, Smit JWA, Havekes LM, van Dijk KW, Rensen PCN (2015) Plasma cholesteryl ester transfer protein is predominantly derived from Kupffer cells. Hepatology 62:1710–1722. https://doi.org/10.1002/hep.27985

173. Maslak E, Gregorius A, Chlopicki S (2015) Liver sinusoidal endothelial cells (LSECs) function and NAFLD; NO-based therapy targeted to the liver. Pharmacol Rep PR 67:689–694. https://doi.org/10.1016/j.pharep.2015.04.010

174. Géraud C, Koch P-S, Zierow J, Klapproth K, Busch K, Olsavszky V, Leibing T, Demory A, Ulbrich F, Diett M, Singh S, Sticht C, Breitkopf-Heinlein K, Richter K, Karppinen S-M, Pihlajaniemi T, Arnold B, Rodewald H-R, Augustin HG, Schledzewski K, Goerdt S (2017) GATA4-dependent organ-specific endothelial differentiation controls liver development and embryonic hematopoiesis. J Clin Invest 127:1099–1114. https://doi.org/10.1172/JCI90086

175. de Haan W, Øie C, Benkheil M, Dheedene W, Vinckier S, Coppiello G, Aranguren XL, Beerens M, Jaekers J, Topal B, Verfaillie C, Smedsrød B, Luttun A (2020) Unraveling the transcriptional determinants of liver sinusoidal endothelial cell specialization. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 318:G803–G815. https://doi.org/10.1152/ajpgi.00215.2019

176. Gracia-Sancho J, Russo L, García-Calderó H, García-Pagán JC, García-Cardeña G, Bosch J (2011) Endothelial expression of transcription factor Kruppel-like factor 2 and its vasoprotective target genes in the normal and cirrhotic rat liver. Gut 60:517–524. https://doi.org/10.1136/gut.2010.220913

177. Shah V, Haddad FG, Garcia-Cardena G, Frangos JA, Mennone A, Groszmann RJ, Sessa WC (1997) Liver sinusoidal endothelial cells are responsible for nitric oxide modulation of resistance in the hepatic sinusoids. J Clin Invest 100:2923–2930. https://doi.org/10.1172/JCI119842

178. Bhandari S, Larsen AK, McCourt P, Smedsrød B, Sørensen KK (2021) The Scavenger Function of Liver Sinusoidal Endothelial Cells in Health and Disease. Front Physiol 12:. https://doi.org/10.3389/fphys.2021.757469

179. Braet F, Wisse E (2002) Structural and functional aspects of liver sinusoidal endothelial cell fenestrae: a review. Comp Hepatol 1:1. https://doi.org/10.1186/1476-5926-1-1

180. Poisson J, Lemoinne S, Boulanger C, Durand F, Moreau R, Valla D, Rautou P-E (2017) Liver sinusoidal endothelial cells: Physiology and role in liver diseases. J Hepatol 66:212–227. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.07.009

181. Maretti-Mira AC, Wang X, Wang L, DeLeve LD Incomplete Differentiation of Engrafted Bone Marrow... : Hepatology

182. Wang B, Shen H, Wei Y, Liu F, Yang Y, Yu H, Fu J, Cui X, Yu T, Xu Y, Liu Y, Dong H, Shen F, Zhou W, Liu H, Chen Y, Wang H (2024) Balance of Gata3 and Ramp2 in hepatocytes regulates hepatic vascular reconstitution in postoperative liver regeneration. J Hepatol 80:309–321. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2023.10.016

183. Koch P-S, Olsavszky V, Ulbrich F, Sticht C, Demory A, Leibing T, Henzler T, Meyer M, Zierow J, Schneider S, Breitkopf-Heinlein K, Gaitantzi H, Spencer-Dene B, Arnold B, Klapproth K, Schledzewski K, Goerdt S, Géraud C (2017) Angiocrine Bmp2 signaling in murine liver controls normal iron homeostasis. Blood 129:415–419. https://doi.org/10.1182/blood-2016-07-729822

184. Colucci S, Altamura S, Marques O, Dropmann A, Horvat NK, Müdder K, Hammad S, Dooley S, Muckenthaler MU (2021) Liver Sinusoidal Endothelial Cells Suppress Bone Morphogenetic Protein 2 Production in Response to TGFβ Pathway Activation. Hepatology 74:2186. https://doi.org/10.1002/hep.31900

185. McEnerney L, Duncan K, Bang B-R, Elmasry S, Li M, Miki T, Ramakrishnan SK, Shah YM, Saito T (2017) Dual modulation of human hepatic zonation via canonical and non-canonical Wnt pathways. Exp Mol Med 49:e413. https://doi.org/10.1038/emm.2017.226

186. Jungermann K, Kietzmann T (1996) Zonation of parenchymal and nonparenchymal metabolism in liver. Annu Rev Nutr 16:179–203. https://doi.org/10.1146/annurev.nu.16.070196.001143

187. Braeuning A, Ittrich C, Köhle C, Hailfinger S, Bonin M, Buchmann A, Schwarz M (2006) Differential gene expression in periportal and perivenous mouse hepatocytes. FEBS J 273:5051–5061. https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05503.x

188. Halpern KB, Shenhav R, Massalha H, Toth B, Egozi A, Massasa EE, Medgalia C, David E, Giladi A, Moor AE, Porat Z, Amit I, Itzkovitz S (2018) Paired-cell sequencing enables spatial gene expression mapping of liver endothelial cells. Nat Biotechnol 36:962–970. https://doi.org/10.1038/nbt.4231

189. Guilliams M, Bonnardel J, Haest B, Vanderborght B, Wagner C, Remmerie A, Bujko A, Martens L, Thoné T, Browaeys R, De Ponti FF, Vanneste B, Zwicker C, Svedberg FR, Vanhalewyn T, Gonçalves A, Lippens S, Devriendt B, Cox E, Ferrero G, Wittamer V, Willaert A, Kaptein SJF, Neyts J, Dallmeier K, Geldhof P, Casaert S, Deplancke B, ten Dijke P, Hoorens A, Vanlander A, Berrevoet F, Van Nieuwenhove Y, Saeys Y, Saelens W, Van Vlierberghe H, Devisscher L, Scott CL (2022) Spatial proteogenomics reveals distinct and evolutionarily conserved hepatic macrophage niches. Cell 185:379-396.e38. https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.12.018

190. Wang B, Zhao L, Fish M, Logan CY, Nusse R (2015) Self-renewing diploid Axin2(+) cells fuel homeostatic renewal of the liver. Nature 524:180–185. https://doi.org/10.1038/nature14863

191. Rocha AS, Vidal V, Mertz M, Kendall TJ, Charlet A, Okamoto H, Schedl A (2015) The Angiocrine Factor Rspondin3 Is a Key Determinant of Liver Zonation. Cell Rep 13:1757–1764. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.10.049

192. Sugimoto A, Saito Y, Wang G, Sun Q, Yin C, Lee KH, Geng Y, Rajbhandari P, Hernandez C, Steffani M, Qie J, Savage T, Goyal DM, Ray KC, Neelakantan TV, Yin D, Melms J, Lehrich BM, Yasaka TM, Liu S, Oertel M, Lan T, Guillot A, Peiseler M, Filliol A, Kanzaki H, Fujiwara N, Ravi S, Izar B, Brosch M, Hampe J, Remotti H, Argemi J, Sun Z, Kendall TJ, Hoshida Y, Tacke F, Fallowfield JA, Blockley-Powell SK, Haeusler RA, Steinman JB, Pajvani UB, Monga SP, Bataller R, Masoodi M, Arpaia N, Lee YA, Stockwell BR, Augustin HG, Schwabe RF (2025) Hepatic stellate cells control liver zonation, size and functions via R-spondin 3. Nature 640:752–761. https://doi.org/10.1038/s41586-025-08677-w

193. Benhamouche S, Decaens T, Godard C, Chambrey R, Rickman DS, Moinard C, Vasseur-Cognet M, Kuo CJ, Kahn A, Perret C, Colnot S (2006) Apc tumor suppressor gene is the "zonation-keeper" of mouse liver. Dev Cell 10:759–770. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.03.015

194. Ma R, Martínez-Ramírez AS, Borders TL, Gao F, Sosa-Pineda B (2020) Metabolic and non-metabolic liver zonation is established non-synchronously and requires sinusoidal Wnts. eLife 9:e46206. https://doi.org/10.7554/eLife.46206

195. Cadoret A, Ovejero C, Terris B, Souil E, Lévy L, Lamers WH, Kitajewski J, Kahn A, Perret C (2002) New targets of beta-catenin signaling in the liver are involved in the glutamine metabolism. Oncogene 21:8293–8301. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206118

196. Sekine S, Lan BY-A, Bedolli M, Feng S, Hebrok M (2006) Liver-specific loss of beta-catenin blocks glutamine synthesis pathway activity and cytochrome p450 expression in mice. Hepatol Baltim Md 43:817–825. https://doi.org/10.1002/hep.21131

197. Colnot S, Perret C (2011) Liver Zonation. In: Monga SPS (ed) Molecular Pathology of Liver Diseases. Springer US, Boston, MA, pp 7–16

198. Hu S, Liu S, Bian Y, Poddar M, Singh S, Cao C, McGaughey J, Bell A, Blazer LL, Adams JJ, Sidhu SS, Angers S, Monga SP (2022) Single-cell spatial transcriptomics reveals a dynamic control of metabolic zonation and liver regeneration by endothelial cell Wnt2 and Wnt9b. Cell Rep Med 3:100754. https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2022.100754

199. Cheng X, Kim SY, Okamoto H, Xin Y, Yancopoulos GD, Murphy AJ, Gromada J (2018) Glucagon contributes to liver zonation. Proc Natl Acad Sci 115:E4111–E4119. https://doi.org/10.1073/pnas.1721403115

200. Sekine S, Ogawa R, Mcmanus MT, Kanai Y, Hebrok M (2009) Dicer is required for proper liver zonation. J Pathol 219:365–372. https://doi.org/10.1002/path.2606

201. Stanulović VS, Kyrmizi I, Kruithof-de Julio M, Hoogenkamp M, Vermeulen JLM, Ruijter JM, Talianidis I, Hakvoort TBM, Lamers WH (2007) Hepatic HNF4α deficiency induces periportal expression of glutamine synthetase and other pericentral enzymes. Hepatology 45:433–444. https://doi.org/10.1002/hep.21456

202. Paris J, Henderson NC (2022) Liver zonation, revisited. Hepatol Baltim Md 76:1219–1230. https://doi.org/10.1002/hep.32408

203. Cunningham RP, Porat-Shliom N (2021) Liver Zonation – Revisiting Old Questions With New Technologies. Front Physiol 12:. https://doi.org/10.3389/fphys.2021.732929

204. Kietzmann T (2017) Metabolic zonation of the liver: The oxygen gradient revisited. Redox Biol 11:622–630. https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.01.012

205. Hijmans BS, Grefhorst A, Oosterveer MH, Groen AK (2014) Zonation of glucose and fatty acid metabolism in the liver: mechanism and metabolic consequences. Biochimie 96:121–129. https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.06.007

206. Xu B, Broome U, Uzunel M, Nava S, Ge X, Kumagai-Braesch M, Hultenby K, Christensson B, Ericzon B-G, Holgersson J, Sumitran-Holgersson S (2003) Capillarization of Hepatic Sinusoid by Liver Endothelial Cell-Reactive Autoantibodies in Patients with Cirrhosis and Chronic Hepatitis. Am J Pathol 163:1275–1289. https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63487-6

207. Miyao M, Kotani H, Ishida T, Kawai C, Manabe S, Abiru H, Tamaki K (2015) Pivotal role of liver sinusoidal endothelial cells in NAFLD/NASH progression. Lab Investig J Tech Methods Pathol 95:1130–1144. https://doi.org/10.1038/labinvest.2015.95

208. Rautou P-E, Chotkoe S, Biquard L, Wettstein G, Van der Graaff D, Liu Y, De Man J, Casteleyn C, Thys S, De Vos WH, Bedossa P, Cooreman MP, Baudin M, Abitbol J-L,

Huot-Marchand P, Dzen L, Albuquerque M, Broqua P, Junien J-L, Vonghia L, Abdelmalek MF, Kwanten WJ, Paradis V, Francque SM (2025) Altered liver sinusoidal endothelial cells in MASLD and their evolution following lanifibranor treatment. JHEP Rep 101366. https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2025.101366

209. DeLeve LD (2015) Liver Sinusoidal Endothelial Cells in Hepatic Fibrosis. Hepatol Baltim Md 61:1740–1746. https://doi.org/10.1002/hep.27376

210. Hammoutene A, Rautou P-E (2019) Role of liver sinusoidal endothelial cells in non-alcoholic fatty liver disease. J Hepatol 70:1278–1291. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.02.012

211. Wen Y, Lambrecht J, Ju C, Tacke F (2021) Hepatic macrophages in liver homeostasis and diseases-diversity, plasticity and therapeutic opportunities. Cell Mol Immunol 18:45–56. https://doi.org/10.1038/s41423-020-00558-8

212. Shetty S, Lalor PF, Adams DH (2018) Liver sinusoidal endothelial cells — gatekeepers of hepatic immunity. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 15:555–567. https://doi.org/10.1038/s41575-018-0020-y

213. Deleve LD, Wang X, Guo Y (2008) Sinusoidal endothelial cells prevent rat stellate cell activation and promote reversion to quiescence. Hepatol Baltim Md 48:920–930. https://doi.org/10.1002/hep.22351

214. Roehlen N, Crouchet E, Baumert TF (2020) Liver Fibrosis: Mechanistic Concepts and Therapeutic Perspectives. Cells 9:875. https://doi.org/10.3390/cells9040875

215. Mederacke I, Hsu CC, Troeger JS, Huebener P, Mu X, Dapito DH, Pradere J-P, Schwabe RF (2013) Fate tracing reveals hepatic stellate cells as dominant contributors to liver fibrosis independent of its aetiology. Nat Commun 4:2823. https://doi.org/10.1038/ncomms3823

216. Wilkinson AL, Qurashi M, Shetty S (2020) The Role of Sinusoidal Endothelial Cells in the Axis of Inflammation and Cancer Within the Liver. Front Physiol 11:. https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00990

217. McConnell MJ, Kostallari E, Ibrahim SH, Iwakiri Y (2023) The Evolving Role of Liver Sinusoidal Endothelial Cells in Liver Health and Disease. Hepatol Baltim Md 78:649–669. https://doi.org/10.1097/HEP.0000000000000207

218. Connolly MK, Bedrosian AS, Malhotra A, Henning JR, Ibrahim J, Vera V, Cieza-Rubio NE, Hassan BU, Pachter HL, Cohen S, Frey AB, Miller G (2010) In Hepatic Fibrosis, Liver Sinusoidal Endothelial Cells Acquire Enhanced Immunogenicity. J Immunol Baltim Md 1950 185:2200–2208. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000332

219. Schmucker DL (2005) Age-related changes in liver structure and function: Implications for disease ? Exp Gerontol 40:650–659. https://doi.org/10.1016/j.exger.2005.06.009

220. Lin Y, Li Y, Liang G, Yang X, Yang J, Hu Q, Sun J, Zhang C, Fang H, Liu A (2024) Single-cell transcriptome analysis of aging mouse liver. FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol 38:e23473. https://doi.org/10.1096/fj.202302282R

221. Sastre J, Pallardó FV, Plá R, Pellín A, Juan G, O'Connor JE, Estrela JM, Miquel J, Viña J (1996) Aging of the Liver: Age–Associated Mitochondrial Damage in Intact Hepatocytes. Hepatology 24:1199. https://doi.org/10.1002/hep.510240536

222. Almanzar N, Antony J, Baghel AS, Bakerman I, Bansal I, Barres BA, Beachy PA, Berdnik D, Bilen B, Brownfield D, Cain C, Chan CKF, Chen MB, Clarke MF, Conley SD, Darmanis S, Demers A, Demir K, de Morree A, Divita T, du Bois H, Ebadi H, Espinoza FH, Fish M, Gan Q, George BM, Gillich A, Gòmez-Sjöberg R, Green F, Genetiano G, Gu X, Gulati GS, Hahn O, Haney MS, Hang Y, Harris L, He M, Hosseinzadeh S, Huang A, Huang KC, Iram T, Isobe T, Ives F, Jones RC, Kao KS, Karkanias J, Karnam G, Keller A, Kershner AM, Khoury N, Kim SK, Kiss BM, Kong W, Krasnow MA, Kumar ME, Kuo CS, Lam J, Lee DP, Lee SE, Lehallier B, Leventhal O, Li G, Li Q, Liu L, Lo A, Lu W-J, Lugo-Fagundo MF, Manjunath A, May AP, Maynard A, McGeever A, McKay M, McNerney MW, Merrill B, Metzger RJ, Mignardi M, Min D, Nabhan AN, Neff NF, Ng KM, Nguyen PK, Noh J, Nusse R, Pálovics R, Patkar R, Peng WC, Penland L, Pisco AO, Pollard K, Puccinelli R, Qi Z, Quake SR, Rando TA, Rulifson EJ, Schaum N, Segal JM, Sikandar SS, Sinha R, Sit RV, Sonnenburg J, Staehli D, Szade K, Tan M, Tan W, Tato C, Tellez K, Dulgeroff LBT, Travaglini KJ, Tropini C, Tsui M, Waldburger L, Wang BM, van Weele LJ, Weinberg K, Weissman IL, Wosczyna MN, Wu SM, Wyss-Coray T, Xiang J, Xue S, Yamauchi KA, Yang AC, Yerra LP, Youngyunpipatkul J, Yu B, Zanini F, Zardeneta ME, Zee A, Zhao C, Zhang F, Zhang H, Zhang MJ, Zhou L, Zou J, The Tabula Muris Consortium (2020) A single-cell transcriptomic atlas characterizes ageing tissues in the mouse. Nature 583:590–595. https://doi.org/10.1038/s41586-020-2496-1

223. Desroches-Castan A, Tillet E, Ricard N, Ouarné M, Mallet C, Belmudes L, Couté Y, Boillot O, Scoazec J-Y, Bailly S, Feige J-J (2019) Bone Morphogenetic Protein 9 Is a Paracrine Factor Controlling Liver Sinusoidal Endothelial Cell Fenestration and Protecting Against Hepatic Fibrosis. Hepatology 70:1392. https://doi.org/10.1002/hep.30655

224. Gómez-Salinero JM, Izzo F, Lin Y, Houghton S, Itkin T, Geng F, Bram Y, Adelson RP, Lu TM, Inghirami GGa, Xiang JZ, Lis R, Redmond D, Schreiner R, Rabbany SY, Landau DA, Schwartz RE, Rafii S (2022) Specification of fetal liver endothelial progenitors to functional zonated adult sinusoids requires c-Maf induction. Cell Stem Cell 29:593-609.e7. https://doi.org/10.1016/j.stem.2022.03.002

225. Desroches-Castan A, Koca D, Liu H, Roelants C, Resmini L, Ricard N, Bouvard C, Chaumontel N, Tharaux P-L, Tillet E, Battail C, Lenoir O, Bailly S (2024) BMP9 is a key player in endothelial identity and its loss is sufficient to induce arteriovenous malformations. Cardiovasc Res 120:782–795. https://doi.org/10.1093/cvr/cvae052

226. Schmid CD, Olsavszky V, Reinhart M, Weyer V, Trogisch FA, Sticht C, Winkler M, Kürschner SW, Hoffmann J, Ola R, Staniczek T, Heineke J, Straub BK, Mittler J, Schledzewski K, ten Dijke P, Richter K, Dooley S, Géraud C, Goerdt S, Koch P (2023)

ALK1 controls hepatic vessel formation, angiodiversity, and angiocrine functions in hereditary hemorrhagic telangiectasia of the liver. Hepatol Baltim Md 77:1211–1227. https://doi.org/10.1002/hep.32641

227. Zhao D, Huang Z, Li X, Wang H, Hou Q, Wang Y, Yan F, Yang W, Liu D, Yi S, Han C, Hao Y, Tang L (2024) BMP9 and BMP10 coordinate liver cellular crosstalk to maintain liver health. eLife 13:. https://doi.org/10.7554/eLife.95811.2

228. Baliou S, Adamaki M, Ioannou P, Pappa A, Panayiotidis MI, Spandidos DA, Christodoulou I, Kyriakopoulos AM, Zoumpourlis V (2021) Protective role of taurine against oxidative stress (Review). Mol Med Rep 24:1–19. https://doi.org/10.3892/mmr.2021.12242

229. Miyazaki T, Karube M, Matsuzaki Y, Ikegami T, Doy M, Tanaka N, Bouscarel B (2005) Taurine inhibits oxidative damage and prevents fibrosis in carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis. J Hepatol 43:117–125. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2005.01.033

230. Al Tabosh T, Liu H, Koça D, Al Tarrass M, Tu L, Giraud S, Delagrange L, Beaudoin M, Rivière S, Grobost V, Rondeau-Lutz M, Dupuis O, Ricard N, Tillet E, Machillot P, Salomon A, Picart C, Battail C, Dupuis-Girod S, Guignabert C, Desroches-Castan A, Bailly S (2024) Impact of heterozygous ALK1 mutations on the transcriptomic response to BMP9 and BMP10 in endothelial cells from hereditary hemorrhagic telangiectasia and pulmonary arterial hypertension donors. Angiogenesis 27:211–227. https://doi.org/10.1007/s10456-023-09902-8

231. Jia G, Aroor AR, Jia C, Sowers JR (2019) Endothelial cell senescence in aging-related vascular dysfunction. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis 1865:1802–1809. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.08.008

232. Schafer MJ, Zhang X, Kumar A, Atkinson EJ, Zhu Y, Jachim S, Mazula DL, Brown AK, Berning M, Aversa Z, Kotajarvi B, Bruce CJ, Greason KL, Suri RM, Tracy RP, Cummings SR, White TA, LeBrasseur NK The senescence-associated secretome as an indicator of age and medical risk. JCI Insight 5:e133668. https://doi.org/10.1172/jci.insight.133668

233. Desroches-Castan A, Tillet E, Ricard N, Ouarné M, Mallet C, Feige J-J, Bailly S (2019) Differential Consequences of Bmp9 Deletion on Sinusoidal Endothelial Cell Differentiation and Liver Fibrosis in 129/Ola and C57BL/6 Mice. Cells 8:1079. https://doi.org/10.3390/cells8091079

234. Herrnberger L, Hennig R, Kremer W, Hellerbrand C, Goepferich A, Kalbitzer HR, Tamm ER (2014) Formation of Fenestrae in Murine Liver Sinusoids Depends on Plasmalemma Vesicle-Associated Protein and Is Required for Lipoprotein Passage. PLOS ONE 9:e115005. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115005

235. Yokomori H, Ando W, Oda M (2021) Plasmalemmal Vesicle-Associated Protein Is Associated with Endothelial Cells Sprouting from the Peribiliary Capillary Plexus in Human Cirrhotic Liver. J Vasc Res 58:361–369. https://doi.org/10.1159/000516923

236. Wilkinson AL, Hulme S, Kennedy JI, Mann ER, Horn P, Shepherd EL, Yin K, Zaki MYW, Hardisty G, Lu W-Y, Rantakari P, Adams DH, Salmi M, Hoare M, Patten DA, Shetty S (2023) The senescent secretome drives PLVAP expression in cultured human hepatic endothelial cells to promote monocyte transmigration. iScience 26:107966. https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.107966

237. Larrivée B, Prahst C, Gordon E, del Toro R, Mathivet T, Duarte A, Simons M, Eichmann A (2012) ALK1 Signaling Inhibits Angiogenesis by Cooperating with the Notch Pathway. Dev Cell 22:489–500. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2012.02.005

238. Anzell AR, Kunz AB, Donovan JP, Tran TG, Lu X, Young S, Roman BL (2024) Blood flow regulates acvrl1 transcription via ligand-dependent Alk1 activity. Angiogenesis 27:501–522. https://doi.org/10.1007/s10456-024-09924-w

239. Cruzat V, Macedo Rogero M, Noel Keane K, Curi R, Newsholme P (2018) Glutamine: Metabolism and Immune Function, Supplementation and Clinical Translation. Nutrients 10:1564. https://doi.org/10.3390/nu10111564

240. Drapé E, Carrier L, Cagnone G, Walali HDT, Bizou M, Vliet PPV, Andelfinger G, Larrivée B, Dubrac A (2025) Loss of endothelial ALK1 signaling induces the emergence of a KIT+ angiogenic endothelial cluster driving brain arteriovenous malformations. 2025.06.05.657957

241. Park H, Furtado J, Poulet M, Chung M, Yun S, Lee S, Sessa WC, Franco CA, Schwartz MA, Eichmann A (2021) Defective flow-migration coupling causes arteriovenous malformations in hereditary hemorrhagic telangiectasia. Circulation 144:805–822. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.120.053047

242. Flister MJ, Wilber A, Hall KL, Iwata C, Miyazono K, Nisato RE, Pepper MS, Zawieja DC, Ran S (2010) Inflammation induces lymphangiogenesis through up-regulation of VEGFR-3 mediated by NF-kappaB and Prox1. Blood 115:418–429. https://doi.org/10.1182/blood-2008-12-196840