



**HAL**  
open science

# Étude du BMP-9 et du PlGF dans la physiopathologie du syndrome hépatopulmonaire : À la recherche de cibles thérapeutiques

Fabien Robert

► **To cite this version:**

Fabien Robert. Étude du BMP-9 et du PlGF dans la physiopathologie du syndrome hépatopulmonaire : À la recherche de cibles thérapeutiques. Cardiologie et système cardiovasculaire. Université Paris-Saclay, 2024. Français. NNT : 2024UPASQ054 . tel-04906518

**HAL Id: tel-04906518**

**<https://theses.hal.science/tel-04906518v1>**

Submitted on 22 Jan 2025

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

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

# Étude du BMP-9 et du PIGF dans la physiopathologie du syndrome hépatopulmonaire : À la recherche de cibles thérapeutiques

*Investigation of BMP-9 and PIGF in the pathophysiology of  
hepatopulmonary syndrome : Exploring novel therapeutic targets*

## Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°569, Innovation Thérapeutique : du Fondamental à l'Appliqué (ITFA)  
Spécialité de doctorat : Physiologie, Physiopathologie  
Graduate School : Santé et Médicaments. Référent : Faculté de Pharmacie

Thèse préparée dans l'unité de recherche  
**Hypertension Pulmonaire : Physiopathologie et Innovation Thérapeutique  
(Université Paris-Saclay, Inserm),**  
sous la direction de **Laurent SAVALE**, Professeur des Universités – Praticien Hospitalier,  
et la co-direction de **Ly TU**, Ingénieur de Recherche.

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 25 Novembre 2024, par

**Fabien ROBERT**

## Composition du Jury

Membres du jury avec voix délibérative

### Marc HUMBERT

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier  
Université Paris-Saclay

Président

### Carole PLANES

Professeure des Universités – Praticienne Hospitalière  
Université Sorbonne Paris Nord

Rapporteur & Examinatrice

### Pierre-Emmanuel RAUTOU

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier  
Université Paris Cité

Rapporteur & Examineur

### Catherine GUETTIER

Professeure des Universités – Praticienne Hospitalière  
Université Paris Saclay

Examinatrice

### Nicolas RICARD

Chargé de Recherche  
Université Grenoble Alpes

Examineur

**Titre :** Étude du BMP-9 et du PIGF dans la physiopathologie du syndrome hépatopulmonaire :  
À la recherche de cibles thérapeutiques.

**Mots clés :** Syndrome hépatopulmonaire ; Hypertension portale ; Hypertension portopulmonaire ;  
Dysfonction endothéliale ; Cirrhose ; Innovation thérapeutique

**Résumé :** Le syndrome hépatopulmonaire (SHP) est une complication pulmonaire sévère provoquée par différentes maladies du foie. Il se caractérise par une prolifération et une dilatation anormale des petits vaisseaux sanguins dans les poumons, ce qui réduit l'oxygénation du sang. Actuellement, la transplantation hépatique est la seule solution pour traiter cette maladie. Il est essentiel de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans le développement et l'aggravation du SHP pour développer des traitements plus efficaces. Dans le cadre de cette thèse, nous avons exploré deux cibles thérapeutiques prometteuses. La première est le BMP-9, dont la perte est indispensable dans le développement de la pathologie. La deuxième est le PIGF, dont la surproduction en cas de cirrhose aggrave les défauts d'oxygénation du sang. Ces deux nouvelles pistes pourraient permettre de mettre au point des traitements plus ciblés pour le SHP.

**Title :** Investigation of BMP-9 and PIGF in the pathophysiology of hepatopulmonary syndrome :  
Exploring novel therapeutic targets.

**Keywords :** Hepatopulmonary syndrome ; Portal hypertension ; Portopulmonary hypertension ;  
Endothelial dysfunction ; Cirrhosis ; Therapeutic innovation

**Summary :** Hepatopulmonary syndrome (HPS) is a severe pulmonary complication caused by liver diseases. It is characterized by abnormal proliferation and dilation of the small blood vessels in the lungs, leading to reduced blood oxygenation. Currently, liver transplantation is the only available treatment for this condition. Understanding the mechanisms involved in both the development and progression of HPS is crucial for developing more effective treatments. During this PhD, we explored two promising therapeutic targets. The first is BMP-9, a protein whose loss is necessary for the development of the disease. The second is PIGF, a protein that increases specifically in the context of cirrhosis and can worsen blood oxygenation issues. These new avenues could lead to the development of more targeted treatments for HPS.

# TABLE DES MATIÈRES

---

<b>TABLE DES MATIÈRES</b> .....	<b>1</b>
<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>4</b>
<b>ABBRÉVIATIONS</b> .....	<b>8</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>9</b>
<b>LISTE DES TRAVAUX DE THÈSE</b> .....	<b>10</b>
<b>REVUE GÉNÉRALE SUR LE SYNDROME HEPATOPULMONAIRE</b> .....	<b>13</b>
1. Définition du Syndrome Hépatopulmonaire .....	14
2. Approche diagnostique.....	15
a) Les hépatopathies, premières responsables.....	15
b) Exploration des dilatations vasculaires pulmonaires .....	16
c) L'hypoxémie, conséquence des anomalies vasculaires pulmonaires .....	18
3. Epidémiologie .....	21
4. Mécanismes physiopathologiques .....	22
a) Le seul modèle <i>in vivo</i> validé pour l'étude du SHP .....	23
b) Les mécanismes vasodilatateurs.....	24
c) Perturbation de la balance pro- et anti-angiogénique .....	25
d) Inflammation pulmonaire.....	26
e) Altération de l'épithélium alvéolaire pulmonaire.....	27
5. Recherche translationnelle : des données animales à l'Homme.....	28
6. La transplantation hépatique : dernier recours et seul espoir .....	30
7. L'Hypertension Portopulmonaire : Une autre complication de l'hypertension portale.....	32
8. Perspectives futures et directions de recherche .....	34
<b>CHAPITRE 1. BMP-9, LE ROLE DETERMINANT DE SA PERTE</b> .....	<b>35</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>36</b>
1. La famille des BMP .....	36

2. Le BMP-9, garant de l'intégrité vasculaire pulmonaire.....	39
a) Mécanismes impliqués dans le contrôle du tonus vasculaire .....	39
b) BMP-9, régulateur négatif de l'angiogénèse.....	39
c) BMP-9, un rôle dans l'inflammation pulmonaire ? .....	40
3. Implication du BMP-9 dans d'autres maladies vasculaires .....	40
a) Maladie de Rendu-Osler .....	41
b) Hypertension artérielle pulmonaire idiopathique et héritable.....	41
c) Phénotype des rongeurs déficients en BMP-9 : un paradoxe à élucider ?.....	43
4. Dérégulation du BMP-9 dans les hépatopathies chroniques .....	43
5. BMP-9 circulant chez les patients ayant un syndrome hépatopulmonaire et/ou une hypertension portopulmonaire .....	44
6. Plan du projet .....	46

**ARTICLE : DISRUPTED BMP-9 SIGNALING IMPAIRS PULMONARY VASCULAR INTEGRITY IN HEPATOPULMONARY SYNDROME .....48**

**DISCUSSION.....84**

1. Un nouveau modèle préclinique pour l'étude du SHP.....	85
2. Perte du BMP-9 dans le SHP : données convergentes des modèles animaux.....	87
3. Le FK506 en traitement curatif : un activateur puissant de la voie du BMP-9 .....	88
4. Taux circulant de BMP-9 chez les patients atteints de syndrome hépatopulmonaire et/ou d'hypertension portopulmonaire .....	90
5. Modulation du BMP-9 dans les modèles animaux d'hypertension pulmonaire .....	91
6. Décrypter le lien entre la perte de facteurs dérivés du foie et la dilatation du lit capillaire pulmonaire .....	93
a) L'opération de Glenn : le premier jalon dans le traitement de ces patients.....	95
b) Dernière étape de la correction chirurgicale : l'opération de Fontan.....	96
c) Anastomose cavo-pulmonaire unidirectionnelle gauche.....	96
7. Le BMP-10 en perspective .....	97

**CONCLUSION.....98**

<b>CHAPITRE 2 : RÔLE DU PIGF DANS LE DÉVELOPPEMENT DU SYNDROME HÉPATOPULMONAIRE.....</b>	<b>99</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>100</b>
1. La grande famille du VEGF.....	100
2. Le VEGF-A, le ligand le plus connu et étudié de sa famille.....	102
3. Le PIGF, une cible de choix dans le traitement du syndrome hépatopulmonaire ?.....	102
4. Plan du projet .....	103
<b>ARTICLE : PLACENTAL GROWTH FACTOR MODULATES ENDOTHELIAL NITRIC OXIDE PRODUCTION AND EXACERBATES EXPERIMENTAL HEPATOPULMONARY SYNDROME .....</b>	<b>105</b>
<b>DISCUSSION.....</b>	<b>142</b>
1. Effet protecteur de la déficience en PIGF dans le SHP associé à une cirrhose.....	143
2. Élévation du PIGF dans la cirrhose : un rôle délétère sur le foie ? .....	144
3. Absence d'implication du PIGF dans le SHP associé à une hypertension portale sans cirrhose .....	145
4. Taux circulant de PIGF chez les patients ayant la coexistence d'un SHP avec une HTPoP.....	146
5. Perte du PIGF dans le développement de la prééclampsie .....	147
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>149</b>
<b>CONCLUSION GÉNÉRALE DES TRAVAUX DE THÈSE.....</b>	<b>150</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>153</b>
<b>RÉFÉRENCES .....</b>	<b>159</b>

## REMERCIEMENTS

---

À l'**ensemble des membres du jury**, merci d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse. Je remercie particulièrement le **Professeur Marc Humbert** pour l'honneur de présider ce jury, ainsi que le **Professeur Carole Planes** et le **Professeur Pierre-Emmanuel Rautou** pour leur investissement en tant que rapporteurs. Je souhaite également remercier chaleureusement le Professeur Pierre-Emmanuel Rautou pour ses précieux conseils et pour nos échanges enrichissants sur mon postdoctorat. Mes sincères remerciements vont aussi au **Professeur Catherine Guettier** et au **Docteur Nicolas Ricard** pour leur participation en qualité d'examineurs. Leurs conseils avisés et leurs contributions lors des comités de suivi de thèse ont été essentiels à l'aboutissement de ce travail.

Au **Professeur Laurent Savale** et au **Docteur Ly Tu**, merci pour avoir encadré cette thèse et m'avoir accompagné durant ces trois années. Votre bienveillance, votre aide, ainsi que nos discussions scientifiques et techniques ont été précieuses. Merci de m'avoir fait confiance pour approfondir mes idées et de m'avoir permis de participer à d'autres projets. J'espère que nous continuerons à collaborer dans ma future carrière. Votre soutien inestimable a rendu cette expérience de thèse enrichissante tant sur le plan scientifique qu'humain.

Au directeur de l'équipe 1 « Dysfonction endothéliale », le **Docteur Christophe Guignabert**, merci pour tous tes conseils précieux. Je te suis profondément reconnaissant pour la rigueur scientifique que tu m'as transmise, ainsi que pour ta vision claire et ta franchise qui ont été essentielles pour orienter mes recherches et mon parcours professionnel.

À **tous les membres de l'équipe du laboratoire**, qu'ils soient actuels ou passés, merci pour les moments incroyables pendant ces trois années, tant au laboratoire qu'en dehors. Je vous remercie également pour votre aide dans la réalisation de cette thèse, qui n'aurait pas pu voir le jour sans votre soutien et vos compétences. Merci à **Vanessa, Marie-Camille, Fériel, Mustapha, Mina, Raphaël, Athénaïs, My Ngoc, Maxime, Alessandra, Marie-Caroline, Aye, Corinne, Antoine, Audrey** et **Stécy**.

Aux **différents services cliniques**, merci de votre implication dans ces projets qui ont permis de constituer et d'analyser les différentes cohortes. Je remercie particulièrement le **Professeur Olivier Sitbon** du service de pneumologie et soins intensifs respiratoires, les **Professeurs Emmanuel Gonzales et Emmanuel Jacquemin** du service d'hépatogastro-entérologie pédiatrique, le **Docteur Valérie Furlan** du service de pharmacologie-toxicologie, ainsi que le **Professeur Céline Verstuyft** du centre de ressource biologique de l'Hôpital Bicêtre. Je tiens également à exprimer ma gratitude au **Professeur Audrey Coilly** du centre hépato-biliaire de l'Hôpital Paul-Brousse.

À l'**équipe CEA "Famille BMP dans l'angiogenèse et la lymphangiogenèse" de Grenoble**, je tiens à vous remercier pour votre aide et vos précieux conseils tout au long de mes 3 années de thèse. Je remercie tout spécialement le **Docteur Sabine Bailly**, le **Docteur Nicolas Ricard** et le **Docteur Agnès Desroches-Castan**.

À la **Fondation du Souffle**, merci d'avoir financé ma thèse et d'avoir permis la réalisation de ces beaux projets.

Aux différentes **plateformes de zootechnie**, merci pour leur aide, leur encadrement et leurs conseils pour la réalisation des différentes expériences in vivo.



À l'équipe **CEA/INSERM** où j'ai réalisé mon stage de **Master 2**, merci de votre confiance et de m'avoir permis de débiter ma carrière à vos côtés. Je tiens particulièrement à remercier le **Docteur Karine Sii-Felice** et **Camille** pour tous ces précieux moments partagés. Merci également à Karine pour avoir encadré ma thèse de doctorat en Pharmacie d'une main de maître.

À **Juan Mantilla**, gracias por estar siempre a mi lado durante esta tesis. Gracias por tu apoyo incondicional, por estar conmigo en los buenos y malos momentos, y por siempre encontrar las palabras y los gestos justos para motivarme. Gracias por hacer que cada día sea especial. Eres mi mayor apoyo y mi inspiración.

À **ma famille** et **ma belle-famille**, merci pour votre amour inconditionnel. En particulier, je remercie profondément **mes parents**, dont le soutien et l'encouragement m'ont été d'un précieux réconfort. Merci également aux deux médecins de la famille, **mon frère et ma belle-soeur**, pour nos passionnantes conversations médicales.

À **mes amis d'enfance**, bien au chaud dans le Sud de la France, merci pour tous ces moments incroyables depuis mon enfance et pour tous ces souvenirs inoubliables que nous construisons depuis tant d'années. Merci à **Florian, Sophie, Mélissa, Lou, Lou, Ingrid, Franck, Lilian, Alexandre, Rémy, Arnaud, Kévin, Alexis** et **Cynad**.

A **todos mis amigos latinoamericanos**, gracias por las fiestas, los bailes, la deliciosa comida venezolana, las conversaciones, los juegos de mesa y mucho más: **Matthieu** (sí, fuiste el primer latino en el que pensé), **Oriana, Nelson** el guitarrista número 1, **Eu, Carla, Léah** (y, por supuesto, mis adorados **Cristobal** y **Leandro**), **Nelson** el guitarrista número 2, **Darvis, Nadia, Remi** y todos los pequeños de la familia **Miguel-Andres, Gabriela** y **María-Angela** (que ya lo sabe todo sobre mi tema de tesis tras su paso por el laboratorio), **Sharon, Victor, Moriely, Gaby, Naty, Pedro, Maibe...** ¡y espero no olvidar a nadie! ¡Gracias, amigos!

À **mes proches**, dont l'amour et les souvenirs m'accompagnent chaque jour.

Merci.

## ABBREVIATIONS

---

<b>A-aO<sub>2</sub></b>	Différence alvéolo-artérielle en oxygène
<b>BMP</b>	<i>Bone morphogenetic proteins</i>
<b>eNOS</b>	NO synthase endothéliale
<b>ET-1</b>	Endothéline-1
<b>HO-1</b>	Hème oxygénase-1
<b>HTAP</b>	Hypertension artérielle pulmonaire
<b>HTPoP</b>	Hypertension portopulmonaire
<b>iNOS</b>	NO synthase inductible
<b>LPVP</b>	Ligature partielle de la veine porte
<b>LVB</b>	Ligature de la voie biliaire principale
<b>MAV</b>	Malformation artério-veineuses
<b>NO</b>	Monoxyde d'azote – <i>Nitric oxide</i>
<b>PaCO<sub>2</sub></b>	Pression partielle artérielle en dioxyde de carbone
<b>PaO<sub>2</sub></b>	Pression partielle artérielle en oxygène
<b>PIGF</b>	<i>Placental growth factor</i>
<b>SHP</b>	Syndrome hépatopulmonaire
<b>VEGF</b>	<i>Vascular endothelial growth factor</i>

## LISTE DES FIGURES

---

<b>Figure 1.</b> Echographie cardiaque avec épreuve de contraste chez un patient souffrant de syndrome hépatopulmonaire. ....	<b>17</b>
<b>Figure 2.</b> Mécanismes responsables de l'altération des échanges gazeux. ....	<b>20</b>
<b>Figure 3.</b> Mécanismes physiopathologiques du syndrome hépatopulmonaire.....	<b>22</b>
<b>Figure 4.</b> Examens d'imageries chez des patients souffrant de SHP. ....	<b>28</b>
<b>Figure 5.</b> Coupe histologique d'artères pulmonaires humaines. ....	<b>33</b>
<b>Figure 6.</b> Synthèse des BMP. ....	<b>37</b>
<b>Figure 7.</b> Voie de signalisation de l'axe BMP-9/BMPR-II/ALK1/Endogline.....	<b>38</b>
<b>Figure 8.</b> Mutations dans l'axe BMP-9/BMPR-II/ALK1/Endogline. ....	<b>42</b>
<b>Figure 9.</b> Intervention de Glenn et de Fontan chez les enfants avec hypoplasie du coeur gauche.....	<b>94</b>
<b>Figure 10.</b> Illustration des différents membres de la famille du VEGF. ....	<b>101</b>
<b>Figure 11.</b> Taux circulant de PIGF chez les patients cirrhotiques sans maladies vasculaires, ayant uniquement un SHP ou un SHP + une HTPoP. ....	<b>147</b>

# LISTE DES TRAVAUX DE THÈSE

---

## ARTICLES DE RECHERCHE

### Chapitre 1.

#### ● **Disrupted BMP-9 Signaling Impairs Pulmonary Vascular Integrity in Hepatopulmonary Syndrome**

**Auteurs:** **Fabien Robert**, Marie-Caroline Certain, Audrey Baron, Raphaël Thuillet, Léa Duhaut, Mina Ottaviani, Mustapha Kamel Chelgham, Corinne Normand, Nihel Berrebeh, Nicolas Ricard, Valerie Furlan, Agnès Desroches-Castan, Emmanuel Gonzales, Emmanuel Jacquemin, Olivier Sitbon, Marc Humbert, Sabine Bailly, Audrey Coilly, Christophe Guignabert, Ly Tu, Laurent Savale

**Publié** en Avril 2024, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*

**DOI:** 10.1164/rccm.202307-1289OC

### Chapitre 2.

#### ● **Placental Growth Factor Modulates Endothelial Nitric Oxide Production and Exacerbates Experimental Hepatopulmonary Syndrome**

**Auteurs:** **Fabien Robert**, Feriel Benchenouf, My Ngoc Ha, Alessandra Cuomo, Mina Ottaviani, Maxime Surbier, Raphaël Thuillet, Corinne Normand, Florent Dumont, Céline Verstuyft, Frederic Fiore, Frederic Guinut, Marc Humbert, Audrey Coilly, Emmanuel Gonzales, Olivier Sitbon, Ly Tu, Christophe Guignabert, Laurent Savale

**Accepté** en Novembre 2024 dans *JHEP Reports*

## REVUES

### • **Hepatopulmonary Syndrome**

**Auteurs:** Alexandre Sayadi, Léa Duhaut, **Fabien Robert**, Laurent Savale, Audrey Coilly  
**Publié** en Mars 2024, *La Revue de Médecine Interne*  
**DOI:** 10.1016/j.revmed.2023.03.008

### • **Hepatopulmonary Syndrome : a Liver-Induced Oxygenation Defect**

**Auteurs:** Laurent Savale, **Fabien Robert**, Ly Tu, Marie-Caroline Certain, Audrey Baron, Audrey Coilly, Léa Duhaut, Marc Humbert, Christophe Guignabert, Olivier Sitbon  
**Publié** en Juin 2023, *Rare Diseases of the Respiratory System – ERS Monograph*  
**DOI:** 10.1183/2312508X.10006023

### • **Dysfunction of Endothelial BMP-9 Signaling in Pulmonary Vascular Disease**

**Auteurs:** **Fabien Robert**, Nihel Berrebeh, Christophe Guignabert, Marc Humbert, Sabine Bailly, Ly Tu, Laurent Savale  
**Publié** en Mars 2023, *Revue des Maladies Respiratoires*  
**DOI:** 10.1016/j.rmr.2023.01.017

### • **Hepatopulmonary Syndrome : Prevalence, Pathophysiology and Clinical Implications**

**Auteurs:** Marie-Caroline Certain, **Fabien Robert**, Audrey Baron, Olivier Sitbon, Marc Humbert, Christophe Guignabert, Ly Tu, Laurent Savale  
**Publié** en Février 2022, *Revue des Maladies Respiratoires*  
**DOI:** 10.1016/j.rmr.2022.02.055

## **AUTRES COLLABORATIONS**

### **• Bone Morphogenetic Protein-9 Controls Pulmonary Vascular Growth and Remodeling**

**Auteurs:** Nihel Berrebeh, Yvon Mbouamboua, Raphaël Thuillet, Mina Ottaviani, **Fabien Robert**, Mustapha Kamel Chelgham, Virginie Magnone, Agnès Desroches-Castan, Nicolas Ricard, Ignacio Anegon, Séverine Remy, Ralph Theo Schermuly, Kevin Lebrigand, Baktybek Kojonazarov, Laurent Savale, Marc Humbert, Sabine Bailly, Pascal Barbry, Ly Tu, Christophe Guignabert

**En revision**

**REVUE GÉNÉRALE SUR LE  
SYNDROME  
HEPATOPULMONAIRE**

---



## 1. Définition du Syndrome Hépatopulmonaire

De nombreuses observations cliniques et expérimentales soulignent l'implication du foie et du système porte dans le maintien des fonctions et de l'intégrité des structures de la circulation pulmonaire. L'hypertension portale peut conduire au développement de deux pathologies vasculaires pulmonaires distinctes : le syndrome hépatopulmonaire (SHP) et l'hypertension portopulmonaire (HTPoP) <sup>1</sup>. Ces deux maladies vasculaires pulmonaires ont un impact majeur sur le pronostic fonctionnel et vital des patients atteints de pathologies hépatiques chroniques, indépendamment de leur étiologie et de leur sévérité.

Plus spécifiquement, le SHP se caractérise par une dilatation excessive des capillaires pulmonaires, passant de 8 µm en conditions physiologiques à des diamètres allant de 15 à 150 µm, associée à un processus de néoangiogenèse <sup>2-7</sup>. Dans les formes sévères, des malformations artério-veineuses (MAV) intrapulmonaires peuvent apparaître, parfois visibles macroscopiquement. Ces anomalies vasculaires pulmonaires sont à l'origine d'une altération des échanges gazeux, conduisant à une hypoxémie progressive et potentiellement sévère <sup>2-7</sup>.

Le diagnostic du SHP repose sur trois critères:

- La présence d'une pathologie hépatique et/ou du système porte.
- L'augmentation de la différence alvéolo-artérielle en oxygène (A-aO<sub>2</sub>) supérieure à 15 mmHg (ou 20 mmHg si le patient est âgé de plus de 64 ans).
- La mise en évidence de dilatations vasculaires pulmonaires par une échographie cardiaque transthoracique avec épreuve de contraste ou par scintigraphie du corps entier avec injection de macro-agrégats d'albumine marqués au Technétium-99.

## 2. Approche diagnostique

### a) Les hépatopathies, premières responsables

Le point de départ dans le développement du SHP est la présence d'une hépatopathie et/ou d'une pathologie du système porte. Dans la majorité des cas, cette pathologie survient dans un contexte d'hypertension portale intra-hépatique associée à une cirrhose. Cependant, le SHP peut également se manifester chez des patients présentant une hypertension portale extra-hépatique ou une fistule portosystémique congénitale<sup>8</sup>. Enfin, quelques cas de patients ayant développé un SHP à la suite d'une hépatite ischémique aiguë ont été rapportés<sup>9</sup>.

L'étiologie de la pathologie hépatique ou portale n'a pas été identifiée comme un facteur de risque du développement du SHP. Par ailleurs, bien que le lien entre la gravité de la pathologie hépatique ou portale et le développement du SHP ne soit pas clairement établi, de plus en plus d'études suggèrent un risque accru de développer un SHP dans un contexte d'hypertension portale sévère ou de cirrhose avancée, accompagné de signes de décompensation clinique tels que l'ascite, les varices œsophagiennes ou l'encéphalopathie hépatique<sup>10-15</sup>.

Deux hypothèses principales sont avancées pour expliquer le développement des anomalies vasculaires pulmonaires observées dans le cadre du SHP. Premièrement, les communications portosystémiques, qu'elles soient acquises ou congénitales, pourraient altérer l'intégrité du lit vasculaire pulmonaire en exposant les poumons à des substances issues de la circulation porte, normalement filtrées par le foie. Deuxièmement, la maladie hépatique ou l'altération de la circulation porte pourrait entraîner une modification de production intra-hépatique de facteurs essentiels à l'homéostasie du lit vasculaire pulmonaire.

## b) Exploration des dilatations vasculaires pulmonaires

Les lésions vasculaires du SHP sont principalement liées à une dilatation du lit capillaire pulmonaire associée à des phénomènes de néoangiogenèse, préférentiellement localisées au niveau des bases pulmonaires. Dans les formes les plus avancées, les anomalies vasculaires pulmonaires peuvent s'étendre à la macrocirculation, avec la formation de MAV. Deux examens sont couramment utilisés, pour mettre en évidence la présence de dilatations capillaires pulmonaires, élément essentiel pour confirmer le diagnostic de SHP :

### Echographie cardiaque avec épreuve de contraste.

Cet examen offre une excellente sensibilité et spécificité pour la détection des dilatations vasculaires pulmonaires. Une injection d'une émulsion de sérum salé, glucosé ou d'hydroxyéthylamidon est administrée par voie intraveineuse. La taille des microbulles varie entre 10 et 90  $\mu\text{m}$ . Après injection, ces microbulles transitent par les cavités droites du cœur et, en condition physiologique, ont un diamètre trop important pour traverser les capillaires pulmonaires sains. Elles sont retenues dans le lit capillaire, et elles n'arrivent donc pas dans les cavités gauches du cœur. En revanche, la présence de microbulles dans les cavités gauches du cœur, notamment après 3 cycles cardiaques, est le reflet de la présence de vasodilatations capillaires pulmonaires et, dans les formes les plus graves, de fistules artério-veineuses (**Figure 1**)<sup>16</sup>. Cet examen permet également de différencier la présence de vasodilatations capillaires pulmonaires d'un shunt intracardiaque (comme un foramen ovale perméable). Dans ce dernier cas, les microbulles passent dans les cavités gauches du cœur dès le premier cycle cardiaque.



**Figure 1. Echographie cardiaque avec épreuve de contraste chez un patient souffrant de syndrome hépatopulmonaire.**

- A)** Passage des bulles dans les cavités droites du cœur suivant l'injection de la solution.  
**B)** Apparition des microbulles dans les cavités gauches du cœur après 3 cycles cardiaques.  
**C)** Remplissage des cavités gauches après 5 cycles cardiaques.

(Savale, **Robert** et al. *Rare Diseases of the Respiratory System – ERS Monograph*, 2023)

#### Scintigraphie par macroagrégats d'albumine marqués au Technétium-99.

La scintigraphie est réalisée après administration intraveineuse de macroagrégats d'albumine marqués au Technétium-99. Comme dans la méthode précédente, ces particules, dont la taille comprise entre 20 et 50  $\mu\text{m}$  est supérieure au diamètre des capillaires pulmonaires en conditions physiologiques, se fixent de manière mécanique par séquestration dans la microcirculation pulmonaire. Chez les patients atteints de SHP, la scintigraphie révèle une fixation extra-pulmonaire, en particulier au niveau cérébral. Toutefois, cette méthode ne permet pas de différencier les dilatations capillaires pulmonaires d'un shunt intracardiaque. De plus, sa sensibilité est inférieure à celle de l'échographie cardiaque avec épreuve de contraste<sup>16,17</sup>. C'est pourquoi l'échocardiographie avec épreuve de contraste reste l'examen de référence.

### c) L'hypoxémie, conséquence des anomalies vasculaires pulmonaires

#### Définition.

L'altération des échanges gazeux se caractérise par une augmentation de la différence alvéolo-artérielle en oxygène  $A-aO_2 \geq 15$  mmHg (ou  $\geq 20$  mmHg chez les patients de plus de 64 ans)<sup>1,18</sup>. La  $A-aO_2$  est calculée selon la formule suivante :

$$[Patm - PH_2O] \times 0.21 - PaCO_2/0.8) - PaO_2$$

où  $PaO_2$  représente la pression partielle artérielle en oxygène,  $PaCO_2$  la pression partielle artérielle en dioxyde de carbone,  $Patm$  la pression atmosphérique et  $PH_2O$  la pression de la vapeur d'eau. L'utilisation exclusive de la  $PaO_2$  pour évaluer l'hypoxémie peut manquer de précision, car l'oxygénation artérielle est souvent surestimée en raison de l'hyperventilation fréquemment observée chez les patients cirrhotiques.

#### Présentation clinique et paraclinique.

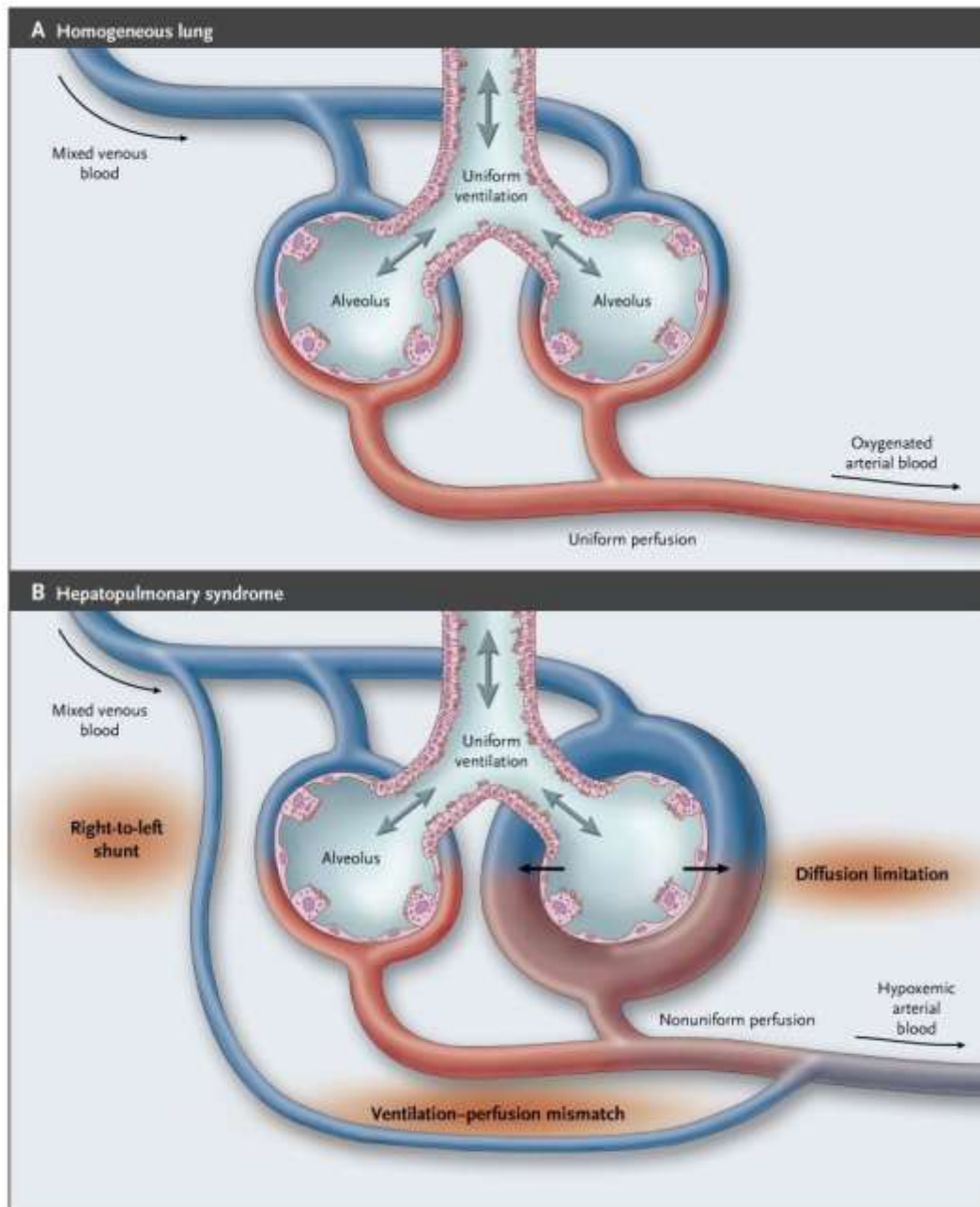
L'hypoxémie est fréquemment observée chez les patients atteints d'hépatopathie chronique et résulte souvent de plusieurs facteurs, même en l'absence d'anomalies vasculaires pulmonaires. Parmi ceux-ci, on retrouve l'ascite abondante, l'œdème pulmonaire, les infections pulmonaires ou encore l'épanchement pleural. De plus, des causes extra-pulmonaires, telles que les cardiopathies alcooliques ou hypertensives, peuvent également contribuer à l'hypoxémie. Cette complexité souligne l'importance d'une approche médicale globale dans la prise en charge des patients cirrhotiques<sup>19,20</sup>. Il est primordial d'explorer et d'éliminer les diverses causes d'hypoxémie et de dyspnée chez ces patients avant d'affirmer que seul le SHP est responsable de l'altération des échanges gazeux.

Le SHP doit être suspecté chez les patients présentant une dyspnée associée à une platypnée, caractérisée par une aggravation de la gêne respiratoire en position assise ou debout. De plus, la présence d'une orthodéoxie, définie par une diminution de plus de 5 mmHg de la  $PaO_2$  ou une baisse de plus de 4 % de la saturation en oxygène ( $SpO_2$ ) lors du passage de la position couchée à la position assise, constitue également

un signe évocateur de cette pathologie. Ces phénomènes s'expliquent par la localisation préférentielle des lésions vasculaires dans les bases pulmonaires et sous-pleurales chez les patients atteints de SHP <sup>21-23</sup>. L'évaluation approfondie de ces symptômes est importante pour distinguer le SHP des autres causes de dyspnée chez les patients cirrhotiques.

### *Les coulisses de l'hypoxémie : quels sont les mécanismes en jeu ?*

Dans le contexte du SHP, l'hypoxémie résulte du développement de vasodilatations capillaires pulmonaires et potentiellement de MAV dans les formes les plus graves. Plusieurs mécanismes expliquent l'altération des échanges gazeux. Premièrement, les dilatations vasculaires intrapulmonaires perturbent le rapport ventilation/perfusion, avec une augmentation de la perfusion par rapport à la ventilation locale inchangée. Les patients cirrhotiques ont par ailleurs un défaut de la vasoconstriction hypoxique pulmonaire aggravant le phénomène. Deuxièmement, l'élargissement du diamètre des capillaires allonge la distance que les molécules d'oxygène doivent parcourir pour se lier à l'hémoglobine des globules rouges. Cette situation est aggravée par la circulation hyperdynamique observée dans l'hypertension portale, qui réduit le temps de transit des globules rouges dans les capillaires pulmonaires. Ceci se traduit par une altération parfois très sévère de la diffusion. Troisièmement, les MAV peuvent entraîner des communications artério-veineuses directes responsables d'un shunt vrai qui n'est pas observé chez tous les patients **(Figure 2)** <sup>2,5-7</sup>.



**Figure 2. Mécanismes potentiels responsables de l'altération des échanges gazeux.**

**A)** Ventilation et perfusion uniforme dans un poumon sain.

**B)** Chez un patient atteint de SHP, on retrouve une perturbation du rapport ventilation/perfusion, des anomalies de diffusion de l'oxygène et la présence de communications artério-veineuses, responsable de l'installation de l'hypoxémie.

(Rodriguez-Roisin *et al.* *N Engl J Med*, 2008 <sup>7</sup>).

### 3. Epidémiologie

La prévalence du SHP varie largement selon les études en fonction des étiologies, de la population étudiée et des critères diagnostiques employés. Chez les patients présentant une hypertension portale associée à une cirrhose, elle peut varier de 5% à plus de 40% <sup>10,11,16,24-31</sup>, tandis que chez ceux avec une hypertension portale non cirrhotique, elle se situe entre 2% et 13% <sup>29-32</sup>. Chez les enfants, la prévalence du SHP en cas de shunts portosystémiques congénitaux varie de 3% à 12% <sup>8,33-40</sup>. Ces prévalences sont sûrement sous-estimées, un nombre important de patients restant asymptomatiques ou peu symptomatiques.

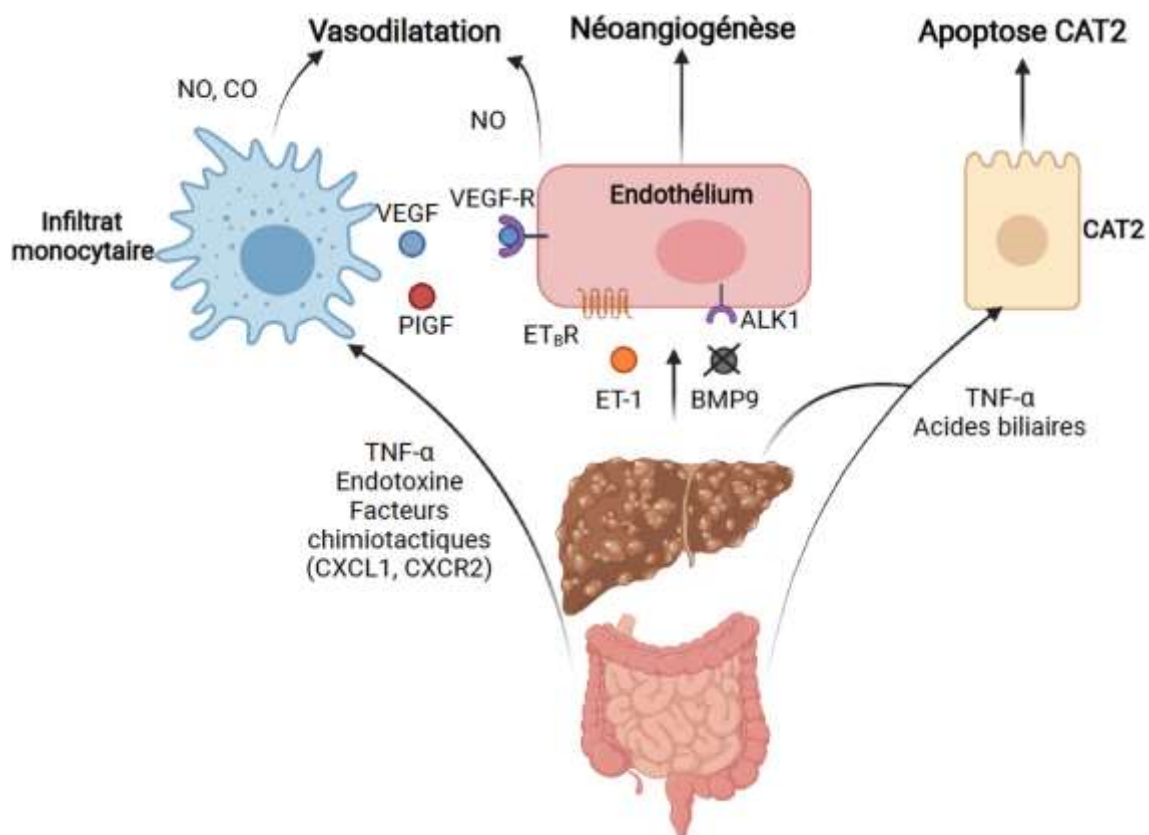
Néanmoins, même en l'absence de symptôme, les patients souffrant de SHP présentent une survie significativement réduite, avec un risque de décès environ deux fois plus élevé, même après ajustement avec la sévérité de la maladie hépatique sous-jacente <sup>11,12,41,42</sup>. Une étude de 2005 a montré une survie à 5 ans de 23% pour les patients avec SHP contre 63% pour ceux avec une cirrhose sans maladie vasculaire pulmonaire <sup>41</sup>. Plus récemment, une étude prospective multicentrique de 2022 a révélé une survie plus faible chez les patients SHP par rapport à des témoins cirrhotiques contrôlés à 1 an (87% *versus* 92%), à 2 ans (73% *versus* 83%) et à 3 ans (63% *versus* 81%) <sup>12</sup>. De plus, la survie des patients atteints de SHP est corrélée à la gravité de l'hypoxémie <sup>42</sup>, qui tend à se détériorer avec le temps, avec une diminution moyenne de la PaO<sub>2</sub> de 5 mmHg par an <sup>41</sup>.

Les patients ayant un SHP présentent également un risque accru de décompensation aiguë de leur maladie hépatique, pouvant entraîner l'apparition d'ascite, d'encéphalopathie ou une rupture de varices. Cette décompensation, souvent associée à des défaillances d'organes, conduit à une augmentation significative de la mortalité à court terme (< 28 jours) <sup>43,44</sup>.



## 4. Mécanismes physiopathologiques

Concernant les mécanismes physiopathologiques impliqués dans le développement du SHP, les interactions complexes entre le foie, la circulation porte et la circulation pulmonaire jouent un rôle crucial dans les perturbations de la microvascularisation pulmonaire. Les recherches, principalement expérimentales, ont mis en évidence plusieurs éléments essentiels : un **mécanisme inflammatoire** à la fois systémique et local, une **modification du tonus vasculaire pulmonaire en faveur d'une vasodilatation** des capillaires pulmonaires, et une **augmentation de l'angiogenèse** (Figure 3). Ce paragraphe offre un aperçu des mécanismes physiopathologiques connus, basé sur l'unique modèle animal utilisé pour étudier le SHP, à savoir le modèle de ligature de la voie biliaire principale (LVB).



**Figure 3. Mécanismes physiopathologiques du syndrome hépatopulmonaire.**

(Sayadi, Duhaut, **Robert** et al. *Rev Med Interne* 2023 <sup>2</sup>)

### a) Le seul modèle *in vivo* validé pour l'étude du SHP

À ce jour, aucun modèle animal ne reproduit entièrement toutes les caractéristiques physiopathologiques du SHP. Néanmoins, le modèle de LVB chez le rongeur est le seul à se rapprocher de cette pathologie, permettant ainsi l'étude du SHP dans un contexte d'hypertension portale associée à une cirrhose biliaire<sup>45,46</sup>. Dans ce modèle, une ligature complète du canal cholédoque provoque une cholestase, suivie d'une inflammation et de la formation de fibrose hépatique, évoluant finalement vers une cirrhose. Ce modèle présente une sévérité importante, avec une mortalité élevée au-delà de 6 semaines. Les caractéristiques du SHP, incluant une vasodilatation des capillaires pulmonaires et une altération des échanges gazeux, se développent rapidement. Cependant, les techniques expérimentales actuelles ne permettent pas de détecter facilement les MAV chez l'animal<sup>47-49</sup>.

La compréhension des mécanismes physiopathologiques impliqués dans le développement du SHP repose principalement sur ce modèle de LVB, qui a permis d'identifier l'implication de facteurs vasodilatateurs, pro-angiogéniques et pro-inflammatoires. Les autres modèles de cirrhose expérimentale, induite par injection de tétrachlorure de carbone (qui génère des radicaux libres toxiques)<sup>50,51</sup> ou de thioacétamide (qui induit la production d'espèces réactives de l'oxygène)<sup>52-55</sup>, n'ont pas montré reproduire les caractéristiques pulmonaires du SHP. De même, le modèle d'hypertension portale extra-hépatique par ligature partielle de la veine porte (LPVP) ne conduit pas au développement du SHP lorsqu'il est analysé 2 à 3 semaines après la procédure<sup>45,46,56</sup>, même si des altérations moléculaires en faveur d'une vasodilatation pulmonaire excessive commencent à apparaître. Notamment, on observe une augmentation pulmonaire de molécules vasodilatatrices telles que l'hème oxygénase-1 (HO-1), de la NO synthase inductible (iNOS) et le récepteur endothélial de type B de l'endothéline (ET<sub>B</sub>)<sup>57,58</sup>.

## b) Les mécanismes vasodilatateurs

Un des mécanismes identifiés dans le modèle expérimental de SHP induit par la LVB est l'altération de l'équilibre entre vasoconstriction et vasodilatation, en faveur d'une vasodilatation excessive.

### Monoxyde d'azote.

Le monoxyde d'azote (NO), un puissant vasodilatateur, est produit par trois types de NO synthases : la NO synthase neuronale (nNOS), la NO synthase inducible (iNOS) et la NO synthase endothéliale (eNOS). Dans le modèle de LVB, une augmentation des taux circulants de NO est observée, ce qui entraîne une réduction du tonus vasculaire pulmonaire. Cette élévation de la production de NO provient à la fois de l'activation de la eNOS dans les cellules endothéliales vasculaires pulmonaires<sup>59-61</sup>, et de l'augmentation de la iNOS dans les monocytes et macrophages intrapulmonaires<sup>61-65</sup>. Des niveaux exhalés de NO plus élevés ont été mesurés chez le rat LVB<sup>64</sup>. Cette augmentation du NO conduit à l'activation de la voie de la guanylate cyclase dans les cellules musculaires lisses pulmonaires, provoquant une relaxation vasculaire<sup>66</sup>. Des traitements utilisant le N-nitro-L-arginine méthyl ester (L-NAME), un inhibiteur des NO synthases<sup>63,64</sup>, ainsi que le bleu de méthylène, un inhibiteur de la guanylate cyclase<sup>67</sup>, ont montré des effets bénéfiques sur les vasodilatations capillaires pulmonaires et l'hypoxémie dans ce modèle.

### Endothéline-1.

Il a également été rapporté une augmentation de la production d'endothéline-1 (ET-1) dans le modèle de LVB<sup>58,61,68-70</sup>. L'ET-1 exerce ses effets en fonction de la liaison à ses récepteurs spécifiques. Sur les cellules musculaires lisses vasculaires, les récepteurs ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub> favorisent la vasoconstriction. En revanche, sur les cellules endothéliales, le récepteur ET<sub>B</sub> favorise la vasodilatation en augmentant la clairance de l'ET-1, ainsi qu'en stimulant la production de NO et de prostacycline.<sup>71</sup>

Dans le modèle de LVB, en plus de l'augmentation de l'ET-1 circulante, on observe une surexpression du récepteur ET<sub>B</sub> endothélial, ce qui suggère un rôle prédominant de l'ET-1 dans la vasodilatation<sup>56,58,68,72</sup>. L'inhibition sélective du récepteur ET<sub>B</sub> a montré une amélioration de la sévérité du SHP expérimental<sup>68,73,74</sup>.

#### Monoxyde de carbone.

Le monoxyde de carbone (CO), composé vasodilatateur, joue également un rôle crucial dans la régulation du tonus vasculaire et est augmenté dans le modèle de LVB. Cette augmentation est associée à une surproduction de l'enzyme hème oxygénase-1 (HO-1), qui est responsable de la synthèse du CO<sup>65,68,75</sup>. Un traitement avec un inhibiteur de l'HO-1 permet de d'améliorer la sévérité du SHP expérimental<sup>65</sup>.

#### Estradiol.

L'estradiol est reconnu pour son effet vasorelaxant sur l'endothélium. Il influence la dilatation des capillaires pulmonaires en activant la eNOS et en augmentant les concentrations circulantes de NO, mais également en bloquant les canaux calciques.<sup>76-80</sup> L'administration d'œstrogènes dans le modèle de LVB entraîne une augmentation de l'hypoxémie, tandis qu'une ovariectomie contribue à réduire cet effet<sup>79</sup>.

### c) Perturbation de la balance pro- et anti-angiogénique

Au niveau expérimental, le SHP peut également être attribué à une dérégulation de l'angiogenèse, favorisant ainsi un phénomène de néoangiogenèse<sup>48</sup>. Le SHP se caractérise par une augmentation de la densité capillaire pulmonaire observable par microscopie électronique<sup>48,49</sup>. De plus, le sérum des rats après LVB stimule la prolifération, la migration et la tubulogénèse des cellules endothéliales *in vitro*, par rapport au sérum provenant de rats témoins (SHAM)<sup>81</sup>. Dans le modèle de LVB, il a été démontré que l'augmentation des facteurs pro-angiogéniques circulants, tels que le

VEGF-A, le PDGF et le PIGF, est associée à l'augmentation du nombre de capillaires pulmonaires<sup>49,55</sup>. L'inhibition de la voie du VEGF-A à l'aide du sorafenib, ou du PIGF à l'aide d'anticorps bloquants, améliorent les échanges gazeux et réduit les vasodilatations capillaires pulmonaires dans le modèle expérimental de cirrhose<sup>49,82</sup>.

#### d) Inflammation pulmonaire

Dans le modèle de LVB associé à une cirrhose, une infiltration du lit vasculaire pulmonaire par des monocytes adhérant à l'endothélium est observée<sup>83</sup>. Il a été suggéré que ces monocytes proviennent de la rate<sup>84</sup>. Cette migration des monocytes est facilitée par la translocation bactérienne du microbiote intestinal vers la circulation portale. Cette translocation résulte de l'altération de la barrière muqueuse intestinale, de la diminution de la capacité de clairance hépatique, des communications portosystémiques contournant le foie, ainsi que de la prolifération bactérienne intestinale. Les endotoxines peuvent ainsi accéder à la circulation pulmonaire, entraînant une production locale de récepteurs et de ligands chimiotactiques. Cette réaction conduit au recrutement et à l'adhésion des monocytes à l'endothélium pulmonaire<sup>85,86</sup>. De plus, l'endotoxémie favorise l'augmentation circulante des cytokines pro-inflammatoires, telles que le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 et l'IL-6, contribuant ainsi à l'activation des monocytes<sup>87,88</sup>. Au niveau pulmonaire, des protéines produites par les cellules endothéliales, telles que le CX3CL1, ICAM-1 ou VCAM-1, jouent un rôle crucial dans le recrutement des cellules inflammatoires et immunitaires. Ces protéines facilitent l'adhésion des monocytes à l'endothélium par leurs fonctions de chimiotaxie, d'adhésion cellulaire et de survie des cellules immunitaires<sup>74,89,90</sup>. Au niveau pulmonaire, ces monocytes exercent un effet délétère sur le tonus vasculaire en sécrétant du NO et du CO via la iNOS et la HO-1, respectivement<sup>65,68,83,87</sup>.

L'utilisation d'anticorps dirigés contre le TNF- $\alpha$  améliore la sévérité du SHP expérimental<sup>88</sup>. De plus, la déplétion des macrophages, réalisée par l'administration de clodronate ou de gadolinium, a également montré des effets bénéfiques<sup>83</sup>.

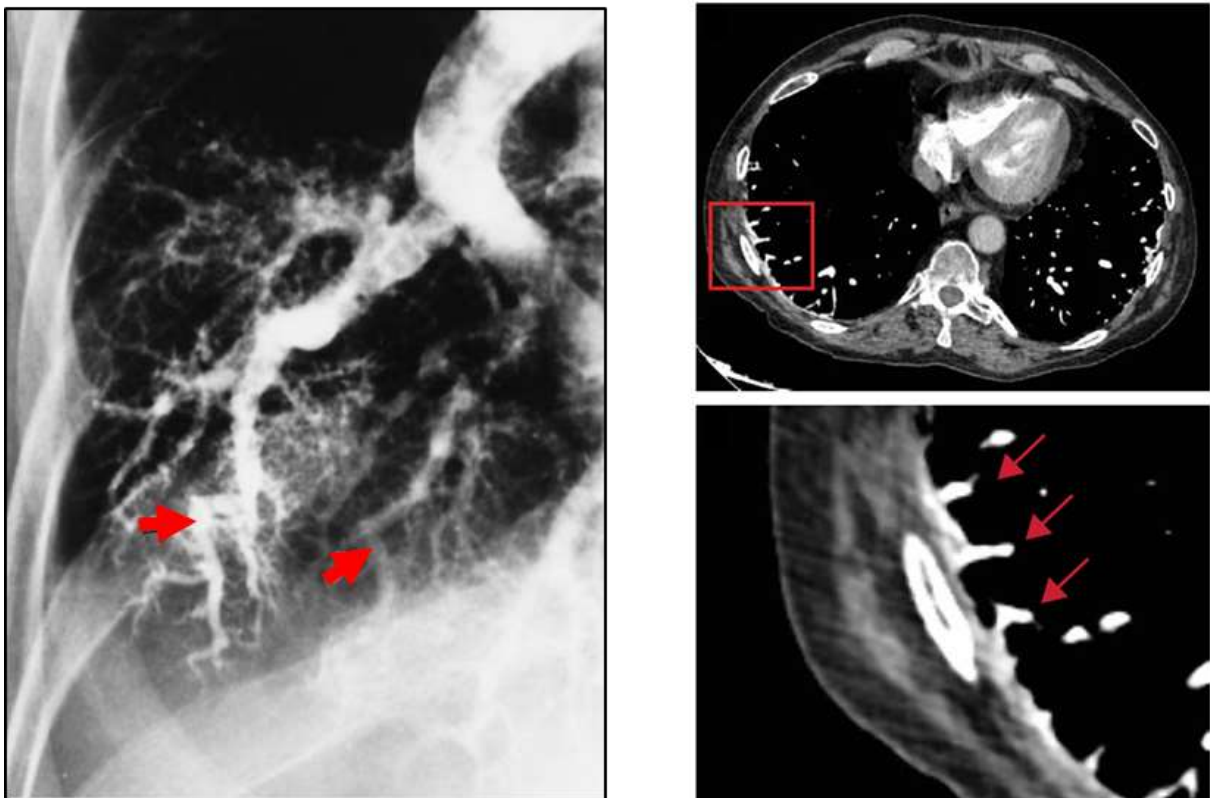
Il est important de noter que, bien que les preuves sur l'implication des monocytes dans le développement du SHP expérimental soient substantielles, les données disponibles pour extrapoler ces résultats chez l'Homme sont limitées. À ce jour, aucune observation de monocytes adhérant à la paroi vasculaire pulmonaire n'a été rapportée chez des patients présentant un SHP. Toutefois, l'accès au tissu pulmonaire provenant de ces patients est extrêmement limité, ce qui restreint les études histologiques chez l'Homme.

### e) Altération de l'épithélium alvéolaire pulmonaire

Quelques études suggèrent que le SHP ne se limite pas uniquement à une pathologie touchant le compartiment vasculaire, mais qu'il peut également être associé à une altération de l'épithélium respiratoire, contribuant ainsi à la défaillance des échanges respiratoires. Dans le modèle expérimental de cirrhose, provoqué par une surproduction d'acides biliaires, le développement du SHP est lié à une réduction de la production de surfactant, laquelle est corrélée à l'apoptose des cellules alvéolaires de type II <sup>91,92</sup>. Cependant, le SHP peut se développer dans des contextes autres que la cirrhose, tels que lors d'une hypertension portale extra-hépatique, ce qui suggère que ces facteurs sont potentiellement aggravants plutôt que déclencheurs de la pathologie. La physiopathologie du SHP non associé à une cirrhose reste mal comprise en raison de l'absence de modèle préclinique approprié.

## 5. Recherche translationnelle : des données animales à l'Homme

Chez l'Homme, peu d'études sont disponibles concernant le SHP. Les atteintes vasculaires sont principalement microscopiques. Dans les formes les plus sévères, en plus d'une échographie cardiaque avec épreuve de contraste ou d'une scintigraphie positive, des études histologiques ou d'imagerie (scanner thoracique ou angiographie pulmonaire) ont mis en évidence des vasodilatations des vaisseaux pulmonaires visibles macroscopiquement, principalement aux bases et en région sous-pleurale (**Figure 4**)<sup>5,21-23</sup>.



**Figure 4. Exams d'imageries chez des patients souffrant de SHP.**

À gauche, angiographie pulmonaire montrant des vaisseaux dilatés et tortueux (Adaptée de Lee *et al. Radiology*, 1999). À droite, un scanner thoracique montrant des vasodilatations pulmonaires dans les zones sous-pleurales des lobes pulmonaires inférieurs après injection. (Savale, **Robert** *et al. Rare Diseases of the Respiratory System – ERS Monograph*, 2023).

Concernant les médiateurs impliqués dans la régulation du tonus vasculaire, les taux exhalés de NO sont significativement plus élevés chez les patients atteints de SHP par rapport aux patients cirrhotiques sans SHP, et sont corrélés à une hypoxémie plus sévère. Ces taux élevés se normalisent après transplantation hépatique, en parallèle d'une résolution du SHP <sup>93-95</sup>. De même, des niveaux élevés de carboxyhémoglobine, le complexe formé entre l'hémoglobine et le monoxyde de carbone, sont associés au développement du SHP et à l'aggravation de l'hypoxémie <sup>96</sup>. Par ailleurs, les niveaux circulants d'ET-1 sont également augmentés chez les patients atteints de SHP <sup>10,97,98</sup>. Des essais cliniques sur l'inhibition de la synthèse de NO ou de la guanylate cyclase chez l'humain ont généré des résultats contradictoires, sans toutefois révéler d'effet bénéfique significatif dans l'ensemble <sup>99-102</sup>.

De plus, ces patients présentent des taux plus élevés d'estradiol et de progestérone par rapport aux patients cirrhotiques contrôles, ces taux se normalisant également après transplantation hépatique, simultanément à la résolution du SHP <sup>103,104</sup>. Il a également été établi que la présence de polymorphismes génétiques dans des gènes associés à la signalisation des œstrogènes est associée à la survenue du SHP <sup>105</sup>. Actuellement, un essai clinique randomisé de phase II en double aveugle est en cours à la Mayo Clinic (États-Unis), visant à tester l'efficacité du létrozole, un inhibiteur de l'aromatase bloquant la conversion des androgènes en œstrogènes, pour le traitement du SHP (ClinicalTrials.gov ID : NCT04577001).

Concernant les mécanismes inflammatoires, un essai clinique portant sur l'administration de norfloxacine, visant à réduire la translocation bactérienne, n'a pas montré d'amélioration significative des échanges gazeux <sup>106</sup>. De plus, la pentoxifylline, un inhibiteur non spécifique de la phosphodiesterase qui bloque également la synthèse du TNF- $\alpha$ , a montré des résultats mitigés selon les études. Toutefois, son potentiel dans le traitement du SHP associé à la cirrhose reste limité en raison d'une tolérance insuffisante <sup>107-109</sup>.

Chez les patients atteints de SHP, une altération des mécanismes régulant l'angiogenèse a également été observée. En effet, une augmentation des facteurs



pro-angiogéniques en comparaison à des patients cirrhotiques contrôles, tels que l'angiopoïétine-2, le VCAM-1 et le PDGF, a été rapportée, tandis qu'une diminution des facteurs anti-angiogéniques, comme l'angiotensine et l'endostatine, a également été documentée <sup>12,110</sup>. Des polymorphismes génétiques dans des gènes liés au développement vasculaire et à la modulation de l'angiogenèse sont également associés à la survenue du SHP <sup>105</sup>. Cependant, il est surprenant de constater que la voie du VEGF-A, un régulateur clé de l'angiogenèse, ainsi que ses récepteurs, ne présentent pas de dérégulation significative chez les patients atteints de SHP, ce qui contraste avec les observations faites dans le modèle expérimental de cette pathologie. Un essai clinique récent avec le sorafenib, un inhibiteur de tyrosine kinase incluant les récepteurs au VEGF-A, n'a pas montré de bénéfice pour le SHP <sup>111</sup>.

Concernant les acides biliaires, une étude a révélé une augmentation significative de leurs concentrations dans le sérum des patients atteints de SHP associés à une cirrhose, quelle que soit la gravité de la cirrhose sous-jacente. De plus, ces niveaux accrus d'acides biliaires étaient corrélés à la sévérité de l'hypoxémie <sup>112</sup>.

Ces résultats cumulés, ainsi que les échecs des divers essais cliniques menés jusqu'à présent à partir des données obtenues dans le modèle expérimental de LVB, soulignent la nécessité de poursuivre les recherches afin d'identifier des traitements plus efficaces et mieux adaptés au SHP.

## **6. La transplantation hépatique : dernier recours et seul espoir**

La transplantation hépatique est le seul traitement curatif du SHP <sup>1,12,13</sup>. La première étude, datant des années 1990, a démontré une normalisation des échanges gazeux après la transplantation hépatique <sup>113</sup>. Depuis lors, cette approche est progressivement devenue le traitement de référence. Plusieurs études ont confirmé les effets bénéfiques de la transplantation hépatique chez les patients atteints de SHP,

notamment une amélioration de la survie, une réduction de l'hypoxémie et une régression des vasodilatations pulmonaires<sup>41,95,114-116</sup>.

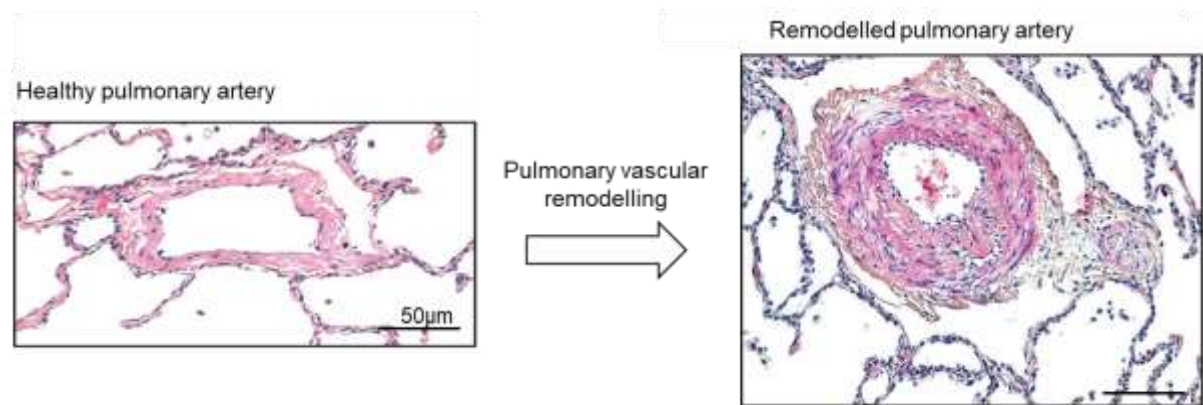
Le score MELD (Model for End-Stage Liver Disease) est devenu le critère de référence pour l'évaluation des candidats à la transplantation hépatique, remplaçant le score de Child-Pugh. Ce score est basé sur des variables quantitatives spécifiques telles que la créatinine, la bilirubine et l'INR. Il a été démontré qu'après un suivi d'un an post-transplantation hépatique, les patients ayant un score MELD de 14 ou moins présentent une mortalité liée à la transplantation supérieure à celle liée à leur cirrhose.<sup>117</sup> En conséquence, seuls les patients ayant un score de 15 ou plus sont éligibles à la transplantation. L'application du score MELD a contribué à réduire la mortalité sur liste d'attente en priorisant les patients les plus critiques. Cependant, bien que le score MELD soit un indicateur fiable, il ne couvre pas toutes les complications de la maladie hépatique pouvant affecter le pronostic vital des patients. Dans les cas du SHP, la mortalité n'est pas nécessairement corrélée à la gravité de l'hépatopathie sous-jacente. Depuis les années 2000, les patients atteints de SHP sévère, avec une PaO<sub>2</sub> inférieure à 60 mmHg, peuvent bénéficier d'une exception au score MELD, leur permettant d'accéder à la transplantation même si leur score MELD n'est pas élevé<sup>118,119</sup>.

Des données contradictoires persistent dans la littérature concernant la surmortalité post-transplantation hépatique. Il est important de noter que l'hypoxémie peut s'aggraver de manière précoce et transitoire en postopératoire, ce qui peut retarder l'extubation et prolonger le séjour en réanimation<sup>120-122</sup>. Certaines études ont observé un risque accru de mortalité après la transplantation chez les patients présentant une hypoxémie très sévère, avec des seuils variant de PaO<sub>2</sub> <45 mmHg à PaO<sub>2</sub> <54 mmHg, selon les études<sup>115,123-125</sup>. Cependant, d'autres études n'ont pas identifié de lien significatif entre la sévérité de l'hypoxémie pré-transplantation hépatique et le risque de mortalité post-transplantation hépatique. En effet, la mortalité post-transplantation chez ces patients se révèle comparativement similaire à celle observée chez des patients cirrhotiques sans maladie vasculaire pulmonaire<sup>12,114,116,126,127</sup>. À ce jour, une hypoxémie sévère ne constitue pas une contre-indication

à la transplantation hépatique chez les patients atteints de SHP, étant donné que la survie est nettement améliorée par rapport à celle des patients ne bénéficiant pas de la transplantation hépatique. Néanmoins, une surveillance rigoureuse et une attention accrue demeurent nécessaires pour ces patients.

## **7. L'Hypertension Portopulmonaire : Une autre complication de l'hypertension portale**

Une autre pathologie vasculaire pulmonaire liée à l'hypertension portale, qui mérite une attention particulière, est l'hypertension portopulmonaire (HTPoP). Il s'agit d'une forme spécifique d'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP), classée dans le groupe 1.4 de la classification des hypertensions pulmonaires. Cette forme se caractérise par une élévation anormale de la pression artérielle pulmonaire ( $>20$  mmHg) et une augmentation des résistances vasculaires pulmonaires ( $>2$  unités Wood) au repos, tout en maintenant une pression capillaire pulmonaire d'occlusion (PAPO) normale ( $\leq 15$  mmHg) <sup>128,129</sup>. Sur le plan physiopathologique, cette maladie sévère et progressive est marquée par un remodelage obstructif de la circulation pulmonaire, entraînant une insuffisance cardiaque et un risque élevé de décès (**Figure 5**). Ce remodelage se traduit par une accumulation de cellules vasculaires pulmonaires (cellules endothéliales, cellules musculaires lisses, fibroblastes) ainsi que de cellules inflammatoires autour et dans la paroi des petites artères pulmonaires, ce qui conduit à une augmentation des résistances vasculaires pulmonaires <sup>128,130-133</sup>.



**Figure 5. Coupe histologique d'artères pulmonaires humaines.**

**À gauche**, une artère saine. **À droite**, une artère de patient souffrant d'HTAP.  
 (Adaptée de Humbert *et al. Lancet Respir Med* 2023 <sup>130</sup>)

Il est crucial de souligner que le SHP et l'HTPoP peuvent coexister chez un même patient, affectant chacun un compartiment vasculaire différent : les capillaires pulmonaires pour le SHP et les artères et artérioles pour l'HTPoP. Une étude a révélé qu'un dépistage systématique du SHP chez les patients atteints d'HTPoP révèle une prévalence de 60 % de SHP parmi ces patients. De plus, les patients présentant à la fois une HTPoP et un SHP ont une survie inférieure à celle des patients souffrant uniquement d'HTPoP <sup>134</sup>. Cependant, à ce jour, très peu d'études ont exploré la coexistence de ces deux pathologies. Il n'existe actuellement aucune information permettant de déterminer les médiateurs spécifiques qui, dans un contexte d'hépatopathie, pourraient conduire au développement d'un SHP, d'une HTPoP, ou des deux.

## **8. Perspectives futures et directions de recherche**

Il est impératif de poursuivre et d'intensifier les recherches visant à élucider les mécanismes moléculaires sous-jacents aux complications pulmonaires associées aux pathologies hépatiques. Une compréhension approfondie des voies biologiques par lesquelles une maladie hépatique peut engendrer des complications vasculaires dans le poumon est essentielle pour développer des stratégies thérapeutiques efficaces. Actuellement, l'absence de modèles précliniques reproduisant un SHP associé à des pathologies de la circulation porte et du foie, en dehors de la cirrhose biliaire sévère, représente une contrainte majeure. Il est crucial de concentrer les efforts sur le développement de modèles expérimentaux afin de permettre une étude approfondie de cette pathologie au-delà du contexte de la cirrhose biliaire.

De plus, les approches thérapeutiques actuelles qui se concentrent exclusivement sur des modulateurs d'une seule catégorie de facteurs (qu'ils soient vasoactifs, inflammatoires ou angiogéniques) ont montré des résultats décevants jusqu'à présent. Il est essentiel d'identifier de nouveaux acteurs moléculaires qui influencent simultanément plusieurs aspects pathophysiologiques de la maladie.

Les recherches futures devraient se concentrer sur l'identification et la validation de ces facteurs, en mettant l'accent sur la compréhension de leur interaction et leur impact global sur la physiopathologie du SHP, pour améliorer le diagnostic et la prise en charge de ces patients.

**CHAPITRE 1.**

**BMP-9 : LE ROLE DETERMINANT**

**DE SA PERTE DANS LE**

**SYNDROME**

**HEPATOPULMONAIRE**

---

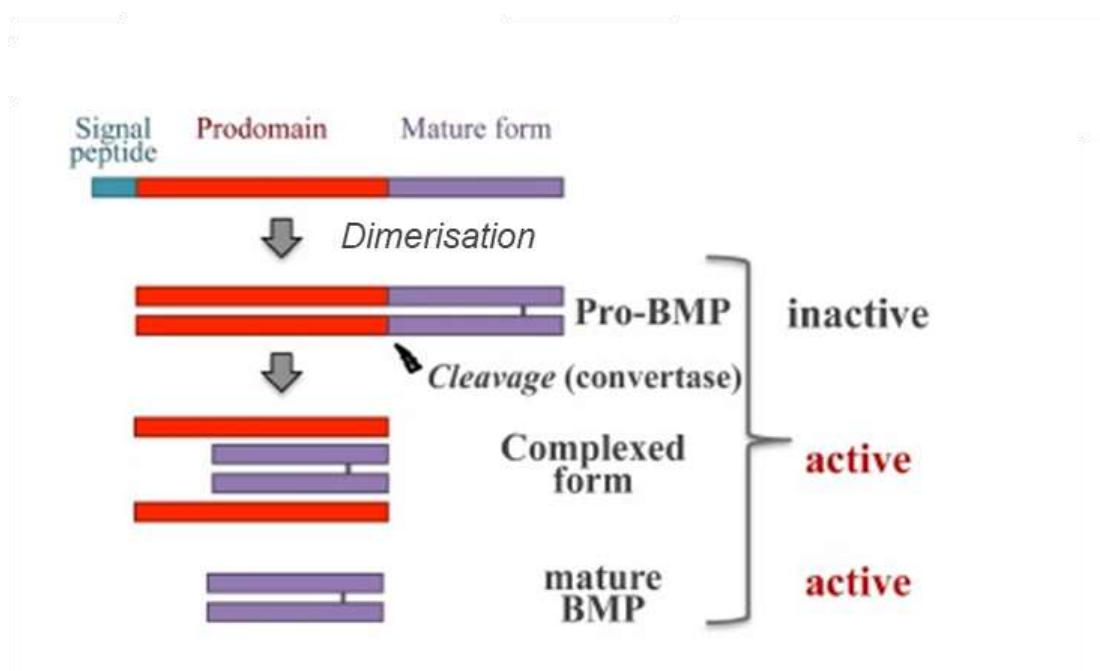
## INTRODUCTION

---

À l'heure actuelle, aucun traitement médical n'a encore démontré d'efficacité convaincante pour le SHP, la transplantation hépatique restant la seule option thérapeutique envisageable. Les mécanismes physiopathologiques ont été principalement explorés dans le contexte d'un modèle unique, celui de LVB chez le rongeur, ce qui limite la portée des connaissances actuelles. Il est donc impératif d'élargir les études et d'approfondir notre compréhension de la maladie en développant de nouveaux modèles de la pathologie. Le foie, en tant que principal organe affecté, est une source de production et de régulation de nombreux médiateurs biologiques importants. Parmi ceux-ci, une protéine **produite par le foie** pourrait jouer un rôle clé dans le développement du SHP : le **Bone Morphogenetic Protein 9 (BMP-9)**. Cette protéine mérite une attention accrue car elle pourrait offrir de nouvelles perspectives pour la compréhension et le traitement de cette pathologie complexe.

### 1. La famille des BMP

Comme tous les BMP, le BMP-9 appartient à la grande famille du TGF-beta. Les BMP regroupent environ 20 ligands distincts, synthétisés sous forme de précurseurs protéiques. Ces précurseurs, appelés pré-pro-BMP, se composent d'un peptide signal du côté N-terminal, d'un prodomaine et d'un peptide mature en C-terminal portant l'activité facteur de croissance<sup>135-137</sup>. Après dimérisation (sous forme homodimérique ou hétérodimérique avec d'autres ligands de la famille des BMP), la forme pro-BMP est clivée pour former la forme mature, qui peut se complexer avec le prodomaine, ce qui jouerait un rôle dans la stabilisation et le transport des BMP (**Figure 6**)<sup>138-141</sup>.



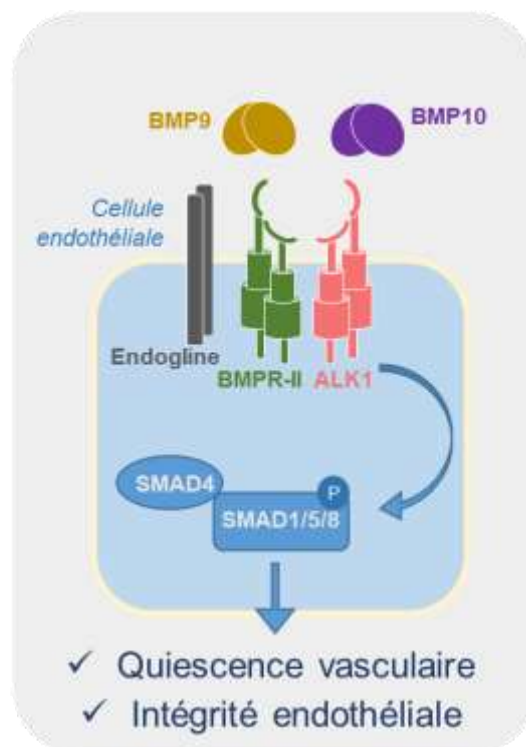
**Figure 6. Synthèse des BMP.**

(Adaptée de Tillet *et al. Front Genet* 2015 <sup>142</sup>)

Les membres de la famille des BMP se lient à des complexes hétérotétramériques de récepteurs à activité sérine/thréonine kinase, composés de deux récepteurs de type 1 et de deux récepteurs de type 2. De plus, des co-récepteurs de type 3, dépourvus d'activité kinase, pourraient jouer un rôle dans la modulation de l'accessibilité, de l'affinité et de la durée de la liaison entre les ligands et les récepteurs <sup>143</sup>. Chaque ligand de la famille des BMP se fixe à une combinaison spécifique de récepteurs et de co-récepteurs. L'interaction des récepteurs avec leurs ligands déclenche une série d'événements intracellulaires, menant à des réponses transcriptionnelles et non transcriptionnelles. L'événement central est la phosphorylation des protéines R-SMAD par le récepteur de type I activé. La voie de signalisation BMP est complexe, car elle est régulée par de nombreux facteurs, incluant des régulateurs qui modifient l'intensité et la durée de la réponse cellulaire, tant au niveau des ligands et des récepteurs qu'au niveau de la signalisation intracellulaire <sup>144</sup>.



Parmi les différents membres de la famille des BMP, les principaux ligands au niveau de l'endothélium sont le **BMP-9, synthétisé et sécrété par les cellules stellaires du foie** <sup>138,145,146</sup>, et le BMP-10, produit par l'oreillette droite du cœur mais également par les cellules stellaires <sup>138,147</sup>. Ces ligands se lient avec une forte affinité au récepteur de type 1 ALK1, qui est fortement exprimé dans l'endothélium pulmonaire, formant ainsi un complexe avec le récepteur de type 2 BMPR-II et le co-récepteur Endogline <sup>148,149</sup>. Cette interaction entraîne la phosphorylation des protéines R-SMAD, notamment SMAD1, SMAD5 et SMAD8, qui s'associent ensuite à SMAD4 et se transloquent dans le noyau pour réguler l'activation ou l'inhibition de gènes cibles essentiels à l'homéostasie vasculaire <sup>150</sup> (**Figure 7**). En parallèle de cette voie de signalisation canonique, les effets de l'activation de cet axe peuvent également être médiés par des voies non canoniques, indépendantes des protéines R-SMAD, comme celles des MAP-kinases, des PI3K-kinase et des Rho-GTPases <sup>151</sup>.



**Figure 7. Voie de signalisation de l'axe BMP-9/BMPR-II/ALK1/Endogline.**

(**Robert** et al. *Rev Mal Respir* 2023 <sup>152</sup>)

## 2. Le BMP-9, garant de l'intégrité vasculaire pulmonaire

Le SHP est une pathologie caractérisée par une altération significative de l'intégrité vasculaire pulmonaire, impliquant trois processus clés : une perturbation du tonus vasculaire favorisant la vasodilatation, une néoangiogenèse exacerbée, et une inflammation pulmonaire persistante. Sur le plan moléculaire et cellulaire, le BMP-9 est connu pour avoir la capacité de moduler ces trois mécanismes.

### a) Mécanismes impliqués dans le contrôle du tonus vasculaire

Sur des cellules endothéliales pulmonaires humaines, il a été démontré que le BMP-9 induit, de manière dose-dépendante, la production d'ET-1, un puissant vasoconstricteur lorsqu'il agit sur ses récepteurs présents sur les cellules musculaires lisses. Parallèlement, le BMP-9 réduit l'expression de l'apeline et de l'adrénoméduline, deux vasodilatateurs <sup>153</sup>. De plus, il a également été montré que le BMP-9 joue un rôle crucial dans l'induction et le maintien de la contractilité des cellules musculaires lisses vasculaires <sup>154</sup>.

### b) BMP-9, régulateur négatif de l'angiogénèse

*In vitro*, le BMP-9 inhibe la migration et la prolifération de divers types de cellules endothéliales, qu'il s'agisse de lignées cellulaires ou de cellules primaires <sup>148,149,155</sup>. Des études fonctionnelles utilisant des métatarses de souris en culture, stimulés par le VEGF-A (un agent pro-angiogénique puissant), ont également révélé une diminution de la capacité de tubulogénèse des cellules endothéliales sous l'effet du BMP-9 <sup>148</sup>.

Des études ont par ailleurs montré que, *in vivo*, le BMP-9 exerce un effet inhibiteur sur la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. Dans un premier test, une éponge inerte imprégnée ou non de BMP-9 est implantée sous la peau de souris pour

évaluer les phénomènes de néoangiogenèse. Les résultats révèlent que l'éponge contenant du BMP-9 présente une angiogenèse significativement réduite par rapport à l'éponge témoin <sup>156</sup>. Dans un autre test réalisé sur une membrane chorioallantoïque de poulet, l'ajout de BMP-9 entraîne la disparition des vaisseaux sanguins de façon dose-dépendante. De plus, les auteurs observent un phénomène de contraction peu après l'administration de BMP-9 <sup>156</sup>.

Ces données démontrent que la présence de BMP-9 joue un rôle crucial dans l'inhibition des fonctions angiogéniques des cellules endothéliales *in vitro* et *in vivo*.

### c) BMP-9, un rôle dans l'inflammation pulmonaire ?

La 3<sup>ème</sup> composante essentielle dans le développement du SHP, en particulier lorsqu'il est associé à une cirrhose, est l'inflammation pulmonaire. Peu d'études ont investigué le rôle du BMP-9 en tant que modulateur de la réponse inflammatoire pulmonaire. Sur des cellules endothéliales pulmonaires humaines, l'ajout de BMP-9 réduit l'expression de CCL2, une chimiokine qui joue un rôle clé dans l'attraction des monocytes et macrophages <sup>157,158</sup>, ainsi que d'IL-6, une cytokine pro-inflammatoire <sup>158</sup>. De plus, dans des modèles inflammatoires *in vivo*, il a été montré que le BMP-9 exerce un effet protecteur sur l'endothélium pulmonaire, notamment en préservant les fonctions de perméabilité endothéliale <sup>159</sup>.

## 3. Implication du BMP-9 dans d'autres maladies vasculaires

Les mutations de la voie de signalisation du BMP-9, qu'il s'agisse du ligand, des récepteurs ou des médiateurs intracellulaires, peuvent être associées à diverses pathologies ayant des répercussions vasculaires pulmonaires, telles la maladie de Rendu-Osler et l'HTAP, démontrant son rôle clé dans le maintien de l'intégrité vasculaire pulmonaire.

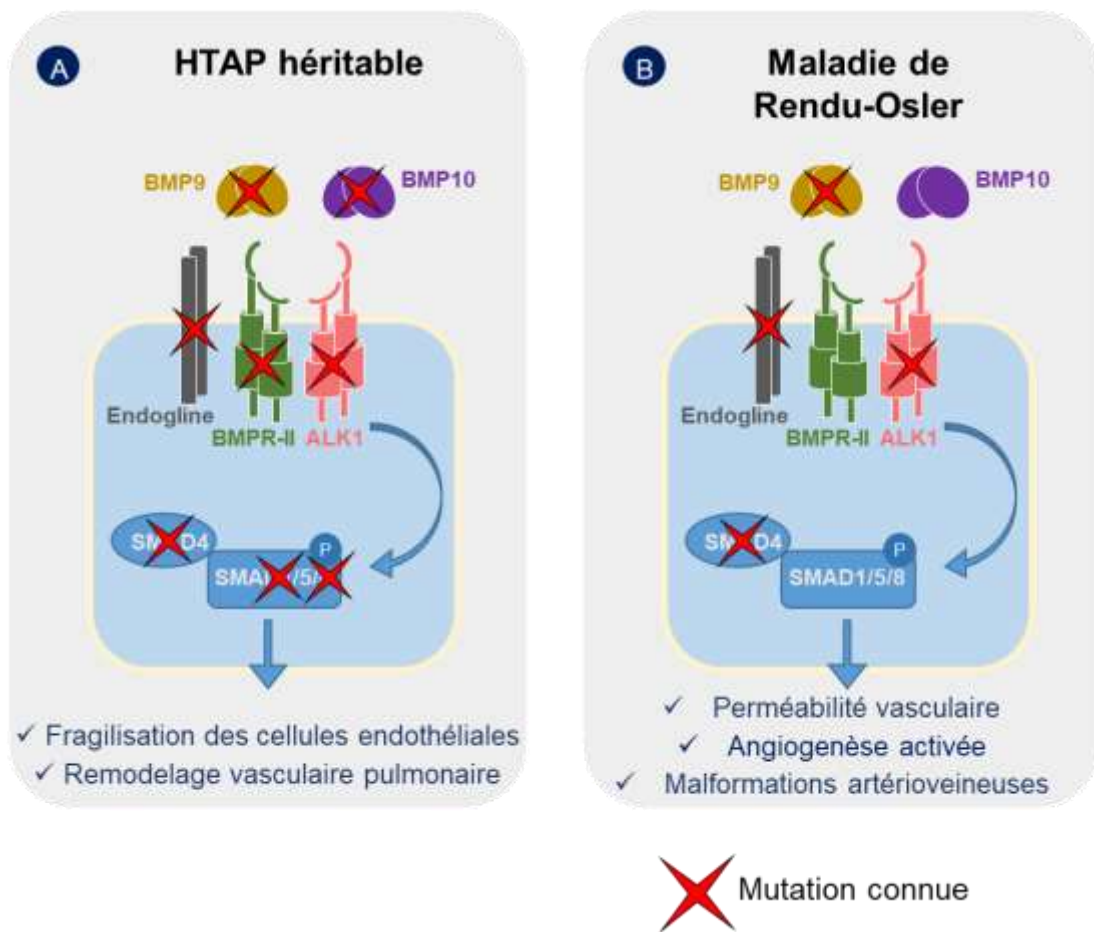
## a) Maladie de Rendu-Osler

La maladie de Rendu-Osler, également appelée télangiectasie héréditaire hémorragique, est une maladie génétique rare à transmission autosomique dominante qui peut se compliquer d'anomalies vasculaires pulmonaires qui présentent des similitudes avec celles observées dans le SHP. Cette pathologie se caractérise en effet par la **présence de MAV** et de **dilatations capillaires** affectant divers tissus et organes, notamment les poumons (jusqu'à 50 % des patients) et le foie (jusqu'à 80 %). Des analyses génétiques ont révélé que la majorité des mutations associées à la maladie de Rendu-Osler touchent deux gènes clés impliqués dans la voie de signalisation du BMP-9 : le gène *ENG* (codant pour l'endogline), responsable de la télangiectasie héréditaire hémorragique de type 1 <sup>160</sup>, et le gène *ACVRL1* (codant pour ALK1), impliqué dans la télangiectasie héréditaire hémorragique de type 2 <sup>161</sup>. Environ 2 % des cas sont liés à des mutations du gène *SMAD4*, qui sont également associées à une polypose juvénile, une pathologie caractérisée par la présence de polypes dans le tractus digestif <sup>162,163</sup>. Plus récemment, des rares mutations du gène *GDF2* (codant pour le BMP-9) ont été identifiées chez des patients présentant des similitudes phénotypiques avec la maladie de Rendu-Osler (**Figure 8B**) <sup>164-167</sup>.

## b) Hypertension artérielle pulmonaire idiopathique et héritable

Dans l'HTAP, caractérisé par un remodelage obstructif des artères pulmonaires de petit calibre, la mutation du gène *BMPR2* a été le premier gène de prédisposition identifié. Cette mutation est retrouvée dans 70 à 80 % des formes héritables <sup>168-170</sup>. Des découvertes récentes ont révélé des mutations pathogènes de gènes codants pour d'autres facteurs impliqués dans la voie de signalisation *BMPR2*, tels que *ACVRL1*, *ENG*, *BMP10*, *SMAD9*, *SMAD1*, et *SMAD4*, codant respectivement pour ALK1, Endogline, BMP-10, Smad8, Smad1, et Smad4. De plus, des cas de mutations dans le gène *GDF2*, codant pour le BMP-9, ont également été rapportés. Chez ces patients, les niveaux de

BMP-9 circulants sont réduits, voire indétectables <sup>169,171-175</sup> (**Figure 8A**). Il est important de noter que ces variants génétiques présentent une pénétrance incomplète, ce qui renforce l'idée qu'elles représentent des facteurs de risque génétiques importants mais ne sont pas suffisantes à elles seules pour provoquer la maladie <sup>172,174-176</sup>. Toutefois, plusieurs études se sont penchées sur l'analyse des taux circulants de BMP-9 dans l'HTAP idiopathique ou héritable (en dehors des mutations *GDF2*). Les taux circulants de BMP-9 chez ces patients sont similaires à ceux des individus sains, ce qui amène à nuancer l'implication de ce ligand dans le développement de l'HTAP <sup>177,178</sup>.



**Figure 8. Mutations dans l'axe BMP-9/BMPR-II/ALK1/Endogline.**

**A)** L'hypertension artérielle pulmonaire héritable et **B)** La maladie de Rendu-Osler.  
 (Adaptée de **Robert** et al. *Rev Mal Respir* 2023 <sup>152</sup>)

### c) Phénotype des rongeurs déficients en BMP-9 : un paradoxe à élucider ?

Bien que des mutations du gène *GDF2* puissent être associées à des phénotypes d'HTAP ou de maladie de Rendu-Osler chez l'Homme, les études sur des modèles de souris transgéniques révèlent des résultats homogènes. La délétion du gène *Gdf2* chez l'animal ne provoque pas d'hypertension pulmonaire expérimentale. Par ailleurs, le phénotype observé chez les souris est similaire à celui de la maladie de Rendu-Osler, se manifestant par une vasodilatation des capillaires, y compris pulmonaires, et la présence de MAV dans divers organes <sup>153,179,180</sup>. Il est donc essentiel de comprendre pourquoi, chez l'Homme, un déficit congénital en BMP-9 est associé à la fois à l'HTAP et parfois à la maladie de Rendu-Osler, tandis que chez l'animal, seul un phénotype présentant des caractéristiques proches de la maladie de Rendu-Osler est observé. Par ailleurs, il est important d'examiner si, dans le cas d'un déficit acquis en BMP-9 observé dans diverses hépatopathies, cette perte de BMP-9 contribue au développement du SHP (qui présente des similitudes phénotypiques avec la maladie de Rendu-Osler) ou d'une HTPoP.

## 4. Dérégulation du BMP-9 dans les hépatopathies chroniques

Étant donné que le BMP-9 est produit par les cellules stellaires du foie, plusieurs équipes de recherche ont étudié si sa production et ses taux circulants étaient modulés au cours des diverses hépatopathies. Il est désormais admis que les taux circulants de BMP-9 sont réduits en cas de cirrhose de diverses étiologies (alcoolique, virale, stéatose hépatique non alcoolique). Cette diminution est corrélée à la gravité de la maladie hépatique (mesurée par les scores MELD ou Child-Pugh) <sup>178,181-183</sup>. Le BMP-9 circulant est également diminué chez les patients atteints de syndrome métabolique, même en l'absence de cirrhose, et cette diminution est corrélée à la résistance à l'insuline <sup>184,185</sup>. De plus, l'analyse de plusieurs bases de données publiques a révélé que l'ARNm du

BMP-9 était réduit dans le foie dans diverses étiologies d'hépatopathies, telles que les cirrheses alcooliques ou non alcooliques, et les carcinomes hépatocellulaires <sup>186</sup>.

Différentes études ont examiné le phénotype hépatique des souris déficientes en BMP-9. Il a été observé que ces souris développaient spontanément une stéatose hépatique, associée à une résistance à l'insuline <sup>182</sup>. De plus, une autre étude a montré que la déficience en BMP-9 entraînait une fibrose hépatique associée à une capillarisation des sinusoides et à une perte de la fenestration des cellules endothéliales sinusoidales <sup>187</sup>. Dans un modèle expérimental de cirrhose induite par injection de tétrachlorure de carbone, les taux de BMP-9 circulants ont été trouvés fortement diminués <sup>178</sup>. L'administration de BMP-9 recombinant exerce un effet bénéfique dans un modèle de stéatose hépatique non alcoolique induite par un régime riche en graisses chez la souris, améliore le métabolisme des glucides et des lipides tout en exerçant une action anti-inflammatoire <sup>182,188,189</sup>.

Il semblerait donc que le BMP-9 peut jouer un rôle dans les fonctions hépatiques, sa perte étant associée au développement d'hépatopathies.

## **5. BMP-9 circulant chez les patients ayant un syndrome hépatopulmonaire et/ou une hypertension portopulmonaire**

Des modifications du taux circulants de BMP-9 ont déjà été observées dans trois études concernant les complications pulmonaires des maladies hépatiques.

Pour les patients atteints de SHP, l'étude de Owen *et al.* a mis en évidence une association entre des taux bas de BMP-9 et le développement du SHP chez les patients atteints de cirrhose décompensée, bien que les deux groupes étudiés présentaient des taux de BMP-9 circulant fortement diminués <sup>181</sup>. Par ailleurs, une autre étude menée par Rochon *et al.* a également observée des taux plus faibles de BMP-9 chez les patients atteints de SHP, après ajustement à l'âge, le sexe et le score MELD-Na, en comparaison aux patients cirrhotiques contrôles <sup>190</sup>.

Chez les patients atteints d'HTPoP, des résultats incohérents et certaines limitations méthodologiques rendent l'interprétation des données difficile. L'étude d'Owen n'a pas montré de différence significative par rapport aux patients cirrhotiques contrôles <sup>181</sup>. Une autre étude a observé des taux circulants de BMP-9 réduits chez les patients HTPoP par rapport aux patients cirrhotiques contrôles, mais uniquement dans un sous-groupe de 8 patients ayant une cirrhose peu sévère (MELD  $\leq$  10) <sup>178</sup>. Il est à noter que ces deux études n'ont pas pris en compte la coexistence possible de SHP, ce qui pourrait biaiser les résultats. Enfin, l'étude de Rochon *et al.* a trouvé une baisse des taux de BMP-9 chez 35 patients HTPoP par rapport à des patients cirrhotiques sans maladie vasculaire pulmonaire, après ajustement à l'âge, le sexe et le MELD-Na. Cependant, dans cette étude, seul 1 patient HTPoP (soit 3%) présentait également un SHP <sup>190</sup>. Cette proportion relativement faible contraste avec les résultats précédents des mêmes auteurs, qui avaient rapporté une prévalence de SHP chez 59 % des patients atteints d'HTPoP <sup>134</sup>. Cela suggère que certains cas de SHP pourraient ne pas avoir été dépistés.

L'implication des taux abaissés de BMP-9 circulant dans le développement du SHP ou de l'HTPoP dans un contexte de cirrhose demeure encore largement inexplicée. Il est également essentiel de souligner que le SHP peut se développer dans un contexte d'hypertension portale extra-hépatique, et à ce jour, aucune étude n'a inclus ces patients pour l'analyse des taux circulants de BMP-9. De plus, l'absence de modèles animaux reproduisant les caractéristiques d'un SHP sans cirrhose constitue un frein majeur aux recherches dans ce contexte.



## 6. Plan du projet

La perte du BMP-9 pourrait jouer un rôle clé dans le développement du SHP. Cette protéine est reconnue pour son effet de quiescence vasculaire, favorisant la vasoconstriction et la diminution de l'angiogenèse. Étant une protéine exclusivement produite par le foie, ses taux circulants diminuent en cas d'hépatopathie, et cette perte semble être associée à la présence de SHP <sup>178,181-183</sup>.

Dans un premier temps, ce projet vise à analyser les niveaux circulants de BMP-9 au sein d'une cohorte de patients soigneusement caractérisés selon la sévérité de leur pathologie hépatique, et le type de maladie vasculaire pulmonaire (SHP et/ou HTPoP). Notre étude a inclus 203 patients adultes cirrhotiques, répartis comme suit : 98 sans pathologie vasculaire pulmonaire ; 17 présentant uniquement un SHP ; 73 avec uniquement une HTPoP ; et 15 souffrant des deux pathologies vasculaires pulmonaires associées. De plus, nous avons analysé trois cohortes distinctes pour approfondir le rôle du BMP-9 : 13 patients pédiatriques avec une atrésie des voies biliaires compensée, avec ou sans SHP ; 7 patients post-transplantation hépatique ayant eu un SHP avant la transplantation ; et 5 patients présentant un cavernome porte associé à une hypertension portale extra-hépatique sans cirrhose. Enfin, 63 patients sains issus de l'Établissement Français du Sang ont servi de groupe contrôle. Cette première partie de notre étude a permis d'analyser le taux circulant de BMP-9 en tenant compte de l'étiologie et de la sévérité de la pathologie hépatique sous-jacente, ainsi que de la présence ou non d'une complication vasculaire pulmonaire et de l'effet de la transplantation hépatique.

Dans un second temps, nous avons cherché à analyser l'implication du déficit en BMP-9 circulant dans le développement du SHP en utilisant deux modèles distincts d'hypertension portale avec ou sans cirrhose associée. Nous avons pour cela utilisé un modèle chirurgical de cirrhose induite par LVB, reconnu pour développer les caractéristiques du SHP au niveau pulmonaire <sup>45</sup>. De plus, étant donné que le SHP peut également se développer dans le contexte d'une hypertension portale

extra-hépatique <sup>5</sup>, nous avons utilisé un modèle de LPVP qui reproduit les caractéristiques d'une hypertension portale extra-hépatique non cirrhotique. Tandis que ce modèle avait été précédemment étudié à 2 ou 3 semaines post-chirurgie, sans développement de SHP <sup>45</sup>, nous avons examiné ce modèle à des temps plus tardifs, à savoir 6 et 10 semaines après la chirurgie.

Dans ces deux modèles d'hypertension portale (LVB et LPVP), nous avons étudié le développement ou non du SHP. Nous avons ensuite examiné si un dysfonctionnement de la voie de signalisation du BMP-9 se produisait dans ces modèles. Nous avons évalué la production hépatique de BMP-9, les taux circulants de BMP-9 ainsi que son activité, et analysé la signalisation endothéliale pulmonaire. Cette approche nous a permis de déterminer si le phénotype pulmonaire du SHP est associé aux modifications observées dans l'ensemble de la voie de signalisation du BMP-9, depuis le site de production jusqu'à la cellule cible. De plus, un modèle de rat déficient en BMP-9 par la technique de CRISPR-Cas9 a été créé pour examiner le phénotype pulmonaire résultant de la perte isolée de BMP-9, en l'absence d'hépatopathie.

Ce projet visait ainsi à approfondir notre compréhension des mécanismes sous-jacents au développement du SHP et à explorer de nouvelles potentielles cibles thérapeutiques.

**Robert et al.**

**Disrupted BMP-9 signaling impairs pulmonary vascular  
integrity in hepatopulmonary syndrome**

*Am J Respir Crit Care Med*

2024

---

# Disrupted BMP-9 Signaling Impairs Pulmonary Vascular Integrity in Hepatopulmonary Syndrome

Fabien Robert<sup>1,2</sup>, Marie-Caroline Certain<sup>1,2,3</sup>, Audrey Baron<sup>1,2,3</sup>, Raphaël Thuillet<sup>1,2</sup>, Léa Duhaut<sup>4,5</sup>, Mina Ottaviani<sup>1,2</sup>, Mustapha Kamel Chelgham<sup>1,2</sup>, Corinne Normand<sup>1,2</sup>, Nihel Berrebeh<sup>1,2</sup>, Nicolas Ricard<sup>6</sup>, Valerie Furlan<sup>7</sup>, Agnès Desroches-Castan<sup>6</sup>, Emmanuel Gonzales<sup>5,8</sup>, Emmanuel Jacquemin<sup>5,8</sup>, Olivier Sitbon<sup>1,2,3</sup>, Marc Humbert<sup>1,2,3</sup>, Sabine Bailly<sup>6</sup>, Audrey Coilly<sup>4,5</sup>, Christophe Guignabert<sup>1,2</sup>, Ly Tu<sup>1,2</sup>, Laurent Savale<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Université Paris-Saclay, Unité Mixte de Recherche en Santé (UMR\_S) 999 "Hypertension Pulmonaire: Physiopathologie et Innovation Thérapeutique (HPPIT)", Le Kremlin-Bicêtre, France; <sup>2</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), UMR\_S 999 "HPPIT", Le Kremlin-Bicêtre, France; <sup>3</sup>Service de pneumologie et soins intensifs respiratoires, Centre de référence de l'hypertension pulmonaire (PulmoTension), Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Hôpital Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre, France; <sup>4</sup>Centre Hépatobiliaire, AP-HP, Hôpital Paul Brousse, Villejuif, France; <sup>5</sup>Université Paris-Saclay, INSERM, UMR\_S 1193, Hepatinov, Orsay, France; <sup>6</sup>Biosanté Unit UMR\_S 1292, Grenoble Alpes University, INSERM, Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives (CEA), Grenoble, France; <sup>7</sup>Service de pharmacologie-toxicologie, AP-HP, Hôpital Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre, France; <sup>8</sup>Pediatric Hepatology and Liver Transplantation Unit, National Reference Centre for Biliary Atresia and Genetic Cholestasis, AP-HP, Hôpital Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre, France.

ORCID IDs: 0000-0003-3132-8706 (F.R.); 0000-0002-1942-1951 (O.S.); 0000-0002-8545-4452 (C.G.); 0000-0002-6862-8975 (L.S.).

## Abstract

**Rationale:** Hepatopulmonary syndrome (HPS) is a severe complication of liver diseases characterized by abnormal dilation of pulmonary vessels, resulting in impaired oxygenation. Recent research highlights the pivotal role of liver-produced BMP-9 (bone morphogenetic protein-9) in maintaining pulmonary vascular integrity.

**Objectives:** This study aimed to investigate the involvement of BMP-9 in human and experimental HPS.

**Methods:** Circulating BMP-9 levels were measured in 63 healthy control subjects and 203 patients with cirrhosis with or without HPS. Two animal models of portal hypertension were employed: common bile duct ligation with cirrhosis and long-term partial portal vein ligation without cirrhosis. Additionally, the therapeutic effect of low-dose BMP activator FK506 was investigated, and the pulmonary vascular phenotype of BMP-9-knockout rats was analyzed.

**Measurements and Main Results:** Patients with HPS related to compensated cirrhosis exhibited lower levels of circulating

BMP-9 compared with patients without HPS. Patients with severe cirrhosis exhibited consistently low levels of BMP-9. HPS characteristics were observed in animal models, including intrapulmonary vascular dilations and an increase in the alveolar-arterial gradient. HPS development in both rat models correlated with reduced intrahepatic BMP-9 expression, decreased circulating BMP-9 level and activity, and impaired pulmonary BMP-9 endothelial pathway. Daily treatment with FK506 for 2 weeks restored the BMP pathway in the lungs, alleviating intrapulmonary vascular dilations and improving gas exchange impairment. Furthermore, BMP-9-knockout rats displayed a pulmonary HPS phenotype, supporting its role in disease progression.

**Conclusions:** The study findings suggest that portal hypertension-induced loss of BMP-9 signaling contributes to HPS development.

**Keywords:** hepatopulmonary syndrome; portal hypertension; cirrhosis; BMP-9; intrapulmonary vascular dilatations

Supported by grants from the French National Institute for Health and Medical Research (INSERM); Université Paris Saclay; Marie Lannelongue Hospital; Fondation pour la Recherche Médicale grant EQU202203014670; Agence Nationale de la Recherche grants ANR-16-CE17-0014 and ANR-17-CE14-0006; Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Service de Pneumologie, Centre de Référence de l'Hypertension Pulmonaire Sévère; Chancellerie des Universités (Legs Poix); a Ph.D. fellowship from the Fondation du Souffle (F.R.); a Ph.D. fellowship from the Ile-de-France region (ARDoc Health; N.B.); and a Contrat d'Interface INSERM (L.S.).

Author contributions: L.S., C.G., and L.T. conceived the study and secured the funding. L.S., A.C., E.G., and E.J. collected human samples. L.S. and F.R. analyzed the clinical data. F.R., M.-C.C., A.B., R.T., M.O., M.K.C., C.N., N.R., A.C., L.T., and C.G. conducted the experiments. All authors contributed to the analysis and interpretation of the findings. C.G., L.S., L.T., and F.R. drafted the manuscript. All authors reviewed and approved the final manuscript.

Correspondence and requests for reprints should be addressed to Laurent Savale, M.D., Ph.D., UMR\_S 999, Faculté de Médecine Paris-Saclay-Bâtiment de recherche (2e étage), 63 Rue Gabriel Péri, 94276 Le Kremlin-Bicêtre, France. E-mail: laurent.savale@aphp.fr.

## At a Glance Commentary

### Scientific Knowledge on the

**Subject:** There is currently no pharmacological treatment available for patients with hepatopulmonary syndrome (HPS), and liver transplant remains the only curative option. BMP-9 (bone morphogenetic protein-9), primarily produced by the liver, is a crucial vascular quiescence factor and is particularly important for the pulmonary circulation because of the high expression of its receptors. HPS is associated with a decrease in circulating BMP-9 levels.

### What This Study Adds to the

**Field:** This study highlights that the lower levels of BMP-9 observed in HPS can be reversed following liver transplant. Long-term partial portal vein ligation successfully replicated the characteristics of HPS associated with extrahepatic portal hypertension. Using common bile duct ligation and a long-term partial portal vein ligation model of HPS in rats, this study provides evidence of decreased hepatic production of BMP-9, reduced circulating BMP-9 and activity, and impaired BMP-9 signaling in the lungs, which contributes to the development of HPS. Rats lacking BMP-9 protein displayed a pulmonary HPS phenotype, further supporting the role of BMP-9 in the disease. The study shows that enhancing the BMP-9 pathway with a low dose of FK506 reverses HPS in preclinical models, indicating its potential as a therapeutic approach for patients with HPS.

Hepatopulmonary syndrome (HPS) is a severe pulmonary vascular complication of liver diseases that is characterized by the presence of intrapulmonary vascular dilations (IPVDs) and alterations in the neoangiogenic processes, leading to abnormal arterial oxygenation (1, 2). This syndrome affects a significant percentage of patients with cirrhosis, ranging from 5% to

30%, profoundly impacting their functional ability and overall health status (3–7). Despite advancements in the understanding of the clinical features and outcomes of HPS, no targeted therapy has demonstrated a sustained effect on its progression. In severe cases, liver transplant is the sole option to reverse the condition and significantly improve survival rates (8).

Although there is a strong belief that key components such as inflammation, vasodilation, and chronic alterations in the pulmonary circulation contribute to the development of HPS, the translation of this knowledge from theory to clinical practice has encountered significant limitations (8). Therefore, it is imperative to intensify research efforts to unravel the intricate mechanisms underlying HPS and to identify potential therapeutic targets. Additionally, the development of more relevant animal models that accurately replicate the complex pathophysiological aspects of HPS is crucial to enhance our understanding of the syndrome and facilitate the development of effective interventions.

Preclinical studies have demonstrated that BMP-9 (bone morphogenetic protein-9; mainly produced by the liver) acts as a vascular quiescence factor and exerts various effects on endothelial cells (9–15). It inhibits *in vitro* tubulogenesis, protects endothelial cells from inflammation-induced damage, and influences vascular density and permeability (9–12). Additionally, BMP-9 plays a significant role in regulating pulmonary vascular tone by promoting vasoconstriction through the suppression of vasodilators and upregulation of endothelin-1 (13). This altered signaling of BMP-9 has significant implications for vascular integrity and contributes to abnormalities in pulmonary circulation as well as the development of diseases such as pulmonary hypertension and hereditary hemorrhagic telangiectasia (14, 15). However, the understanding of its involvement in HPS is limited because of a scarcity of clinical and preclinical data.

Recent studies have reported a reduction in circulating BMP-9 levels in patients with cirrhosis with HPS (16, 17), suggesting a potential involvement of BMP-9 in HPS development. This decrease has also been observed in patients with portopulmonary hypertension (PoPH), another pulmonary vascular disease characterized by occlusive remodeling of the small peripheral lung vasculature (16–18). To

unravel the mechanisms underlying the contribution of BMP-9 in HPS and distinguish it from PoPH, we conducted a comprehensive investigation into circulating BMP-9 levels in well-phenotyped patient groups with portal hypertension. These groups included individuals with or without pulmonary vascular disease such as HPS, PoPH, or both. In addition, we investigated the impact of BMP-9 on the development of pulmonary vascular disorders in two rat models of portal hypertension with cirrhosis (common bile duct ligation [CBDL]) and without cirrhosis (partial portal vein ligation [PPVL]) and in BMP-9-deficient rats to gain further insight into its contribution to the pathogenesis of the disease.

## Methods

See online supplement for complete details of the study methods.

### Cohort Data Collection

From 2017 to 2023, a cohort of 203 patients diagnosed with cirrhosis with or without HPS and/or PoPH participated in this study. Control samples were obtained from peripheral blood donated by 63 healthy individuals through the Établissement Français du Sang in Paris, France.

The study encompassed specific analyses within three distinct additional populations: a group of 5 patients with extrahepatic portal hypertension, a pediatric cohort comprising 13 patients diagnosed with biliary atresia, and 7 patients who underwent liver transplants with a preexisting diagnosis of HPS before the surgical procedure. The median time elapsed after the transplants was 16 months, with a range spanning from 9 to 67 months.

The diagnosis of HPS was confirmed in patients with liver disease by abnormal arterial oxygenation, defined by an alveolar-arterial oxygen gradient ( $A-aO_2$ )  $>15$  mm Hg (or  $>20$  mm Hg in patients aged  $>64$  years) on arterial blood gas analysis, along with the presence of IPVDs assessed by contrast-enhanced echocardiography (19). PoPH was defined by a resting mean pulmonary artery pressure (mPAP)  $>20$  mm Hg with pulmonary artery wedge pressure  $\leq 15$  mm Hg and pulmonary vascular resistance  $>2$  Wood units measured by right heart catheterization according to the most recent European guidelines (20).

## Circulating Serum BMP-9 Concentrations

Serum samples from patients were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  and subjected to centralized analysis at the Université Paris-Saclay/INSERM UMR\_S 999 research laboratory (Le Kremlin-Bicêtre, France). The quantification of circulating serum BMP-9 concentrations was performed using the SimplePlex Ella microfluidic platform (Protein Simple) following the manufacturer's instructions. Levels of circulating BMP-9 were measured in healthy control subjects, patients with liver disease with or without HPS and/or PoPH, and patients with HPS who had undergone a liver transplant.

## Experimental Design and *in vivo* Treatment

All animal care and procedures were conducted in compliance with the guidelines of the French National Research Council for the Care and Use of Laboratory Animals and approved by the French Animal Experimentation Ethics Committees (Aparis no. 23045). Male wild-type Sprague-Dawley rats (8 weeks old; Janvier Labs) were subjected to CBDL and PPVL as previously described (21–23), whereas sham surgery was performed as a control. See online supplement for a description of the surgical procedures. Portal hypertension in the two models and in controls was investigated by liver Doppler ultrasonography. The phenotype of male rats lacking the BMP-9 protein ( $Gdf2^{-/-}$ ) was also analyzed in comparison with their  $Gdf2^{+/+}$  littermates (Janvier Labs). Blood samples, blood gas analysis, contrast-enhanced transthoracic echocardiography, injection of fluorescent microspheres, and the removal of kidney, liver, and lungs for Western blot, immunostaining, and RT-qPCR were all performed in the same set of animals. However, scanning electron microscopy following pulmonary vascular corrosion and measurements of pulmonary pressure, Fulton index, and echocardiographic parameters were conducted in separate series.

For *in vivo* treatment, FK506 (Astellas Pharma), known for its ability to activate BMP signaling (24, 25), was used in a curative approach. FK506 binds FKBP12 (FK-binding protein-12), a repressor of BMP signaling. At Week 4 after CBDL surgery or Week 10 after PPVL surgery, rats were randomly divided into two groups and treated orally for 2 weeks with vehicle (0.5%

carboxymethylcellulose) or FK506 in vehicle (0.2 mg/kg/d). Age-matched sham-operated control groups were also included.

## Arterial Oxygenation and IPVD Measurements in Animal Models

Anesthesia was induced using 2% inhaled isoflurane in room air, and body temperature was maintained at  $37^{\circ}\text{C}$  throughout the procedure. Rats were ventilated on room air via a tracheotomy with a Small Animal Ventilator (model 683; Harvard Apparatus).  $\text{PaO}_2$  and  $\text{PaCO}_2$  were measured in the left carotid artery, and the A-a $\text{O}_2$  was calculated. To assess IPVDs, two techniques were employed. First, contrast-enhanced transthoracic echocardiography was performed. The second method involved the injection of  $7 \times 10^6$  orange fluorescent microspheres 8  $\mu\text{m}$  in diameter (Phosphorex) through a catheter inserted into the jugular vein. After 1 minute, the kidney was removed and the number of fluorescent microspheres inside the kidney was assessed, representing the extent of IPVDs. In addition, pulmonary vascular dilation was analyzed by scanning electron microscopy after pulmonary vascular corrosion casting in PPVL models and in rats lacking the BMP-9 protein ( $Gdf2^{-/-}$ ). See online supplement for a description of all methods of IPVD investigation.

## Statistical Analyses

Continuous variables are expressed as means  $\pm$  SEM according to the data distribution analyzed by the Shapiro-Wilk test. Comparisons between continuous variables were performed using an independent *t* test for normally distributed variables and the Mann-Whitney *U* test for nonnormally distributed variables. Categorical variables are reported as the number of patients and relative frequencies and were compared using  $\chi^2$  tests.

Patients with cirrhosis were stratified in two groups according to the severity of the liver disease (Child-Pugh class A vs. B/C and Model for End-stage Liver Disease [MELD] score  $<15$  vs.  $\geq 15$ ). First, we tested whether decreased circulating BMP-9 levels is driven by the severity of liver disease by comparing Child-Pugh class A versus Child-Pugh class B or C versus healthy controls using ANOVA followed by a Tukey multiple comparison test. Then, we tested if an association with HPS phenotype was present by comparing BMP-9 levels between healthy controls, patients with cirrhosis with or

without HPS according to the severity of liver disease, and patients with HPS after liver transplantation using ANOVA followed by a Tukey multiple comparison test. To examine the link between BMP-9 levels and HPS adjusted for age, sex, and severity of cirrhosis, a logistic regression model was used. In a second analysis, we compared the BMP-9 levels in patients with cirrhosis according to the presence of HPS, PoPH, or both in each subgroup of patients using the same statistical methods. Circulating levels of BMP-9 were also compared with healthy controls in a specific population of patients with cavernoma (extrahepatic portal hypertension) without associated cirrhosis using an unpaired *t* test. In the pediatric population of patients with biliary atresia, BMP-9 levels were compared between patients with and without HPS using an unpaired *t* test.

We then hypothesized that a BMP-9 defect induced by experimental models of portal hypertension with cirrhosis (i.e., CBDL) and without cirrhosis (i.e., PPVL) is involved in HPS development. In animal models, differences in continuous variables between sham and each experimental model of portal hypertension (CBDL and PPVL) or between  $Gdf2^{-/-}$  and  $Gdf2^{+/+}$  rats were compared using an unpaired *t* test. The effect of low-dose FK506 on HPS progress was investigated by comparing variables between sham treatment, animals treated with vehicle, and animals treated with FK506 using ANOVA followed by a Tukey test. Results with a *P* value  $<0.05$  were considered statistically significant.

## Results

### Clinical Study

**Circulating BMP-9 levels in HPS.** Patient demographic characteristics, etiologies, and severity of liver disease, as well as HPS-related characteristics of patients with cirrhosis, are listed in Table 1. Circulating serum BMP-9 levels were significantly lower in patients with cirrhosis than in healthy controls regardless of Child-Pugh class ( $68.4 \pm 7.0$  vs.  $146.3 \pm 4.8$  pg/ml,  $P < 0.0001$  in Child-Pugh class A cirrhosis vs. controls;  $19.3 \pm 1.8$  vs.  $146.3 \pm 4.8$  pg/ml,  $P < 0.0001$  in Child-Pugh class B/C cirrhosis vs. controls). In addition, BMP-9 levels were significantly lower in patients with advanced cirrhosis (Child-Pugh class B/C) than in patients with mild cirrhosis (Child-Pugh



**Table 1.** Demographic and Clinical Characteristics of Patients with Cirrhosis without PVD or with HPS According to Child-Pugh Class

Characteristic	Child-Pugh Class A		Child-Pugh Class B/C	
	No PVD	HPS	No PVD	HPS
Total sample size	22	23	76	9
Age, yr	61.3 ± 2.6	57.5 ± 2.9	58.4 ± 1.1	60.8 ± 1.9
Female sex	1 (5%)	10 (43%)	24 (32%)	1 (11%)
Etiology of portal hypertension				
ALD	6 (27%)	10 (43%)	36 (47%)	5 (56%)
NASH	1 (5%)	3 (13%)	9 (12%)	0
Viral hepatitis	5 (23%)	2 (9%)	6 (8%)	1 (11%)
ALD and NASH	1 (5%)	2 (9%)	13 (17%)	2 (22%)
ALD and viral hepatitis	4 (18%)	2 (9%)	2 (3%)	1 (11%)
Cryptogenic cirrhosis	1 (5%)	2 (9%)	4 (5%)	0
Other*	4 (18%)	2 (9%)	6 (8%)	0
Combined portopulmonary hypertension	—	11 (48%)	—	4 (44%)
Alveolar-arterial oxygen gradient, mm Hg	—	47.0 ± 2.9	—	39.2 ± 4.7
Severity of HPS				
Mild: PaO <sub>2</sub> ≥80 mm Hg	—	2 (9%)	—	1 (11%)
Moderate: PaO <sub>2</sub> ≥60 to <80 mm Hg	—	12 (52%)	—	6 (67%)
Severe: PaO <sub>2</sub> ≥50 to <60 mm Hg	—	5 (22%)	—	1 (11%)
Very severe: PaO <sub>2</sub> <50 mm Hg	—	4 (17%)	—	1 (11%)

*Definition of abbreviations:* ALD = alcohol-related liver disease; HPS = hepatopulmonary syndrome; NASH = nonalcoholic steatohepatitis; PVD = pulmonary vascular disorder.

Data presented as mean ± SEM where applicable.

\*Others include hemochromatosis (*n* = 1), chronic granulomatous disease (*n* = 1), ischemic cholangitis (*n* = 1), Klatskin tumor (*n* = 1), portosinusoidal vascular disorder (*n* = 1), biliary cirrhosis (*n* = 3), sclerosing cholangitis (*n* = 1), type 1 autoimmune hepatitis (*n* = 1), and Wilson's disease (*n* = 2).

class A) ( $19.3 \pm 1.8$  vs.  $68.4 \pm 7.0$  pg/ml respectively;  $P < 0.0001$ ). Furthermore, we recruited five patients with extrahepatic portal hypertension due to portal cavernoma without cirrhosis. Circulating levels of BMP-9 were significantly lower in a setting of prehepatic portal hypertension than in healthy controls ( $62.5 \pm 7.1$  vs.  $146.3 \pm 4.8$  pg/ml, respectively;  $P < 0.0001$ ).

In the overall population, circulating levels of BMP-9 were similar between patients with cirrhosis without pulmonary vascular disorder and those with HPS ( $37.6 \pm 4.3$  vs.  $33.3 \pm 3.9$  pg/mL, respectively;  $P$  value not significant). However, patients without pulmonary vascular disorder exhibited more advanced cirrhosis than patients with HPS as indicated by higher MELD scores ( $16.6 \pm 0.7$  vs.  $12.8 \pm 0.5$ ;  $P < 0.01$ ) and a higher proportion of patients with Child-Pugh class B and C disease (78% vs. 28%;  $P < 0.0001$ ). Subsequently, we conducted a comparison of BMP-9 levels after stratifying patients based on the severity of cirrhosis and investigated the association between BMP-9 and HPS using a logistic regression model, with adjustments made for age, sex, and cirrhosis severity.

In the group of patients with Child-Pugh class A cirrhosis, circulating levels of

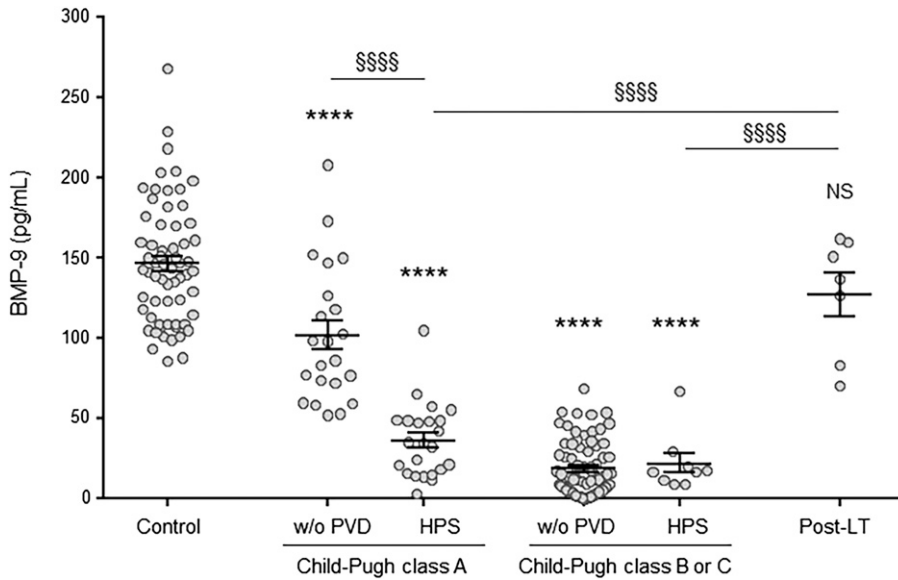
BMP-9 were significantly lower in patients with HPS than in patients without pulmonary vascular disorder ( $36.3 \pm 4.8$  vs.  $101.9 \pm 9.1$  pg/ml, respectively;  $P < 0.0001$ ) (Figure 1). Similar results were observed in the pediatric population of biliary atresia with compensated cirrhosis, including seven patients without pulmonary vascular disorder and six patients with HPS ( $153.5 \pm 36.0$  vs.  $37.0 \pm 12.2$  pg/ml, respectively;  $P < 0.05$ ) (Figure E1 in the online supplement). However, no significant difference in BMP-9 levels was observed between patients with and without HPS among patients with Child-Pugh class B or C cirrhosis, as both groups exhibited low BMP-9 levels ( $22.2 \pm 6.0$  vs.  $19.0 \pm 1.9$  pg/ml, respectively;  $P$  value not significant).

Similar results were found after segregating patients with cirrhosis according to MELD score ( $<15$  and  $\geq 15$ ). In the group of patients with a MELD score lower than 15, circulating levels of BMP-9 were significantly lower in patients with HPS than in patients without HPS ( $36.1 \pm 4.6$  vs.  $75.6 \pm 8.5$  pg/ml, respectively;  $P < 0.001$ ), whereas no significant difference was found in the group of patients with a MELD score of at least 15 (Figure E2A).

Interestingly, the relationship between low serum levels of BMP-9 and HPS was confirmed in an age-, sex-, and MELD score-adjusted logistic regression model (odds ratio, 0.975; 95% confidence interval, 0.957–0.993,  $P = 0.075$ ) in the overall population. Similar results were obtained after adjusting for age, sex, and Child-Pugh class (odds ratio, 0.955; 95% confidence interval, 0.930–0.981;  $P = 0.0008$ ).

Next, we measured BMP-9 levels in seven patients who underwent liver transplants for HPS after a median time of 16 months after the transplants (Table E1). In these transplant recipients, the level of BMP-9 was similar to that in healthy control subjects ( $127.3 \pm 13.8$  vs.  $146.3 \pm 4.8$  pg/ml, respectively;  $P$  value not significant) (Figure 1). All these patients showed normalized gas exchange after liver transplant at the time of blood collection.

**BMP-9 levels in patients with HPS with or without associated PoPH.** Because 15 patients had HPS and PoPH, we conducted an analysis to compare circulating BMP-9 levels in patients with HPS with and without PoPH and in 73 patients with PoPH without HPS. The detailed patient characteristics for PoPH are provided in Table E2. In patients with Child-Pugh class A



**Figure 1.** Circulating BMP-9 (bone morphogenetic protein-9) levels measured using ELISA in healthy control subjects, patients with cirrhosis without pulmonary vascular disorder or with hepatopulmonary syndrome according to Child-Pugh class, and patients who underwent a liver transplant with a preexisting diagnosis of hepatopulmonary syndrome before the surgical procedure. Comparisons were made using one-way ANOVA followed by a Tukey test. \*\*\*\* $P < 0.0001$  versus control group and \$\$\$ $P < 0.0001$ . HPS = hepatopulmonary syndrome; LT = liver transplant; NS = not significant ( $P > 0.05$ ); PVD = pulmonary vascular disorder; w/o PVD = without pulmonary vascular disorder.

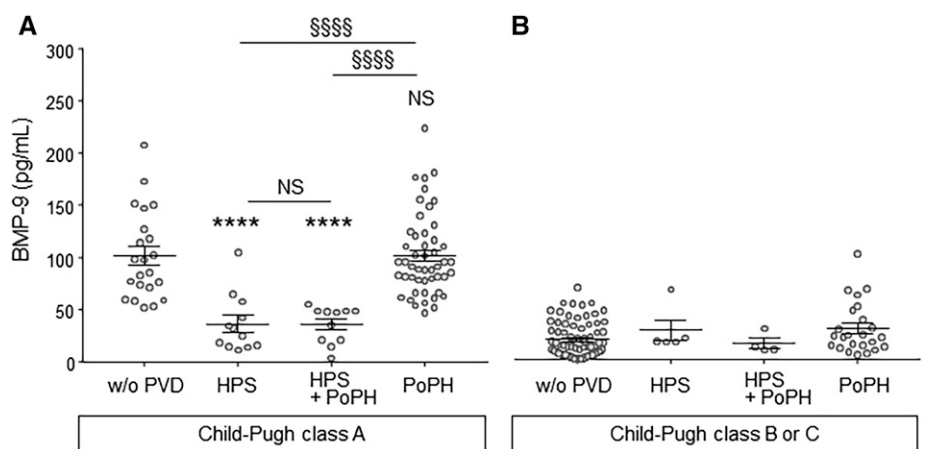
cirrhosis, we observed similar levels of BMP-9 in patients with isolated HPS and those with the combination of HPS and PoPH ( $36.7 \pm 8.0$  vs.  $36.0 \pm 5.3$  pg/ml, respectively;  $P$  value not significant). In contrast, patients with isolated PoPH without HPS exhibited levels of BMP-9 that were similar to patients with cirrhosis without pulmonary vascular disease ( $102.2 \pm 5.6$  vs.  $101.9 \pm 9.1$  pg/ml, respectively;  $P$  value not significant). Levels of BMP-9 in patients with isolated PoPH were significantly higher than in patients with HPS and PoPH ( $102.2 \pm 5.6$  vs.  $36.0 \pm 5.3$  pg/ml, respectively;  $P < 0.0001$ ) (Figure 2A). These differences were not observed in patients with Child-Pugh class B or C cirrhosis, with all groups exhibiting low BMP-9 levels (Figure 2B). Similar results were observed after segregating patients according to MELD score. In patients with a MELD score lower than 15, patients with isolated PoPH without HPS exhibited levels of BMP-9 that were similar to those in patients with cirrhosis without pulmonary vascular diseases ( $90.8 \pm 6.3$  vs.  $75.6 \pm 8.5$ , respectively;  $P$  value not significant). In contrast, comparable levels of BMP-9 were observed between patients with isolated HPS and those presenting with the combination of HPS and PoPH ( $35.1 \pm 6.6$  vs.  $37.8 \pm 5.7$ ,

respectively;  $P$  value not significant) (see Figure E2B).

### Experimental Study

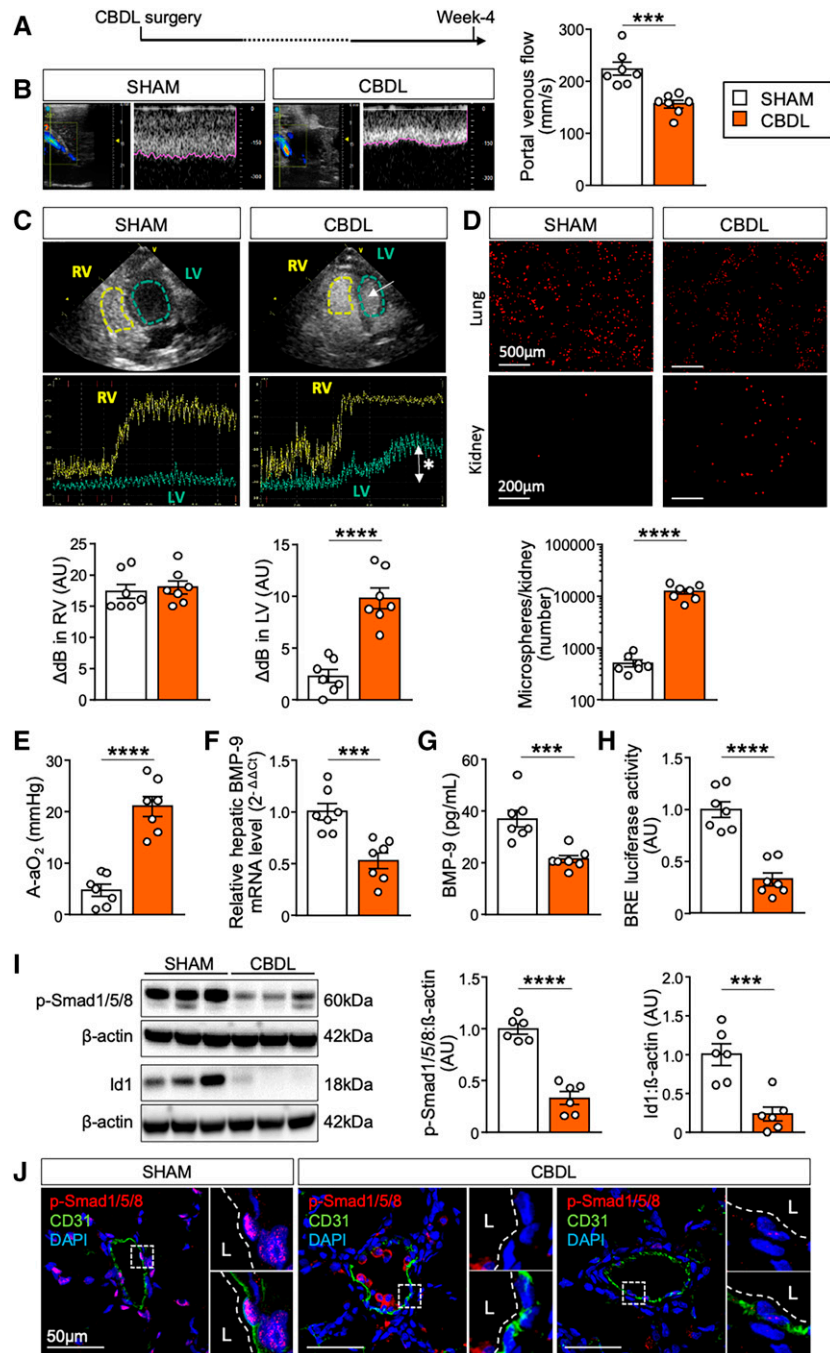
**Effects of CBDL on the BMP-9 pathway.** To explore the implication of BMP-9 and its

pathway in the development of HPS, we analyzed a surgical animal model of portal hypertension associated with biliary cirrhosis induced by CBDL (21). Four weeks after surgery (Figure 3A), CBDL led to an increase in spleen and liver weight; along with disrupted liver biochemistry characterized by increased levels of total bilirubin, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, alkaline phosphatase, and  $\gamma$ -glutamyl transferase; and a decrease in albumin (Table E3). The presence of portal hypertension was confirmed by a decrease in portal venous flow measured by hepatic Doppler ultrasound (Figure 3B). The development of IPVDs was observed through contrast echocardiography, which showed a significant increase in left ventricle acoustic signal after three cycles compared with the sham-operated group (Figure 3C). We confirmed these results by injecting fluorescent microspheres into the jugular vein and analyzing their passage to the systemic vasculature and peripheral organs. The total concentration of microspheres in the kidneys was significantly higher in CBDL rats (Figure 3D). Furthermore, CBDL rats also experienced hypoxemia, as evidenced by a significant increase in A-aO<sub>2</sub> (Figure 3E). Fulton index and mPAP were similar between CBDL and sham rats, as were the tricuspid annular plane systolic excursion (TAPSE) and the ratio of acceleration time to ejection time (AT/ET) assessed by echocardiography (Figure E3A).



**Figure 2.** Circulating BMP-9 (bone morphogenetic protein-9) levels assessed by ELISA in patients without pulmonary vascular disorder, with hepatopulmonary syndrome alone, with portopulmonary hypertension alone, or with the combination of both with Child-Pugh class A (A) or class B/C (B) cirrhosis. Comparisons were made using one-way ANOVA followed by a Tukey test. \*\*\*\* $P < 0.0001$  versus no-PVD group and \$\$\$ $P < 0.0001$ . HPS = hepatopulmonary syndrome; NS = not significant ( $P > 0.05$ ); PoPH = portopulmonary hypertension; PVD = pulmonary vascular disorder; w/o PVD = without pulmonary vascular disorder.





**Figure 3.** BMP-9 (bone morphogenetic protein-9) pathway in the common bile duct ligation (CBDL) model. (A) Experimental procedure. (B) Illustration and quantification of portal venous flow by liver Doppler ultrasound in sham-operated and common bile duct ligation rats. (C) Illustration and quantification of contrast-enhanced transthoracic echocardiography. At the top, the illustration shows the four cardiac cavities during injection of an agitated solution: the right ventricle (RV) is surrounded in yellow, the left ventricle (LV) in blue. At the bottom, the yellow curve represents acoustic signal in RV over time, and the blue curve represents acoustic signal in LV over time. The difference in the acoustic signal between baseline and after agitated solution injection is quantified in the RV and LV. (D) Illustration of fluorescent-labeled microspheres in the lung and kidney observed by microscopy after injection into the jugular vein and quantification of the total number of microspheres in one kidney by fluorescence-activated cell sorting. (E) A-aO<sub>2</sub> in arterial blood. (F) Detection of BMP-9 mRNA levels in the liver using qRT-PCR. (G) Circulating BMP-9 levels measured using ELISA. (H) BMP responsive element-luciferase activity in serum. (I) Pulmonary protein expression of phospho-Smad1/5/8 and Id1 determined by Western blot analysis, normalized with  $\beta$ -actin. Illustration of the Western blot represents three individual animals per group. (J) Coimmunostaining of lung sections for phospho-Smad1/5/8 (red), CD31 (green), and DAPI (blue). Comparisons were made using an unpaired *t* test after a Shapiro-Wilk test. \*\*\**P* < 0.001 and \*\*\*\**P* < 0.0001. A-aO<sub>2</sub> = alveolar-arterial oxygen gradient; AU = arbitrary units; BRE = BMP responsive element.

To investigate the role of BMP-9 protein in this well-established model of HPS, analyses were conducted in the liver, blood, and lungs of CBDL rats. BMP-9 mRNA levels exhibited a significant decrease in the liver (Figure 3F), along with a reduction in circulating BMP-9 levels (Figure 3G). To explore the functional activity of BMP-9, BMP responsive element (BRE)-luciferase reporter assays were conducted using rat serum as previously described (26, 27). In CBDL rats, BRE-luciferase activity exhibited a decrease compared with the sham-operated group (Figure 3H). In addition, the levels of p-Smad1/5/8 and Id1, pivotal components of intracellular BMP-9 signaling, were significantly decreased in the lungs of CBDL rats (Figure 3I), particularly in the pulmonary endothelium, as demonstrated by immunofluorescent staining (Figure 3J).

#### **Pulmonary phenotype and HPS features in a long-term PPVL rat model.**

We examined the pulmonary phenotype in a PPVL model at 6 and 10 weeks after surgery. Six weeks after surgery, PPVL rats displayed a reduction in portal venous flow (Figure E4A) associated with IPVDs, as evidenced by positive contrast-enhanced echocardiography and systemic microsphere passage after venous injection (see Figures E4B and E4C). Although there was a trend toward an increased A-aO<sub>2</sub>, no significant difference was observed at this time point (see Figure E4D).

Subsequently, we analyzed the pulmonary phenotype in a long-term PPVL model 10 weeks after surgery (Figure 4A). As anticipated, PPVL rats exhibited an increase in spleen weight, whereas there were no changes in liver weight or liver biochemistry (Table E4). In PPVL rats, there was a decrease in venous flow in the portal vein compared with sham-operated rats (Figure 4B). By the 10th week after PPVL, rats manifested all characteristic features of HPS, encompassing the presence of IPVDs and the development of hypoxemia. We observed a significant increase in the acoustic signal in the left ventricle following contrast-enhanced transthoracic echocardiography (Figure 4C), as well as a significant increase in the number of total microspheres per kidney after venous injection (Figure 4D). In addition, the A-aO<sub>2</sub> was significantly higher in the long-term PPVL group than in the sham-operated group (Figure 4E). Scanning electron microscopy of the pleural surfaces revealed architectural changes in the pulmonary vasculature 10 weeks after PPVL

characterized by dilations of pulmonary capillaries (Figure 4F). Fulton index and measurement of mPAP were similar between long-term PPVL and sham-operated rats, as were TAPSE and the ratio of AT/ET assessed by echocardiography (see Figure E3B).

#### **BMP-9 pathway in the long-term**

**PPVL model.** Ten weeks after PPVL surgery, the rats exhibited reduced levels of hepatic BMP-9 mRNA (Figure 5A) and decreased circulating BMP-9 levels (Figure 5B), as well as lower circulating BRE-luciferase activity (Figure 5C) compared with sham-operated rats. The expression levels of p-Smad1/5/8 and Id1 in the lungs were significantly decreased compared with those in the sham group (Figure 5D), particularly in the endothelial cells (Figure 5E). No pulmonary intravascular macrophages were observed in the lungs of the PPVL rats.

#### **Low-dose FK506, a potent activator of BMP signaling, reverses HPS in CBDL and long-term PPVL models.**

In this study, we administered FK506 by oral gavage at a dose of 0.2 mg/kg/d for 2 weeks in CBDL and long-term PPVL rats. Treatment was initiated at specific time points when we previously observed the HPS phenotype: 4 weeks after CBDL surgery and 10 weeks after PPVL surgery (Figures 6A and 7A). The mean FK506 trough level measured 24 hours after the last administration was  $0.355 \pm 0.171$  ng/ml (SEM) in the CBDL model. In the long-term PPVL model, the mean FK506 trough level was  $0.054 \pm 0.005$  ng/ml, which was lower than that in the CBDL model. Undetectable FK506 levels were observed in the vehicle-treated rats. FK506 treatment induced a significant increase in p-Smad1/5/8 and Id1 expression in the lungs of CBDL and long-term PPVL models compared with vehicle-treated rats. An increase in p-Smad1/5/8 expression was observed in the endothelial cells (Figures 6B and 7B). As expected, FK506 treatment did not change the circulating level of BMP-9 in the two models (Figure E5).

Following FK506 treatment, CBDL and long-term PPVL rats exhibited a substantial decrease in IPVDs and a reduction in hypoxemia severity (Figures 6C and 7C). However, it is important to note that FK506 treatment did not influence the severity of splenomegaly or the reduction in portal venous flow in either model (Tables E5 and E6). These parameters are considered surrogate indicators of portal hypertension. In addition, FK506 treatment had no impact

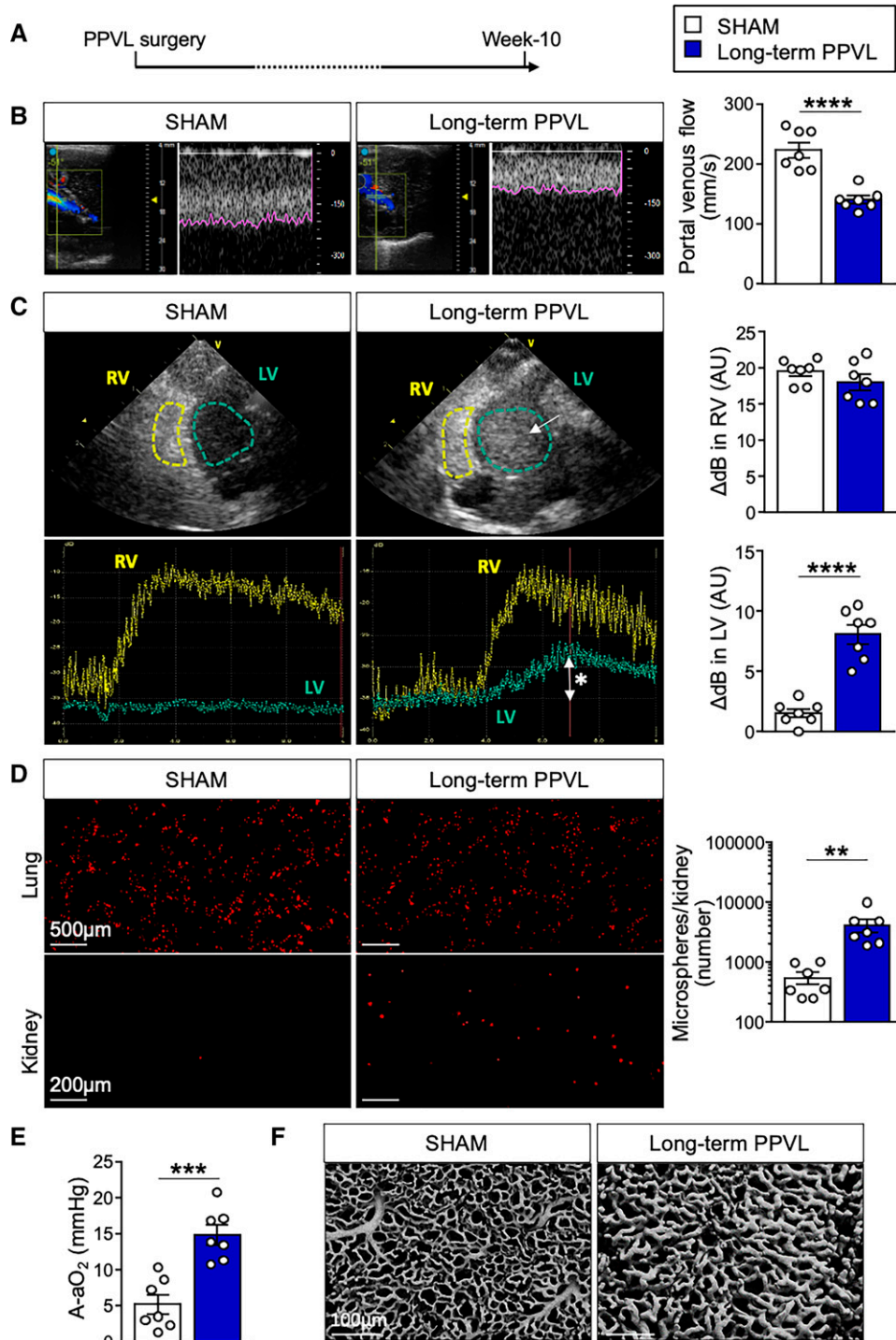
on the severity of biliary cirrhosis in the CBDL model (Figure E6). Because FK506 is often used for its immunosuppressive properties with higher target trough levels, we assessed the blood cell counts in both models. Treatment with low-dose FK506 did not reduce the total white blood cells, neutrophils, or lymphocytes compared with the vehicle group. Thrombocytopenia, a common occurrence in chronic liver disease, was observed in the CBDL and long-term PPVL models, without any influence of FK506 treatment (see Tables E5 and E6). Additionally, in the CBDL model, the percentage of vessels with more than 10 adherent intravascular macrophages increased with or without FK506 treatment, without showing any differences between the two groups. Pulmonary intravascular macrophages were not found in the pulmonary vessels of the sham-operated or long-term PPVL rats (Figure E7).

#### **Spontaneous Development of an “HPS-like” Phenotype in BMP-9 Protein-Knockout Rats**

To explore the role of BMP-9 loss as a potential cause or consequence in the development of IPVDs, we used rats genetically deficient in BMP-9 protein (*Gdf2*<sup>-/-</sup>). The absence of BMP-9 protein was confirmed by the absence of circulating BMP-9 levels and BRE-luciferase activity. *Gdf2*<sup>-/-</sup> rats exhibited an “HPS-like” phenotype characterized by the presence of IPVDs and hypoxemia (Figure 8A) in the absence of cirrhosis or portal hypertension. Scanning electron microscopy of the pleural surface revealed similar features between *Gdf2*<sup>-/-</sup> and PPVL rats, including an increase in the diameter of pulmonary capillaries compared with *Gdf2*<sup>+/+</sup> rats (Figure 8B).

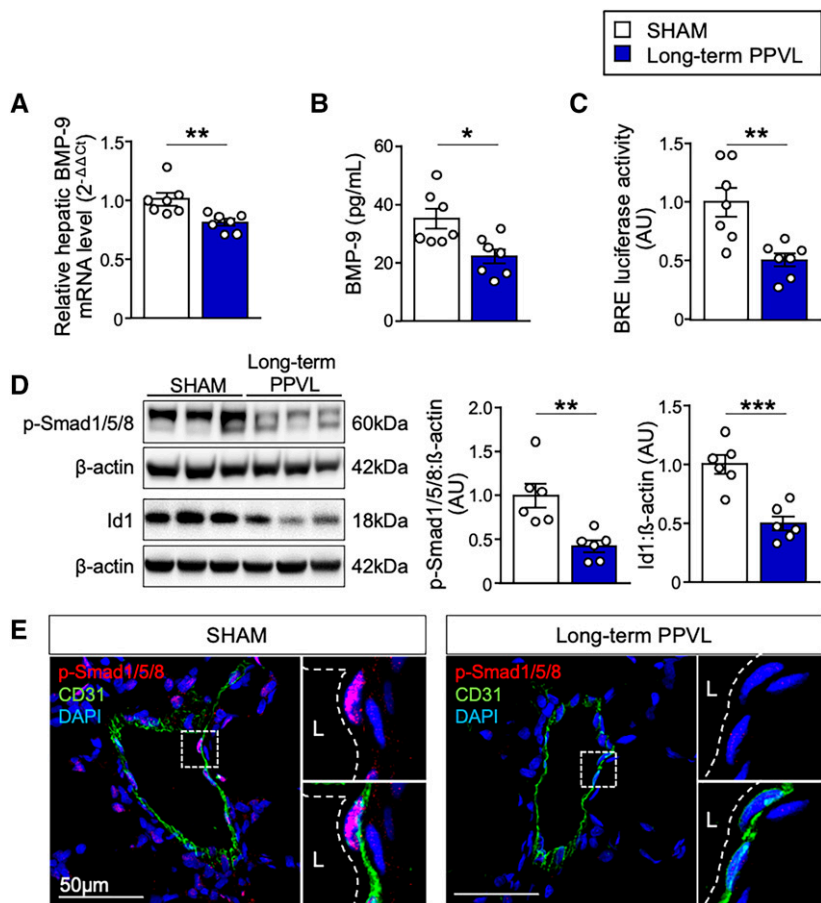
## **Discussion**

Our study provides valuable insights into the relationship between BMP-9, a critical factor primarily synthesized by the liver, and HPS. We confirmed that patients with HPS and compensated cirrhosis had lower BMP-9 levels than those with compensated cirrhosis without HPS. In both rat models of portal hypertension (CBDL and long-term PPVL), there were decreases in the hepatic production of BMP-9, circulating BMP-9 levels, and serum BRE-luciferase activity, resulting in the development of HPS.



**Figure 4.** Long-term PPVL in rats as a new model for hepatopulmonary syndrome without cirrhosis at 10 weeks after surgery. (A) Experimental procedure. (B) Illustration and quantification of portal venous flow analysis by liver Doppler ultrasound. (C) Illustration and quantification of contrast-enhanced transthoracic echocardiogram: difference in acoustic signal between baseline and after agitated solution injection in the right ventricle and left ventricle. (D) Illustration of fluorescent-labeled microspheres in the lung and kidney observed by microscopy after injection into the jugular vein and quantification of the total number of microspheres in one kidney by fluorescence-activated cell sorting. (E) A-aO<sub>2</sub> in arterial blood. (F) Scanning electron microscopy images of the pleural surface using lung vascular casts of sham-operated and partial portal vein ligation rat lungs. Data are presented as mean ± SEM. Comparisons were made using an unpaired *t* test after a Shapiro-Wilk test. \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001, and \*\*\*\**P* < 0.0001. A-aO<sub>2</sub> = alveolar-arterial oxygen gradient; AU = arbitrary units; LV = left ventricle; PPVL = partial portal vein ligation; RV = right ventricle.





**Figure 5.** Development of hepatopulmonary syndrome in the long-term partial portal vein ligation (PPVL) model is associated with a decrease in BMP-9 (bone morphogenetic protein-9) mRNA in the liver, BMP-9 activity in serum, and the BMP-9 pathway in the lungs. (A) Detection of BMP-9 mRNA levels in the liver using qRT-PCR. (B) Circulating BMP-9 levels measured using ELISA. (C) BMP responsive element-luciferase activity in serum. (D) Pulmonary protein expression of phospho-Smad1/5/8 and Id1 determined by Western blot analysis, normalized with  $\beta$ -actin. Illustration of the Western blot represents three individual animals per group. (E) Coimmunostaining of lung sections for phospho-Smad1/5/8 (red), CD31 (green), and DAPI (blue). Data are presented as mean  $\pm$  SEM. Comparisons were made using an unpaired *t* test after a Shapiro-Wilk test. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , and \*\*\* $P < 0.001$ . AU = arbitrary units; BRE = BMP responsive element.

Moreover, phosphorylated Smad1/5/8 levels and Id1 expression within the pulmonary endothelium were reduced in the HPS rats. Notably, the treatment of HPS rats with low doses of FK506 restored phosphorylated Smad1/5/8 and Id1 levels, mitigated IPVDs, and improved gas exchange impairment. Furthermore, *Gdf2*<sup>-/-</sup> rats lacking BMP-9 exhibited mild hypoxemia and IPVDs mimicking HPS, providing further evidence of the role of BMP-9 deficiency in HPS development. Collectively, our findings support the hypothesis that portal hypertension with or without cirrhosis can trigger a decrease in BMP-9 production in

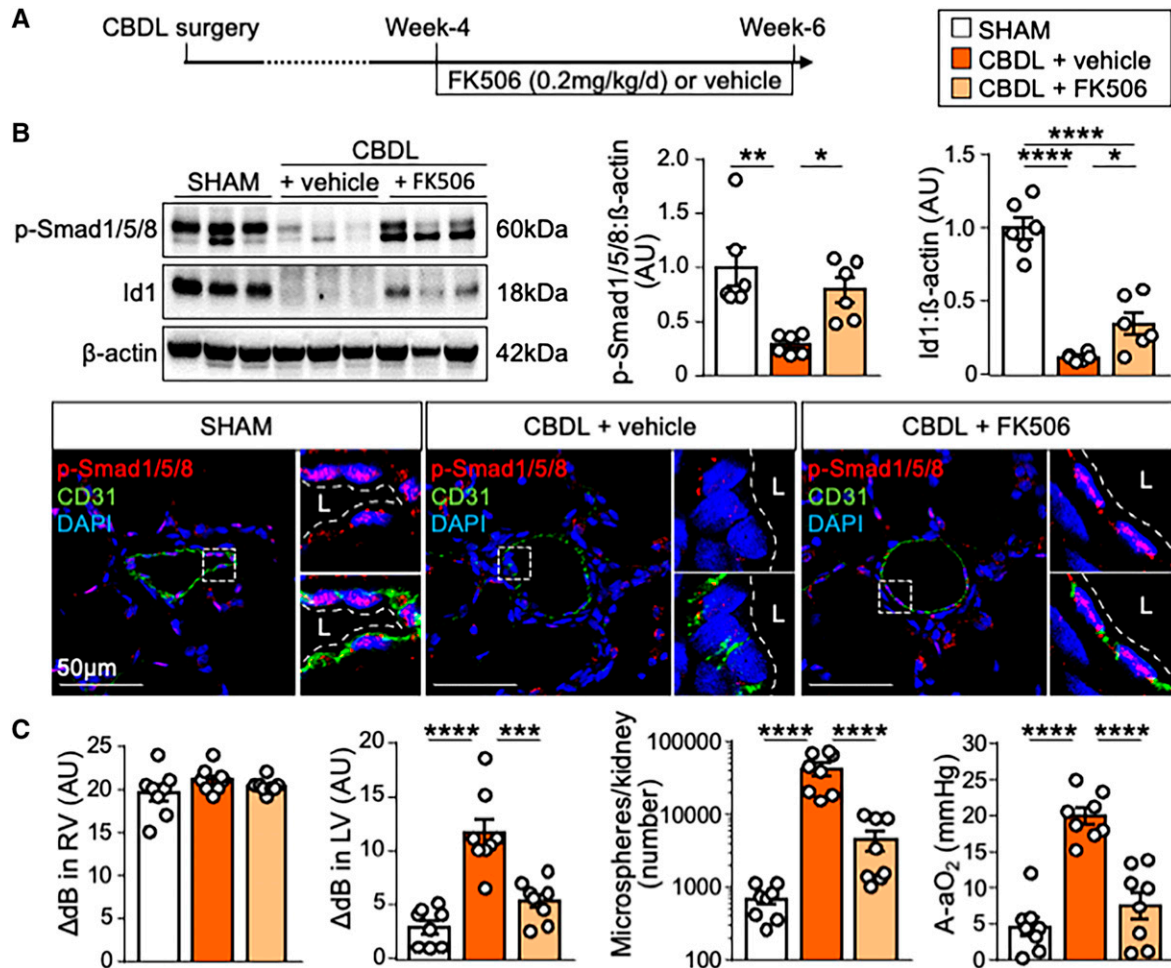
the liver, leading to the development of IPVDs and HPS.

The Glenn procedure, which involves bidirectional superior vena cavopulmonary anastomosis, is a standard surgical procedure for children with single-ventricle physiology. Following this surgery, patients commonly develop pulmonary vascular abnormalities characterized by an increased number of blood vessels, pulmonary arteriovenous malformations (AVMs), and vasodilation, even without evident pulmonary AVMs (28–30). These lesions closely resemble those observed in patients with HPS. Interestingly, surgical redirection of hepatic venous flow to

the pulmonary vascular bed (also known as the Fontan procedure) leads to regression of pulmonary AVMs (31–33). Privation of liver-derived factors is believed to play a crucial role in the development of pulmonary AVMs following a Glenn procedure, underscoring the significance of these factors in maintaining pulmonary vascular integrity.

To date, the CBDL model is the only model that recapitulates the pulmonary features of HPS (21), and it has been instrumental in investigating the underlying mechanisms of HPS. Several suspected factors responsible for HPS development were investigated using this model. Multiple preclinical studies support the notion that proangiogenic, inflammatory, or vasodilatory factors may be involved in HPS pathophysiology (34). However, the translation to clinical practice was unsuccessful, as no clinical trial has demonstrated a beneficial outcome for patients with HPS (34–36).

BMP-9 is a liver-derived factor that plays a crucial role in maintaining the balance between vasomotor function and vascular tissue homeostasis in the lungs, providing protection to the vascular endothelium. BMP-9 binds with high affinity to ALK1, BMPRII (BMP type II receptor), and endoglin, which are highly expressed in the lung vascular endothelial cells (12, 13, 37). It is widely accepted that alterations in the BMP-9 signaling pathway play a central role in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension and hereditary hemorrhagic telangiectasia, the latter being characterized by AVMs (13–15). In our study, we observed a mild reduction in serum BMP-9 levels in patients classified as having Child-Pugh class A cirrhosis, whereas patients categorized as Child-Pugh class B or C cirrhosis exhibited a dramatic reduction in serum BMP-9 levels regardless of the condition of the pulmonary circulation. These findings validated and extend previous observations (16, 18). Among individuals with mild cirrhosis, those diagnosed with HPS showed significantly lower BMP-9 levels. Furthermore, we demonstrated that the resolution of HPS after liver transplantation correlated with the normalization of circulating BMP-9 levels. Our study suggests that low BMP-9 levels are a crucial factor in HPS development, as all patients with HPS manifested a substantial reduction in circulating BMP-9. Conversely, severe cirrhosis was associated with reduced circulating BMP-9 levels, but not all such



**Figure 6.** Common bile duct ligation (CBDL) model: a low dose of FK506, a high activator of BMP (bone morphogenetic protein) signaling, administered *per os* at 0.2mg/kg/d for 2 weeks reverses hepatopulmonary syndrome. (A) Experimental procedure in CBDL rats. (B) Pulmonary protein expression of phospho-Smad1/5/8 and Id1 determined by Western blot analysis normalized with  $\beta$ -actin and coimmunostaining of lung sections for phospho-Smad1/5/8 (red), CD31 (green), and DAPI (blue). Illustration of the Western blot represents three individual animals per group. (C) Presence of intrapulmonary vascular dilations and hypoxemia detected by contrast-enhanced transthoracic echocardiography, quantification of fluorescently-labeled microspheres in one kidney, and analysis of A-aO<sub>2</sub> in arterial blood. Data are presented as mean  $\pm$  SEM. Comparisons were made using one-way ANOVA followed by a Tukey test. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , and \*\*\*\* $P < 0.0001$ . A-aO<sub>2</sub> = alveolar-arterial oxygen gradient; AU = arbitrary units; LV = left ventricle; RV = right ventricle.

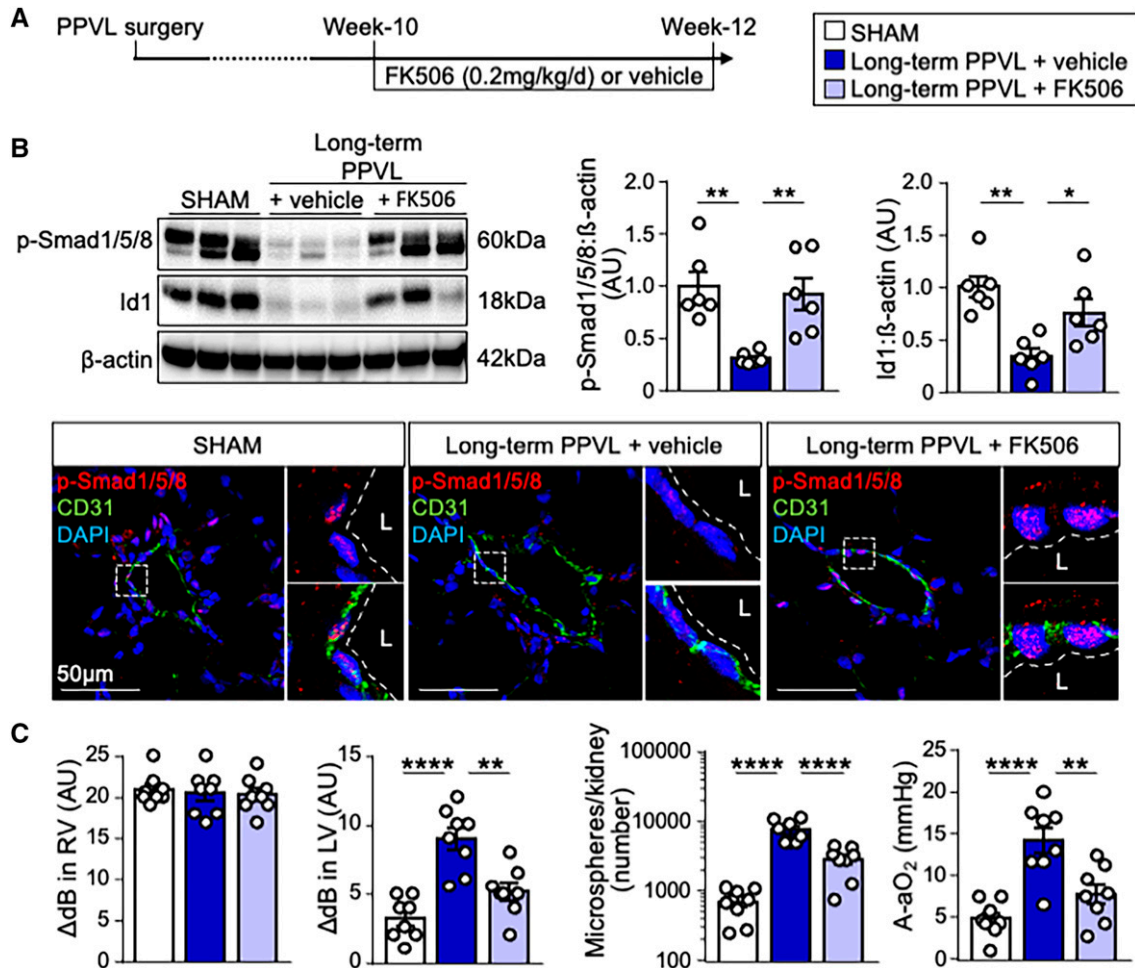
patients develop HPS. Our findings align with a more comprehensive understanding of patients with dysfunction in the BMP-9–BMPRII–ALK1–endoglin pathway, emphasizing that not all individuals with this dysfunction invariably develop associated pulmonary vascular disorders (15). This suggests that additional unknown cofactors may contribute to the development of pulmonary vascular disease induced by congenital or acquired BMP-9 pathway dysfunction, as observed in patients with liver disease.

Given that PoPH and HPS are two interrelated pathologies triggered by the same factor, portal hypertension, it is plausible that they coexist, as previously

demonstrated (38). Our investigation thus aimed to explore whether each condition independently influences circulating BMP9 levels. In contrast to previous studies (16–18), our findings did not reveal reduced levels of circulating BMP-9 in patients with isolated PoPH compared with patients with cirrhosis without pulmonary vascular disorders. However, within the subgroup of compensated cirrhosis, individuals with a combination of PoPH and HPS exhibited lower BMP-9 levels, akin to those observed in isolated HPS cases. The sensitivity of BMP-9 in distinguishing between these conditions may be influenced by various factors, such as the severity of liver disease and the necessity for a well-defined patient

phenotype with systematic HPS screening in patients with PoPH. A prospective, multicenter study conducted in a cohort of patients with precisely characterized phenotypes could prove valuable in advancing our understanding of the implications of BMP-9 in PoPH and HPS.

Previous evidence indicates that the inhibition or deletion of BMP-9 in rodents does not predispose to the development of pulmonary hypertension; instead, it exerts beneficial effects against experimental pulmonary hypertension induced by chronic hypoxia, Sugen/hypoxia, or monocrotaline injection (13, 39). In addition, our observations revealed that *Gdf2*<sup>-/-</sup> rats, which lack the BMP-9 protein, exhibited a



**Figure 7.** Reversal of hepatopulmonary syndrome in the long-term partial portal vein ligation (PPVL) model by low-dose FK506, a potent activator of BMP (bone morphogenetic protein) signaling, administered orally at 0.2mg/kg/d for 2 weeks. (A) Experimental procedure in PPVL rats. (B) Pulmonary protein expression of phospho-Smad1/5/8 and Id1 determined by Western blot analysis normalized with  $\beta$ -actin, along with coimmunostaining of lung sections for phospho-Smad1/5/8 (red), CD31 (green), and DAPI (blue). Illustration of the Western blot represents three individual animals per group. (C) Presence of intrapulmonary vascular dilations and hypoxemia detected by contrast-enhanced transthoracic echocardiography, quantification of fluorescent-labeled microspheres in one kidney, and analysis of the A-aO<sub>2</sub> in arterial blood. Comparisons were made using one-way ANOVA followed by a Tukey test. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , and \*\*\*\* $P < 0.0001$ . A-aO<sub>2</sub> = alveolar-arterial oxygen gradient; AU = arbitrary units; LV = left ventricle; RV = right ventricle.

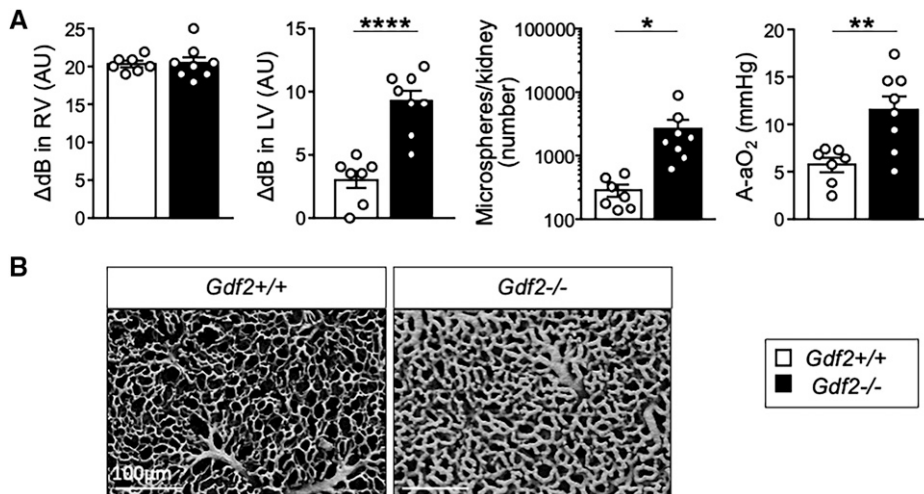
pulmonary phenotype resembling that of HPS. These rats displayed mild hypoxemia and the development of IPVDs, providing additional compelling evidence supporting the notion that BMP-9 loss plays a role in the pathogenesis of HPS.

Furthermore, we obtained several pieces of experimental evidence *in vivo* that support the contribution of BMP-9 loss to HPS development. Although no animal model fully replicates all the clinical and pathophysiological features of HPS, understanding its pathophysiology and developing medical therapies relies heavily on animal models, particularly those with cirrhosis. It is well known that HPS can

occur in patients with extrahepatic portal hypertension or a congenital portosystemic shunt, highlighting that cirrhosis is not a necessary condition for the development of HPS. The PPVL model is widely used in hepatic studies. Some evidence suggests that PPVL rats did not develop IPVDs or gas-exchange impairment 2–3 weeks after surgery (21) but exhibited increased vascular synthesis of nitric oxide and circulating nitrate ions (40–42) and higher lung expression of heme oxygenase-1 and inducible nitric oxide synthase (43). Administration of low-dose endothelin-1 in the setting of prehepatic portal hypertension exerts a vasodilatory effect in lung

vasculature (44). Based on these observations, PPVL appears to induce short-term functional alterations in the pulmonary vasculature without significant clinical effects at this stage. In our study, we analyzed the long-term effects of PPVL on the pulmonary vasculature and demonstrated that rats develop IPVDs 6 weeks after surgery and the full HPS phenotype 10 weeks after surgery. Based on these findings, we hypothesized that previous studies prematurely analyzed the pulmonary phenotypes of PPVL rats. The demonstration of IPVDs leading to abnormal arterial oxygenation 10 weeks after partial ligation of the portal vein opens a new field of investigation in HPS. Unlike the





**Figure 8.** *Gdf2*<sup>-/-</sup> rats spontaneously develop a hepatopulmonary syndrome-like phenotype. (A) Presence of IPVDs and hypoxemia in *Gdf2*<sup>-/-</sup> rats compared with *Gdf2*<sup>+/+</sup> rats detected by contrast-enhanced transthoracic echocardiography, quantification of fluorescent-labeled microspheres in one kidney, and analysis of A-aO<sub>2</sub> in arterial blood. (B) Lung pleural vascular cast images of *Gdf2*<sup>-/-</sup> rats compared with *Gdf2*<sup>+/+</sup> rats. Comparisons were made using an unpaired *t* test after a Shapiro-Wilk test. \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, and \*\*\*\**P* < 0.0001. A-aO<sub>2</sub> = alveolar-arterial oxygen gradient; AU = arbitrary units; LV = left ventricle; RV = right ventricle.

CBDL model, long-term PPVL does not induce biological or histological signs of cirrhosis. In addition, recruitment of intravascular pulmonary macrophages was not observed in this model of portal hypertension, suggesting that HPS may be first induced by dysregulation of circulating mediators and associated biological pathways in the pulmonary vasculature more than intrapulmonary vascular inflammation induced by biliary cirrhosis. Interestingly, decreases in liver BMP-9 expression, circulating BMP-9 and BRE-luciferase activity, and pulmonary BMP-9 signaling was observed in the CBDL and long-term PPVL models. These *in vivo* observations are consistent with our findings showing low levels of BMP-9 in patients with portal hypertension without cirrhosis, highlighting portal hypertension as a sufficient trigger of hepatic BMP-9 production impairment. Exploration of the BMP-9 pathway in a larger cohort of patients with extrahepatic portal hypertension is required to validate these results.

Further research would be needed to elucidate the mechanisms underlying the modulation of disease onset in HPS by BMP-9/Smad signaling. Previous studies from our group and others have underscored the role of BMP-9 in regulating pulmonary vascular

tone and angiogenesis, pivotal components in HPS pathophysiology. BMP-9 has been shown to regulate the expression of endothelium-derived factors responsible for vascular relaxation and constriction, thereby exerting influence over vascular tone (13). In addition, BMP-9 plays a critical role in maintaining vascular endothelial quiescence. *In vitro* studies conducted on human pulmonary microvascular endothelial cells have demonstrated the capacity of BMP-9 to reduce tube formation, migration, and proliferation. Moreover, recent findings indicate that BMP-9 inhibits the activation of robust proangiogenic signaling mediated by VEGFR2 following VEGF stimulation. In line with this observation, the depletion of BMP-9 using the ligand trap ALK1-Fc has shown the converse effect, resulting in increases in tube formation, migration, and proliferation of pulmonary endothelial cells (45). These findings highlight the intricate interplay between BMP-9 signaling and angiogenesis regulation, shedding light on potential therapeutic targets for conditions like HPS.

The beneficial role of BMP-9 in HPS has also been investigated through the use of FK506, an activator of the BMP-9 pathway via FKBP12 binding (24, 25). Remarkably, this treatment restored the levels of

phosphorylated Smad1/5/8 and Id1, ameliorated IPVDs, and improved gas exchange impairment in both HPS models, without any change in liver disease severity. These findings suggest the potential of targeting the BMP-9 pathway as a therapeutic strategy for treating HPS. We demonstrated that a low dose of FK506 with low trough levels was sufficient to activate lung BMP-9 signaling *in vivo*. The beneficial effects of FK506 treatment, particularly in the CBDL model with extremely low circulating BMP-9 levels and BRE-luciferase activity, may be attributed to the binding of other BMP ligands to type I receptors on endothelial cells after FKBP12 removal (46). Hepatic metabolism and immunosuppressive effects of tacrolimus are two serious limitations to its long-term administration in patients with cirrhosis. However, in line with previous evidence (24), low doses of FK506 were sufficient in our study to induce the activation of Smad1/5/8 phosphorylation without significant changes in blood counts or recruitment of intrapulmonary vascular macrophages. Another alternative would be to use more specific therapies targeting the BMP-9 pathway such as FKBP and Smurf1 inhibitors that are under development (47, 48).

In conclusion, our study sheds light on the pivotal role of BMP-9 in the pathogenesis of HPS. The involvement of liver-derived factors underscores their significance in the development of HPS. The identification of the BMP-9 pathway as a potential therapeutic target holds promise for innovative interventions in HPS. ■

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

**Acknowledgment:** The authors thank the animal facility staff at the "Ingénierie et Plateformes au Service de l'Innovation Thérapeutique (IPSIT)" for their assistance with the animals, all the pathologists and technicians from the Centre de Recherche Biologique at Centre Hospitalier Universitaire Bicêtre for their invaluable expertise and support (Pr. Céline Verstuyft, Julie Tisserand, Allison Cardoso), Amaria Remil for blood collection in the pediatric cohort, the French PAH patient association (HTAP France) and all the participants in the French PH Network PulmoTension for their contributions to the study, Allegra Leghissa for kindly performing FK506 level measurements in this study, and Maxime Surbier for performing Picrosirius Red staining analysis on liver sections.

## References

- Rodríguez-Roisin R, Krowka MJ. Hepatopulmonary syndrome—a liver-induced lung vascular disorder. *N Engl J Med* 2008;358:2378–2387.
- Raevens S, Boret M, Fallon MB. Hepatopulmonary syndrome. *JHEP Rep* 2022;4:100527.
- Younis I, Sarwar S, Butt Z, Tanveer S, Qaadir A, Jadoon NA. Clinical characteristics, predictors, and survival among patients with hepatopulmonary syndrome. *Ann Hepatol* 2015;14:354–360.
- Schenk P, Schöniger-Hekele M, Fuhrmann V, Madl C, Silberhumer G, Müller C. Prognostic significance of the hepatopulmonary syndrome in patients with cirrhosis. *Gastroenterology* 2003;125:1042–1052.
- Schenk P, Fuhrmann V, Madl C, Funk G, Lehr S, Kandel O, et al. Hepatopulmonary syndrome: prevalence and predictive value of various cut offs for arterial oxygenation and their clinical consequences. *Gut* 2002;51:853–859.
- Kawut SM, Krowka MJ, Forde KA, Al-Naamani N, Krok KL, Patel M, et al.; Pulmonary Vascular Complications of Liver Disease Study Group. Impact of hepatopulmonary syndrome in liver transplantation candidates and the role of angiogenesis. *Eur Respir J* 2022;60:2102304.
- Fallon MB, Krowka MJ, Brown RS, Trotter JF, Zacks S, Roberts KE, et al.; Pulmonary Vascular Complications of Liver Disease Study Group. Impact of hepatopulmonary syndrome on quality of life and survival in liver transplant candidates. *Gastroenterology* 2008;135:1168–1175.
- Krowka MJ, Fallon MB, Kawut SM, Fuhrmann V, Heimbach JK, Ramsay MAE, et al. International Liver Transplant Society practice guidelines: diagnosis and management of hepatopulmonary syndrome and portopulmonary hypertension. *Transplantation* 2016;100:1440–1452.
- Desroches-Castan A, Tillet E, Bouvard C, Bailly S. BMP9 and BMP10: two close vascular quiescence partners that stand out. *Dev Dyn* 2022;251:178–197.
- Ricard N, Ciais D, Levet S, Subileau M, Mallet C, Zimmers TA, et al. BMP9 and BMP10 are critical for postnatal retinal vascular remodeling. *Blood* 2012;119:6162–6171.
- Ricard N, Bailly S, Guignabert C, Simons M. The quiescent endothelium: signalling pathways regulating organ-specific endothelial normalcy. *Nat Rev Cardiol* 2021;18:565–580.
- Bidart M, Ricard N, Levet S, Samson M, Mallet C, David L, et al. BMP9 is produced by hepatocytes and circulates mainly in an active mature form complexed to its prodomain. *Cell Mol Life Sci* 2012;69:313–324.
- Tu L, Desroches-Castan A, Mallet C, Guyon L, Cumont A, Phan C, et al. Selective BMP-9 inhibition partially protects against experimental pulmonary hypertension. *Circ Res* 2019;124:846–855.
- Tillet E, Bailly S. Emerging roles of BMP9 and BMP10 in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Front Genet* 2015;5:456.
- Aldred MA, Morrell NW, Guignabert C. New mutations and pathogenesis of pulmonary hypertension: progress and puzzles in disease pathogenesis. *Circ Res* 2022;130:1365–1381.
- Owen NE, Alexander GJ, Sen S, Bunclark K, Polwarth G, Pepke-Zaba J, et al. Reduced circulating BMP10 and BMP9 and elevated endoglin are associated with disease severity, decompensation and pulmonary vascular syndromes in patients with cirrhosis. *EBioMedicine* 2020;56:102794.
- Rochon ER, Krowka MJ, Bartolome S, Heresi GA, Bull T, Roberts K, et al. BMP9/10 in pulmonary vascular complications of liver disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2020;201:1575–1578.
- Nikolic I, Yung L-M, Yang P, Malhotra R, Paskin-Flerlage SD, Dinter T, et al. Bone morphogenetic protein 9 is a mechanistic biomarker of portopulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2019;199:891–902.
- Abrams GA, Jaffe CC, Hoffer PB, Binder HJ, Fallon MB. Diagnostic utility of contrast echocardiography and lung perfusion scan in patients with hepatopulmonary syndrome. *Gastroenterology* 1995;109:1283–1288.
- Humbert M, Kovacs G, Hoeper MM, Badagliacca R, Berger RMF, Brista M, et al. 2022 ESC/ERS guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 2023;61:2200879.
- Fallon MB, Abrams GA, McGrath JW, Hou Z, Luo B. Common bile duct ligation in the rat: a model of intrapulmonary vasodilatation and hepatopulmonary syndrome. *Am J Physiol* 1997;272:G779–G784.
- Chojkier M, Groszmann RJ. Measurement of portal-systemic shunting in the rat by using gamma-labeled microspheres. *Am J Physiol* 1981;240:G371–G375.
- Easter DW, Wade JB, Boyer JL. Structural integrity of hepatocyte tight junctions. *J Cell Biol* 1983;96:745–749.
- Spiekerkoetter E, Tian X, Cai J, Hopper RK, Sudheendra D, Li CG, et al. FK506 activates BMPR2, rescues endothelial dysfunction, and reverses pulmonary hypertension. *J Clin Invest* 2013;123:3600–3613.
- Ruiz S, Chandakkar P, Zhao H, Papoin J, Chatterjee PK, Christen E, et al. Tacrolimus rescues the signaling and gene expression signature of endothelial ALK1 loss-of-function and improves HHT vascular pathology. *Hum Mol Genet* 2017;26:4786–4798.
- David L, Mallet C, Mazerbourg S, Feige JJ, Bailly S. Identification of BMP9 and BMP10 as functional activators of the orphan activin receptor-like kinase 1 (ALK1) in endothelial cells. *Blood* 2007;109:1953–1961.
- Ricard N, Bidart M, Mallet C, Lesca G, Giraud S, Prudent R, et al. Functional analysis of the BMP9 response of ALK1 mutants from HHT2 patients: a diagnostic tool for novel ACVRL1 mutations. *Blood* 2010;116:1604–1612.
- Feinstein JA, Moore P, Rosenthal DN, Puchalski M, Brook MM. Comparison of contrast echocardiography versus cardiac catheterization for detection of pulmonary arteriovenous malformations. *Am J Cardiol* 2002;89:281–285.
- Larsson ES, Solymar L, Eriksson BO, de Wahl Granelli A, Mellander M. Bubble contrast echocardiography in detecting pulmonary arteriovenous malformations after modified Fontan operations. *Cardiol Young* 2001;11:505–511.
- Bernstein HS, Brook MM, Silverman NH, Bristow J. Development of pulmonary arteriovenous fistulae in children after cavopulmonary shunt. *Circulation* 1995;92:II309–II314.
- Shah MJ, Rychik J, Fogel MA, Murphy JD, Jacobs ML. Pulmonary AV malformations after superior cavopulmonary connection: resolution after inclusion of hepatic veins in the pulmonary circulation. *Ann Thorac Surg* 1997;63:960–963.
- Lee J, Menkis AH, Rosenberg HC. Reversal of pulmonary arteriovenous malformation after diversion of anomalous hepatic drainage. *Ann Thorac Surg* 1998;65:848–849.
- Agnoletti G, Borghi A, Anneschino FP, Crupi G. Regression of pulmonary fistulas in congenital heart disease after redirection of hepatic venous flow to the lungs. *Ann Thorac Surg* 2001;72:909–911.
- Raevens S, Fallon MB. Potential clinical targets in hepatopulmonary syndrome: lessons from experimental models. *Hepatology* 2018;68:2016–2028.
- Gupta S, Faughnan ME, Lilly L, Hutchison S, Fowler R, Bayoumi AM. Norfloxacin therapy for hepatopulmonary syndrome: a pilot randomized controlled trial. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2010;8:1095–1098.
- Kawut SM, Ellenberg SS, Krowka MJ, Goldberg D, Vargas H, Koch D, et al. Sorafenib in hepatopulmonary syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Liver Transpl* 2019;25:1155–1164.
- Guignabert C, Humbert M. Targeting transforming growth factor- $\beta$  receptors in pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 2021;57:2002341.
- Fussner LA, Iyer VN, Cartin-Ceba R, Lin G, Watt KD, Krowka MJ. Intrapulmonary vascular dilatations are common in portopulmonary hypertension and may be associated with decreased survival. *Liver Transpl* 2015;21:1355–1364.
- Bouvard C, Tu L, Rossi M, Desroches-Castan A, Berrebeh N, Helfer E, et al. Different cardiovascular and pulmonary phenotypes for single- and double-knock-out mice deficient in BMP9 and BMP10. *Cardiovasc Res* 2022;118:1805–1820.
- Pateron D, Tazi KA, Sogni P, Heller J, Chagneau C, Poirel O, et al. Role of aortic nitric oxide synthase 3 (eNOS) in the systemic vasodilation of portal hypertension. *Gastroenterology* 2000;119:196–200.
- Hori N, Takahashi H, Okanoue T, Sawa Y, Mori T, Takami S, et al. Augmented endogenous nitric oxide production in partial portal vein-ligated rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1995;22:506–511.



42. Martin PY, Ginès P, Schrier RW. Nitric oxide as a mediator of hemodynamic abnormalities and sodium and water retention in cirrhosis. *N Engl J Med* 1998;339:533–541.
43. Schroeder RA, Ewing CA, Sitzmann JV, Kuo PC. Pulmonary expression of iNOS and HO-1 protein is upregulated in a rat model of prehepatic portal hypertension. *Dig Dis Sci* 2000;45:2405–2410.
44. Zhang M, Luo B, Chen S-J, Abrams GA, Fallon MB. Endothelin-1 stimulation of endothelial nitric oxide synthase in the pathogenesis of hepatopulmonary syndrome. *Am J Physiol* 1999;277:G944–G952.
45. Berrebeh N, Mbouamboua Y, Thuillet R, Ottaviani M, Chelgham MK, Magnone V, *et al.* Bone morphogenetic protein-9 controls pulmonary vascular growth and remodeling [preprint]. medRxiv; 2023 [accessed 2023 Jun 5]. Available from: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2023.06.02.23290910v1.full.pdf>.
46. Quist-Løkken I, Andersson-Rusch C, Kastnes MH, Kolos JM, Jatzlau J, Hella H, *et al.* FKBP12 is a major regulator of ALK2 activity in multiple myeloma cells. *Cell Commun Signal* 2023;21:25.
47. Kolos JM, Pomplun S, Jung S, Rieß B, Purder PL, Voll AM, *et al.* Picomolar FKBP inhibitors enabled by a single water-displacing methyl group in bicyclic [4.3.1] aza-amides. *Chem Sci (Camb)* 2021;12:14758–14765.
48. Abdel-Magid AF. Therapeutic potential of smurf-1 inhibitors for the treatment of pulmonary arterial hypertension (PAH). *ACS Med Chem Lett* 2016;7:878–880.

## ONLINE DATA SUPPLEMENT

---

### **Disrupted BMP-9 Signaling Impairs Pulmonary Vascular Integrity in Hepatopulmonary Syndrome**

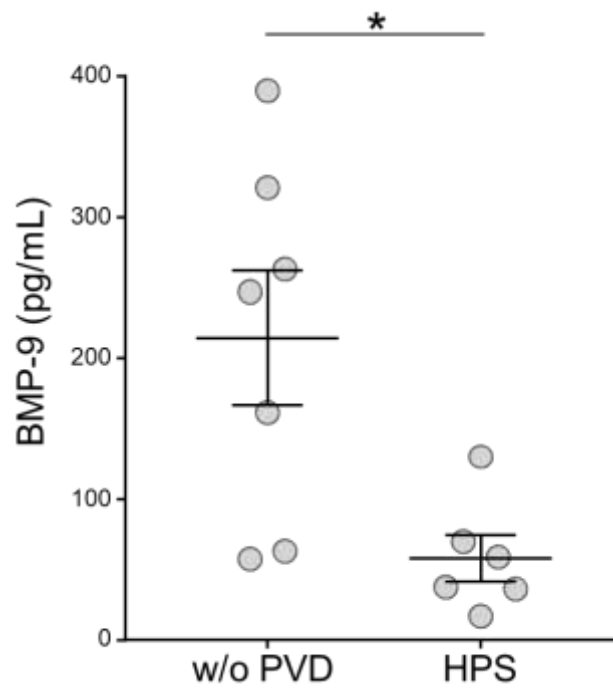
**Fabien Robert**<sup>1,2</sup>, Marie-Caroline Certain<sup>1,2,3</sup>, Audrey Baron<sup>1,2,3</sup>, Raphaël Thuillet<sup>1,2</sup>, Léa Duhaut<sup>4,5</sup>, Mina Ottaviani<sup>1,2</sup>, Mustapha Kamel Chelgham<sup>1,2</sup>, Corinne Normand<sup>1,2</sup>, Nihel Berrebeh<sup>1,2</sup>, Nicolas Ricard<sup>6</sup>, Valerie Furlan<sup>7</sup>, Agnès Desroches-Castan<sup>6</sup>, Emmanuel Gonzales<sup>5,8</sup>, Emmanuel Jacquemin<sup>5,8</sup>, Olivier Sitbon<sup>1,2,3</sup>, Marc Humbert<sup>1,2,3</sup>, Sabine Bailly<sup>6</sup>, Audrey Coilly<sup>4,5</sup>, Christophe Guignabert<sup>1,2</sup>, Ly Tu<sup>1,2</sup>, Laurent Savale<sup>1,2,3</sup>

## SUPPLEMENTARY FIGURES

---

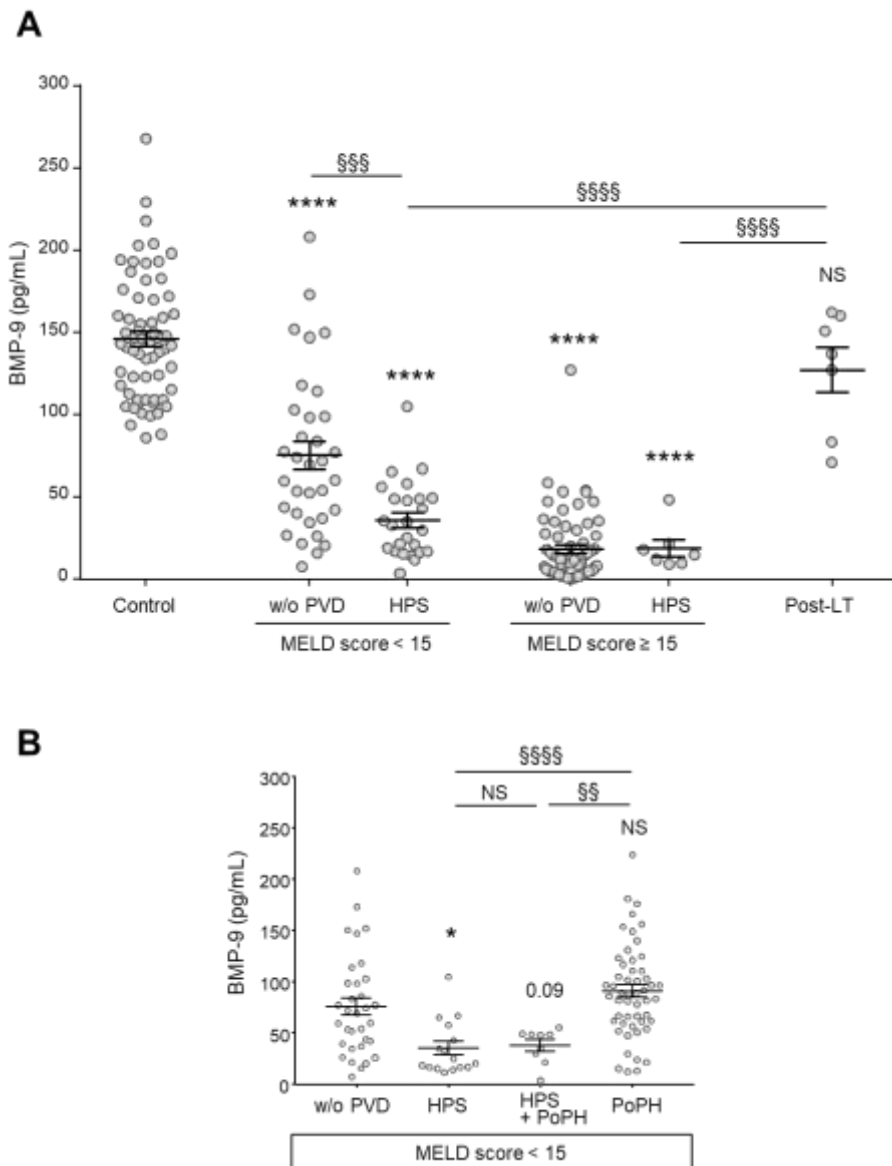
**Figure E1. Circulating BMP-9 levels in pediatric cohort of biliary atresia with compensated cirrhosis without pulmonary vascular disorder (w/o PVD) and with hepatopulmonary syndrome (HPS).**

Comparisons were made using unpaired t-test after Shapiro-Wilk test. \* $p < 0.05$ .



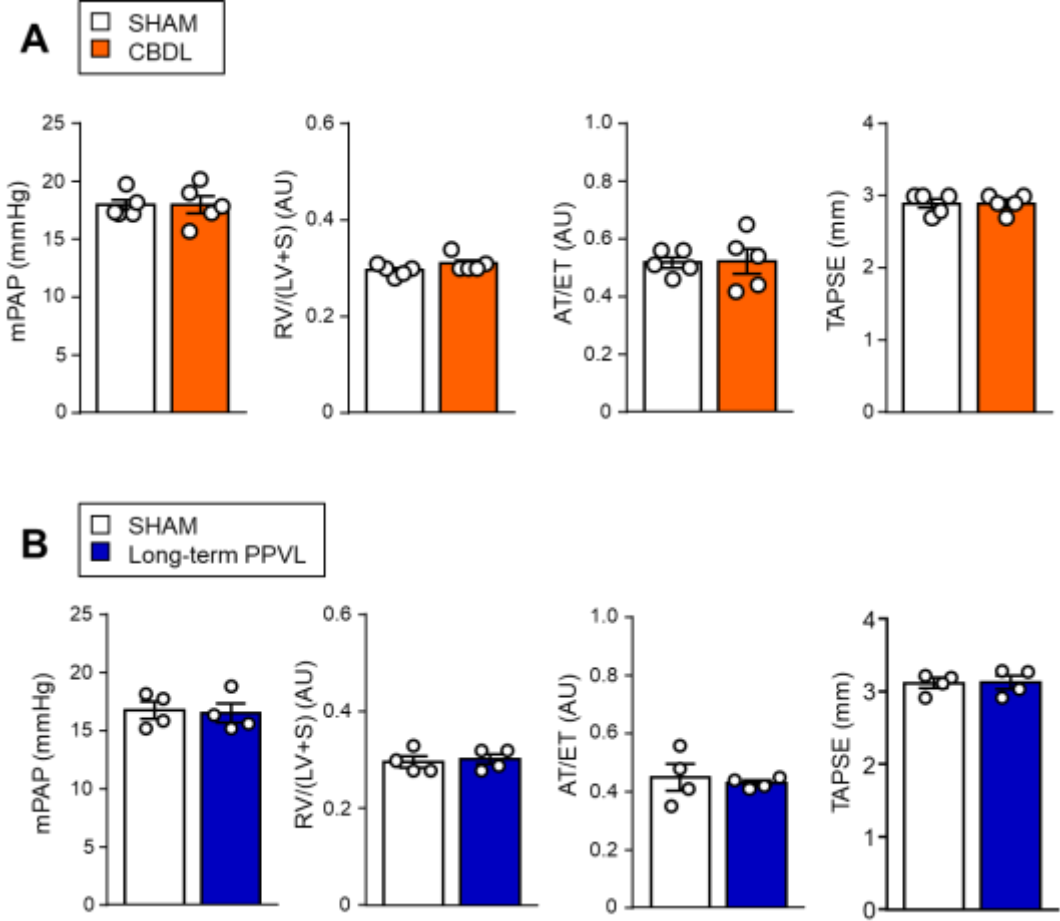
**Figure E2. Circulating BMP-9 levels in HPS and PoPH patients according to the MELD score.**

(A) Serum BMP-9 levels in healthy subjects (control), patients with cirrhosis without pulmonary vascular disorder (w/o PVD) or with hepatopulmonary syndrome (HPS) and in patients who underwent liver transplantation with a pre-existing diagnosis of HPS before the surgical procedure (Post-LT). (B) Serum BMP-9 levels in patients without PVD, with HPS alone, portopulmonary hypertension alone (PoPH) or the combination of both (HPS + PoPH). Comparisons were made using one-way ANOVA followed by the Tukey test. NS = not significant ( $p > 0.05$ ); \* $p < 0.05$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  vs control or vs w/o PVD.  $^{\$}$  $p < 0.01$ ,  $^{\$ \$}$  $p < 0.001$ ,  $^{\$ \$ \$}$  $p < 0.0001$ .



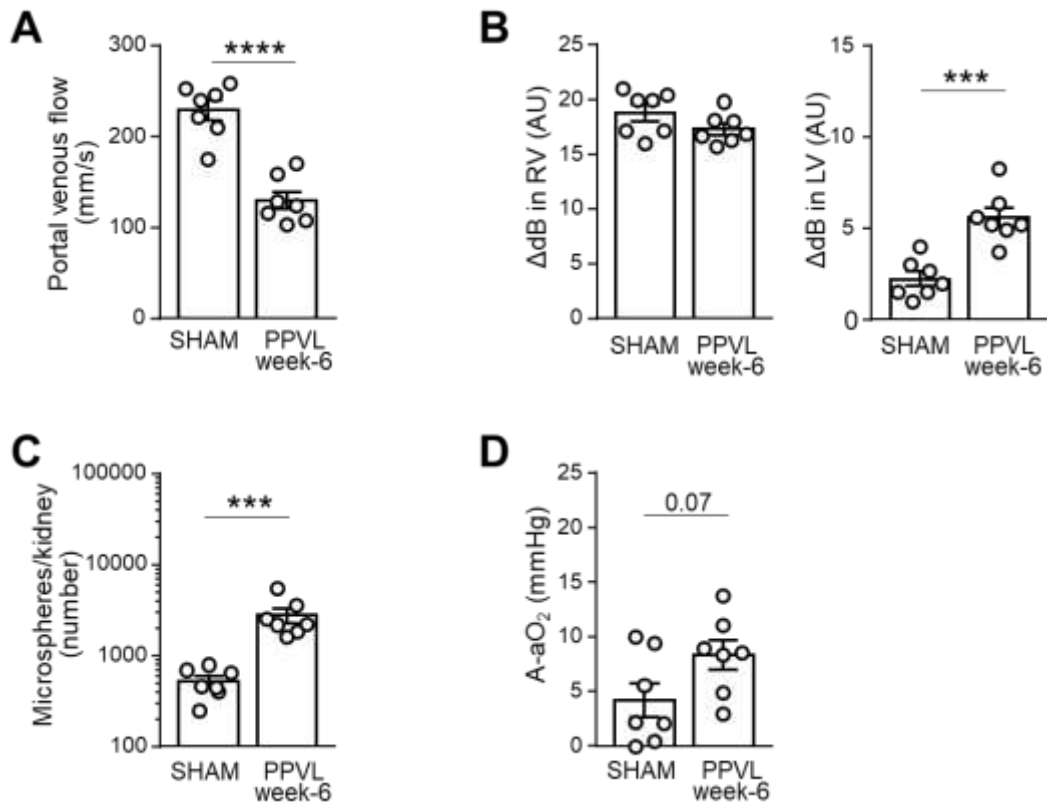
**Figure E3. Mean pulmonary arterial pressure, Fulton index (RV/(LV+S)) and echocardiographic parameters (TAPSE and AT/ET).**

**(A)** CBDL rats and **(B)** long-term PPVL rats.



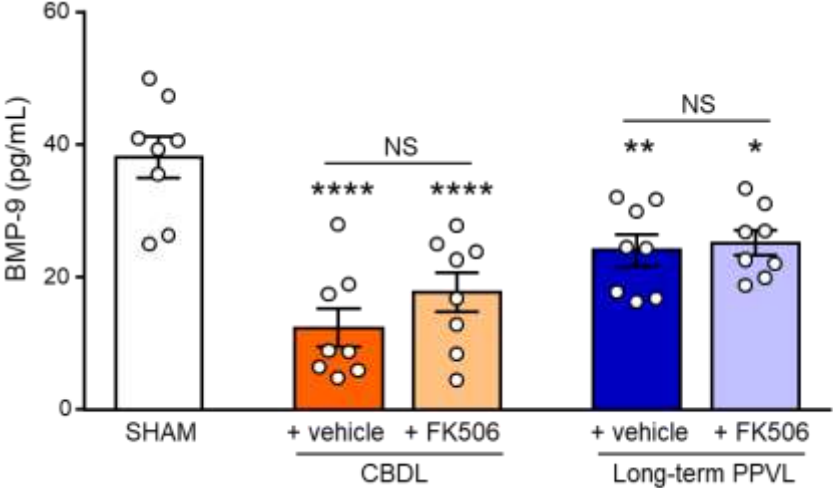
**Figure E4. Analysis of HPS phenotype after PPVL in rats, 6 weeks post-surgery.**

(A) Quantification of portal venous flow analysis by liver Doppler ultrasound. (B) Quantification of contrast-enhanced transthoracic echocardiogram: difference in acoustic signal between baseline and after agitated solution injection, in the right ventricle (RV) and left ventricle (LV). (C) Quantification of total number of microspheres in one kidney by FACS. (D) Alveolar-arterial oxygen gradient (A-aO<sub>2</sub>) in arterial blood. Data are represented as mean ± SEM. Comparisons were made using unpaired t-test after Shapiro-Wilk test. \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001. AU: arbitrary units.



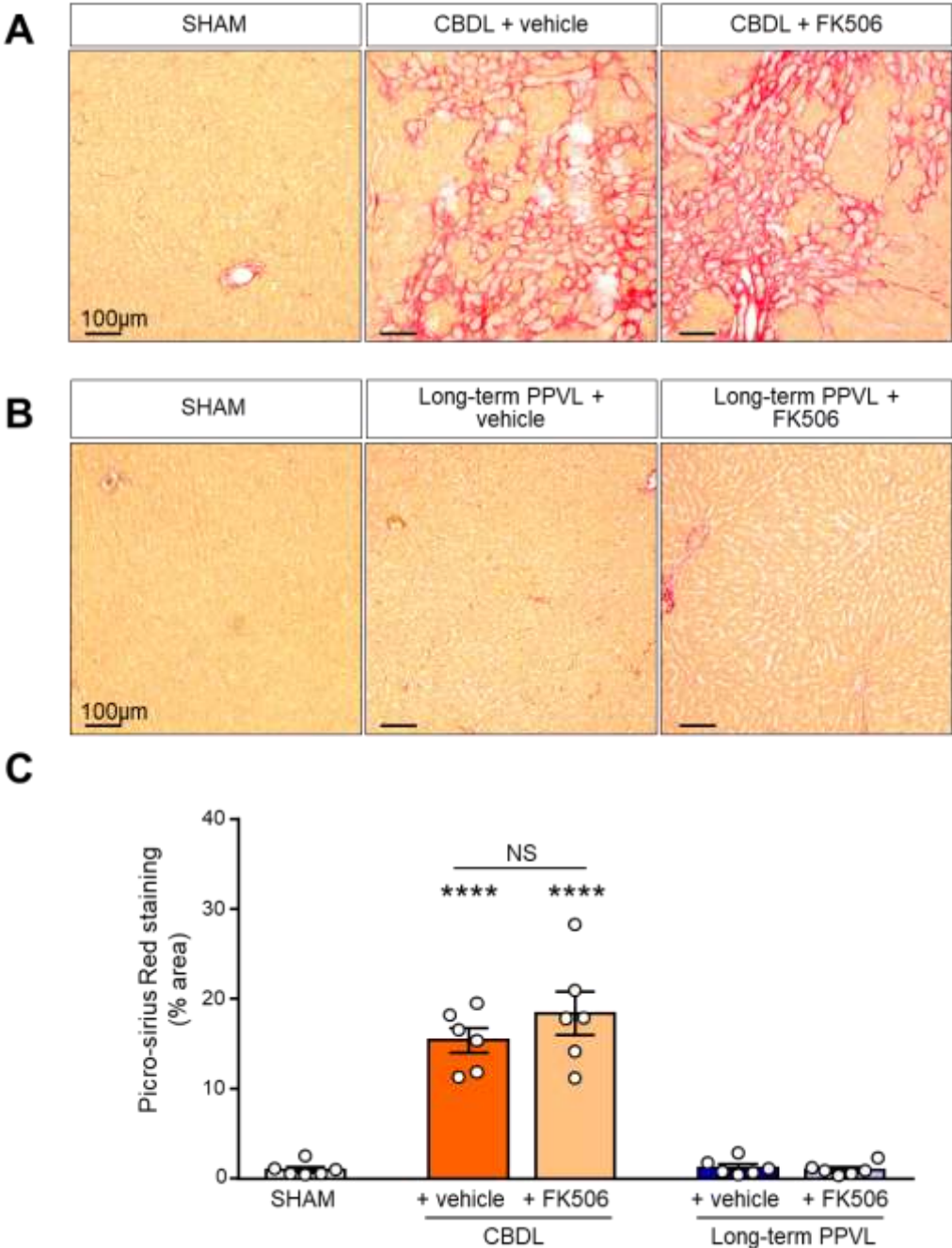
**Figure E5. Circulating BMP-9 levels measured using ELISA in CBDL and long-term PPVL rats after FK506 treatment or vehicle.**

Comparisons were made using one-way ANOVA followed by the Tukey test. NS = not significant ( $p > 0.05$ ) ; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ , versus SHAM group.



**Figure E6. Effect of FK506 treatment on liver fibrosis.**

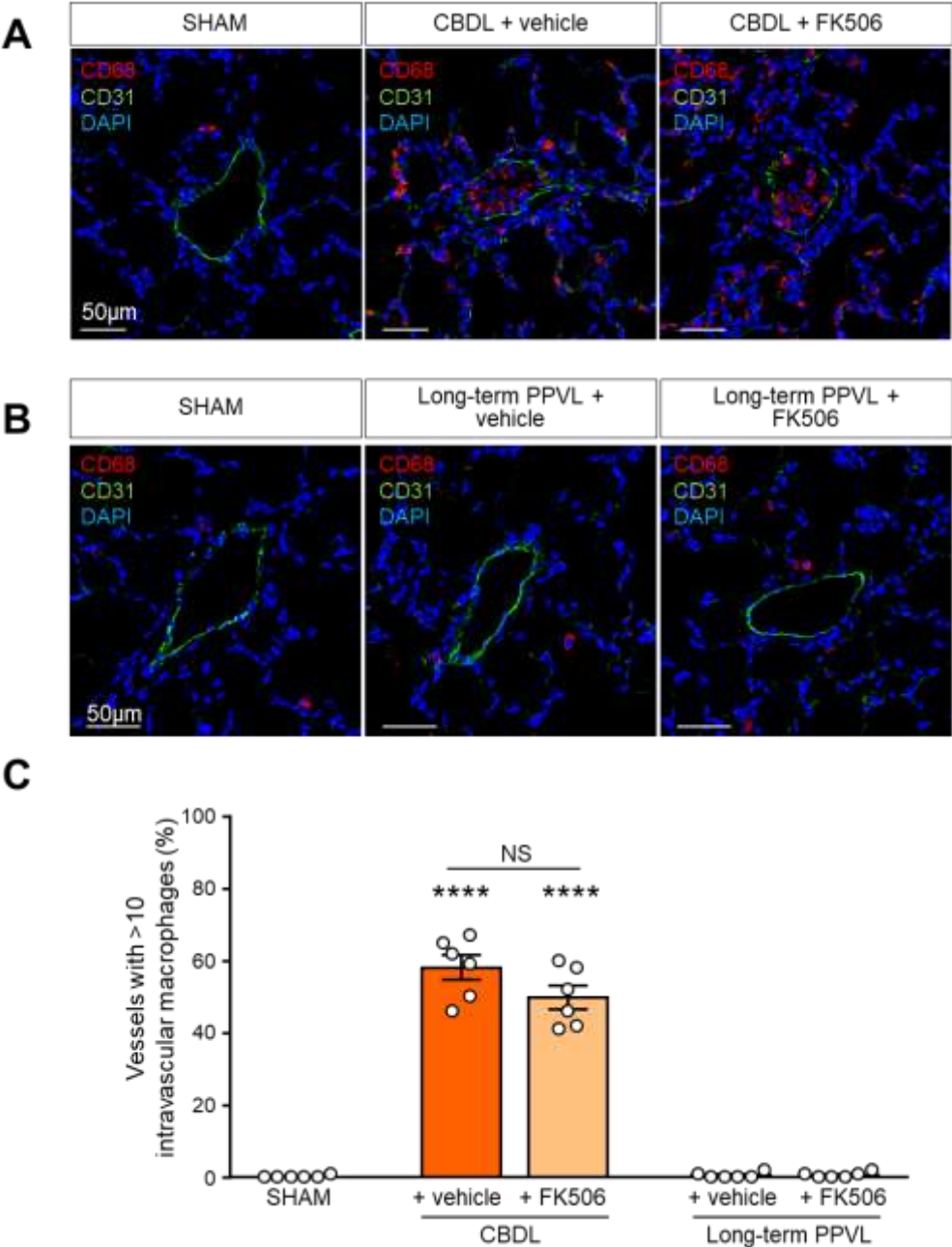
Illustration of Picro-Sirius red staining on liver sections on (A) the CBDL model and (B) the long-term PPVL model, treated with vehicle or FK506. (C) Quantification of fibrotic area by measuring the percentage Picro-sirius red staining. Comparisons were made using one-way ANOVA followed by the Tukey test. NS = not significant ( $p > 0.05$ ) ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ , versus SHAM group.





**Figure E7. Effect of FK506 on pulmonary intravascular macrophages.**

(A) Coimmunostaining of lung sections for CD68 (red), CD31 (green) and DAPI (blue) in SHAM, CBDL rats and CBDL rats treated with low dose of FK506. (B) Coimmunostaining of lung sections for CD68 (red), CD31 (green) and DAPI (blue) in SHAM, Long-term PPVL rats and Long-term PPVL rats treated with low dose of FK506. (C) Percentages of vessels with more than 10 pulmonary intravascular macrophages. Comparisons were made using one-way ANOVA followed by the Tukey test. NS = not significant ( $p > 0.05$ ) ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ , versus SHAM group.



## SUPPLEMENTARY TABLES

---

**Table E1. Demographics and clinical characteristics of patients who underwent liver transplantation for HPS.**

Characteristic	Post-LT
Total sample size, n	7
Age, yr, mean $\pm$ SEM	49.1 $\pm$ 8.3
Sexe, female subjects, n (%)	2 (29)
Sample collection, months after LT, mean $\pm$ SEM	29 $\pm$ 8.9
Child-Pugh before LT	
Child-Pugh stage A, n (%)	4 (57)
Child-Pugh stages B and C, n (%)	3 (43)
Etiology of portal hypertension before LT, n (%)	
ArLD	3 (43)
ArLD and NAFLD	1 (14)
ArLD and viral hepatitis	1 (14)
Biliary atresia	2 (29)
Combined PoPH, n (%)	2 (29)
A-a oxygen gradient before LT, mmHg, mean $\pm$ SEM	57.6 $\pm$ 8.5

**Table E2. Demographics and clinical characteristics of patients with portopulmonary hypertension.**

<b>Characteristic</b>	<b>PoPH</b>
Total sample size, n	88
Age, yr, mean $\pm$ SEM	59.7 $\pm$ 0.9
Sexe, female subjects, n (%)	35 (40)
Child-Pugh	
Child-Pugh stage A, n (%)	60 (68)
Child-Pugh stages B and C, n (%)	28 (32)
Combined HPS, n (%)	15 (17)
Hemodynamics, mean $\pm$ SEM	
Right atrial pressure, mmHg	8.8 $\pm$ 0.6
Mean pulmonary artery pressure, mmHg	38.6 $\pm$ 1.2
Pulmonary artery wedge pressure, mmHg	10.6 $\pm$ 0.4
Cardiac index, L/min/m <sup>2</sup>	3.6 $\pm$ 0.1
Pulmonary vascular resistance, Wood units	4.7 $\pm$ 0.3
6-minute-walk distance, m	384 $\pm$ 13.4
NYHA III, IV, n (%)	38 (43)

**Table E3. Spleen and liver weight, liver biochemistry in SHAM and CBDL rats.**

<b>Parameters</b>	<b>SHAM</b>	<b>CBDL</b>
Spleen weight (g)	1.2 ± 0.1	3.3 ± 0.3 ****
Liver weight (g)	16.0 ± 0.9	35.4 ± 1.0 ****
Liver biochemistry		
Bilirubin (µmol/L)	<2	135.9 ± 5.5 ****
Albumin (g/L)	8.0 ± 0.2	6.0 ± 0.3 ****
AST (UI/L)	76.9 ± 4.1	357.1 ± 31.2 ****
ALT (UI/L)	44.4 ± 2.0	80.1 ± 6.3 ****
ALP (UI/L)	177.3 ± 15.1	421.4 ± 29.0 ****
Gamma GT (UI/L)	7.5 ± 0.4	48.4 ± 4.5 ****

Comparisons were made using unpaired t-test after Shapiro-Wilk test.

\*\*\*\*p<0.0001.

**Table E4. Spleen and liver weight, liver biochemistry in SHAM and Long-term PPVL rats.**

<b>Parameters</b>	<b>SHAM</b>	<b>Long-term PPVL</b>
Spleen weight (g)	1.1 ± 0.1	1.8 ± 0.1 ***
Liver weight (g)	15.8 ± 0.6	14.8 ± 0.5
Liver biochemistry		
Bilirubin (µmol/L)	<2	<2
Albumin (g/L)	7.3 ± 0.1	7.2 ± 0.1
AST (UI/L)	72.1 ± 4.9	76.9 ± 3.7
ALT (UI/L)	44.0 ± 2.4	45.7 ± 2.5
ALP (UI/L)	174.7 ± 12.5	178.0 ± 23.7
Gamma GT (UI/L)	6.9 ± 0.5	6.3 ± 0.6

Comparisons were made using unpaired t-test after Shapiro-Wilk test.

\*\*\*p<0.001.

**Table E5. Effects of FK506 treatment in the CBDL model on portal venous flow, spleen and liver weight, liver biochemistry and blood cell count.**

Parameters	SHAM	CBDL + vehicle	CBDL + FK506
Portal venous flow (mm/s)	239.2 ± 7.4	146.0 ± 18.2 ***	137.7 ± 12.4 ****
Spleen weight (g)	1.2 ± 0.1	4.0 ± 0.3 ****	3.7 ± 0.1 ****
Liver weight (g)	16.7 ± 0.3	49.1 ± 1.8 ****	47.3 ± 1.1 ****
Liver biochemistry			
Bilirubin (µmol/L)	<2	176.6 ± 4.8 ****	169.5 ± 10.5 ****
Albumin (g/L)	8.57 ± 0.2	5.9 ± 0.2 ****	6.2 ± 0.2 ****
AST (UI/L)	86.0 ± 3.2	313.7 ± 47.4 ****	320.0 ± 32.4 ****
ALT (UI/L)	48.6 ± 3.3	76.3 ± 8.0 **	68.67 ± 1.7 *
ALP (UI/L)	202.4 ± 18.3	479.7 ± 55.9 ***	388.7 ± 33.2 **
Gamma GT (UI/L)	7.5 ± 0.4	45.0 ± 5.8 ***	43.3 ± 4.8 **
Blood cell count			
White blood cells	10.0 ± 0.9	49.3 ± 5.7 ****	49.0 ± 3.5 ****
Neutrophils (10 <sup>3</sup> /µL)	1.1 ± 0.1	13.8 ± 1.9 ****	16.2 ± 1.7 ****
Lymphocytes (10 <sup>3</sup> /µL)	7.5 ± 0.9	21.4 ± 3.3 **	21.1 ± 2.0 **
Hemoglobin (g/L)	136.7 ± 3.6	103.3 ± 4.9 ***	111.2 ± 5.0 **
Platelets (10 <sup>3</sup> /µL)	770.6 ± 28.7	378.3 ± 115.2 *	448.0 ± 97.2 *

Comparisons were made using one-way ANOVA followed by the Tukey test. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001, versus SHAM group. No significant difference between CBDL + vehicle group and CBDL + FK506 group.

**Table E6. Effects of FK506 treatment in the long-term PPVL model on portal venous flow, spleen and liver weight, liver biochemistry and blood cell count.**

Parameters	SHAM	Long-term PPVL	Long-term PPVL
		+ vehicle	+ FK506
Portal venous flow (mm/s)	234.8 ± 11.0	118.7 ± 14.5 ****	134.6 ± 11.9 ****
Spleen weight (g)	1.1 ± 0.1	2.1 ± 0.2 ****	2.2 ± 0.1 ****
Liver weight (g)	16.8 ± 0.3	16.5 ± 0.5	16.3 ± 0.4
Liver biochemistry			
Bilirubin (µmol/L)	<2	<2	<2
Albumin (g/L)	6.7 ± 0.3	7.6 ± 0.4	7.4 ± 0.2
AST (UI/L)	74.8 ± 5.9	77.3 ± 4.2	77.2 ± 2.3
ALT (UI/L)	49.1 ± 2.6	57.4 ± 2.3	53.9 ± 3.1
ALP (UI/L)	168.6 ± 14.0	182.0 ± 21.2	160.9 ± 11.3
Gamma GT (UI/L)	6.6 ± 0.6	7.0 ± 0.2	7.1 ± 0.3
Blood cell count			
White blood cells	8.9 ± 0.7	8.9 ± 0.8	8.2 ± 0.9
Neutrophils (10 <sup>3</sup> /µL)	1.1 ± 0.1	1.2 ± 0.3	1.0 ± 0.1
Lymphocytes (10 <sup>3</sup> /µL)	8.0 ± 0.6	7.0 ± 0.6	6.5 ± 0.7
Hemoglobin (g/L)	137.7 ± 2.3	136.0 ± 4.9	136.7 ± 2.0
Platelets (10 <sup>3</sup> /µL)	792.6 ± 30.6	635.5 ± 25.5 **	547.4 ± 21.9 ****

Comparisons were made using one-way ANOVA followed by the Tukey test.

\*\*p<0.01, \*\*\*\*p<0.0001, versus SHAM group. No significative difference between long-term PPVL + vehicle group and long-term PPVL + FK506 group.

## MATERIALS AND METHODS

---

### **Cohort Data Collection**

#### **Ethical approval**

This study was conducted in accordance with the principles outlined in the Declaration of Helsinki, and informed consent was obtained from each patient prior to their enrolment. This study was approved by the ethics committee CPP Ile-de-France – VII (approval number CO 10-003). The blood collection of the pediatric cohort was approved by the ethics committee (approval number CO-16-011).

#### **Liver disease characteristics**

The diagnosis of portal hypertension was based on hemodynamic measurements, indicating a hepatic venous pressure gradient of more than 5 mmHg, or a combination of suggestive signs such as splenomegaly, thrombocytopenia, oesophageal varices, or clinical evidence of portosystemic shunt. Cirrhosis was diagnosed based on documented historical liver biopsy or the presence of typical clinical and/or laboratory features. Variables related to liver disease were assessed at the time of HPS diagnosis, and the aetiology of portal hypertension was systematically recorded. The severity of cirrhosis was evaluated by the Child-Pugh stage and MELD score, calculated post hoc based on available information. HPS patients eligible for liver transplantation were identified, and samples were analyzed from 7 patients who underwent liver transplantation after a median time of 16 months after transplantation (from 9 to 67 months).

#### **Hepatopulmonary syndrome (HPS) diagnosis**

The diagnosis of HPS was confirmed in patients with portal hypertension by the presence of abnormal arterial oxygenation, as defined by an alveolar-arterial oxygen gradient ( $A-aO_2$ )  $>15$  mmHg (or  $>20$  mmHg in patients  $>64$  years old) on arterial blood gas analysis, along with the presence of intrapulmonary vascular dilatations assessed



by contrast-enhanced echocardiography <sup>16</sup>. The A-aO<sub>2</sub> was calculated using the formula:  $([P_{atm} - P_{H_2O}] \times 0.21 - P_{aCO_2}/0.8) - P_{aO_2}$ , where P<sub>atm</sub> is atmospheric pressure and P<sub>H<sub>2</sub>O</sub> is the water vapour pressure. Agitated saline was administered through a peripheral vein, and the passage of microbubbles from the right to the left cavities using an apical four-chamber view was observed. Presence of intrapulmonary vascular dilatations was confirmed if a significant passage of microbubbles was visualized after 3 cycles.

## ***In vivo* studies**

### **Surgical procedures**

Induction of biliary cirrhosis was performed by conducting common bile duct ligation (CBDL) under sterile conditions <sup>45,191</sup>. Rats were anesthetized with 2% inhaled isoflurane in room air, and body temperature was maintained at 37°C. The abdominal skin was shaved and sterilized using an iodine solution. A laparotomy was performed, and the common bile duct was isolated. Two separate ligatures of a 5-0 silk non-resorbable suture were used to occlude the common bile duct, which was then sectioned between the two ligatures. The abdomen was closed following the procedure.

Induction of portal hypertension without associated cirrhosis was achieved through PPVL <sup>45,192</sup>. Using the same aforementioned conditions, the portal vein was isolated. A single ligature of 5-0 silk was tied around both the portal vein and an adjacent 23-gauge needle. Subsequently, the needle was removed, allowing the portal vein to expand to the limit imposed by the ligature, thereby inducing a calibrated stenosis.

### **Arterial oxygenation and intrapulmonary vascular dilations (IPVDs) measurements in animal models**

Arterial blood samples were collected from the left carotid artery on anesthetized animals, and the partial pressure of arterial oxygen (PaO<sub>2</sub>) was determined using epoc® blood analysis system (Siemens Healthineers, Courbevoie, France) after adjusting ventilation to achieve a partial pressure of arterial carbon dioxide (PaCO<sub>2</sub>) between 35

and 45 mmHg using Small Animal Ventilator (Harvard Apparatus, Holliston, USA). The alveolar-arterial oxygen gradient (A-aPO<sub>2</sub>) was calculated as described previously.

To assess IPVDs, two techniques were employed. First, contrast-enhanced transthoracic echocardiography was performed using the Vivid E9 echography system (GE Healthcare, Velizy-Villacoublay, France). An agitated solution with 9 mL of Gelofusin® (Braun) and 1 mL of air was injected into a catheter introduced into the right jugular vein. Microbubbles were trapped in the lung microcirculation, and the appearance of microbubbles in the left ventricle after 3 cardiac cycles following venous injection was considered as evidence of IPVDs. Quantification was performed by measuring the difference in acoustic signal intensity before and after injection in the right and left ventricle.

The second method involved the injection of  $7 \times 10^6$  orange fluorescent microspheres with 8 µm diameter (Phosphorex, Hopkinton, USA) through a catheter inserted into the jugular vein. Similar to the previous technique, the lung microcirculation trapped the fluorescent microspheres, and the presence of IPVDs facilitated their dissemination into the systemic circulation. After 1 minute, the kidney was removed, and the number of fluorescent microspheres inside within the kidney was evaluated, representing the extent of IPVDs. The images of trapped microspheres in lung and kidney were acquired using Zeiss Axiovert A1 microscope (Zeiss, Paris, France). Afterwards, the kidney is homogenized in a solution of PBS and 0.1% BSA, followed by successive lavages and digestion of the pellet using Proteinase K at a concentration of 0.2 mg/mL (Invitrogen, Carlsbad, USA) in an appropriate buffer, incubated for 1 hour at 65°. The total number of fluorescent microspheres was determined and analyzed using flow cytometry with the Accuri™ C6 instrument (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France).

### **Liver function assessment**

Portal vein venous flow was measured using hepatic Doppler ultrasound with the Vevo® 3100 LT echocardiography system (Fujifilm VisualSonics Inc., Toronto, Canada) on anesthetized rats to evaluate the presence of portal hypertension. The weight of the

spleen and liver was measured to determine the presence of splenomegaly and/or hepatomegaly.

Liver biochemistry analysis was performed on blood samples to assess liver function. Measurements included total bilirubin, albumin, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), and gamma-glutamyl transpeptidase (gamma-GT), using routine laboratory methods at the Service de Biologie Médicale (Marie-Lannelongue hospital, Le Plessis-Robinson, France).

Liver biopsies were fixed with a 4% formalin buffer for 24h before being embedded in paraffin. To assess the degree of liver fibrosis, 5µm liver sections were analyzed after Picro-sirius Red staining using Zeiss Axiovert A1 microscope (Zeiss).

### **Measurement of mean pulmonary arterial pressure, Fulton index and echocardiographic parameters (TAPSE and AT/ET)**

Doppler echocardiography was performed on anesthetized rats using the Vivid E9 echography system. Tricuspid annular plane systolic excursion (TAPSE) was measured to assess the right ventricular function, while pulmonary artery acceleration time (AT) to ejection time (ET) was measured to evaluate the development of pulmonary hypertension. To determine mean pulmonary arterial pressure (mPAP), a polyvinyl catheter was inserted into the rats' right jugular vein and pushed into the pulmonary artery. Right ventricular hypertrophy was measured by the Fulton index [weight ratio of the right ventricle and (left ventricle + septum)].

### **Pulmonary vascular corrosion casting**

Euthanized rats were subjected to intrapulmonary artery injection of 8 mL fresh Batson solution #17 corrosion kit (Polysciences, Eppenheim, Germany) using an 18-gauge catheter. To facilitate polymerization, ice was placed directly on the lungs, covered with a humid gauze, and left for 30 minutes. Subsequently, the lungs were dissected and macerated in the Maceration Solution (Polysciences, catalog #07359) for 24 hours. The vascular corrosion casts were then rinsed with water and preserved in 70% ethanol

(v/v). Scanning electron microscope images of the pleural surfaces of the lung vascular casts were captured using a Zeiss Ultra 55 microscope (Zeiss).

### **Blood cell count and FK506 trough levels**

Blood cell count was performed in blood using Element HT5 (HESKA distributed by SCIL, Altorf, France) to obtain levels of total white blood cells, neutrophils, lymphocytes, hemoglobin, and platelets. Tacrolimus (FK506) trough blood concentrations collected 24 hours after the last oral administration were measured on a UHPLC Nexera XS system coupled with an 8050 MS system (Shimadzu). Blood samples (200 $\mu$ L) were spiked with an internal standard solution followed by extraction procedure. The validation was carried out, mostly, according to European Medicines Agency (EMA) guidelines with a lower limit of quantification of 0.01 ng/mL (Laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie, Kremlin-Bicêtre hospital, Le Kremlin Bicêtre, France).

### **Circulating BMP-9 concentrations and BRE-luciferase activity measurement**

Rat BMP-9 plasmatic concentrations were quantified using the Picokine<sup>TM</sup> ELISA (Boster Biological Technology, catalog number EK1611, USA) following the manufacturer's instructions.

To assess the functional activity of BMP-9 in rats serum, BRE-luciferase activity was conducted following previously described methods<sup>149,193</sup>. NIH-3T3 cells were transfected with various plasmids, including the reporter plasmid pGL3(BRE)<sub>2</sub>-luc encoding firefly luciferase downstream of a BMP response element, the pcDNA3-derived plasmid pALK1, and the pRL-TK-luc plasmid encoding renilla luciferase as a control reporter vector. Four hours after transfection, cells were stimulated with serum obtained from SHAM-operated, PPVL, or CBDL rats. Firefly and renilla luciferase activities were measured consecutively using the Twin-lite reporter assay (Perkin-Elmer, Waltham, USA). The results were expressed as ratios of firefly luciferase activity to renilla luciferase activity, and normalized to SHAM-operated rats.

### **Real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR)**

RNA extraction from liver biopsies was performed using the RNeasy® Mini Kit (QIAGEN S.A.S., Courtaboeuf, France) following the manufacturer's protocol. The quality of RNA was assessed by agarose gel electrophoresis. Subsequently, 1µg of total RNA was reverse transcribed using the high-capacity RNA-to-cDNA™ kit (Invitrogen, Carlsbad, USA). Real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was conducted for *Gdf2* using Taqman primers and probes on the Quant Studio 5 PCR machine (Applied Biosystems, Waltham, USA). The expression levels of each gene were normalized to 18S ribosomal RNA using the comparative delta-CT method ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ).

### **Western blot**

Lung biopsies were homogenized and sonicated in RIPA buffer containing protease and phosphatase inhibitors (Sigma Aldrich, Saint-Louis, USA). Protein extracts (40µg) were loaded onto SDS-PAGE gels and subsequently transferred to PVDF membranes. After blocking for 2 hours, the membranes were incubated overnight with primary antibodies: anti-p-Smad1/5/8 (1:400, Cell Signaling Technology, clone D5B10, catalog number 13820, Danvers, USA), anti-Id1 (1:100, Santa Cruz, clone B-8, catalog number sc-133104, USA), or anti-β-actin (1:5000, Sigma-Aldrich, clone AC-15, catalog number A3854). Immunoreactive bands were detected by incubating with appropriate HRP-conjugated secondary antibodies, followed by enhanced chemiluminescence reagent using Clarity Max™ Western ECL substrate (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) and visualized using the ChemiDoc™ Imaging System (Bio-Rad). Protein band intensity was quantified using Image Lab software (Bio-Rad) and normalized to β-actin.

### **Immunofluorescent staining**

The inflated lungs were fixed with a 4% formalin buffer for 24h before being embedded in paraffin. Lung sections with a thickness of 5µm were deparaffinized and incubated with retrieval buffer. Subsequently, the sections were saturated with blocking buffer and incubated overnight with primary antibodies, namely anti-p-Smad1/5/8 (1:100,

Cell signaling Technology, clone D5B10, catalog number 13820), anti-CD68 (1:100, Invitrogen, clone ED1, catalog number MA5-16654) and anti-CD31 (1:50, R&D systems, polyclonal, catalog number AF3628, USA). Afterwards, appropriate fluorescent secondary antibodies were applied for 2 hours. The slides were then labeled with DAPI and mounted using ProLong Gold antifade reagent. Imaging of the slides was performed using a LSM700 confocal microscope (Zeiss).

To assess the sequestration of pulmonary intravascular macrophages, 60 blood vessels per slide were analyzed, and the percentage of vessels with more than 10 adherent intravascular macrophages was determined.

## DISCUSSION

---

Ce projet a permis de mettre en lumière l'implication de la perte du BMP-9 et de sa voie de signalisation dans le développement du SHP. L'analyse d'une large cohorte de patients atteints de cirrhose a montré que tous les patients présentant un SHP avaient systématiquement des taux abaissés de BMP-9 circulant, indépendamment de la sévérité de leur cirrhose ou de la coexistence d'une HTPoP. La diminution du BMP-9 semble donc indispensable au développement du SHP chez l'Homme.

L'utilisation de deux modèles expérimentaux de SHP, l'un associé à une cirrhose (après LVB) et l'autre associé à une hypertension portale extra-hépatique (après une LPVP prolongée), a révélé que le développement du SHP est lié à une diminution de la production hépatique de BMP-9 dans les 2 cas. Cela entraîne une réduction des niveaux circulants de BMP-9 et de son activité, et une altération de signalisation pulmonaire. Le traitement curatif avec le FK506 (également appelé Tacrolimus) dans ces deux modèles a permis de restaurer la voie de signalisation pulmonaire du BMP-9, entraînant une régression des dilatations vasculaires pulmonaires et une normalisation des échanges gazeux.

De plus, les rats déficients en BMP-9 développent spontanément un phénotype pulmonaire similaire au SHP, renforçant l'idée que la perte du BMP-9 est crucial pour le développement de cette pathologie. Ensemble, ces résultats démontrent que la perte de BMP-9, due à l'hypertension portale (qu'elle soit cirrhotique ou non), est nécessaire au développement de vasodilatations capillaires pulmonaires et d'un SHP. Ces découvertes ouvrent des perspectives prometteuses pour le traitement et la compréhension des mécanismes sous-jacents aux pathologies vasculaires pulmonaires induites par l'hypertension portale.

## 1. Un nouveau modèle préclinique pour l'étude du SHP

Une des principales limites des recherches actuelles sur la physiopathologie du SHP est qu'un seul modèle préclinique est scientifiquement établi, celui de LVB chez le rongeur. Ce modèle a considérablement enrichi notre compréhension du SHP en permettant l'étude de la progression des dilatations vasculaires capillaires pulmonaires et de l'hypoxémie. Cependant, il présente des limitations majeures, principalement en raison de l'association avec une cirrhose biliaire extrêmement sévère, qui entraîne une mortalité élevée. Cette cirrhose biliaire sévère peut introduire un biais important dans les résultats obtenus, car elle ne reflète pas entièrement la diversité des contextes dans lesquels le SHP peut se développer et peut masquer d'autres médiateurs essentiels. En effet, le SHP n'est pas exclusivement une conséquence d'une cirrhose ; il peut également se manifester dans d'autres contextes, comme une hypertension portale extra-hépatique ou la présence de fistules portosystémiques congénitales <sup>5,8</sup>. Le modèle de LVB est limité à un contexte de cirrhose biliaire. Par conséquent, il était important de développer et de valider de nouveaux modèles précliniques de SHP qui reproduisent ces différentes conditions pathologiques, afin de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques impliqués et d'élargir notre connaissance au-delà de la cirrhose biliaire hépatique.

Dans cette perspective, nous avons entrepris d'explorer les répercussions pulmonaires de l'hypertension portale extra-hépatique induite chirurgicalement, en utilisant le modèle de LPVP. Bien que le modèle LPVP ne reproduise pas les caractéristiques du SHP, telles que l'hypoxémie et les vasodilatations capillaires pulmonaires, dans les 2 à 3 semaines suivant la chirurgie <sup>45</sup>, des changements physiopathologiques significatifs sont néanmoins observés à court terme chez les rongeurs. Sur le plan hépatique, une augmentation de la densité des vaisseaux sanguins dans le foie est observée, accompagnée d'une activation de la voie du VEGF-A <sup>194</sup>. Par ailleurs, une circulation hyperdynamique se développe, associée à une vasodilatation splanchnique <sup>195</sup>, associée à une activation locale accrue de la voie du NO mais aussi une inflammation, caractérisée par une élévation du TNF $\alpha$  <sup>196,197</sup>. Cette inflammation pourrait être attribuée à des mécanismes de translocation bactérienne <sup>198</sup>. Des études sur les artères systémiques ont révélé une hyporéactivité lors de l'exposition à des



vasoconstricteurs, en raison d'une augmentation locale de la production de NO<sup>59,199-201</sup>. De plus, ce modèle montre une élévation des niveaux circulants de nitrates et nitrites, métabolites du NO<sup>202</sup>. Au niveau pulmonaire, on constate une hausse de l'expression de la HO-1 et de la iNOS<sup>57</sup>, ainsi qu'une augmentation du récepteur ET<sub>B</sub> de l'ET-1 dans l'endothélium, ce récepteur étant reconnu pour ses propriétés vasodilatatrices<sup>58</sup>. Il est intéressant de noter que l'administration chronique de faibles doses d'ET-1 induit le développement d'un SHP chez les rats après LPVP, caractérisé par une hypoxémie et des vasodilatations capillaires pulmonaires, un phénomène absent chez les rats témoins<sup>58,74</sup>.

Ainsi, même 2 ou 3 semaines après la chirurgie, des altérations vasculaires systémiques et pulmonaires sont déjà présentes, suggérant une modification du tonus vasculaire en faveur d'une vasodilatation.

Nous avons donc émis l'hypothèse que l'absence de développement du SHP dans l'étude précédente, réalisée après LPVP, était due à une période d'observation trop courte après la chirurgie (2 à 3 semaines)<sup>45</sup>. Pour approfondir cette question, nous avons reproduit le modèle LPVP et effectué des analyses à des délais plus longs. Six semaines après la chirurgie, nous avons observé des vasodilatations au niveau des capillaires pulmonaires, sans impact sur les échanges gazeux. En revanche, 10 semaines après l'intervention, toutes les caractéristiques du SHP étaient présentes, incluant des vasodilatations capillaires pulmonaires ainsi qu'une hypoxémie. Ce nouveau modèle ouvre des perspectives intéressantes pour mieux comprendre le développement du SHP dans un contexte non cirrhotique, tout en évitant l'inflammation sévère et systémique, l'hyperbilirubinémie et la surmortalité généralement observée dans le modèle de LVB.

## 2. Perte du BMP-9 dans le SHP : données convergentes des modèles animaux

Dans nos deux modèles expérimentaux de SHP, nous avons cherché à déterminer si le développement du SHP était lié à une altération de la voie de signalisation du BMP-9.

Dans un premier temps, l'analyse de l'expression hépatique du BMP-9 a révélé une diminution de l'ARNm dans le tissu hépatique des deux modèles. L'analyse des taux sanguins a montré une réduction des taux circulants de BMP-9. Parallèlement, une baisse significative de l'activité du BMP-9 a été constatée à l'aide du test BRE-luciférase, un test *in vitro* qui mesure l'activation transcriptionnelle des gènes cibles médiée par les BMP, en particulier ceux liés au récepteur ALK1. Pour évaluer la signalisation du BMP-9 au niveau pulmonaire, nous avons examiné deux acteurs clés de cette voie : la phosphorylation de Smad1/5/8 et l'expression de Id1. Les résultats ont révélé une diminution de ces acteurs moléculaires sous la dépendance du BMP-9, avec une réduction particulièrement marquée dans les cellules endothéliales pulmonaires.

En conclusion, l'hypertension portale, qu'elle soit associée ou non à une cirrhose, exerce un impact sur les fonctions endocrines du foie. Nos modèles précliniques de SHP montrent une diminution de la production hépatique, des niveaux circulants, de l'activité et de la signalisation pulmonaire du BMP-9. Ces résultats ouvrent la voie à une exploration plus approfondie du lien de causalité potentiel entre la diminution de la voie du BMP-9 pulmonaire et le développement du SHP.

Pour établir ce lien de causalité, nous avons développé un modèle de rats déficients en BMP-9. Ces rats sont viables et fertiles. Cependant, ils présentent spontanément un phénotype vasculaire pulmonaire similaire au SHP, telles que des vasodilatations significatives des capillaires pulmonaires et une hypoxémie marquée, en conséquence de la perte isolée de BMP-9. Ces observations démontrent que la perte de BMP-9 joue un rôle central dans le développement du SHP.

### 3. Le FK506 en traitement curatif : un activateur puissant de la voie du BMP-9

Nous avons cherché à démontrer que la réactivation de la voie de signalisation du BMP-9 au niveau pulmonaire, en particulier la phosphorylation des protéines Smad1/5/8, pourrait réduire les vasodilatations capillaires pulmonaires et l'hypoxémie induites par les modèles expérimentaux d'hypertension portale. L'administration clinique de BMP-9 recombinant pose plusieurs défis, en raison de sa faible stabilité et de sa demi-vie très courte<sup>203</sup>. De plus, cela pourrait entraîner des effets indésirables importants, tels qu'une activité ostéogénique excessive pouvant provoquer une ossification ectopique, une calcification vasculaire<sup>204-207</sup>, ainsi que des phénomènes de vasoconstriction<sup>153,154,156,208,209</sup>.

Plusieurs analyses de criblage à haut débit ont identifié le FK506 comme un candidat prometteur le plus puissant pour activer la voie des BMP<sup>210,211</sup>. En effet, le FK506 a montré sa capacité à induire la phosphorylation des protéines Smad1/5/8 et à stimuler la transcription de *Id1* *in vitro* dans des cellules endothéliales pulmonaires humaines<sup>211</sup>. L'effet du FK506 sur la voie BMP est médié par son interaction avec le FKBP12, un inhibiteur endogène de la superfamille du TGF- $\beta$ , à laquelle appartient le BMP-9. Le FKBP12 se lie aux récepteurs de type 1 de cette superfamille et bloque la signalisation en occupant le site de phosphorylation du récepteur de type 1<sup>212-214</sup>. De plus, le FK506 représente un candidat de choix, car il s'agit d'une molécule couramment utilisée en clinique, bénéficiant d'un recul significatif en termes de pharmacodynamie et de pharmacocinétique. D'autres candidats prometteurs ont été identifiés pour activer également la voie des BMP, tels que l'ascomycine ou la rapamycine, bien que leurs effets soient moins puissants que ceux du FK506<sup>211</sup>.

*In vivo*, nous avons démontré que l'administration orale de FK506 permet de restaurer la signalisation endothéliale du BMP-9 en augmentant la phosphorylation de Smad1/5/8 ainsi que le facteur de transcription *Id1*, en particulier dans les cellules endothéliales pulmonaires. Notre étude a ainsi montré que l'administration orale de FK506, même à faible dose, est suffisante pour induire l'activation de la voie BMP endothéliale pulmonaire *in vivo*.

Cette augmentation de la voie BMP endothéliale pulmonaire est associée à une amélioration du phénotype du SHP dans les deux modèles de rats, que ce soit le modèle de

LVB ou le modèle de LPVP. Après traitement, nous avons observé une diminution des vasodilatations capillaires pulmonaires ainsi qu'une normalisation des échanges gazeux. L'activation de la voie BMP pourrait représenter une alternative thérapeutique prometteuse pour les patients atteints de SHP, qui, à ce jour, n'ont pour seule option pharmacologique que la transplantation hépatique.

Une question importante concerne le mécanisme d'action du FK506 dans ce contexte ; en effet, sans la présence du ligand BMP-9, le simple retrait de l'inhibiteur endogène FKBP12 ne suffirait pas à induire l'activation de la voie. Une étude récente menée par l'équipe de Toril Holien (Norwegian University of Science and Technology, Norway) a montré que dans des cellules de myélome *in vitro*, le retrait du FKBP12 (par le FK506) modifie l'affinité des récepteurs de type 1 de la famille des BMP, leur permettant de se lier à des ligands auxquels ils ne se fixent normalement pas. Cette interaction permet ainsi l'activation des récepteurs du BMP-9 par d'autres ligands de la famille des BMP<sup>215</sup>. Il est donc plausible que la restauration de la phosphorylation des Smad1/5/8 soit médiée par la liaison de ces BMP alternatifs au complexe récepteur ALK1/BMPRII sur les cellules endothéliales.

Le FK506 est également largement utilisé en clinique pour ses propriétés immunosuppressives, principalement en inhibant la calcineurine. *In vivo*, il a été démontré que de faibles doses de FK506 (0,05 mg/kg/j en injection sous-cutanée) n'affectent pas significativement le nombre total de globules blancs, de neutrophiles ou de lymphocytes<sup>211</sup>. Dans notre étude, nous avons administré une dose de 0,02 mg/kg/j par voie orale et avons également observé qu'il n'y avait pas d'impact significatif sur le nombre de leucocytes sanguins chez les rats traités par FK506 par rapport aux rats non traités. Dans le modèle de cirrhose induite par LVB, caractérisé par une inflammation pulmonaire importante et la présence de macrophages intravasculaires, nous avons constaté qu'il n'y avait pas de différence dans le nombre de macrophages présents dans la lumière des petits vaisseaux pulmonaires entre les rats traités et non traités. De plus, avec les faibles doses utilisées, nous n'avons observé aucune amélioration de la sévérité de la cirrhose dans ce modèle, suggérant que l'effet du FK506 à faible dose est spécifiquement pulmonaire. Il serait pertinent de réaliser des analyses plus approfondies pour vérifier qu'à ces faibles doses, même en l'absence de variations dans la numération formule sanguine, il n'y a pas d'effet sur la

calcineurine ni sur l'activité des lymphocytes.

Ensemble, ces données fournissent une preuve de concept démontrant que l'activation de la voie BMP pulmonaire peut induire une régression des vasodilatations capillaires pulmonaires et permettre le traitement du SHP.

#### **4. Taux circulant de BMP-9 chez les patients atteints de syndrome hépatopulmonaire et/ou d'hypertension portopulmonaire**

Les études précédentes visant à évaluer les taux circulants de BMP-9 dans le cadre du SHP ou de l'HTPoP présentent plusieurs limites : absence d'exploration de la présence conjointe de ces deux pathologies, absence de stratification en fonction de la sévérité de la cirrhose, et la taille restreinte des cohortes étudiées<sup>178,181,190</sup>. Pour approfondir notre compréhension du rôle de BMP-9 dans le SHP et l'HTPoP, il est essentiel d'étudier une cohorte de patients bien caractérisés en termes de sévérité hépatique et de présence de SHP, d'HTPoP, ou des deux. Notre étude, comprenant 17 patients atteints uniquement de SHP, 73 patients atteints uniquement d'HTPoP, et 15 patients souffrant des deux pathologies, répond à cette exigence.

Nous avons identifié une association significative entre la diminution des niveaux de BMP-9 et la présence de SHP dans l'entièreté de notre cohorte. En analysant la gravité de la cirrhose, nous avons constaté que, chez les patients avec une cirrhose Child-Pugh A, une réduction significative des niveaux de BMP-9 chez les patients SHP est observée. Les patients ayant uniquement un SHP ou un SHP associé à une HTPoP montrent une diminution comparable des niveaux de BMP-9 par rapport aux patients cirrhotiques sans maladies vasculaires pulmonaires, tandis que les patients présentant uniquement une HTPoP ne montrent pas de différence significative. Chez les patients atteints de cirrhose Child-Pugh B ou C, les niveaux de BMP-9 circulant sont fortement réduits, indépendamment de la présence de pathologies vasculaires pulmonaires. Ainsi, dans ce contexte, des taux abaissés de BMP-9 ne sont pas signe de la présence de SHP.

En conclusion, nos résultats suggèrent que des niveaux bas de BMP-9 sont

nécessaires et indispensables au développement du SHP, bien que non suffisants. En effet, tous les patients atteints de SHP présentent des niveaux effondrés de BMP-9, cependant cette diminution seule ne suffit pas à expliquer le SHP, puisque des patients atteints de cirrhoses sévères montrent également des taux très bas de BMP-9 circulant sans pour autant développer de SHP. De plus, notre étude révèle que le développement de l'HTPoP n'est pas associé à une diminution des niveaux circulants de BMP-9. Alors que nous avons montré que la baisse de BMP-9 est principalement associée à la présence de SHP plutôt qu'à la présence de l'HTPoP, il est intéressant d'explorer le rôle du BMP-9 dans d'autres pathologies vasculaires, telles que les autres formes d'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP).

## **5. Modulation du BMP-9 dans les modèles animaux d'hypertension pulmonaire**

Comme indiqué dans l'introduction, des mutations au niveau du gène *Gdf2*, qui code pour le BMP-9, constituent un facteur de prédisposition à l'HTAP, et les patients concernés présentent des concentrations circulantes de BMP-9 réduites. En revanche, dans d'autres formes d'HTAP idiopathique et héritable, les niveaux circulants de BMP-9 ne montrent pas de diminution par rapport à des individus sains<sup>177,178</sup>, ni dans l'HTPoP en comparaison à des patients cirrhotiques, comme le démontre notre étude.

Il a été précédemment démontré que les souris déficientes en BMP-9 ne développent pas d'hypertension pulmonaire, mais présentent plutôt un phénotype avec des caractéristiques proches de celles observées dans la maladie de Rendu-Osler. Ces souris sont également protégées contre l'hypertension pulmonaire expérimentale induite par mise en hypoxie chronique<sup>153,179,180</sup>. Une étude en cours dans notre laboratoire, à laquelle j'ai contribué et qui est actuellement en révision, se concentre sur le développement de l'hypertension pulmonaire expérimentale sévère chez les rats déficients en BMP-9. Cette recherche utilise deux modèles d'hypertension pulmonaire : l'un après injection de monocrotaline et l'autre après injection de SU5416 suivi d'une hypoxie chronique. Nos résultats indiquent que les rats déficients en BMP-9 ne développent pas d'hypertension

pulmonaire. Au contraire, ils bénéficient même d'une protection significative, avec des pressions artérielles pulmonaires moyennes, des résistances vasculaires pulmonaires, un débit cardiaque et une hypertrophie ventriculaire droite inférieurs à ceux observés chez les rats témoins (WT).

Au niveau moléculaire, nous avons démontré que le BMP-9 exerce son effet de facteur de quiescence vasculaire pulmonaire en diminuant l'activation du récepteur pro-angiogénique VEGFR2, et ce, même en présence de son ligand le VEGF-A. La perte en BMP-9 circulant entraîne donc une augmentation de l'angiogénèse via l'activation du récepteur VEGFR2. Cela pourrait expliquer en partie l'effet protecteur de la déficience en BMP-9 dans le développement de l'hypertension pulmonaire expérimentale, sachant que la raréfaction vasculaire pulmonaire joue un rôle délétère bien établi dans sa physiopathologie.

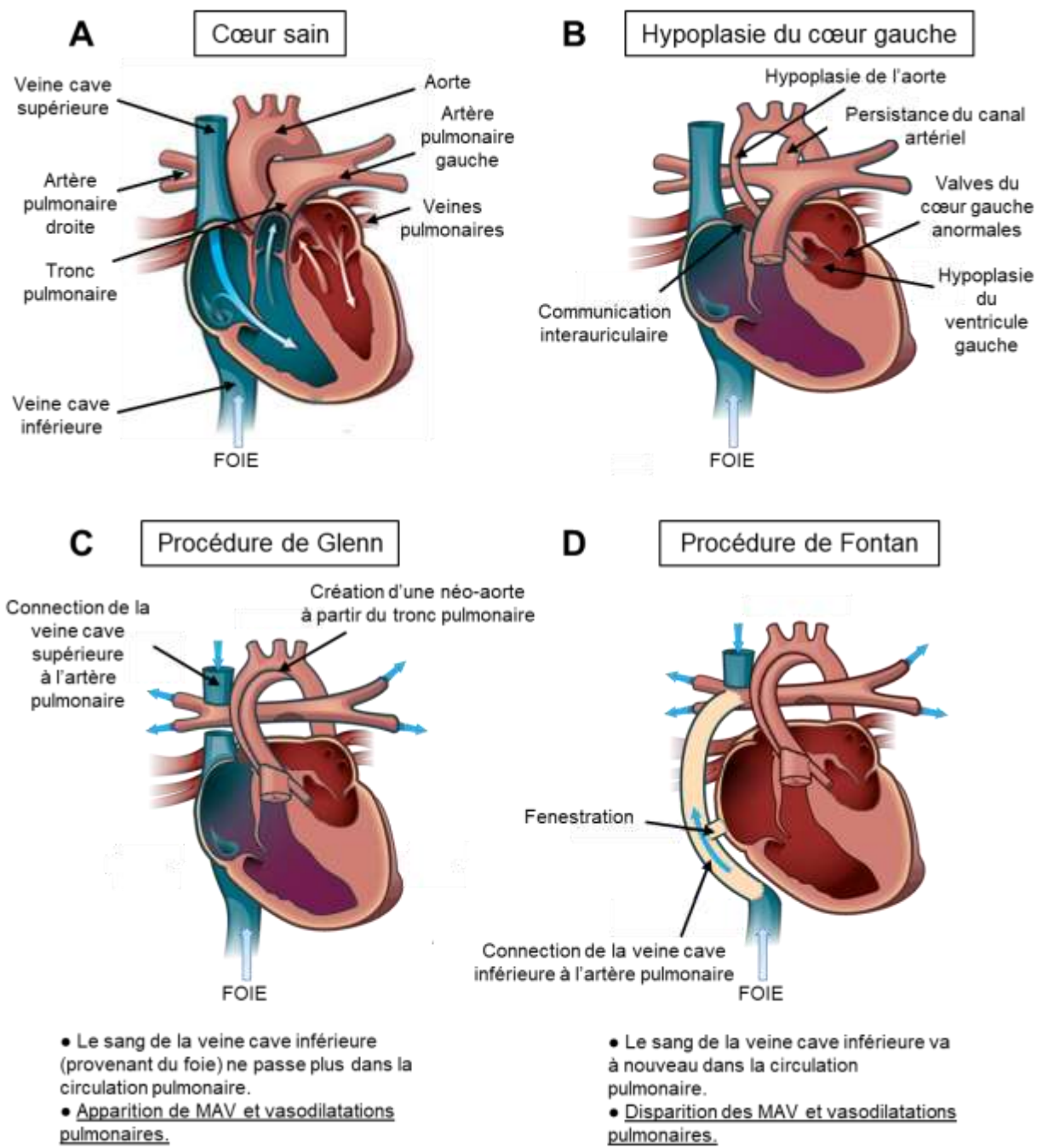
Dans le cadre du SHP, l'implication de facteurs pro-angiogéniques est reconnue, notamment en ce qui concerne la prolifération des capillaires pulmonaires. La diminution des niveaux de BMP-9 pourrait donc être liée à une augmentation de l'angiogénèse dans les poumons des patients atteints de SHP, en particulier via l'activation de la voie VEGF-A/VEGFR2. Cependant, l'implication de cette voie est remise en question à la suite de l'essai clinique portant sur le sorafenib dans le SHP, qui n'a pas révélé d'effet bénéfique dans ce contexte <sup>111</sup>. Des études complémentaires sur le lien entre la voie du BMP-9 et celle du VEGF-A/VEGFR2 seraient pertinentes, notamment dans le nouveau modèle de LPVP, où le rôle de l'angiogénèse dans le développement du SHP dans un contexte d'hypertension portale extra-hépatique n'a jamais été documenté.

## 6. Décrypter le lien entre la perte de facteurs dérivés du foie et la dilatation du lit capillaire pulmonaire

Dans le SHP, deux hypothèses sont envisagées pour expliquer le développement de la pathologie : d'une part, les facteurs impliqués pourraient provenir de la circulation porte, qui, grâce aux shunts portosystémiques, ne sont pas filtrés par le foie et atteignent directement le lit capillaire pulmonaire. D'autre part, les facteurs impliqués pourraient provenir directement du foie, dont la sécrétion serait modifiée au cours des diverses hépatopathies. Grâce à notre étude, nous avons démontré qu'en premier lieu, la privation de BMP-9, un facteur produit par le foie, est indispensable au développement du SHP. Des observations réalisées lors des procédures chirurgicales de Glenn et de Fontan ont également révélé que la privation de la circulation pulmonaire en facteurs hépatiques entraîne des dilatations capillaires pulmonaires et des MAV, similaires à celles retrouvées dans le SHP.

Ces interventions concernent certaines cardiopathies congénitales, appelées « ventricule unique », où un seul ventricule gère les débits sanguins pulmonaires et systémiques. Parmi les pathologies associées à cette condition, l'hypoplasie du cœur gauche est la plus courante, et elle sera utilisée ici comme exemple (**Figure 9A et B**). Physiologiquement, ces patients présentent une hypoplasie du ventricule gauche et de l'aorte, entraînant une perfusion systémique réduite. De plus, des communications interauriculaires et une persistance du canal artériel mélangent le sang pauvre en oxygène des veines caves avec le sang oxygéné des veines pulmonaires, provoquant une hypoxémie persistante et une perfusion organique diminuée, ce qui est particulièrement grave pour le patient.





**Figure 9. Intervention de Glenn et de Fontan chez les enfants avec hypoplasie du cœur gauche.**

(A) Anatomie d'un cœur sain. (B) Anatomie d'un cœur avec hypoplasie du cœur gauche. (C) Anatomie d'un cœur après procédure de Glenn. (D) Anatomie du cœur après procédure de Fontan.  
(Adaptée de *Cardinal Glennon Children's Hospital – SSM Health*)

## a) L'opération de Glenn : le premier jalon dans le traitement de ces patients

Pour améliorer l'oxygénation et la perfusion systémique chez ces patients, l'opération de Glenn (également appelée anastomose cavo-pulmonaire bidirectionnelle) est réalisée dans un premier lieu (**Figure 9C**). Cette intervention soulage le ventricule unique en dirigeant une partie du flux sanguin systémique vers les poumons, réduisant ainsi la charge de travail cardiaque. Une communication directe est établie entre la veine cave supérieure, qui transporte le sang désoxygéné de la partie supérieure du corps, et l'artère pulmonaire, permettant au sang de contourner le cœur. Parallèlement, le tronc pulmonaire est utilisé pour créer une néo-aorte, reliant le ventricule unique à la circulation systémique. La veine cave inférieure, qui transporte le sang provenant notamment du foie et se jetant dans le ventricule droit, est déconnectée de la circulation pulmonaire, excluant ainsi les facteurs hépatiques du lit vasculaire pulmonaire.

Suite à cette opération, les patients développent des vasodilatations pulmonaires importantes, détectées par échographie cardiaque avec contraste ou scintigraphie de perfusion au technétium 99m, ainsi que des MAV pulmonaires détectées par angiographie pulmonaire <sup>217</sup>. La prévalence des patients ayant développé des vasodilatations capillaires pulmonaires après une procédure de Glenn est de 20 à plus de 60% selon les études, avec un risque d'apparition et d'aggravation de ces vasodilatations qui augmente avec le temps

218–220 .

## b) Dernière étape de la correction chirurgicale : l'opération de Fontan

La procédure de Fontan est l'intervention chirurgicale définitive, caractérisée par une connexion cavo-pulmonaire totale, qui transforme le seul ventricule fonctionnel en ventricule systémique (**Figure 9D**). Dans cette intervention, la veine cave inférieure, auparavant reliée au ventricule droit, est chirurgicalement connectée à l'artère pulmonaire, de manière similaire à la veine cave supérieure dans la procédure de Glenn. Ainsi, tout le sang veineux est dirigé vers la circulation pulmonaire, rétablissant le contact entre le lit vasculaire pulmonaire et le sang provenant du foie.

Plusieurs études ont montré que les vasodilatations capillaires pulmonaires et les MAV apparues après la procédure de Glenn régressent et disparaissent complètement après la procédure de Fontan, généralement dans un délai de quelques mois à quelques années <sup>221-224</sup>.

## c) Anastomose cavo-pulmonaire unidirectionnelle gauche

Pour approfondir la notion selon laquelle la perte de facteurs dérivés du foie induit des vasodilatations du lit capillaire et la formation de MAV pulmonaires, intéressons-nous cette fois-ci à plusieurs cas de patients ayant subi une anastomose cavo-pulmonaire, cette fois-ci unidirectionnelle gauche. Dans ces cas, la veine cave supérieure est anastomosée exclusivement à l'artère pulmonaire gauche. Ainsi, seul le lit capillaire du poumon droit est en contact avec le sang veineux hépatique. Chez ces patients, les MAV se forment exclusivement dans le poumon gauche, qui n'est pas en contact avec les facteurs provenant du foie, tandis que le poumon droit ne présente aucune anomalie vasculaire détectée par angiographie <sup>225</sup>.

## 7. Le BMP-10 en perspective

Le BMP-10, un autre membre de la famille des BMP, est très similaire au BMP-9. Produit par l'oreillette droite du cœur et par les cellules stellaires du foie <sup>138,147</sup>, le BMP-10 se lie avec une grande affinité aux mêmes récepteurs tétramères sur les cellules endothéliales pulmonaires que le BMP-9, à savoir ALK1 et BMPR-II <sup>149</sup>. Les deux protéines partagent une séquence identique à 64% dans leur forme mature et ont montré des rôles à la fois spécifiques et redondants <sup>142,150</sup>. De plus, BMP-9 et BMP-10 peuvent former un hétérodimère, dont il a été suggéré qu'il pourrait être responsable de leur activité biologique <sup>138</sup>.

Une étude a révélé une diminution du taux de BMP-10 circulant chez 80 patients atteints de SHP par rapport à 121 patients cirrhotiques contrôles, en ajustant pour l'âge, le sexe et la sévérité de la maladie hépatique <sup>190</sup>. En revanche, une autre étude sur une cohorte plus petite n'a pas trouvé d'association entre des taux bas de BMP-10 et la présence de SHP chez les patients cirrhotiques (13 patients avec SHP contre 14 patients cirrhotiques contrôles) <sup>181</sup>.

Il est pertinent de se demander si la perte de BMP-10 est également un facteur nécessaire au développement du SHP. La diminution de l'activité BRE observée dans nos modèles animaux (LVB et LPVP) pourrait en partie résulter d'une perte de BMP-10 circulant. Il n'est pas encore établi si le BMP-10 produit par le cœur et celui produit par le foie ont des activités biologiques similaires. Étant donné que le foie est initialement affecté dans le développement du SHP, il est possible que le BMP-10 hépatique joue un rôle dans la pathologie pulmonaire. Des études plus approfondies sur le BMP-10, y compris dans notre nouveau modèle LPVP, pourraient fournir des éclaircissements importants sur les facteurs influençant le développement du SHP et sur les mécanismes impliqués dans la régulation des voies des BMP.

## CONCLUSION

---

La voie BMP-9/BMPRII/ALK1, avec ses divers acteurs, joue un rôle crucial dans le développement de plusieurs pathologies vasculaires pulmonaires, mais demeure complexe et encore largement méconnue. Ce projet a permis d'éclairer le rôle spécifique du ligand de cette voie, le BMP-9, en particulier dans les complications vasculaires pulmonaires associées à l'hypertension portale.

Le BMP-9, essentiel à la quiescence et à la stabilité vasculaire, tout en jouant un rôle dans le maintien du tonus vasculaire par la promotion de la vasoconstriction, est un acteur clé du bon fonctionnement des vaisseaux sanguins. Principalement produit par le foie, sa production diminue en cas d'hépatopathie chronique, comme la cirrhose, mais aussi en présence d'hypertension portale extra-hépatique. Cette diminution constitue un facteur nécessaire au développement du SHP. Dans ce contexte, étant donné que la perte de BMP-9 est indispensable au développement de la pathologie, restaurer sa voie de signalisation pulmonaire se distingue comme une cible thérapeutique potentielle pour le traitement des patients atteints de SHP, qu'il soit associé ou non à une cirrhose. Cette approche pourrait offrir une solution prometteuse, en particulier en l'absence de traitements curatifs autres que la transplantation hépatique.

Cependant, des zones d'ombre subsistent. Bien que tous les patients atteints de SHP présentent des taux diminués de BMP-9 circulant, cette baisse n'est pas toujours suffisante pour déclencher la pathologie. En cas de cirrhose très sévère, les taux de BMP-9 circulant peuvent également être fortement réduits, même en l'absence de maladie vasculaire pulmonaire. D'autres facteurs contribuent donc à la physiopathologie du SHP et restent à identifier. Le nouveau modèle de SHP après LPVP, que nous avons développé, offre de nombreuses perspectives prometteuses pour les recherches futures.

**CHAPITRE 2 :**  
**RÔLE DU PIGF DANS LE**  
**DÉVELOPPEMENT DU SYNDROME**  
**HÉPATOPULMONAIRE**

---

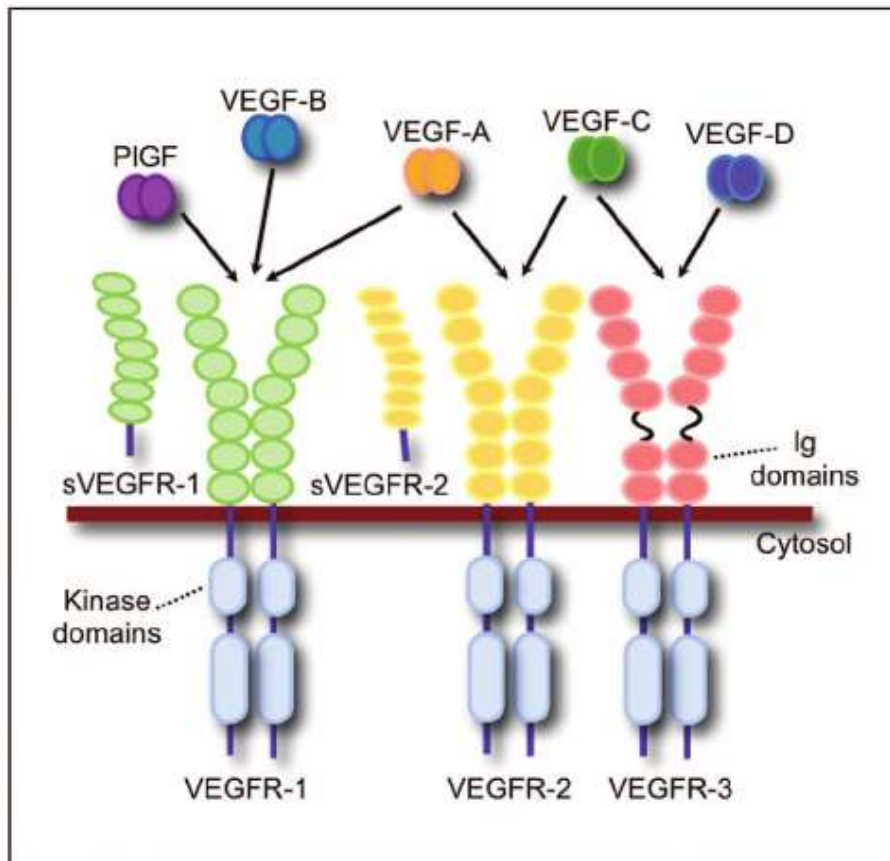
# INTRODUCTION

---

L'implication des facteurs pro-angiogéniques dans le développement du SHP est bien établie, notamment en ce qui concerne leur rôle dans la prolifération anormale des capillaires pulmonaires. Cependant, parmi les cibles thérapeutiques identifiées jusqu'à présent grâce à l'unique modèle de SHP associé à une cirrhose biliaire sévère, aucune n'a démontré de bénéfice clinique significatif pour les patients. L'émergence d'un nouveau modèle de SHP, sans cirrhose associée, offre des perspectives prometteuses pour approfondir notre compréhension de cette pathologie et mieux appréhender le rôle des acteurs pro-angiogéniques. Parmi les différents modulateurs de l'angiogénèse, le **Placental Growth Factor (PIGF)** pourrait représenter une cible thérapeutique pertinente.

## 1. La grande famille du VEGF

Chez les mammifères, la famille VEGF comporte 5 ligands : le VEGF-A, membre le plus connu de la famille, mais également le VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D et le PIGF. D'autres protéines associées au VEGF, comme le VEGF-E et VEGF-F, ont été retrouvées dans d'autres organismes non mammifères, comme parmi les virus ou dans le venin de serpent <sup>226</sup>. Tous ces ligands sont sécrétés et exercent leur activité principalement sous forme d'homodimères, bien que des formes hétérodimériques aient été décrites plus récemment. Ils interagissent avec différents récepteurs, chacun ayant des affinités variées. Les trois principaux récepteurs avec une activité tyrosine kinase sont le VEGFR1, VEGFR2 et VEGFR3 <sup>226</sup>. Des formes solubles de VEGFR1 et VEGFR2 existent et pourraient agir comme des inhibiteurs de la signalisation, en se comportant comme des pièges à ligand (**Figure 10**) <sup>227,228</sup>.



**Figure 10. Illustration des différents membres de la famille du VEGF.**

(Schmidt *et al. Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2011 <sup>229</sup>)

Parmi tous les ligands, le VEGF-A et le PIGF jouent un rôle majeur dans l'angiogenèse chez l'humain, et pourraient représenter les cibles les plus intéressantes sur le plan thérapeutique pour le traitement du SHP. Le VEGF-C et le VEGF-D sont principalement impliqués dans la lymphangiogenèse, en raison de leur interaction avec le récepteur VEGFR3 <sup>230,231</sup>. Quant au VEGF-B, son rôle reste encore mal compris, bien qu'il semble être limité au compartiment cardiaque, où il joue un rôle dans la survie cellulaire et l'anti-apoptose, sans véritablement agir comme un médiateur pro-angiogénique <sup>232-234</sup>.



## 2. Le VEGF-A, le ligand le plus connu et étudié de sa famille

Le VEGF-A a attiré une attention considérable au cours des dernières décennies en raison de son rôle central dans l'homéostasie vasculaire, tant dans les contextes physiologiques que pathologiques, principalement via le récepteur VEGFR2. Il influence divers processus tels que la prolifération, la migration, la survie cellulaire et la perméabilité vasculaire, et est crucial pour le développement de plusieurs organes<sup>235-237</sup>. Bien qu'il puisse également se lier au VEGFR1, le rôle précis de cette interaction reste encore mal compris<sup>237</sup>. Plusieurs thérapies ciblant l'inhibition du VEGF-A, en particulier dans le domaine du cancer, ont révélé des effets indésirables graves tels que l'hypertension, une altération de la fonction rénale due à des dommages aux cellules endothéliales nécessaires à la filtration glomérulaire, et un risque accru d'hémorragies<sup>238,239</sup>.

Le VEGF-A a longtemps été envisagé comme une cible thérapeutique prometteuse dans le traitement du SHP, soutenu par des données expérimentales issues du modèle de LVB, qui suggéraient une implication significative de ce ligand dans la pathologie<sup>55</sup>. Cependant, la transposition de ces résultats au contexte clinique humain n'a pas été couronnée de succès. En effet, un essai clinique utilisant le sorafenib, un inhibiteur de tyrosine kinase incluant les récepteurs au VEGF-A, a donné des résultats négatifs, mettant en évidence les limites de cette approche dans le traitement du SHP<sup>111</sup>.

## 3. Le PlGF, une cible de choix dans le traitement du syndrome hépatopulmonaire ?

Le PlGF, initialement découvert dans le placenta, est également exprimé par divers types cellulaires et organes, tels que le foie, le cœur et les poumons. Contrairement à son homologue le VEGF-A et aux trois récepteurs de la famille VEGF, dont la déficience est létale, les souris déficientes en PlGF sont viables et fertiles<sup>240-243</sup>. Le PlGF se lie exclusivement au VEGFR1, sans interagir avec VEGFR2, et semble être impliqué uniquement dans des conditions pathologiques. Cette spécificité en fait une cible potentielle attrayante pour le

traitement de certaines maladies, évitant ainsi les nombreux effets indésirables <sup>237</sup>. Des études cliniques chez l'Homme utilisant des anticorps anti-PIGF ont par ailleurs démontré que cette thérapie est bien tolérée avec peu d'effets indésirables <sup>244,245</sup>.

Le PIGF joue des rôles importants dans les trois grands composants du développement du SHP : le tonus vasculaire, l'angiogenèse et l'inflammation. Il est essentiel dans la vasorelaxation des artères et veines systémiques, facilitant la dilatation des vaisseaux et contribuant ainsi à la régulation du tonus vasculaire <sup>246-249</sup>. De plus, le PIGF induit la prolifération, la migration et la survie des cellules endothéliales, ce qui est crucial pour la régulation de l'angiogenèse <sup>250-252</sup>. Enfin, il agit comme un régulateur positif de la réponse inflammatoire <sup>253-256</sup>. Cibler le PIGF pourrait donc offrir une approche thérapeutique pertinente, capable de réduire la sévérité du SHP tout en minimisant les effets indésirables.

Une étude antérieure a démontré que la diminution du PIGF joue un rôle bénéfique sur le SHP expérimental associé à une cirrhose chez la souris dans le modèle de LVB. Le traitement par anticorps anti-PIGF a conduit à une amélioration de l'hypoxémie et une réduction des dilatations intravasculaires pulmonaires <sup>49</sup>. Ces résultats sont encourageants et prometteurs. L'évaluation des effets bénéfiques de la réduction du PIGF sur le SHP dans des contextes non cirrhotiques et la validation dans d'autres espèces permettrait d'approfondir notre compréhension du rôle du PIGF dans la maladie et de mieux cerner son potentiel thérapeutique.

#### **4. Plan du projet**

Dans un premier temps, ce projet vise à analyser les niveaux de PIGF dans une cohorte de patients présentant une pathologie hépatique, qu'elle soit cirrhotique ou liée à une hypertension portale extra-hépatique, avec ou sans SHP. Notre étude inclut 130 patients cirrhotiques, répartis en deux groupes : 111 sans maladies vasculaires pulmonaires et 19 présentant uniquement un SHP. De plus, 7 patients atteints de cavernome porte sont inclus.

Dans un second temps, nous avons développé un modèle de rat déficient en PIGF par la technique de CRISPR-Cas9. L'objectif de cette partie est d'évaluer si la déficience en PIGF

influence le développement du SHP expérimental associé à une cirrhose ou à une hypertension portale extra-hépatique. Nous avons utilisé les deux modèles de SHP par chirurgie dans les rats déficients en PIGF et les rats témoins (WT) : le modèle bien connu après LVB et notre modèle précédemment développé dans le Chapitre 1 après LPVP. Nous avons analysé la sévérité de l'hypoxémie et des dilatations vasculaires pulmonaires dans ces deux modèles. Nous avons examiné également la sévérité de l'hypertension portale et de la cirrhose pour déterminer si la déficience en PIGF joue un rôle protecteur contre le développement des hépatopathies dans ces modèles précliniques.

Enfin, nous utiliserons une approche transcriptomique novatrice grâce à l'outil QIAGEN Ingenuity Pathway Analysis (IPA), qui nous permettra de mettre en évidence les relations *in vivo* entre le PIGF et d'autres médiateurs potentiellement impliqués dans le développement du SHP. Ces relations seront ensuite validées en utilisant des méthodes *in vitro*, grâce à des cellules endothéliales microvasculaires pulmonaires humaines primaires.

**Robert et al.**

**Placental growth factor modulates endothelial nitric oxide  
production and exacerbates experimental hepatopulmonary  
syndrome**

Accepté dans *JHEP Reports*

---

# Placental Growth Factor Modulates Endothelial Nitric Oxide Production and Exacerbates Experimental Hepatopulmonary Syndrome

Fabien Robert<sup>1,2</sup>, Ferial Benchenouf<sup>1,2</sup>, My Ngoc Ha<sup>1,2</sup>, Alessandra Cuomo<sup>1,3</sup>, Mina Ottaviani<sup>1,2</sup>, Maxime Surbier<sup>1,2</sup>, Raphaël Thuillet<sup>1,2</sup>, Corinne Normand<sup>1,2</sup>, Florent Dumont<sup>1,2</sup>, Céline Verstuyft<sup>4</sup>, Frederic Fiore<sup>5</sup>, Frederic Guinut<sup>6</sup>, Marc Humbert<sup>1,2,7</sup>, Audrey Coilly<sup>8,9</sup>, Emmanuel Gonzales<sup>9,10</sup>, Olivier Sitbon<sup>1,2,7</sup>, Ly Tu<sup>1,2</sup>, Christophe Guignabert<sup>1,2,\*</sup>, Laurent Savale<sup>1,2,7,\*</sup>

\* These authors contributed to the manuscript equally

1. Université Paris-Saclay, Unité Mixte de Recherche en Santé (UMR\_S) 999 “Hypertension Pulmonaire: Physiopathologie et Innovation Thérapeutique (HPPIT)”, Le Kremlin-Bicêtre, France.
2. Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), UMR\_S 999 “HPPIT”, Le Kremlin-Bicêtre, France.
3. Department of Translational Medical Sciences, Federico II University, Naples, Italy.
4. Université Paris-Saclay, Centre de Ressource Biologique Paris-Saclay, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (APHP), Hôpital Bicêtre, Le Kremlin Bicêtre, France
5. Centre d'Immunophénomique (CIPHE), Aix Marseille Université, INSERM, CNRS, CELPHEDIA, PHENOMIN, Marseille, France.
6. Janvier-Labs, France.
7. Service de pneumologie et soins intensifs respiratoires, Centre de référence de l'hypertension pulmonaire (PulmoTension), AP-HP, Hôpital Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre, France.
8. Centre Hépatobiliaire, AP-HP, Hôpital Paul Brousse, Villejuif, France.
9. INSERM UMR\_S 1193, Hepatinov, University Paris-Saclay, Orsay, France.
10. Pediatric Hepatology and Liver Transplantation Unit, National Reference Centre for Biliary Atresia and Genetic Cholestasis, AP-HP, Hôpital Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre, France.

**Corresponding author:** Pr Laurent Savale (MD, PhD). INSERM UMR\_S 999 - Team 1 - Faculté de Médecine, Université Paris-Saclay. Bâtiment de recherche (2<sup>e</sup> étage). 63 rue Gabriel Péri, 94276 Le Kremlin Bicêtre, France. Tel: +33 1 40 94 88 33. E-mail: [laurent.savale@aphp.fr](mailto:laurent.savale@aphp.fr)

**Keywords:** Liver cirrhosis; Portal hypertension; Pulmonary endothelial dysfunction; Partial portal vein ligation; Common bile duct ligation; Intrapulmonary vascular dilations; Hypoxemia; VEGF

**Short Title :** Placental Growth Factor in Hepatopulmonary Syndrome

**Electronic word count:**

**Number of figures and Table:** 4 figures + 2 tables

**Conflict of interest statement:** Over the last three years, C.G. reports grants from Acceleron Pharma (Cambridge, MA, USA), a wholly-owned subsidiary of Merck & Co., Inc. (Rahway, NJ, USA), MSD, Corteria pharmaceuticals, Structure therapeutics (ex ShouTi), Diagonal Therapeutics, Gossamer, outside the submitted work. M.H. reports grants and personal fees from Acceleron, Aerovate, Altavant, AOP Orphan, Bayer, Chiesi, Ferrer, Janssen, Merck, MorphogenIX and United Therapeutics, outside the submitted work. L.S. reports personal fees from Bayer, MSD, Janssen and grants from Acceleron, Janssen, MSD, outside the submitted work. All the other authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this original article

**Financial Support statement:** This work was supported by funding from the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) grants no. EQU202203014670 (Equipe FRM 2022), the Chancellerie des Universités de Paris (Legs Poix), and the INSERM (Contrat Interface). F.R. is a recipient of a PhD fellowship from the Fondation du Souffle (FdS). A.C. acknowledges funding received from the Heart Failure Association of the ESC in form of an HFA Basic and Translational Research Grant.

**Authors contributions:** Conception and design: F.R., L.T., C.G., L.S.; Analysis and interpretation: all; Drafting manuscript: F.R., C.G., L.S.. F.F. and F.G. generated the *Plgf*<sup>-/-</sup> deficient rats.

## Abstract

**Background & aims:** Hepatopulmonary syndrome (HPS) results from portal hypertension, with or without cirrhosis, and is marked by pulmonary vascular dilations leading to severe hypoxemia. While the placental growth factor (PIGF) is important for vascular growth and endothelial function, its role in HPS is unclear. This study aims to clarify the involvement of PIGF in experimental models and human cases of HPS.

**Methods:** Circulating PIGF levels were measured in 64 controls and 137 patients with liver disease, with or without HPS. Two rat models, common bile duct ligation (CBDL) and long-term partial portal vein ligation (PPVL), were utilized. *Plgf* knockout (*Plgf*<sup>-/-</sup>) rats were generated using CRISPR-Cas9. Lung RNA sequencing analysis was performed in the CBDL model. The effects of PIGF on eNOS activity in human pulmonary microvascular endothelial cells (PMECs) were investigated.

**Results:** Circulating PIGF levels were significantly higher in cirrhotic patients compared to healthy controls ( $29.4 \pm 1.2$  versus  $20.2 \pm 0.8$  pg/mL,  $p < 0.0001$ ), but no difference were found between HPS and non-HPS patients. However, a significant correlation was observed between PIGF levels and hypoxemia in HPS patients ( $r = 0.61$ ,  $p = 0.005$ ). PIGF levels were not elevated in cases of extrahepatic portal hypertension. In *Plgf*<sup>-/-</sup> rats, there was a protective effect against CBDL-induced HPS, while PPVL-induced HPS severity remained unchanged. RNA sequencing coupled with IPA identified significant interactions between PIGF and pulmonary eNOS activity. Following CBDL, *Plgf*<sup>-/-</sup> rats showed decreased pulmonary eNOS activity and reduced circulating nitric oxide metabolites. *In vitro*, PIGF stimulation enhanced eNOS activity in PMECs, whereas PIGF knockdown led to a decrease.

**Conclusions:** These findings indicate that PIGF aggravates cirrhosis-induced HPS through modulation of pulmonary eNOS activity, and is not involved in HPS from extrahepatic portal hypertension.

## **Impact and implications**

This study identifies placental growth factor (PlGF) as a significant contributor to the exacerbation of hepatopulmonary syndrome (HPS) associated with cirrhosis, through its regulation of pulmonary nitric oxide production. Our findings demonstrate that PlGF deficiency mitigates the severity of both cirrhosis and HPS in the common bile duct ligation (CBDL) model, highlighting its potential as a therapeutic target in cirrhosis-induced HPS. Notably, this protective effect is absent in the partial portal vein ligation (PPVL) model, which induces HPS associated with portal hypertension without cirrhosis. These results open avenue for novel pharmacological interventions aim at improving patient outcomes for patients with cirrhosis-induced HPS.

## **Highlights**

- Increased circulating PlGF levels is associated with worsened hypoxemia in patients with cirrhosis-associated HPS.
- PlGF directly regulates endothelial nitric oxide production.
- PlGF deficiency protects against cirrhosis-associated HPS.
- PlGF does not contribute to HPS induced by portal hypertension in the absence of cirrhosis.



## 1 **Introduction**

2 Hepatopulmonary syndrome (HPS) poses a significant challenge in chronic liver diseases,  
3 marked by liver dysfunction, intrapulmonary vascular dilatations (IPVDs) and arterial  
4 hypoxemia (1). HPS notably impacts patient's quality of life and survival, making it a critical  
5 clinical concern (2–5). While commonly associated with cirrhosis, HPS can also occur  
6 independently, particularly in cases of extrahepatic portal hypertension or congenital  
7 portosystemic shunts (1,6,7). This heterogeneity highlights the complex interplay between the  
8 portal and pulmonary circulatory systems, suggesting multifaceted pathophysiological  
9 mechanisms driving HPS.

10 Unfortunately, the cellular and molecular mechanisms underlying the onset and progression of  
11 HPS remain poorly understood, contributing to the lack of curative treatments. As a result, liver  
12 transplantation remains the only effective therapeutic option (8). The placental growth factor  
13 (PlGF) is known to play a role in regulating vascular tone (9–14), angiogenesis (15–19), and  
14 inflammatory processes (20–22) in various pathologic contexts. This member of the vascular  
15 endothelial growth factor (VEGF) family is abundantly expressed in conditions affecting the  
16 liver and lungs (22–25). Blocking PlGF with antibodies has been shown to reduce IPVDs and  
17 hypoxemia in cirrhotic mice with HPS by modulating pulmonary inflammation and  
18 angiogenesis (22).

19 However, despite this promising evidence, it remains unclear whether PlGF can serve as a true  
20 therapeutic target in HPS. Most studies have focused on cirrhotic patients and the common bile  
21 duct ligation (CBDL) model. There is a lack of data on the involvement of PlGF in patients  
22 with portal hypertension without cirrhosis, or in the partial portal vein ligation (PPVL) model  
23 of HPS associated with extrahepatic portal hypertension. Given the ubiquitous nature of portal  
24 hypertension in chronic liver diseases, irrespective of cirrhosis, understanding its role in the

25 pathogenesis of HPS is crucial. Exploring the dynamics of PIGF across various hepatic contexts  
26 is essential for developing effective targeted therapeutic strategies.

27 To bridge this gap, our study aims to investigate PIGF expression in human subjects across  
28 different contexts of portal hypertension, both with or without cirrhosis, and its association with  
29 HPS. Additionally, we examined the role of PIGF in the development of HPS using two  
30 complementary experimental models : the cirrhosis-related CBDL model (26) and the long-  
31 term PPVL model, which induces portal hypertension without cirrhosis (27). By analyzing  
32 PIGF levels across these distinct hepatic conditions, we aim to clarify its specific contributions  
33 to the pathophysiology of HPS. To gain further insight into the role of PIGF in pulmonary  
34 vascular dysfunction, we conducted *in vitro* studies using primary cultures of human pulmonary  
35 microvascular endothelial cells (PMECs).

## 36 **Material and Methods**

### 37 **Cohort Data collection**

38 This study was approved by the ethics committee CPP Ile-de-France – VII (approval number:  
39 CO 10-003) and conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. All patients gave  
40 informed consent for data and sample collection. Between 2017 and 2024, 130 patients  
41 diagnosed with cirrhosis (with or without HPS) were included in this study. Additionally,  
42 samples from 7 patients with portal cavernoma without cirrhosis were also included. Patients  
43 with combined portopulmonary hypertension were excluded. Lastly, 64 control samples from  
44 healthy individuals were obtained through the Etablissement Français du Sang (EFS).

45 Cirrhosis was diagnosed based on clinical and laboratory findings or liver biopsy, with severity  
46 assessed using the Child-Pugh or MELD classifications. Portal hypertension was diagnosed  
47 using hemodynamic measurements or suggestive signs, such as esophageal varices,  
48 splenomegaly, thrombocytopenia, presence of portosystemic collaterals, ascites and  
49 encephalopathy.

50 The diagnosis of HPS in cirrhotic patients was confirmed by the presence of IPVDs, assessed  
51 using contrast-enhanced echocardiography, along with abnormal arterial oxygenation defined  
52 by an alveolar-arterial oxygen gradient ( $A-aO_2$ )  $>15$ mmHg (or  $>20$  mmHg in patients  $>64$  years  
53 old) (28).

54 Serum samples from healthy controls, cirrhotic patients or patients with portal cavernoma were  
55 stored at  $-80^\circ\text{C}$ . Circulating PlGF levels were quantified using the SimplePlex Ella<sup>TM</sup>  
56 microfluidic platform (Protein Simple) following the manufacturer's instructions.

### 57 **Generation of *Plgf*-deficient rats**

58 The knock-out (KO) of the *Plgf* gene (from the Ensembl browser [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org), number  
59 ENSRNOG00000005650) was achieved by deleting a 663 bp sequence. The suppressed region  
60 corresponds to the 5'UTR, the start codon and the Exon 1 of the *Plgf* gene (Pgf-201  
61 ENSRNOT00000007790.5 transcript) (**Fig. S1**). CRISPR Cas9 gene-editing technology was  
62 used by micro-injecting the RjHan:SD Rat zygotes. Two CRISPR guides were selected to  
63 induce the deletion, a sgRNA (5'- TGC GGGGGT CACGCGCACTC) targeting the region  
64 located 56 bp before the 5'UTR and a sgRNA (5'- AGGATGCC CACATATTTCCC) targeting  
65 the region located 119 bp after the exon 1 of the *Plgf* gene. CRISPR guides and Cas9 mRNA  
66 were microinjected into RjHan:SD zygotes (RjHan:SD wild type zygotes provided by Janvier-  
67 labs, France). The micro-injection mix consisted of 15 ng/ $\mu$ L of Cas9 (mRNA) and 5ng/ $\mu$ L of  
68 each sgRNA. The F0 founders (mosaïcs) were screened for the desired mutation using PCR and  
69 sequencing. These founders were then mated to RjHan:SD breeders to segregate the targeted  
70 allele. The N1 progeny were identified using PCR and sequencing. The international  
71 designation for this edited rat lineage is RjHan:SD-Pgfem1Ciphe/Rj.

## 72 ***In vivo* experimental design**

73 All animal care and procedures were approved by the French Animal Experimentation Ethics  
74 Committees (permit number: Apafis #23045). Male *Plgf*-deficient rats or their wild-type (WT)  
75 littermates (8 weeks old, Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France) underwent CBDL and  
76 PPVL surgery as previously described (26,27,29,30). Analyses were performed 4 weeks post-  
77 CBDL and 10 weeks post-PPVL, as we previously demonstrated that HPS develops after these  
78 time points (27). Age-matched SHAM-operated control animals were also included for  
79 comparison.

## 80 **Arterial oxygenation and Intrapulmonary vascular dilations measurements in rats**

81 *Arterial blood gas analysis.* Rats were anesthetized with 2% inhaled isoflurane in ambient air,  
82 and their body temperature was maintained at 37°C. A tracheotomy was performed, and  
83 ventilation was adjusted using a Small Animal Ventilator (Harvard Apparatus, Holliston, USA)  
84 to maintain a partial pressure of arterial carbon dioxide (PaCO<sub>2</sub>) between 35 and 45 mmHg .  
85 Within 5 minutes of anesthesia induction, arterial blood samples were collected from the left  
86 carotid artery, and the partial pressure of arterial oxygen (PaO<sub>2</sub>) was measured using the epoc®  
87 blood analysis system (Siemens Healthineers, Courbevoie, France). The A-aPO<sub>2</sub> was then  
88 calculated.

89 *Contrast-enhanced echocardiography.* A microbubbles-based contrast agent was injected  
90 through a jugular vein catheter. The microbubbles (ranging from 10 to 40µm) are larger than  
91 the average diameter of pulmonary capillaries. The presence of microbubbles in the left  
92 ventricle after 5 cardiac cycles following the injection indicated the presence of IPVDs. The  
93 signal was calculated by the difference in decibels (ΔdB) before and after injection in both the  
94 right and left ventricles. The signal ratio between the left and right ventricles was calculated to  
95 assess the severity of IPVDs. Detection was performed using the Vevo® 3100 LT  
96 echocardiography system (Fujifilm VisualSonics Inc.).

97 *Systemic fluorescent microspheres dissemination.* A total of  $7 \times 10^6$  orange fluorescent  
98 microspheres (8 µm in diameter, Phosphorex) were injected through a jugular vein catheter.  
99 Under normal physiological conditions, the pulmonary capillaries trapped the fluorescent  
100 microspheres. The presence of IPVDs facilitated their dissemination into the systemic  
101 circulation. One minute after injection, the kidney was removed, and the number of fluorescent  
102 microspheres in the kidney was quantified using flow cytometry with the Accuri™ C6  
103 instrument (BD Biosciences) as previously described (27).

104 **Liver function assessment**

105 Portal vein venous flow was measured using hepatic Doppler ultrasound with the Vevo® 3100  
106 LT echocardiography system (Fujifilm VisualSonics Inc.) on anesthetized rats. Spleen and liver  
107 weights were recorded, and 5µm liver sections were analyzed following Picro-Sirius Red  
108 staining. Blood samples were tested for common liver enzymes at the Service de Biologie  
109 Médicale (Marie-Lannelongue hospital, Le Plessis-Robinson, France).

110

### 111 **Circulating PIGF levels, Complete blood cell count and Nitrite/Nitrate analysis in animal** 112 **samples**

113 Serum PIGF levels were quantified using the ELISA kit (E-CL-R0520, ElabScience) following  
114 the manufacturer's instructions. Total white blood cells, neutrophils, lymphocytes and  
115 monocytes counts were measured in blood samples using Element HT5 (HESKA distributed  
116 by SCIL). Nitrite and nitrate levels were quantified in serum samples using a colorimetric  
117 Nitrite/Nitrate Assay kit (23479, Sigma-Aldrich) following the manufacturer's instructions.

118

### 119 **RNA extraction and transcriptomic analysis**

120 RNA extraction from lung biopsies was performed using the RNeasy® Mini Kit (QIAGEN  
121 S.A.S., Courtaboeuf, France) following the manufacturer's protocol. A total of 250 ng of RNA  
122 was used for Next-Generation Sequencing (NGS) library preparation using the Illumina  
123 stranded mRNA prep kit following the manufacturer's instructions. Data analysis was  
124 performed using R and RStudio software. Reads were independently mapped to the *rattus*  
125 *norvegicus* genome mRatBN7.2 using Rsubread package (31). Genes were considered  
126 significantly upregulated with a fold-change > 1.5, and down-regulated with a fold-change <  
127 1.5, all with a p-value < 0.05. My pathway tool from Ingenuity pathway analysis (IPA)  
128 QIAGEN (QIAGEN Inc., <https://digitalinsights.qiagen.com/IPA>) was used to map all known  
129 PIGF direct and indirect interactions with downstream targets or genesets according to IPA's

130 database. The previously generated dataset was overlaid onto this network. All raw and  
131 processed data have been submitted on GEO NCBI database under the accession number  
132 GSE278353.

133

#### 134 ***In vitro* experimental design**

135 Human PMECs were isolated and cultured as previously described (32), and used at early  
136 passages <5. Experiments were conducted in a serum-depleted medium (0.5% Fetal Calf  
137 Serum). To analyse the effect of exogenous PlGF on human PMECs, synchronized cells were  
138 stimulated for 24 hours with the vehicle (PBS) or recombinant PlGF (Catalog 264-PGB, Bio-  
139 Techne) at concentrations of 50 or 200ng/mL. To suppress PlGF expression, synchronized cells  
140 were transfected using lipofectamine RNAiMAX with 100 nM of PlGF siRNA (HSS143278,  
141 Thermo Fisher Scientific) or with a scrambled sequence, and the cells were studied within 1  
142 day after transfection.

143

#### 144 **Western Blot and Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR)**

145 Protein extracts from cells and tissues were analyzed for NOS3 (1:500, catalog number 610297,  
146 BD Biosciences) p-NOS3 (1:100, catalog number sc-81510, Santa Cruz) and  $\beta$ -actin (1:5000,  
147 catalog number A3854, Sigma-Aldrich). *Plgf* mRNA expression levels were measured by RT-  
148 qPCR as previously described (27).

149

#### 150 **Statistical analyses**

151           Categorical variables are expressed as numbers (n) and relative frequencies (%), while  
152 continuous variables are expressed as mean  $\pm$  SEM. Normality was assessed with the Shapiro-  
153 Wilk test.

154           Circulating PIGF levels among healthy controls, cirrhotic patients and patients with  
155 extrahepatic portal hypertension were compared using a one-way ANOVA followed by a Tukey  
156 post hoc test. Then, we evaluated whether circulating PIGF levels are influenced by the severity  
157 of cirrhosis by comparing patients based on their Child-Pugh or MELD scores using an unpaired  
158 *t* test. To assess an association between PIGF levels and HPS in cirrhotic patients, a multivariate  
159 logistic regression was performed, after adjustment for liver disease severity assessed by Child-  
160 Pugh or MELD scores. Finally, Pearson's correlation coefficient was used to examine the  
161 correlation between PIGF levels and the severity of hypoxemia (A-aO<sub>2</sub>) in cirrhotic patients  
162 with HPS.

163           We hypothesized that PIGF levels may be dysregulated in HPS experimental models  
164 and that deleting *Plgf* could mitigate HPS severity. In animal models, we compared continuous  
165 variables in SHAM, CBDL, and PPVL rats (both WT and *Plgf*-deficient rats) using a one-way  
166 ANOVA followed by a Tukey post hoc test.

167           For *in vitro* experiments with human PMECs, we evaluated the effects of two doses of  
168 recombinant PIGF stimulation using a one-way repeated measures ANOVA. We assessed the  
169 impact of siRNA-mediated inhibition of PIGF using a paired *t* test.

170           Statistical analyses were conducted using GraphPad Prism version 10.0.0 for Windows  
171 (GraphPad Software), except for the logistic regression, which was performed using SPSS  
172 Statistics, version 29 (SPSS Inc.). Results with a p-value  $<0.05$  were considered statistically  
173 significant.



## 174 **Results**

### 175 **Elevated PIGF Levels Correlate with Hypoxemia in Cirrhosis Patients with HPS**

176 Patient demographics, etiologies, and liver disease severity are detailed in **Table 1**, with healthy  
177 subjects serving as controls. Circulating serum PIGF levels were significantly higher in patients  
178 with cirrhosis compared to healthy controls ( $29.4 \pm 1.2$  versus  $20.2 \pm 0.8$  pg/mL,  $p < 0.0001$ ) (**Fig.**  
179 **1A**). Notably, circulating PIGF levels were elevated in cirrhotic patients, irrespective of the  
180 stage of liver disease. There was no significant difference in PIGF levels between patients with  
181 Child-Pugh class A cirrhosis and those with Child-Pugh class B or C cirrhosis ( $30.3 \pm 2.3$  pg/mL  
182 versus  $29.0 \pm 1.4$  pg/mL, respectively, NS) (**Fig. 1B**). Additionally, in patients with Child-Pugh  
183 A cirrhosis, those with clinically significant portal hypertension with esophageal varices or  
184 portosystemic collaterals did not exhibit differences in PIGF levels compared to patients  
185 without these clinical features ( $30.9 \pm 3.3$  versus  $29.6 \pm 3.1$  pg/mL, respectively, NS).  
186 Stratifying cirrhotic patients by MELD score yielded similar results, as PIGF levels did not  
187 differ significantly between those with MELD scores  $< 15$  and those with scores  $\geq 15$  ( $27.6 \pm$   
188  $1.6$  versus  $30.8 \pm 1.7$  pg/mL, respectively, NS). In contrast, patients with portal cavernoma who  
189 exhibited no signs of cirrhosis had PIGF levels comparable to those of healthy controls  
190 ( $18.7 \pm 1.4$  versus  $20.2 \pm 0.8$  pg/mL respectively, NS) (**Fig. 1A**).

191 Among the 130 cirrhotic patients, 19 were diagnosed with HPS. There was no significant  
192 difference in PIGF levels between cirrhotic patients with HPS and those without pulmonary  
193 vascular disorder (**Fig. 1C**). There was no association between serum PIGF levels and the  
194 presence of HPS, as assessed by a logistic regression model adjusted for liver disease severity  
195 using either the Child-Pugh score (OR 0.960; 95% CI 0.908–1.016, NS) or the MELD score  
196 (OR 0.978; 95% CI 0.930–1.028, NS). However, in HPS patients, Pearson analysis revealed a

197 significant correlation between elevated circulating PlGF levels and increased A-aO<sub>2</sub> (r=0.61,  
198 p=0.005) (**Fig. 1D**).

### 199 **PlGF Deficiency Mitigates CBDL-Induced HPS but Not PPVL-Induced HPS**

200 To investigate the role of PlGF in the development of HPS, we generated *Plgf*-deficient rats  
201 (*Plgf*<sup>-/-</sup> KO rats) using CRISPR-Cas9 technology by deleting a 663 bp sequence in the *Plgf*  
202 gene. These *Plgf*<sup>-/-</sup> KO rats are viable and fertile, and did not exhibit any noticeable  
203 abnormalities. We then performed CBDL, PPVL, or SHAM surgery on these rats (**Figure 2A**).  
204 Circulating PlGF levels and tissue expression were assessed using ELISA for the serum and  
205 RT-qPCR analysis for lungs and liver tissues from SHAM, CBDL, and PPVL rats (both WT  
206 and *Plgf*<sup>-/-</sup> KO rats). Under basal conditions (SHAM-operated rats), *Plgf* mRNA levels were  
207 higher in lung tissues compared to liver tissues. In WT rats, following CBDL surgery,  
208 circulating PlGF levels significantly increased, along with hepatic *Plgf* mRNA levels compared  
209 to SHAM rats, indicating enhanced hepatic production in cirrhotic rats (**Fig. 2B-C**). However,  
210 no changes in lung *Plgf* mRNA levels were observed after CBDL surgery. Following PPVL  
211 surgery, circulating PlGF levels, as well as hepatic and pulmonary *Plgf* mRNA levels, were  
212 similar to those in SHAM-operated rats (**Fig. 2B-C**). As expected, in *Plgf*-deficient rats, *Plgf*  
213 mRNA was undetectable in both lungs and liver across all surgical groups.

214 The development of HPS was evaluated in each model. In SHAM-operated rats (both WT and  
215 *Plgf*<sup>-/-</sup> KO rats), no IPVDs were observed via contrast-enhanced echocardiography or systemic  
216 fluorescent microspheres analysis following jugular vein injection. Additionally, arterial blood  
217 gas analysis showed no evidence of hypoxemia (**Fig. 2 D-F**).

218 Following CBDL surgery, *Plgf*<sup>-/-</sup> KO rats were partially protected from experimental HPS  
219 development, as evidenced by a less significant increase in A-aO<sub>2</sub> and fewer detected IPVDs  
220 compared to their WT littermates (**Fig. 2D-F**).

221 However, after PPVL surgery, both *Plgf*<sup>-/-</sup> KO rats and their WT littermates developed IPVDs  
222 and hypoxemia with no significant difference in severity between both groups (**Fig. 2D-F**).

223 These findings suggest that PlGF deficiency provided a protection against the development of  
224 cirrhosis-induced HPS, but does not play a role in the development of HPS related to  
225 extrahepatic portal hypertension.

### 226 **PlGF Deficiency Attenuates Severity of Biliary Cirrhosis and Portal Hypertension after** 227 **CBDL surgery**

228 The development of HPS results from biliary cirrhosis in CBDL rats and from extrahepatic  
229 portal hypertension in PPVL rats. We explored surrogate indicators of portal hypertension using  
230 hepatic Doppler ultrasound and found that portal venous flow decreased following CBDL  
231 surgery. However, *Plgf*<sup>-/-</sup> KO rats exhibited a trend towards a less pronounced reduction in  
232 portal venous flow compared to *Plgf*<sup>+/+</sup> rats (**Fig. 3A**). In addition, cirrhotic *Plgf*<sup>-/-</sup> KO rats had  
233 a less severe increase in liver and spleen weights (**Fig. 3B**). Following PPVL surgery, the  
234 reduction in portal venous flow was similar between *Plgf*<sup>-/-</sup> KO rats and their WT littermates,  
235 with both groups showing comparable levels of splenomegaly and no hepatomegaly (**Fig. 3A-**  
236 **B**).

237 We also investigated liver dysfunction and cirrhosis severity in each model. Interestingly, PlGF  
238 deficiency reduced the severity of collagen deposition following cirrhosis induction, as shown  
239 by a decrease in the area of Picro-Sirius Red staining in liver sections (**Fig. 3C-D**). Consistent  
240 with these findings, cirrhotic *Plgf*<sup>-/-</sup> KO rats had lower levels of aspartate aminotransferase  
241 (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP) and gamma glutamyl  
242 transpeptidase (Gamma GT) compared to cirrhotic *Plgf*<sup>+/+</sup> rats (**Table 2**). Moreover,  
243 leukocytosis, commonly observed post-CBDL, was less severe in *Plgf*<sup>-/-</sup> KO rats, with reduced  
244 total white blood cells, neutrophils, lymphocytes, and monocytes compared to their WT

245 littermates (**Table 2**). Since cirrhosis and leukocytosis did not develop following PPVL surgery,  
246 no differences in these parameters were observed between groups.

247 Overall, these results suggest that PIGF deficiency provides partial protection against the  
248 development of biliary cirrhosis.

### 249 **PIGF-Mediated Regulation of Pulmonary Transcriptome in Cirrhosis-Associated HPS**

250 Following CBDL surgery, PIGF appears to play a significant role in the development of both  
251 cirrhosis and HPS. However, in the PPVL model, PIGF does not appear to play a role in the  
252 development of portal hypertension or the severity of HPS. Given the increased hepatic  
253 production of PIGF in experimental cirrhosis, we aimed to explore the molecular pathways  
254 through which this overproduction modulates lung pathophysiology in CBDL rats.

255 To achieve this, we performed RNA sequencing analysis on lung tissue from a new surgical  
256 series that included 6 CBDL and 10 SHAM WT rats. This analysis identified 16,626  
257 differentially expressed genes, of which 2,382 were highly significant ( $p < 0.05$ , fold  
258 change  $> |1.5|$ ).

259 We investigated the interactions between PIGF and the pulmonary transcriptome of CBDL rats  
260 using Qiagen's ingenuity pathway analysis (IPA). Leveraging the "My Pathway" tool, we  
261 mapped all direct and indirect interactions downstream of PIGF and overlaid our dataset on the  
262 generated pathway. PIGF is predicted to modulate several molecules and canonical pathways  
263 in the lung (**Fig. S2**). Notably, our transcriptomic analysis indicates that PIGF is predicted to  
264 activate inflammatory and immunomodulatory cytokines, such as CCL4, CXCL8, TNF,  
265 CCL28, CCL12, IL6 and IL1B, as well as multiple canonical pathways involved in inflammation.  
266 Interestingly, PIGF is also predicted to activate pathways involved in nitric oxide (NO)  
267 production, a key vasodilator known to play a role in the development of HPS, specifically the  
268 pathways identified as "eNOS signaling" and "Nitric Oxide Signaling in the Cardiovascular  
269 System".

## 270 **Modulation of Pulmonary eNOS Activity by PIGF Abundance**

271 To investigate the relationship between PIGF and pulmonary eNOS signaling in cirrhotic rats,  
272 we measured the levels of eNOS and its phosphorylated form (p-eNOS) at the Serine 1177,  
273 which is known to activate NO production, in lung homogenates. Following CBDL surgery, we  
274 observed increased levels of both p-eNOS and total eNOS in WT rats. Interestingly, in *Plgf*<sup>-/-</sup>  
275 KO rats, there was a significant decrease in the pulmonary levels of p-eNOS and eNOS, which  
276 were normalized compared to SHAM WT rats (**Fig. 4A**). Additionally, we examined the levels  
277 of NO metabolites (Nitrite/Nitrate) in the serum of rats following CBDL surgery. While  
278 circulating Nitrite/Nitrate levels were elevated in cirrhotic WT rats, the increase was less  
279 significant in *Plgf*<sup>-/-</sup> KO rats (**Fig. 4B**).

280 To establish a direct link between PIGF and NO production, we performed *in vitro* experiments  
281 using primary cultures of human PMECs from six different lung specimens.

282 Cells were stimulated with PIGF at concentrations of 50 ng/mL and 200 ng/mL, and the  
283 expression of eNOS and its phosphorylated form on Serine 1177 were analyzed. Interestingly,  
284 30 minutes of stimulation induced a strong phosphorylation of eNOS without altering its total  
285 form. However, after 24 hours, both p-eNOS and total eNOS levels increased in PMECs (**Fig.**  
286 **4C**). To investigate the impact of PIGF inhibition on eNOS activity, we conducted siRNA-  
287 mediated knockdown of PIGF (siPIGF) and examined eNOS activity 24 hours after transfection.  
288 We confirmed the successful suppression by RT-qPCR with the absence of PIGF mRNA  
289 detection. The use of siPIGF treatment on PMECs significantly decreased in both p-eNOS and  
290 eNOS levels (**Figure 4D**).

291 These findings highlight the significant role of PIGF abundance in modulating pulmonary  
292 eNOS activity.

## 293 **Discussion**

294 Our study provides new insights into the role of PIGF in HPS associated with various types of  
295 liver diseases, with or without cirrhosis. Consistent with prior reports, we observed significantly  
296 elevated PIGF levels in cirrhotic patients (33,34). Notably, as previously demonstrated (35),  
297 PIGF levels were comparable between cirrhotic patients with or without HPS. However, among  
298 HPS patients, higher PIGF levels correlated with more severe hypoxemia. Interestingly, PIGF  
299 levels remained unchanged in patients with extrahepatic portal hypertension without cirrhosis,  
300 despite the potential for triggering HPS. These observations suggest that while PIGF may  
301 exacerbate cirrhosis-induced HPS, it may not directly initiate the condition.

302 These human findings align with our rodent studies. Biliary cirrhosis induced by CBDL in rats  
303 led to a marked overproduction of PIGF in the liver, resulting in increased circulating PIGF  
304 levels. Conversely, in the model of extrahepatic portal hypertension following PPVL surgery,  
305 in which we previously demonstrated the development of HPS (27), circulating PIGF levels,  
306 hepatic and pulmonary PIGF expression remained unaltered.

307 The role of PIGF in HPS induced by CBDL in mice has been previously highlighted (22). The  
308 administration of anti-PIGF antibody, both prophylactically and therapeutically, improved the  
309 pulmonary phenotype by reducing IPVDs and hypoxemia, which is attributed to the reduction  
310 of angiogenesis and inflammation. Our findings using *Plgf*-deficient rats post-CBDL echoed  
311 these results, showing protection against HPS development, albeit without completely reversing  
312 the condition. However, the severity of HPS in the long-term PPVL model was comparable  
313 between *Plgf*-deficient and WT rats, indicating that PIGF does not contribute to the  
314 development of HPS in the context of extrahepatic portal hypertension.

315 The exacerbation of cirrhosis-induced HPS by PlGF appears primarily mediated through its  
316 modulation of inflammation, angiogenesis (22) and vascular tone. PlGF is a key circulating  
317 factor that regulates the secretion of inflammatory and immunomodulatory cytokines from  
318 various cell types (20–22). Our transcriptomic study revealed the potential role of PlGF in  
319 pulmonary inflammation, a critical component of the CBDL-induced HPS model. We found  
320 that PlGF activates inflammatory and immunomodulatory cytokines, such as CCL4, CXCL8,  
321 TNF, CCL28, CCL2, IL6 and IL1B, along with canonical pathways involved in inflammation.  
322 Moreover, PlGF was predicted to regulate NO production, a pivotal actor in vascular tone  
323 modulation, which is strongly implicated in HPS (36–39).

324 The effect of PlGF on systemic vascular tone is well-documented, particularly in pre-eclampsia,  
325 where low circulating PlGF levels predict disease occurrence (40). PlGF administration has  
326 been shown to treat and reverse pre-eclampsia in experimental models. Numerous studies  
327 demonstrated PlGF dose-dependent vasodilator effect on systemic circulation (9–14).  
328 Interestingly, the systemic vasodilatory effect of PlGF involved NO, since this effect was  
329 reversible with a NO synthase inhibitor (9,13). However, the role of PlGF in pulmonary NO  
330 synthesis and its impact on pulmonary vascular tone remained unexplored until now.

331 Our research reveals a dose-dependent activation of eNOS by PlGF in cultured human PMECs,  
332 with the opposite effect observed following siRNA-mediated knockdown of PlGF. *In vivo*,  
333 cirrhotic WT rats post-CBDL surgery exhibited elevated pulmonary eNOS and its  
334 phosphorylated form, alongside increased circulating NO metabolites, all contributing to HPS  
335 development. In contrast, cirrhotic *Plgf*<sup>-/-</sup> KO rats displayed normalized levels of pulmonary  
336 eNOS, phosphorylated eNOS, and NO metabolites, suggesting a direct role for PlGF in  
337 pulmonary NO production.

338 Finally, we cannot rule out that the beneficial effect of PlGF deficiency on the development of  
339 cirrhosis could influence the severity of HPS. Previous studies have shown that PlGF inhibition  
340 improves cirrhosis severity and liver function across different models (23–25). Our study  
341 similarly found that deleting the *Plgf* gene in rats attenuated CBDL-induced cirrhosis severity,  
342 as evidenced by reduced portal hypertension, decreased collagen deposition, and improved liver  
343 function in *Plgf*-deficient rats. Finally, future studies are needed to precise the role of PlGF on  
344 liver cells including liver sinusoidal endothelial cells.

345 In conclusion, our study highlights the complex role of PlGF in HPS, particularly in the context  
346 of cirrhosis. While elevated circulating PlGF exacerbates cirrhosis-associated HPS severity  
347 through its effects on pulmonary vascular tone, inflammation, and angiogenesis, it does not  
348 directly trigger the condition. These findings deepen our understanding of the molecular  
349 mechanisms underlying HPS and suggest potential therapeutic strategies, particularly through  
350 the modulation of PlGF activity in cirrhotic patients. These discoveries offer promising  
351 opportunities for improving HPS management by elucidating the interactions between  
352 circulating factors and liver pathologies.



353 **Abbreviations**

354 **A-aO<sub>2</sub>**: Alveolar-arterial oxygen gradient; **CBDL**: Common bile duct ligation; **eNOS**:  
355 Endothelial nitric oxide synthase; **HPS**: Hepatopulmonary syndrome; **IPA**: Ingenuity pathway  
356 analysis; **IPVDs**: Intrapulmonary vascular dilations; **KO**: Knock-out; **NO**: Nitric oxide; **PIGF**:  
357 Placental growth factor; **PMECs**: Pulmonary microvascular endothelial cells; **PPVL**: Partial  
358 portal vein ligation; **VEGF**: Vascular endothelial growth factor; **WT**: Wild-type.

359

360 **Acknowledgments**

361 The authors would like to express their gratitude to Axel Perrot for his invaluable assistance  
362 with the animals, and to Alexandre Kauskot and Cécile Denis for their expert guidance with  
363 flow cytometry. Special thanks are also due to to the CIPHE-GEMTIS Consortium  
364 investigators, including Fabien Angelis, Corine Arnoux, Thomas Bagarre, Yannis Berkane,  
365 Kevin Forin, Cécile Garcia, Robin Lacombe, Naïs Phillippe, and Mireille Richelme, for their  
366 essential role in the generation of *Plgf* KO rats. We also thank the Centre de Ressources  
367 Biologiques Paris-Saclay (CRB Paris-Saclay) for the storage of biological samples for  
368 pneumology cohort (BRIF Number: BB-0033-00089). We also appreciate the support and  
369 collaboration of our laboratory colleagues and the funding agencies that made this research  
370 possible.

## References

1. Raevens S, Boret M, Fallon MB. Hepatopulmonary syndrome. *JHEP Reports*. 2022;4:100527.
2. Younis I, Sarwar S, Butt Z, Tanveer S, Qadir A, Jadoon NA. Clinical characteristics, predictors, and survival among patients with hepatopulmonary syndrome. *Ann Hepatol*. 2015;14:354–360.
3. Schenk P, Schöniger-Hekele M, Fuhrmann V, Madl C, Silberhumer G, Müller C. Prognostic significance of the hepatopulmonary syndrome in patients with cirrhosis. *Gastroenterology*. 2003;125:1042–1052.
4. Kawut SM, Krowka MJ, Forde KA, Al-Naamani N, Krok KL, Patel M, et al. Impact of Hepatopulmonary Syndrome in Liver Transplantation Candidates and the Role of Angiogenesis. *Eur Respir J*. 2021;2102304.
5. Fallon MB, Krowka MJ, Brown RS, Trotter JF, Zacks S, Roberts KE, et al. Impact of Hepatopulmonary Syndrome on Quality of Life and Survival in Liver Transplant Candidates. *Gastroenterology*. 2008;135:1168–1175.
6. Baiges A, Turon F, Simón-Talero M, Tasayco S, Bueno J, Zekrini K, et al. Congenital Extrahepatic Portosystemic Shunts (Abernethy Malformation): An International Observational Study. *Hepatology*. 2020;71:658–669.
7. Lambert V, Ladarre D, Fortas F, Durand P, Hervé P, Gonzales E, et al. Cardiovascular disorders in patients with congenital portosystemic shunts: 23 years of experience in a tertiary referral centre. *Arch Cardiovasc Dis*. 2021;114:221–231.
8. Krowka MJ, Fallon MB, Kawut SM, Fuhrmann V, Heimbach JK, Ramsay MAE, et al. International Liver Transplant Society Practice Guidelines: Diagnosis and Management of Hepatopulmonary Syndrome and Portopulmonary Hypertension. *Transplantation*. 2016;100:1440–1452.
9. Osol G, Celia G, Gokina N, Barron C, Chien E, Mandala M, et al. Placental growth factor is a potent vasodilator of rat and human resistance arteries. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2008;294:H1381–H1387.
10. Y. Tan A, Kearney K, Jenkins C, Karumanchi SA, Bee W, Kussie P. Cardiovascular and hemodynamic consequences of recombinant placental growth factor administration in Guinea pigs. *Hypertension in Pregnancy*. 2022;41:99–106.
11. Makris A, Yeung KR, Lim SM, Sunderland N, Heffernan S, Thompson JF, et al. Placental Growth Factor Reduces Blood Pressure in a Uteroplacental Ischemia Model of Preeclampsia in Nonhuman Primates. *Hypertension*. 2016;67:1263–1272.
12. Palei AC, Tan AY, Joo WS, Kussie P, Anderson CD, Wilson BA, et al. Administration of recombinant human placental growth factor decreases blood pressure in obese hypertensive pregnant rats. *Journal of Hypertension*. 2020;38:2295–2304.

13. Mandalà M, Gokina N, Barron C, Osol G. Endothelial-Derived Hyperpolarization Factor (EDHF) Contributes to PlGF-Induced Dilation of Mesenteric Resistance Arteries from Pregnant Rats. *J Vasc Res.* 2012;49:43–49.
14. Parenti A. Effect of hypoxia and endothelial loss on vascular smooth muscle cell responsiveness to VEGF-A: role of flt-1/VEGF-receptor-1. *Cardiovascular Research.* 2002;55:201–212.
15. Cai J, Ahmad S, Jiang WG, Huang J, Kontos CD, Boulton M, et al. Activation of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 Sustains Angiogenesis and Bcl-2 Expression Via the Phosphatidylinositol 3-Kinase Pathway in Endothelial Cells. *Diabetes.* 2003;52:2959–2968.
16. Carmeliet P, Moons L, Luttun A, Vincenti V, Compernelle V, De Mol M, et al. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med.* 2001;7:575–583.
17. Nguyen QD, De Falco S, Behar-Cohen F, Lam W, Li X, Reichhart N, et al. Placental growth factor and its potential role in diabetic retinopathy and other ocular neovascular diseases. *Acta Ophthalmologica* [Internet]. 2018 [cited 2024 May 29];96. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/aos.13325>
18. Li B, Sharpe EE, Maupin AB, Teleron AA, Pyle AL, Carmeliet P, et al. VEGF and PlGF promote adult vasculogenesis by enhancing EPC recruitment and vessel formation at the site of tumor neovascularization. *FASEB j.* 2006;20:1495–1497.
19. Luttun A, Tjwa M, Moons L, Wu Y, Angelillo-Scherrer A, Liao F, et al. Revascularization of ischemic tissues by PlGF treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1. *Nat Med.* 2002;8:831–840.
20. Selvaraj SK, Giri RK, Perelman N, Johnson C, Malik P, Kalra VK. Mechanism of monocyte activation and expression of proinflammatory cytochemokines by placenta growth factor. *Blood.* 2003;102:1515–1524.
21. Perelman N, Selvaraj SK, Batra S, Luck LR, Erdreich-Epstein A, Coates TD, et al. Placenta growth factor activates monocytes and correlates with sickle cell disease severity. *Blood.* 2003;102:1506–1514.
22. Raevens S, Geerts A, Paridaens A, Lefere S, Verhelst X, Hoorens A, et al. Placental growth factor inhibition targets pulmonary angiogenesis and represents a therapy for hepatopulmonary syndrome in mice: Liver Failure/Cirrhosis/Portal Hypertension. *Hepatology.* 2018;68:634–651.
23. Li X, Jin Q, Yao Q, Zhou Y, Zou Y, Li Z, et al. Placental Growth Factor Contributes to Liver Inflammation, Angiogenesis, Fibrosis in Mice by Promoting Hepatic Macrophage Recruitment and Activation. *Front. Immunol.* 2017;8:801.
24. Li X, Yao Q-Y, Liu H-C, Jin Q-W, Xu B-L, Zhang S-C, et al. Placental growth factor silencing ameliorates liver fibrosis and angiogenesis and inhibits activation of hepatic stellate cells in a murine model of chronic liver disease. *J. Cell. Mol. Med.* 2017;21:2370–2385.

25. Van Steenkiste C, Ribera J, Geerts A, Pauta M, Tugues S, Casteleyn C, et al. Inhibition of placental growth factor activity reduces the severity of fibrosis, inflammation, and portal hypertension in cirrhotic mice. *Hepatology*. 2011;53:1629–1640.
26. Fallon MB, Abrams GA, McGrath JW, Hou Z, Luo B. Common bile duct ligation in the rat: a model of intrapulmonary vasodilatation and hepatopulmonary syndrome. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 1997;272:G779–G784.
27. Robert F, Certain M-C, Baron A, Thuillet R, Duhaut L, Ottaviani M, et al. Disrupted BMP-9 Signaling Impairs Pulmonary Vascular Integrity in Hepatopulmonary Syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 2024;rccm.202307-1289OC.
28. Abrams GA, Jaffe CC, Hoffer PB, Binder HJ, Fallon MB. Diagnostic utility of contrast echocardiography and lung perfusion scan in patients with hepatopulmonary syndrome. *Gastroenterology*. 1995;109:1283–1288.
29. Chojkier M, Groszmann RJ. Measurement of portal–systemic shunting in the rat by using gamma-labeled microspheres. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 1981;240:G371–G375.
30. Easter DW, Wade JB, Boyer JL. Structural integrity of hepatocyte tight junctions. *Journal of Cell Biology*. 1983;96:745–749.
31. Liao Y, Smyth GK, Shi W. The R package Rsubread is easier, faster, cheaper and better for alignment and quantification of RNA sequencing reads. *Nucleic Acids Research*. 2019;47:e47–e47.
32. Phan C, Jutant E-M, Tu L, Thuillet R, Seferian A, Montani D, et al. Dasatinib increases endothelial permeability leading to pleural effusion. *Eur Respir J*. 2018;51:1701096.
33. Gelman S, Salteniene V, Pranculis A, Skieceviciene J, Zykus R, Petrauskas D, et al. Plasma Nogo-A and placental growth factor levels are associated with portal hypertension in patients with liver cirrhosis. *WJG*. 2019;25:2935–2946.
34. Krawczyk M, Zimmermann S, Hess G, Holz R, Dauer M, Raedle J, et al. Panel of three novel serum markers predicts liver stiffness and fibrosis stages in patients with chronic liver disease. *PLoS ONE*. 2017;12:e0173506.
35. Raevens S, Coulon S, Van Steenkiste C, Colman R, Verhelst X, Van Vlierberghe H, et al. Role of angiogenic factors/cell adhesion markers in serum of cirrhotic patients with hepatopulmonary syndrome. *Liver Int*. 2015;35:1499–1507.
36. Fallon M, Abrams G, Luo B, Hou Z, Dai J, Ku D. The role of endothelial nitric oxide synthase in the pathogenesis of a rat model of hepatopulmonary syndrome. *Gastroenterology*. 1997;113:606–614.
37. Nunes H, Lebrec D, Mazmanian M, Capron F, Heller J, Tazi KA, et al. Role of Nitric Oxide in Hepatopulmonary Syndrome in Cirrhotic Rats. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164:879–885.
38. Rolla G. Exhaled Nitric Oxide and Impaired Oxygenation in Cirrhotic Patients before and after Liver Transplantation. *Ann Intern Med*. 1998;129:375.

39. Rolla G, Brussino L, Colagrande P, Dutto L, Polizzi S, Scappaticci E, et al. Exhaled nitric oxide and oxygenation abnormalities in hepatic cirrhosis. *Hepatology*. 1997;26:842–847.
40. Chau K, Hennessy A, Makris A. Placental growth factor and pre-eclampsia. *J Hum Hypertens*. 2017;31:782–786.

**Table 1. Demographics and Clinical Characteristics of Control Subjects, Cirrhotic Patients, and Patients with Portal Cavernoma**

Characteristic	Control	Cirrhosis	Portal cavernoma
Total sample size, n	64	130	7
Age, yr, mean $\pm$ SEM	44.6 $\pm$ 1.6	54.1 $\pm$ 1.6	24.9 $\pm$ 9.0
Sex, female subjects, n (%)	28 (44)	37 (28)	2 (29)
Child-Pugh			
Class A, n (%)	-	43 (33)	-
Class B or C, n (%)	-	87 (67)	-
MELD score, mean $\pm$ SEM	-	15.9 $\pm$ 0.6	-
Etiology of cirrhosis, n (%) <sup>1</sup>			
ALD	-	78 (60)	-
NAFLD	-	30 (23)	-
Viral hepatitis	-	18 (14)	-
Biliary atresia	-	12 (9)	-
Cryptogenic cirrhosis	-	6 (5)	-
Others <sup>2</sup>	-	11 (8)	-
HPS, n (%)	-	19 (15)	3 (42)
Presence of ascites, n (%)	-	69 (53)	0 (0)
Presence of varices, n (%)	-	88 (67)	5 (71)
History of variceal bleeding, n (%)	-	15 (11)	4 (57)
History of encephalopathy, n (%)	-	32 (25)	0 (0)

<sup>1</sup> Cirrhotic patients may have more than one etiology

<sup>2</sup> Others include: primary biliary cirrhosis (n=3), Wilson's disease (n=2), chronic granulomatous disease (n=1), type 1 autoimmune hepatitis (n=1), haemochromatosis (n=1), ischemic cholangitis (n=1), sclerosing cholangitis (n=1) and klatskin tumor (n=1).

**Table 2. Liver biochemistry and complete blood cell count in *Plgf*-deficient rats following surgeries.**

	SHAM		CBDL		PPVL	
	WT	<i>Plgf</i> <sup>-/-</sup>	WT	<i>Plgf</i> <sup>-/-</sup>	WT	<i>Plgf</i> <sup>-/-</sup>
Liver biochemistry						
AST (UI/L)	88.1 ± 4.7	77.4 ± 4.2	257.0 ± 19.2 ****	181.0 ± 12.3 ****, &&&	84.6 ± 4.7	78.0 ± 7.2
ALT (UI/L)	36.1 ± 1.7	39.1 ± 2.0	80.9 ± 7.6 ****	53.7 ± 3.4 *, &&&	48.3 ± 3.3	45.7 ± 3.5
ALP (UI/L)	174.9 ± 9.5	188.6 ± 12.4	352.4 ± 31.9 ***	261.3 ± 10.1 *, &&	179.4 ± 17.6	186.3 ± 9.1
Gamma GT (UI/L)	6.4 ± 0.5	6.6 ± 0.7	35.0 ± 5.2 ***	18.1 ± 2.0 *, &&&	6.6 ± 0.4	6.9 ± 0.5
Blood cell count						
White blood cells (10 <sup>3</sup> /μL)	9.9 ± 0.7	7.0 ± 0.6	34.3 ± 4.2 ****	23.4 ± 2.0 ***, &&	9.6 ± 0.6	6.5 ± 0.4
Neutrophils (10 <sup>3</sup> /μL)	0.9 ± 0.1	0.5 ± 0.1	9.9 ± 1.0 ****	6.2 ± 0.6 ****, &&&&	1.0 ± 0.2	0.6 ± 0.1
Lymphocytes (10 <sup>3</sup> /μL)	8.2 ± 0.4	6.8 ± 0.4	19.5 ± 2.2 ****	11.7 ± 0.8 &&&	8.1 ± 0.4	5.7 ± 0.4
Monocytes (10 <sup>3</sup> /μL)	0.5 ± 0.1	0.3 ± 0.1	6.9 ± 0.7 ****	3.2 ± 0.5 ****, &&&&	0.6 ± 0.1	0.2 ± 0.1

AST, aspartate aminotransferase ; ALT, alanine aminotransferase ; ALP, alkaline phosphatase ; gamma GT, gamma glutamyl transpeptidase.

One-way ANOVA test.

\*P<0.05, \*\*\*P<0.001, \*\*\*\*P<0.0001, versus SHAM group

&&P<0.01, &&&P<0.001, &&&&P<0.0001 CBDL *Plgf*<sup>-/-</sup> versus CBDL WT group.

## Figures legends.

**Fig. 1. PIGF levels in human.** (A) Circulating PIGF levels in healthy control subjects, patients with cirrhosis, and patients with portal cavernoma. (B) Among cirrhotic patients, circulating PIGF levels according to the Child-Pugh class. (C). Among cirrhotic patients, circulating PIGF levels in patients without HPS and with HPS. (D) Among HPS patients, correlation between circulating PIGF levels and A-aO<sub>2</sub> assessed by Pearson correlation. Comparisons were made using one-way ANOVA followed by the Tukey test or by unpaired t-test. NS = not significant ( $p>0.05$ ); \* $p<0.05$ , \*\*\*\* $p<0.0001$ .

## **Fig. 2. HPS development in *Plgf*<sup>-/-</sup> KO rats after CBDL and PPVL surgery.**

(A) Experimental procedures. (B) Circulating PIGF levels in serum using ELISA. (C) Detection of *Plgf* mRNA levels in the liver and the lung using RT-qPCR. (D) Alveolar-arterial oxygen gradient (A-aO<sub>2</sub>) in arterial blood. (E) Quantification of contrast-enhanced transthoracic echocardiogram: ratio of the difference in acoustic signal between baseline and after injection in the left ventricle (LV) to the right ventricle (RV). (F) Quantification of total microspheres in one kidney by FACS after jugular vein injection. Comparisons were made using one-way ANOVA followed by the Tukey test. NS = not significant ( $p>0.05$ ); \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$ , \*\*\*\* $p<0.0001$ , *versus* SHAM WT group; &&& $p<0.001$ , &&&& $p<0.0001$  *versus* WT CBDL.

## **Fig. 3. Portal hypertension and cirrhosis development in *Plgf*<sup>-/-</sup> KO rats after CBDL and PPVL surgery.**

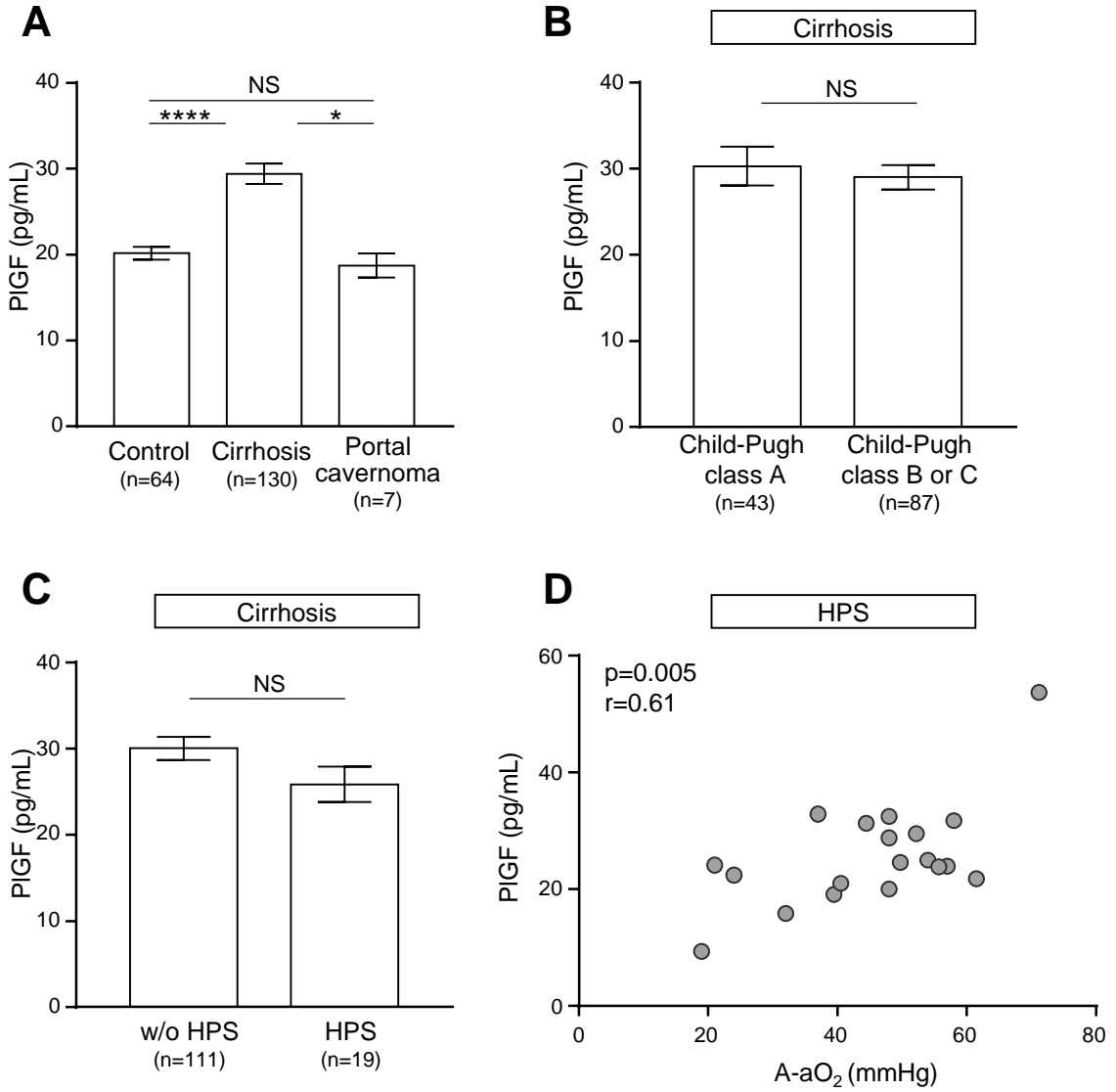
(A) Quantification of portal venous flow by liver Doppler ultrasound. (B) Spleen and liver weight. (C) Illustration of Picro-Sirius red staining on liver sections. (D) Quantification of liver fibrotic area by measuring the percentage of Picro-sirius red staining.



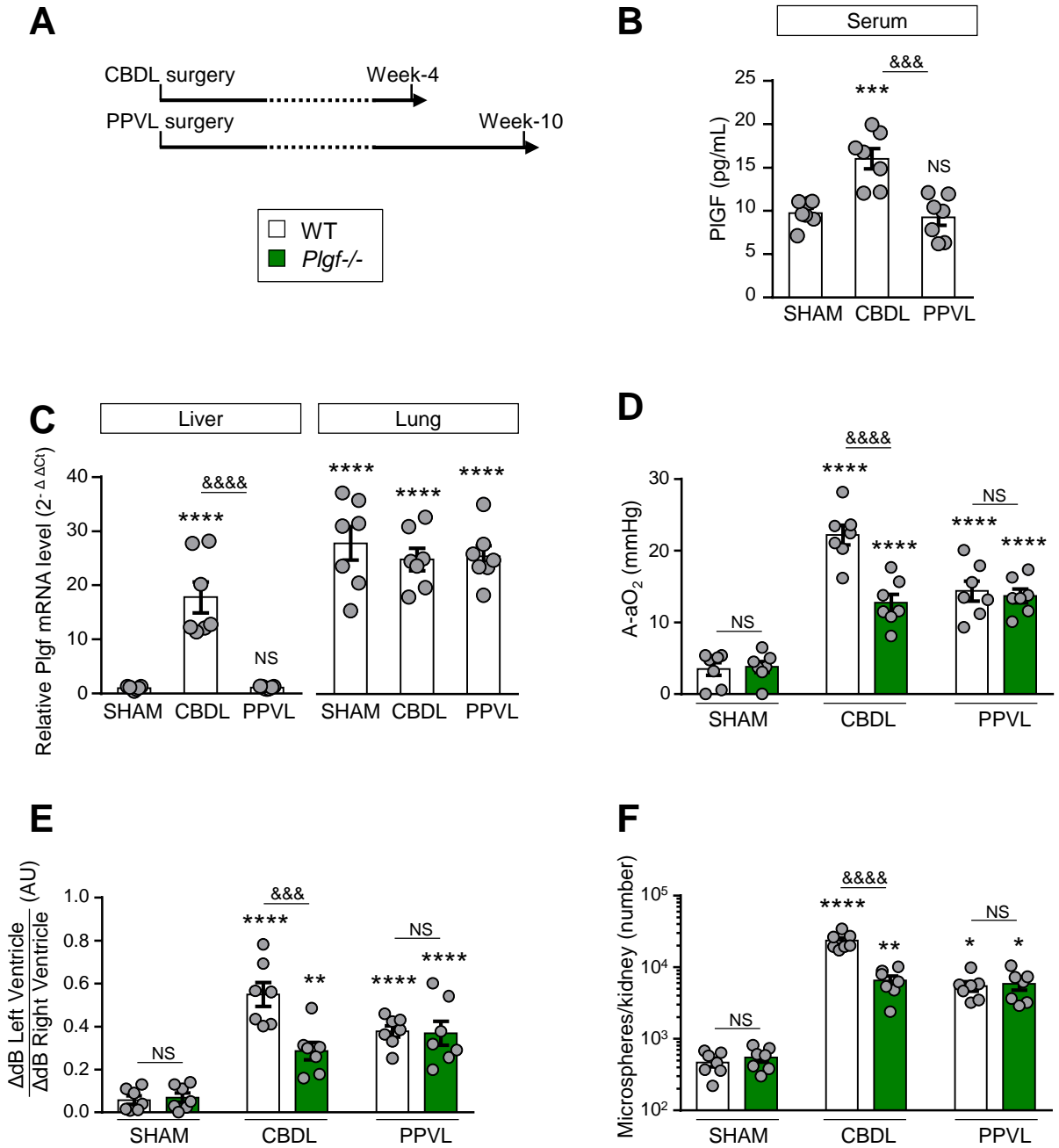
NS = not significant ( $p > 0.05$ ); \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  versus SHAM WT group; && $p < 0.01$ , &&& $p < 0.001$ , &&&& $p < 0.0001$  versus WT CBDL.

**Fig. 4. eNOS activity modulation by PIGF abundance in CBDL rats and in primary human pulmonary microvascular endothelial cells (PMECs).** (A) eNOS and p-eNOS expression in WT and *Plgf*<sup>-/-</sup> KO rats after CBDL surgery by WesternBlot. Illustration of WesternBlot represents three individual animals per group. (B) NO metabolites in WT and *Plgf*<sup>-/-</sup> rats after CBDL surgery. (C) eNOS and p-eNOS expression after 30 minutes or 24 hours of PIGF stimulation (0, 50 or 200ng/mL). (D) eNOS and p-eNOS expression after transfection with siPIGF or scrambled sequence. Comparisons were made using one-way ANOVA followed by the Tukey test or by unpaired t-test. NS = not significant ( $p > 0.05$ ); \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

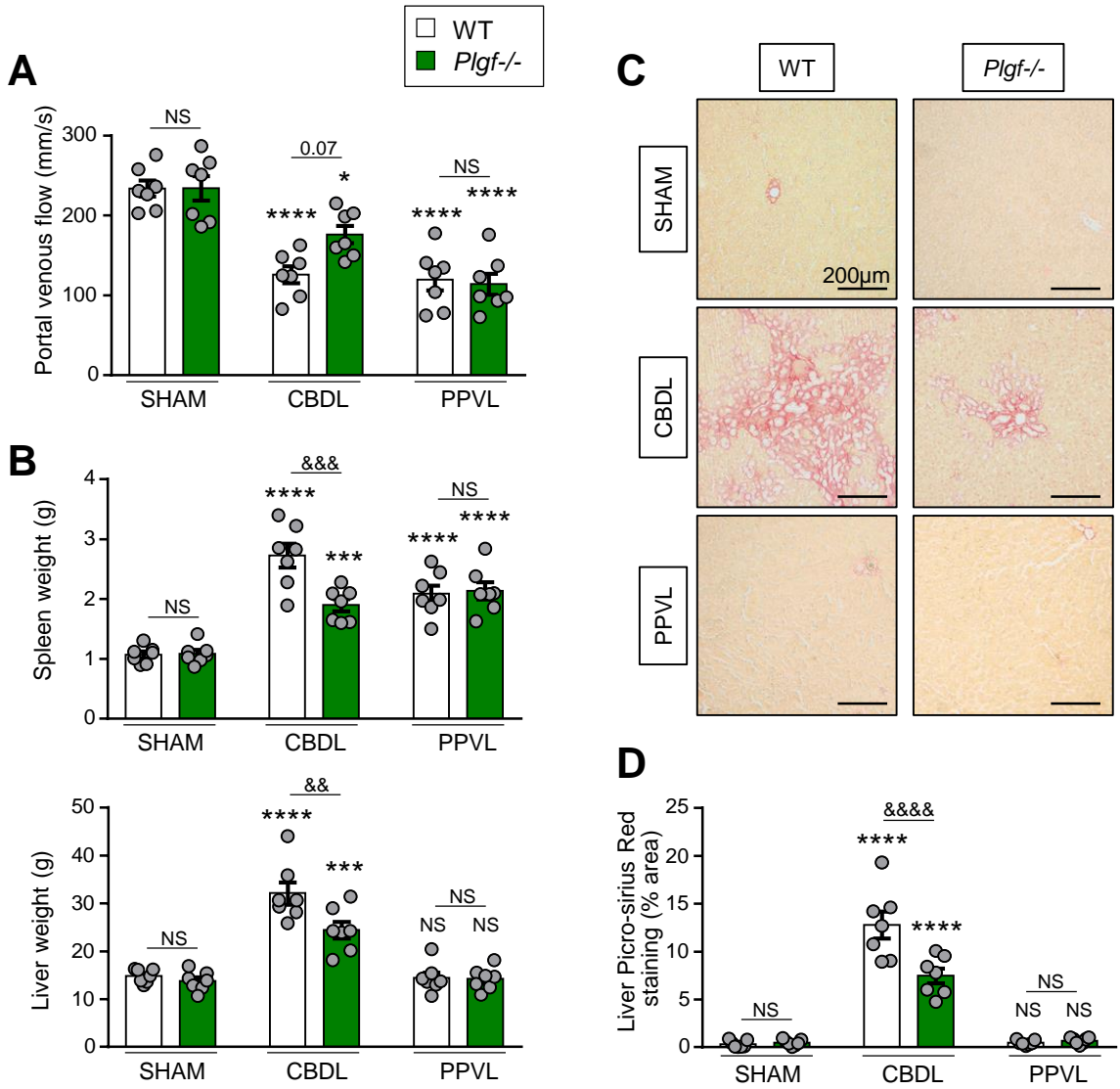
**Figure 1. PIGF levels in human**



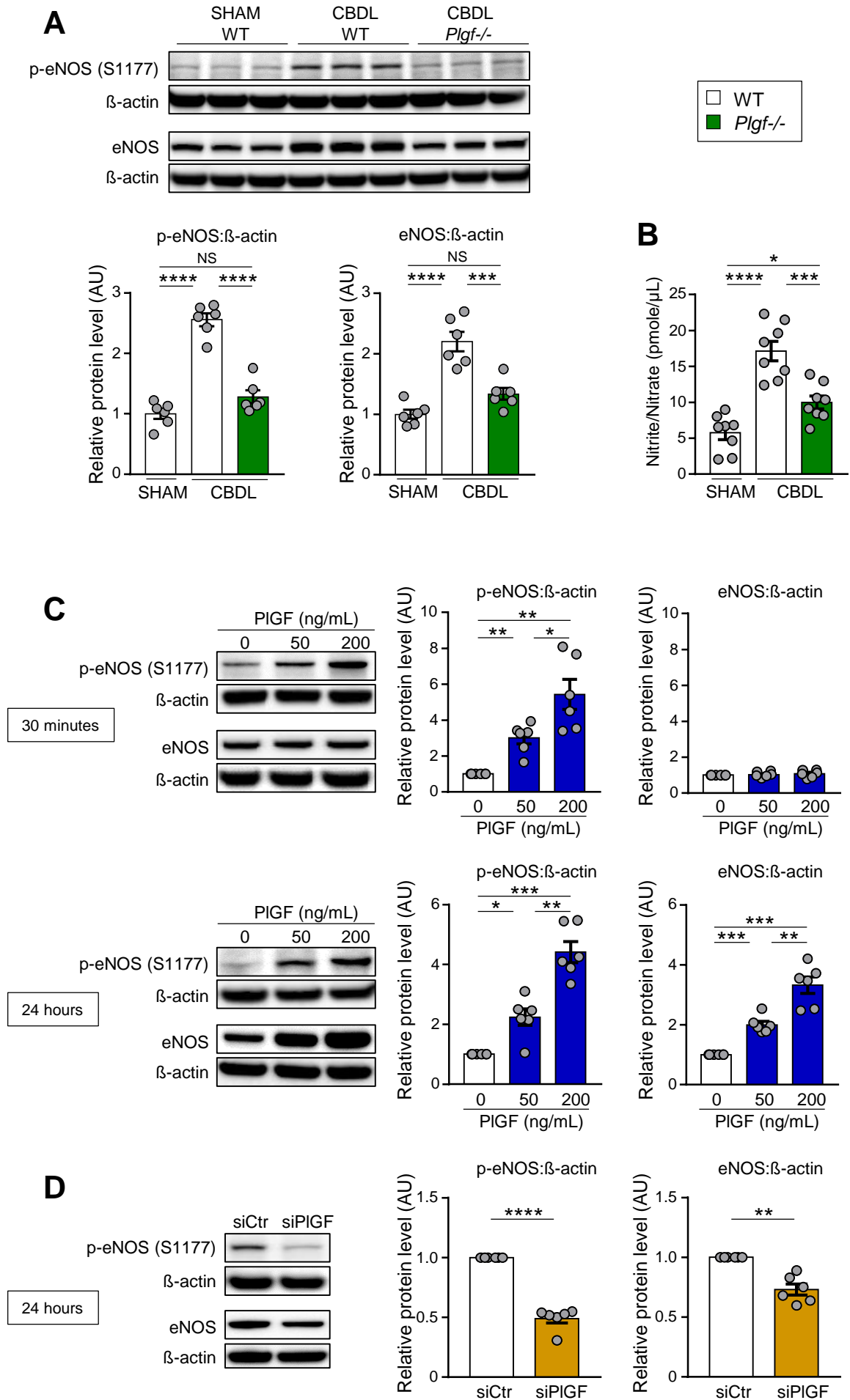
**Figure 2. HPS development in *Plgf*<sup>-/-</sup> KO rats after CBDL and PPVL surgery**



**Fig. 3. Portal hypertension and cirrhosis development in *Plgf*<sup>-/-</sup> KO rats after CBDL and PPVL surgery**



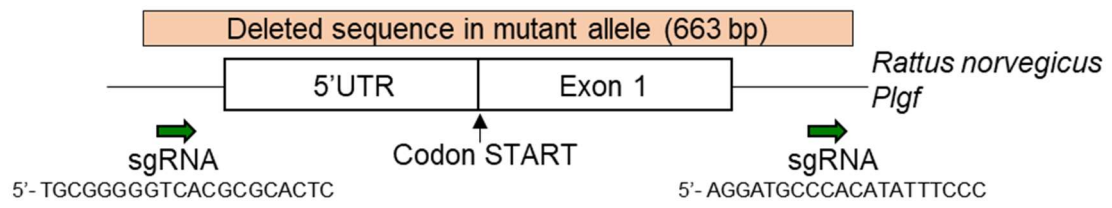
**Fig. 4. eNOS activity modulation by PIGF abundance in CBDL rats and in primary human pulmonary microvascular endothelial cells (PMECs).**



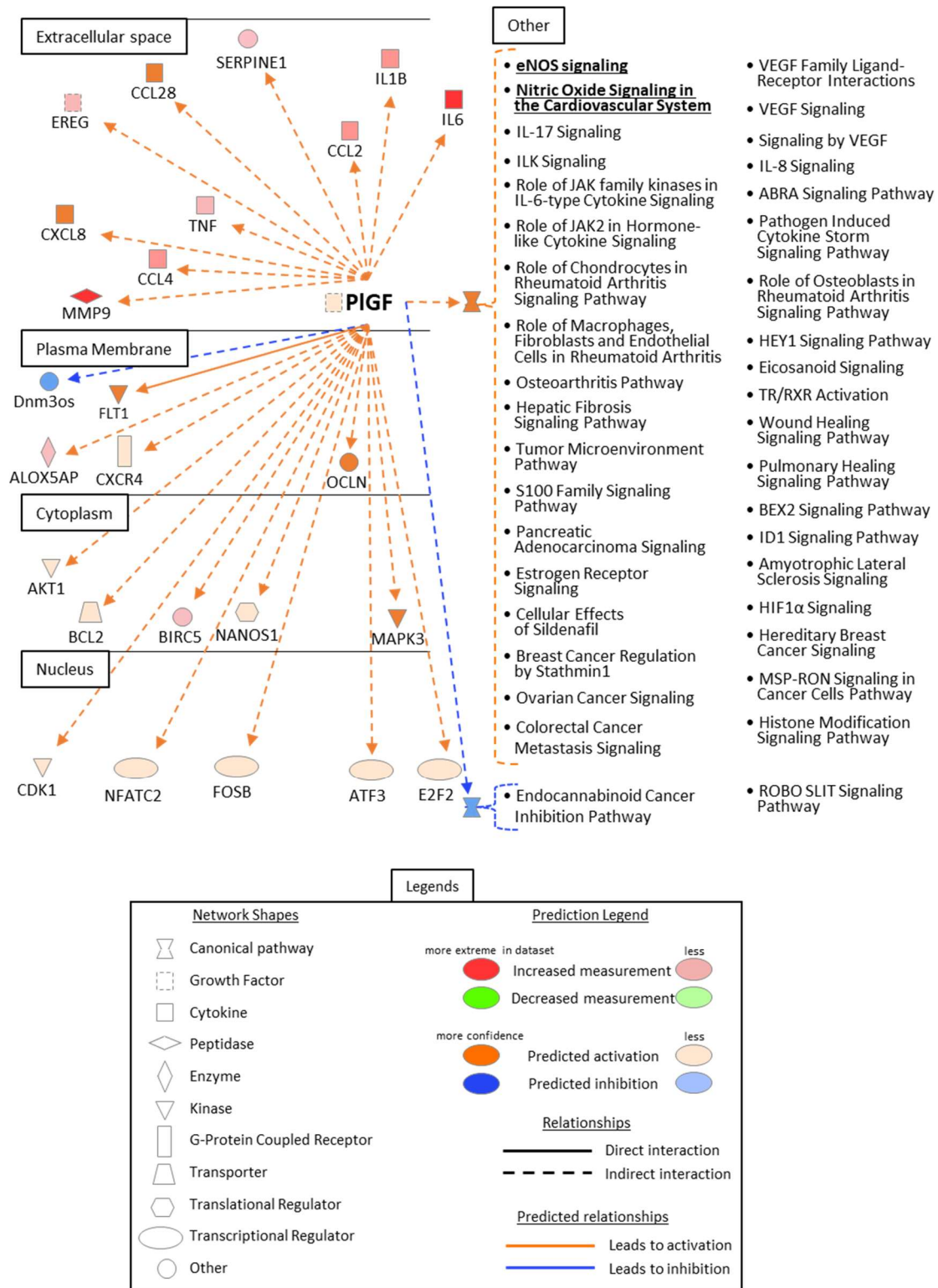
# **Placental Growth Factor Modulates Endothelial Nitric Oxide Production and Exacerbates Experimental Hepatopulmonary Syndrome**

Fabien Robert<sup>1,2</sup>, Ferial Benchenouf<sup>1,2</sup>, My Ngoc Ha<sup>1,2</sup>, Alessandra Cuomo<sup>1,3</sup>, Mina Ottaviani<sup>1,2</sup>, Maxime Surbier<sup>1,2</sup>, Raphaël Thuillet<sup>1,2</sup>, Corinne Normand<sup>1,2</sup>, Florent Dumont<sup>1,2</sup>, Céline Verstuyft<sup>4</sup>, Frederic Fiore<sup>5</sup>, Frederic Guinut<sup>6</sup>, Marc Humbert<sup>1,2,7</sup>, Audrey Coilly<sup>8,9</sup>, Emmanuel Gonzales<sup>9,10</sup>, Olivier Sitbon<sup>1,2,7</sup>, Ly Tu<sup>1,2</sup>, Christophe Guignabert<sup>1,2,\*</sup>, Laurent Savale<sup>1,2,7,\*</sup>

## **Supplementary Data**



**Fig. S1. Generation of the *Plgf*-deficient rat model.**



**Fig. S2. Interaction between PIGF and the pulmonary transcriptome of CBDL rats using My Pathway analysis (IPA tool, QIAGEN). Cut-off: p-value<0.05, fold-change>|1.5|. The predicted relationships are represented with either full-lined arrows for direct or dotted arrows for indirect interaction. The predicted relationships that lead to activation or inhibition of the downstream targets or gene sets are shown in orange and blue, respectively. Upregulated genes are represented in red and downregulated genes in green. Predicted activated or inhibited genes and gene sets are shown in orange and blue, respectively.**



## DISCUSSION

---

Dans ce projet, nous avons mis en lumière le rôle du PIGF dans le développement du SHP associé à une cirrhose. Nous avons observé que, chez les patients cirrhotiques présentant un SHP, des concentrations élevées de PIGF sont corrélées à une hypoxémie plus sévère. En utilisant le modèle expérimental de LVB, nous avons constaté que la déficience en PIGF conduit à une diminution de l'hypoxémie ainsi qu'à une réduction des vasodilatations capillaires pulmonaires, suggérant un effet protecteur notable contre le SHP. De plus, cette déficience semble ralentir la progression de la cirrhose biliaire, indiquant un effet bénéfique potentiel sur le compartiment hépatique.

L'analyse transcriptomique des poumons de rats sauvages après LVB a révélé une association entre l'augmentation des niveaux de PIGF et la surproduction de NO pulmonaire. Cette observation a été confirmée par des études *in vitro* sur des cellules endothéliales microvasculaires pulmonaires humaines primaires.

En revanche, le SHP peut également se manifester en l'absence de cirrhose hépatique. Chez les patients souffrant d'hypertension portale extra-hépatique, les niveaux de PIGF sont similaires à ceux observés chez les individus sains. De même, dans le modèle expérimental de SHP associé à une hypertension portale extra-hépatique après LPVP, la déficience en PIGF n'influence pas sur la gravité du SHP ni celle de l'hypertension portale.

En conclusion, l'augmentation de la production de PIGF induite par la cirrhose pourrait aggraver le SHP, notamment en activant la production de NO pulmonaire. En revanche, le PIGF ne semble pas impliqué dans le développement d'un SHP induit par une hypertension portale extra-hépatique, restreignant ainsi son intérêt en tant que cible thérapeutique potentielle pour le SHP associé à une cirrhose.

## 1. Effet protecteur de la déficience en PIGF dans le SHP associé à une cirrhose

Précédemment, l'effet bénéfique de la réduction du PIGF sur le développement du SHP associé à une cirrhose a été démontré dans un modèle murin, notamment après l'administration d'anticorps anti-PIGF. Cette étude préclinique a montré que l'inhibition de ce facteur permettait de réduire la sévérité des vasodilatations pulmonaires et d'améliorer les échanges gazeux chez les souris atteintes de SHP induit par LVB, notamment grâce à son action sur l'angiogenèse et l'inflammation <sup>49</sup>.

Dans le cadre de notre étude, nous avons cherché à évaluer les effets de la déficience en PIGF dans une autre espèce animale, le rat. Nos résultats ont révélé que les rats SHP induit par LVB, déficients en PIGF, présentaient une réduction significative des vasodilatations du lit capillaire pulmonaire ainsi qu'une hypoxémie moins sévère par rapport à leurs homologues WT. De plus, notre analyse transcriptomique a montré qu'en plus de son rôle dans l'angiogenèse et l'inflammation pulmonaire, des taux élevés de PIGF sont impliqués dans la production de NO pulmonaire. Ces résultats ont été validés *in vitro* en modulant les taux de PIGF sur des cellules endothéliales microvasculaires pulmonaires humaines primaires, montrant que l'augmentation du PIGF induit la phosphorylation de l'eNOS, tandis que son inhibition grâce à l'utilisation d'un siRNA dirigé contre le PIGF produit les effets opposés.

Ces premiers résultats mettent en évidence le rôle délétère du PIGF dans le développement du SHP associé à la cirrhose sur le compartiment pulmonaire, en particulier grâce à la stimulation de la production pulmonaire de NO.

## 2. Élévation du PIGF dans la cirrhose : un rôle délétère sur le foie ?

Dans le cadre de la cirrhose, il a été démontré que les taux circulants de PIGF sont significativement augmentés chez les patients cirrhotiques par rapport aux individus sains<sup>257-259</sup>. Nos résultats confirment ces observations. De plus, nous n'avons observé aucune différence significative entre les patients ayant une cirrhose peu sévère (Child-Pugh A) et ceux présentant une cirrhose sévère (Child-Pugh B ou C), suggérant que la sévérité de la cirrhose n'influence pas l'augmentation des taux de PIGF. Ces conclusions sont renforcées par l'absence de corrélation entre les taux de PIGF et le score MELD, confirmée par l'analyse de corrélation de Pearson ( $r=0.03$ ,  $p=0.76$ , non significatif).

Le rôle du PIGF dans la cirrhose reste controversé, sur la base d'études expérimentales réalisées chez la souris. Dans le modèle de LVB chez la souris, l'étude de Raevens *et al.* a montré qu'il n'y avait aucun impact sur la sévérité de la cirrhose après traitement par anticorps anti-PIGF, que ce soit en traitement préventif ou curatif. Cette étude s'est concentrée sur la splénomégalie et la fibrose hépatique, évaluée par coloration au rouge Picro-Sirius<sup>49</sup>. En revanche, une autre étude utilisant le même modèle de LVB a rapporté des résultats différents : un protocole d'injection *in vivo* d'un siRNA anti-PIGF a démontré une réduction de la sévérité de la cirrhose, ainsi qu'une diminution de l'activation des cellules stellaires et de l'inflammation, à travers diverses approches<sup>260</sup>. De plus, dans un autre modèle de cirrhose induite par injection de tétrachlorure de carbone, les anticorps anti-PIGF, l'injection de siRNA anti-PIGF, ainsi que l'utilisation de souris déficientes en PIGF ont montré un effet bénéfique de la réduction du PIGF sur le développement de la cirrhose hépatique<sup>261,262</sup>.

Notre étude montre que chez les rats déficients en PIGF, un développement moins sévère de la cirrhose biliaire est observé, avec une fibrose hépatique réduite, des marqueurs de cytolyse et cholestase (AST, ALT, GGT, PAL) plus bas, ainsi qu'une hypertension portale moins prononcée, évaluée par l'analyse de la splénomégalie et l'échographie Doppler de la veine porte.

Il est donc important de considérer la possibilité que l'amélioration pulmonaire observée chez les rats déficients en PIGF après LVB soit en partie due à l'amélioration de la fonction hépatique. Bien que plusieurs études aient montré que la sévérité de la cirrhose n'est pas toujours liée à celle du SHP, une amélioration de la fonction hépatique pourrait avoir un impact positif sur l'intégrité vasculaire pulmonaire.

### **3. Absence d'implication du PIGF dans le SHP associé à une hypertension portale sans cirrhose**

Dans le premier chapitre de ce manuscrit, nous avons développé un nouveau modèle de SHP associé à une hypertension portale extra-hépatique (le modèle de LPVP). Ce modèle permet d'étudier les mécanismes physiopathologiques sous-jacents au développement du SHP, en évitant l'inflammation sévère et systémique typique d'un contexte de cirrhose biliaire.

Nous avons d'abord observé que, chez des patients atteints de cavernome porte sans cirrhose, les taux circulants de PIGF sont similaires à ceux des sujets témoins. Parmi ces 7 patients, 3 présentent également un SHP, avec des taux de PIGF comparables à ceux des sujets sains. Il semble donc que le SHP puisse se développer sans augmentation des niveaux de PIGF.

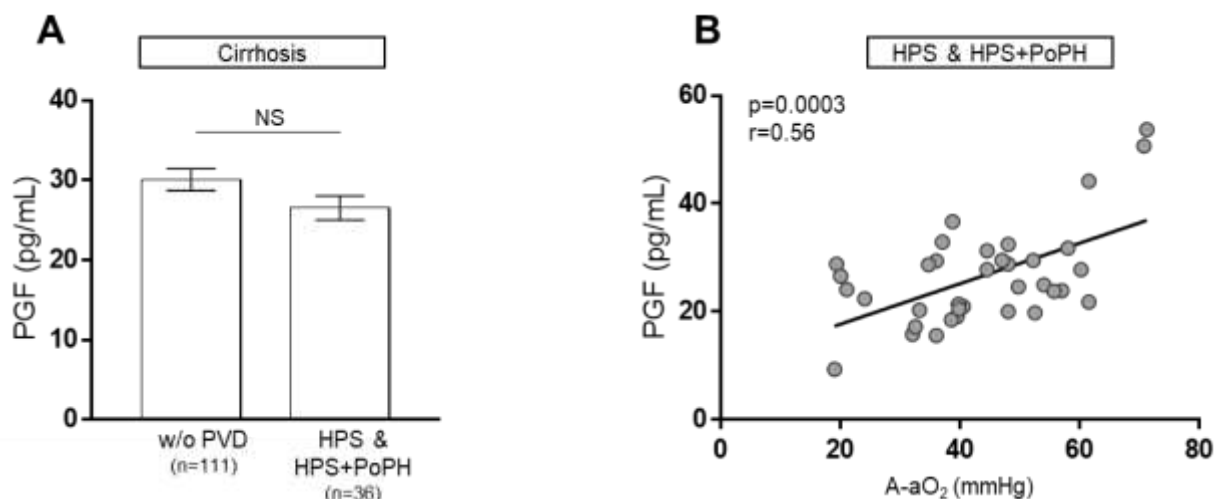
Par conséquent, nous avons analysé l'implication du PIGF dans le développement du SHP au sein du modèle de LPVP. Nous avons constaté qu'il n'y a pas de changement dans les taux circulants de PIGF, et que la production hépatique et pulmonaire de PIGF n'est pas augmentée dans ce modèle. De plus, chez les rats déficients en PIGF, l'absence de PIGF n'affecte ni la sévérité de l'hypertension portale, ni celle des dilatations capillaires pulmonaires ou de l'hypoxémie. Il apparaît donc que l'absence de PIGF n'a pas d'effet bénéfique dans le contexte d'un SHP associé à une hypertension portale extra-hépatique.

#### 4. Taux circulant de PIGF chez les patients ayant la coexistence d'un SHP avec une HTPoP

Dans cette étude, nous avons montré que des taux circulants élevés de PIGF ne sont pas associés à la présence d'un SHP, validant ainsi des observations réalisées dans une autre cohorte <sup>110</sup>. En effet, aucune différence significative n'est observée entre les patients présentant un SHP et ceux atteints de cirrhose sans maladies vasculaires pulmonaires, même après ajustement à l'âge, le sexe, et la sévérité de la maladie hépatique. En revanche, au sein de notre cohorte de patients présentant uniquement un SHP, une corrélation significative a été observée entre la sévérité de l'hypoxémie et les taux de PIGF. Cela suggère que le PIGF pourrait avoir un rôle aggravant, sans toutefois être un facteur déclencheur.

Au moment de cette étude, nous avons également accès à des échantillons provenant de 17 patients présentant les deux pathologies vasculaires pulmonaires, à savoir le SHP et l'HTPoP (deux patients supplémentaires par rapport au Chapitre 1 de cette thèse). Ces patients n'ont pas été inclus dans notre analyse, car des taux élevés de PIGF pourraient également avoir un effet délétère dans l'HTAP et le remodelage vasculaire pulmonaire <sup>263,264</sup>. Une étude en cours dans notre laboratoire vise à éclaircir les mécanismes sous-jacents reliant le PIGF au développement des différentes formes d'HTAP, incluant l'HTPoP.

Lorsque nous avons repris notre analyse sur notre cohorte de patients en intégrant les 17 patients présentant à la fois un SHP et une HTPoP, aucune différence significative n'a été observée entre les patients cirrhotiques sans maladie vasculaire pulmonaire et ceux atteints de SHP ( $\pm$  HTPoP) (**Figure 11A**). Même après ajustement à l'âge, le sexe et la sévérité de la cirrhose selon le score MELD, il n'existe pas d'association entre les niveaux de PIGF et la présence de SHP (OR 0.983; IC95% 0.947-1.020, NS). Cependant, parmi les patients atteints de SHP ( $\pm$  HTPoP), l'association entre des taux élevés de PIGF et une hypoxémie plus sévère est toujours significative (**Figure 11B**). En incluant la population présentant un SHP et une HTPoP, nos résultats confirment que des taux élevés de PIGF ne sont pas associés à la présence de SHP, mais qu'ils sont en revanche corrélés à une forme plus sévère.



**Figure 11. Taux circulant de PIGF chez les patients cirrhotiques sans maladies vasculaires, ayant uniquement un SHP ou un SHP + une HTPoP.**

**A)** Parmi les patients cirrhotiques, les taux de PIGF circulant en comparant les patients sans maladies vasculaires pulmonaires (without pulmonary vascular disease, w/o PVD) et ceux ayant un SHP +/- HTPoP.

**B)** Parmi tous les patients ayant un SHP, corrélation entre les taux circulant de PIGF et la sévérité de l'hypoxémie calculée avec le A-aO<sub>2</sub>.

NS = non significatif

## 5. Perte du PIGF dans le développement de la prééclampsie

La perte de PIGF joue un rôle fondamental dans une pathologie particulière, la prééclampsie. Cette complication de la grossesse se caractérise par une hypertension artérielle et la présence de protéinurie. Dans ce contexte, les taux circulants de PIGF diminuent, tandis que ceux de son récepteur soluble VEGFR1 augmentent. La diminution en PIGF est même utilisée comme marqueur prédictif du développement de la prééclampsie durant la grossesse<sup>265,266</sup>. Plusieurs études ont montré que le PIGF agit comme un facteur vasodilatateur, et que la chute de ses taux circulants entraîne un déséquilibre en faveur de la vasoconstriction, contribuant au développement de l'hypertension artérielle dans la prééclampsie<sup>267</sup>. Dans les modèles expérimentaux de prééclampsie, l'administration de PIGF recombinant exerce un effet protecteur dans plusieurs espèces, notamment chez la souris, les primates non-humains et les cochons d'Inde<sup>268-272</sup>. *In vitro*, il a été démontré que le PIGF induit une relaxation vasculaire dans diverses artères et veines systémiques, tant chez le rat que chez l'humain<sup>246-249</sup>.

Dans notre étude, nous avons démontré que le PlGF active l'eNOS de manière dose-dépendante dans des cellules endothéliales microvasculaires pulmonaires humaines, augmentant la production de NO. À l'inverse, l'inhibition du PlGF via un siRNA réduit l'activation de l'eNOS. Chez les rats après LVB, les taux de PlGF circulant sont augmentés, ce qui est corrélé à une hausse de l'activation de la eNOS pulmonaire et des niveaux de nitrites/nitrates, métabolites du NO. En revanche, chez les rats déficients en PlGF, qui sont protégés contre le développement du SHP, les niveaux d'eNOS pulmonaire et de nitrites/nitrates circulants sont similaires à ceux des rats SHAM WT. Nos données montrent ainsi que le PlGF est un médiateur clé et direct de la production de NO, ce qui pourrait également expliquer le rôle de sa perte dans le développement de la prééclampsie.

## CONCLUSION

---

Cette étude a permis d'approfondir notre compréhension du rôle complexe du PIGF dans le développement du SHP. Tout d'abord, tant chez l'humain que dans le modèle expérimental de SHP associé à une hypertension portale extra-hépatique, le PIGF ne semble pas jouer de rôle dans ce contexte : les taux circulants sont similaires, et une diminution du PIGF n'a pas d'effet bénéfique sur la sévérité de l'hypertension portale, des vasodilatations capillaires pulmonaires ou de l'hypoxémie. En revanche, dans le contexte d'un SHP associé à une cirrhose, des taux élevés de PIGF sont associés à une forme plus sévère de SHP, et la délétion de PIGF dans les modèles expérimentaux améliore à la fois la sévérité du SHP et la sévérité de la cirrhose biliaire. Cependant, il est important de noter qu'il n'y a pas de différence dans les taux circulants de PIGF entre les patients cirrhotiques sans maladie vasculaire pulmonaire et ceux présentant un SHP associé à une cirrhose.

Il apparaît donc que des taux élevés de PIGF ne sont ni indispensables ni suffisants pour induire la pathologie, puisque le SHP peut se développer en l'absence d'élévation de PIGF (comme lors d'une hypertension portale extra-hépatique) et peut ne pas se développer malgré des taux très élevés de PIGF (comme lors d'une cirrhose sans maladie vasculaire pulmonaire). Le PIGF semble jouer un rôle aggravant : lorsqu'une prédisposition au développement de la pathologie existe, des niveaux élevés de PIGF pourraient exacerber la dysfonction endothéliale et la vasodilatation.

Cette constatation soulève la question de savoir si d'autres facteurs identifiés grâce aux recherches précédentes sur le modèle de cirrhose induite par LVB ne seraient pas uniquement des facteurs aggravants et non des déclencheurs de la pathologie. Ainsi, cibler des facteurs uniquement aggravants pourrait expliquer l'échec des précédentes études cliniques. Le modèle LPVP ouvre de nouvelles perspectives sur la compréhension de la physiopathologie de la maladie, permettant de valider ou d'invalider les acteurs précédemment identifiés, tout en mettant en évidence les points communs entre les modèles LVB et LPVP pour identifier des cibles thérapeutiques prometteuses.



# **CONCLUSION GÉNÉRALE DES TRAVAUX DE THÈSE**

---

En conclusion, nos travaux, réalisés à partir d'études sur diverses cohortes humaines, de modèles animaux et d'expériences *in vitro*, ont permis d'identifier et de mieux comprendre l'implication de deux acteurs clés dans la physiopathologie du SHP.

Dans un premier temps, nous avons développé un **nouveau modèle d'étude préclinique du SHP**, associé à une hypertension portale extra-hépatique. Ce modèle innovant élargit le champ de la recherche préclinique et permet une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques impliqués dans le développement du SHP. L'identification de voies de signalisation communes avec le modèle bien établi de LVB permettra de cibler plus précisément les acteurs clés de la perte d'intégrité vasculaire pulmonaire impliqués à la fois dans le SHP associé à une hypertension portale cirrhotique et non cirrhotique.

Ces travaux ont permis d'identifier une cible thérapeutique prometteuse : le **BMP-9**, un facteur de quiescence vasculaire produit exclusivement par le foie. Dans un contexte d'hypertension portale, qu'elle soit associée ou non à une cirrhose, une diminution significative de la production hépatique de BMP-9 est observée. **Sa perte** est directement impliquée dans la dilatation du lit capillaire pulmonaire et constitue **un élément indispensable** au développement du SHP. Toutefois, il est important de souligner que chez les patients atteints de cirrhose sévère, les niveaux de BMP-9 sont considérablement réduits, même en l'absence de pathologie vasculaire pulmonaire. L'identification de cofacteurs biologiques ou environnementaux nécessaires au déclenchement du SHP reste indispensable. Une exploration plus approfondie des autres facteurs de la voie de signalisation de la superfamille du TGF- $\beta$ , tels que le BMP-10, s'avère également nécessaire.

La **restauration de la voie de signalisation pulmonaire du BMP-9** en utilisant le FK506 dans deux modèles précliniques de SHP permet de réduire la sévérité des vasodilatations capillaires pulmonaires et d'améliorer les échanges gazeux. Cette preuve de concept met en lumière le **potentiel thérapeutique** de réactiver cette voie de signalisation dans le traitement du SHP. Cependant, l'utilisation clinique du FK506 chez les patients atteints de maladies hépatiques chroniques est limitée en raison de son activité immunosuppressive et de son métabolisme hépatique. Le développement de nouveaux composés capables de rétablir cette voie de signalisation représente une piste prometteuse

pour le traitement du SHP, ouvrant la voie à de futurs essais précliniques et cliniques.

Ces travaux ont également mis en lumière le paradoxe de la voie de signalisation du BMP-9, qui implique les récepteurs BMPRII, ALK1 et Endogline, et dont les altérations peuvent entraîner des phénotypes vasculaires pulmonaires variés, allant de l'HTAP à la maladie de Rendu-Osler, parfois coexistants. Bien que les recherches actuelles montrent que la perte de BMP-9 est principalement associée à un phénotype de vasodilatation et à des MAV, les mécanismes par lesquels des mutations de ce ligand prédisposent également au développement de l'HTAP restent à élucider. Un approfondissement des connaissances sur la voie du BMP et, plus largement, sur la superfamille du TGF- $\beta$  dans un contexte de pathologie hépatique pourrait apporter des éclaircissements supplémentaires sur leur rôle dans les maladies vasculaires pulmonaires.

Enfin, nous avons exploré le rôle du **PIGF** et nuancer son rôle dans le développement du SHP. Ce facteur pro-angiogénique, pro-vasodilatateur et pro-inflammatoire est produit par divers organes et types cellulaires. Chez les patients ayant un **SHP associé à une cirrhose**, une **augmentation** de la production hépatique de PIGF contribue à l'**aggravation** de la pathologie pulmonaire et de l'hypoxémie. Cependant, nos résultats montrent que des niveaux élevés de PIGF circulant ne sont **ni suffisants ni indispensables** au développement du SHP, rendant l'inhibition thérapeutique du PIGF pertinente uniquement dans un contexte du SHP induit par une cirrhose.

Ces découvertes apportent un éclairage nouveau sur les mécanismes complexes sous-jacents au SHP. En identifiant ces deux facteurs, nos travaux ouvrent des perspectives prometteuses pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques ciblées.

# ANNEXES

---



Disponible en ligne sur

**ScienceDirect**  
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France

**EM|consulte**  
www.em-consulte.com



Mise au point

## Syndrome hépato-pulmonaire

### Hepatopulmonary syndrome



A. Sayadi<sup>a</sup>, L. Duhaut<sup>a</sup>, F. Robert<sup>b</sup>, L. Savale<sup>b,c</sup>, A. Coilly<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> UMR-S 1193, hôpital Paul-Brousse, centre hépato-biliaire, université Paris-Saclay, AP-HP, 94800 Villejuif, France

<sup>b</sup> Inserm UMR.S 999, 94270 Le Kremlin-Bicêtre, France

<sup>c</sup> Service de pneumologie, hôpital Bicêtre, université Paris-Saclay, AP-HP, 94270 Le Kremlin-Bicêtre, France

#### INFO ARTICLE

Historique de l'article :

Disponible sur Internet le 31 mars 2023

Mots clés :

Cirrhose

Hypertension portale

Syndrome hépato-pulmonaire

Transplantation hépatique

Keywords:

Cirrhosis

Portal hypertension

Hepatopulmonary syndrome

Liver transplantation

#### RÉSUMÉ

Le syndrome hépato-pulmonaire (SHP) est une des maladies pulmonaires associées à la cirrhose et à l'hypertension portale. Il doit être évoqué devant toute dyspnée du patient cirrhotique. Il correspond à une maladie vasculaire pulmonaire caractérisée par des dilatations vasculaires intrapulmonaires (DVIP). La physiopathologie est complexe et semble essentiellement reposer sur la présence de communications entre les circulations porte et systémique. Cliniquement, elle est définie par une triade associant une maladie du foie et une hypertension portale, la mise en évidence des DVIP et une altération des échanges gazeux (différence alvéolo-artérielle en oxygène  $[DA-aO_2] \geq 15$  mmHg). Le SHP grève le pronostic (23 % de survie à 5 ans) et la qualité de vie des patients. La transplantation hépatique (TH) permet dans près de 100 % des cas la régression des DVIP, la normalisation des échanges gazeux et améliore la survie, avec une survie à 5 ans post-TH de 76 à 87 %. Elle est donc le traitement de référence des patients atteints de SHP sévère, défini par une pression partielle artérielle en oxygène ( $PaO_2$ ) inférieure à 60 mmHg. L'oxygénothérapie de longue durée est quant à elle un traitement palliatif. Il est nécessaire d'avancer dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques pour permettre d'élargir les possibilités thérapeutiques dans un futur proche.

© 2023 Société Nationale Française de Médecine Interne (SNFMI). Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

#### ABSTRACT

The hepatopulmonary syndrome (HPS) is one of the lung diseases associated with cirrhosis and portal hypertension. It should be discussed for any dyspnea in cirrhotic patients. HPS is a pulmonary vascular disease characterized by intrapulmonary vascular dilatations (IPVD). The pathogenesis is complex and seems to rely on communications between the portal and pulmonary circulations. The diagnosis is based on a triad of liver disease and portal hypertension, evidence of IPVDs, and impaired gas exchange (alveolar-arterial oxygen difference  $[A-aO_2] \geq 15$  mmHg). HPS impairs prognosis (23% survival at 5 years) and patients' quality of life. Liver transplantation (LT) allows regression of IPVD in almost 100% of cases, normalization of gas exchange and improves survival with a 5-year post-LT survival between 76 and 87%. It is the only curative treatment, indicated in patients with severe HPS, defined by an arterial partial pressure of oxygen ( $PaO_2$ ) below 60 mmHg. When LT is not indicated or feasible, long-term oxygen therapy may be proposed as a palliative treatment. A better understanding of the pathophysiological mechanisms is needed to improve the therapeutic possibilities in a near future.

© 2023 Société Nationale Française de Médecine Interne (SNFMI). Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.




### 1. Introduction et prévalence

La dyspnée est un symptôme fréquent au cours de la cirrhose et concernerait jusqu'à 70 % des patients en attente de transplantation

\* Auteur correspondant.  
Adresse e-mail : [audrey.coilly@aphp.fr](mailto:audrey.coilly@aphp.fr) (A. Coilly).



# Hepatopulmonary syndrome: a liver-induced oxygenation defect

Laurent Savale <sup>1,2,3</sup>, Fabien Robert<sup>1,2</sup>, Ly Tu<sup>1,2</sup>, Marie-Caroline Certain<sup>1,2,3</sup>,  
Audrey Baron<sup>1,2,3</sup>, Audrey Coilly<sup>2,4,5</sup>, Léa Duhaut<sup>2,4,5</sup>, Marc Humbert <sup>1,2,3</sup>,  
Christophe Guignabert <sup>1,2</sup> and Olivier Sitbon <sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>INSERM UMR\_S 999 “Pulmonary Hypertension: Pathophysiology and Novel Therapies”, Hôpital Marie Lannelongue, Le Plessis-Robinson, France. <sup>2</sup>Faculté de Médecine, Université Paris-Saclay, Le Kremlin-Bicêtre, France. <sup>3</sup>Assistance Publique – Hôpitaux de Paris (AP-HP), Service de Pneumologie et Soins Intensifs Respiratoires, European Reference Network on Rare Respiratory Diseases (ERN-LUNG), Hôpital Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre, France. <sup>4</sup>AP-HP Hôpital Paul Brousse, Centre Hépato-Biliaire, Villejuif, France. <sup>5</sup>UMR-S 1193, Université Paris-Saclay, Villejuif, France.

Corresponding author: Laurent Savale (laurent.savale@aphp.fr)

---

**Cite as:** Savale L, Robert F, Tu L, *et al.* Hepatopulmonary syndrome: a liver-induced oxygenation defect. *In:* Wagner TOF, Humbert M, Wijsenbeek M, *et al.*, eds. Rare Diseases of the Respiratory System (ERS Monograph). Sheffield, European Respiratory Society, 2023; pp. 224–236 [https://doi.org/10.1183/2312508X.10006023].

@ERSpublications

**Hepatopulmonary syndrome is an underdiagnosed devastating complication of chronic liver disease that can lead to a decision for liver transplantation, regardless of the severity of liver disease. Its detection and diagnostic approach must be rigorous.** <https://bit.ly/ERSM100>

Copyright ©ERS 2023. Print ISBN: 978-1-84984-166-5. Online ISBN: 978-1-84984-167-2. Print ISSN: 2312-508X. Online ISSN: 2312-5098.

---

A diagnosis of hepatopulmonary syndrome (HPS) is based on the clinical triad of liver disease and/or portal hypertension, intrapulmonary vascular dilation and abnormal arterial oxygenation. HPS is clearly identified as a significant comorbidity affecting both the functional status and prognosis of patients with chronic liver disease. Although substantial progress has been made in the description of the clinical characteristics and outcomes, no specific targeted therapy has been shown to have a long-term effect on the evolution of HPS. Liver transplantation, which remains the only option to reverse HPS, must be considered an essential option in the management of severe HPS (arterial oxygen tension <60 mmHg), regardless of the severity of the underlying liver disease. Progress in our understanding of the pathophysiological mechanisms involved in HPS and in the regulatory mechanisms between the liver and the lung circulation is needed to identify potential targeted therapies in the future.

## Introduction

The pulmonary circulation can be severely affected by pathogenic processes arising within the liver and the portal venous system. Two distinct vascular disorders associated with liver disease and/or portal hypertension have been described: hepatopulmonary syndrome (HPS), which is characterised by an alteration of the pulmonary capillary bed, and portopulmonary hypertension, which is characterised by an obstructive remodelling of the distal pulmonary vascular bed [1–3].

Severe arterial hypoxaemia is the most dramatic manifestation of HPS, explained primarily by intrapulmonary vascular dilations (IPVDs) and alterations in the neoangiogenic processes [2]. The risk of patients with portal hypertension developing HPS underlines the complex



Disponible en ligne sur

**ScienceDirect**  
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France

**EM|consulte**  
www.em-consulte.com



RECHERCHE EN PNEUMOLOGIE

# Dysfonction de la signalisation endothéliale du BMP-9 dans les maladies vasculaires pulmonaires

*Dysfunction of endothelial BMP-9 signaling in pulmonary vascular disease*

F. Robert<sup>a,b</sup>, N. Berrebeh<sup>a,b</sup>, C. Guignabert<sup>a,b</sup>,  
M. Humbert<sup>a,b,c</sup>, S. Bailly<sup>d</sup>, L. Tu<sup>a,b</sup>, L. Savale<sup>a,\*,b,c</sup>

<sup>a</sup> Faculté de médecine, Université Paris-Saclay, Inserm UMR\_S 999 – Bâtiment de recherche (2<sup>e</sup> étage), 63, rue Gabriel-Péri, 94276 Le Kremlin-Bicêtre, France

<sup>b</sup> Inserm Unité mixte de recherche 999, Hôpital Marie-Lannelongue, 92350 Le Plessis-Robinson, France

<sup>c</sup> Service de pneumologie et soins intensifs respiratoires, Centre de référence de l'hypertension pulmonaire, Hôpital Bicêtre, Assistance publique–Hôpitaux de Paris (AP–HP), 94276 Le Kremlin-Bicêtre, France

<sup>d</sup> Laboratoire BioSanté, Université Grenoble Alpes, INSERM, CEA, Grenoble, France

Reçu le 5 janvier 2023 ; accepté le 6 janvier 2023

Disponible sur Internet le 23 février 2023

## MOTS CLÉS

Remodelage vasculaire pulmonaire, Dysfonction endothéliale, Tonus vasculaire, Voie de signalisation des BMP

**Résumé** La signalisation du ligand *bone morphogenetic protein* (BMP)-9 dépendante des récepteurs endothéliaux *BMP receptor type II* (BMPR-II), *activin receptor-like kinase-1* (ALK1) et leur corécepteur endogline est au cœur de l'intégrité vasculaire pulmonaire. Cette revue rassemble l'ensemble des évidences actuelles qui mettent en lumière les liens étroits qu'il existe entre la perte/les dysfonctionnements de cet axe et la perte de l'intégrité vasculaire pulmonaire que l'on retrouve dans l'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP), la télangiectasie héréditaire hémorragique (HHT) et le syndrome hépatopulmonaire (SHP).

© 2023 SPLF. Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

\* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : [laurent.savale@aphp.fr](mailto:laurent.savale@aphp.fr) (L. Savale).



Disponible en ligne sur

**ScienceDirect**  
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France

**EM|consulte**  
www.em-consulte.com



RECHERCHE EN PNEUMOLOGIE

# Syndrome hépatopulmonaire : prévalence, physiopathologie et implications cliniques

*Hepatopulmonary syndrome: Prevalence, pathophysiology and clinical implications*

M.-C. Certain<sup>a,b,c,\*</sup>, F. Robert<sup>a</sup>, A. Baron<sup>a,b,c</sup>,  
O. Sitbon<sup>a,b,c</sup>, M. Humbert<sup>a,b,c</sup>, C. Guignabert<sup>a</sup>,  
L. Tu<sup>a</sup>, L. Savale<sup>a,b,c</sup>

<sup>a</sup> Inserm UMR.S 999 « Pulmonary Hypertension : Pathophysiology & Novel Therapies », Le Plessis-Robinson, France

<sup>b</sup> Faculté de médecine, université de Paris-Saclay, Le Kremlin-Bicêtre, France

<sup>c</sup> Service de pneumologie et soins intensifs respiratoires, hôpital Bicêtre, Assistance publique–Hôpitaux de Paris, Le Kremlin-Bicêtre, France

Reçu le 5 janvier 2022 ; accepté le 5 janvier 2022

Disponible sur Internet le 23 février 2022

## MOTS CLÉS

Syndrome hépatopulmonaire ; Hypertension portale ; Dysfonction endothéliale ; Remodelage vasculaire pulmonaire ; BMP-9

**Résumé** Le syndrome hépatopulmonaire (SHP) est une maladie vasculaire pulmonaire induite par l'hypertension portale qui se caractérise par une prolifération et une dilatation des capillaires pulmonaires associées, dans les formes les plus sévères, à la formation de fistules artérioveineuses intra-pulmonaires. Ces anomalies de structure du lit capillaire pulmonaire sont responsables de l'installation progressive d'une hypoxémie parfois sévère. Bien qu'un certain nombre d'observations cliniques et expérimentales suggèrent l'implication de facteurs angiogéniques et d'une dysfonction endothéliale dans le développement du SHP, leurs rôles précis dans le déclenchement et l'aggravation de la maladie restent à élucider. Les progrès substantiels réalisés dans la description de cette pathologie n'ont pas permis d'aboutir à l'identification d'un traitement spécifique efficace. La transplantation hépatique reste actuellement le seul moyen d'obtenir une réversibilité totale ou partielle du SHP. Cet article a pour objectif de fournir une revue sur la définition et l'épidémiologie du SHP, de décrire les différents modèles expérimentaux ainsi que les avancées dans la compréhension de la physiopathologie de la maladie avec un intérêt particulier porté au BMP-9 et sa voie de signalisation.

© 2022 SPLF. Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

\* Auteur correspondant. Service de pneumologie et soins intensifs respiratoires, hôpital Bicêtre, Assistance publique–Hôpitaux de Paris, Le Kremlin-Bicêtre, France.

Adresse e-mail : [mariecaroline.certain@gmail.com](mailto:mariecaroline.certain@gmail.com) (M.-C. Certain).

<https://doi.org/10.1016/j.rmr.2022.02.055>

0761-8425/© 2022 SPLF. Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.



# 1 **Bone Morphogenetic Protein-9 Controls Pulmonary Vascular Growth and Remodeling**

2 **Running title:** *Berrebeh et al.; Role of BMP-9 in pulmonary vascular remodeling*

3 Nihel Berrebeh<sup>1,2</sup>, Yvon Mbouamboua<sup>3</sup>, Raphaël Thuillet<sup>1,2</sup>, Mina Ottaviani<sup>1,2</sup>, Fabien Robert<sup>1,2</sup>, Mustapha  
4 Kamel Chelgham<sup>1,2</sup>, Virginie Magnone<sup>3</sup>, Agnès Desroches-Castan<sup>4</sup>, Nicolas Ricard<sup>4</sup>, Ignacio Anegon<sup>5</sup>,  
5 Séverine Remy<sup>5</sup>, Ralph Theo Schermuly<sup>6</sup>, Kevin Lebrigand<sup>3</sup>, Baktybek Kojonazarov<sup>6</sup>, Laurent Savale<sup>1,2,7</sup>,  
6 Marc Humbert<sup>1,2,7</sup>, Sabine Bailly<sup>4</sup>, Pascal Barbry<sup>3,8</sup>, Ly Tu<sup>1,2,\*</sup>, Christophe Guignabert<sup>1,2,\*</sup>

7  
8 <sup>1</sup>INSERM UMR\_S 999 « Pulmonary Hypertension: Pathophysiology and Novel Therapies », Hôpital Marie  
9 Lannelongue, 92350 Le Plessis-Robinson, France.

10 <sup>2</sup>Université Paris-Saclay, Faculté de Médecine, Pulmonary Hypertension: Pathophysiology and Novel Therapies, 94276  
11 Le Kremlin-Bicêtre, France.

12 <sup>3</sup>Université Côte d'Azur, CNRS, INSERM, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, F06560 Sophia  
13 Antipolis, France.

14 <sup>4</sup>Biosanté unit U1292, Grenoble Alpes University, INSERM, CEA, F-38000 Grenoble, France.

15 <sup>5</sup>Center for Research in Transplantation and Translational Immunology, Plateforme Transgénèse Rat & Immuno  
16 Phénomique, INSERM 1064 & SFR François Bonamy, CNRS UMS3556, F44098 Nantes, France.

17 <sup>6</sup>Department of Internal Medicine, Member of the German Center of Lung Research (DZL), Justus-Liebig-University of  
18 Giessen (JLU), Aulweg 130, Giessen, 35392, Germany.

19 <sup>7</sup>Assistance Publique - Hôpitaux de Paris (AP-HP), Service de Pneumologie et Soins Intensifs Respiratoires, Hôpital  
20 Bicêtre, 94270 Le Kremlin-Bicêtre, France.

21 <sup>8</sup>3IA Côte d'Azur, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, F06560 Sophia Antipolis, France.

22

23 \* These authors contributed equally to this work

24

## 25 **Corresponding author:**

26 Christophe Guignabert, Ph.D (ORCID ID: 0000-0002-8545-4452)

27 Université Paris Saclay - INSERM

28 UMR\_S 999: "Pulmonary Hypertension: Pathophysiology and Novel Therapies"

29 Faculté de Médecine Paris-Saclay - Bâtiment de recherche (2e étage)

30 63 Rue Gabriel Péri

31 94276 Le Kremlin Bicêtre, FRANCE

32 Tel: +33 1 40948833 - E-mail: [christophe.guignabert@inserm.fr](mailto:christophe.guignabert@inserm.fr)

33

34 **Manuscript word count:** 5,222

35 **Journal Subject Codes:** Pulmonary circulation and disease:[18]

# RÉFÉRENCES

---

1. Krowka, M. J. *et al.* International Liver Transplant Society Practice Guidelines: Diagnosis and Management of Hepatopulmonary Syndrome and Portopulmonary Hypertension. *Transplantation* **100**, 1440–1452 (2016).
2. Sayadi, A., Duhaut, L., Robert, F., Savale, L. & Coilly, A. Syndrome hépato-pulmonaire. *La Revue de Médecine Interne* **45**, 156–165 (2024).
3. Townsley, M. I. Structure and Composition of Pulmonary Arteries, Capillaries, and Veins. in *Comprehensive Physiology* (ed. Prakash, Y. S.) 675–709 (Wiley, 2012). doi:10.1002/cphy.c100081.
4. Glazier, J. B., Hughes, J. M., Maloney, J. E. & West, J. B. Measurements of capillary dimensions and blood volume in rapidly frozen lungs. *Journal of Applied Physiology* **26**, 65–76 (1969).
5. Savale, L. *et al.* Hepatopulmonary syndrome: a liver-induced oxygenation defect. in *Rare Diseases of the Respiratory System* (eds. Wagner, T. O. F., Humbert, M., Wijsenbeek, M., Kreuter, M. & Hebestreit, H.) 224–236 (European Respiratory Society, Sheffield, United Kingdom, 2023). doi:10.1183/2312508X.10006023.
6. Certain, M.-C. *et al.* Syndrome hépatopulmonaire: prévalence, physiopathologie et implications cliniques. *Revue des Maladies Respiratoires* **39**, 84–89 (2022).
7. Rodríguez-Roisin, R. & Krowka, M. J. Hepatopulmonary Syndrome — A Liver-Induced Lung Vascular Disorder. *N Engl J Med* **358**, 2378–2387 (2008).
8. Baiges, A. *et al.* Congenital Extrahepatic Portosystemic Shunts (Abernethy Malformation): An International Observational Study. *Hepatology* **71**, 658–669 (2020).
9. Fuhrmann, V. *et al.* Hepatopulmonary Syndrome in Patients With Hypoxic Hepatitis. *Gastroenterology* **131**, 69–75 (2006).
10. Darmadi, D. & Habriel Ruslie, R. Endothelin-1 level as a predictor of hepatopulmonary syndrome in liver cirrhosis. *Medicinski Glasnik* **17**, 389–394 (2020).
11. Fallon, M. B. *et al.* Impact of Hepatopulmonary Syndrome on Quality of Life and Survival in Liver Transplant Candidates. *Gastroenterology* **135**, 1168–1175 (2008).
12. Kawut, S. M. *et al.* Impact of Hepatopulmonary Syndrome in Liver Transplantation Candidates and the Role of Angiogenesis. *Eur Respir J* 2102304 (2021) doi:10.1183/13993003.02304-2021.
13. Pascasio, J. M. *et al.* Prevalence and Severity of Hepatopulmonary Syndrome and Its Influence on Survival in Cirrhotic Patients Evaluated for Liver Transplantation. *American Journal of Transplantation* **14**, 1391–1399 (2014).
14. Younis, I. *et al.* Clinical characteristics, predictors, and survival among patients with hepatopulmonary syndrome. *Ann Hepatol* **14**, 354–360 (2015).
15. Lejealle, C. *et al.* Evidence for an Association Between Intrahepatic Vascular Changes and the Development of Hepatopulmonary Syndrome. *Chest* **155**, 123–136 (2019).
16. Abrams, G. A., Jaffe, C. C., Hoffer, P. B., Binder, H. J. & Fallon, M. B. Diagnostic utility of contrast echocardiography and lung perfusion scan in patients with hepatopulmonary syndrome. *Gastroenterology* **109**, 1283–1288 (1995).
17. Kalambokis, G. & Tsianos, E. V. Lung perfusion scan is not superior to contrast-enhanced echocardiography for the diagnosis of the hepatopulmonary syndrome in chronic liver disease: *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* **22**, 1387–1388 (2010).
18. Schenk, P. Hepatopulmonary syndrome: prevalence and predictive value of various cut offs for arterial oxygenation and their clinical consequences. *Gut* **51**, 853–859 (2002).
19. Heinemann, H. O., Emirgil, C. & Mijnsen, J. P. Hyperventilation and arterial hypoxemia in cirrhosis of the liver. *The American Journal of Medicine* **28**, 239–246 (1960).
20. Edell, E. S., Cortese, D. A., Krowka, M. J. & Rehder, K. Severe Hypoxemia and Liver Disease. *Am Rev Respir Dis* **140**, 1631–1635 (1989).
21. Berthelot, P., Walker, J. G., Sherlock, S. & Reid, L. Arterial Changes in the Lungs in Cirrhosis of the Liver — Lung Spider Nevi. *N Engl J Med* **274**, 291–298 (1966).
22. Lee, K.-N., Lee, H.-J., Shin, W. W. & Webb, W. R. Hypoxemia and Liver Cirrhosis (Hepatopulmonary Syndrome) in Eight Patients: Comparison of the Central and Peripheral Pulmonary Vasculature. *Radiology* **211**, 549–553 (1999).

23. Saad, N. E. A., Lee, D. E., Waldman, D. L. & Saad, W. E. A. Pulmonary arterial coil embolization for the management of persistent type I hepatopulmonary syndrome after liver transplantation. *J Vasc Interv Radiol* **18**, 1576–1580 (2007).
24. Soulaïdopoulos, S., Cholongitas, E., Giannakoulas, G., Vlachou, M. & Goulis, I. Review article: Update on current and emergent data on hepatopulmonary syndrome. *WJG* **24**, 1285–1298 (2018).
25. Krowka, M. J., Tajik, A. J., Dickson, E. R., Wiesner, R. H. & Cortese, D. A. Intrapulmonary Vascular Dilatations (IPVD) in Liver Transplant Candidates. *Chest* **97**, 1165–1170 (1990).
26. DuBrock, H. M. *et al.* Clinical Impact of Intrapulmonary Vascular Dilatation in Candidates for Liver Transplant. *Chest* **153**, 414–426 (2018).
27. Hopkins, W. E., Waggoner, A. D. & Barzilai, B. Frequency and significance of intrapulmonary right-to-left shunting in end-stage hepatic disease. *The American Journal of Cardiology* **70**, 516–519 (1992).
28. Santa-Cruz, R. A. *et al.* Clinical predictors and characteristics of patients with chronic liver disease and intrapulmonary shunts. *Clin Cardiol* **28**, 437–441 (2005).
29. Borkar, V. V. *et al.* Hepatopulmonary Syndrome in children: a comparative study of non-cirrhotic vs. cirrhotic portal hypertension. *Liver International* **35**, 1665–1672 (2015).
30. Kaymakoglu, S. *et al.* Hepatopulmonary syndrome in noncirrhotic portal hypertensive patients. *Digestive Diseases and Sciences* **48**, 556–560 (2003).
31. Anand, A. C., Mukherjee, D., Rao, K. S. & Seth, A. K. Hepatopulmonary syndrome: prevalence and clinical profile. *Indian J Gastroenterol* **20**, 24–27 (2001).
32. Gupta, D. *et al.* Prevalence of hepatopulmonary syndrome in cirrhosis and extrahepatic portal venous obstruction. *Am J Gastroenterology* **96**, 3395–3399 (2001).
33. Fu, L. *et al.* Congenital extrahepatic portosystemic shunt: an underdiagnosed but treatable cause of hepatopulmonary syndrome. *Eur J Pediatr* **175**, 195–201 (2016).
34. Alvarez, A. E., Ribeiro, A. F., Hessel, G., Baracat, J. & Ribeiro, J. D. Abernethy malformation: One of the etiologies of hepatopulmonary syndrome. *Pediatric Pulmonology* **34**, 391–394 (2002).
35. Sokollik, C., Bandsma, R. H. J., Gana, J. C., Van Den Heuvel, M. & Ling, S. C. Congenital Portosystemic Shunt: Characterization of a Multisystem Disease. *J. pediatr. gastroenterol. nutr.* **56**, 675–681 (2013).
36. Bernard, O. *et al.* Congenital Portosystemic Shunts in Children: Recognition, Evaluation, and Management. *Semin Liver Dis* **32**, 273–287 (2013).
37. DiPaola, F. *et al.* Congenital Portosystemic Shunts in Children: Associations, Complications, and Outcomes. *Dig Dis Sci* **65**, 1239–1251 (2020).
38. Lambert, V. *et al.* Cardiovascular disorders in patients with congenital portosystemic shunts: 23 years of experience in a tertiary referral centre. *Arch Cardiovasc Dis* **114**, 221–231 (2021).
39. Fahmy, D. M., Mitchell, P. D. & Jonas, M. M. Presentation, Management, and Outcome of Congenital Portosystemic Shunts in Children: The Boston Children’s Hospital Experience. *Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition* **75**, 81–87 (2022).
40. Tyraskis, A. *et al.* Complications of congenital portosystemic shunts: liver tumors are affected by shunt severity, but pulmonary and neurocognitive associations are not. *Hepatol Int* (2022) doi:10.1007/s12072-022-10328-5.
41. Swanson, K. L., Wiesner, R. H. & Krowka, M. J. Natural history of hepatopulmonary syndrome: Impact of liver transplantation. *Hepatology* **41**, 1122–1129 (2005).
42. Schenk, P. *et al.* Prognostic significance of the hepatopulmonary syndrome in patients with cirrhosis. *Gastroenterology* **125**, 1042–1052 (2003).
43. Han, S. K., Kim, M. Y., Kang, S. H., Suk, K. T. & Baik, S. K. Hepatopulmonary syndrome is related to the development of acute-on-chronic liver failure and poor prognosis in cirrhotic patients. *Hepatol Int* **15**, 1207–1214 (2021).
44. Arroyo, V., Moreau, R. & Jalan, R. Acute-on-Chronic Liver Failure. *N Engl J Med* **382**, 2137–2145 (2020).

45. Fallon, M. B., Abrams, G. A., McGrath, J. W., Hou, Z. & Luo, B. Common bile duct ligation in the rat: a model of intrapulmonary vasodilatation and hepatopulmonary syndrome. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* **272**, G779–G784 (1997).
46. Raevens, S. & Fallon, M. B. Potential Clinical Targets in Hepatopulmonary Syndrome: Lessons From Experimental Models. *Hepatology* **68**, 2016–2028 (2018).
47. Van Steenkiste, C. *et al.* Vascular corrosion casting: analyzing wall shear stress in the portal vein and vascular abnormalities in portal hypertensive and cirrhotic rodents. *Laboratory Investigation* **90**, 1558–1572 (2010).
48. Schraufnagel, D. E., Malik, R., Goel, V., Ohara, N. & Chang, S. W. Lung capillary changes in hepatic cirrhosis in rats. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* **272**, L139–L147 (1997).
49. Raevens, S. *et al.* Placental growth factor inhibition targets pulmonary angiogenesis and represents a therapy for hepatopulmonary syndrome in mice: Liver Failure/Cirrhosis/Portal Hypertension. *Hepatology* **68**, 634–651 (2018).
50. Carbon tetrachloride toxicity as a model for studying free-radical mediated liver injury. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **311**, 633–645 (1985).
51. Scholten, D., Trebicka, J., Liedtke, C. & Weiskirchen, R. The carbon tetrachloride model in mice. *Lab Anim* **49**, 4–11 (2015).
52. Staňková, P. *et al.* The toxic effect of thioacetamide on rat liver in vitro. *Toxicology in Vitro* **24**, 2097–2103 (2010).
53. Natarajan, S. K. *et al.* Oxidative stress in the development of liver cirrhosis: A comparison of two different experimental models. *J Gastroenterol Hepatol* **21**, 947–957 (2006).
54. Chilakapati, J. *et al.* Toxicokinetics and toxicity of thioacetamide sulfoxide: a metabolite of thioacetamide. *Toxicology* **230**, 105–116 (2007).
55. Zhang, J. *et al.* Pulmonary Angiogenesis in a Rat Model of Hepatopulmonary Syndrome. *Gastroenterology* **136**, 1070–1080 (2009).
56. Luo, B. *et al.* ET-1 and TNF- $\alpha$  in HPS: analysis in prehepatic portal hypertension and biliary and nonbiliary cirrhosis in rats. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* **286**, G294–G303 (2004).
57. Schroeder, R. A., Ewing, C. A., Sitzmann, J. V. & Kuo, P. C. Pulmonary expression of iNOS and HO-1 protein is upregulated in a rat model of prehepatic portal hypertension. *Digestive Diseases and Sciences* **45**, 2405–2410 (2000).
58. Luo, B. *et al.* Increased pulmonary vascular endothelin B receptor expression and responsiveness to endothelin-1 in cirrhotic and portal hypertensive rats: a potential mechanism in experimental hepatopulmonary syndrome. *Journal of Hepatology* **38**, 556–563 (2003).
59. Martin, P.-Y., Ginès, P. & Schrier, R. W. Nitric Oxide as a Mediator of Hemodynamic Abnormalities and Sodium and Water Retention in Cirrhosis. *N Engl J Med* **339**, 533–541 (1998).
60. Ros, J. *et al.* Nitric oxide production in arterial vessels of cirrhotic rats. *Hepatology* **21**, 554–560 (1995).
61. Fallon, M. *et al.* The role of endothelial nitric oxide synthase in the pathogenesis of a rat model of hepatopulmonary syndrome. *Gastroenterology* **113**, 606–614 (1997).
62. Chabot, F. *et al.* Role of NO in the pulmonary artery hyporeactivity to phenylephrine in experimental biliary cirrhosis. *Eur Respir J* **9**, 560–564 (1996).
63. Zhang, X.-J. *et al.* Intrapulmonary vascular dilatation and nitric oxide in hypoxemic rats with chronic bile duct ligation. *Journal of Hepatology* **39**, 724–730 (2003).
64. Nunes, H. *et al.* Role of Nitric Oxide in Hepatopulmonary Syndrome in Cirrhotic Rats. *Am J Respir Crit Care Med* **164**, 879–885 (2001).
65. Zhang, J. *et al.* Analysis of pulmonary heme oxygenase-1 and nitric oxide synthase alterations in experimental hepatopulmonary syndrome. *Gastroenterology* **125**, 1441–1451 (2003).
66. Koesling, D., Russwurm, M., Mergia, E., Mullershausen, F. & Friebe, A. Nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase: structure and regulation. *Neurochemistry International* **45**, 813–819 (2004).

67. Miyamoto, A. *et al.* Effect of chronic methylene blue administration on hypoxemia in rats with common bile duct ligation: Methylene blue in rats with hypoxemia. *Hepatology Research* **40**, 622–632 (2010).
68. Ling, Y. *et al.* The role of endothelin-1 and the endothelin B receptor in the pathogenesis of hepatopulmonary syndrome in the rat. *Hepatology* **39**, 1593–1602 (2004).
69. Luo, B., Abrams, G. A. & Fallon, M. B. Endothelin-1 in the rat bile duct ligation model of hepatopulmonary syndrome: correlation with pulmonary dysfunction. *Journal of Hepatology* **29**, 571–578 (1998).
70. Luo, B. *et al.* Cholangiocyte Endothelin 1 and Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 Production in Rat Experimental Hepatopulmonary Syndrome. *Gastroenterology* **129**, 682–695 (2005).
71. Chaumais, M.-C. *et al.* Clinical Pharmacology of Endothelin Receptor Antagonists Used in the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Cardiovasc Drugs* **15**, 13–26 (2015).
72. Tang, L. *et al.* Modulation of pulmonary endothelial endothelin B receptor expression and signaling: implications for experimental hepatopulmonary syndrome. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* **292**, L1467–L1472 (2007).
73. Zhang, J. *et al.* Attenuation of experimental hepatopulmonary syndrome in endothelin B receptor-deficient rats. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* **296**, G704–G708 (2009).
74. Zhang, J., Yang, W., Hu, B., Wu, W. & Fallon, M. B. Endothelin-1 Activation of the Endothelin B Receptor Modulates Pulmonary Endothelial CX3CL1 and Contributes to Pulmonary Angiogenesis in Experimental Hepatopulmonary Syndrome. *The American Journal of Pathology* **184**, 1706–1714 (2014).
75. Imamura, M. *et al.* Hypoxic pulmonary hypertension is prevented in rats with common bile duct ligation. *Journal of Applied Physiology* **98**, 739–747 (2005).
76. Bell, D. R., Rensberger, H. J., Koritnik, D. R. & Koshy, A. Estrogen pretreatment directly potentiates endothelium-dependent vasorelaxation of porcine coronary arteries. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **268**, H377–H383 (1995).
77. Weiner, C. P. *et al.* Induction of calcium-dependent nitric oxide synthases by sex hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 5212–5216 (1994).
78. Han, S.-Z., Karaki, H., Ouchi, Y., Akishita, M. & Orimo, H.  $17\beta$ -Estradiol Inhibits  $Ca^{2+}$  Influx and  $Ca^{2+}$  Release Induced by Thromboxane  $A_2$  in Porcine Coronary Artery. *Circulation* **91**, 2619–2626 (1995).
79. Yol, S., Erikoglu, M., Toprak, S., Tavli, S. & Tavli, L. The effects of serum estrogen levels on hypoxemia and blood nitric oxide levels in experimental hepatopulmonary syndrome. *Hepatology Research* **33**, 7–13 (2005).
80. Oswald-Mammosser, M. *et al.* Effect of the oestrogen receptor antagonist fulvestrant on the cirrhotic rat lung. *Fundam Clin Pharmacol* **29**, 269–277 (2015).
81. Yang, Y. *et al.* Krüppel-like factor 6 (KLF6) mediates pulmonary angiogenesis in rat experimental hepatopulmonary syndrome and is aggravated by bone morphogenetic protein 9 (BMP9). *Biology Open* bio.040121 (2019) doi:10.1242/bio.040121.
82. Chang, C.-C. *et al.* Sorafenib treatment improves hepatopulmonary syndrome in rats with biliary cirrhosis. *Clinical Science* **124**, 457–466 (2013).
83. Thenappan, T. *et al.* A Central Role for CD68(+) Macrophages in Hepatopulmonary Syndrome: Reversal by Macrophage Depletion. *Am J Respir Crit Care Med* **183**, 1080–1091 (2011).
84. Wu, W., Zhang, J., Yang, W., Hu, B. & Fallon, M. B. Role of splenic reservoir monocytes in pulmonary vascular monocyte accumulation in experimental hepatopulmonary syndrome. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* **31**, 1888–1894 (2016).
85. Sztrymf, B. *et al.* Cirrhotic rats with bacterial translocation have higher incidence and severity of hepatopulmonary syndrome. *J Gastroenterol Hepatol* **20**, 1538–1544 (2005).
86. Li, X. *et al.* CXCR2 is involved in pulmonary intravascular macrophage accumulation and angiogenesis in a rat model of hepatopulmonary syndrome. *Clinical Science* **131**, 159–168 (2017).



87. Sztrymf, B. *et al.* Prevention of hepatopulmonary syndrome and hyperdynamic state by pentoxifylline in cirrhotic rats. *Eur Respir J* **23**, 752–758 (2004).
88. Liu, L. *et al.* TNF- $\alpha$  neutralization improves experimental hepatopulmonary syndrome in rats. *Liver Int* **32**, 1018–1026 (2012).
89. Zhu, J., Qiu, J., Chen, K., Wang, W. & Zheng, S. Tea polyphenols and Levofloxacin alleviate the lung injury of hepatopulmonary syndrome in common bile duct ligation rats through Endotoxin -TNF signaling. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **137**, 111263 (2021).
90. Morise, Z. *et al.* Reactive oxygen species and vascular cell adhesion molecule-1 in distant organ failure following bile duct obstruction in mice. *Digestive Diseases and Sciences* **47**, 607–613 (2002).
91. Yang, W. *et al.* Alveolar Type II Epithelial Cell Dysfunction in Rat Experimental Hepatopulmonary Syndrome (HPS). *PLoS ONE* **9**, e113451 (2014).
92. Nacif, L. S. *et al.* Surfactant protein A is decreased in the lung of rats with hepatopulmonary syndrome. *Acta Cir. Bras.* **29**, 573–578 (2014).
93. Rolla, G. *et al.* Exhaled nitric oxide and oxygenation abnormalities in hepatic cirrhosis. *Hepatology* **26**, 842–847 (1997).
94. Cremona, G. *et al.* Elevated exhaled nitric oxide in patients with hepatopulmonary syndrome. *European Respiratory Journal* **8**, 1883–1885 (1995).
95. Rolla, G. Exhaled Nitric Oxide and Impaired Oxygenation in Cirrhotic Patients before and after Liver Transplantation. *Ann Intern Med* **129**, 375 (1998).
96. Arguedas, M. R., Drake, B. B., Kapoor, A. & Fallon, M. B. Carboxyhemoglobin levels in cirrhotic patients with and without hepatopulmonary syndrome. *Gastroenterology* **128**, 328–333 (2005).
97. Feng, G. & Rong, H. The role of hemodynamic and vasoactive substances on hepatopulmonary syndrome. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* **18**, 380–386 (2014).
98. Koch, D. G. *et al.* Elevated Levels of Endothelin-1 in Hepatic Venous Blood Are Associated with Intrapulmonary Vasodilatation in Humans. *Dig Dis Sci* **57**, 516–523 (2012).
99. Gómez, F. P. *et al.* Effects of nebulized NG-nitro-L-arginine methyl ester in patients with hepatopulmonary syndrome. *Hepatology* **43**, 1084–1091 (2006).
100. Maniscalco, M., Sofia, M. & Higenbottam, T. Effects of an NO-Synthase Inhibitor L-NMMA in the Hepatopulmonary Syndrome. *Respiration* **68**, 226–226 (2001).
101. Brussino, L. *et al.* Effect on dyspnoea and hypoxaemia of inhaled NG-nitro-L-arginine methyl ester in hepatopulmonary syndrome. *The Lancet* **362**, 43–44 (2003).
102. Gupta, S., Tang, R. & Al-Hesayen, A. Inhaled nitric oxide improves the hepatopulmonary syndrome: a physiologic analysis. *Thorax* **76**, 1142–1145 (2021).
103. Aller, R. *et al.* The effect of liver transplantation on circulating levels of estradiol and progesterone in male patients: Parallelism with hepatopulmonary syndrome and systemic hyperdynamic circulation improvement. *J Endocrinol Invest* **24**, 503–509 (2001).
104. Aller, R. *et al.* Implications of estradiol and progesterone in pulmonary vasodilatation in cirrhotic patients. *J Endocrinol Invest* **25**, 4–10 (2002).
105. Roberts, K. E. *et al.* Genetic Risk Factors for Hepatopulmonary Syndrome in Patients With Advanced Liver Disease. *Gastroenterology* **139**, 130-139.e24 (2010).
106. Gupta, S. *et al.* Norfloxacin Therapy for Hepatopulmonary Syndrome: A Pilot Randomized Controlled Trial. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* **8**, 1095–1098 (2010).
107. Tanikella, R., Philips, G. M., Faulk, D. K., Kawut, S. M. & Fallon, M. B. Pilot study of pentoxifylline in hepatopulmonary syndrome. *Liver Transpl* **14**, 1199–1203 (2008).
108. Kianifar, H. R. Pentoxifylline in hepatopulmonary syndrome. *WJG* **18**, 4912 (2012).
109. Gupta, L. B. *et al.* Pentoxifylline Therapy for Hepatopulmonary Syndrome: A Pilot Study. *Arch Intern Med* **168**, 1820 (2008).
110. Raevens, S. *et al.* Role of angiogenic factors/cell adhesion markers in serum of cirrhotic patients with hepatopulmonary syndrome. *Liver Int* **35**, 1499–1507 (2015).
111. Kawut, S. M. *et al.* Sorafenib in Hepatopulmonary Syndrome: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Liver Transpl* **15**, 25438 (2019) doi:10.1002/lt.25438.

112. Horvatits, T. *et al.* Serum bile acids in patients with hepatopulmonary syndrome. *Z Gastroenterol* **55**, 361–367 (2016).
113. Eriksson, L. S. *et al.* Normalization of ventilation/perfusion relationships after liver transplantation in patients with decompensated cirrhosis: Evidence for a hepatopulmonary syndrome. *Hepatology* **12**, 1350–1357 (1990).
114. Iyer, V. N. *et al.* Hepatopulmonary syndrome: Favorable outcomes in the MELD exception era. *Hepatology* **57**, 2427–2435 (2013).
115. Kadry, Z. *et al.* Excellent outcomes with liver transplantation in hepatopulmonary syndrome across pre-transplant PaO<sub>2</sub> spectrum. *JHEP Reports* **3**, 100351 (2021).
116. Gupta, S. *et al.* Improved Survival After Liver Transplantation in Patients with Hepatopulmonary Syndrome. *American Journal of Transplantation* **10**, 354–363 (2010).
117. Merion, R. M. *et al.* The Survival Benefit of Liver Transplantation. *American Journal of Transplantation* **5**, 307–313 (2005).
118. Francoz, C. *et al.* Model for end-stage liver disease exceptions in the context of the french model for end-stage liver disease score-based liver allocation system: Meld Exceptions in the French System. *Liver Transpl* **17**, 1137–1151 (2011).
119. Fallon, M. B., Mulligan, D. C., Gish, R. G. & Krowka, M. J. Model for end-stage liver disease (MELD) exception for hepatopulmonary syndrome. *Liver Transpl* **12**, S105–S107 (2006).
120. Fleming, G. M., Cornell, T. T., Welling, T. H., Magee, J. C. & Annich, G. M. Hepatopulmonary syndrome: Use of extracorporeal life support for life-threatening hypoxia following liver transplantation. *Liver Transpl* **14**, 966–970 (2008).
121. Taille, C. *et al.* Liver transplantation for hepatopulmonary syndrome: A ten-year experience in Paris, France. *Transplantation* **75**, 1482–1489 (2003).
122. Meyers, C., Low, L., Kaufman, L., Druger, G. & Wong, L. L. Trendelenburg positioning and continuous lateral rotation improve oxygenation in hepatopulmonary syndrome after liver transplantation. *Liver Transpl* **4**, 510–512 (1998).
123. Arguedas, M. Prospective evaluation of outcomes and predictors of mortality in patients with hepatopulmonary syndrome undergoing liver transplantation. *Hepatology* **37**, 192–197 (2003).
124. Goldberg, D. S. *et al.* Impact of the Hepatopulmonary Syndrome MELD Exception Policy on Outcomes of Patients After Liver Transplantation: An Analysis of the UNOS Database. *Gastroenterology* **146**, 1256–1265.e1 (2014).
125. Jose, A. *et al.* Predictors of outcomes following liver transplant in hepatopulmonary syndrome: An OPTN database analysis. *Respiratory Medicine* **190**, 106683 (2021).
126. Aragon Pinto, C. *et al.* ICU and Hospital Outcomes in Patients with Hepatopulmonary Syndrome Undergoing Liver Transplantation. *Lung* **200**, 5–10 (2022).
127. Al-Harbi, A., Abdullah, K., Al-Abdulkareem, A., Alghamdi, A. & Al-Jahdali, H. Prevalence, Severity, and Prognostic Effect of Hepatopulmonary Syndrome in Liver Transplant Candidates. *Ann Transplant* **21**, 180–184 (2016).
128. Humbert, M. *et al.* 2022 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. *European Heart Journal* **43**, 3618–3731 (2022).
129. Kovacs, G. *et al.* Definition, classification and diagnosis of pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 2401324 (2024) doi:10.1183/13993003.01324-2024.
130. Humbert, M. *et al.* Treatment of pulmonary arterial hypertension: recent progress and a look to the future. *The Lancet Respiratory Medicine* **11**, 804–819 (2023).
131. Savale, L. *et al.* Portopulmonary hypertension in the current era of pulmonary hypertension management. *Journal of Hepatology* **73**, 130–139 (2020).
132. Savale, L., Watherald, J. & Sitbon, O. Portopulmonary Hypertension. *Semin Respir Crit Care Med* **38**, 651–661 (2017).
133. Guignabert, C. *et al.* Pathology and pathobiology of pulmonary hypertension: current insights and future directions. *Eur Respir J* 2401095 (2024) doi:10.1183/13993003.01095-2024.



134. Fussner, L. A. *et al.* Intrapulmonary vascular dilatations are common in portopulmonary hypertension and may be associated with decreased survival. *Liver Transpl* **21**, 1355–1364 (2015).
135. Hinck, A. P., Mueller, T. D. & Springer, T. A. Structural Biology and Evolution of the TGF- $\beta$  Family. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **8**, a022103 (2016).
136. Constam, D. B. Regulation of TGF $\beta$  and related signals by precursor processing. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **32**, 85–97 (2014).
137. Katagiri, T. & Watabe, T. Bone Morphogenetic Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **8**, a021899 (2016).
138. Tillet, E. *et al.* A heterodimer formed by bone morphogenetic protein 9 (BMP9) and BMP10 provides most BMP biological activity in plasma. *Journal of Biological Chemistry* **293**, 10963–10974 (2018).
139. Valera, E., Isaacs, M. J., Kawakami, Y., Izpisua Belmonte, J. C. & Choe, S. BMP-2/6 Heterodimer Is More Effective than BMP-2 or BMP-6 Homodimers as Inductor of Differentiation of Human Embryonic Stem Cells. *PLoS ONE* **5**, e11167 (2010).
140. Carpenter, R. S. *et al.* Osteoblastic differentiation of human and equine adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells when BMP-2 or BMP-7 homodimer genetic modification is compared to BMP-2/7 heterodimer genetic modification in the presence and absence of dexamethasone. *Journal Orthopaedic Research* **28**, 1330–1337 (2010).
141. Brown, M. A. *et al.* Crystal Structure of BMP-9 and Functional Interactions with Pro-region and Receptors. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 25111–25118 (2005).
142. Tillet, E. & Bailly, S. Emerging roles of BMP9 and BMP10 in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Front. Genet.* **5**, (2015).
143. Lowery, J. W. & De Caestecker, M. P. BMP signaling in vascular development and disease. *Cytokine & Growth Factor Reviews* **21**, 287–298 (2010).
144. Derynck, R. & Zhang, Y. E. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* **425**, 577–584 (2003).
145. Breikopf-Heinlein, K. *et al.* BMP-9 interferes with liver regeneration and promotes liver fibrosis. *Gut* **66**, 939–954 (2017).
146. Miller, A. F., Harvey, S. A. K., Thies, R. S. & Olson, M. S. Bone Morphogenetic Protein-9. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 17937–17945 (2000).
147. Neuhaus, H., Rosen, V. & Thies, R. S. Heart specific expression of mouse BMP-10 a novel member of the TGF- $\beta$  superfamily. *Mechanisms of Development* **80**, 181–184 (1999).
148. Scharpfenecker, M. *et al.* BMP-9 signals via ALK1 and inhibits bFGF-induced endothelial cell proliferation and VEGF-stimulated angiogenesis. *Journal of Cell Science* **120**, 964–972 (2007).
149. David, L., Mallet, C., Mazerbourg, S., Feige, J.-J. & Bailly, S. Identification of BMP9 and BMP10 as functional activators of the orphan activin receptor-like kinase 1 (ALK1) in endothelial cells. *Blood* **109**, 1953–1961 (2007).
150. Desroches-Castan, A., Tillet, E., Bouvard, C. & Bailly, S. BMP9 and BMP10: Two close vascular quiescence partners that stand out. *Developmental Dynamics* **251**, 158–177 (2022).
151. Zhang, Y. E. Non-Smad Signaling Pathways of the TGF- $\beta$  Family. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **9**, a022129 (2017).
152. Robert, F. *et al.* Dysfonction de la signalisation endothéliale du BMP-9 dans les maladies vasculaires pulmonaires. *Revue des Maladies Respiratoires* **40**, 234–238 (2023).
153. Tu, L. *et al.* Selective BMP-9 Inhibition Partially Protects Against Experimental Pulmonary Hypertension. *Circ Res* **124**, 846–855 (2019).
154. Wang, L. *et al.* BMP9 and BMP10 Act Directly on Vascular Smooth Muscle Cells for Generation and Maintenance of the Contractile State. *Circulation* **143**, 1394–1410 (2021).
155. Long, L. *et al.* Selective enhancement of endothelial BMPR-II with BMP9 reverses pulmonary arterial hypertension. *Nat Med* **21**, 777–785 (2015).
156. David, L. *et al.* Bone Morphogenetic Protein-9 Is a Circulating Vascular Quiescence Factor. *Circulation Research* **102**, 914–922 (2008).

157. Upton, P. D. *et al.* The endothelial protective factors, BMP9 and BMP10, inhibit CCL2 release by human vascular endothelial cells. *Journal of Cell Science* jcs.239715 (2020) doi:10.1242/jcs.239715.
158. Chen, X. *et al.* Bone Morphogenetic Protein 9 Protects against Neonatal Hyperoxia-Induced Impairment of Alveolarization and Pulmonary Inflammation. *Front. Physiol.* **8**, 486 (2017).
159. Li, W. *et al.* Circulating BMP9 Protects the Pulmonary Endothelium during Inflammation-induced Lung Injury in Mice. *Am J Respir Crit Care Med* **203**, 1419–1430 (2021).
160. McAllister, K. A. *et al.* Endoglin, a TGF- $\beta$  binding protein of endothelial cells, is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type 1. *Nat Genet* **8**, 345–351 (1994).
161. Johnson, D. W. *et al.* Mutations in the activin receptor-like kinase 1 gene in hereditary haemorrhagic telangiectasia type 2. *Nat Genet* **13**, 189–195 (1996).
162. Gallione, C. J. *et al.* A combined syndrome of juvenile polyposis and hereditary haemorrhagic telangiectasia associated with mutations in MADH4 ( SMAD4). *The Lancet* **363**, 852–859 (2004).
163. Gallione, C. J. *et al.* SMAD4 mutations found in unselected HHT patients. *Journal of Medical Genetics* **43**, 793–797 (2006).
164. Hernandez, F. *et al.* Mutations in RASA1 and GDF2 identified in patients with clinical features of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Hum Genome Var* **2**, 15040 (2015).
165. Wooderchak-Donahue, W. L. *et al.* BMP9 Mutations Cause a Vascular-Anomaly Syndrome with Phenotypic Overlap with Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. *The American Journal of Human Genetics* **93**, 530–537 (2013).
166. Farhan, A., Yuan, F., Partan, E. & Weiss, C. R. Clinical manifestations of patients with *GDF2* mutations associated with hereditary hemorrhagic telangiectasia type 5. *American J of Med Genetics Pt A* **188**, 199–209 (2022).
167. Hodgson, J. *et al.* Homozygous *GDF2* nonsense mutations result in a loss of circulating BMP9 and BMP10 and are associated with either PAH or an “HHT-like” syndrome in children. *Mol Genet Genomic Med* (2021) doi:10.1002/mgg3.1685.
168. Deng, Z. *et al.* Familial Primary Pulmonary Hypertension (Gene PPH1) Is Caused by Mutations in the Bone Morphogenetic Protein Receptor-II Gene. *The American Journal of Human Genetics* **67**, 737–744 (2000).
169. Aldred, M. A., Morrell, N. W. & Guignabert, C. New Mutations and Pathogenesis of Pulmonary Hypertension: Progress and Puzzles in Disease Pathogenesis. *Circ Res* **130**, 1365–1381 (2022).
170. Evans, J. D. W. *et al.* BMPR2 mutations and survival in pulmonary arterial hypertension: an individual participant data meta-analysis. *The Lancet Respiratory Medicine* **4**, 129–137 (2016).
171. Grynblat, J. *et al.* Pulmonary vascular phenotype identified in patients with *GDF2* ( *BMP9* ) or *BMP10* variants: an international multicentre study. *Eur Respir J* **63**, 2301634 (2024).
172. Wang, G. *et al.* Novel homozygous BMP9 nonsense mutation causes pulmonary arterial hypertension: a case report. *BMC Pulm Med* **16**, 17 (2016).
173. Gräf, S. *et al.* Identification of rare sequence variation underlying heritable pulmonary arterial hypertension. *Nat Commun* **9**, 1416 (2018).
174. Wang, X.-J. *et al.* Germline *BMP9* mutation causes idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J* **53**, 1801609 (2019).
175. Austin, E. D. *et al.* Genetics and precision genomics approaches to pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 2401370 (2024) doi:10.1183/13993003.01370-2024.
176. Larkin, E. K. *et al.* Longitudinal Analysis Casts Doubt on the Presence of Genetic Anticipation in Heritable Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* **186**, 892–896 (2012).
177. Hodgson, J. *et al.* Characterization of *GDF2* Mutations and Levels of BMP9 and BMP10 in Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* **201**, 575–585 (2020).
178. Nikolic, I. *et al.* Bone Morphogenetic Protein 9 Is a Mechanistic Biomarker of Portopulmonary Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* **199**, 891–902 (2019).
179. Bouvard, C. *et al.* Different cardiovascular and pulmonary phenotypes for single- and double-knock-out mice deficient in BMP9 and BMP10. *Cardiovascular Research* cvab187 (2021) doi:10.1093/cvr/cvab187.

180. Desroches-Castan, A. *et al.* BMP9 is a key player in endothelial identity and its loss is sufficient to induce arteriovenous malformations. *Cardiovascular Research* **120**, 782–795 (2024).
181. Owen, N. E. *et al.* Reduced circulating BMP10 and BMP9 and elevated endoglin are associated with disease severity, decompensation and pulmonary vascular syndromes in patients with cirrhosis. *EBioMedicine* **56**, 102794 (2020).
182. Yang, Z. *et al.* CRISPR-mediated BMP9 ablation promotes liver steatosis via the down-regulation of PPAR $\alpha$  expression. *Sci. Adv.* **6**, eabc5022 (2020).
183. Hao, J. *et al.* Circulating Bone Morphogenetic Protein-9 is Decreased in Patients with Type 2 Diabetes and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *IJGM Volume* **15**, 8539–8546 (2022).
184. Xu, X. *et al.* Circulating bone morphogenetic protein-9 in relation to metabolic syndrome and insulin resistance. *Sci Rep* **7**, 17529 (2017).
185. Luo, Y. *et al.* Decreased circulating BMP-9 levels in patients with Type 2 diabetes is a signature of insulin resistance. *Clinical Science* **131**, 239–246 (2017).
186. John, M., Kim, K.-J., Bae, S. D. W., Qiao, L. & George, J. Role of BMP-9 in human liver disease. *Gut* **68**, 2097–2100 (2019).
187. 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* **70**, 1392–1408 (2019).
188. Sun, Q.-J. *et al.* The Role of Bone Morphogenetic Protein 9 in Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Mice. *Front. Pharmacol.* **11**, 605967 (2021).
189. Caperuto, L. C. *et al.* Modulation of Bone Morphogenetic Protein-9 Expression and Processing by Insulin, Glucose, and Glucocorticoids: Possible Candidate for Hepatic Insulin-Sensitizing Substance. *Endocrinology* **149**, 6326–6335 (2008).
190. Rochon, E. R. *et al.* BMP9/10 in Pulmonary Vascular Complications of Liver Disease. *Am J Respir Crit Care Med* **201**, 1575–1578 (2020).
191. Easter, D. W., Wade, J. B. & Boyer, J. L. Structural integrity of hepatocyte tight junctions. *Journal of Cell Biology* **96**, 745–749 (1983).
192. Chojkier, M. & Groszmann, R. J. Measurement of portal–systemic shunting in the rat by using gamma-labeled microspheres. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* **240**, G371–G375 (1981).
193. Ricard, N. *et al.* Functional analysis of the BMP9 response of ALK1 mutants from HHT2 patients: a diagnostic tool for novel ACVRL1 mutations. *Blood* **116**, 1604–1612 (2010).
194. Yokoyama, Y. *et al.* Hepatic arterial flow becomes the primary supply of sinusoids following partial portal vein ligation in rats. *J of Gastro and Hepatol* **21**, 1567–1574 (2006).
195. Huang, Y.-T. *et al.* Decreased vascular reactivity of portal vein in rats with portal hypertension. *Journal of Hepatology* **24**, 194–199 (1996).
196. Reiberger, T. *et al.* Sorafenib attenuates the portal hypertensive syndrome in partial portal vein ligated rats. *Journal of Hepatology* **51**, 865–873 (2009).
197. Fernandez, M. *et al.* Inhibition of VEGF receptor-2 decreases the development of hyperdynamic splanchnic circulation and portal-systemic collateral vessels in portal hypertensive rats. *Journal of Hepatology* **43**, 98–103 (2005).
198. Sorell, W. T., Quigley, E. M. M., Jin, G., Johnson, T. J. & Rikkers, L. F. Bacterial translocation in the portal-hypertensive rat: Studies in basal conditions and on exposure to hemorrhagic shock. *Gastroenterology* **104**, 1722–1726 (1993).
199. Pateron, D. *et al.* Role of aortic nitric oxide synthase 3 (eNOS) in the systemic vasodilation of portal hypertension. *Gastroenterology* **119**, 196–200 (2000).
200. Cahill, P. A., Redmond, E. M., Hodges, R., Zhang, S. & Sitzmann, J. V. Increased endothelial nitric oxide synthase activity in the hyperemic vessels of portal hypertensive rats. *Journal of Hepatology* **25**, 370–378 (1996).
201. Cahill, P. A. *et al.* Enhanced nitric oxide synthase activity in portal hypertensive rabbits. *Hepatology* **22**, 598–606 (1995).

202. Hori, N. *et al.* AUGMENTED ENDOGENOUS NITRIC OXIDE PRODUCTION IN PARTIAL PORTAL VEIN-LIGATED RATS. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **22**, 506–511 (1995).
203. Han, Y. *et al.* BMP9-induced vascular normalisation improves the efficacy of immunotherapy against hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. *Clinical & Translational Med* **13**, e1247 (2023).
204. Kang, Q. *et al.* Characterization of the distinct orthotopic bone-forming activity of 14 BMPs using recombinant adenovirus-mediated gene delivery. *Gene Ther* **11**, 1312–1320 (2004).
205. Leblanc, E. *et al.* BMP-9-induced muscle heterotopic ossification requires changes to the skeletal muscle microenvironment. *Journal of Bone and Mineral Research* **26**, 1166–1177 (2011).
206. Li, J. Z. *et al.* Osteogenic potential of five different recombinant human bone morphogenetic protein adenoviral vectors in the rat. *Gene Ther* **10**, 1735–1743 (2003).
207. Varady, P. *et al.* Morphologic Analysis of BMP-9 Gene Therapy-Induced Osteogenesis. *Human Gene Therapy* **12**, 697–710 (2001).
208. Zhong, Y. *et al.* Abstract 18578: BMP9 Regulates Endothelial Expression of Mediators of Pulmonary Vascular Remodeling. *Circulation* **148**, (2023).
209. Star, G. P., Giovinazzo, M. & Langleben, D. Bone morphogenic protein-9 stimulates endothelin-1 release from human pulmonary microvascular endothelial cells. *Microvascular Research* **80**, 349–354 (2010).
210. Larraufie, M.-H. *et al.* Phenotypic screen identifies calcineurin-sparing FK506 analogs as BMP potentiators for treatment of acute kidney injury. *Cell Chemical Biology* **28**, 1271–1282.e12 (2021).
211. Spiekerkoetter, E. *et al.* FK506 activates BMPR2, rescues endothelial dysfunction, and reverses pulmonary hypertension. *J. Clin. Invest.* **123**, 3600–3613 (2013).
212. Chen, Y.-G., Liu, F. & Massagué, J. Mechanism of TGF $\beta$  receptor inhibition by FKBP12. *EMBO J* **16**, 3866–3876 (1997).
213. Huse, M., Chen, Y.-G., Massagué, J. & Kuriyan, J. Crystal Structure of the Cytoplasmic Domain of the Type I TGF  $\beta$  Receptor in Complex with FKBP12. *Cell* **96**, 425–436 (1999).
214. Wang, T. *et al.* The Immunophilin FKBP12 Functions as a Common Inhibitor of the TGF $\beta$  Family Type I Receptors. *Cell* **86**, 435–444 (1996).
215. Quist-Løkken, I. *et al.* FKBP12 is a major regulator of ALK2 activity in multiple myeloma cells. *Cell Commun Signal* **21**, 25 (2023).
216. Zhu, N. *et al.* Novel risk genes and mechanisms implicated by exome sequencing of 2572 individuals with pulmonary arterial hypertension. *Genome Med* **11**, 69 (2019).
217. Cloutier, A. *et al.* Abnormal distribution of pulmonary blood flow after the Glenn shunt or Fontan procedure: risk of development of arteriovenous fistulae. *Circulation* **72**, 471–479 (1985).
218. Kopf, G. S. *et al.* Thirty-year follow-up of superior vena cava-pulmonary artery (Glenn) shunts. *J Thorac Cardiovasc Surg* **100**, 662–670; discussion 670–671 (1990).
219. Feinstein, J. A., Moore, P., Rosenthal, D. N., Puchalski, M. & Brook, M. M. Comparison of contrast echocardiography versus cardiac catheterization for detection of pulmonary arteriovenous malformations. *The American Journal of Cardiology* **89**, 281–285 (2002).
220. Bernstein, H. S., Brook, M. M., Silverman, N. H. & Bristow, J. Development of Pulmonary Arteriovenous Fistulae in Children After Cavopulmonary Shunt. *Circulation* **92**, 309–314 (1995).
221. Lee, J., Menkis, A. H. & Rosenberg, H. C. Reversal of Pulmonary Arteriovenous Malformation After Diversion of Anomalous Hepatic Drainage. *The Annals of Thoracic Surgery* **65**, 848–849 (1998).
222. Agnoletti, G., Borghi, A., Anecchino, F. P. & Crupi, G. Regression of pulmonary fistulas in congenital heart disease after redirection of hepatic venous flow to the lungs. *The Annals of Thoracic Surgery* **72**, 909–911 (2001).
223. Gendera, K., Eicken, A. & Ewert, P. Spontaneous closure of arterio-venous pulmonary fistulas by redirection of hepatic venous blood 9 years after Glenn anastomosis in a 12-year-old girl. *Cardiol Young* **29**, 1287–1289 (2019).
224. Kim, S.-J. *et al.* Inclusion of Hepatic Venous Drainage in Patients with Pulmonary Arteriovenous Fistulas. *The Annals of Thoracic Surgery* **87**, 548–553 (2009).



225. Srivastava, D. *et al.* Hepatic Venous Blood and the Development of Pulmonary Arteriovenous Malformations in Congenital Heart Disease. *Circulation* **92**, 1217–1222 (1995).
226. Yamazaki, Y. & Morita, T. Molecular and functional diversity of vascular endothelial growth factors. *Mol Divers* **10**, 515 (2006).
227. Veeravagu, A. *et al.* Vascular Endothelial Growth Factor and Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Inhibitors as Anti-Angiogenic Agents in Cancer Therapy. *PRA* **2**, 59–71 (2007).
228. Barleon, B. *et al.* Soluble VEGFR-1 secreted by endothelial cells and monocytes is present in human serum and plasma from healthy donors. *Angiogenesis* **4**, 143–154 (2001).
229. Schmidt, T. & Carmeliet, P. Angiogenesis: A Target in Solid Tumors, Also in Leukemia? *Hematology* **2011**, 1–8 (2011).
230. Alitalo, K., Tammela, T. & Petrova, T. V. Lymphangiogenesis in development and human disease. *Nature* **438**, 946–953 (2005).
231. Saharinen, P., Tammela, T., Karkkainen, M. J. & Alitalo, K. Lymphatic vasculature: development, molecular regulation and role in tumor metastasis and inflammation. *Trends in Immunology* **25**, 387–395 (2004).
232. Aase, K. *et al.* Vascular Endothelial Growth Factor-B-Deficient Mice Display an Atrial Conduction Defect. *Circulation* **104**, 358–364 (2001).
233. Bellomo, D. *et al.* Mice Lacking the Vascular Endothelial Growth Factor-B Gene ( *Vegfb* ) Have Smaller Hearts, Dysfunctional Coronary Vasculature, and Impaired Recovery From Cardiac Ischemia. *Circulation Research* **86**, (2000).
234. Li, X. *et al.* VEGF-B: A survival, or an angiogenic factor? *Cell Adhesion & Migration* **3**, 322–327 (2009).
235. Hicklin, D. J. & Ellis, L. M. Role of the Vascular Endothelial Growth Factor Pathway in Tumor Growth and Angiogenesis. *JCO* **23**, 1011–1027 (2005).
236. Braile, M. *et al.* VEGF-A in Cardiomyocytes and Heart Diseases. *IJMS* **21**, 5294 (2020).
237. Apte, R. S., Chen, D. S. & Ferrara, N. VEGF in Signaling and Disease: Beyond Discovery and Development. *Cell* **176**, 1248–1264 (2019).
238. Kamba, T. & McDonald, D. M. Mechanisms of adverse effects of anti-VEGF therapy for cancer. *Br J Cancer* **96**, 1788–1795 (2007).
239. Eremina, V. *et al.* Glomerular-specific alterations of VEGF-A expression lead to distinct congenital and acquired renal diseases. *J. Clin. Invest.* **111**, 707–716 (2003).
240. Dumont, D. J. *et al.* Cardiovascular Failure in Mouse Embryos Deficient in VEGF Receptor-3. *Science* **282**, 946–949 (1998).
241. Karkkainen, M. J. *et al.* Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat Immunol* **5**, 74–80 (2004).
242. Fong, G.-H., Rossant, J., Gertsenstein, M. & Breitman, M. L. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* **376**, 66–70 (1995).
243. Ferrara, N. *et al.* Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* **380**, 439–442 (1996).
244. Lassen, U. *et al.* A phase I, dose-escalation study of TB-403, a monoclonal antibody directed against PlGF, in patients with advanced solid tumours. *Br J Cancer* **106**, 678–684 (2012).
245. Martinsson-Niskanen, T. *et al.* Monoclonal Antibody TB-403: A First-in-Human, Phase I, Double-Blind, Dose Escalation Study Directed Against Placental Growth Factor in Healthy Male Subjects. *Clinical Therapeutics* **33**, 1142–1149 (2011).
246. Mandalà, M., Gokina, N., Barron, C. & Osol, G. Endothelial-Derived Hyperpolarization Factor (EDHF) Contributes to PlGF-Induced Dilation of Mesenteric Resistance Arteries from Pregnant Rats. *J Vasc Res* **49**, 43–49 (2012).
247. Maynard, S. E. *et al.* Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J. Clin. Invest.* **111**, 649–658 (2003).
248. Osol, G. *et al.* Placental growth factor is a potent vasodilator of rat and human resistance arteries. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **294**, H1381–H1387 (2008).

249. Parenti, A. Effect of hypoxia and endothelial loss on vascular smooth muscle cell responsiveness to VEGF-A: role of flt-1/VEGF-receptor-1. *Cardiovascular Research* **55**, 201–212 (2002).
250. Carmeliet, P. *et al.* Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med* **7**, 575–583 (2001).
251. Adini, A., Kornaga, T., Firoozbakht, F. & Benjamin, L. E. Placental growth factor is a survival factor for tumor endothelial cells and macrophages. *Cancer Res* **62**, 2749–2752 (2002).
252. Fischer, C. *et al.* Anti-PlGF Inhibits Growth of VEGF(R)-Inhibitor-Resistant Tumors without Affecting Healthy Vessels. *Cell* **131**, 463–475 (2007).
253. Zhang, J., Chen, A., Wu, Y. & Zhao, Q. Placental Growth Factor Promotes Cardiac Muscle Repair via Enhanced Neovascularization. *Cell Physiol Biochem* **36**, 947–955 (2015).
254. Perelman, N. *et al.* Placenta growth factor activates monocytes and correlates with sickle cell disease severity. *Blood* **102**, 1506–1514 (2003).
255. Pipp, F. *et al.* VEGFR-1–Selective VEGF Homologue PlGF Is Arteriogenic: Evidence for a Monocyte-Mediated Mechanism. *Circulation Research* **92**, 378–385 (2003).
256. Selvaraj, S. K. *et al.* Mechanism of monocyte activation and expression of proinflammatory cytochemokines by placenta growth factor. *Blood* **102**, 1515–1524 (2003).
257. Gelman, S. *et al.* Plasma Nogo-A and placental growth factor levels are associated with portal hypertension in patients with liver cirrhosis. *WJG* **25**, 2935–2946 (2019).
258. Krawczyk, M. *et al.* Panel of three novel serum markers predicts liver stiffness and fibrosis stages in patients with chronic liver disease. *PLoS ONE* **12**, e0173506 (2017).
259. Salcedo Mora, X. *et al.* Association between angiogenesis soluble factors and disease progression markers in chronic hepatitis C patients. *Rev. esp. enferm. dig.* **97**, (2005).
260. Li, X. *et al.* Placental Growth Factor Contributes to Liver Inflammation, Angiogenesis, Fibrosis in Mice by Promoting Hepatic Macrophage Recruitment and Activation. *Front. Immunol.* **8**, 801 (2017).
261. Van Steenkiste, C. *et al.* Inhibition of placental growth factor activity reduces the severity of fibrosis, inflammation, and portal hypertension in cirrhotic mice. *Hepatology* **53**, 1629–1640 (2011).
262. Li, X. *et al.* Placental growth factor silencing ameliorates liver fibrosis and angiogenesis and inhibits activation of hepatic stellate cells in a murine model of chronic liver disease. *J. Cell. Mol. Med.* **21**, 2370–2385 (2017).
263. Hirsch, K. *et al.* Circulating markers of inflammation and angiogenesis and clinical outcomes across subtypes of pulmonary arterial hypertension. *The Journal of Heart and Lung Transplantation* **42**, 173–182 (2023).
264. Tiede, S. L. *et al.* New potential diagnostic biomarkers for pulmonary hypertension. *Eur Respir J* **46**, 1390–1396 (2015).
265. Kim, M. Y. *et al.* Angiogenic factor imbalance early in pregnancy predicts adverse outcomes in patients with lupus and antiphospholipid antibodies: results of the PROMISSE study. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* **214**, 108.e1–108.e14 (2016).
266. Chappell, L. C. *et al.* Diagnostic Accuracy of Placental Growth Factor in Women With Suspected Preeclampsia: A Prospective Multicenter Study. *Circulation* **128**, 2121–2131 (2013).
267. Chau, K., Hennessy, A. & Makris, A. Placental growth factor and pre-eclampsia. *J Hum Hypertens* **31**, 782–786 (2017).
268. Suzuki, H. *et al.* Effect of Recombinant Placental Growth Factor 2 on Hypertension Induced by Full-Length Mouse Soluble fms-Like Tyrosine Kinase 1 Adenoviral Vector in Pregnant Mice. *Hypertension* **54**, 1129–1135 (2009).
269. Palei, A. C. *et al.* Administration of recombinant human placental growth factor decreases blood pressure in obese hypertensive pregnant rats. *Journal of Hypertension* **38**, 2295–2304 (2020).
270. Zhu, M., Ren, Z., Possomato-Vieira, J. S. & Khalil, R. A. Restoring placental growth factor-soluble fms-like tyrosine kinase-1 balance reverses vascular hyper-reactivity and hypertension in pregnancy. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **311**, R505–R521 (2016).

271. Spradley, F. T. *et al.* Placental Growth Factor Administration Abolishes Placental Ischemia-Induced Hypertension. *Hypertension* **67**, 740–747 (2016).
272. Makris, A. *et al.* Placental Growth Factor Reduces Blood Pressure in a Uteroplacental Ischemia Model of Preeclampsia in Nonhuman Primates. *Hypertension* **67**, 1263–1272 (2016).