

THESE DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITE SORBONNE PARIS CITE
PREPAREE A L'UNIVERSITE PARIS DIDEROT

Ecole doctorale
Hématologie Oncogénèse et Biothérapies (HOB)

UMR 965 Inserm / Carcinose, Angiogénèse et Recherche
Translationnelle

Thèse de doctorat d'Oncogénèse

Par

Chetana LIM

**Microenvironnement et angiogénèse : implications dans la
stratégie onco-chirurgicale des métastases hépatiques synchrones
des cancers colorectaux**

Présentée et soutenue publiquement à Créteil le 12 juin 2017

Composition du Jury :

M, Evrard Serge	Professeur, Université de Bordeaux	Rapporteur
M, Tournigand Christophe	Professeur, Université Paris XII	Rapporteur
M, Soncin Fabrice	Professeur, Université de Lille	Président du Jury
M, Azoulay Daniel	Professeur, Université Paris XII	Examinatrice
Mme, Goere Diane	Docteur, Université Paris-Sud	Examinateur
M, Pocard Marc	Professeur, Université Paris VII	Directeur de thèse

Microenvironnement et angiogénèse : implications dans la stratégie onco-chirurgicale des métastases hépatiques synchrones des cancers colorectaux

Résumé

Lors du diagnostic de cancer colorectal, près d'un quart des patients ont des métastases hépatiques dites synchrones. Lorsque la tumeur primitive est asymptomatique, la stratégie chirurgicale (chirurgie première de la tumeur primitive versus chirurgie première des métastases hépatiques) reste débattue. Les recommandations actuelles ne reposent que sur des accords d'experts qui elles-mêmes sont basées sur des études cliniques rétrospectives.

L'étude du microenvironnement tumoral a pris ces dernières années une place majeure dans la recherche sur le cancer. Elle a permis de changer de *paradigme* avec une nouvelle conception du processus métastatique : une tumeur primitive peut agir sur le microenvironnement du futur site métastatique pour créer une "niche pré-métastatique". Cette niche pré-métastatique permettrait secondairement la croissance des cellules tumorales via une angiogénèse tumorale et la formation de métastases. Par une triple approche à la fois fondamentale, translationnelle et clinique, nous avons obtenu des données qui suggèrent qu'une chirurgie première de la tumeur colique ou rectale permet de moduler l'angiogénèse au sein du microenvironnement hépatique. Cette stratégie chirurgicale permettrait également d'améliorer le pronostic oncologique des malades et l'efficacité des anti-angiogéniques.

Mots clefs : Microenvironnement, niche pré-métastatique, progéniteurs endothéliaux médullaires, angiogénèse, tumeur primitive, métastases hépatiques synchrones, anti-angiogéniques, foie premier.

Microenvironment and angiogenesis: impact on onco-surgical management of synchronous colorectal liver metastases

Abstract

At the time of the diagnosis of colorectal cancer, nearly 25% of patients have synchronous liver metastases. When this tumor is asymptomatic, the question of surgical strategy (primary tumor first versus liver-first strategy) remains debated. Current recommendations are based on agreements of experts which are by themselves based on retrospective clinical studies. The study of the tumor microenvironment has taken in recent years a major place in the field of cancer research. It leads to new *paradigm* with a new conception of the metastatic process. It may be possible that the microenvironment of the metastatic sites can be modulated by the primary tumor to promote the formation of the pre-“metastatic niche”. This leads to promote the growth of cancer cells and increase the metastatic potential of primary tumor. By a multidisciplinary research including fundamental, translational and clinical approaches, we have shown that primary tumor first strategy could modulate tumor angiogenesis and liver metastatic process. It is associated with improved survival of patients and efficacy of the anti-angiogenic therapy.

Keywords: Microenvironment, pre-metastatic niche, bone marrow-derived endothelial progenitor cells, angiogenesis, synchronous liver metastases, anti-angiogenic, liver-first strategy.

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Daniel Azoulay,

Vous me faites l'honneur de participer à ce jury de thèse ; soyez-en ici remercié et assuré de ma plus grande reconnaissance. Je vous remercie pour votre inestimable aide à ma formation pratique, votre état d'esprit et votre vision innovante et futuriste de la chirurgie.

A mon directeur de Thèse,

A monsieur le Professeur Marc Pocard,

Vous me faites l'honneur de diriger cette thèse. Merci de m'avoir appris à « écrire ». Merci pour votre disponibilité, enthousiasme et vos précieux conseils. Recevez ma sincère reconnaissance et ma profonde sympathie.

Aux membres du Jury,

Mes remerciements vont au Professeur Evrard et au Professeur Tournigand qui m'ont fait l'honneur d'être les rapporteurs de cette thèse, ainsi qu'au Professeur Goéré et au Professeur Soncin qui sont les examinateurs de cette thèse.

Je tiens à remercier les Docteurs Dong Broqueres-You et Tatiana Merkulova-Rainon de l'Institut des Vaisseaux et du Sang.

Un grand merci aux Docteurs Fetemeh Valamesh, Jean Philippe Brouland, Philippe Bonnin, Martine Applanat et Rose Hilal de l'Unité INSERM U965.

Je remercie le Docteur Julien Calderaro du service d'Anatomopathologie de l'Hôpital Henri Mondor.

Je remercie le Docteur Anne-Marie Faussat de la Plateforme Cytométrie de l'Hôpital Saint-Antoine.

Je remercie tout particulièrement Christine Gousse et Yves Millet de l'Unité INSERM U 965.

LISTE DES PUBLICATIONS EN LIEN AVEC LA THESE

Articles originaux

- Bevacizumab improves survival in patients with resected synchronous colorectal liver metastases. **Lim C**, Salloum C, Doussot A, Osseis M, Compagnon P, Tournigand C, Calderaro J, Azoulay D (soumis à Journal of Surgical Research).
- Primary tumor versus liver-first strategy for stage IVA colo-rectal cancer. A propensity score analysis on long-term outcomes and recurrence pattern. **Lim C**, Doussot A, GomezGavara C, Salloum C, Compagnon P, Brunetti F, Calderaro J, Azoulay D. Annals of Surgical Oncology 2016.
- Hepatic ischemia-reperfusion increases circulating bone marrow-derived progenitor cells and tumour growth in a mouse model of colorectal liver metastases. **Lim C**, Broqueres-You D, Brouland J-P, Merkulova-Rainon T, Faussat A-M, Hilal R, Rouquie D, Eveno C, Audollent R, Levy B.I, Pocard M. Journal of Surgical Research 2013.

Revues systématiques

- Tumour progression and liver regeneration- Insight from animal models. **Lim C**, Cauchy F, Azoulay D, Farges O, Ronot M, Pocard M. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology 2013.
- Microenvironnement et angiogénèse des métastases hépatiques d'origine colorectale: incidences chirurgicales. **Lim C**, Eveno C, Pocard M. Bulletin du Cancer 2013.

Correspondances

- Bone marrow cell therapy and liver regeneration: the potential clinical caveat. **Lim C**, Broqueres-You D, Pocard M. Digestive Diseases and Sciences 2015.
- Ischemia-reperfusion injury and regrowth of liver cancers: to clamp or not to clamp? **Lim C**, Azoulay D. Digestive Diseases and Sciences 2014.
- Infusion of CD133+ Bone Marrow-Derived Stem Cell (BMSC) after selective portal vein embolization enhances functional hepatic reserves after extended right hepatectomy. **Lim C**, Audollent R, Pocard M, Azoulay D. Annals of Surgery 2013.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS	10
TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	11
1. PREAMBULE	12
2. INTRODUCTION	17
2.1. Le processus métastatique	18
2.2. L'angiogénèse tumorale	19
2.3. Pourquoi cibler l'angiogénèse dans le cancer colorectal métastatique?	19
2.4. Qu'est-ce que le microenvironnement tumoral?	20
2.5. Quel rôle pour le microenvironnement dans l'angiogénèse tumorale?.....	21
3. PRESENTATION DU PROJET DE RECHERCHE	25
3.1. Hypothèse	26
3.2. Déroulement du projet	26
4. MATERIELS ET METHODES.....	28
4.1. Méthodologie <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>	29
4.1.1. Cellules et cultures	29
4.1.2. Expérimentation animale.....	30
4.1.3. Modèles murins de tumeurs.....	31
4.1.4. Modèles murins de libération des progéniteurs endothéliaux dans le sang.....	32
4.1.5. Cytométrie en flux	34
4.1.6. Immunohistochimie	36
4.2. Méthodologie clinique	39

5. RESULTATS ET DISCUSSION.....	40
5.1. Microenvironnement tumoral et potentiel métastatique.....	41
5.1.1. Résumé	41
5.1.2. ARTICLE 1: La mobilisation des progéniteurs endothéliaux médullaires dans le sang induite par une ischémie augmente la croissance tumorale et l'angiogénèse dans un modèle murin de métastases hépatiques.....	44
5.1.3. ARTICLE 2: L'administration de progéniteurs endothéliaux médullaires augmente la croissance tumorale dans les modèles murins de carcinose péritonéale et de tumeur sous-cutanée	54
5.1.4. RESULTATS NON PUBLIES N°1: Les progéniteurs médullaires mobilisés dans le sang vont se localiser dans le foie: validation du concept de niche pré-métastatique.....	57
5.2. Résection de la tumeur colorectale et angiogénèse des métastases hépatiques	62
5.2.1. Objectif.....	62
5.2.2. Matériels et méthodes.....	62
5.2.3. Résultats non publiés N°2	63
5.2.3. Discussion.....	65
5.3. Exérèse première de la tumeur colorectale et survies globale et sans récurrence.....	66
5.3.1. Résumé	65
5.3.2. ARTICLE 3: La résection première des métastases hépatiques dans les cancers colorectaux stade IVA est associée à une récurrence précoce des métastases extra-hépatiques.....	68
5.4. Exérèse première de la tumeur colorectale et efficacité du Bevacizumab	78
5.4.1. Résumé	78
5.4.2. ARTICLE 4: La chirurgie première de la tumeur primitive est associée à une augmentation de l'efficacité du Bevacizumab et de la survie dans les cancers colorectaux stade IVA	80
6. SYNTHESE ET CONCLUSION	103

7. PERSPECTIVES	109
8. BIBLIOGRAPHIE	110
9. ANNEXES	115

LISTE DES ABRÉVIATIONS

UICC : Union Internationale contre le Cancer

INSERM: Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

VEGFR: Receptors for Vascular Endothelial Growth Factor

NK: Natural Killer

PIGF: Phosphatidylinositol-glycan biosynthesis class F

VLA-4: Very Late Antigen-4

MMP9: Metalloproteinase matricielle 9

DMSO: Diméthylsulfoxyde

RPMI: Roswell Park Memorial Institute Medium

EDTA: Éthylène Diamine Tétra-Acétique

DAB: 3-3' diaminobenzidine

SDF-1 α : Stromal cell-derived factor 1

G-CSF : Facteur de croissance granulocytaire

SRY: Sex-determining Region of Y chromosome

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1. Le processus métastatique.

Figure 2. Le microenvironnement tumoral.

Figure 3. Un modèle d'évolution de la niche pré-métastatique.

Figure 4. Modèle de métastases hépatiques par injection intra-splénique de cellules CT-26.

Figure 5. Modèle d'ischémie-reperfusion hépatique par clampage total du pédicule hépatique.

Figure 6. Modèle d'ischémie de patte par ligature de l'artère fémorale.

Figure 7. Stratégie de détection des cellules progénitrices CD34+, des progéniteurs endothéliaux CD34+/VEGFR2+ et des cellules progénitrices hématopoïétiques CD34+/CD45+.

Figure 8. Evaluation semi-quantitative du marquage immunohistochimique au CD31.

Figure 9. Evaluation semi-quantitative du marquage immunohistochimique au VEGF.

Figure 10. Protocole pour évaluer l'histoire naturelle des métastases hépatiques après injection intra-splénique de cellules CT-26.

Figure 11. Histoire naturelle des métastases dans notre modèle.

Figure 12. Modèle de parabiose chez la souris.

Figure 13. Les progéniteurs endothéliaux mobilisés dans la circulation sanguine par la ligature de l'artère fémorale vont se localiser précocement dans le foie des souris ayant reçu l'injection intra-splénique de CT-26.

Figure 14. Les progéniteurs endothéliaux mobilisés dans la circulation sanguine par la ligature de l'artère fémorale vont se localiser précocement dans le foie des souris ayant reçu l'injection intra-splénique de CT-26.

Figure 15. Analyse en immunohistochimie montrant la présence de cellules de souris males "ischémie de patte" dans le foie de souris femelles "métastase hépatique".

Figure 16. Densité micro-vasculaire par immunohistochimie dans les métastases hépatiques.

Figure 17. Analyse de la densité micro-vasculaire par immunohistochimie dans les métastases hépatiques réséquées selon que la tumeur primitive est en place ou pas.

1. PREAMBULE

Le foie est le premier site métastatique des cancers colorectaux en raison de sa place anatomique dans le drainage veineux du côlon et du rectum. Lors du diagnostic de cancer colorectal, près d'un quart des patients ont des métastases hépatiques dites synchrones. La présence de métastases hépatiques fait classer ces patients en M+ de la classification TNM et au stade IVA de la classification de l'UICC. Lorsque la tumeur primitive est asymptomatique et les métastases hépatiques synchrones sont jugées résécables, la stratégie chirurgicale quant à l'ordre dans lequel opérer la tumeur primitive et les lésions hépatiques reste débattue. Faut-il réaliser une chirurgie première de la tumeur primitive (stratégie « *primitif premier* ») ou plutôt privilégier l'inverse à savoir une exérèse chirurgicale des métastases hépatiques avant une chirurgie du primitif (stratégie « *foie premier* ») ? Seule une étude randomisée, qui n'existe pas à l'heure actuelle, pourrait répondre à cette question. Cette dernière dépasse largement le cadre du cancer colorectal puisqu'elle intéresse toute la cancérologie des tumeurs solides ^{1,2}.

Les stratégies chirurgicales varient d'un centre expert à un autre : d'une chirurgie combinée en un temps (exérèse simultanée de la tumeur colique ou rectale et des métastases hépatiques) à une chirurgie séquentielle en deux temps. En cas de chirurgie séquentielle, là encore l'intérêt de commencer par une chirurgie de la tumeur primitive ou par une chirurgie des métastases hépatiques est controversé.

Dans le cadre de cette thèse de science, nous n'aborderons pas le sujet de la chirurgie combinée. Les risques élevés de morbidité et de mortalité postopératoires ne doivent faire envisager son indication que chez des malades très sélectionnés, à savoir des malades plutôt jeunes que âgés, porteurs d'une tumeur plutôt colique que rectale et avec des métastases résécables au prix d'une hépatectomie mineure ³⁻⁶. Bien que le mécanisme ne soit pas clairement établi, cette stratégie de résection combinée semble être associée à une diminution de la survie sans progression ⁶.

Dans le cadre d'une chirurgie séquentielle en deux temps, la stratégie proposée par certaines équipes était de réaliser la résection première de la tumeur primitive pour prévenir le risque de complications liées à la tumeur primitive laissée en place sous chimiothérapie telles qu'une hémorragie, une perforation ou une occlusion ⁷⁻⁹. A l'inverse, d'autres équipes privilégient une chirurgie première des métastases hépatiques argumentant que d'une part le pronostic oncologique serait plutôt conditionné par la maladie métastatique plutôt que par la tumeur primitive elle-même ¹⁰.

Actuellement dans les dernières recommandations du Thésaurus National de Cancérologie Digestive, pour les patients avec un cancer colorectal stade IVA, il est mentionné que *la stratégie « foie premier » (chirurgie hépatique première éventuellement précédée de chimiothérapie et colectomie secondaire) peut être envisagée lorsque la tumeur primitive n'est pas symptomatique*. Cette recommandation est faite après un accord entre experts. Cependant en pratique, les deux attitudes sont possibles et il n'existe aucun rationnel scientifique pour privilégier l'une ou l'autre stratégie. L'impact de la stratégie chirurgicale (« primitif premier » versus « foie premier ») a été évalué au travers de nombreuses études. Ces études sont rétrospectives, souvent monocentriques, et comparent des patients qui reçoivent différents protocoles de chimiothérapie et qui ont une maladie métastatique différente les uns des autres (**Article 1**)¹¹⁻¹⁶. Elles montrent que la survie globale et la survie sans progression étaient comparables entre ces deux stratégies, à condition que les patients aillent au bout de la stratégie chirurgicale. En dépit de leurs limites, deux études ont suggéré que la survie sans progression était meilleure après une stratégie « primitif premier » qu'après une stratégie « foie premier »^{15, 16}.

Ce bénéfice en termes de survie sans progression observé après une stratégie « primitif premier » soulève quelques questions mécanistiques. Quel est le rôle d'une chirurgie première de la tumeur primitive ? Est-ce la diminution de sa masse tumorale elle-même qui influence le potentiel métastatique d'une tumeur colorectale donnée?

Les travaux réalisés sur le microenvironnement tumoral au cours de ces dernières années ont démontré que le processus métastatique était bien plus complexe que prévu. Il est désormais prouvé que le potentiel métastatique d'un cancer primitif est déterminé non seulement par le génotype des cellules tumorales mais aussi par des interactions entre les cellules tumorales et son environnement. Il ne s'agit pas dans ce travail de décrire le rôle du microenvironnement tumoral dans les différentes étapes de la cancérogénèse^{17, 18} mais de proposer une hypothèse mécanistique et un rationnel scientifique centré le microenvironnement tumoral dans le débat qui oppose la stratégie « primitif premier » à la stratégie « foie premier ».

Il se trouve que l'angiogénèse et le microenvironnement tumoral sont les thématiques prédominantes du laboratoire Unité INSERM U965 de l'hôpital Lariboisière dans lequel j'ai réalisé cette thèse de science. Nous avons par conséquent fait l'hypothèse que l'amélioration de la survie sans progression après une stratégie « primitif premier » pourrait être attribué au rôle central de la tumeur primitive dans le développement d'un microenvironnement hépatique et d'une vascularisation importante favorables à la croissance des métastases

hépatiques. Le corolaire clinique de cette hypothèse, si elle est vérifiée, est qu'une exérèse chirurgicale de la tumeur primitive supprimerait toute cette voie de signalisation entre la tumeur primitive, l'angiogénèse tumorale et le microenvironnement hépatique. Notre hypothèse de travail est détaillée dans une mise au point publiée dans le journal *Bulletin du Cancer* (**Annexe 1**)¹⁹.

Il est important de citer deux papiers majeurs qui ont été une sorte de « fil rouge » pour ce travail. Le premier papier a été publié en 2005 par Kaplan et al. dans *Nature* ²⁰. Dans ce travail expérimental réalisé chez la souris, les auteurs ont montré que le microenvironnement du futur site métastatique pouvait être modifié à distance par la tumeur initiale. Le concept de « niche pré-métastatique » a été introduit pour la première fois par ce travail. Les cellules tumorales sécrètent du VEGF-A favorisant l'activation, la mobilisation et le recrutement local de cellules hématopoïétiques progénitrices provenant de la moelle osseuse. L'entrée des cellules hématopoïétiques progénitrices dans la circulation sanguine et leur migration vers les sites métastatiques précéderait l'arrivée des cellules tumorales. L'envahissement du stroma par les cellules hématopoïétiques progénitrices serait responsable d'une activation locale du stroma, qui serait alors responsable du recrutement secondaire de cellules tumorales circulantes transformant la niche pré-métastatique en une micro-métastase. Enfin les cellules endothéliales progénitrices dérivées de la moelle osseuse sont recrutées pour contribuer à l'établissement d'une micro-vascularisation de la future lésion métastatique. Le deuxième papier a été publié en 2013 par Van der Waal et al. dans *Annals of Surgery* ²¹. Dans ce travail translationnel, les auteurs ont montré qu'en présence d'une tumeur colique ou rectale, le parenchyme hépatique en périphérie des métastases était un parenchyme propice à l'angiogénèse. Il s'agit du premier papier translationnel qui introduit la notion de relation entre une tumeur colorectale et l'angiogénèse hépatique.

Ce travail de thèse a été divisé en trois parties : expérimentale, translationnelle et clinique. Les travaux menés dans le laboratoire ont été en partie consacrés à la mise au point d'un modèle murin de métastases hépatiques d'origine colique permettant de mimer les interactions entre le microenvironnement tumoral hépatique et les métastases hépatiques. Sachant d'une part que la phase de croissance d'une tumeur et son processus de dissémination métastatique sont largement dépendants de la formation de nouveaux vaisseaux (angiogénèse tumorale) et d'autre part que le mécanisme d'angiogénèse tumorale implique la participation de cellules endothéliales progénitrices dérivées de la moelle osseuse, un effort important a été fourni au cours de ce travail expérimental pour isoler, caractériser et quantifier la présence de

progéniteurs endothéliaux médullaires circulants dans notre modèle murin de métastases hépatiques. Le modèle choisi pour obtenir une libération de ces progéniteurs endothéliaux était un modèle murin d'ischémie de patte par ligature de l'artère fémorale et d'ischémie hépatique par clampage de la veine porte. Compte tenu du nombre de modèles animaux utilisés, de la complexité de certains protocoles expérimentaux, et pour rendre la lecture de cette travail plus simple, un paragraphe résumant les principaux modèles animaux a été volontairement simplifié et le détail des différents protocoles figurent dans les résultats des articles ou données non publiées.

2. INTRODUCTION

2.1. Le processus métastatique

Le processus métastatique est la dissémination de cellules tumorales à partir d'une tumeur initiale vers des organes à distance, conduisant à la formation de métastases. Les métastases représentent la principale cause de mortalité en cancérologie. Le processus métastatique résulte d'étapes multiples, progressives et aujourd'hui bien caractérisées (**Figure 1**): dans la tumeur initiale (prolifération, et invasion locale), dans la circulation sanguine (intravasation, circulation des cellules tumorales, reconnaissance de l'organe hôte, et adhésion), et dans les organes à distance (extravasation, invasion du tissu, et croissance secondaire des cellules tumorales disséminées). Parmi ces étapes, l'angiogénèse est un mécanisme indispensable non seulement à la croissance tumorale, mais aussi au développement de la métastase ²². Les mécanismes du processus métastatique ne s'excluent probablement pas les uns des autres. Le processus métastatique est à la fois dépendant des propriétés intrinsèques de la cellule tumorale, qui est le facteur déterminant principal, mais aussi de facteurs extrinsèques tels que le microenvironnement tumoral de la tumeur initiale et des sites métastatiques.

Figure 1. Le processus métastatique. Exemple de la métastase osseuse. Adapté de Mundy G.R., Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities. Nature Reviews Cancer 2002(12).

2.2. L'angiogénèse tumorale

Comme pour la majorité des tumeurs solides, la phase de croissance d'une tumeur colorectale et son processus de dissémination métastatique sont largement dépendants de la formation de nouveaux vaisseaux (angiogénèse tumorale), sans laquelle les cellules tumorales demeurent à l'état de cellules dormantes, état stable intermédiaire entre la prolifération et l'apoptose. Ces nouveaux vaisseaux tumoraux assurent les apports en nutriments, oxygène et facteurs de croissance indispensables à la croissance de la tumeur primitive, mais aussi de sa dissémination.

L'initiation de l'angiogénèse tumorale serait sous la dépendance d'un *switch* angiogénique, secondaire à la sécrétion par les cellules tumorales de facteurs pro-angiogéniques. Cette sécrétion se fait en réponse à l'hypoxie tissulaire et est liée à des modifications génétiques au sein du génome des cellules tumorales ²³. Le processus d'angiogénèse se fait par deux mécanismes, le premier mécanisme est un bourgeonnement des vaisseaux sanguins pré-existants (sprouting) et le deuxième mécanisme implique le recrutement et l'incorporation de cellules endothéliales dans les vaisseaux en formation. Parmi les facteurs angiogéniques identifiés, le vascular endothelial growth factor (VEGF) est le régulateur clé de l'angiogénèse tumorale. Cette glycoprotéine exprimée de façon dérégulée par les cellules tumorales, *via* sa fixation, active deux récepteurs VEGFR1 et VEGFR2. L'activation de cette voie de signalisation VEGF-dépendante est un élément favorisant la migration, la survie et la prolifération des cellules endothéliales, l'induction de protéinases conduisant à un remodelage de la matrice extracellulaire, l'augmentation de la perméabilité vasculaire et le maintien de la survie des vaisseaux néoformés. L'administration d'anticorps anti-VEGF dans des modèles animaux de xénogreffes de tumeurs colorectales humaines semble inhiber la croissance tumorale ²⁴.

2.3. Pourquoi cibler l'angiogénèse dans le cancer colorectal métastatique?

La croissance des cancers colorectaux s'associe à l'expression accrue de facteurs pro-angiogéniques, il a été ainsi montré qu'une surexpression du VEGF était retrouvée dans 37 à 100 % des cas ²⁵. Cette surexpression est corrélée d'une part à l'invasion cellulaire et à la densité vasculaire, et d'autre part au développement des métastases et au pronostic oncologiques des malades ²⁶⁻²⁹. L'expression du VEGF semblerait fréquemment corrélée aux

mutations de *RAS*, aux mutations de la voie de signalisation APC-WNT, ainsi qu'à la surexpression de la cyclo-oxygénase 2, qui sont des anomalies fréquemment rapportées dans le cancer colorectal ³⁰⁻³². Une association significative entre la densité micro-vasculaire tumorale et les taux de récurrence tumorale a été également rapportée ³³⁻³⁵. Sur la base de ces données, il existe donc un rationnel à cibler l'angiogénèse dans le cancer colorectal. L'utilisation d'anti-angiogénique en association à une chimiothérapie cytotoxique a permis d'améliorer la médiane de survie à plus de 24 mois, faisant du Bevacizumab (anticorps anti-VEGF) le traitement standard en première ligne du cancer colorectal métastatique ³⁶⁻⁴⁰. Par ailleurs, l'utilisation du Bevacizumab a également permis d'amener certains patients ayant des métastases hépatiques jugées comme initialement non résecables à la résection chirurgicale (on parle de résecabilité secondaire) avec un bénéfice en termes de survie globale.

2.4. Qu'est-ce le microenvironnement tumoral?

Si les facteurs génétiques sont importants pour déterminer le caractère invasif et le potentiel de dissémination métastatique d'un cancer primitif, il n'en reste pas moins que tous les éléments extérieurs à la cellule tumorale, qui composent le microenvironnement tumoral sont importants pour permettre aux cellules tumorales de croître.

Dans le tissu tumoral, on trouve deux composantes : les cellules tumorales et le stroma. Le stroma est un tissu non tumoral provenant de l'hôte. Sa formation est induite par la présence de cellules cancéreuses. Il se compose de structures conjonctives, vasculaires et de cellules immunitaires, et représente le tissu nourricier de soutien des cellules tumorales. On le trouve dans tous les types de cancers primitifs solides, et il est aussi bien présent au sein de la tumeur primitive que dans les sites métastatiques ⁴¹.

Le stroma est schématiquement constitué (**Figure 2**) : (1) d'une matrice extra-cellulaire, composée d'un réseau de protéines et de protéoglycanes dont le rôle est d'assurer la cohésion, la migration et la différenciation cellulaires. Elle contient la matrice interstitielle (cellules mésenchymateuses) dont les collagènes, l'élastine, la fibronectine et les glycoaminoglycanes; et la membrane basale (cellules épithéliales) constituée par le collagène IV et la laminine, ; (2) de nouveaux vaisseaux formés au cours de l'angiogénèse tumorale ; (3) de fibroblastes, d'adipocytes, et de vaisseaux lymphatiques ; (4) de cellules de l'immunité et diverses cellules: lymphocytes, cellules NK, plasmocytes, histiocytes, polynucléaires neutrophiles,

polynucléaires éosinophiles, macrophages et (5) de cellules endothéliales matures et progénitrices dérivées de la moelle osseuse.

Figure 2. Le microenvironnement tumoral. Adapté de Joyce J.A et Pollard J.W., Microenvironmental regulation of metastasis. Nature Reviews Cancer 2009 (31).

2.5. Quel rôle pour le microenvironnement dans l'angiogénèse tumorale?

Progéniteurs endothéliaux médullaires, angiogénèse tumorale et progression tumorale

L'angiogénèse physiologique et tumorale, chez l'adulte, a longtemps été considérée comme un processus local et exclusivement assuré par le bourgeonnement des vaisseaux pré-existants, résultant de la prolifération et de la migration des cellules endothéliales matures. Deux publications ont démontré pour la première fois que la vasculogénèse physiologique pourrait être le résultat de la différenciation et de l'incorporation fonctionnelle de cellules endothéliales progénitrices (ou progéniteurs endothéliaux), originaires de la moelle osseuse ⁴², ⁴³; concept qui était auparavant exclusivement lié à l'embryogenèse. D'autres progéniteurs

médullaires, tels que des cellules hématopoïétiques progénitrices (ou progéniteurs hématopoïétiques) sont recrutés en même temps que les progéniteurs endothéliaux et contribuent également au processus de vasculogénèse.

C'est en 2001, suite aux travaux expérimentaux de Lyden *et al.* sur la souris, qu'il a été montré pour la première fois que des progéniteurs endothéliaux dérivés de la moelle osseuse pouvaient contribuer à la néo-angiogénèse tumorale ⁴⁴. Depuis ces premières observations, les progéniteurs endothéliaux, aujourd'hui bien caractérisées pour leur rôle dans la réparation des parois vasculaires et la néo-angiogénèse post-ischémique, sont largement explorées pour leur rôle dans la néo-angiogénèse tumorale, dans la croissance tumorale et dans le développement des métastases. Néanmoins, le rôle exact de ces progéniteurs endothéliaux circulants dans le processus de néo-angiogénèse tumorale reste encore à élucider. Dans les modèles expérimentaux d'angiogénèse tumorale, 5 à 50 % des progéniteurs endothéliaux dérivées de la moelle osseuse sont retrouvés dans la paroi des néo-vaisseaux tumoraux ⁴⁵. A l'inverse seulement 5 % de ces progéniteurs sont retrouvés chez des patients atteints de cancer du poumon ou ayant développé des cancers secondaires ^{46, 47}. Les études sur la valeur pronostique des progéniteurs endothéliaux et des cellules endothéliales matures circulantes sont nombreuses dans le cancer du sein ⁴⁸⁻⁵⁰. Dans le cancer colorectal en situation métastatique, il a été rapporté une corrélation entre un taux élevé de progéniteurs endothéliaux ou de cellules endothéliales matures circulantes et la réponse tumorale après Bevacizumab ⁵¹⁻⁵³. Les résultats de toutes ces études sont difficiles à interpréter, du fait de l'absence de standardisation des méthodes de détection. De plus, ces progéniteurs endothéliaux sont difficiles à doser dans le sang car ils ne représentent que 0,01 à 0,0001 % de l'ensemble des cellules mononuclées du sang ⁵⁴. Enfin, le taux de progéniteurs endothéliaux circulants pourrait varier selon le type, le grade et la localisation de la tumeur ⁵⁵.

En résumé, les données expérimentales suggèrent que les progéniteurs endothéliaux dérivés de la moelle osseuse pourraient contribuer directement à l'angiogénèse tumorale et indirectement à la progression métastatique. Toutefois, l'hétérogénéité des résultats souligne l'absence de standardisation des méthodes de détection et la possibilité que leur influence diffère d'un cancer à un autre.

Progéniteurs endothéliaux et niche pré-métastatique

Des travaux récents chez la souris ont montré que le microenvironnement du futur site métastatique pourrait être modifié à distance par la tumeur initiale ^{20, 56}. La formation d'une «

niche pré-métastatique » par la tumeur primitive rendrait le microenvironnement de l'organe cible propice et favorable au développement des métastases (**Figure 3**)⁵⁷. Cela confirme la théorie ancienne de la graine et du sol proposée par Stephen Paget en 1889. Les cellules tumorales du cancer primitif sécrètent du VEGF-A favorisant l'activation, la mobilisation et le recrutement local de progéniteurs hématopoïétiques provenant de la moelle osseuse. L'entrée des progéniteurs hématopoïétiques dans la circulation sanguine et leur migration vers les sites métastatiques précéderait l'arrivée des cellules tumorales (**Figure 3A**). Les progéniteurs hématopoïétiques exprimant à leur surface le VEGFR1+ circuleraient dans le sang et se dirigeraient dans les stromas péri-vasculaires riches en fibronectine, la fibronectine étant synthétisée par les fibroblastes qui sont localisés dans les régions sous-capsulaires des organes ou par des fibroblastes-like elles-mêmes stimulées par le PIGF sécrété aussi par la tumeur initiale. Les progéniteurs hématopoïétiques expriment à la fois une intégrine VLA-4 leur permettant d'adhérer à la fibronectine, mais aussi une métalloprotéinase dégradant la membrane basale, ce qui permet d'accroître l'extravasation des progéniteurs hématopoïétiques dans la niche pré-métastatique (**Figure 3B**). À ce stade, l'envahissement du stroma par les progéniteurs hématopoïétiques serait responsable d'une activation locale du stroma, qui serait alors responsable du recrutement secondaire des cellules tumorales circulantes, la niche pré-métastatique devient alors une micro-métastase (**Figure 3C**). Enfin, les progéniteurs endothéliaux médullaires (exprimant le VEGFR2+) sont recrutés pour contribuer à l'établissement d'une micro-vascularisation de la future lésion métastatique et la progression des micro-métastases en métastases macroscopiquement décelables (**Figure 3D**). Ces données ont été corroborées par une autre étude qui a montré que l'inhibition pharmacologique de VEGFR1+ et VEGFR2 (récepteurs exprimés à la surface des progéniteurs hématopoïétiques et endothéliaux) semble inhiber la formation de micro- et macro-métastases⁴⁴, suggérant que le processus de mobilisation des progéniteurs médullaires pourrait être un facteur-clé de la néo-angiogénèse tumorale et du processus métastatique. Depuis ces premières observations, d'autres mécanismes de formation de la niche pré-métastatique ont été décrits, faisant intervenir d'autres composantes cellulaires et moléculaires du microenvironnement tumoral: (i) le recrutement de macrophages et la sécrétion locale de MMP9 seraient aussi un facteur favorisant le recrutement des cellules tumorales dans le poumon⁵⁸ ou (ii) le recrutement de cellules myéloïdes Mac1+ et la sécrétion locale de S100A8 et S100A9 par les cellules stromales⁵⁹

En résumé, il existe des données issues de modèles pré-cliniques qui suggèrent que le microenvironnement du futur site métastatique pourrait être modifié à distance par la tumeur initiale. La formation d'une niche pré-métastatique serait alors le facteur clé du recrutement et de l'implantation des cellules tumorales métastatiques. Toutefois, ces modèles ont des limites. Ce sont des modèles tumoraux qui sont hétérotopiques (greffes sous-cutanées de cellules de cancer du poumon) et qui nécessitent des injections de cellules tumorales syngéniques sur des animaux au système immunitaire déficient, ce qui devient discutable dès lors qu'il existe actuellement des données qui montrent l'influence de l'immunité anti-tumorale dans la cancérogenèse ¹⁸.

Figure 3. Un modèle d'évolution de la niche pré-métastatique. Exemple de la métastase pulmonaire. Adapté de Psaila B. et Lyden D., The metastatic niche: adapting the foreign soil. Nature Reviews Cancer 2009 (47).

3. PRESENTATION DU PROJET DE RECHERCHE

31 Hypothèse

Sachant que le caractère invasif et le potentiel métastatique d'un cancer colorectal sont principalement déterminés par le génotype des cellules tumorales, l'hypothèse que nous avons formulée pour cette thèse de science reposait sur la possibilité que le pouvoir de dissémination métastatique de la tumeur initiale soit également déterminé par la présence d'un microenvironnement tumoral généré par la tumeur initiale elle-même. Les interactions entre la tumeur initiale et le microenvironnement tumoral situé au sein du parenchyme hépatique seraient alors responsable d'une augmentation de l'angiogénèse tumorale et de la croissance des métastases microscopiques en métastases hépatiques macroscopiquement décelables en imagerie.

L'implication clinique de cette hypothèse, si elle est vérifiée, serait de privilégier une chirurgie d'exérèse première de la tumeur colique ou rectale en cas métastases hépatiques synchrones pour réduire les interactions entre la tumeur colorectale et le microenvironnement hépatique. Notre hypothèse de travail est détaillée dans une mise au point publiée dans le journal *Bulletin du Cancer* (**Annexe 1**)¹⁹. Par une approche à la fois fondamentale, translationnelle et clinique, nous avons exploré ce rationnel scientifique.

32 Déroulement du projet

Le projet de recherche est divisé en trois parties : (1) la première partie est un travail de recherche expérimentale réalisé dans le laboratoire du Pr Marc Pocard à l'Hôpital Lariboisière. J'ai réalisé toutes les expérimentations animales et *in vitro* sous la supervision du Pr Marc Pocard et du Dr Dong Broqueres-You (Institut des vaisseaux et du sang - Hôpital Lariboisière). Le passage des tubes en cytométrie en flux a été réalisé dans l'unité du Dr Anne-Marie Faussat (Plateforme cytométrie - Hôpital Saint-Antoine). L'inclusion en paraffine, le marquage immunohistochimique et l'analyse des lames des foies de souris ont été réalisés en collaboration avec le Dr Jean-Philippe Brouland (Service d'anatomopathologie - Hôpital Lariboisière) ; (2) la deuxième partie est un travail de recherche translationnelle dont les hypothèses de travail et la méthodologie ont été développées sous la supervision du Pr Marc Pocard (Hôpital Lariboisière) et du Pr Daniel Azoulay (Hôpital Henri Mondor). L'inclusion, le marquage immunohistochimique et l'analyse des lames des foies de patients opérés de métastases hépatiques d'origine colorectale à l'hôpital Henri Mondor ont été réalisés par le Dr Julien Calderaro (Hôpital Henri Mondor) ; et (3) la troisième partie est un

travail de recherche clinique réalisé sous la supervision du Pr Daniel Azoulay, portant sur la cohorte de patients opérés de métastases hépatiques d'origine colorectale à l'hôpital Henri Mondor.

4. MATERIELS ET METHODES

4L Méthod olog ie *in vitr o* et *in vivo*

Toutes les expérimentations décrites et les photos prises dans ce travail ont été réalisées par l'étudiant. L'analyse statistique a été réalisée avec le logiciel GraphPad Prism.

4.1.1. Cellules et cultures

La lignée CT-26 [CRL-2638; American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA] est issue d'un adénocarcinome colique de souris immunocompétentes BALB/c traitées par le N-nitroso-N-méthylurethane. Cette lignée est régulièrement utilisée au sein de notre laboratoire. Les cellules initialement conservées dans un milieu de congélation (DMSO) sont plongées dans un bain marie à 37°C. Les cellules sont lavées avec du milieu de culture RPMI 1640 supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal, des antibiotiques (Pénicilline et Streptomycine) et un antifongique (Fungizone) afin d'éliminer le DMSO. Les cellules sont cultivées en monocouches dans des flasques, et placées dans un incubateur à 37°C (5% CO₂ et 95% d'air) et à saturation en humidité. Le milieu est renouvelé tous les deux jours. Après 5 à 7 jours d'incubation, les cellules sont confluentes.

A confluence, les cellules sont lavées une fois au PBS et placées en contact avec de la trypsine-EDTA 0,25% à 37°C pendant 5 minutes. L'action de la digestion de la trypsine est arrêtée grâce à l'ajout du milieu de culture. La suspension cellulaire est recueillie dans des tubes coniques puis centrifugée à 300 g pendant 6 minutes. Les cellules sont alors remises en suspension dans du milieu de culture et déposées dans des flasques de culture. Les cellules au troisième et quatrième passage sont utilisées pour les expériences *in vivo*. Le reste de la suspension cellulaire est suspendu dans du milieu de congélation à la concentration d'environ 5×10^6 cellules/ml et réparti dans des cryotubes pour être conservées à -180°C dans de l'azote liquide.

Avant utilisation, les cellules sont lavées et dissociées par la trypsine-EDTA. Les cellules sont re-suspendues dans une solution contenant du RPMI et 10 % de sérum de veau fœtal. Après contrôle de leur viabilité au bleu de Trypan, les cellules tumorales CT-26 sont injectées à la concentration de 10^6 cellules/100 µl, en intra-splénique pour le modèle de métastase hépatique, en intra-péritonéale pour le modèle de carcinose péritonéale, et en sous cutanée pour le modèle de tumeur sous-cutanée.

4.1.2. Expérimentation animale

Toutes les expérimentations ont été réalisées selon le respect des règles éthiques en vigueur en Europe (décret n° 2001-131 du 6 février 2001, liées à la directive européenne 86-609-CEE de 1986) et la charte nationale portant sur l'éthique de l'expérimentation animale établie en 2008 (www.enseignementsup-recherche.gouv.fr). Les animaux (souris immunocompétentes BALB/c femelles âgées de 5 semaines et pesant $20 \pm 0,5$ g) d'origine contrôlés (Charles River, Arbresle, France), ont été hébergés dans une animalerie rattachée au laboratoire et agréée par le ministère de l'Agriculture et la Pêche sous couvert de la Direction départementale des services vétérinaires, et dont les contrôles sanitaires ont permis de valider la présence de souris EOPS (Exempts d'Organismes Pathogènes Spécifiques) avec en particulier l'absence de virus de l'Hépatite murine. Les animaux ont été acclimatés pendant une semaine avant toute expérimentation. Nourriture et eau sont fournies *ad libitum*. L'animalerie est climatisée avec une alternance de lumière/obscurité selon le cycle nyctéméral. Toutes les expérimentations ont été réalisées sous la responsabilité du Pr Marc Pocard (autorisation avec chirurgie n° 75-1229 du 15/11/2006). Toutes les précautions nécessaires ont été prises pour éviter la souffrance et la douleur de l'animal au cours des expérimentations.

L'induction de l'anesthésie est réalisée, via une inhalation d'isoflurane (Baxter) à 4% avec un débit d'air de 1.5 l/mn. L'anesthésie est ensuite maintenue par 2% d'isoflurane. L'efficacité de l'anesthésie est vérifiée avant le début de tout acte chirurgical par pincement interdigital de la patte arrière de la souris. Si la souris tend à s'éveiller, la dose d'isoflurane est augmentée à 2,5% pendant quelques minutes. En post-opératoire les animaux sont maintenus à 37°C et observés jusqu'à leur réveil.

Après toute procédure chirurgicale, une hydratation par voie sous-cutanée de 1 ml de sérum physiologique par jour a été réalisée pendant 3 jours. Les souris ont été inspectées quotidiennement et pesées une fois par semaine. Les animaux qui présentaient des signes de souffrance et de prostration, qui pesaient plus de 35 g, ou qui présentaient une tumeur sous-cutanée de plus de 4 cm³ étaient euthanasiés.

Les deux méthodes de prélèvements de sang par incision de la veine caudale et ponction intracardiaque sont deux techniques connues du laboratoire.

La technique de prélèvement de sang par incision de la veine caudale a été utilisée pour des prélèvements répétés. L'animal conscient est placé dans un dispositif de contention prévu à cet effet. La queue a été exposée à la lumière et désinfectée à l'alcool afin de provoquer une

vasodilatation. Une incision de la veine caudale avec une lame de bistouri est réalisée pour obtenir un prélèvement d'environ 0,3 ml de sang. Le sang est recueilli dans des eppendorfs préalablement héparinés. Au décours du prélèvement, une hydratation par voie sous-cutanée de 1 ml de sérum physiologique est réalisée.

La technique de prélèvement sanguin par ponction cardiaque a été utilisée pour obtenir des prélèvements de sang d'environ 0.8 à 1 ml. L'animal anesthésié profondément à l'isoflurane est placé en décubitus dorsal. Après désinfection locale à la Bétadine, une sternotomie est réalisée. 0.8 à 1 ml de sang sont prélevés dans des tubes EDTA. Les animaux sont ensuite euthanasiés.

4.1.3. Modèles murins de tumeurs

Modèle de métastase hépatique obtenue après injection intra-splénique de cellules tumorales

Après désinfection locale à la bétadine, une incision sous-costale gauche est réalisée chez l'animal anesthésié. Après extériorisation de la rate, une injection intra-splénique de 10^6 cellules/100µl de CT-26 est effectuée. L'hémostase est assurée par compression douce de la rate pendant quelques minutes à l'aide d'un coton tige. La fermeture péritonéale est réalisée au Vicryl 4.0 et la fermeture cutanée à l'aide d'agrafes de Michel (**Figure 4**).

Modèle de tumeur sous cutanée

Les cellules tumorales CT-26 (10^6 cellules/100µl) sont injectées en sous-cutané dans la région inter-scapulaire de l'animal. Lorsque la tumeur mesure environ 3-4 cm de grand axe, la souris est euthanasiée et une exérèse de la tumeur, dans des conditions d'asepsie chirurgicale, est effectuée.

Modèle de carcinose péritonéale

Les cellules tumorales CT-26 sont injectées (10^6 cellules/100µl) en intra-péritonéal. Lorsque l'animal pèse environ 35 g ou présentent des signes de souffrance précoce, il est euthanasié. La cavité péritonéale est ensuite inspectée pour quantifier la carcinose selon le score de carcinose péritonéale (score de Sugarbaker).

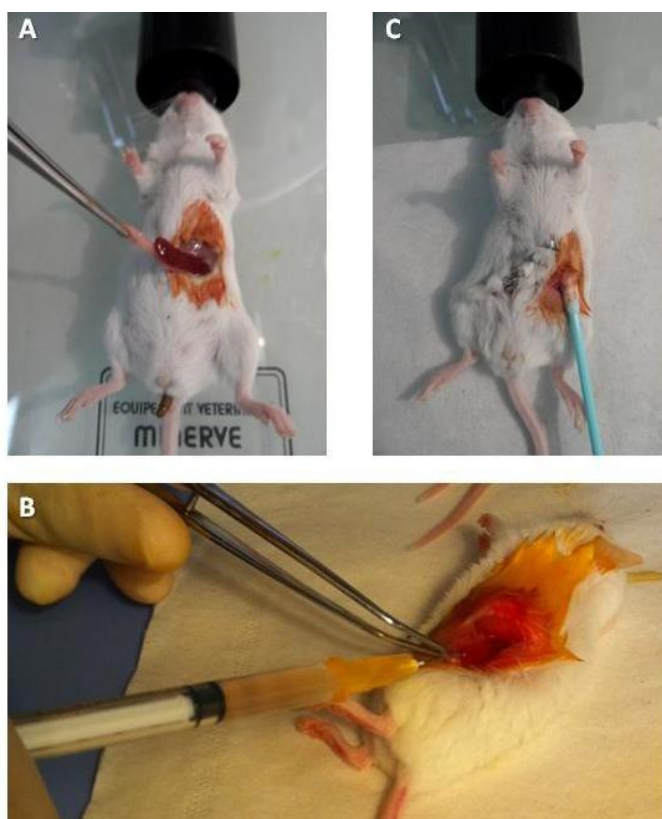


Figure 4. Modèle de métastases hépatiques par injection intra-splénique de cellules CT-26.
 (A) La rate est extériorisée. (B) 0.1 ml contenant 10^6 cellules tumorales sont injectées en intra-splénique. (C) Hémostase au point de ponction.

4.1.4. Modèles murins de libération des progéniteurs endothéliaux dans le sang

Modèle d'ischémie-reperfusion hépatique par clampage total du pédicule hépatique

Une incision médiane est réalisée chez l'animal anesthésié. L'ensemble du tube digestif est extériorisé et placé sur le flanc gauche de l'animal. Les viscères sont recouverts d'une compresse imbibée de sérum physiologique. La veine porte pédiculaire supra-pancréatique est clampée à l'aide d'un petit clamp de microchirurgie pendant 5 minutes (**Figure 5**). Le tube digestif présente un aspect congestif et violacé, et le foie un aspect pâle. Durant le clampage, la cavité péritonéale est irriguée avec 1 ml de sérum physiologique. La reperfusion du foie est contrôlée après déclampage. Les viscères sont réintroduits dans la cavité péritonéale. La paroi est fermée. Une injection par voie sous-cutanée de 1 ml de sérum physiologique est effectuée au décours de la procédure.

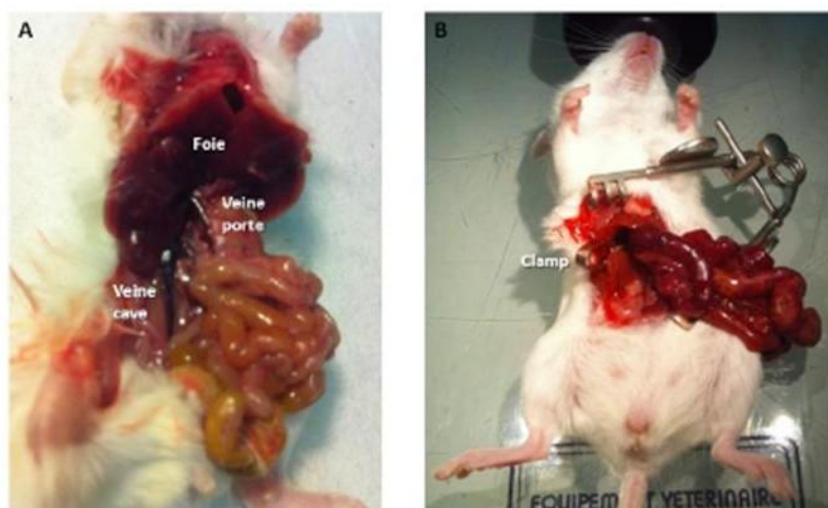


Figure 5. Modèle d'ischémie-reperfusion hépatique par clampage total du pédicule hépatique pendant 5 minutes. (A) Anatomie vasculaire. (B) Aspect violacé de l'intestin grêle après clampage du pédicule hépatique.

Modèle d'ischémie de patte par ligature de l'artère fémorale

Ce modèle est connu de notre laboratoire et a été utilisé afin d'étudier *in vivo* les différentes voies de signalisation impliquées dans l'angiogénèse et la vasculogénèse post-ischémique chez la souris diabétique. Une incision sur la face interne de la cuisse gauche est réalisée chez l'animal anesthésié. Sous loupe binoculaire, l'artère fémorale est dégagée du nerf fémoral en haut et de la veine fémorale en bas. La ligature de l'artère fémorale est réalisée au Prolène 5/0 (**Figure 6**). La fermeture cutanée est effectuée à l'aide des agrafes de Michel. De la nourriture sous forme de gelée est ensuite déposée dans la cage afin de faciliter l'alimentation des animaux.

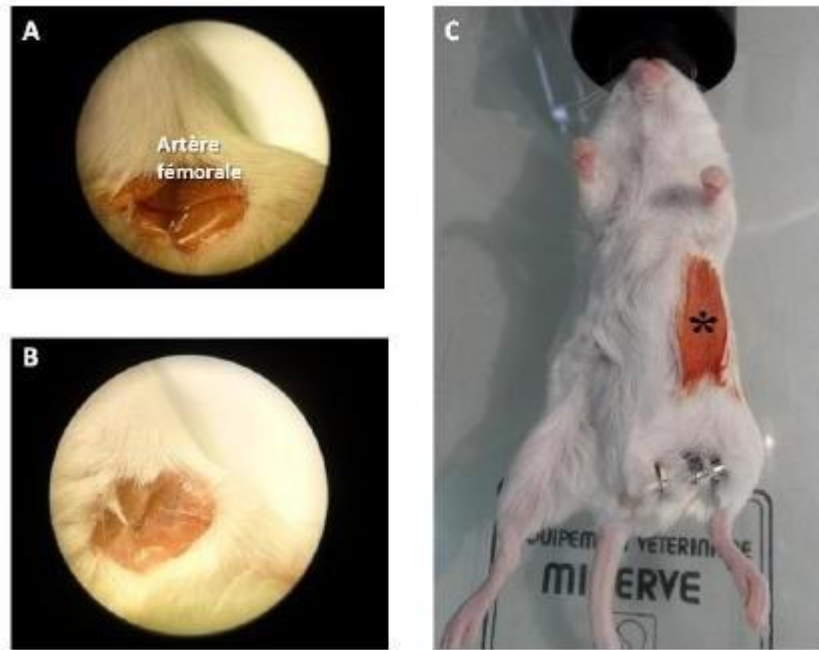


Figure 6. Modèle d'ischémie de patte par ligature de l'artère fémorale. (A) Visualisation du pédicule fémoral à la loupe binoculaire. (B) Ligature de l'artère fémorale. (C) Après fermeture de l'incision cutanée (* voie d'abord chirurgicale de l'injection intra-splénique des cellules CT-26).

4.1.5. Cytométrie en flux

Anticorps utilisés et principe de l'immunomarquage direct

Les anticorps utilisés sont les suivants: anti-CD34/APC (eBioscience), anti-CD117/FITC (eBioscience), anti-CD45/Pe-Cy7 (eBioscience), et anti-VEGFR2/PE (eBioscience).

Les échantillons sanguins sont centrifugés pendant 15 minutes à 300g. Le surnageant correspondant au sérum est récupéré pour réaliser le dosage ultérieur du facteur dérivé du stroma (SDF-1 α) par la méthode ELISA. Tous les culots cellulaires sont répartis à raison de 30 μ l par puits, chaque puits correspondant à une souris. Le culot cellulaire est suspendu dans 6 μ l de solution d'immunomarquage, et 1 μ l de chaque anticorps est ajouté. Les cellules sont incubées pendant 30 minutes à 4°C et à l'abri de la lumière. 150 μ l puis 200 μ l de solution de lyse des globules rouges sont ajoutés, puis une centrifugation (2 minutes, 3000g) est réalisée afin d'éliminer les anticorps en excès. Le culot est repris dans 50 μ l de solution d'immunomarquage et 50 μ l de solution de fixation, et une centrifugation est réalisée. Enfin le culot est repris dans 300 μ l de solution d'immunomarquage avant d'être analysé en cytométrie en flux. Un tube pour le contrôle négatif (cellules non marquées dans de la solution

d'immunomarquage), un tube pour le contrôle isotypique de chaque anticorps spécifique et un tube pour le marquage mono-couleur de chaque anticorps sont également préparés.

Analyse en cytométrie en flux

Les cellules sont analysées sur le cytomètre [Analyseurs LSR II (Becton-Dickinson) ou Gallios (Beckman Coulter) ; Plate-forme de Cytométrie en flux de l'IFR 65, Hôpital Saint-Antoine et Plate-forme de Cytométrie en flux de l'Hôpital Saint-Louis]. L'analyse des résultats a été réalisée en collaboration avec le Docteur Anne-Marie Faussat (Plate-forme de Cytométrie en flux de l'IFR 65, Hôpital Saint-Antoine). Un minimum de 100000 événements a été recueilli lors de chaque analyse. La population cellulaire est repérée sur le scattogramme en fonction de la taille et de la granulosité. Une fenêtre, prenant en compte uniquement cette population (les cellules mononuclées du sang), est dessinée afin d'éliminer les débris cellulaires. Sur le cytogramme représentant la taille cellulaire en fonction de la granulosité, les valeurs de SSC (Side Scatter) (taille) et de FSC (Forward Scatter) (granulosité) sont réglées de façon à bien visualiser la population cellulaire.

Sur l'histogramme de la fluorescence, la tension du photomultiplicateur est réglée de façon à ce que les cellules non marquées (le contrôle négatif qui permet de s'affranchir de l'autofluorescence des cellules) ainsi que les cellules incubées en présence d'immunoglobulines non spécifiques (le contrôle isotypique qui permet de s'affranchir de la fluorescence du marquage aspécifique) apparaissent négatives, entre 0 et 1 sur l'échelle logarithmique. La tension du photomultiplicateur ne sera plus touchée après ce réglage afin de ne pas faire d'erreurs sur la lecture des intensités de fluorescence des échantillons analysés.

L'intensité de fluorescence de la population cellulaire est mesurée automatiquement par le cytomètre et analysée à l'aide du logiciel système (FacsDIVA, Gallios ou Kaluza). Les cellules progénitrices ont été identifiées par le phénotype CD34⁺ et les progéniteurs endothéliaux identifiés par le phénotype CD34⁺ et VEGFR2⁺. Les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage de cellules positives rapporté au total de cellules mononuclées pour les cellules CD34⁺ ou en nombre de cellules pour les progéniteurs endothéliaux.

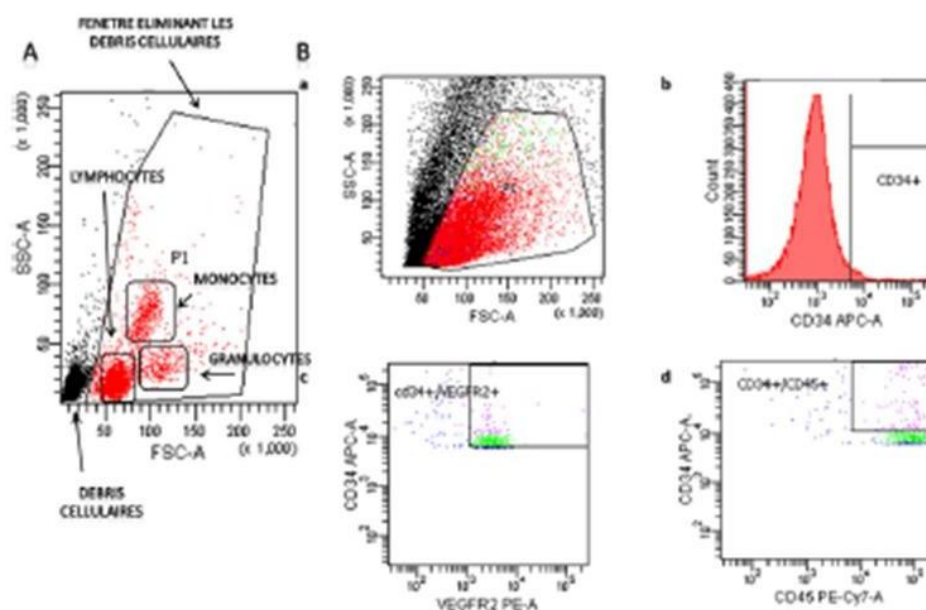


Figure 7. Stratégie de détection des cellules progénitrices CD34+, des progéniteurs endothéliaux CD34+/VEGFR2+ et des cellules progénitrices hématopoïétiques CD34+/CD45+. (A) Cytogramme représentant les diverses populations en fonction de la taille (SSC) et de la granulosité (FSC). (B) Stratégie de détection. a, Fenêtre éliminant les débris cellulaires. b, fenêtr sélectionnant les évènements CD34+. c, Fenêtr contenant les évènements CD34+VEGFR2+. d, Fenêtr contenant les évènements CD34+CD45+ (progéniteurs hématopoïétiques).

4.1.6. Immunohistochimie

Les prélèvements hépatiques fixés sont inclus en paraffine. Les coupes de 5 μ m d'épaisseur sont effectuées au microtome et colorées de façon standard à l'hématoxyline-éosine-safran. L'étude immunohistochimique a été réalisé en utilisant une méthode indirecte ABC-peroxydase révélée par le 3-3' diaminobenzidine (DAB). Les anticorps utilisés sont les suivants : CD31 (EBiosciences, titre : 1/200) et VEGF (Santa Cruz, titre : 1/50). Pour une meilleur homogénéité des résultats, un automate de coloration immuno-histochimique (Benchmark, Ventana Medical System, Tucson, AZ, USA) a été utilisé. Les images ont été visualisées avec un microscope Zeiss (Germany) équipé d'une caméra AxioCam Icc 1 (Zeiss, Germany). L'analyse des prélèvements a été réalisée en collaboration avec le Docteur Jean-Philippe Brouland (Département d'Anatomopathologie, Hôpital Lariboisière).

Evaluation semi-quantitative de l'immunoréactivité

L'expression des marquages CD31 (densité du réseau micro-vasculaire) et VEGF a été évaluée semi-quantitativement dans le foie adjacent à la métastase hépatique et ce sur 3 coupes prélevées à différents niveaux du foie de l'animal. Des tests de dilution ont été effectués préalablement pour chaque anticorps afin de définir le meilleur rapport signal/bruit de fond et s'assurer que le marquage obtenu ne soit pas saturé. Après la réaction immunohistochimique, les images sont prises à l'aide du microscope couplé à une caméra numérique. Afin de réaliser une évaluation semi-quantitative fiable et reproductible de l'immunoréactivité des coupes, les différentes séquences - de la préparation des lames avec l'automate à l'enregistrement des images - ont été réalisées de manière standardisée. Tous les paramètres de visualisation et d'acquisition de l'image sur le microscope ont été déterminés sur une première coupe de foie et ont été conservés pour toutes les autres coupes. Les images obtenues ont été ensuite analysées à l'aide du logiciel Image J. Le grossissement x40 a été retenu pour la numérisation de la surface totale des lames histologiques.

Marquage CD31

L'évaluation de la densité du réseau micro-vasculaire a été effectuée selon le protocole décrit par les équipes de Fox et al. et de Weidner et al.^{60, 61}. Globalement, les vaisseaux ont été comptés manuellement sur les 3 coupes de foie au grossissement x40. Seuls les vaisseaux morphologiquement distincts des vaisseaux adjacents étaient comptabilisés. L'absence de lumière vasculaire n'était pas un critère d'exclusion. L'expression du CD31 est exprimée en nombre moyen de vaisseaux marqués par coupe histologique.

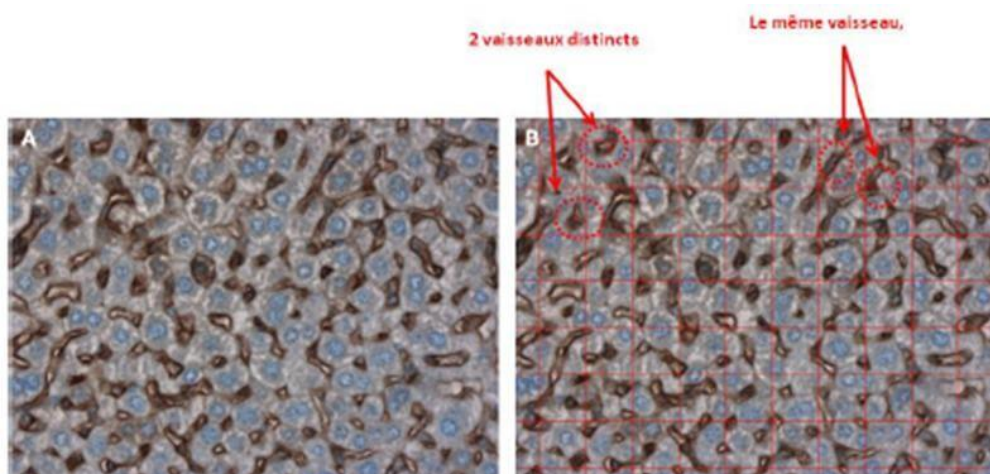


Figure 8. Evaluation semi-quantitative du marquage immunohistochimique au CD31 au grossissement x 40. (A) Enregistrement numérique de l'image histologique. (B) Comptage des vaisseaux à l'aide du logiciel Image J.

Marquage VEGF

Nous avons utilisé une méthode basée sur la déconvolution couleur. Le principe consiste à calculer la contribution d'une couleur donnée au niveau d'une image couleur ^{62, 63}. Nous avons utilisé ce principe pour étudier la contribution du DAB marron et de l'hématoxyline bleue au niveau des images histologiques de foie. Pour cela, nous avons utilisé une programmation en java réalisant cette déconvolution couleur sous forme de plugin image J ⁶⁴ et dont le but est d'isoler le marquage VEGF du fond des images histologiques à traiter (**Figure 9**).

Globalement, on génère deux images comportant seulement les marquages des images de référence DAB et hématoxyline à l'aide de la déconvolution couleur. Cette étape nous permet d'écarter le fond de l'image de l'analyse des couleurs de référence marron et bleue liées au DAB et à l'hématoxyline. Puis on génère une image binaire (rouge) sur l'image de référence DAB. L'image est décomposée en pixels dont l'intensité lumineuse est codée par un nombre en 0 et 255: 0 correspondant à la valeur maximale d'intensité (pixels blancs) et 255 correspondant à la valeur minimale (pixels rouges). Dans ce cas, plus les zones de la coupe auront fixé l'anticorps et réagi à la révélation, moins elles laisseront passer la lumière et plus elles apparaîtront sombres, et inversement pour les zones n'ayant pas réagi. L'évaluation a été réalisée également sur 3 coupes de foie (par animal) au grossissement x40. L'expression du VEGF est définie par la surface moyenne de sinusoides marqués rapportée à la surface totale d'une coupe histologique de foie.

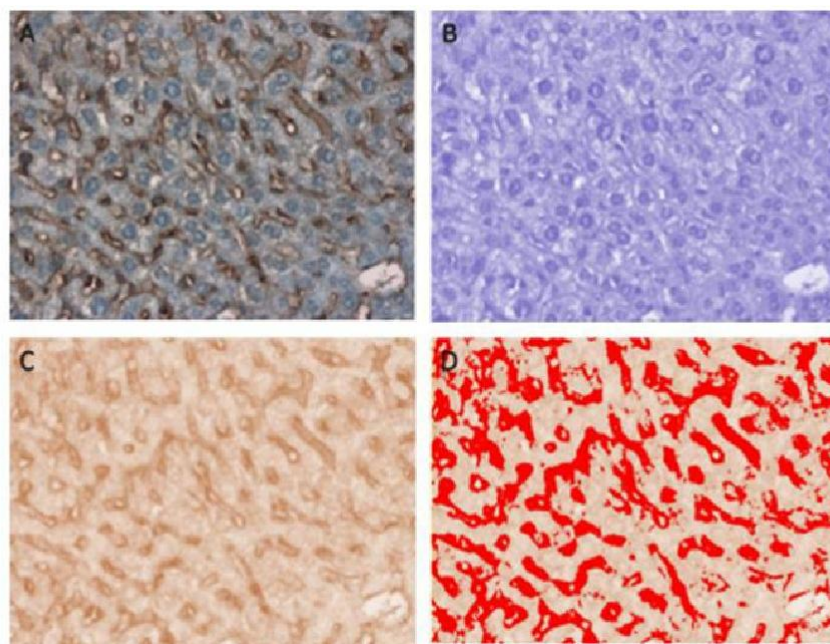


Figure 9. Evaluation semi-quantitative du marquage immunohistochimique au VEGF au grossissement x40. (A) Enregistrement numérique de l'image histologique. (B) Image hématoxyline (bleu-violet) après déconvolution couleur. (C) Image DAB (marron) après déconvolution couleur. (D) Image binaire (rouge) sur l'image DAB permettant d'estimer une surface de marquage (ici les images en rouge représentant 21% de la surface totale de l'image numérisée).

42 Méthodologie clinique

Les données cliniques et biologiques proviennent de la cohorte de patients qui ont eu une hépatectomie pour métastases hépatiques synchrones d'origine colorectale à l'Hôpital Henri Mondor (Créteil). L'analyse des données a été réalisée sous la direction du Pr Daniel Azoulay (Créteil). L'analyse statistique a été réalisée avec les logiciels Statview et SPSS.

5. RESULTATS ET DISCUSSION

5.1. Microenvironnement tumoral et potentiel métastatique

5.1.1. Résumé

Nous savons, depuis quelques années, par des données issues de modèles expérimentaux: (i) que le microenvironnement tumoral du site métastatique peut être préalablement modifié à distance par la tumeur initiale; et (ii) que la tumeur initiale, en sécrétant des chémokines, induit la formation d'une niche pro-métastatique qui rend le site métastatique permissif aux développements de celles-ci.

Récemment, des résultats expérimentaux ont suggéré que des progéniteurs dérivés de la moelle osseuse, cellules non cancéreuses du microenvironnement tumoral, avaient une influence sur la croissance tumorale et la dissémination métastatique. Il a été proposé que ces progéniteurs hématopoïétiques et endothéliaux dérivés de la moelle osseuse, soient recrutés en réponse à des cytokines sécrétées par la tumeur primitive (dont le VEGF), et qu'ils circulent dans le sang pour se localiser dans les sites métastatiques où elles assurent des fonctions de néo-angiogénèse et de vasculogénèse tumorales. Tous ces résultats n'ont jamais été validés dans un modèle animal de métastases hépatiques d'origine colique.

Pour simuler la présence d'une tumeur primitive dans notre modèle animal de métastases hépatiques, nous avons utilisé combinée un modèle d'ischémie par ligature de l'artère fémorale ou clampage du pédicule hépatique (modèle mimant la présence d'une tumeur primitive) et un modèle de métastases hépatiques obtenues par injection de cellules CT-26 en intra-splénique. Dans le modèle d'ischémie de patte, la ligature de l'artère fémorale induit une libération de progéniteurs dérivés de la moelle osseuse dans la circulation sanguine (on parle de mobilisation de progéniteurs). Ces progéniteurs se dirigent vers la zone ischémique pour participer à la néo-angiogénèse, vasculogénèse et la neurogénèse. Ainsi, dans notre modèle tumoral de métastases hépatiques, nous avons ajouté un modèle de ligature de l'artère fémorale et voulu savoir si la libération de progéniteurs endothéliaux modifiait l'angiogénèse hépatique et la croissance tumorale des métastases hépatiques (**Article 1**).

Nous montrons deux résultats importants: (i) En induisant la mobilisation de progéniteurs endothéliaux médullaires dans la circulation sanguine par un mécanisme d'ischémie par ligature de l'artère fémorale (à distance du foie), nous avons montré que la présence massive

de ces progéniteurs circulants s'associe à une accélération de la croissance des métastases hépatiques, et (ii) la présence massive de progéniteurs endothéliaux circulants s'accompagne également d'une augmentation de l'angiogénèse au sein du parenchyme hépatique non tumoral, adjacent aux métastases hépatiques. Ces résultats suggèrent que le microenvironnement hépatique peut être modulé à distance pour être profondément permissif à l'angiogénèse tumorale, et par conséquent aux développements des métastases.

Ces résultats ont été validés, dans une deuxième partie du travail expérimental, sur un modèle de carcinose péritonéale et un modèle de tumeur sous-cutanée (**Article 2**). La co-administration de cellules tumorales de cancer colique murin CT-26 et de progéniteurs endothéliaux dérivées de la moelle osseuse dans la cavité péritonéale induit une accélération de la croissance tumorale dans le modèle de carcinose péritonéale avec un index de carcinose péritonéale significativement plus élevé par rapport au groupe contrôle (co-injection de cellules tumorales et de sérum en intra-péritonéal). De même, que la co-injection de cellules tumorales de cancer colique murin CT-26 et de progéniteurs endothéliaux dérivées de la moelle osseuse en sous-cutané induit une accélération de la croissance tumorale dans le modèle de tumeur sous-cutanée par rapport au groupe contrôle (co-injection de cellules tumorales et de sérum en sous-cutané).

Enfin, dans une troisième partie expérimentale, nous avons validé le concept de niche pré-métastatique dans notre modèle murin de métastases hépatiques (**partie « résultats non publiés »**). Dans notre modèle expérimental de parabiose, les progéniteurs endothéliaux médullaires mobilisés dans la circulation sanguine viennent se localiser dans le foie dès le 7^{ème} jour de l'expérimentation, et ce avant l'apparition de métastases hépatiques (autour du 21^{ème} jour dans notre modèle de métastases hépatiques). Sur la base de nos résultats précédemment décrits, cela suggère que ces progéniteurs endothéliaux participent à la formation d'une niche pré-métastatique, y développent une angiogénèse propice à l'implantation ultérieure des cellules tumorales et au développement de métastases hépatiques. Nous avons choisi de définir comme progéniteurs endothéliaux dérivées de la moelle osseuse toutes les cellules qui exprimaient le CD34+ et VEGFR2+ en cytométrie en flux. A ce jour, le critère phénotypique qui définit cette population reste sujet à controverse et aucun consensus n'existe sur les marqueurs de surface qui identifient ces cellules. En 1997, Asahara et al ont décrit une population de cellules CD34+, qui cultivées ex vivo, se différenciaient en cellules ayant les caractéristiques de cellules endothéliales matures ⁶⁵. Ce résultat a été ensuite confirmé par d'autres équipes ⁶⁶⁻⁷¹. Ces cellules ont été appelées "cellules progénitrices

endothéliales" et des données ont montré qu'elles provenaient de la moelle osseuse, qu'elles étaient libérées en réponse à des stimuli dans la circulation sanguine, et qu'elles constituaient les foyers de néo-vascularisation au sein des lésions ischémiques. Dans la littérature, la combinaison de marqueurs de surface la plus utilisée pour l'identification de ces progéniteurs est la suivante : CD34, CD133 et le VEGFR2 ; sachant que chaque marqueur à lui-seul peut présent à la surface de plusieurs cellules du sang.

Des données récentes montrent que des cytokines et des facteurs de croissance tels que le VEGF, SDF-1 α , le facteur de croissance granulocytaire (G-CSF), et le MMP9 sont impliqués dans la mobilisation des cellules endothéliales progénitrices dans la circulation sanguine. Dans nos expériences (**Article 1**), le dosage de SDF-1 α sérique à différents intervalles de temps n'a pas montré de variations statistiquement significatives. Ce résultat peut être expliqué par le fait que les mécanismes par lesquels ces molécules activent la mobilisation des progéniteurs se déroulent dans la moelle osseuse.

La principale limite de ce travail expérimental réside dans le fait que nous avons utilisé un modèle murin d'ischémie et non un modèle murin de tumeur colique. Cependant ce travail expérimental constituait une preuve de concept car il n'existe, à notre connaissance, aucune données expérimentales prouvant qu'une tumeur colique soit associée à la libération de progéniteurs endothéliaux dans le sang. Ainsi, la mise en place du modèle murin de tumeur colique avec des prélèvements sanguins répétés chez le même animal pour doser les progéniteurs sanguins nous a paru être une procédure complexe (pour une preuve de concept) et risquée pour l'animal (risque de décès précoce par la complexité et la lourdeur des procédures chirurgicales). On aurait aussi pu utiliser un modèle murin de métastases hépatiques par implantation d'une tumeur au niveau du caecum car il s'agit d'un modèle connu du laboratoire. Mais le risque d'apparition de nodules de carcinose péritonéale locale et généralisée au cours de l'évolution naturelle de notre modèle tumoral risque de biaiser l'interprétation des résultats en ajoutant des facteurs confondants. D'autres questions restent en suspens telles que les mécanismes d'action (directe ou paracrine) ou la réelle contribution de ces progéniteurs sur la formation de la niche pré-métastatique et l'angiogénèse tumorale dans notre modèle de cancer colorectal métastatique.

- 5.12 ARTICLE 1:** La mobilisation des progéniteurs endothéliaux médullaires dans le sang induite par une ischémie augmente la croissance tumorale et l'angiogénèse dans un modèle murin de métastases hépatiques.

Journal of Surgical Research. 2013 184:888-897.

Hepatic ischemia-reperfusion increases circulating bone marrow-derived progenitor cells and tumor growth in a mouse model of colorectal liver metastases.

Lim C, Broqueres-You D, Brouland JP, Merkulova-Rainon T, Faussat AM, Hilal R, Rouquie D, Eveno C, Audollent R, Levy B, Pocard M.

Available online at www.sciencedirect.com

SciVerse ScienceDirect

journal homepage: www.JournalofSurgicalResearch.com

Hepatic ischemia-reperfusion increases circulating bone marrow-derived progenitor cells and tumor growth in a mouse model of colorectal liver metastases

Chetana Lim, MD,^{a,*} Dong Broqueres-You, MD, PhD,^{a,b,c}
 Jean-Philippe Brouland, MD, PhD,^{a,d} Tatiana Merkulova-Rainon, MD,^{a,b}
 Anne-Marie Faussat, MD,^e Rose Hilal, MD,^a Delphine Rouquie, MD,^a Clarisse Eveno, MD,^a
 Raphaële Audollent, MD,^a Bernard I. Levy, MD, PhD,^{a,b,c} and Marc Pocard, MD, PhD^{a,f}

^aUnité INSERM U965 (Université Paris 7), équipe "Angiogenèse et Recherche Translationnelle," Hôpital Lariboisière, Paris, France

^bInstitut des Vaisseaux et du Sang, Hôpital Lariboisière, Paris, France

^cParis Cardiovascular Research Center (PARCC), INSERM U970, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France

^dService d'Anatomie-pathologie, Hôpital Lariboisière, Paris, France

^eIFR 65, Plateforme Cytométrie, Hôpital Saint-Antoine, Paris, France

^fService de Chirurgie Digestive et Cancérologique, Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, Hôpital Lariboisière, Paris, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 March 2013

Received in revised form

9 April 2013

Accepted 26 April 2013

Available online 21 May 2013

Keywords:

Ischemia-reperfusion

Bone marrow-derived progenitor cells

Mobilization

Colorectal liver metastasis

Angiogenesis

CT-26 colon cancer cells

ABSTRACT

Background: Hepatic pedicle clamping is often required to reduce blood loss and transfusion during liver resection. However, the question remains whether use of hepatic pedicle clamping promotes tumor growth. Endothelial progenitor cells (EPCs) are mobilized from bone marrow in response to tissue ischemia, which allows neovascularization of ischemic tissue. It has been suggested that EPCs are involved in tumor progression. We hypothesized that hepatic ischemia reperfusion (I/R)-induced mobilization of EPCs could enhance growth of microscopic tumor, therefore promoting liver metastasis in a mouse model of colorectal cancer.

Materials and methods: We used mouse models of hepatic I/R and hind limb ischemia. For comparison, we studied mice that underwent limb ischemia as positive controls of EPC mobilization. At day 0, we divided 40 mice into four groups: hepatic I/R, hind limb ischemia, combined hepatic I/R and hind limb ischemia, and control (sham midline incision laparotomy). At day 2, we induced liver metastasis in all mice by injecting CT-26 cells into the spleen. Time-dependent circulating EPCs were determined by flow cytometry. We evaluated liver metastasis and microvascular density on day 21.

Results: The number of circulating progenitor cells increased rapidly in the ischemic groups compared with the control group. Hepatic I/R significantly increased tumor outgrowth compared with the control group. Increased tumor growth was associated with enhanced CD31-positive microvascular density in liver tissue.

Conclusions: Hepatic I/R leads to mobilization of bone marrow-derived EPCs and enhanced intra-hepatic angiogenesis, which is associated with increased tumor burden in an animal model of colorectal liver metastasis.

© 2013 Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

* Corresponding author. Angiogenèse et Recherche Translationnelle, INSERM U965, 2 Rue Ambroise Paré, 75475 Paris Cedex 10, France. Tel.: +33 1 49 95 82 58; fax: +33 1 49 95 91 02.

E-mail address: chetana.lim@gmail.com (C. Lim).

0022-4804/\$ – see front matter Crown Copyright © 2013 Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jss.2013.04.069>

2.4. Enzyme-linked immunosorbent assay

We also collected peripheral blood samples in heparinized tubes by tail bleeding (at different time points after induction of ischemia) or cardiac puncture from anaesthetized mice (immediately before mice were killed). Blood was then centrifuged to collect plasma. We determined serum levels of SDF-1 using a commercially available mouse CXCL12/SDF-1 α Immunoassay Kit (Quantikine; R&D Systems, Lille, France) according to the manufacturer's instructions.

2.5. Immunohistochemistry

Formalin-fixed, paraffin-embedded liver samples were cut into serial 5- μ m sections. The sections were stained with hematoxylin-eosin according to standard procedures. We performed immunostaining with anti-CD31 antibody (eBiosciences; 1/200 dilution) and anti-VEGF antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, CA; 1/50 dilution), followed by detection with 3,3'-diaminobenzidine peroxidase, using the Benchmark Autostainer apparatus (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ).

We performed semiquantitative analysis of immunolabeling in a blinded manner using ImageJ image analysis software (version 1.45b; National Institutes of Health, Bethesda, MD). We assessed microvessel density (number of vessels per square millimeter) after CD31 immunolabeling in three sections per each experimental animal on a $\times 40$ field [23]. We assessed VEGF immunostaining using the Color Deconvolution plugin for the DAB stain [24,25]. The DAB (VEGF)-stained regions were isolated from the hematoxylin counterstain in the digital image of the liver section and control images through the use of color decomposition. Each result is expressed as a ratio of the surface occupied by VEGF staining to the total surface.

2.6. Colorectal liver metastasis model

We made a 1-cm left subphrenic incision to expose the spleen. We then injected CT-26 cells (1×10^6) into the spleen using a 29-gauge needle. The wound was closed in two layers.

2.7. Hepatic I/R and hind limb ischemia models

A modified model of hepatic I/R injury was induced as previously described [8,26]. Briefly, a midline laparotomy was performed, and an atraumatic microvascular clamp was used to interrupt blood supply to both the left and right lobes of the liver. After 5 min total hepatic ischemia, the clamp was removed to initiate hepatic reperfusion (Fig. 1). For the unilateral hind limb ischemia model, the femoral artery was gently dissected and separated from the vein using a microscope. The femoral artery of one hind limb was ligated and excised. The ligation was performed just above the origin of the circumflexa femoris lateralis, as previously described [20].

2.8. Experimental design

To investigate the effects of hepatic ischemia-induced mobilization of circulating EPCs on liver metastatic tumor growth, we induced ischemia 48 h before the intrasplenic injection of

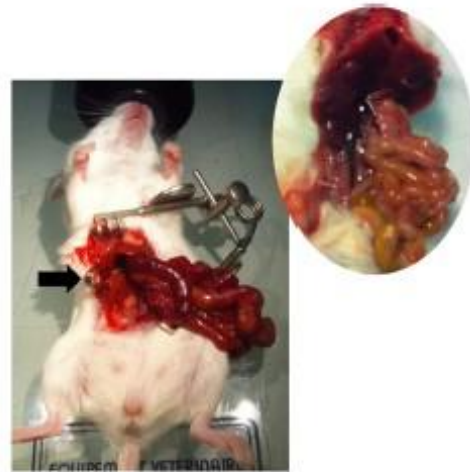


Fig. 1 – Intraoperative view of total hepatic pedicle clamping (black arrow, microvascular clamp; white star, portal vein).

CT-26 cells, and killed animals 21 d post-ischemia (Fig. 2A). For comparison, we studied mice that underwent limb ischemia as positive controls of EPC mobilization. Four groups of animals ($n = 10$ /group) were analyzed. Ten mice constituted the studied group (Hepa I/R + CT-26 group) and underwent hepatic I/R 48 h before the intrasplenic implantation of CT-26 cells. There were two control groups: 10 control sham-operated animals that received a sham midline incision laparotomy 48 h before the intrasplenic injection of CT-26 cells constituted the control group (Sham + CT-26 group), and 10 mice subjected to hind limb ischemia 48 h before the intrasplenic implantation of tumor cells constituted the positive control group (Limb Is + CT-26 group). One additional group included mice that underwent both hepatic I/R and hind limb ischemia before the intrasplenic injection of CT-26 cells (Limb Is + Hepa I/R + CT-26 group).

We collected venous blood samples before surgery at day 0 and at various times after the surgeries, and submitted them to flow cytometry analysis to count circulating hematopoietic progenitor cells (CD34 $^{+}$) and circulating EPCs (CD34 $^{+}$ /VEGFR2 $^{+}$).

Assessment of tumor growth included counting the macroscopic liver metastases and weighing the livers. Livers were then excised and separated into right and left halves. The right section was quickly frozen in liquid nitrogen for biochemical analysis, and the left section was fixed in 10% formaldehyde and paraffin-embedded for subsequent immunohistochemical analyses.

2.9. Data analysis and statistics

Results are expressed as means \pm standard error of the mean. Circulating progenitor cells are expressed as a percentage of control (Sham + CT-26 group). We performed comparisons

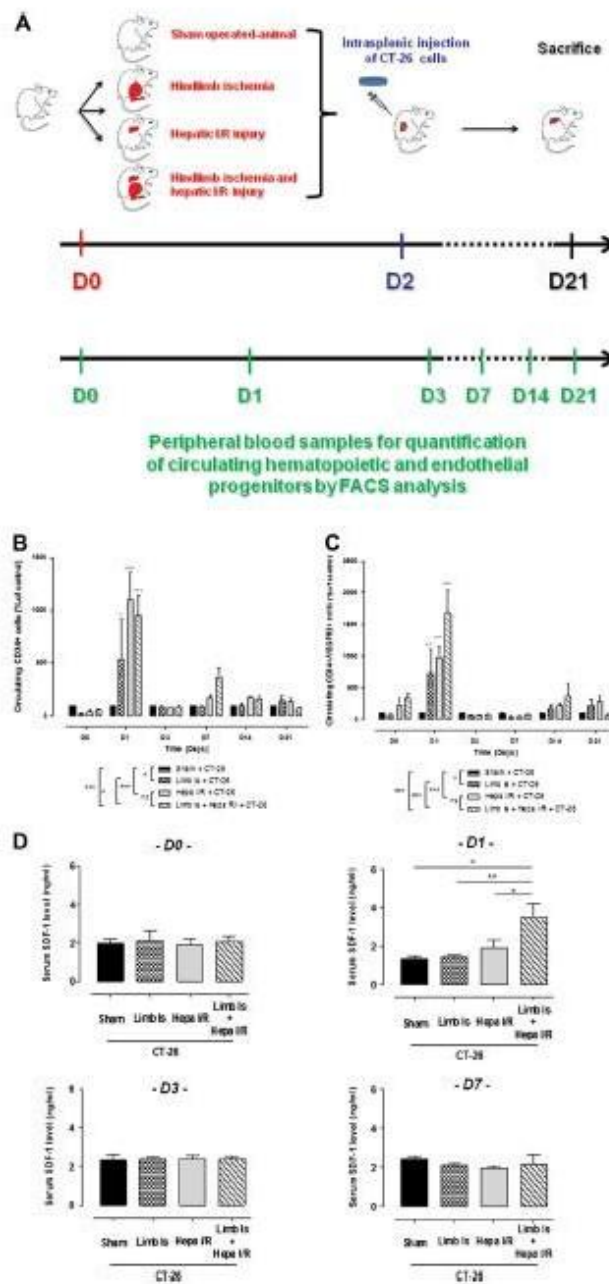


Fig. 2 – Hepatic I/R and/or hind limb injury increase circulating progenitor cell levels and serum SDF-1 concentrations in animals with liver metastasis. (A) Hind limb and/or hepatic I/R injury was performed 48 h before the intrasplenic injection of

using Student t-test for analysis of two experimental groups and one-way analysis of variance followed by Newman-Keuls multiple comparison test for analysis of more than two experimental groups. Two-way analysis of variance followed by post hoc Bonferroni complementary correction was performed when two independent variables were present. $P < 0.05$ was considered significant. We performed statistical analysis with GraphPad Prism (v5.03; GraphPad, San Diego, CA).

3. Results

3.1. Mortality

Postoperative mortality rate was 10% ($n = 1$ /each) in both hepatic I/R (Hepa I/R + CT-26) and hepatic I/R + hind limb ischemia (Limb Is + Hepa I/R + CT-26) groups. There was no operative mortality in both hind limb ischemia (Limb Is + CT-26) and control (Sham + CT-26) groups.

3.2. Effect of hepatic I/R injury on number of circulating hematopoietic progenitor cells and EPCs

On the day before each surgical procedure, $1.4\% \pm 0.5\%$ PB-MNCs were CD34⁺ and $0.1\% \pm 0.16\%$ PB-MNCs were CD34⁺/VEGFR2⁺ in female BALB/c mice. We detected no significant differences among the four experimental groups at this time point. On day 1 after ischemic surgery, CD34⁺ PB-MNCs were significantly increased and reached $1105\% \pm 250\%$, $538\% \pm 372\%$, and $950\% \pm 187\%$ of those in the Sham + CT-26 group for the Hepa I/R + CT-26, Limb Is + CT-26, and Limb Is + Hepa I/R + CT-26 groups, respectively ($P < 0.05$). Similarly, the CD34⁺/VEGFR2⁺ PB-MNCs were elevated to $976\% \pm 170\%$, $728\% \pm 378\%$, and $1687\% \pm 355\%$ of the Sham + CT-26 group for the Hepa I/R + CT-26, Limb Is + CT-26, and Limb Is + Hepa I/R + CT-26 groups, respectively, at 1 d post-ischemia ($P < 0.05$) (Fig. 2B and C). The levels of PB-MNCs in the CD34⁺ and CD34⁺/VEGFR2⁺ cells of the three ischemic groups then rapidly returned to the level of the Sham + CT-26 group and remained relatively stable for up to 21 d after ischemia.

3.3. Increased circulating progenitor cell levels correlate with elevated serum SDF-1 content

Because SDF-1 is a key regulator of progenitor mobilization from bone marrow, we next investigated whether SDF-1 was up-regulated in the serum of ischemic animals. We measured serum SDF-1 contents by enzyme-linked immunosorbent assay at various times before and after ischemia. At day 0 before surgery, the serum SDF-1 concentrations were similar

in the nonischemic and ischemic groups (1.98 ± 0.55 , 2.12 ± 0.52 , 1.89 ± 0.34 , and 2.07 ± 0.29 ng/mL for the Sham + CT-26, Limb Is + CT-26, Hepa I/R + CT-26, and Limb Is + Hepa I/R + CT-26 groups, respectively) (Fig. 2D). Only hind limb ischemia associated with hepatic I/R injury significantly enhanced the serum SDF-1 concentration at day 1 post-ischemia (3.51 ± 0.72 ng/mL for the Limb Is + Hepa I/R + CT-26 group at day 1; $P < 0.01$) (Fig. 2D). At days 3 and 7 postsurgery, no significant difference existed among serum SDF-1 levels in the four experimental groups. At days 14 and 21 post-ischemia, SDF-1 became undetectable in the sera of animals of all groups (data not shown).

3.4. Effect of hepatic I/R injury on liver metastasis

Next, we assessed the impact of hepatic I/R injury on colorectal liver metastasis. At day 21 post-ischemia, 20% ($n = 2/10$) of the sham-operated animals that received CT-26 developed macroscopic liver metastases. Hepatic I/R injury and/or hind limb ischemia increased the incidence of liver metastasis (44% for the Hepa I/R + CT-26 group and 70% for the Limb Is + CT-26 group). Hepatic I/R injury associated with hind limb ischemia did not further enhance the incidence of liver metastasis (66% for the Limb Is + Hepa I/R injury + CT-26 group) (Fig. 3A–C). However, we found a greater number of liver metastases in animals that received two ischemic surgeries compared with animals in the other experimental groups (Fig. 3A–C). Moreover, the liver/body weight ratio of these animals was significantly increased (0.0597 ± 0.0022 , 0.0603 ± 0.0018 , 0.0604 ± 0.0037 , and 0.0829 ± 0.0100 for the Sham + CT-26, Hepa I/R + CT-26, Limb Is + CT-26, and Limb Is + Hepa I/R + CT-26 groups, respectively; $P < 0.01$) (Fig. 3D), which suggests a higher liver metastasis burden in the ischemic groups.

3.5. Immunohistochemical analysis of CD31-positive microvessel density in liver tissue adjacent to metastases

We next sought to investigate whether liver tissue adjacent to liver metastases was modified by the hepatic ischemia-induced increase in circulating progenitor cells; this increase may provide a permissive environment for metastatic tumor seeding and growth in a manner similar to that described by Kaplan and colleagues [27]. We assessed microvessel density 21 d after ischemia (19 d after intrasplenic injection of CT-26) in serial sections of liver tissues. Anti-CD31 immunostaining revealed an extensive sinusoidal network in an area adjacent to liver metastases in all four groups. Hepatic I/R injury or hind limb ischemia significantly increased microvessel density in the vicinity of the liver metastases (53 ± 5 , 70 ± 5 , and 71 ± 5 vessels/mm² for the Sham + CT-26, Hepa I/R + CT-26, and

CT-26 cells in 5-wk-old female BALB/c mice ($n = 10$ mice/group). Animals were killed on day 21, and assessments of tumor growth included counting macroscopic liver metastases and weighing livers. Blood samples ($n = 5$ mice/time point) were collected by tail bleeding, and circulating EPCs and hematopoietic progenitor cells were measured in all groups before and 1, 3, 7, 14, and 21 d after ischemia. FACS, fluorescein isothiocyanate. (B, C) Percentages of circulating CD34-positive (B) and circulating CD34/VEGFR2-positive (C) cells at different time points after ischemia. Hepatic I/R injury and/or hind limb ischemia rapidly increased the levels of circulating progenitors at day 1 post-ischemia ($n = 5$ /group). (D) Hepatic I/R injury associated with hind limb ischemia significantly increased serum SDF-1 content 1 day (D1) after ischemia. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. ns, not significant.

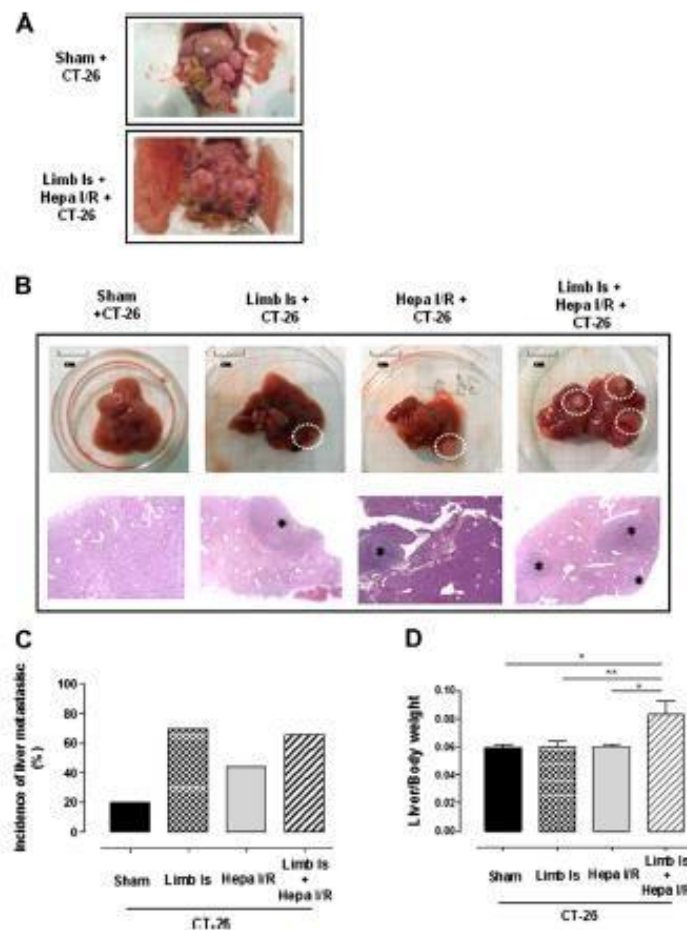


Fig. 3 – Effects of hepatic I/R injury on liver metastasis in animals with intrasplenic injection of CT-26 cells. (A) Representative photos of CT-26 in intrasplenic injection-induced peritoneal metastasis in animals 21 d after hepatic I/R injury and limb ischemia. (B) Representative images indicate that hind limb ischemia and/or hepatic I/R injury enhance liver metastasis. Upper, macroscopic observation; lower, hematoxylin-eosin staining in liver sections. Scale bars = 1 cm. *Liver tumors. (C) At day 21, incidence of liver metastasis. (D) Ratio of mouse liver/body weight at day 21 ($n = 10/\text{group}$), * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

Limb Is + CT-26 groups, respectively; $P < 0.001$) (Fig. 4A and B). The vascular density was highest in animals with both hepatic I/R injury and hind limb ischemia ($88 \pm 5 \text{ vessels/mm}^2$ for the Limb Is + Hepa I/R + CT-26 group; $P < 0.05$) (Fig. 4A and B). However, no significant modification of VEGF expression was evidenced between these experimental groups at day 21 post-ischemia.

4. Discussion

We conducted the present study to assess the effect of hepatic pedicle clamping on tumor progression of colorectal liver

cancer. First, our results suggest that hepatic I/R-induced mobilization of hematopoietic progenitor cells and IPCs led to modification of the liver tissue microenvironment, rendering it more pro-angiogenic. Second, this pro-angiogenic microenvironment that was generated subsequently enhanced colorectal cancer cell engraftment and metastatic growth.

Several experimental studies were developed to investigate the effects of hepatic pedicle clamping on tumor growth. Induction of new tumors after liver resection suggests the presence of preexisting micrometastases that have been positively stimulated by VR. Hepatic VR is predicted to contribute to tumor progression in three ways: (1) Up-regulation of angiogenic factors such as VEGF might be

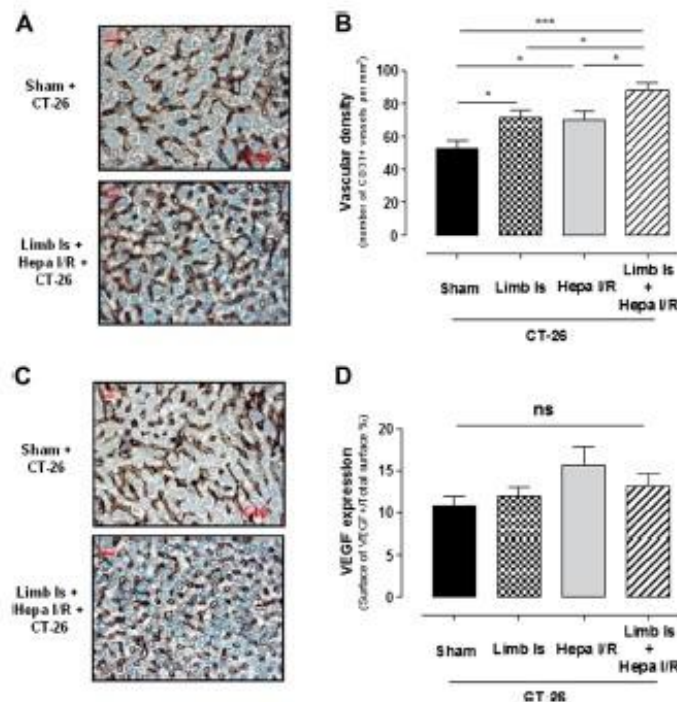


Fig. 4 – Effects of hepatic I/R injury on microvascular density and VEGF expression in liver parenchyma adjacent to metastases at day 21 post-ischemia. (A) Representative images of CD31-positive microvascular density in liver tissue adjacent to metastases. **(B)** Hepatic I/R and/or hind limb injury increase the microvascular density in liver tissue adjacent to the liver tumor ($n = 5/\text{group}$). **(C)** Representative photos of VEGF-positive liver tissue adjacent to liver metastases. **(D)** Hepatic I/R and/or hind limb injury have no significant effect on VEGF expression in liver tissue adjacent to the liver tumor at day 21 post-ischemia ($n = 5/\text{group}$). Scales bars = 20 μm . ns, not significant. * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$.

responsible for both tissue repair-associated angiogenesis and tumor angiogenesis, (2) inflammation could directly or indirectly trigger tumor growth [28–32], and (3) prolonged hypoxia may provide a pro-tumorigenic microenvironment through up-regulation of hypoxia inducible factor-1 α [33].

In the present study, we hypothesized that the increase in circulating EPCs either after hepatic ischemia (resulting from hepatic pedicle clamping) or limb ischemia (resulting from femoral artery ligation) might enhance tumor growth in our mouse model of colorectal liver metastases. We therefore compared a group of mice that underwent limb ischemia, known to have increased levels of circulating EPCs after limb ischemia (positive controls), with mice that underwent either hepatic ischemia, combined hepatic and limb ischemia, or sham-ischemic surgery (negative controls).

We used the association of immunocompetent mice and the CT-26 cell line for the experimental model in this study, for several reasons. First, BALB/c mice have a normal immune system, which may reflect the normal immune state of patients with colorectal cancer and avoid immunologic bias. Second, we chose to induce total hepatic I/R by occluding the vascular inflow of the whole liver for 5 min.

Compared with partial hepatic I/R, total hepatic I/R model mimics the so-called “Pringle maneuver,” the procedure commonly used for liver resection. We obtained liver metastases by intrasplenic injection of tumor cells, which was similar to the clinical setting of hematogenous dissemination of human colorectal cancer cells through the portal system. This model allows us to study all metastatic phases of colorectal cancer from micrometastases to macrometastases. Fourth, we chose to use a mouse model of hind limb ischemia as a positive control, in addition to the nonischemic control mice.

In this study, we first performed ischemia before liver metastasis occurred, and analyzed the liver tissue adjacent to the metastases. This approach is original because it consisted of creating pathophysiologic conditions to modulate the pre-metastatic microenvironment and therefore increase the tumor-enhancing effects of the liver microenvironment. Recently, it has been recognized that preferential colonization of specific tissues by tumor cells is determined, in part, by the presence of microenvironments within distant target organs that are suitable for metastasis formation [34–37]. Increasing evidence suggests that certain primary tumors stimulate

a specific population of non-tumor hematopoietic cells to mobilize and engraft distant target tissues, consequently creating a pre-metastatic niche that allows for the colonization of circulating cancer cells [27,38].

In accordance with previously reported studies [15,39,40], our results demonstrate that circulating hematopoietic progenitor cell and EPC levels were increased at 24 h after hepatic I/R injury and/or hind limb ischemia, and then decreased to a normal level at 48 h. These modifications in progenitor cell levels were likely correlated with a peak serum concentration of SDF-1, a key factor inducing the mobilization of progenitor cells [41,42]. However, serum concentration of SDF-1 was increased only when hind limb ischemia and hepatic I/R injury were combined, but increased mobilization of hematopoietic progenitor cell and EPC was seen in all three ischemic mouse models. Possible hypotheses for the differential effects observed may be that (1) peak serum concentration of SDF-1 relies on additional effects of the combination of regional and distal ischemic procedures; or (2) increased mobilization of these cells was associated with changes in the liver and the limb, and not only with serum SDF-1 content.

Interestingly, this ischemia-induced transient increase in circulating hematopoietic progenitor cells and EPCs before tumor cells injection was accompanied by a subsequent acceleration in liver metastasis. Immunohistochemical analysis of CD31 labeling evidenced a more pronounced microvascular density in the liver tissue adjacent to metastases in tumor-bearing mice that underwent hepatic ischemia compared with that in the mice without ischemia.

Because EPCs have the capacity to differentiate into mature endothelial cells and form new vascular networks [14,43,44], an increase in circulating EPCs could promote angiogenesis in the liver and facilitate the seeding of circulating colorectal cancer cells. It has been reported that tissue VEGF expression was rapidly increased 2 d after hind limb ischemia [45]. However, our study demonstrated no significant differences in VEGF expression in the liver tissue adjacent to metastases at day 21 post-ischemia. This discrepancy may reflect a bell-shape character of VEGF expression after ischemia, with a transient increase at early time points and a return to basal levels at later time points.

These results are in accordance with our previous study in which we found that intravenous injection of exogenous bone marrow-derived mononuclear cells into LS-174 tumor-bearing mice stimulated colorectal liver metastasis [22]. Our previous study showed that these mononuclear cells isolated from the bone marrow of transgenic GFP mice into LS-174 tumor-bearing mice are capable of homing to and infiltrating liver tumors. In addition, immunostaining analysis revealed that a fraction of these cells was co-localized with endothelial cells [22], which indicates, at least in part, the recruitment and incorporation of EPCs into neovessels of the metastatic microenvironment.

However, we observed no significant correlation between the numbers of circulating bone marrow-derived progenitor cells, tumoral responses, and microvascular density. We observed that hepatic ischemia and combined hepatic and limb ischemia both induced higher levels of hematopoietic progenitor cells (CD34 + PBMCs), but we found that combined

hepatic and limb ischemia resulted in more metastases than hepatic ischemia alone. In addition, combined hepatic and limb ischemia induced higher microvascular density than hepatic or limb ischemia alone. Possible reasons for these seemingly varied results may be that (1) circulating endothelial progenitor cells do not directly contribute to angiogenesis-mediated tumor growth and metastatic progression, and (2) the mechanisms of ischemia-accelerated tumor growth are likely to be multifactorial.

Indeed, controversy exists concerning the relative contribution of these cells to the formation of neovessels. The existence of an adult hemangioblast was well-evidenced, but the differentiation of marrow stem cells toward the endothelial lineage is an extremely rare event [46]. A recent study reported that EPCs did not contribute to the formation of tumor endothelium in animal models of lung metastatic tumors (melanoma and prostate carcinoma) [47]. Conversely, transplantation with Id wild-type bone marrow significantly reduced hemorrhaging in poorly differentiated prostate adenocarcinomas, with bone marrow-derived endothelial cells contributing to 14% of the tumor blood vessels. However, in well-differentiated prostate adenocarcinomas, there was little evidence of bone marrow-derived endothelial cell incorporation, which suggests that tumor angiogenesis varies depending on the tumor grade [48].

Few clinical studies have focused on the effect of hepatic pedicle clamping on recurrence and survival after resection of primary or secondary liver tumors [49–51]. However, these studies yielded conflicting results. Ishizuka et al. [50] reported that longer hepatic pedicle clamping may predict a shorter survival in patients undergoing hepatectomy for hepatocellular carcinoma. On the other hand, use of hepatic pedicle clamping does not seem to adversely affect long-term survival for colorectal liver metastases [49,51]. Our preclinical results are consistent with recent data obtained from liver metastatic patients, in which the expression of angiogenic factors such as VEGFA, VEGFR2, placental growth factor, hypoxia inducible factor-1 α , and VEGFR1 was increased in the liver tissue adjacent to colorectal liver metastases in the presence of the primary tumor. These data suggest that the colon tumor could influence the environment in the liver before metastasis [11].

Our study has several limitations. Alternative explanations could be derived from the observed results because the generation of ischemic tissues may also produce a systemic pro-angiogenic state that stimulates metastasis development and progression. Another limit of the present study is the lack of description of molecular events underlying the mechanisms of recruitment of the mobilized cells.

In conclusion, the formation of liver metastases was significantly accelerated in our hepatic I/R mouse model, supporting the notion that I/R potentially enhances tumor progression. Our results suggest that invasion and metastatic properties are not always influenced by cancer cells themselves, but by crosstalk between the cancer cells and bone marrow-derived components in the metastatic microenvironments. The results provide a rationale for the clinical development of an innovative strategy based on combining anti-angiogenic drugs with therapies targeting circulating EPCs.

Acknowledgments

Chetana Lim is the recipient of a grant from Association Benoit Malassagne. Dong Broqueres-You is supported by a grant from the Lefoulon-Delalande Fondation of France Institute.

REFERENCES

- Agrawal S, Belghiti J. Oncologic resection for malignant tumors of the liver. *Ann Surg* 2011;253:656.
- Abdalla EK, Vauthey JN, Ellis LM, et al. Recurrence and outcomes following hepatic resection, radiofrequency ablation, and combined resection/ablation for colorectal liver metastases. *Ann Surg* 2004;239:818. discussion: 825.
- Nordlinger B, Sorbye H, Glimelius B, et al. Perioperative chemotherapy with FOLFOX4 and surgery versus surgery alone for resectable liver metastases from colorectal cancer (EORTC Intergroup trial 40983): a randomised controlled trial. *Lancet* 2008;371:1007.
- Asahara T, Katayama K, Itamoto T, et al. Perioperative blood transfusion as a prognostic indicator in patients with hepatocellular carcinoma. *World J Surg* 1999;23:676.
- Zakaria S, Donohue JH, Que FG, et al. Hepatic resection for colorectal metastases: value for risk scoring systems? *Ann Surg* 2007;246:183.
- Doi K, Horiuchi T, Uchinami M, et al. Hepatic ischemia-reperfusion promotes liver metastasis of colon cancer. *J Surg Res* 2002;105:243.
- Nicoud JB, Jones CM, Pierce JM, et al. Warm hepatic ischemia-reperfusion promotes growth of colorectal carcinoma micrometastases in mouse liver via matrix metalloproteinase-9 induction. *Cancer Res* 2007;67:2720.
- van der Bilt JD, Kranenburg O, Nijkamp MW, et al. Ischemia/reperfusion accelerates the outgrowth of hepatic micrometastases in a highly standardized murine model. *Hepatology* 2005;42:165.
- Tamagawa K, Horiuchi T, Uchinami M, et al. Hepatic ischemia-reperfusion increases vascular endothelial growth factor and cancer growth in rats. *J Surg Res* 2008;148:158.
- Takahashi Y, Tucker SL, Kitadai Y, et al. Vessel counts and expression of vascular endothelial growth factor as prognostic factors in node-negative colon cancer. *Arch Surg* 1997;132:541.
- van der Wal GE, Gouw AS, Kamps JA, et al. Angiogenesis in synchronous and metachronous colorectal liver metastases: the liver as a permissive soil. *Ann Surg* 2012;255:86.
- Carmeliet P. VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology* 2005;69(Suppl 3):4.
- Lyden D, Hattori K, Dias S, et al. Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med* 2001;7:1194.
- Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997;275:964.
- Takahashi T, Kalka C, Masuda H, et al. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med* 1999;5:434.
- Asahara T, Masuda H, Takahashi T, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 1999;85:221.
- Gao D, Nolan D, McDonnell K, et al. Bone marrow-derived endothelial progenitor cells contribute to the angiogenic switch in tumor growth and metastatic progression. *Biochim Biophys Acta* 2009;1796:33.
- Yoder MC, Ingram DA. The definition of EPCs and other bone marrow cells contributing to neoangiogenesis and tumor growth: is there common ground for understanding the roles of numerous marrow-derived cells in the neoangiogenic process? *Biochim Biophys Acta* 2009;1796:50.
- Bertolini F, Shaked Y, Mancuso P, Kerbel RS. The multifaceted circulating endothelial cell in cancer: towards marker and target identification. *Nat Rev Cancer* 2006;6:835.
- You D, Waackel L, Ebrahimi TG, et al. Increase in vascular permeability and vasodilation are critical for proangiogenic effects of stem cell therapy. *Circulation* 2006;114:328.
- Gustafsson E, Tschmelitsch J, Eberwein M, et al. In vivo release of vascular endothelial growth factor from colorectal carcinomas. *Oncology* 2002;62:313.
- Audollet R, Eveno C, Contreras JO, et al. Bone marrow-derived endothelial and hematopoietic precursors cells enhance the metastasis of colon cancer in an orthotopic murine model. *Int J Cancer* 2011;129:2304.
- Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis—correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991;324:1.
- Lesack K, Naugle C. Performance of a simple chromatin-rich segmentation algorithm in quantifying basal cell carcinoma from histology images. *BMC Res Notes* 2012;5:35.
- Ruifrok AC, Johnston DA. Quantification of histochemical staining by color deconvolution. *Anal Quant Cytol Histol* 2001;23:291.
- Sakai N, Van Sweringen HL, Schuster R, et al. Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) protects against hepatic ischemia/reperfusion injury in mice. *Hepatology* 2012;55:888.
- Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, et al. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature* 2005;438:820.
- Ballwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 2001;357:539.
- Lewis C, Murdoch C. Macrophage responses to hypoxia: implications for tumor progression and anti-cancer therapies. *Am J Pathol* 2005;167:627.
- Lewis CE, Pollard JW. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res* 2006;66:605.
- Lin EY, Pollard JW. Role of infiltrated leukocytes in tumor growth and spread. *Br J Cancer* 2004;90:2053.
- Tazawa H, Okada F, Kobayashi T, et al. Infiltration of neutrophils is required for acquisition of metastatic phenotype of benign murine fibrosarcoma cells: implication of inflammation-associated carcinogenesis and tumor progression. *Am J Pathol* 2003;163:2221.
- van der Bilt JD, Soeters ME, Duyverman AM, et al. Perinecrotic hypoxia contributes to ischemia/reperfusion-accelerated outgrowth of colorectal micrometastases. *Am J Pathol* 2007;170:1379.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144:646.
- Joyce JA, Pollard JW. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer* 2009;9:239.
- Psaila B, Kaplan RN, Port ER, Lyden D. Priming the "soil" for breast cancer metastasis: the pre-metastatic niche. *Breast Dis* 2006;26:65.
- Psaila B, Lyden D. The metastatic niche: adapting the foreign soil. *Nat Rev Cancer* 2009;9:285.
- Hiratsuka S, Watanabe A, Aburatani H, Maru Y. Tumour-mediated upregulation of chemotactic factors and recruitment of myeloid cells predetermines lung metastasis. *Nat Cell Biol* 2006;8:1369.

- [39] Lemoli RM, Catani L, Talarico S, et al. Mobilization of bone marrow-derived hematopoietic and endothelial stem cells after orthotopic liver transplantation and liver resection. *Stem Cells* 2006;24:2817.
- [40] Oh SH, Witek RP, Bae SH, et al. Bone marrow-derived hepatic oval cells differentiate into hepatocytes in 2-acetylaminofluorene/partial hepatectomy-induced liver regeneration. *Gastroenterology* 2007;132:1077.
- [41] Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ Res* 2004;95:343.
- [42] Yamaguchi J, Kusano KF, Masuo O, et al. Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization. *Circulation* 2003;107:1322.
- [43] Roelmaaker MB, Tolboom H, Goldschmeding R, Zwagink JJ, Rabelink TJ, Verhaar MC. Bone-marrow-derived cells contribute to endothelial repair after thrombotic microangiopathy. *Blood* 2002;99:1095.
- [44] Walter DH, Rittig K, Bahlmann FH, et al. Statin therapy accelerates reendothelialization: a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Circulation* 2002;105:3017.
- [45] Loinard C, Ginouves A, Vilar J, et al. Inhibition of prolyl hydroxylase domain proteins promotes therapeutic revascularization. *Circulation* 2009;120:50.
- [46] Larivee B, Niessen K, Pollet I, et al. Minimal contribution of marrow-derived endothelial precursors to tumor vasculature. *J Immunol* 2005;175:2890.
- [47] Wickersheim A, Kerber M, de Miguel LS, Plate KH, Machein MR. Endothelial progenitor cells do not contribute to tumor endothelium in primary and metastatic tumors. *Int J Cancer* 2009;125:1771.
- [48] Li H, Gerald WL, Benezra R. Utilization of bone marrow-derived endothelial cell precursors in spontaneous prostate tumors varies with tumor grade. *Cancer Res* 2004;64:6137.
- [49] Giulante F, Ardito F, Pulitano C, et al. Does hepatic pedicle clamping affect disease-free survival following liver resection for colorectal metastases? *Ann Surg* 2010;252:1020.
- [50] Ishizuka M, Kubota K, Kita J, Shimoda M, Kato M, Sawada T. Duration of hepatic vascular inflow clamping and survival after liver resection for hepatocellular carcinoma. *Br J Surg* 2011;98:1284.
- [51] Weiss MJ, Ito H, Araujo RL, et al. Hepatic pedicle clamping during hepatic resection for colorectal liver metastases: no impact on survival or hepatic recurrence. *Ann Surg Oncol* 2012;20:285.

- 513. ARTICLE 2:** L'administration de progéniteurs endothéliaux médullaires augmente la croissance tumorale dans les modèles murins de carcinose péritonéale et de tumeur sous-cutanée.

Digestive Disease and Science. 2015 60:280-282.

Bone marrow cell therapy and liver regeneration: The potential clinical caveat.

Lim C, Broqueres-You D, Pocard M.

Bone Marrow Cell Therapy and Liver Regeneration: The Potential Clinical Caveat

Chetana Lim · Dong Broqueres-You ·
Marc Pocard

Received: 16 November 2014 / Accepted: 30 November 2014 / Published online: 6 December 2014
© Springer Science+Business Media New York 2014

We have read with great interest the article by Karibori et al. [1] titled “Bone marrow cells enhance liver regeneration after massive hepatectomy in mice,” published in the July 2014 issue of *Digestive Diseases and Sciences*. These experimental results are very interesting and validate the concept that bone marrow cell therapy may improve hepatic function and regeneration in the setting of liver resection [2, 3]. However, the following points must be discussed.

First, liver resection is mainly performed for oncological purposes. In that sense, the ideal animal model should be mice with established liver cancer at the time of hepatectomy and portal or tail vein bone marrow cell injection, which represents the real-life situation faced by the surgeons. This was not the case in the study published by Karibori et al.

Second, there is increasing evidence that the interaction between the cancer microenvironment and bone marrow cells may potentially enhance tumor growth (the so-called concept of the *pre-metastatic niche* [4, 5], where bone

marrow cells participate in the creation of the metastatic environment site, by increasing the angiogenic properties, before tumor cell arrival). Indeed, we have showed that transplantation of bone marrow precursor cells promotes tumor growth in a mouse implantation model of subcutaneous colorectal cancer and a mouse model of colorectal cancer peritoneal carcinomatosis (Fig. 1). To obtain peripheral blood mononuclear cells (PB-MNCs), 24 h after femoral artery ligation, mice were killed, and blood was collected by cardiac puncture. PB-MNCs were isolated by gradient density centrifugation on a Pancoll centrifuge and re-suspended in phosphate-buffered saline (PBS). Approximately 5×10^5 PB-MNCs were co-injected with CT-26 murine colon cancer cells either subcutaneously (subcutaneous CT-26 tumor model) or intraperitoneally (peritoneal carcinomatosis model). The control group received a subcutaneous or intraperitoneal injection of an equal volume of PBS ($n = 5$ animals per group).

C. Lim (✉) · D. Broqueres-You · M. Pocard
INSERM U965, Carcinomatosis Angiogenesis and Translational
Research (CART), Lariboisière Hospital, Paris 75010, France
e-mail: chetana.lim@gmail.com

M. Pocard
e-mail: marc.pocard@inserm.fr

C. Lim · M. Pocard
UMT 965, Paris 7 University, Paris-Diderot, Paris 75010, France

C. Lim
Department of HPB Surgery and Liver Transplantation,
Henri Mondor Hospital, Creteil, France

D. Broqueres-You
Institut des Vaisseaux et du Sang, Hôpital Lariboisière,
2 rue Ambroise Paré, 75010 Paris, France

M. Pocard
Service de Chirurgie digestive et cancérologique, Assistance
Publique des Hôpitaux de Paris (AP-HP), Hôpital Lariboisière,
2 rue Ambroise Paré, 75010 Paris, France

M. Pocard
Unité INSERM U965 (Université Paris 7), Carcinose
Angiogenèse et Recherche Translationnelle (CART), Université
Paris-Diderot, Paris 7, Paris, France

M. Pocard
Service de Chirurgie Digestive et Cancérologique, Assistance
Publique Hôpitaux de Paris (AP-HP), Hôpital Lariboisière,
2 Rue Ambroise Paré, 75475 Paris Cedex 10, France

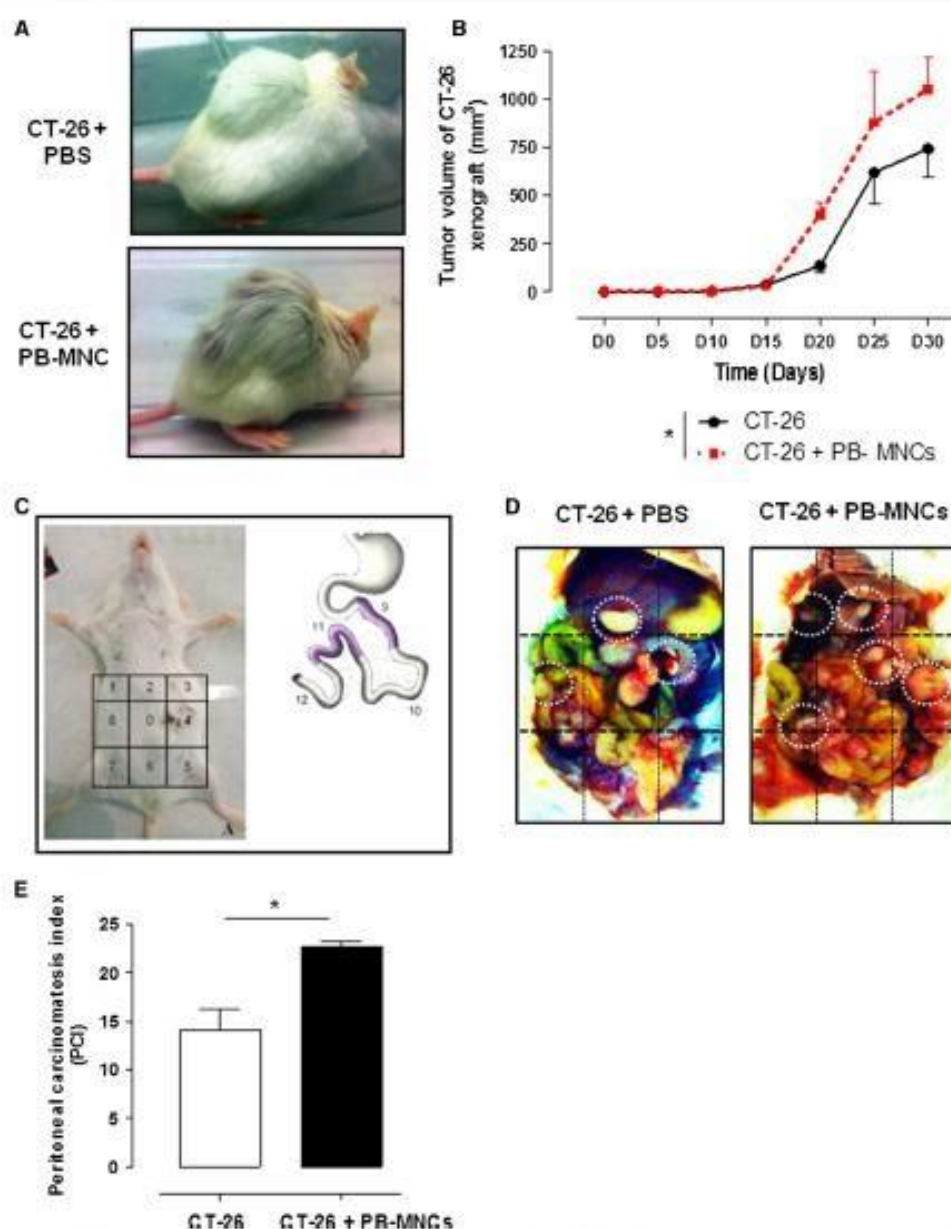


Fig. 1 Effects of peripheral blood mononuclear cells isolated from animals that underwent hindlimb ischemia on tumor progression in murine colorectal cancer xenograft and carcinomatosis models. **a** Representative photograph of tumor volume in animals with colorectal cancer xenografts. **b** Co-injection of limb ischemia-activated PB-MNCs increases tumor progression in a colorectal

cancer xenograft model ($n = 5$ per group). **c** Distribution of carcinomatosis in the mouse abdomen is evaluated with a modified peritoneal cancer index (PCI) assessment. **d** Representative photos of colorectal cancer peritoneal carcinomatosis. **e** Co-injection of limb ischemia-activated PB-MNCs is associated with an enhanced peritoneal carcinomatosis index ($n = 5$ per group). $*p < 0.05$

Fluorescence-activated cell sorting analysis of these PB-MNCs demonstrated that 20 % of them were positive for CD34 immunostaining. Among these CD34⁺ cells, 51 %

were CD34⁺/VEGFR2⁺. At day 30 after the CT-26 cell subcutaneous injection, PB-MNCs increased the volume of tumors compared with those found in the control animals

5.14 RESULTATS NON PUBLIES N°1: Les progéniteurs médullaires mobilisés dans le sang vont se localiser dans le foie: validation du concept de niche pré-métastatique.

L'objectif de ce travail expérimental était de montrer que les progéniteurs endothéliaux mobilisés de la moelle osseuse dans la circulation sanguine se dirigent vers le foie, avant l'arrivée des cellules tumorales. Cette donnée permettrait de valider le concept de niche pré-métastatique.

Pour cela, nous avons réalisé deux protocoles expérimentaux. Dans un premier temps, il s'est avéré nécessaire d'évaluer le délai d'apparition des nodules hépatiques macroscopiquement visibles dans notre modèle de métastases hépatiques. Dans un deuxième temps, nous avons mis en place un modèle de parabiose en liant chirurgicalement deux souris au niveau leurs abdomens, de façon à mettre en communication le sang de ces deux souris. Le but est de montrer que les progéniteurs endothéliaux médullaires libérés dans la circulation sanguine de l'une circulent dans le sang de l'autre pour se diriger vers le foie de cette dernière.

Délai d'apparition des nodules hépatiques macroscopiquement visibles dans notre modèle de métastases hépatiques

Nous avons injecté chez 15 souris, 1×10^6 cellules de la lignée tumorale CT-26 en intra-splénique. Les animaux ont été sacrifiés par groupe de trois tous les sept jours à partir du 7^{ème} jour suivant l'injection. La présence de tumeurs spléniques nous a servi de "contrôle" et a montré qu'une injection de cellules tumorales viables en intra-splénique a bien été réalisée (**Figure 10**).

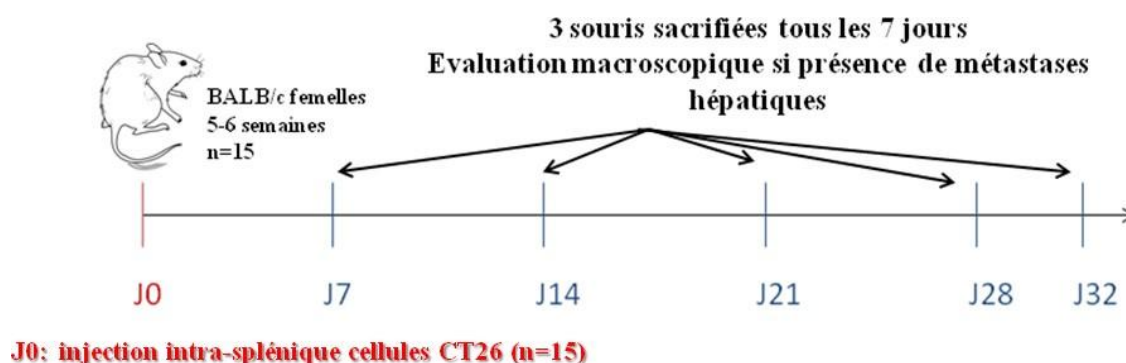


Figure 10. Protocole pour évaluer l'histoire naturelle des métastases hépatiques après injection intra-splénique de cellules CT-26.

Nous n'avons pas observé de métastases hépatiques macroscopiques avant le 21^{ème} jour. Au 21^{ème} jour, les métastases étaient présentes dans 66% des cas (n=2/3). A partir du 28^{ème} jour, 100% des souris sacrifiées avaient des métastases hépatiques. Les métastases hépatiques étaient peu nombreuses (entre 1 et 4) et mesuraient quelques millimètres de diamètre. L'injection intra-splénique de cellules n'a pas entraîné de décès post-opératoire. Par contre, 3 (20%) souris sont décédées spontanément après le 25^{ème} jour ; parmi elles, 2 avaient des métastases hépatiques (**Figure 11**).

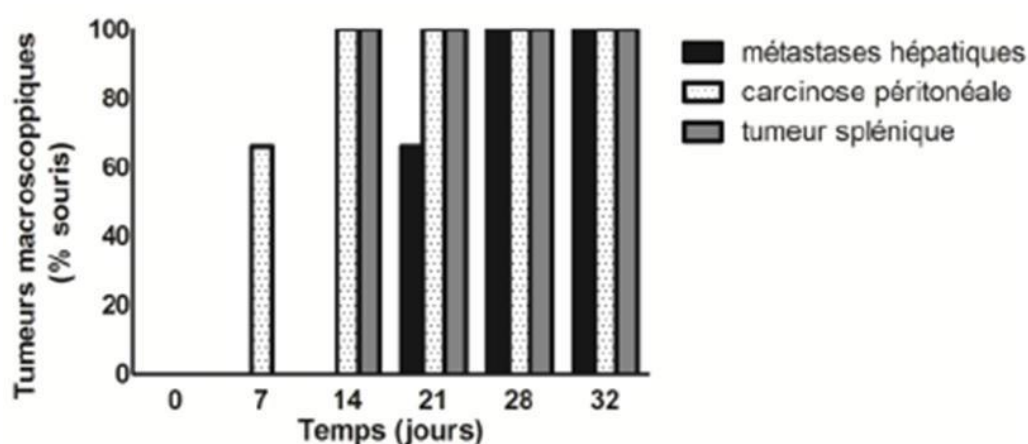


Figure 11. Histoire naturelle des métastases dans notre modèle.

Niche pré-métastatique

Une ligature de l'artère fémorale droite a été réalisée sur une première souris, que l'on nomme "souris ischémie de patte" et une injection intra-splénique de cellules CT-26 a été réalisée sur une deuxième souris, que l'on nomme "souris métastase hépatique". Ces deux souris ont été ensuite réopérées avec la technique de parabiose. Les souris sont successivement anesthésiées. Une incision cutanée est réalisée sur le flanc gauche de l'abdomen de la "souris ischémie de patte" et sur le flanc droit de l'abdomen de la "souris métastase hépatique". Ces deux incisions sont ensuite anastomosées par deux hémisurjets au Prolène 5/0. La peau est fermée à l'aide d'agrafes de Michel (**Figure 12**).

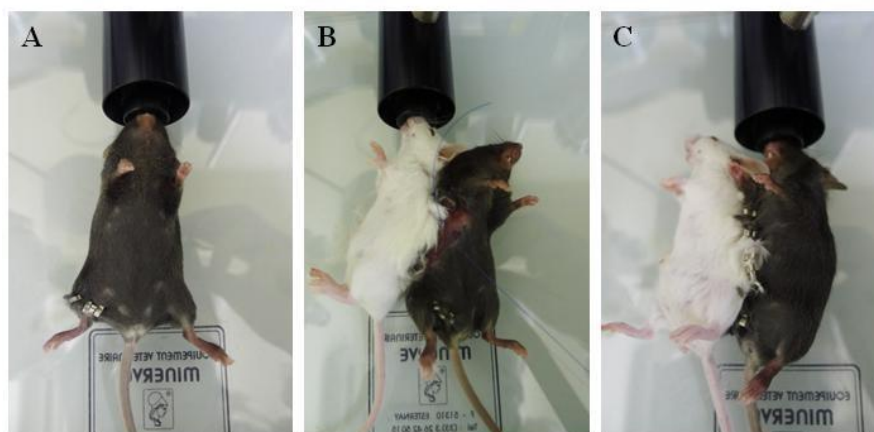


Figure 12. Modèle de parabiose chez la souris. (A) Anesthésie de la première souris. (B) Réalisation de la parabiose. (C) Les deux souris sont liées chirurgicalement.

Deux types de paires ont été réalisés. Le premier modèle est constitué de deux souris femelles de fond génétique différent: CD 45.1 (*GenOway, France*) ("souris ischémie de patte") et CD 45.2 ("souris métastase hépatique"). La présence des progéniteurs endothéliaux médullaires mobilisés après l'ischémie de patte a été analysée par cytométrie en flux sur le sang périphérique et dans le foie des "souris métastase hépatique" aux 7 et 9^{ème} jours de l'expérimentation. La présence des cellules marquées CD 45.1 provenant des souris CD 45.1 a été analysé par cytométrie en flux sur le sang périphérique et dans le foie des "souris métastase hépatique" et a servi de contrôle.

Le deuxième modèle est constitué d'une souris male BALC/c ("souris ischémie de patte") et d'une souris femelle BALC/c ("souris métastase hépatique"). Aux 7 et 11^{ème} jours de l'expérimentation, les animaux ont été sacrifiés. Les foies des souris femelles ("souris métastase hépatique") ont été fixés et inclus en paraffine pour des analyses immunohistochimiques. Les cellules de la souris male ("souris ischémie de patte") possèdent le marquage N-terminal du gène SRY (Sex-determining Region of Y chromosome) ont été détectées à l'aide d'anticorps de rat anti-SRY (1/400, Santa Cruz Biotechnologies, US).

Nous montrons les deux résultats suivants. Aux 7 et 9^{ème} jours, des cellules positives pour le CD 45.1 provenant de souris CD 45.1 "ischémie de patte" sont détectées dans le sang périphérique et dans le foie des souris CD 45.2 "métastase hépatique". Ces cellules CD 45.1+ sont également positives pour le marquage CD34+/VEGFR2+. Ce résultat montre qu'il existe dès le 7^{ème} jour des progéniteurs endothéliaux mobilisés qui circulent dans le sang périphérique et dans le foie (**Figures 13 et 14**).

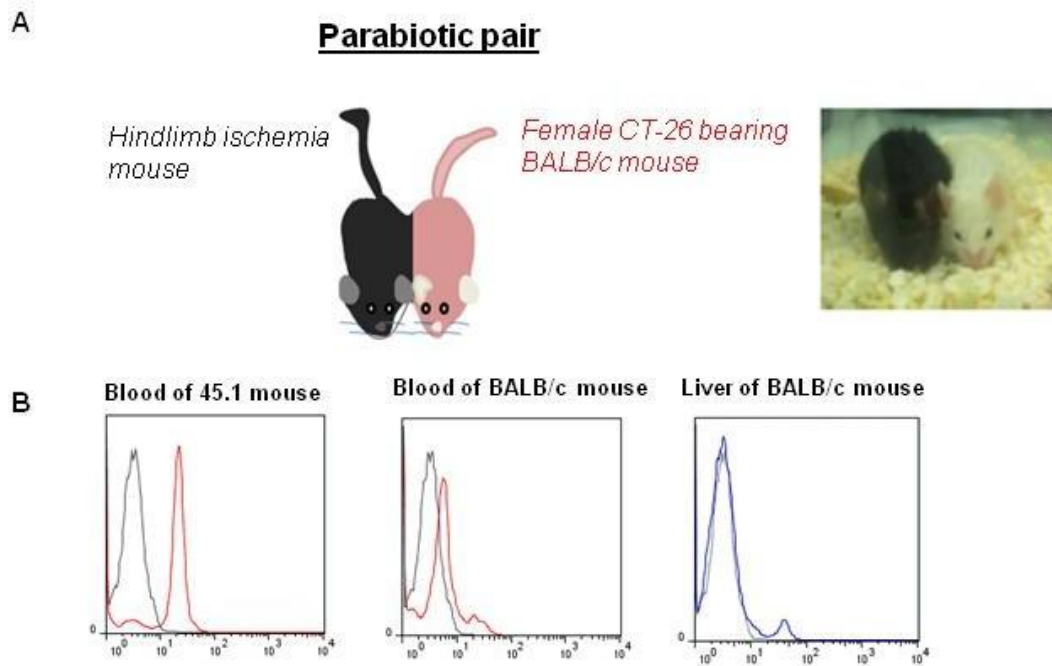


Figure 13. Les progéniteurs endothéliaux mobilisés dans la circulation sanguine par la ligature de l'artère fémorale vont se localiser précocement dans le foie des souris ayant reçu l'injection intra-splénique de CT-26. (A) Modèle expérimental de la parabiose. (B) Cytométrie en flux montrant la présence de cellules marquées CD 45.1 "ischémie de patte" dans le sang et foie de la souris CD 45.2 "métastase hépatique".

Detected cells in BALB/c mice	Day 7		Day 9	
	Blood	Liver	Blood	Liver
CD45.1 positive cells	+	+	+	+
CD45.1/CD34/VEGFR2- positive cells	+	+	+	+

Figure 14. Les progéniteurs endothéliaux mobilisés dans la circulation sanguine par la ligature de l'artère fémorale vont se localiser précocement dans le foie des souris ayant reçu l'injection intra-splénique de CT-26.

Aux 7 et 11^{ème} jours, nous mettons en évidence la présence de cellules provenant de la souris mâle "ischémie de patte" dans le foie des souris femelles "métastase hépatique" par immunohistochimie (**Figure 15**). Ce résultat montre que les progéniteurs endothéliaux mobilisés dans la circulation sanguine se localisent dans le foie, et ce avant l'apparition de métastases hépatiques macroscopiquement visibles.

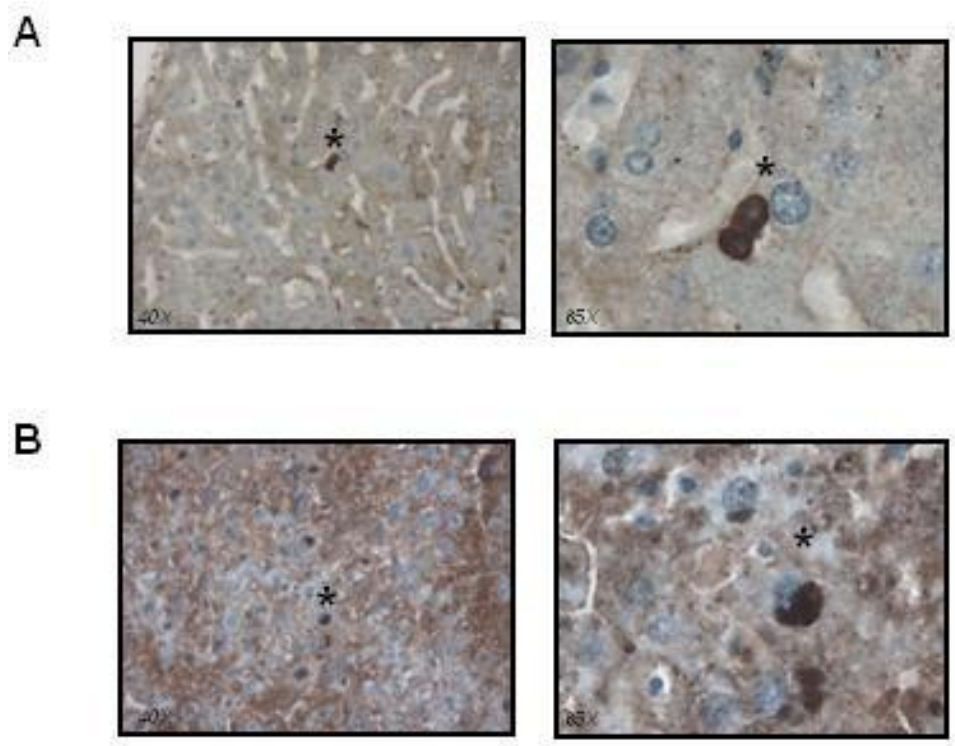


Figure 15. Analyse en immunohistochimie montrant la présence de cellules de souris males "ischémie de patte" () dans le foie de souris femelles "métastase hépatique". (A) 7^{ème} jour. (B) 11^{ème} jour.*

5.2. Résection de la tumeur colorectale et angiogénèse des métastases hépatiques

5.2.1. Objectif

Le but de ce travail de recherche translationnelle était d'étudier la relation entre résection première de la tumeur primitive avant une chirurgie des métastases hépatiques et l'angiogénèse tumorale hépatique.

5.2.2. Matériels et méthodes

Il s'agit d'une analyse de la densité micro-vasculaire par une évaluation immunohistochimique semi-quantitative de l'expression du CD34 au sein des métastases hépatiques. L'analyse a été réalisée sur des pièces opératoires d'hépatectomie disponibles dans la tumorotheque de l'Hôpital Henri Mondor (Créteil, France). Les données cliniques et biologiques des patients proviennent de la série monocentrique de métastases hépatiques synchrones de l'Hôpital Henri Mondor. Deux groupes de patients ont été constitués: un groupe "foie premier" (n = 8) et un groupe "primitif premier" (n = 12). L'évaluation du marquage au CD34 sur les coupes histologiques de métastases hépatiques a été réalisée par le Dr Julien Calderaro, anatomopathologiste à l'Hôpital Henri Mondor. L'analyse des lames a été réalisée en aveugle par le pathologiste sans avoir connaissance de la stratégie chirurgicale des patients (**Figure 16**).

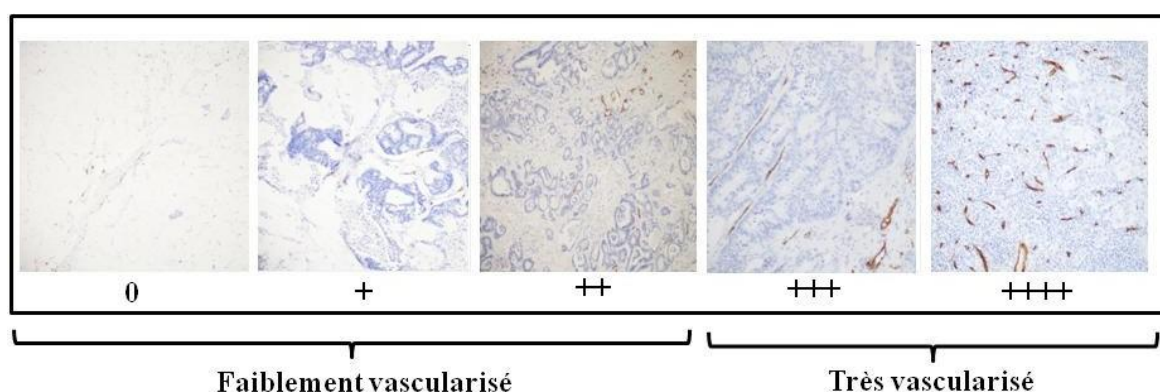


Figure 16. Densité micro-vasculaire par immunohistochimie (anticorps anti-CD34) dans les métastases hépatiques. Evaluation semi-quantitative (0; 1:++; 2:+++; 3:++++; 4:+++++). Faiblement vascularisé < 2 versus Très vascularisé > 2.

5.2.3. Résultats non publiés n°2: La présence d'une tumeur primitive dans les cancers colorectaux stade IVA métastatique au foie est associée à une augmentation de l'angiogénèse tumorale hépatique.

Entre 1989 et 2013, 161 patients ont été opérés de métastases hépatiques synchrones d'origine colorectale à l'hôpital Henri Mondor. Tous ces malades ont eu une stratégie chirurgicale en deux temps: 145 patients ont eu une résection du primitif dans un premier temps puis une exérèse chirurgicale des métastases hépatiques dans un second temps (primitif premier) et 16 patients ont eu une exérèse chirurgicale des métastases hépatiques dans un premier temps puis une résection de la tumeur primitive dans un second temps (foie premier). Parmi ces 161 patients, un groupe de 20 patients opérés entre 2010 et 2013 a été analysé: 8 malades dans le groupe foie premier et 12 malades dans le groupe primitif premier. Les données démographiques et tumorales des patients sont reportées dans le **tableau 1**.

Table 1. Clinicopathologic characteristics of patients according to the type of strategy

	Synchronous LM with PT resected (n = 12)	Synchronous LM with PT still in place (n = 8)	P value
Age, years	63 ± 15	63 ± 10	0.93
Sex, male/female	5/7	5/3	0.36
Preoperative CEA levels, ng/mL	780 ± 1862	177 ± 107	0.54
Colon/rectum	10/2	4/4	0.11
<i>Liver metastases</i>			
Preoperative chemotherapy	11	8	0.40
Preoperative Bevacizumab	6	4	1
Preoperative Cetuximab	1	3	0.11
Mean maximum tumor size, mm (pathology)	41 ± 23	81 ± 43	0.01
Tumor number multiple (pathology)	10	6	0.65
Positive resection margin (pathology)	3	1	0.49

Footnotes: CEA indicates carcinoembryonic antigen; LM indicates liver metastases; PT, primary tumor

*i.e, hepatectomy in case of classical strategy (PT resection followed by hepatectomy) or PT resection in case of reverse strategy (hepatectomy followed by PT resection). Continuous data are given as mean (standard deviation) and categorical variables are presented as numbers (percentages).

L'analyse semi-quantitative en immunohistochimie de l'expression du CD34 au sein des métastases hépatiques montre que la présence de la tumeur primitive au moment de l'hépatectomie est associée à une augmentation de l'angiogénèse tumorale au sein des métastases hépatiques ($p < 0.0001$; **Figure 17**).

La médiane de survie dans le groupe "primitif premier" est significativement supérieure à celle du groupe "foie premier" (36 vs. 19 mois; $p = 0.03$; **tableau 2**). Le taux de récurrence globale et le type de récurrence sont comparables entre les deux groupes.

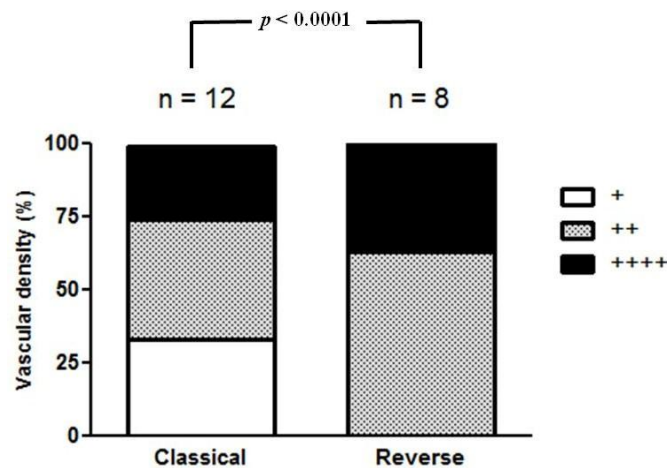


Figure 17. Analyse de la densité micro-vasculaire par immunohistochimie (anticorps anti-CD34) dans les métastases hépatiques réséquées selon que la tumeur primitive est en place ou pas

Table 2. Survival outcomes according to the type of strategy

	Synchronous LM with PT resected (n = 12)	Synchronous LM with PT still in place (n = 8)	P value
Overall survival	36 ± 16	19 ± 14	0.03
Overall recurrence	10 (83%)	6 (75%)	0.65
Extrahepatic as first recurrence	2 (17%)	4 (50%)	0.11
Intrahepatic as first recurrence	2 (17%)	2 (25%)	0.65
Delay of recurrence from the last surgery (dys)*	639 ± 540	274 ± 276	0.09

Footnotes: LM indicates liver metastases; PT, primary tumor

*i.e, hepatectomy in case of classical strategy (PT resection followed by hepatectomy) or PT resection in case of reverse strategy (hepatectomy followed by PT resection).

Continuous data are given as mean (standard deviation) and categorical variables are presented as numbers (percentages).

5.3. Discussion

Dans ce travail, nous montrons que la présence d'une tumeur primitive est associée à des modifications angiogéniques au sein des métastases hépatiques. L'angiogénèse tumorale des métastases hépatiques est augmentée lorsque l'hépatectomie est réalisée en présence de la tumeur primitive (stratégie foie premier).

Ces résultats corroborent ceux d'une étude hollandaise réalisée sur 20 patients et publiée en 2013 ²¹. Dans cette étude, l'expression des déterminants moléculaires de l'angiogénèse dans les métastases hépatiques et dans le parenchyme hépatique adjacent a été analysée dans trois situations différentes: (1) métastases hépatiques synchrones réséquées en même temps que la tumeur primitive (n = 6), (2) métastases hépatiques synchrones réséquées avec une tumeur primitive réséquée 3 à 12 mois avant (n = 10), et (3) métastases hépatiques métachrones réséquées (n = 14). Trois résultats majeurs se dégagent de cette étude: (i) l'activité d'angiogénèse traduite par l'expression du CD31 et CD34 est significativement plus élevée en cas de métastases synchrones que métachrones, (ii) elle est significativement plus élevée dans le parenchyme hépatique adjacent aux métastases par rapport aux lésions elles-mêmes, et (iii) elle est la plus élevée dans le groupe de patients qui ont eu une résection simultanée des métastases hépatiques et du primitif. Ces données suggèrent qu'en présence d'une tumeur primitive, le microenvironnement hépatique est un environnement favorable à l'angiogénèse tumorale et la croissance métastatique. Cependant, cette étude n'inclut pas de malades qui ont eu une stratégie type foie premier.

Notre étude a des limites: (i) le nombre de patients est faible (n = 20). Cependant elle inclut 8 malades qui ont eu un foie premier, soit 50% de notre expérience. Une étude multicentrique (250 centres) publiée en 2012 par le registre Livermetsurvey ne compte que 58 malades avec une stratégie type foie premier ¹¹, et (ii) l'analyse de l'angiogénèse n'a été réalisée qu'au sein des métastases hépatiques et non dans le parenchyme hépatique non tumoral à proximité des lésions.

5.3. Exérèse première de la tumeur colorectale et survie s globale et sans récidive

5.3.1. Résumé

L'impact d'une exérèse première de la tumeur primitive sur le pronostic oncologique des patients avec des cancers colorectaux stade IVA métastatique au foie est un sujet encore débattu dans nos réunions de concertations pluridisciplinaires.

De 1989 à 2013, 161 patients avec un cancer colorectal stade IVA métastatique au foie ont eu une hépatectomie à l'Hôpital Henri Mondor. Nous avons analysé, de façon rétrospective, l'impact de la stratégie chirurgicale (primitif premier versus foie premier) sur le pronostic oncologique en termes de survie globale, survie sans récidive et type de récidive. Nous avons comparé 145 patients avec une stratégie type primitif premier (suivi moyen de 35 mois) à 16 patients avec une stratégie foie premier (suivi moyen de 31 mois).

Les patients qui avaient une chirurgie des métastases hépatiques avant la résection du primitif avaient une maladie métastatique plus sévère avec des lésions hépatiques de taille plus importante et un taux d'ACE avant l'hépatectomie qui était significativement plus élevé. D'autre part les tumeurs rectales étaient beaucoup plus fréquentes dans le groupe foie premier. La survie globale (survie globale à 5 ans de 51.5% dans le groupe primitif premier vs. 42.7% dans le groupe foie premier; $p = 0.91$) et la survie sans récidive (survie sans récidive à 5 ans de 20.6% dans le groupe primitif premier vs. 20.5% dans le groupe foie premier; $p = 0.15$) n'étaient pas significativement différentes entre les deux groupes. Le délai de récidive tumorale (peu importe la localisation était significativement plus court dans le groupe foie premier (3.5 mois vers 13 mois; $p = 0.02$) que dans le groupe primitif premier. D'autre part il y avait significativement plus de récidive extra-hépatique dans le groupe foie premier (37.5% vs. 16.6%; $p = 0.04$) que dans le groupe primitif premier.

Pour obtenir des groupes comparables sur le plan de la maladie métastatique, les deux groupes ont été appariés avec un ratio de 1 patient du groupe foie premier pour 2 patients du groupe primitif premier selon un score de propension. Quatorze patients du groupe foie premier ont été appariés à 28 patients du groupe primitif premier. La survie globale (survie globale à 5 ans de 47.7% dans le groupe primitif premier vs. 46.6% dans le groupe foie

premier; $p = 0.94$) et la survie sans récurrence (survie sans récurrence à 3 ans de 33.6% dans le groupe primitif premier vs. 24.2% dans le groupe foie premier; $p = 0.08$) n'étaient pas significativement différentes après appariement. Le délai de récurrence restait plus court (3 vs 13 mois; $p = 0.04$) et il y avait significativement plus de récurrence extra-hépatique (42.9% vs. 10.7%; $p = 0.02$) dans le groupe foie premier après appariement.

- 5.3.2. ARTICLE 3:** La résection première des métastases hépatiques dans les cancers colorectaux stade IVA est associée à une récurrence précoce des métastases extra-hépatiques.

Annals of Surgical Oncology. 2016 23:3024-3032.

Primary tumor versus liver-first strategy in patients with stage IVA colorectal cancer: a propensity score analysis of long-term outcomes and recurrence pattern

Lim C, Doussot A, Osseis M, Salloum C, Gomez Gavara C, Compagnon P, Brunetti F, Calderaro J, Azoulay D.



ORIGINAL ARTICLE – HEPATOBILIARY TUMORS

Primary Tumor Versus Liver-First Strategy in Patients with Stage IVA Colorectal Cancer: A Propensity Score Analysis of Long-term Outcomes and Recurrence PatternChetana Lim, MD^{1,2}, Alexandre Doussot, MD¹, Michael Osseis, MD¹, Chady Salloum, MD¹, Concepcion Gomez Gavara, MD¹, Philippe Compagnon, MD, PhD^{1,3}, Francesco Brunetti, MD¹, Julien Calderaro, MD, PhD^{3,4}, and Daniel Azoulay, MD, PhD^{1,3}¹Department of Digestive, Hepatobiliary and Pancreatic Surgery and Liver Transplantation, Henri Mondor Hospital, Créteil, France; ²INSERM, U965, Paris, France; ³INSERM, U955, Créteil, France; ⁴Department of Pathology, Henri Mondor Hospital, Créteil, France**ABSTRACT****Background.** The optimal strategy in patients with stage IVA colorectal cancer remains debated. This study was designed to compare the long-term outcomes and the pattern of recurrence following classical (CS) versus reverse (RS) strategy.**Methods.** Data from all consecutive patients, who have completed the CS and RS, were retrospectively reviewed. A propensity score matching (PSM) was performed on 1:2 (RS:CS) ratio to obtain two groups matched for tumor characteristics. Survival and recurrence pattern were investigated before and after matching.**Results.** The study population included 161 patients: 145 treated with CS versus 16 with RS. Five-year overall survival (OS, 51.5 vs. 42.7 %, $p = 0.91$) and recurrence-free survival (RFS, 20.5 vs. 20.6 %, $p = 0.15$) were not different between the two strategies. The median time to recurrence (TTR) whatever the site was significantly shorter in the RS group than in the CS group (3.5 vs. 13 months, $p = 0.02$). Extrahepatic recurrence was significantly more frequent (37.5 vs. 16.6 %, $p = 0.04$) and occurred earlier after treatment completion in the RS group than in the CS group (3.4 vs. 16.4 months, $p = 0.009$). Similar findings in terms of OS, RFS, median TTR whatever the site and proportion of extrahepatic recurrence were observed after PSM.**Conclusions.** Stage IVA colorectal cancer patients who have completed the CS or RS had similar OS. Extrahepatic recurrence is more frequent and occurs earlier after RS. Postoperative locoregional therapy and active follow-up strategies should be considered in RS patients.Multimodal management of stage IVA colorectal cancer may achieve long-term survival, and even cure, provided it includes complete resection of the primary tumor (PT) and the liver metastases (LM).¹ The optimal timing of resection of the PT and LM in this setting remains actively debated. Three strategies are available: 1) classic strategy (CS, so-called primary-first strategy), 2) reverse strategy (RS, so-called liver-first strategy), and 3) combined strategy.² The latter includes simultaneous PT and LM resection and avoids delaying surgical resection of both tumor sites. However, this approach often is associated with higher rates of morbidity and mortality and might even impair recurrence-free survival.^{3–6} This strategy is proposed to a highly selected subset of stage IVA patients younger than age 70 years who had colectomy rather than rectal resection combined with minor rather than major hepatectomy.⁷

The dilemma between CS and RS questions when both PT and LM are considered resectable (either upfront or after some form of neoadjuvant treatment) but require more than one operation. The CS improves the selection of patients for liver surgery by the “double test of time and chemotherapy”: patients with an appropriate response to chemotherapy following the PT resection are subsequently operated on for their LM. However, this strategy may abort “half way” because of liver disease progression beyond resectability or appearance of additional extrahepatic metastases. The

© Society of Surgical Oncology 2016

First Received: 29 February 2016

D. Azoulay, MD, PhD
e-mail: daniel.azoulay@hmn.ap-hop-paris.fr

advantage of the RS is to treat the liver first, particularly in patients with marginally resectable liver disease before becoming not resectable in case of progression.⁸ However, in this setting, resection is generally major and associated with operative risk, whereas the PT might progress beyond resectability due to local complications or invasion into surrounding structures.^{9,10}

CS and RS achieve similar overall (OS) and recurrence-free survival (RFS) according to several retrospective studies (Table 1).^{10–15} However, these reports and the subsequent systematic reviews suffer from numerous bias, including the heterogeneity in terms of tumor characteristics, endpoints, and outcomes monitoring.^{10–14,16–25} Furthermore, a better understanding of recurrence patterns and their timing could help not only to adapt postoperative screening for recurrence, but also to tailor adjuvant treatment strategies including locoregional therapies.²⁶

This background motivated us to assess the long-term outcomes of patients who underwent surgical treatment for stage IVA colorectal cancer according to surgical strategy (i.e., CS or RS) and to assess differences, if any, in the timing and patterns of recurrence. This retrospective, single-center analysis of consecutive patients was performed before and after propensity-score matching (PSM) for comparing both strategies.

METHODS

Patients and Study Design

From 1989 to 2013, the charts of all consecutive patients who underwent surgical treatment for synchronous LM were retrieved from a prospectively maintained data file and retrospectively reviewed. The Institutional Review Board approved this study. These two questions were assessed: (1) From the time of the last surgical procedure (i.e., PT resection for RS or LM resection for CS), are the long-term outcomes similar following completed CS and RS? (2) Are the timing and patterns of recurrence similar following CS and RS?

To answer these questions, the study population included all consecutive patients having completed the CS or RS. Stage IVA patients entering into any of the following categories were excluded from the study: (1) simultaneous PT and LM resection; (2) any noncurative procedure; (3) presence of synchronous extrahepatic metastases; (4) patients who underwent urgent PT resection; and (5) death that occurred within 90 days after any surgery.

Oncological Strategy

The author's oncological strategy has been previously described.²⁷ For patients with PT in place and synchronous LM, our strategy has been tailored according to the

TABLE 1 Reported series of the literature comparing classical versus reverse strategy in patients with synchronous colorectal liver metastases

First author, study period (yr)	No. of patients who were planned/have completed the strategy	Extrahepatic disease		Recal cancer, %		Main differences in patient and tumor characteristics		RFS following completed strategy 3.5-year, %		OS following completed strategy 3.5-year, %	
		CS	RS	CS	RS			CS	RS	CS	RS
Bouquet, ¹⁰ 1992–2009 (17)	72/72	43/27	–	48.6	70.4	Age, sex, primary tumor location, chemotherapy	–	–	–	58/79	48/39
Andres, ¹¹ 1974–2010 (36)	–/729	–/38	–	23.2	36.9	Propensity score but differences in terms of primary tumor location and lymph node metastases, radio- and chemotherapy	33/26	30/30	0.839	65/46	68/48
Mayo, ¹² 1982–2011 (29)	–/647	–/28	Yes	26.4	33.6	Primary tumor location, extent of liver disease, chemotherapy	–	–	–	60/45	65/50
Chung, ¹³ 2006–2013 (7)	13/13	12/12	Yes	61.6	38.3	Age, number of hepatic metastases, CA 19-19	29/4–	29/21–	0.57	82/5–	87/51–
Tsai, ¹⁴ 1992–2012 (20)	30/28	10/2	Yes	27	20	Propensity score	–/119	–/40	0.043	–	–
Welsh, ¹⁵ 2004–2014 (10)	463/467	98/92	Yes	27.8	46	Propensity score	–/41.2	–/37	0.083	49.1	47
Present series, 1989–2013 (24)	148/145	20/16	No	20	50	Propensity score	28.3/10.6	20.5/20.5	0.21	67.6/47.6	80/64

CS: classical; RS: reverse strategy; RFS: recurrence-free survival; OS: overall survival; NS: not significant.

– Indicates not available.

* Including “wait and see” policy in two patients.

** Assessing in an intention-to-treat basis.

*** Including patients who underwent simultaneous resection of colorectal and liver metastases.

resectability of the metastatic disease and the location and the extent of the PT. Preoperative chemotherapy was considered before any surgery as described elsewhere.^{10,11}

In case of rectal cancer, chemoradiation was delivered before proctectomy. As in all other series, the program of RS was opened at our unit from the first report of liver-first strategy published by Mentha et al. in 2006.⁸⁻¹³ For all patients, the surgical sequence to achieve complete PT and LM resection was decided on case-by-case basis at a multidisciplinary decision meeting.^{9,12}

In brief, for patients who required a conventional hepatectomy of four segments or less (still maintaining more than 30 % of the parenchyma), surgery was performed before chemotherapy. For patients who required an extended hepatectomy, neoadjuvant chemotherapy was performed with the PT in place. Then, surgery was proposed when the metastatic disease was at least controlled by chemotherapy.

Combined PT and LM resection was attempted except for patients with complicated (bleeding, obstruction, perforation) or locally advanced (requiring preoperative radiotherapy and/or locoregional resection) PT. In these situations, delayed liver resection was performed and patients received interval chemotherapy (CS). Patients with initially unresectable LM were treated with chemotherapy. Patients who responded were offered a RS, as were patients with resectable but advanced LM, which might become unresectable if the PT was resected first (RS).

Postoperative Management

Tumor markers measurement and computed tomography (CT) scan for recurrence screening were performed the first month postoperatively and then every 3 months for the first 2 years and every 6 months for the following 3 years.²⁸ The diagnosis of recurrence was based on the above explorations completed by site-specific cross imaging in case of symptoms. Biopsy of suspicious lesions for liver and extrahepatic recurrence was performed, whenever needed.

Statistical Analysis

Continuous variables are presented as the means \pm standard deviations and were compared using Student's *t* test or the nonparametric Mann-Whitney test, as appropriate. Categorical variables are presented as numbers (percentages) and were compared across groups using the χ^2 or Fischer's exact test, as appropriate.

Long-term outcomes were measured as follows: (1) OS from the last surgical procedure (PT resection for RS or resection of LM for CS) to the date of death; and (2) RFS from the date of the last surgical procedure to the date of

the first recurrence at any site or death, respectively.¹¹ Survival rates were calculated using the Kaplan-Meier method and compared using log-rank tests.

In a second step, the PSM was performed to account for some differences in the patient and tumor characteristics in groups CS and RS that could have an impact on survival. The propensity scores were estimated using a logistic regression model that included the following six covariates: primary tumor location, preoperative carcinoembryonic antigen (CEA) level, neoadjuvant chemotherapy, tumor size and number, and surgical resection margins. A 1:2 "nearest neighbor" match paradigm was used; each RS patient was matched with the two CS patients who had the closest estimated propensity score. After matching, the two groups were compared to control the covariate balance and the similarity in the baseline covariates between groups. Then, the two matched groups were compared with respect to the goals of the study. All statistical analyses and PSM were performed with SPSS software (Statistical Package for Social Science, IBM SPSS Statistics, version 23 for Macintosh; IBM, Armonk, NY). The present study complies with the RECORD guidelines.²⁹

RESULTS

Study Population

As shown in Fig. 1, during the study period, a total of 244 patients with synchronous LM were evaluated at our liver unit working as a tertiary center. Overall, 83 patients were excluded from the study: 70 for simultaneous resection of PT and LM, 6 for synchronous lung metastases, 4 following death within the 90 days of surgery, and 3 for tumor progression following the first step of the planned strategy.

Among the 148 patients who were planned for CS, 2 patients died following surgery (of PT, $n = 0$; of LM, $n = 2$) and 1 patient did not undergo the second step of a two-stage procedure due to liver disease progression and lung metastatic appearance. Among the 20 patients who were planned for RS, 2 patients died following surgery (of PT, $n = 0$; of LM, $n = 2$) and two patients did not have PT resection due to tumor progression. Finally, CS and RS were considered as completed in 145 of 148 (98 %) and 16 of 20 (80 %) patients respectively ($p = 0.6$). The study population included these 161 patients.

Study Population Characteristics

Compared with CS patients, RS patients were more likely to have rectal cancer ($p = 0.007$), preoperative CEA >5 ng/mL ($p = 0.004$), and a larger liver tumor size ($p = 0.002$). The two groups were statistically similar

FIG. 1 Flow chart of the study

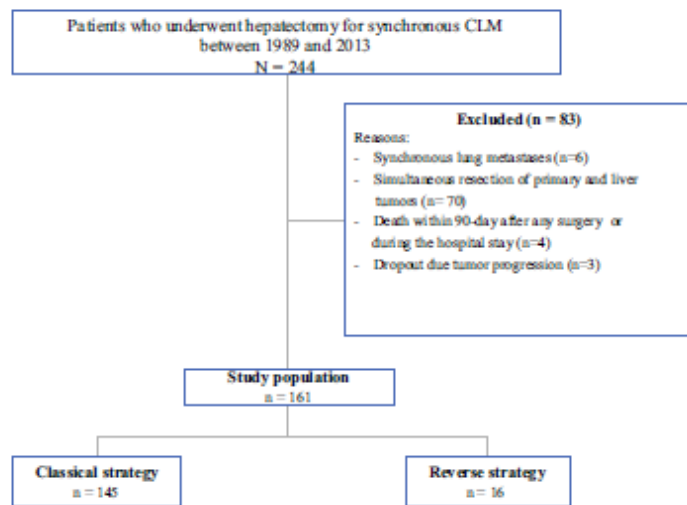


TABLE 2 Clinicopathologic characteristics of patients according to the type of strategy

	All patients N = 161	Classical strategy n = 145 (90 %)	Reverse strategy n = 16 (10 %)	P value
Age, year	61.4 ± 10.6	61.5 ± 10.8	60.3 ± 8.2	0.68
Age > 70 year	34 (21.1)	32 (22)	2 (12.5)	0.37
Sex, male/female	91 (56.5)/70 (43.5)	83 (57.2)/62 (42.7)	8 (50)/8 (50)	0.58
Preoperative CEA levels, ng/mL	374 ± 1636	280 ± 1262	985 ± 3147	0.12
Preoperative CEA >5 ng/mL	76 (47.2)	63 (43.4)	13 (81.3)	0.004
Primary disease				
Colon/rectum	124 (77)/37 (23)	116 (80)/29 (20)	8 (50)/8 (50)	0.007
Liver metastases				
Neoadjuvant chemotherapy	135 (83.9)	121 (83.4)	14 (87.5)	0.68
Mean maximum tumor size, mm (pathology)	46 ± 33	43 ± 30	71 ± 47	0.002
Maximum tumor size >50 mm (pathology)	43 (26.7)	34 (23.4)	9 (56.3)	0.005
Tumor number (pathology)	3 ± 2	3 ± 2	3 ± 2	0.73
Tumor number >3 (pathology)	49 (30.4)	43 (29.7)	6 (67.2)	0.52
Positive resection margin (pathology)	29 (18.0)	24 (16.6)	5 (47.8)	0.15
Two-stage hepatectomy	15 (9.3)	12 (8.3)	3 (18.8)	0.17

CEA carcinoembryonic antigen

Continuous data are given as mean (standard deviation) and categorical variables are presented as numbers (percentages)

regarding age ($p = 0.68$), sex ($p = 0.58$), neoadjuvant chemotherapy ($p = 0.68$), number of liver metastases ($p = 0.73$), and surgical margins ($p = 0.15$; Table 2). Preoperative antiangiogenic regimens (including bevacizumab and cetuximab) were administered in 41 (28 %) patients in the CS group and 11 (69 %) patients in the RS group ($p = 0.001$; Table 3). Preoperative bevacizumab was administered in 30 (21 %) patients in the CS group and

7 (44 %) patients in the RS group ($p = 0.04$). Yet, 88 (55 %) patients received adjuvant chemotherapy after hepatectomy. No liver-directed therapy was used.

Postoperative Morbidity

There was no significant difference in terms of postoperative complications (48/145 in the CS group vs. 7/16 in

Primary Tumor Versus Liver-First Strategy in Patients with Stage IVA Colorectal Cancer

TABLE 3 Chemotherapy regimens administered before and after hepatectomy according to the type of strategy

	All patients N = 161	Classical strategy n = 145 (90 %)	Reverse strategy n = 16 (10 %)
Preoperative chemotherapy	135 (84)	121 (83)	14 (88)
Conventional protocols	81 (50)	79 (54)	2 (13)
LV5FU2	16 (10)	15 (10)	1 (6)
Folfox	47 (29)	46 (32)	1 (6)
Folfiri	13 (8)	13 (9)	0
Xelox/xeloda	5 (3)	5 (3)	0
Conventional protocols and anti-angiogenic therapies	52 (32)	41 (28)	11 (69)
Bevacizumab	37 (23)	30 (21)	7 (44)
Cetuximab	15 (9)	11 (8)	4 (25)
5FU alone	2 (1)	1 (69)	1 (6)
Postoperative chemotherapy	88 (55)	76 (52)	12 (75)
Conventional protocols	59 (37)	51 (35)	8 (50)
LV5FU2	13 (8)	11 (8)	2 (13)
Folfox	23 (14)	21 (14)	2 (13)
Folfiri	17 (11)	13 (9)	4 (25)
Xelox/xeloda	6 (4)	6 (4)	0
Conventional protocols and anti-angiogenic therapies	26 (16)	22 (15)	4 (25)
Bevacizumab	14 (9)	12 (8)	2 (13)
Cetuximab	12 (7)	10 (7)	2 (13)
5FU alone	3 (2)	3 (2)	0

5FU 5-fluorouracil; LV5FU2 combination 5-fluorouracil and folinic acid

the RS group; $p = 0.39$) and rate of reoperation (3/48 in the CS group vs. 2/7 in the RS group; $p = 0.06$) between the two groups.

Long-Term Outcomes

No patient was lost for follow-up, and the mean follow-up was 35 ± 28 months and 31 ± 47 months for groups CS ($n = 145$) and RS ($n = 16$), respectively ($p = 0.61$). OS at 1, 3, and 5 years was 93.1, 66.5, and 51.5 % respectively in group CS versus 100, 64, and 42.7 % respectively in group RS ($p = 0.91$; Fig. 2a). RFS at 1, 3, and 5 years was 68.5, 42.1, and 20.6 % respectively in group CS and 38.5, 30.8, and 20.5 % respectively in group RS ($p = 0.15$; Fig. 2b).

Timing and Pattern of Recurrence

During the follow-up period, recurrence was observed in 93 (64.1 %) patients in the CS group and 11 (68.8 %) patients in the RS group ($p = 0.80$). The median time to recurrence whatever the site was significantly shorter in the RS group than in the CS group (3.5 vs. 13 months, $p = 0.02$). The site of the first recurrence was as follows: intrahepatic ($n = 37$; 35.6 %), extrahepatic ($n = 30$; 28.8 %), and extra- and intrahepatic ($n = 37$; 35.6 %).

First recurrence site was extrahepatic in a significantly higher proportion following RS 6 of 16 (37.5 %) compared with CS (24/145; 16.6 %; $p = 0.04$). The median time to this pattern of recurrence was shorter in the RS group than in the CS group (3.4 vs. 16.4 months, $p = 0.009$). First recurrence site was intrahepatic in 32 of 145 (22.1 %) CS patients versus 5 of 16 (31.3 %) RS patients ($p = 0.41$). The median time to this pattern of recurrence was similar in both groups: 4 versus 14 months for RS versus CS patients respectively ($p = 0.36$).

First recurrence site was both extrahepatic and intrahepatic in a significantly higher proportion following CS (37/145; 25.5 %) compared with RS (0/16; 0 %; $p = 0.02$). The median time to this pattern of recurrence was 9 months in the CS group.

Survival and Recurrence Pattern Analysis using Propensity Score Matching

After PSM, 14 of 16 RS patients could be matched with 28 of 145 CS patients with a 1:2 ratio. No covariates had a standardized mean difference >0.2 .³⁰ The baseline characteristics of the matched study population (42 patients) are summarized in Table 4. There were no significant differences in the demographic or operative characteristics between groups. Preoperative antiangiogenic regimens

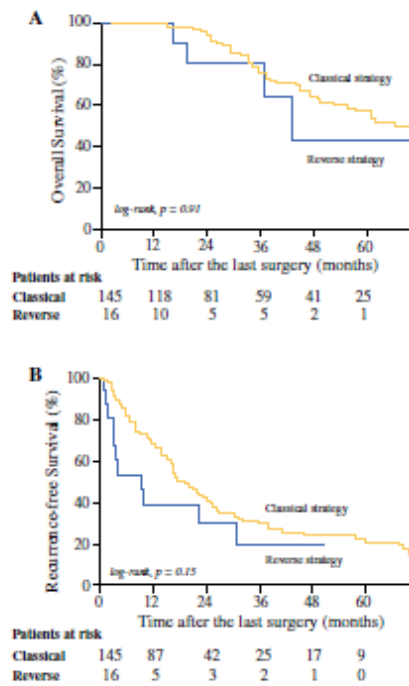


FIG. 2 Overall (a) and recurrence-free (b) survival curves stratified according to the strategy ($n = 161$)

(including bevacizumab or cetuximab) were administered in ten (36 %) patients in the CS group and ten (71 %) patients in the RS group ($p = 0.03$). Preoperative bevacizumab was administered in nine patients in the CS group and six patients in the RS group ($p = 0.5$).

CS and RS groups had similar 5-year OS (47.7 % vs. 46.7 %, respectively, $p = 0.94$). Although not statistically significant, a trend towards longer 3-year RFS was found following CS compared with RS (33.6 % vs. 24.2 %, respectively, $p = 0.08$; Fig. 3). The median time to recurrence at any site was significantly shorter in the RS group than in the CS group (3 vs. 13 months; $p = 0.04$; Fig. 3).

Recurrence patterns were significantly different between the two therapeutic strategies. First recurrence site was thus extrahepatic in a significantly higher proportion following RS group (6/14; 42.9 %) compared with CS group (3/28; 10.7 %; $p = 0.02$). First recurrence site was both extra- and intrahepatic in a significantly higher proportion following CS (7/28; 25 %) compared with RS (0 %; $p = 0.04$). There was no significant difference in the proportion of initial intrahepatic recurrence between the CS and RS groups (5/28; 17.9 % vs. 3/11; 24.4 %; $p = 0.78$).

DISCUSSION

The present study confirms that CS and RS achieve similar OS and RFS upon analysis of the whole population and after PSM. In addition time to recurrence was significantly shorter following RS. First recurrence site was

TABLE 4 Clinicopathologic characteristics of patients according to the type of strategy after matching

	Case liver-first approach $n = 14$	Matched primary-first approach $n = 28$	P value
Variables used for propensity score matching			
Colon/rectum	7 (50)/7 (50)	15 (54)/13 (46)	0.83
Preoperative CEA levels, ng/mL	197 \pm 196	747 \pm 2236	0.77
Preoperative CEA >5 ng/mL	12 (86)	23 (82)	0.77
Neoadjuvant chemotherapy	12 (86)	24 (85.7)	>0.99
Mean maximum liver tumor size, mm (pathology)	58.8 \pm 38.1	58.0 \pm 37.7	0.95
Maximum liver tumor size >50 mm (pathology)	7 (50)	13 (46)	0.83
Liver tumor number (pathology)	3.4 \pm 2.6	2.6 \pm 1.6	0.21
Liver tumor number >3 (pathology)	6 (43)	8 (29)	0.35
Positive resection margin after hepatectomy (pathology)	3 (21)	7 (25)	0.80
Other variables			
Age, year	59 \pm 7	57 \pm 12	0.60
Age >70 year	1 (7)	5 (18)	0.35
Sex, male/female	6 (43)/8 (57)	17 (61)/11(39)	0.27
2-stage hepatectomy	3 (21)	4 (14)	0.56

CEA carcinoembryonic antigen

Continuous data are given as mean (standard deviation) and categorical variables are presented as numbers (percentages)

Primary Tumor Versus Liver-First Strategy in Patients with Stage IVA Colorectal Cancer

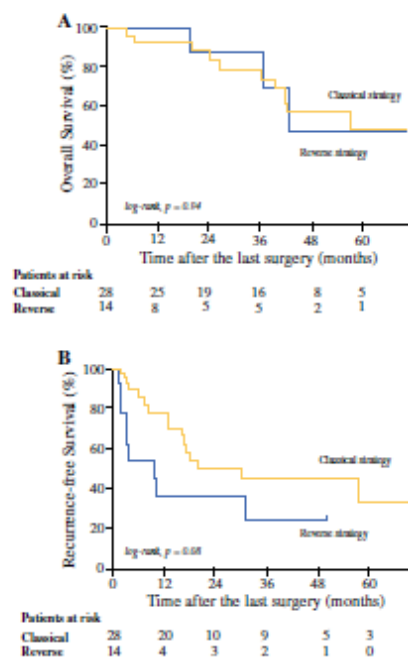


FIG. 3 Overall (a) and recurrence-free (b) survival curves stratified according to the strategy after propensity score matching

extrahepatic in a significantly higher proportion following RS compared with CS. First recurrence site was intrahepatic in similar proportions following RS or CS and within similar delay. First recurrence site was both extrahepatic and intrahepatic in a significantly higher proportion following CS.

However, our comparison from the whole study population suffers from the following main caveat: the intrinsic noncomparability of the two compared populations (Table 1): a significantly higher proportion of rectum cancer and as well a significantly higher proportion of patients with more advanced liver disease were found in the RS group. These limitations are common to most studies.^{10-12,14}

This heterogeneity weakens the value of recent systematic reviews, showing no difference in OS and RFS following CS compared with RS.¹³⁻¹⁹

We used propensity-score matching to overcome the problem of confounding from the prognostic variables–outcome association and to emulate a randomized comparison that will probably never be performed. Using this methodology, OS appeared to be similar between the two groups, as found by others.¹¹ We confirm with this methodology similar OS and RFS as recently reported by

Welsh et al.¹⁵ Although the latter included the largest single-centre population LM resection first reported ($n = 98$) and provided a sufficient follow-up to capture almost all recurrences, this recent study had the following limitations: (1) while they reported an intent to treat survival rate of 44 % at 5 years, the survival rate of 82 patients following completed liver-first approach is missing; (2) mortality was measured at 30 days and has not been excluded upon long-term outcome assessment, and (3) timing and pattern of recurrence were not reported.

To the best of our knowledge, this is the first study to evaluate the recurrence pattern of these two approaches in a homogeneous cohort of patients. An interesting finding in this study, although not significant, was a trend towards shorter RFS was found for patients who underwent a RS (24.2 %) compared with those who underwent a CS (33.6 %, $p = 0.08$) and RS was associated with high rate of extrahepatic recurrence. These results suggest that a high incidence of extrahepatic metastases may be the cause of the poor RFS observed after RS. This discrepancy might be explained by several reasons: 1) the liver first group was small, and 2) this study included patients treated (before 2000) with less efficient chemotherapy regimens (5-fluorouracil and combination 5-fluorouracil and folinic acid) and those treated with new standard chemotherapy regimens (Folfox regimens or Folfiri regimens). In addition, bevacizumab and cetuximab association with these new standard chemotherapy protocols can further improve survivals. These improvements in the effectiveness of chemotherapy represent a bias that may explain why there was no difference in OS following CS compared with RS.

Our results corroborate those of one recent study, which reported that the RS is significantly associated with poor RFS ($p = 0.043$) because of a relatively high incidence of number and site of recurrence.¹³ However, this study includes several relevant limitations: extrahepatic disease was present in 10 % of patients and the rate of completion of the RS was only 20 %. These findings imply that postoperative locoregional therapy should be considered after resection of the PT in RS patients and these patients should undergo close follow-up with combined interval CT scan of the chest and fluorodeoxyglucose positron emission tomography.^{31,32} Although the reasons for these findings are obviously multifactorial and controversial, these clinical results may be explained by a biological rationale suggesting that the behavior of metastatic disease could be dependent on whether the primary tumor stays or not in place.³³

There are several shortcomings in this study. As with other retrospective studies, there is a patient selection bias inherent to a tertiary liver center. Although the limited sample size of patients included in the group RS may represent other limitation, one recent multicenter study included only 58 patients from 250 centers, which makes

our single-center study is an honorable series.¹¹ Yet, all patients included in the present study did not receive equally modern chemotherapy protocols, and some patients received targeted therapies when they became available. Finally, we could not investigate the differences in the survival outcomes and recurrence pattern between patients with wild-type KRAS and those with a KRAS gene mutation because of missing data.^{34–36}

In conclusion, patients with synchronous CLM and intact PT managed with either CS or RS have similar OS and RFS. However, RS is associated with a relatively high incidence of and early time to extrahepatic recurrence. These data may be useful to tailor patients at high risk of recurrence for adjuvant locoregional therapy and for active follow-up strategies.

FUNDING None.

CONFLICT OF INTEREST None.

REFERENCES

- Adam R, de Gramont A, Figueras J, et al. Managing synchronous liver metastases from colorectal cancer: a multidisciplinary international consensus. *Cancer Treat Rev*. 2015;41(9):729–41.
- Mentha G, Majno P, Terraz S, et al. Treatment strategies for the management of advanced colorectal liver metastases detected synchronously with the primary tumour. *Eur J Surg Oncol*. 2007;33 Suppl 2:S76–83.
- Reddy SK, Pawlik TM, Zorž D, et al. Simultaneous resections of colorectal cancer and synchronous liver metastases: a multi-institutional analysis. *Ann Surg Oncol*. 2007;14(12):3481–91.
- Tanaka K, Shimada H, Matsuo K, et al. Outcome after simultaneous colorectal and hepatic resection for colorectal cancer with synchronous metastases. *Surgery*. 2004;136(3):650–9.
- Thelen A, Jonas S, Bendken C, et al. Simultaneous versus staged liver resection of synchronous liver metastases from colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis*. 2007;22(10):1269–76.
- de Haas RJ, Adam R, Wicherts DA, et al. Comparison of simultaneous or delayed liver surgery for limited synchronous colorectal metastases. *Br J Surg*. 2010;97(8):1279–89.
- Yin Z, Liu C, Chen Y, et al. Timing of hepatectomy in resectable synchronous colorectal liver metastases (SCRLM): Simultaneous or delayed? *Hepatology*. 2013;57(6):2346–57.
- Mentha G, Majno PE, Andres A, et al. Neoadjuvant chemotherapy and resection of advanced synchronous liver metastases before treatment of the colorectal primary. *Br J Surg*. 2006;93(7):872–8.
- Poultides GA, Servais EL, Saltz LB, et al. Outcome of primary tumor in patients with synchronous stage IV colorectal cancer receiving combination chemotherapy without surgery as initial treatment. *J Clin Oncol*. 2009;27(20):3379–84.
- Brouquet A, Mortenson MM, Vauthey JN, et al. Surgical strategies for synchronous colorectal liver metastases in 156 consecutive patients: classic, combined or reverse strategy? *J Am Coll Surg*. 2010;210(6):934–41.
- Andres A, Toso C, Adam R, et al. A survival analysis of the liver-first reversed management of advanced synchronous colorectal liver metastases: a LiverMetSurvey-based study. *Ann Surg*. 2012;256(5):772–8; discussion 778–9.
- Mayo SC, Pulitano C, Marques H, et al. Surgical management of patients with synchronous colorectal liver metastasis: a multi-center international analysis. *J Am Coll Surg*. 2013;216(4):707–16; discussion 716–8.
- Tanaka K, Murakami T, Matsuo K, et al. Preliminary results of 'liver-first' reverse management for advanced and aggressive synchronous colorectal liver metastases: a propensity-matched analysis. *Dig Surg*. 2015;32(1):16–22.
- Okuno M, Hatano E, Kasai Y, et al. Feasibility of the liver-first approach for patients with initially unresectable and not optimally resectable synchronous colorectal liver metastases. *Surg Today*. 2015.
- Welsh FK, Chandrakumar K, John TG, et al. Propensity score-matched outcomes analysis of the liver-first approach for synchronous colorectal liver metastases. *Br J Surg*. 2016.
- De Rosa A, Gomez D, Brooks A, Cameron IC. 'Liver-first' approach for synchronous colorectal liver metastases: is this a justifiable approach? *J Hepatobiliary Pancreat Sci*. 2013;20(3):263–70.
- Donati M, Stavrou GA, Stang A, et al. 'Liver-first' approach for metastatic colorectal cancer. *Future Oncol*. 2015;11(8):1233–43.
- Jegatheeswaran S, Mason JM, Hancock HC, Siriwardena AK. The liver-first approach to the management of colorectal cancer with synchronous hepatic metastases: a systematic review. *JAMA Surg*. 2013;148(4):385–91.
- Kelly ME, Spolverato G, Le GN, et al. Synchronous colorectal liver metastasis: a network meta-analysis review comparing classical, combined, and liver-first surgical strategies. *J Surg Oncol*. 2014;111(3):341–51.
- Lam VW, Laurence JM, Pang T, et al. A systematic review of a liver-first approach in patients with colorectal cancer and synchronous colorectal liver metastases. *HPB (Oxford)*. 2013;16(2):101–8.
- Patrij L, Klijck R, Klijck R, et al. The surgical treatment of patients with colorectal cancer and liver metastases in the setting of the "liver first" approach. *Hepatobiliary Surg Nutr*. 2014;3(5):324–9.
- Waisberg J, Ivankovic IG. Liver-first approach of colorectal cancer with synchronous hepatic metastases: a reverse strategy. *World J Hepatol*. 2015;7(11):1444–9.
- Ayez N, Burger JW, van der Pool AE, et al. Long-term results of the "liver first" approach in patients with locally advanced rectal cancer and synchronous liver metastases. *Dis Colon Rectum*. 2013;56(3):281–7.
- van der Pool AE, de Wilt JH, Lalmahomed ZS, et al. Optimizing the outcome of surgery in patients with rectal cancer and synchronous liver metastases. *Br J Surg*. 2010;97(3):383–90.
- Mentha G, Roth AD, Terraz S, et al. "Liver first" approach in the treatment of colorectal cancer with synchronous liver metastases. *Dig Surg*. 2008;25(6):430–5.
- Goere D, Benham L, Bonnet S, et al. Adjuvant chemotherapy after resection of colorectal liver metastases in patients at high risk of hepatic recurrence: a comparative study between hepatic arterial infusion of oxaliplatin and modern systemic chemotherapy. *Ann Surg*. 2013;257(1):114–20.
- Goyer P, Karoui M, Viano L, et al. Single-center multidisciplinary management of patients with colorectal cancer and resectable synchronous liver metastases improves outcomes. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2013;37(1):47–55.
- Blanc JF, Barbare JC, Boige V, et al. Carcinome hépatocellulaire. Thésaurus National de Cancérologie Digestive, juin 2015, en ligne [http://www.tnol.org].
- Benchimol EI, Langan S, Guttmann A. Call to RECORD: the need for complete reporting of research using routinely collected health data. *J Clin Epidemiol*. 2012;66(7):703–5.
- Austin PC. An introduction to propensity score methods for reducing the effects of confounding in observational studies. *Multivariate Behav Res*. 2011;46(3):399–424.

31. Ogunbiyi OA, Flanagan FL, Dehdashti F, et al. Detection of recurrent and metastatic colorectal cancer: comparison of positron emission tomography and computed tomography. *Ann Surg Oncol.* 1997;4(8):613–20.
32. Wiering B, Vogel WV, Ruers TJ, Oyen WJ. Controversies in the management of colorectal liver metastases: role of PET and PET/CT. *Dig Surg.* 2008;25(6):413–20.
33. van der Wal GE, Gouw AS, Kamps JA, et al. Angiogenesis in synchronous and metachronous colorectal liver metastases: the liver as a permissive soil. *Ann Surg.* 2011;255(1): 86–94.
34. Shindoh J, Nishioka Y, Yoshioka R, et al. KRAS mutation status predicts site-specific recurrence and survival after resection of colorectal liver metastases irrespective of location of the primary lesion. *Ann Surg Oncol.* 2016.
35. Vauthey JN, Zimmitti G, Kopetz SE, et al. RAS mutation status predicts survival and patterns of recurrence in patients undergoing hepatectomy for colorectal liver metastases. *Ann Surg.* 2013;258(4):619–26; discussion 626–7.
36. Yaeger R, Cowell E, Chou JF, et al. RAS mutations affect pattern of metastatic spread and increase propensity for brain metastasis in colorectal cancer. *Cancer.* 2014;121(8):1195–203.

5.4. Exérèse première de la tumeur colorectale et efficacité du Bevacizumab

5.4.1. Résumé

Le Bevacizumab est un anticorps monoclonal recombinant humanisé dirigé contre le VEGF dont le mécanisme d'action est d'inhiber l'angiogénèse. Contrairement aux antagonistes de l'EGFR qui agissent directement sur la cellule tumorale (et peuvent donc être prescrits en monothérapie), le Bevacizumab en combinaison avec différentes chimiothérapies cytotoxiques perturbe l'environnement tumoral et permet à ces chimiothérapies spécifiques de mieux agir.

Sur la base des données expérimentales et cliniques de la littérature et de nos résultats suggérant qu'une tumeur colorectale pourrait moduler l'angiogénèse hépatique et créer un environnement favorable au développement de métastases hépatiques, nous avons voulu savoir si la chirurgie de la tumeur primitive était associée à une meilleure efficacité de cet inhibiteur de l'angiogénèse en termes de survie globale et survie sans progression.

De 1989 à 2013, 120 patients avec un cancer colorectal stade IVA métastatique au foie ont eu une chimiothérapie néo-adjuvante suivie d'une hépatectomie à l'Hôpital Henri Mondor : 110 patients ont été opérés avec une stratégie type primitif premier et 10 avec une stratégie type foie premier. Les patients ont été divisés en deux groupes: chimiothérapie conventionnelle associée à du Bevacizumab (Bevacizumab +, n = 37 ; 30%) et chimiothérapie conventionnelle sans Bevacizumab (Bevacizumab-, 83 ; 70%).

Les patients du groupe Bevacizumab+ avaient une maladie métastatique plus avancée avec des lésions multiples plus fréquentes (nombre de lésions > 3 : 51% vs. 24% ; p = 0.003) et étaient plus pris en charge avec une stratégie foie premier que ceux du groupe Bevacizumab- (19% vs. 4% ; p = 0.005).

Malgré la présence d'une maladie métastatique plus avancée, la survie globale à 5 ans était significativement plus élevée dans le groupe Bevacizumab+ (62%) que dans le groupe Bevacizumab- (44% ; p = 0.04). La survie sans progression à 3 ans n'était pas significativement différente entre les deux groupes (19% vs. 20% ; p = 0.55).

Lorsqu'on fait une analyse de survie en sous-groupe selon le type de stratégie chirurgicale (primitif premier versus foie premier), le Bevacizumab s'était avérée efficace en termes de

survie globale pour les patients qui avaient été opérés de leur tumeur primitive en premier. L'adjonction du Bevacizumab n'a pas montré de bénéfice en termes de survie globale pour les patients qui avaient été opérés de leurs métastases hépatiques en premier.

Il s'agit de la première étude qui étudie l'impact de la chirurgie de la tumeur primitive, dans les cancers colorectaux stade IVA, sur la survie globale observée sous Bevacizumab.

Cette étude a plusieurs limites. Premièrement elle est rétrospective. Deuxièmement, nous ne montrons pas de bénéfice en termes de survie sans progression, ce qui peut être expliqué par le nombre de patients inclus dans cette étude. Cependant la survie globale est le critère principal dans les études cliniques et en définitive celui qui importe le plus aux malades.

Troisièmement, elle inclut des patients qui ont reçu différents protocoles de chimiothérapies au cours d'une longue période d'étude (24 ans). Enfin, le nombre limité de patients qui ont eu une stratégie « foie premier » est limité (10 malades), ce qui peut expliquer l'absence de différence en terme de survie globale dans ce groupe.

4.4.2. ARTICLE 4: La chirurgie première de la tumeur primitive est associée à une augmentation de l'efficacité du Bevacizumab et de la survie dans les cancers colorectaux stade IVA.

Journal of Surgical Research (en cours de soumission).

Bevacizumab improves survival in patients with resected synchronous colorectal liver metastases

Lim C, Doussot A, Salloum C, Osseis M, Compagnon P, Tournigand C, Calderaro J, Azoulay D.

Surgical Research Elsevier Editorial System(tm) for Journal of
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Bevacizumab Improves Survival in Patients with Resected
Synchronous Colorectal Liver Metastases

Article Type: Regular Article

Keywords: Stage IVA, Synchronous colorectal liver metastases;
Bevacizumab; Primary tumor resection first.

Corresponding Author: Dr. Chetana LIM,

Corresponding Author's Institution: Henri Mondor

First Author: Chetana LIM

Order of Authors: Chetana LIM; Alexandre Doussot, MD; Chady Salloum, MD;
Michael Osseis, MD; Philippe Compagnon, MD, PhD; Christophe Tournigand,
MD, PHD; Julien Calderaro, MD, PHD; Daniel Azoulay, MD, PHD

Suggested Reviewers: Norihiro kokudo
Tokyo University Hospital
KOKUDO-2SU@h.u-tokyo.ac.jp
One of the most experienced HPB surgeon in Japan

Peter Lodge
Leeds
Peter.Lodge@leedsth.nhs.uk
One of the most famous HPB surgeon in UK

Pietro Majno
Geneve University Hospital
Pietro.Majno@hcuge.ch
One of the most experienced surgeon in Switzerland

Bevacizumab Improves Survival in Patients with Resected Synchronous Colorectal Liver Metastases

Chetana Lim^{1,2}, MD; Alexandre Doussot¹, MD; Chady Salloum¹, MD ; Michael Osseis¹, MD; Philippe Compagnon^{1,3}, MD, PhD; Christophe Tournigand⁴, MD, PhD; Julien Calderaro^{3,5}, MD, PhD; Daniel Azoulay^{1,3}, MD, PhD.

¹ Department of Hepatobiliary and Pancreatic Surgery and Liver Transplantation, Henri Mondor Hospital, APHP, UPEC, Créteil, France.

² INSERM, U965, Paris, France

³ INSERM, U955, Créteil, France

⁴ Department of Oncology, Henri Mondor Hospital, APHP, UPEC, Créteil, France.

⁵ Department of Pathology, Henri Mondor Hospital, APHP, UPEC, Créteil, France.

Corresponding Author and Reprint Requests:

Daniel Azoulay

Department of Hepatobiliary and Pancreatic Surgery and Liver Transplantation. Henri Mondor Hospital; 51 avenue de Lattre de Tassigny; 94010 Créteil, France.

Email: daniel.azoulay@hmn.aphp.fr

Tel. + 33 1 49 81 25 48 ; Fax. + 33 1 49 81 24 32

Article category: Original article

Short title: Bevacizumab and synchronous colorectal liver metastases

Author contributions:

Study conception and design: CL, AD, CS, DA.

Acquisition of data: CL, AD, MO.

Analysis and interpretation of data: CL, AD, CS, MO, PC, CT, DA.

Drafting article: CL, AD, CT, DA.

Critical revision: AD, CS, MO, PC, CT, JC, DA.

ABSTRACT (213 words)

Background: Multimodal strategy including chemotherapy and hepatectomy is advocated for the management of colorectal liver metastases (CRLM). The aim of this study was to evaluate the impact of neoadjuvant Bevacizumab-based chemotherapy on survival in patients with resected stage IVA colorectal cancer and liver metastases.

Materials and methods: Data from 120 consecutive patients who received neoadjuvant chemotherapy and underwent curative-intent hepatectomy for synchronous CRLM were retrospectively reviewed. Overall survival (OS) was stratified according to administration of Bevacizumab before liver resection and surgical strategy, i.e. classical strategy (primary tumor resection first) versus reverse strategy (liver metastases resection first).

Results: Patients who received Bevacizumab ($n = 37$; 30%) had a higher number of CRLM ($p = 0.003$) and underwent more often reverse strategy ($p = 0.005$), as compared to those who did not ($n = 83$; 70%). Bevacizumab was associated with an improved OS compared with conventional chemotherapy ($p = 0.04$). After stratifying by the surgical strategy, Bevacizumab was associated with improved OS in patients who had classical strategy ($p = 0.03$). In contrast, Bevacizumab had no impact on OS among patients who had liver metastases resection first ($p = 0.89$).

Conclusions: Neoadjuvant Bevacizumab-based chemotherapy was associated with improved OS in patients who underwent liver resection of synchronous CRLM, especially in those who underwent primary tumor resection first.

KEY WORDS: Stage IVA, Synchronous colorectal liver metastases; Bevacizumab; Primary tumor resection first.

INTRODUCTION

Multimodal strategy including surgery and chemotherapy is the only effective treatment that may achieve long-term survival, and even cure, in selected patients with stage IVA colorectal cancer (CRC) and synchronous liver metastases ¹. Systemic chemotherapy is indicated to convert primarily unresectable primary tumor (PT) and/or hepatic disease to resection, or achieve systemic disease control of upfront resectable disease.

Three surgical strategies are available to treat primary CRC with synchronous liver metastases ²: (i) the classical strategy (CS) where the primary tumor is resected first, (ii) the reverse strategy (RS) where liver metastases (LM) are resected first and (iii) the combined strategy (simultaneous resection of the PT and LM). These strategies achieve similar overall survival (OS) and recurrence-free survival (RFS) according to recent meta-analyses ³⁻⁵ and systematic reviews ^{6, 7}. However, three more recent retrospective studies have reported that CS reduces the risk of recurrence in patients with stage IVA liver-only CRC ^{8, 9} and achieves improved cumulative RFS ¹⁰.

Addition of Bevacizumab to conventional neoadjuvant chemotherapy was shown to increase resectability of LM and to improve OS and RFS for patients with stage IV CRC and unresectable LM ¹¹⁻¹⁵. In the context of upfront resectable LM, the use of Bevacizumab prior to liver resection results from an extrapolation of these latter studies ¹⁶ and remains to be ascertained ¹⁷.

This background motivated the present study aimed to evaluate the oncologic results of neoadjuvant Bevacizumab-based chemotherapy in stage IVA liver-only CRC patients with resected LM.

MATERIAL AND METHODS

Patients and Study Design

All consecutive patients who underwent surgical treatment for stage IVA CRC with synchronous liver-only metastasis from 1990 to 2013 were retrieved from a prospectively maintained data file and medical charts were retrospectively reviewed. The institutional review board approved the present study. Stage IVA patients entering into any of the following categories were excluded from the study: simultaneous PT and LM resection, presence of synchronous extrahepatic metastases, patients who underwent urgent PT resection, two-stage liver resection when PT resection was included in the first surgery, death within 90 days of any surgery, and patients who did not receive chemotherapy and those who received Cetuximab before liver resection.

Oncological strategy

Our oncological strategy has been previously reported ⁹. For patients with stage IVA CRC, the treatment strategy was tailored according to the potential resectability of the metastatic disease, location and extent of PT and response to preoperative chemotherapy on cross-imaging and tumor markers. In case of rectal cancer, chemoradiation was delivered before proctectomy. The RS program was opened at our liver center in 2006 ⁹. As in any other specialized center, the surgical sequence and chemotherapy administration strategy to achieve complete PT and LM resection was decided on a case-by-case basis. Each case was discussed at a multidisciplinary colorectal board every three to four chemotherapy courses.

Surgical strategies were defined as classical (CS, PT resection first followed by liver resection at a second operation) and reverse (RS, liver resection first followed by PT resection at a second operation). In the present study, all patients with bilateral LM who underwent

two-stage hepatectomy had their PT resected before the first stage (CS group) or after the two-stage hepatectomy (RS).

For both strategies, Bevacizumab-based chemotherapy was administered before liver resection, and interval conventional chemotherapy was administered between the first and the second surgery.

Postoperative Management

Serum carcinoembryonic antigen (CEA) level and computed tomography (CT) scan for recurrence screening were performed the first month postoperatively and then every three months for the first two years and every six months for the following three years. Recurrence diagnosis was based on the above explorations completed by site-specific imaging in case of symptoms. Biopsy of suspicious lesions for liver and extrahepatic recurrence was performed, whenever needed.

Statistical analysis

Continuous variables are presented as means (standard deviations) and were compared using Student's *t*-test or the non-parametric Mann-Whitney test, as appropriate. Categorical variables are presented as numbers (percentages) and were compared across groups using the χ^2 or Fischer's exact test, as appropriate. Differences were considered statistically significant when *p*-value < 0.05.

Overall survival (OS) was calculated from the date of surgical strategy completion to the date of death. Survival rates were calculated using the Kaplan Meier method and compared using log-rank tests. Independent predictors of OS were identified using a logistic regression model with a $P \leq 0.05$ variable retention criterion. All statistical analyses were performed with SPSS software (Statistical Package, IBM SPSS Statistics, version 23 for

Macintosh; IBM, Armonk, NY).

RESULTS

Demographic and clinicopathologic characteristics

The study population included 120 stage IVA liver-only CRC patients with resected LM after neoadjuvant chemotherapy. Of these, 110 (92%) patients have completed the CS and 10 (8%) patients have completed the RS. Bevacizumab was included in the chemotherapy regimen in 37 (30%) patients. Chemotherapy regimens administered before and after hepatectomy are reported in **Table 1**.

Mean interval between each surgical procedure (i.e. primary tumor first resection followed by liver resection or liver first resection followed by primary tumor resection) was 10 months in the Bevacizumab group and 11 months in the no Bevacizumab group ($p = 0.54$). Patients who received Bevacizumab were more likely to have a liver metastases number > 3 ($p = 0.003$), and to undergo the reverse strategy ($p = 0.005$; **Table 2**) as compared to those who did not receive Bevacizumab. Otherwise, the 2 groups were not statistically different regarding age ($p = 0.53$), gender ($p = 0.80$), preoperative CEA > 5 ng/ml ($p = 0.49$), PT location (colon or rectum, $p = 0.91$), tumor size ($p = 0.21$) and surgical margins of resected LM ($p = 0.26$).

The overall morbidity rate in the entire cohort was 35% (42/120). The morbidity rate was not statistically different between the Bevacizumab group (37.8%) and the no Bevacizumab group (33.7%, $p = 0.66$).

Timing and pattern of recurrence

Overall, recurrence occurred in 82 (68.3%) patients, including 27 in the Bevacizumab group and 55 patients in the no Bevacizumab group ($p = 0.47$). Mean time to recurrence whatever the location was similar between the two groups (15.6 months in the Bevacizumab

group and 16.2 months in the no Bevacizumab group; $p = 0.87$). The location of the first recurrence was as follows: intrahepatic in 29 cases (35.4%), extrahepatic in 22 cases (26.8%), and extra-and intrahepatic in 31 cases (37.8%). As for the first recurrence site, there was no difference between the two groups in terms of intrahepatic (11/27, 40.7% in the Bevacizumab group vs. 18/55, 32.7% in the no Bevacizumab group; $p = 0.48$), extrahepatic (8/27, 29.6% in the Bevacizumab group vs. 14/55, 25.5% in the no Bevacizumab group; $p = 0.69$), and intra- and extrahepatic recurrences (8/27, 29.6% in the Bevacizumab group vs. 23/55, 41.8% in the no Bevacizumab group; $p = 0.28$).

Survival

OS at 1-, 3-, and 5-years was 93%, 68%, and 49% respectively in the entire cohort. 1-, 3- and 5 year OS was 100 %, 85 %, and 62 % respectively in the Bevacizumab group; and 89 %, 61 %, and 44% respectively in the no Bevacizumab group ($p = 0.04$; **Figure 1**). At univariate analysis, only the administration of Bevacizumab ($p = 0.04$) was associated with improved OS (**Table 3**).

A stratified analysis was performed to assess the impact of relationship between neoadjuvant Bevacizumab-based chemotherapy and PT resection timing. Bevacizumab-based chemotherapy was associated with improved OS in patients who underwent PT resection first strategy: 5-year OS was 64% for patients who received Bevacizumab and 45% for those who did not ($p = 0.03$; **Figure 2A**). In contrast, Bevacizumab-based chemotherapy was not associated with OS in patients who underwent LM resection first strategy ($p = 0.89$; **Figure 2B**).

DISCUSSION

In the present retrospective single center study, neoadjuvant Bevacizumab-based chemotherapy prior to liver resection of stage IVA CRC was associated with improved OS, in the subset of patients managed by PT resection first strategy.

To our knowledge, this is the first study to assess the oncological impact of Bevacizumab in patients with resected synchronous LM according to the PT resection. Ghiringhelli et al¹⁸ already compared the Bevacizumab efficacy in metastatic colorectal cancer whether the primary tumor was resected or not. The group of patients who underwent PT resection achieved a significant improved median OS for patients treated with Bevacizumab (41.9 months) as compared to those without (25.3 months; $p = 0.0003$). This difference was not observed when PT was not removed (18.5 months for the Bevacizumab group versus 17.1 months in the chemotherapy-alone group; $p = 0.6$). This study, in line with ours, was limited by the following biases: i) Only 26% of patients had complete surgery of LM, whereas ii) up to 40% of patients had extrahepatic disease (stage IVB), and iii) LM were metachronous in 38% of patients.

In the present study, patients with stage IVA liver-only CRC who received Bevacizumab had more advanced disease and were more often selected for a liver-first approach than those who did not. In other words, patients with more advanced and/or borderline resectable liver disease were more likely to receive a combination of Bevacizumab to conventional chemotherapy and to undergo liver resection first¹⁹. Despite these adverse characteristics, addition of Bevacizumab was significantly associated with improved OS. These results are in contradiction with the LiverMetSurvey analysis¹⁷ which reported no significant impact on long-term outcomes of perioperative Bevacizumab in patients with resected CRLM. However,

this study included patients with synchronous (76%) and metachronous LM (24%). Further, this study did not evaluate the efficacy of Bevacizumab for stage IVA liver-only CRC according to the surgical strategy.

The physiopathological hypotheses why PT resection first strategy may improve Bevacizumab efficacy are unclear. Van der Wal et al. have shown that expression of angiogenic factors is higher in the metastases and the adjacent liver to the metastases in patients who underwent simultaneous resection of synchronous LM and PT as compared to those who had resection of synchronous LM 3 to 12 months after resection of the PT and those who underwent resection of metachronous LM ²⁰. If the liver microenvironment (i.e, liver parenchyma adjacent to the LM) is more angiogenic in the presence of PT, this could explain the improved survival with VEGF inhibition observed when the PT is resected first ¹⁸.

Some shortcomings of the present study need to be acknowledged. First, patients referred at our tertiary liver center may imply a selection bias. Second, the study period covered years between 1990 and 2013, therefore including patients belonging to different eras of chemotherapy (and in particular before introduction of Bevacizumab into clinical practice). As well the KRAS type might be explored in the studied setting ²¹. Third, although the limited sample size may represent an important limitation, this is however to our knowledge the first study to investigate the influence of PT resection on Bevacizumab efficacy in synchronous stage IVA CRC and liver metastases. These preliminary data support the rationale to prospectively validate this hypothesis.

CONCLUSIONS

Neoadjuvant Bevacizumab-included chemotherapy was associated with improved OS in patients who underwent liver resection for stage IVA liver-only CRC, especially in those who had primary tumor resection first strategy. A stratified analysis identified a specific population with an OS improved and will provide a better management of staged IVA CRC liver-only patients. Provided these results are confirmed in further studies, the choice of the surgical strategy with Bevacizumab could improve survival in selected patients.

Compliance with Ethical Standards

Funding or Grants: None

Conflict of interest: All authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval: All procedures performed in this study involving human participants were in accordance with ethical standards of the institutional committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

Informed consent: Informed consent was obtained from all individual participants included in this study.

REFERENCES

1. Kopetz S, Chang GJ, Overman MJ, et al. Improved survival in metastatic colorectal cancer is associated with adoption of hepatic resection and improved chemotherapy. *J Clin Oncol* 2009; 27(22):3677-83.
2. Mentha G, Majno P, Terraz S, et al. Treatment strategies for the management of advanced colorectal liver metastases detected synchronously with the primary tumour. *Eur J Surg Oncol* 2007; 33 Suppl 2:S76-83.
3. Chen J, Li Q, Wang C, et al. Simultaneous vs. staged resection for synchronous colorectal liver metastases: a metaanalysis. *Int J Colorectal Dis* 2010; 26(2):191-9.
4. Yin Z, Liu C, Chen Y, et al. Timing of hepatectomy in resectable synchronous colorectal liver metastases (SCRLM): Simultaneous or delayed? *Hepatology* 2013; 57(6):2346-57.
5. Feng Q, Wei Y, Zhu D, et al. Timing of hepatectomy for resectable synchronous colorectal liver metastases: for whom simultaneous resection is more suitable--a meta-analysis. *PLoS One* 2014; 9(8):e104348.
6. Slessor AA, Simillis C, Goldin R, et al. A meta-analysis comparing simultaneous versus delayed resections in patients with synchronous colorectal liver metastases. *Surg Oncol* 2013; 22(1):36-47.
7. Lykoudis PM, O'Reilly D, Nastos K, Fusai G. Systematic review of surgical management of synchronous colorectal liver metastases. *Br J Surg* 2014; 101(6):605-12.
8. Tanaka K, Murakami T, Matsuo K, et al. Preliminary results of 'liver-first' reverse management for advanced and aggressive synchronous colorectal liver metastases: a propensity-matched analysis. *Dig Surg* 2015; 32(1):16-22.
9. Lim C, Doussot A, Osseis M, et al. Primary Tumor Versus Liver-First Strategy in Patients with Stage IVA Colorectal Cancer: A Propensity Score Analysis of Long-term Outcomes and Recurrence Pattern. *Ann Surg Oncol* 2016.
10. Welsh FK, Chandrakumaran K, John TG, et al. Propensity score-matched outcomes analysis of the liver-first approach for synchronous colorectal liver metastases. *Br J Surg* 2016; 103(5):600-6.

11. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004; 350(23):2335-42.
12. Kabbinnar FF, Hambleton J, Mass RD, et al. Combined analysis of efficacy: the addition of bevacizumab to fluorouracil/leucovorin improves survival for patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23(16):3706-12.
13. Kabbinnar FF, Schulz J, McCleod M, et al. Addition of bevacizumab to bolus fluorouracil and leucovorin in first-line metastatic colorectal cancer: results of a randomized phase II trial. *J Clin Oncol* 2005; 23(16):3697-705.
14. Giantonio BJ, Catalano PJ, Meropol NJ, et al. Bevacizumab in combination with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin (FOLFOX4) for previously treated metastatic colorectal cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200. *J Clin Oncol* 2007; 25(12):1539-44.
15. Adam R, Wicherts DA, de Haas RJ, et al. Patients with initially unresectable colorectal liver metastases: is there a possibility of cure? *J Clin Oncol* 2009; 27(11):1829-35.
16. Van Cutsem E, Cervantes A, Adam R, et al. ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol* 2016; 27(8):1386-422.
17. Rong Z, Martel G, Vandenbroucke-Menu F, et al. Impact of peri-operative bevacizumab on survival in patients with resected colorectal liver metastases: an analysis of the LiverMetSurvey. *HPB (Oxford)* 2014; 16(4):342-9.
18. Ghiringhelli F, Bichard D, Limat S, et al. Bevacizumab efficacy in metastatic colorectal cancer is dependent on primary tumor resection. *Ann Surg Oncol* 2014; 21(5):1632-40.
19. Mentha G, Majno PE, Andres A, et al. Neoadjuvant chemotherapy and resection of advanced synchronous liver metastases before treatment of the colorectal primary. *Br J Surg* 2006; 93(7):872-8.
20. van der Wal GE, Gouw AS, Kamps JA, et al. Angiogenesis in synchronous and metachronous colorectal liver metastases: the liver as a permissive soil. *Ann Surg* 2011; 255(1):86-94.
21. Vauthey JN, Zimmitti G, Kopetz SE, et al. RAS mutation status predicts survival and patterns of recurrence in patients undergoing hepatectomy for colorectal liver metastases. *Ann Surg* 2013; 258(4):619-26; discussion 626-7.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Overall survival curves stratified according to the Bevacizumab use

Figure 2. Overall survival curves stratified according to the Bevacizumab use. **A** in patients who underwent primary tumor resection and then liver resection (classical strategy). **B** in patients who underwent liver resection and then primary tumor resection (reverse strategy).

Table 1. Chemotherapy regimens administered before hepatectomy

	All patients N = 120	Bevacizumab- based chemotherapy n = 37 (30 %)	Conventional chemotherapy without Bevacizumab n = 83 (70 %)
LV5FU2	16 (13)	0 (0)	16 (19)
Folfox	70 (58)	23 (62)	47 (57)
Folfiri	27 (23)	14 (38)	13 (16)
Xelox/ xeloda	5 (4)	0 (0)	5 (6)
5FU alone	2 (2)	0 (0)	2 (2)

Footnotes: 5FU indicates 5-fluorouracil; LV5FU2, combination 5-fluorouracil and folinic acid; Folfox, combination folinic acid, 5-fluorouracil, and oxaliplatin; Folfiri, combination folinic acid, 5-fluorouracil, and irinotecan.

Table 2. Demographic and clinicopathologic characteristics

	All patients N = 120	Bevacizumab- based chemotherapy n = 37 (30 %)	Conventional chemotherapy without Bevacizumab n = 83 (70 %)	P value
<i>Demographics</i>				
Age, years	62 ± 11	61 ± 12	62 ± 10	0.53
Age ≥ 70 years	28 (23)	9 (24)	19 (23)	0.86
Sex, male/female	66 (55)/54 (45)	21 (57)/16 (43)	45 (54)/38 (46)	0.80
<i>Surgical strategy</i>				
Classical vs. reverse strategy	110 (92)/10 (8)	30 (81)/7 (19)	80 (96)/3 (4)	0.005
<i>Primary disease</i>				
Colon vs. rectum	90 (69)/30 (31)	28 (76)/9 (24)	62 (75)/21 (25)	0.91
Pre or postoperative radiochemotherapy	11 (9)	3 (8)	8 (10)	-
<i>Liver metastases</i>				
Preoperative carcinoembryonic antigen > 5 ng/ml	56 (47)	19 (51)	37 (45)	0.49
Surgical approach (open vs. laparoscopic)	109 (91)/11 (9)	35 (95)/2 (5)	74 (89)/9 (11)	0.34
Major hepatectomy (≥ 3 segments)	82 (68)	23 (62)	59 (71)	0.33
Postoperative morbidity	42 (35)	14 (38)	28 (34)	0.66
Mean maximum tumor size, mm (pathology)	42 ± 33	36 ± 31	44 ± 34	0.21
Maximum tumor size > 50 mm (pathology)	34 (28)	8 (22)	26 (31)	0.28
Tumor number > 3 (pathology)	39 (33)	19 (51)	20 (24)	0.003
Positive resection margin (pathology)	22 (18)	9 (24)	13 (16)	0.26

Continuous data are given as mean (standard deviation) and categorical variables are presented as numbers (percentages).

Table 3. Univariate analysis of prognostic factors for overall survival in the entire cohort (n = 120)

Variable		Univariable Analysis
		<i>P</i> value
Age > 70 years	Yes	0.59
	No	
Gender	Male	0.37
	Female	
Rectal tumor	Yes	0.32
	No	
Chemoradiation before proctectomy	Yes	0.37
	No	
Prehepatectomy carcinoembryonic antigen > 5 ng/ml	Yes	0.26
	No	
Prehepatectomy Bevacizumab	Yes	0.04
	No	
Maximum tumor size > 50 mm	Yes	0.23
	No	
Tumor number > 3	Yes	0.33
	No	
Positive surgical margins	Yes	0.85
	No	
Reverse strategy	Yes	0.67
	No	
Major hepatectomy	Yes	0.99
	No	
Postoperative morbidity	Yes	0.77
	No	

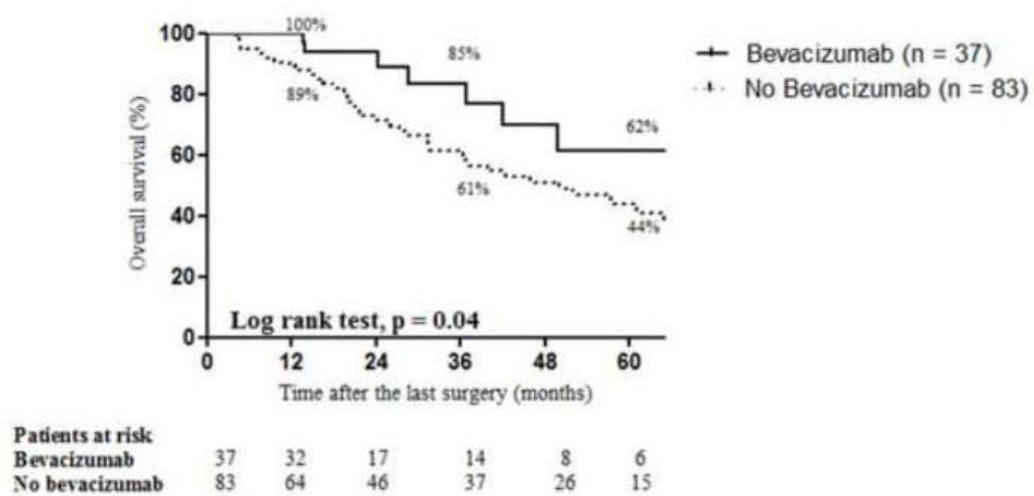


Figure 1

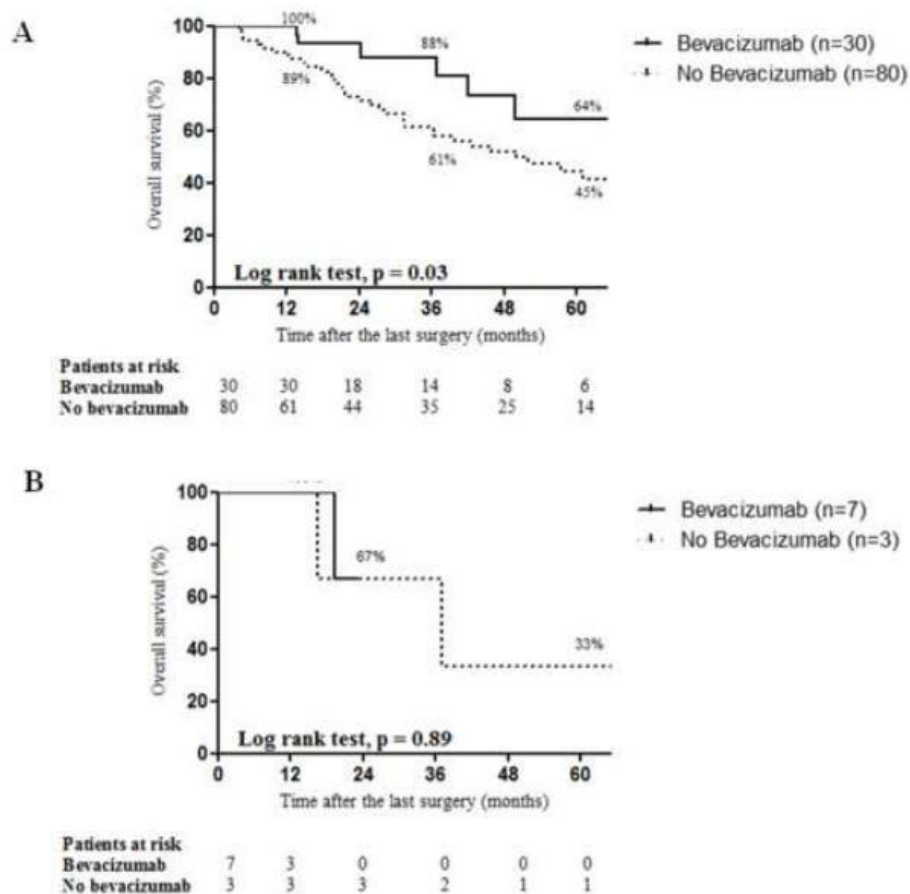


Figure 2

6. SYNTHESE ET CONCLUSION

Vers une nouvelle conception du processus métastatique

Le cancer colorectal a été longtemps considéré comme une pathologie dont l'initiation et l'évolution étaient directement déterminées par les altérations génétiques et épigénétiques des cellules tumorales ⁷². Nous savons maintenant depuis quelques années par des données issues de modèles expérimentaux que le processus métastatique est bien plus complexe que prévu et que le caractère invasif d'un cancer primitif ainsi que son potentiel métastatique sont déterminées non seulement par les modifications génétiques des cellules cancéreuses mais aussi par des interactions entre le microenvironnement et ces cellules cancéreuses. Ce sont ces interactions qui vont en partie moduler la capacité de développement local (caractère invasif) et à distance (potentiel métastatique) de la tumeur primitive.

Nous pouvons faire plusieurs conclusions à partir des travaux présentés dans cette thèse de science. Tout d'abord nous montrons dans notre modèle murin de métastases hépatiques d'origine colique que si on module le microenvironnement hépatique en induisant la présence massive de progéniteurs endothéliaux issus de la moelle osseuse dans la circulation sanguine (obtenue soit par un mécanisme d'ischémie située à distance du foie (ligature de l'artère fémorale) ou dans le foie (clampage puis déclampage de la veine porte)), et ce sans modifier qualitativement ou quantitativement les cellules tumorales injectées, on accélère de façon significative la croissance tumorale des métastases hépatiques en augmentant le nombre et en raccourcissant le délai d'apparition de ces lésions via une augmentation de l'angiogénèse tumorale (**Article 1**). Cependant, ces résultats ne nous permettent pas d'exclure l'hypothèse que la croissance tumorale des métastases hépatiques dans notre modèle puisse être aussi la conséquence de processus liés à l'ischémie et l'hypoxie tissulaire. Dans une expérience complémentaire, nous montrons que l'administration de progéniteurs endothéliaux isolés à partir du sang périphérique de souris ayant eu au préalable une ligature de l'artère fémorale accélère également la croissance tumorale dans un modèle de carcinose péritonéale et un modèle de tumeur sous-cutanée (**Article 2**). Ces données nous ont permis de faire la preuve de concept qu'il existerait des interactions entre le microenvironnement tumoral hépatique et la présence de ces progéniteurs médullaires sanguins et que ces interactions pourraient augmenter le potentiel métastatique dans notre modèle tumoral de métastases hépatiques.

Le microenvironnement hépatique est modulé par la tumeur colorectale via les progéniteurs dérivés de la moelle osseuse et l'angiogénèse.

Nous nous sommes ensuite intéressés aux résultats récemment publiés en 2012 dans « *Annals Of Surgery* » par Van der Wal et al.²¹. Les auteurs ont montré qu'il y avait une différence d'activité de l'angiogénèse au sein du parenchyme hépatique selon que la tumeur primitive colique soit en place ou pas. L'activité angiogénique représentée par les dosages de ces déterminants est plus forte en cas de métastases hépatiques synchrones que métachrone et 4 fois plus élevée dans le foie juxta-tumoral que dans la métastase elle-même. Les auteurs ont conclu que pour les patients porteurs de métastases hépatiques avec une tumeur colique primitive en place, le parenchyme hépatique adjacent à la métastase est un parenchyme profondément favorable à l'angiogénèse tumorale.

Dans ce contexte, nous pouvons faire plusieurs conclusions à partir de nos travaux expérimentaux. La première information est la présence d'une activité d'angiogénèse en cas de métastase hépatique. La seconde information est la différence d'activité de l'angiogénèse dans le parenchyme juxta-tumoral en cas de présence massive de progéniteurs circulants. La troisième information est que le réseau de densité micro-vasculaire est 1,5 fois plus important dans le parenchyme hépatique adjacent à la métastase dans les groupes de souris ayant eu une double ischémie par rapport au groupe contrôle (**Article 1**). Bien que l'analyse soit semi-quantitative, nous suggérons que cette augmentation de l'angiogénèse pourrait être liée à la présence de ces progéniteurs endothéliaux circulants. Ce qui confirme l'hypothèse que l'angiogénèse hépatique n'est pas un processus exclusivement local et que des progéniteurs endothéliaux sont recrutés à distance pour jouer un rôle physique dans la formation des vaisseaux tumoraux au sein du parenchyme hépatique. Enfin nos résultats montrent que ces progéniteurs endothéliaux vont se localiser précocement dans le foie (**résultats non publiés n°1**), corroborant les travaux antérieurs de Kaplan et al.²⁰ et de Gao et al.⁷³ qui montrent que ces progéniteurs avaient un rôle majeur d'une part dans la formation de la niche pré-métastatique et d'autre part dans le switch angiogénique et la progression des micro-métastases en macro-métastases.

Encore une fois, il est important de rappeler que dans ce travail de thèse nous avons fait le postulat que la présence d'une tumeur colorectale induit une libération de progéniteurs endothéliaux d'origine médullaire dans la circulation sanguine. Bien qu'il s'agisse d'une hypothèse que nous n'avons pas directement investigué dans notre modèle murin de métastases hépatiques, il existe plusieurs travaux réalisés dans d'autres modèles murins de

tumeurs (modèle de métastases pulmonaires ⁷³, métastases pulmonaires de lymphome sous-cutanée ²⁰) qui montrent qu'un cancer primitif peut produire des facteurs pro-angiogéniques ou des cytokines pour mobiliser des progéniteurs médullaires.

La chirurgie première de la tumeur primitive pourrait diminuer le caractère permissif du foie pour le processus métastatique.

Il s'agit d'une question récurrente qui est souvent posée en réunion de concertation pluridisciplinaire lorsque le patient est en bon état général et que la tumeur colique ou rectale est asymptomatique. Le traitement standard a longtemps consisté en la résection de la tumeur primitive pour éviter les complications obstructive, infectieuse ou hémorragique, puis d'une chimiothérapie adjuvante et, en cas de réponse effective, de la résection des métastases hépatiques quelques mois plus tard. La question ne doit plus être posée uniquement en termes de complications de la tumeur primitive mais également en termes de pronostic oncologique et de survie à long-terme (qui reste le principal critère reflétant le bénéfice clinique pour le patient). Il ne s'agit pas de mettre le patient à l'abri d'une potentielle occlusion survenant sous chimiothérapie qui est finalement peu fréquente, mais de ne pas laisser en place la "machine à métastases" que représente la tumeur primitive.

Sur la base de nos résultats expérimentaux et de ceux de la littérature, une tumeur primitive serait capable de modifier le microenvironnement des futurs sites métastatiques en favorisant la mise en place d'une niche pré-métastatique, il existerait donc un rationnel fondamental pour justifier une chirurgie première de la tumeur colique ou rectale dans les cancers stade IV métastatique au foie. Cette exérèse première de la tumeur primitive pourrait limiter le processus métastatique en supprimant la relation entre la tumeur primitive et le microenvironnement des sites métastatiques.

Nos données obtenues avec notre travail translationnel suggèrent que l'angiogénèse tumorale au sein de la lésion métastatique quantifiée sur les pièces d'hépatectomies est significativement moins importante lorsque les patients sont préalablement opérés de leurs tumeurs colique ou rectale (**Résultats non publiés n°2**).

Nos résultats cliniques montrent que les deux stratégies (i.e, primitif premier versus foie premier) sont comparables en termes de survie globale et survie sans progression. Nous montrons, cependant, que la récurrence extra-hépatique est plus fréquente et plus précoce après une stratégie foie premier (**Article 3**). Le corolaire de ce résultat est que si on choisit une stratégie foie premier, il faut probablement proposer à ces patients une chimiothérapie

adjuvante et réaliser une surveillance rapprochée dont l'objectif est le dépistage d'une récurrence extra-hépatique.

A l'inverse, la possibilité qu'une hépatectomie ou une embolisation portale puisse accélérer la croissance tumorale de micro-métastases a été évoquée sans que le lien de causalité n'ait été clairement démontré. Il est aujourd'hui démontré qu'une hépatectomie ou une embolisation portale induit une régénération hépatique via un mécanisme d'angiogénèse. La possibilité que cette angiogénèse initiée au moment de la régénération hépatique module le microenvironnement hépatique et stimule la croissance tumorale a été étudiée dans plusieurs modèles expérimentaux d'hépatectomie chez le petit animal (**Annexes 2 et 3**). Les résultats sont divergents voire contradictoires. Plusieurs raisons peuvent expliquer ces divergences telles que la diversité des modèles tumoraux utilisés (modèle orthotopique ou hétérotopique, animaux immunodéprimés ou immunocompétents, souris ou rats), le timing choisi pour l'injection des cellules tumorales (avant, après ou pendant la réalisation de l'hépatectomie) et le type de cellules tumorales injectées. Les résultats sont similaires pour le modèle de régénération hépatique induite par une embolisation portale chez le rat (**Annexe 2**). Enfin il est important de souligner que les patients justifiant d'une hépatectomie en deux temps ou d'une embolisation portale avant une hépatectomie majeure (car il s'agit de ces patients dont on parle) ont souvent une maladie carcinologique évolutive qui, en elle-même et indépendamment de l'hépatectomie ou de l'embolisation portale peut expliquer la progression tumorale.

Comme les deux stratégies sont possibles, l'une ou l'autre peut être choisie en fonction de l'extension de la tumeur primitive et de l'évolutivité de la maladie métastatique hépatique. L'objectif principal de la stratégie onco-chirurgicale est d'aller au bout de la stratégie c'est-à-dire réaliser la résection des deux localisations tumorales. L'attitude logique serait de traiter rapidement le site tumoral le plus évolutif car cette attitude permettrait d'augmenter les chances de traiter la deuxième localisation tumorale. L'hypothèse du microenvironnement tumoral nous incite à traiter en premier le cancer primitif, d'autant plus qu'environ 15% des patients qui ont une stratégie foie premier n'ont pas eu la résection du primitif soit du fait d'une progression tumorale soit de complications de la chirurgie hépatique ¹⁶.

Les protocoles de chimiothérapie doivent cibler le microenvironnement et non plus uniquement les cellules tumorales.

Des données cliniques issues d'études randomisées ont déjà confirmé l'efficacité de cette approche thérapeutique qui consiste à cibler l'angiogénèse tumorale. Les anti-angiogéniques ont prouvé leur efficacité en termes de réponse tumorale et de pronostic oncologique dans le cancer colorectal métastatique.

Nous montrons par les résultats de l'**Article 4** que si on choisit d'associer un anti-angiogénique à la chimiothérapie conventionnelle péri-opératoire, il faut probablement le faire davantage si la tumeur primitive est réséquée en premier. Les résultats de l'**Article 3** suggèrent que si on choisit de traiter par une chimiothérapie adjuvante un patient opéré de métastases hépatiques synchrones, il faut probablement le faire davantage si les métastases hépatiques sont réséquées en premier.

En conclusion, nos données sur les interactions entre une tumeur colique ou rectale, le microenvironnement hépatique et l'angiogénèse tumorale pourraient dans ce contexte nous servir de rationnel scientifique pour rediscuter nos stratégies onco-chirurgicales pour les patients qui ont cancer colorectal et des métastases hépatiques synchrones. Les deux stratégies chirurgicales sont possibles mais il existe tout de même des données fondamentales pour privilégier une chirurgie première de la tumeur primitive et l'utilisation d'anti-angiogéniques.

7. PERSPECTIVES

Les résultats expérimentaux obtenus à partir de notre modèle relevant et proche de la clinique confirment que les progéniteurs endothéliaux dérivés de la moelle osseuse ont un rôle fonctionnel (sécrétion de facteurs pro-angiogéniques modifiant à distance le parenchyme hépatique) et structurel (formation de nouveaux vaisseaux) dans la néo-angiogénèse tumorale et le processus métastatique. Bien que les mécanismes impliqués dans le recrutement et la mobilisation de ces progéniteurs ne sont pas clairement démontrés dans le cancer colorectal, ces résultats apportent un solide rationnel sur la possibilité d'utiliser ces cellules comme de potentiels biomarqueurs circulants de l'angiogénèse tumorale et donc du pronostic du malade. Ils pourraient aussi être utilisés dans ce contexte comme des biomarqueurs de l'efficacité des traitements ciblant l'angiogénèse tumorale ⁵².

Bien qu'il n'existe actuellement aucun consensus sur les marqueurs de surface qui identifient ces cellules, ces cellules dérivées de la moelle osseuse pourraient à eux seuls constituer une nouvelle cible thérapeutique dans la lutte contre le cancer ^{74, 75}.

Enfin, nos données expérimentales sur ces progéniteurs endothéliaux dérivés de la moelle osseuse pourraient nous aider à apporter des éléments de réponse à la question si l'ischémie/reperfusion induite par le clampage vasculaire au cours d'une hépatectomie a un effet délétère ou pas sur la croissance tumorale ⁷⁶⁻⁸⁰. Bien que les mécanismes impliqués soient encore mal expliqués, des publications cliniques récentes ont montré l'absence d'impact du clampage hépatique sur la survie globale de patients opérés de métastases hépatiques d'origine colorectale ^{81, 82}. En pratique cependant, le lien de causalité entre clampage hépatique et croissance des métastases hépatiques n'est pas clairement démontré, si bien que l'indication de cette technique chirurgicale doit rester large au cours d'une résection hépatique (**Annexe 4**).

8. BIBLIOGRAPHIE

1. Headon H, Wazir U, Kasem A, Mokbel K. Surgical treatment of the primary tumour improves the overall survival in patients with metastatic breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *Mol Clin Oncol* 2016; 4(5):863-867.
2. Bertani E, Fazio N, Radice D, et al. Assessing the role of primary tumour resection in patients with synchronous unresectable liver metastases from pancreatic neuroendocrine tumour of the body and tail. A propensity score survival evaluation. *Eur J Surg Oncol* 2016.
3. Reddy SK, Pawlik TM, Zorzi D, et al. Simultaneous resections of colorectal cancer and synchronous liver metastases: a multi-institutional analysis. *Ann Surg Oncol* 2007; 14(12):3481-91.
4. Tanaka K, Shimada H, Matsuo K, et al. Outcome after simultaneous colorectal and hepatic resection for colorectal cancer with synchronous metastases. *Surgery* 2004; 136(3):650-9.
5. Thelen A, Jonas S, Benckert C, et al. Simultaneous versus staged liver resection of synchronous liver metastases from colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 2007; 22(10):1269-76.
6. de Haas RJ, Adam R, Wicherts DA, et al. Comparison of simultaneous or delayed liver surgery for limited synchronous colorectal metastases. *Br J Surg* 2010; 97(8):1279-89.
7. Liu SK, Church JM, Lavery IC, Fazio VW. Operation in patients with incurable colon cancer--is it worthwhile? *Dis Colon Rectum* 1997; 40(1):11-4.
8. Kuo LJ, Leu SY, Liu MC, et al. How aggressive should we be in patients with stage IV colorectal cancer? *Dis Colon Rectum* 2003; 46(12):1646-52.
9. Rosen SA, Buell JF, Yoshida A, et al. Initial presentation with stage IV colorectal cancer: how aggressive should we be? *Arch Surg* 2000; 135(5):530-4; discussion 534-5.
10. Mentha G, Majno PE, Andres A, et al. Neoadjuvant chemotherapy and resection of advanced synchronous liver metastases before treatment of the colorectal primary. *Br J Surg* 2006; 93(7):872-8.
11. Andres A, Toso C, Adam R, et al. A survival analysis of the liver-first reversed management of advanced simultaneous colorectal liver metastases: a LiverMetSurvey-based study. *Ann Surg* 2012; 256(5):772-8; discussion 778-9.
12. Brouquet A, Mortenson MM, Vauthey JN, et al. Surgical strategies for synchronous colorectal liver metastases in 156 consecutive patients: classic, combined or reverse strategy? *J Am Coll Surg* 2010; 210(6):934-41.
13. Mayo SC, Pulitano C, Marques H, et al. Surgical management of patients with synchronous colorectal liver metastasis: a multicenter international analysis. *J Am Coll Surg* 2013; 216(4):707-16; discussion 716-8.
14. Okuno M, Hatano E, Kasai Y, et al. Feasibility of the liver-first approach for patients with initially unresectable and not optimally resectable synchronous colorectal liver metastases. *Surg Today* 2015.

15. Tanaka K, Murakami T, Matsuo K, et al. Preliminary results of 'liver-first' reverse management for advanced and aggressive synchronous colorectal liver metastases: a propensity-matched analysis. *Dig Surg* 2015; 32(1):16-22.
16. Welsh FK, Chandrakumaran K, John TG, et al. Propensity score-matched outcomes analysis of the liver-first approach for synchronous colorectal liver metastases. *Br J Surg* 2016; 103(5):600-6.
17. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100(1):57-70.
18. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144(5):646-74.
19. Lim C, Eveno C, Pocard M. [Microenvironment and colorectal liver metastases angiogenesis: surgical implications]. *Bull Cancer* 2013; 100(4):343-50.
20. Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, et al. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature* 2005; 438(7069):820-7.
21. van der Wal GE, Gouw AS, Kamps JA, et al. Angiogenesis in synchronous and metachronous colorectal liver metastases: the liver as a permissive soil. *Ann Surg* 2011; 255(1):86-94.
22. Mundy GR. Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(8):584-93.
23. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 2003; 3(6):401-10.
24. Warren RS, Yuan H, Matli MR, et al. Regulation by vascular endothelial growth factor of human colon cancer tumorigenesis in a mouse model of experimental liver metastasis. *J Clin Invest* 1995; 95(4):1789-97.
25. Ishigami SI, Aii S, Furutani M, et al. Predictive value of vascular endothelial growth factor (VEGF) in metastasis and prognosis of human colorectal cancer. *Br J Cancer* 1998; 78(10):1379-84.
26. Carmeliet P. VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology* 2005; 69 Suppl 3:4-10.
27. Ferrara N. VEGF as a therapeutic target in cancer. *Oncology* 2005; 69 Suppl 3:11-6.
28. Takahashi Y, Tucker SL, Kitadai Y, et al. Vessel counts and expression of vascular endothelial growth factor as prognostic factors in node-negative colon cancer. *Arch Surg* 1997; 132(5):541-6.
29. Tokunaga T, Oshika Y, Abe Y, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA isoform expression pattern is correlated with liver metastasis and poor prognosis in colon cancer. *Br J Cancer* 1998; 77(6):998-1002.
30. Zhang T, Otevrel T, Gao Z, et al. Evidence that APC regulates survivin expression: a possible mechanism contributing to the stem cell origin of colon cancer. *Cancer Res* 2001; 61(24):8664-7.
31. Seno H, Oshima M, Ishikawa TO, et al. Cyclooxygenase 2- and prostaglandin E(2) receptor EP(2)-dependent angiogenesis in Apc(Delta716) mouse intestinal polyps. *Cancer Res* 2002; 62(2):506-11.
32. Okada F, Rak JW, Croix BS, et al. Impact of oncogenes in tumor angiogenesis: mutant K-ras up-regulation of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is necessary, but not sufficient for tumorigenicity of human colorectal carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(7):3609-14.
33. Choi HJ, Hyun MS, Jung GJ, et al. Tumor angiogenesis as a prognostic predictor in colorectal carcinoma with special reference to mode of metastasis and recurrence. *Oncology* 1998; 55(6):575-81.

34. Frank RE, Saclarides TJ, Leurgans S, et al. Tumor angiogenesis as a predictor of recurrence and survival in patients with node-negative colon cancer. *Ann Surg* 1995; 222(6):695-9.
35. Tomisaki S, Ohno S, Ichiyoshi Y, et al. Microvessel quantification and its possible relation with liver metastasis in colorectal cancer. *Cancer* 1996; 77(8 Suppl):1722-8.
36. Fuchs CS, Marshall J, Barrueco J. Randomized, controlled trial of irinotecan plus infusional, bolus, or oral fluoropyrimidines in first-line treatment of metastatic colorectal cancer: updated results from the BICC-C study. *J Clin Oncol* 2008; 26(4):689-90.
37. Hurwitz HI, Fehrenbacher L, Hainsworth JD, et al. Bevacizumab in combination with fluorouracil and leucovorin: an active regimen for first-line metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23(15):3502-8.
38. Kabbinavar FF, Hambleton J, Mass RD, et al. Combined analysis of efficacy: the addition of bevacizumab to fluorouracil/leucovorin improves survival for patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23(16):3706-12.
39. Kabbinavar FF, Schulz J, McCleod M, et al. Addition of bevacizumab to bolus fluorouracil and leucovorin in first-line metastatic colorectal cancer: results of a randomized phase II trial. *J Clin Oncol* 2005; 23(16):3697-705.
40. Saltz LB, Clarke S, Diaz-Rubio E, et al. Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: a randomized phase III study. *J Clin Oncol* 2008; 26(12):2013-9.
41. Joyce JA, Pollard JW. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer* 2009; 9(4):239-52.
42. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 1999; 85(3):221-8.
43. Takahashi T, Kalka C, Masuda H, et al. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med* 1999; 5(4):434-8.
44. Lyden D, Hattori K, Dias S, et al. Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med* 2001; 7(11):1194-201.
45. Rafii S, Lyden D, Benezra R, et al. Vascular and haematopoietic stem cells: novel targets for anti-angiogenesis therapy? *Nat Rev Cancer* 2002; 2(11):826-35.
46. Hilbe W, Dirnhofer S, Oberwasserlechner F, et al. CD133 positive endothelial progenitor cells contribute to the tumour vasculature in non-small cell lung cancer. *J Clin Pathol* 2004; 57(9):965-9.
47. Lin Y, Weisdorf DJ, Solovey A, Hebbel RP. Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J Clin Invest* 2000; 105(1):71-7.
48. Goon PK, Lip GY, Boos CJ, et al. Circulating endothelial cells, endothelial progenitor cells, and endothelial microparticles in cancer. *Neoplasia* 2006; 8(2):79-88.
49. Naik RP, Jin D, Chuang E, et al. Circulating endothelial progenitor cells correlate to stage in patients with invasive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2008; 107(1):133-8.
50. Richter-Ehrenstein C, Rentzsch J, Runkel S, et al. Endothelial progenitor cells in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2007; 106(3):343-9.
51. Matsusaka S, Suenaga M, Mishima Y, et al. Circulating endothelial cells predict for response to bevacizumab-based chemotherapy in metastatic colorectal cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2010; 68(3):763-8.

52. Malka D, Boige V, Jacques N, et al. Clinical value of circulating endothelial cell levels in metastatic colorectal cancer patients treated with first-line chemotherapy and bevacizumab. *Ann Oncol* 2011; 23(4):919-27.
53. Massard C, Borget I, Le Deley MC, et al. Prognostic value of circulating VEGFR2+ bone marrow-derived progenitor cells in patients with advanced cancer. *Eur J Cancer* 2012; 48(9):1354-62.
54. Farace F, Bidart JM. [Circulating endothelial cells: biomarkers for monitoring activity of antiangiogenic therapy]. *Bull Cancer* 2007; 94 Spec No:S254-9.
55. Bertolini F, Shaked Y, Mancuso P, Kerbel RS. The multifaceted circulating endothelial cell in cancer: towards marker and target identification. *Nat Rev Cancer* 2006; 6(11):835-45.
56. Kaplan RN, Rafii S, Lyden D. Preparing the "soil": the premetastatic niche. *Cancer Res* 2006; 66(23):11089-93.
57. Psaila B, Lyden D. The metastatic niche: adapting the foreign soil. *Nat Rev Cancer* 2009; 9(4):285-93.
58. Hiratsuka S, Nakamura K, Iwai S, et al. MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis. *Cancer Cell* 2002; 2(4):289-300.
59. Hiratsuka S, Watanabe A, Sakurai Y, et al. The S100A8-serum amyloid A3-TLR4 paracrine cascade establishes a pre-metastatic phase. *Nat Cell Biol* 2008; 10(11):1349-55.
60. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991; 324(1):1-8.
61. Fox SB, Moghaddam A, Westwood M, et al. Platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase expression in normal tissues: an immunohistochemical study. *J Pathol* 1995; 176(2):183-90.
62. Landini G. Quantitative analysis of the epithelial lining architecture in radicular cysts and odontogenic keratocysts. *Head Face Med* 2006; 2:4.
63. Ruifrok AC, Katz RL, Johnston DA. Comparison of quantification of histochemical staining by hue-saturation-intensity (HSI) transformation and color-deconvolution. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2003; 11(1):85-91.
64. Landini G, Othman IE. Architectural analysis of oral cancer, dysplastic, and normal epithelia. *Cytometry A* 2004; 61(1):45-55.
65. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997; 275(5302):964-7.
66. Els Sheikh E, Uzunel M, He Z, et al. Only a specific subset of human peripheral-blood monocytes has endothelial-like functional capacity. *Blood* 2005; 106(7):2347-55.
67. Hur J, Yoon CH, Kim HS, et al. Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovascularogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24(2):288-93.
68. Ingram DA, Mead LE, Tanaka H, et al. Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. *Blood* 2004; 104(9):2752-60.
69. Rehman J, Li J, Orschell CM, March KL. Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation* 2003; 107(8):1164-9.
70. Urbich C, Heeschen C, Aicher A, et al. Relevance of monocytic features for neovascularization capacity of circulating endothelial progenitor cells. *Circulation* 2003; 108(20):2511-6.

71. Yoder MC, Mead LE, Prater D, et al. Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. *Blood* 2007; 109(5):1801-9.
72. Bruin SC, Klijn C, Liefers GJ, et al. Specific genomic aberrations in primary colorectal cancer are associated with liver metastases. *BMC Cancer* 2010; 10:662.
73. Gao D, Nolan DJ, Mellick AS, et al. Endothelial progenitor cells control the angiogenic switch in mouse lung metastasis. *Science* 2008; 319(5860):195-8.
74. Bertolini F, Paul S, Mancuso P, et al. Maximum tolerable dose and low-dose metronomic chemotherapy have opposite effects on the mobilization and viability of circulating endothelial progenitor cells. *Cancer Res* 2003; 63(15):4342-6.
75. Shaked Y, Bertolini F, Man S, et al. Genetic heterogeneity of the vasculogenic phenotype parallels angiogenesis; Implications for cellular surrogate marker analysis of antiangiogenesis. *Cancer Cell* 2005; 7(1):101-11.
76. Man K, Ng KT, Lo CM, et al. Ischemia-reperfusion of small liver remnant promotes liver tumor growth and metastases--activation of cell invasion and migration pathways. *Liver Transpl* 2007; 13(12):1669-77.
77. Nicoud IB, Jones CM, Pierce JM, et al. Warm hepatic ischemia-reperfusion promotes growth of colorectal carcinoma micrometastases in mouse liver via matrix metalloproteinase-9 induction. *Cancer Res* 2007; 67(6):2720-8.
78. Nijkamp MW, Hoogwater FJ, Steller EJ, et al. CD95 is a key mediator of invasion and accelerated outgrowth of mouse colorectal liver metastases following radiofrequency ablation. *J Hepatol* 2010; 53(6):1069-77.
79. van der Bilt JD, Kranenburg O, Nijkamp MW, et al. Ischemia/reperfusion accelerates the outgrowth of hepatic micrometastases in a highly standardized murine model. *Hepatology* 2005; 42(1):165-75.
80. van der Bilt JD, Soeters ME, Duyverman AM, et al. Perinecrotic hypoxia contributes to ischemia/reperfusion-accelerated outgrowth of colorectal micrometastases. *Am J Pathol* 2007; 170(4):1379-88.
81. Giuliani F, Ardito F, Pulitano C, et al. Does hepatic pedicle clamping affect disease-free survival following liver resection for colorectal metastases? *Ann Surg* 2010; 252(6):1020-6.
82. Weiss MJ, Ito H, Araujo RL, et al. Hepatic pedicle clamping during hepatic resection for colorectal liver metastases: no impact on survival or hepatic recurrence. *Ann Surg Oncol* 2012; 20(1):285-94.

9. ANNEXES

ANNEXE 1

Bulletin du Cancer. 2013 100:343-350.

Microenvironnement et angiogénèse des métastases hépatiques d'origine colorectale: implications chirurgicales.

Lim C, Eveno C, Pocard M.

Microenvironnement et angiogenèse des métastases hépatiques d'origine colorectale : implications chirurgicales

Microenvironment and colorectal liver metastases angiogenesis: surgical implications.

Chetana Lim¹, Clarisse Eveno^{1,2}, Marc Pocard^{1,2}

¹ Hôpital Lariboisière, unité Inserm U965 (université Paris-VII), équipe angiogenèse et recherche translationnelle, 2, rue Ambroise-Paré, 75010 Paris, France

² Assistance publique des hôpitaux de Paris, hôpital Lariboisière, service de chirurgie digestive et cancérologique, 2, rue Ambroise-Paré, 75010 Paris, France

<marc.pocard@inserm.fr>

Article reçu le 11 janvier 2013,

accepté le 12 janvier 2013

Tirés à part : M. Pocard

Pour citer cet article : Lim C, Eveno C, Pocard M. Microenvironnement et angiogenèse des métastases hépatiques d'origine colorectale : implications chirurgicales. *Bull Cancer* 2013 ; 100 : 343-50.
doi : 10.1684/bdc.2013.1725.

Résumé. Stephen Paget a introduit la théorie de la graine et du sol selon laquelle les métastases ne se répartissent pas au hasard dans l'organisme mais ne peuvent croître que dans un environnement approprié. Il existe un grand nombre d'arguments expérimentaux et cliniques qui contribuent à légitimer cette hypothèse. Plus récemment, il a été suggéré que la tumeur primitive pourrait modifier le microenvironnement du futur site métastatique afin de le rendre permissif au développement de métastase, conduisant au concept de niche prémétastatique. Les cellules tumorales produiraient des cytokines et des facteurs de croissance qui activeraient le recrutement et la mobilisation de progéniteurs endothéliaux médullaires, nécessaires à la néovascularisation tumorale et à la croissance des métastases. Bien que la signification clinique de la niche prémétastatique reste encore à élucider, cette hypothèse apporte un élément de réponse pour recommander une exérèse première de la tumeur colorectale primitive en cas de métastases hépatiques synchrones. La signalisation réciproque entre la tumeur primitive et le microenvironnement métastatique influencerait la progression tumorale et représenterait, outre une cible thérapeutique importante dans la lutte contre le cancer, un rationnel fondamental pour rediscuter nos stratégies thérapeutiques de prise en charge des métastases hépatiques synchrones. ▲

Abstract. Stephen Paget's proposed an original "seed and soil" theory, with organ-preference patterns of tumor metastasis resulting in interaction between metastatic tumor cells and their specific microenvironment. There is many experimental and clinical data showing that this theory is validated. More recently, it has been suggested that early changes in the microenvironment at the distant sites, could be induced by the primary tumor, reported as "pre-metastatic niche" formation. Tumor cells could produce growth factors, cytokines which could facilitate the recruitment and the mobilization of the bone marrow-derived endothelial progenitor cells, and thus necessary for the tumor neovascularization and metastasis growth. Although the clinical value of the concept of the premetastatic niche is not yet elucidated, these data could encourage surgeons to perform the colorectal surgery first and then the liver surgery, in patients with synchronous colorectal liver metastases. The reciprocal interactions between primary tumor and microenvironment at the distant sites are therefore determinant for tumor progression. Taken together, the microenvironment is an important therapeutic target and surgeons and oncologist could discuss the choice of different surgical strategy for patient with synchronous colorectal liver metastases regarding the interaction with the microenvironment affected by primary tumor resection. ▲

Mots clés : microenvironnement tumoral, angiogenèse, métastases hépatiques, cancer colorectal, niche prémétastatique

Key words : tumor microenvironment, angiogenesis, liver metastases, colorectal cancer, pro-metastatic niche

doi : 10.1684/bdc.2013.1725

Introduction

Lors de cette dernière décennie, un nombre croissant de publications a été consacré à l'étude de la relation entre le microenvironnement et la carcinogenèse. Ces travaux reposent sur l'utilisation de modèles *in vitro* et *in vivo* de prolifération tumorale, d'invasion, de remodelage cellulaire, d'angiogenèse et d'inflammation, mais aussi sur une analyse de la génomique, de la biologie moléculaire et des banques de données de tissus. Le processus métastatique est à la fois dépendant des modifications génétiques et épigénétiques au sein du génome de la cellule tumorale, qui reste le facteur déterminant principal, mais aussi dépendant de facteurs extrinsèques tels que le microenvironnement de la tumeur primitive et des sites métastatiques [1]. La croissance tumorale et la dissémination métastatique sont largement dépendantes de l'angiogenèse tumorale. Les éléments du microenvironnement interviennent à toutes les étapes du processus métastatique. Des données cliniques ont déjà confirmé l'efficacité de ces approches scientifiques avec les traitements anti-angiogéniques qui ont prouvé leur efficacité en termes de réponse tumorale et de pronostic pour une majorité de cancers métastatiques. Parmi eux, les cancers colorectaux ont été parmi les premiers à bénéficier d'un traitement anti-angiogénique efficace.

L'angiogenèse est aussi un processus physiologique, activé dans la régénération hépatique induite par une hépatectomie. La possibilité qu'une chirurgie curative des métastases hépatiques ait elle-même un effet délétère sur la croissance des lésions a été évoquée il y a plus de 20 ans, sans qu'aucun lien direct n'ait été démontré. La compréhension de la relation entre la chirurgie et la croissance tumorale nécessite de mieux comprendre la physiopathologie du microenvironnement tumoral. L'hypothèse que nous présentons ici, repose sur la possibilité que la présence de la tumeur colorectale primitive ou qu'un geste chirurgical sur la lésion primitive module le microenvironnement de la future lésion métastatique via l'angiogenèse de façon à le rendre ou non, permissif à la croissance tumorale. L'objectif de cet article est d'amener les chirurgiens et oncologues à rediscuter nos stratégies médico-chirurgicales de prise en charge des malades porteurs de métastases hépatiques synchrones.

Pourquoi cibler l'angiogenèse dans le cancer colorectal métastatique ?

Rationnel

Comme pour la majorité des tumeurs solides, la phase de croissance précoce d'une tumeur primitive d'origine colorectale et son processus de dissémination métastatique sont largement dépendants de la formation de nouveaux vaisseaux (angiogenèse tumorale), sans

laquelle les cellules tumorales demeurent à l'état de cellules dormantes, état stable intermédiaire entre la prolifération et l'apoptose. Ces néovaisseaux tumoraux assurent les apports en nutriments, oxygène et facteurs de croissance indispensables à la croissance de la tumeur primitive, mais aussi de sa dissémination. L'initiation de l'angiogenèse tumorale serait sous la dépendance d'un *switch* angiogénique, secondaire à la sécrétion par les cellules tumorales de facteurs pro-angiogéniques, perturbant ainsi l'équilibre entre facteurs pro- et anti-angiogéniques. Cette sécrétion est liée à l'hypoxie tissulaire et à des modifications génétiques au sein du génome des cellules tumorales, intéressant certains oncogènes clés [2]. Le processus d'angiogenèse se fait par deux mécanismes, le bourgeonnement des vaisseaux sanguins préexistants (*sprouting*) et le recrutement et l'incorporation de cellules endothéliales aux vaisseaux en formation. Parmi les facteurs angiogéniques identifiés, le *vascular endothelial growth factor* (VEGF) est le régulateur clé de l'angiogenèse tumorale. Cette glycoprotéine exprimée de façon dérégulée par les cellules tumorales via sa fixation, active deux récepteurs VEGFR1 et VEGFR2. L'activation de cette voie de signalisation VEGF-dépendante est un élément favorisant la migration, la survie et la prolifération des cellules endothéliales, l'induction de protéinases conduisant à un remodelage de la matrice extracellulaire, l'augmentation de la perméabilité vasculaire et le maintien de la survie des vaisseaux néoformés. L'administration d'anticorps anti-VEGF dans des modèles animaux de xénogreffes de tumeurs colorectales humaines semble inhiber la croissance tumorale [3].

Arguments épidémiologiques et cliniques

La croissance des cancers colorectaux s'associe à l'expression accrue de ces facteurs pro-angiogéniques, il a été ainsi montré qu'une surexpression du VEGF était retrouvée dans 37 à 100 % des cas [4]. Cette surexpression est corrélée à l'invasion cellulaire, à la densité vasculaire, au développement des métastases et au pronostic des malades [5-9]. L'expression du VEGF semble fréquemment corrélée aux mutations de RAS, aux mutations de la voie de signalisation APC-WNT, ainsi qu'à la surexpression de la cyclooxygénase 2, anomalies fréquemment rapportés au cours du cancer colorectal [10-12]. Une association significative entre la densité microvasculaire tumorale et les taux de récurrence tumorale et de survie des malades a été également rapportée [13-15]. Il existe donc un rationnel à cibler l'angiogenèse dans le cancer colorectal métastatique, dont le but est de ne pas seulement cibler la tumeur mais aussi un mécanisme indispensable à sa croissance et à sa dissémination. L'utilisation d'anti-angiogénique en association à une chimiothérapie cytotoxique a permis d'améliorer la médiane de

survie globale à plus de 24 mois, faisant du bévazumab (anticorps anti-VEGF) le traitement standard en première ligne du cancer colorectal métastatique [16-19]. Par ailleurs, l'utilisation du bévazumab a permis d'amener certains patients considérés comme initialement non résecables à la résection chirurgicale (résécabilité secondaire) avec également un bénéfice en termes de survie globale.

Quel rôle pour le microenvironnement dans l'angiogenèse tumorale et le potentiel métastatique ?

Progéniteurs médullaires, angiogenèse tumorale et progression tumorale

L'angiogenèse physiologique et tumorale, chez l'adulte, a longtemps été considérée comme un processus local et exclusivement assuré par le bourgeonnement des vaisseaux préexistants, résultant de la prolifération et de la migration des cellules endothéliales. Deux publications ont démontré pour la première fois que la vasculogenèse physiologique pourrait être le résultat de la différenciation et de l'incorporation fonctionnelle de cellules endothéliales progénitrices (CEP), originaires de la moelle osseuse [20-22] ; concept qui était auparavant exclusivement lié à l'embryogenèse. D'autres progéniteurs médullaires, tels que des cellules hématopoïétiques progénitrices (CHP) sont recrutés en même temps que les CEP et contribuent également au processus de vasculogenèse. C'est en 2001, suite aux travaux de Lyden *et al.* sur la souris, qu'il a été montré pour la première fois que des progéniteurs médullaires pourraient contribuer à la néoangiogenèse tumorale [23]. Depuis ces premières observations, les CEP, aujourd'hui bien caractérisées pour leur rôle dans la réparation des parois vasculaires et la néoangiogenèse post-ischémique, sont largement explorées pour leur rôle dans l'initiation de la néoangiogenèse tumorale et dans la croissance tumorale et le développement des métastases. Néanmoins, l'importance de ces CEP circulantes dans le processus de néoangiogenèse tumorale reste encore à élucider. Dans les modèles expérimentaux d'angiogenèse tumorale, entre 5 et 50 % des CEP sont retrouvées dans la paroi des néovaisseaux tumoraux [24] et seulement pour près de 5 % chez des patients atteints de cancer du poumon ou ayant développé des cancers secondaires [25, 26]. Les études sur la valeur pronostique des CEP et des cellules endothéliales circulantes sont nombreuses dans le cancer du sein [27-29]. Dans le cancer colorectal en situation métastatique, il a été rapporté une corrélation entre un taux élevé de CEP ou de cellules

endothéliales circulantes et la réponse tumorale après bévazumab ainsi qu'à la survie globale [30-32]. Ces travaux sont encore rares et hétérogènes, du fait de l'absence de standardisation des méthodes de détection et de la rareté de ces cellules dans le sang, représentant 0,01 à 0,0001 % des cellules mononuclées périphériques [33]. Plusieurs données expérimentales suggèrent que le taux de CEP circulantes pourrait varier selon le type, le grade et la localisation de la tumeur [34].

En résumé, les données expérimentales suggèrent que les CEP d'origine médullaire pourraient contribuer à l'angiogenèse tumorale et la progression métastatique. En pratique, elles pourraient être utilisées comme biomarqueur pronostique du cancer colorectal. Toutefois, l'hétérogénéité des résultats souligne l'absence de standardisation des méthodes de détection et la possibilité que leur influence diffère d'un cancer à un autre ou de la localisation métastatique.

Progéniteurs endothéliaux et niche pré-métastatique

Des travaux récents chez la souris ont montré que le microenvironnement du futur site métastatique pourrait être modifié à distance par la tumeur initiale [35, 36]. La formation d'une « niche pré-métastatique » par la tumeur primitive rendrait le microenvironnement de l'organe cible propice et favorable au développement des métastases. Cela confirme la théorie ancienne proposée par Stephen Paget en 1889 de la graine et du sol. Les cellules tumorales sécrètent du VEGF-A favorisant l'activation, la mobilisation et le recrutement local de CHP provenant de la moelle osseuse. L'entrée des CHP dans la circulation sanguine et leur migration vers les sites métastatiques précéderait l'arrivée des cellules tumorales. Les CHP exprimant à leur surface le VEGFR1+ circuleraient dans le sang et se dirigeraient dans les stromas périvasculaires riches en fibronectine, la fibronectine étant synthétisée par les fibroblastes qui sont localisés dans les régions sous-capsulaires des organes ou par des *fibroblastes-like* elles-mêmes stimulées par le PlGF sécrété aussi par la tumeur initiale. Les CHP expriment à la fois une intégrine VLA-4 leur permettant d'adhérer à la fibronectine, mais aussi une métalloprotéinase dégradant la membrane basale, ce qui permet d'accroître l'extravasation des CHP dans la niche pré-métastatique. À ce stade, l'envahissement du stroma par les CHP serait responsable d'une activation locale du stroma, qui serait alors responsable du recrutement secondaire des cellules tumorales circulantes, la niche pré-métastatique devient alors une micrométastase. Enfin, les CEP médullaires (exprimant le VEGFR2+) sont recrutées pour contribuer à l'établissement d'une microvascularisation de la future lésion métastatique et la progression des micrométastases en métastases macroscopiquement

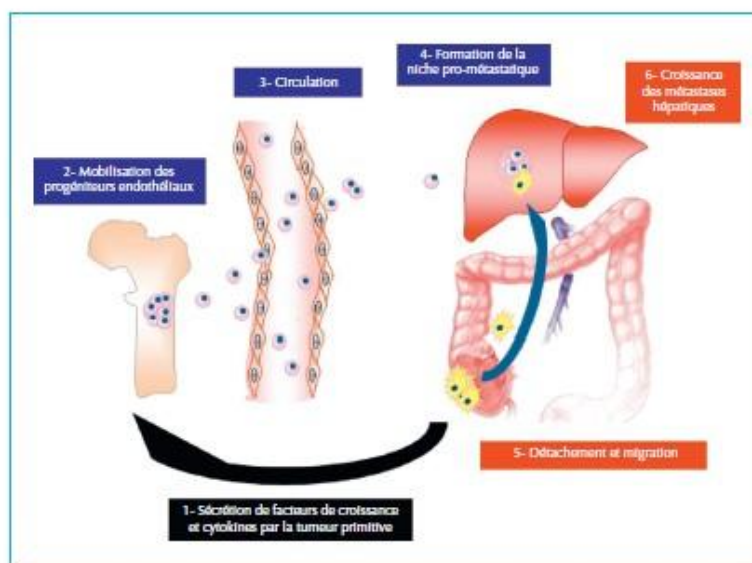


Figure 1. Concept de la niche prométastatique dans le cancer colorectal. 1. Sécrétion de facteurs de croissance et cytokines par les cellules tumorales. 2. Induction de la mobilisation des progéniteurs endothéliaux médullaires dans la circulation sanguine. 3. Circulation et migration des vers le foie. 4. Formation de la niche prométastatique. 5. Intravasation, circulation et dissémination des cellules tumorales. 6. Arrivée des cellules tumorales dans la niche prométastatique (micrométastase), angiogenèse locale et croissance des métastases (macrométastase).

décelables. L'inhibition pharmacologique de VEGFR1+ et VEGFR2 semble inhiber la formation de micro- et macrométastases [23], suggérant que le processus de mobilisation des progéniteurs médullaires pourrait être un facteur-clé de la néoangiogenèse tumorale et du processus métastatique (figure 1).

Depuis ces premières observations, d'autres mécanismes de formation de niche pré-metastatique ont été décrits, faisant intervenir d'autres composantes cellulaires et moléculaires du microenvironnement :

- le recrutement de macrophages et la sécrétion locale de MMP9 seraient aussi un facteur favorisant le recrutement des cellules tumorales dans le poumon [37] ou ;
- le recrutement de cellules myéloïdes Mac1+ et la sécrétion locale de S100A8 et S100A9 par les cellules stromales [38].

En résumé, il existe des données issues de modèles pré-cliniques qui suggèrent que le microenvironnement du futur site métastatique pourrait être modifié à distance par la tumeur initiale. La formation d'une niche pré-metastatique serait alors le facteur-clé du recrutement et de l'implantation des cellules tumorales métastatiques. Toutefois, les modèles *in vivo* utilisés ont des limitations :

- ce concept n'a été décrit que dans un modèle expérimental de métastase pulmonaire chez la souris ;
- les modèles utilisés étaient des modèles hétérotopiques (greffes sous-cutanées de cellules de cancers

du poumon) d'injection de cellules tumorales syngéniques sur des animaux au système immunitaire déficient, ce qui devient discutable dès lors qu'il existe actuellement des données qui montrent l'influence de l'immunité anti-tumorale dans la cancérogenèse [39] ;

- les animaux étaient soumis à des irradiations pour différencier les diverses cellules murines (progéniteurs médullaires ou cellules tumorales). Ces irradiations aplasiantes pouvant elles-mêmes induire une mobilisation des progéniteurs médullaires.

Influence de la chirurgie sur le microenvironnement tumoral

Influence de l'exérèse de la tumeur primitive sur le microenvironnement métastatique

Sur la base des données expérimentales suggérant que la tumeur primitive serait capable de modifier le microenvironnement de la future lésion secondaire en favorisant la mise en place d'une niche pré-metastatique, nous pouvons nous interroger sur l'effet de l'exérèse de la tumeur colique ou rectale qui pourrait donc limiter le processus métastatique en supprimant la relation entre la tumeur initiale et le microenvironnement métastatique. Une étude majeure

Microenvironnement et angiogenèse des métastases hépatiques d'origine colorectale

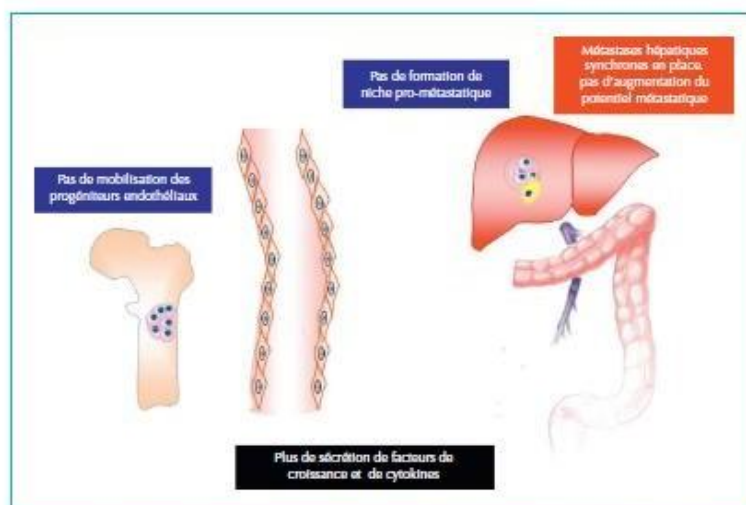


Figure 2. Niche prométastatique et exérèse de la tumeur colique primitive en cas de métastases hépatiques synchrones. L'exérèse de la tumeur primitive (colectomie droite) supprime la possibilité de formation de niches prométastatiques et diminue le potentiel métastatique.

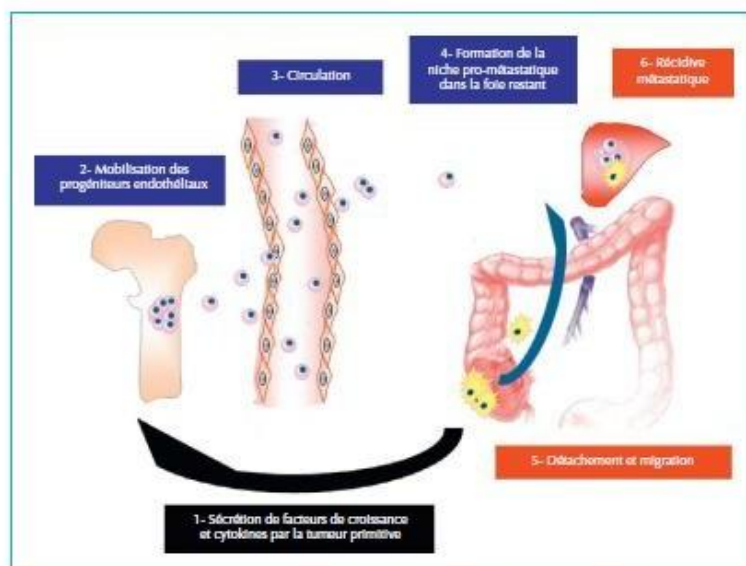


Figure 3. Niche prométastatique et exérèse première des lésions hépatiques (hépatectomie droite) en cas de métastases hépatiques synchrones. La présence de la tumeur primitive contribue au développement de niches prométastatiques et explique en partie les récurrences intrahépatiques précoces.

a comparé, pour des patients opérés de métastases hépatiques, l'expression des déterminants moléculaires de l'angiogenèse dans la métastase hépatique et dans le foie adjacent, et ce pour trois situations cliniques différentes : métastases hépatiques synchrones avec cancer

du côlon en place, métastases hépatiques synchrones avec un cancer réséqué il y a plusieurs mois suivi de chimiothérapie, et métastases hépatiques métachrones diagnostiquées pendant le suivi [40]. Dans cette étude, il a été rapporté que l'activité d'angiogenèse traduite

C. Lim, *et al.*

par l'expression du CD31 et CD34 est plus forte en cas de métastase synchrone que métachrone, et ce dans le foie juxta-tumoral par rapport au foie tumoral, suggérant qu'en présence d'une tumeur colique primitive, le parenchyme hépatique adjacent aux métastases est un parenchyme favorable à l'angiogenèse tumorale et la croissance métastatique (*figures 2 et 3*).

Influence de l'hépatectomie et de l'embolisation portale sur le microenvironnement hépatique

Il est admis qu'une hépatectomie induit une régénération hépatique accompagnée d'une angiogenèse physiologique [41, 42]. La possibilité que l'angiogenèse physiologique initiée au moment de la régénération module le microenvironnement hépatique et ait un effet délétère sur la croissance des métastases a été étudiée dans plusieurs modèles expérimentaux d'hépatectomie chez la souris [43-46]. Les résultats sont hétérogènes voire contradictoires, à cause de la diversité des modèles tumoraux (modèles orthotopique ou hétérotopique, cellules tumorales syngéniques, animaux immunodéprimés ou immunocompétents, souris et rats), des hépatectomies (majeure ou mineure) et du moment choisi pour injecter les cellules tumorales (avant, après ou pendant la réalisation de l'hépatectomie). Un autre modèle de régénération hépatique par embolisation portale a été aussi étudié chez le rat, avec des résultats discordants [47, 48]. En pratique, l'objectif de l'embolisation portale est d'accroître le taux de résécabilité des patients ayant des métastases hépatiques initialement non résécables [49] en induisant une hypertrophie du futur foie restant *via* une régénération hépatique. En théorie, elle pourrait stimuler la croissance tumorale des métastases hépatiques, soit par l'induction d'une angiogenèse physiologique *via* la régénération hépatique ou soit par une augmentation du débit artériel dans le foie embolisé. Bien que cela n'a jamais été démontré dans les modèles expérimentaux, l'administration de bévazumab pourrait altérer le processus de régénération après embolisation portale mais les résultats ne sont pas consensuels [50-52]. Cela conduit toutefois à discuter de poursuivre ou de reprendre rapidement la chimiothérapie pendant que le foie régénère après hépatectomie ou après embolisation portale.

Microenvironnement et stratégie chirurgicale dans les métastases hépatiques colorectales synchrones

Les métastases hépatiques synchrones sont retrouvées chez environ 20 % des patients au moment du diagnostic de cancer colorectal et posent une question de stratégie chirurgicale quant à l'ordre dans lequel opé-

rer la tumeur colorectale primitive et les métastases hépatiques. L'exérèse de la tumeur primitive en cas de maladie métastatique synchrone reste une question récurrente pour toute la cancérologie solide et toujours non résolue à ce jour. Face à cette question, les stratégies sont variables d'un centre à un autre variant d'une chirurgie en un temps (exérèse de la tumeur colique ou rectale et résection des métastases hépatiques) ou en deux temps (avec foie ou côlon en premier) [53-57]. En cas de métastases hépatiques synchrones, l'exérèse de la tumeur primitive n'est souvent pas réalisée sauf en présence d'une tumeur compliquée (obstruction, perforation ou hémorragie). Bien que le rationnel ne soit pas clairement établi, certaines équipes préconisent de réséquer les métastases hépatiques en premier. Un argument discutable avancé en faveur de cette stratégie est que le pronostic de ces patients serait conditionné par l'atteinte hépatique et que la priorité devrait être donnée à une résection première de toutes les lésions hépatiques. Mais, compte tenu que nous avons fait l'hypothèse que la tumeur initiale pouvait modifier le microenvironnement hépatique, l'idée de recommander une exérèse première de la tumeur colorectale en cas de métastases hépatiques synchrones afin de diminuer le caractère permissif du foie pour le développement des métastases est privilégiée. L'objectif principal n'étant pas de mettre à l'abri le patient d'une possible occlusion digestive sous chimiothérapie mais surtout de ne pas laisser en place « la machine à métastases » puisqu'elle génère en plus un foie permissif.

Conclusion

Le concept de « niche prémétastatique », soutenu par plusieurs études précliniques, suggère que la tumeur primitive modifie le microenvironnement du futur site métastatique afin de le rendre permissif au développement métastatique. Les cellules tumorales produiraient des cytokines et des facteurs de croissance qui activeaient le recrutement et la mobilisation de progéniteurs endothéliaux médullaires, nécessaires à la néovascularisation tumorale. Bien que la signification clinique de la niche prémétastatique reste encore à être définie, une étude clinique d'importance majeure abonde dans le sens de cette hypothèse et apporte un élément de réponse pour étudier l'impact d'une exérèse première de la tumeur colorectale primitive en cas de métastases hépatiques synchrones. La signalisation entre la tumeur primitive et le microenvironnement métastatique influençant la progression tumorale représente une cible thérapeutique importante et un rationnel fondamental pour discuter nos stratégies thérapeutiques de prise en charge des métastases hépatiques synchrones. ▼

Conflits d'intérêts: aucun.

Références

1. Joyce JA, Pollard JW. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer* 2009; 9: 239-52.
2. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 401-10.
3. Warren RS, Yuan H, Matli MR, Gillett NA, Ferrara N. Regulation by vascular endothelial growth factor of human colon cancer tumorigenesis in a mouse model of experimental liver metastasis. *J Clin Invest* 1995; 95: 1789-97.
4. Ishigami SI, Arai S, Furutani M, et al. Predictive value of vascular endothelial growth factor (VEGF) in metastasis and prognosis of human colorectal cancer. *Br J Cancer* 1998; 78: 1379-84.
5. Carmeliet P. VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology* 2005; 69 (Suppl. 3): 4-10.
6. Ferrara N. VEGF as a therapeutic target in cancer. *Oncology* 2005; 69 (Suppl. 3): 11-6.
7. Takahashi Y, Kitadai Y, Bucana CD, Cleary KR, Ellis LM. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer. *Cancer Res* 1995; 55: 3964-8.
8. Takahashi Y, Tucker SL, Kitadai Y, et al. Vessel counts and expression of vascular endothelial growth factor as prognostic factors in node-negative colon cancer. *Arch Surg* 1997; 132: 541-6.
9. Tokunaga T, Oshika Y, Abe Y, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA isoform expression pattern is correlated with liver metastasis and poor prognosis in colon cancer. *Br J Cancer* 1998; 77: 998-1002.
10. Zhang T, Otevrel T, Gao Z, Ehrlich SM, Fields JZ, Boman BM. Evidence that APC regulates survivin expression: a possible mechanism contributing to the stem cell origin of colon cancer. *Cancer Res* 2001; 61: 8664-7.
11. Seno H, Oshima M, Ishikawa TO, et al. Cyclooxygenase 2- and prostaglandin E(2) receptor EP(2)-dependent angiogenesis in Apc(Delta716) mouse intestinal polyps. *Cancer Res* 2002; 62: 506-11.
12. Okada F, Rak JW, Croix BS, et al. Impact of oncogenes in tumor angiogenesis: mutant K-ras up-regulation of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is necessary, but not sufficient for tumorigenicity of human colorectal carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 3609-14.
13. Choi HJ, Hyun MS, Jung CJ, Kim SS, Hong SH. Tumor angiogenesis as a prognostic predictor in colorectal carcinoma with special reference to mode of metastasis and recurrence. *Oncology* 1998; 55: 575-81.
14. Frank RE, Saclarides TJ, Leurgans S, Speziale NJ, Drab EA, Rubin DB. Tumor angiogenesis as a predictor of recurrence and survival in patients with node-negative colon cancer. *Ann Surg* 1995; 222: 695-9.
15. Tomisaki S, Ohno S, Ichiyoshi Y, Kuwano H, Maehara Y, Sugimachi K. Microvessel quantification and its possible relation with liver metastasis in colorectal cancer. *Cancer* 1996; 77 (8 Suppl.): 1722-8.
16. Fuchs CS, Marshall J, Barrueco J. Randomized, controlled trial of irinotecan plus infusional, bolus, or oral fluoropyrimidines in first-line treatment of metastatic colorectal cancer: updated results from the BICC-C study. *J Clin Oncol* 2008; 26: 689-90.
17. Hurwitz HJ, Fehrenbacher L, Hainsworth JD, et al. Bevacizumab in combination with fluorouracil and leucovorin: an active regimen for first-line metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23: 3502-8.
18. Kabbinnavar FF, Schulz J, McCleod M, et al. Addition of bevacizumab to bolus fluorouracil and leucovorin in first-line metastatic colorectal cancer: results of a randomized phase II trial. *J Clin Oncol* 2005; 23: 3697-705.
19. Saltz LB, Clarke S, Diaz-Rubio E, et al. Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: a randomized phase III study. *J Clin Oncol* 2008; 26: 2013-9.
20. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 1999; 85: 221-8.
21. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997; 275: 964-7.
22. Takahashi T, Kalka C, Masuda H, et al. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med* 1999; 5: 434-8.
23. Lyden D, Hattori K, Dias S, et al. Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med* 2001; 7: 1194-201.
24. Rafii S, Lyden D, Benezra R, Hattori K, Heissig B. Vascular and haematopoietic stem cells: novel targets for anti-angiogenesis therapy? *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 826-35.
25. Hilbe W, Dimhofer S, Oberwasserlechner F, et al. CD133 positive endothelial progenitor cells contribute to the tumour vasculature in non-small cell lung cancer. *J Clin Pathol* 2004; 57: 965-9.
26. Lin Y, Weisdorf DJ, Solovey A, Heibel RP. Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J Clin Invest* 2000; 105: 71-7.
27. Goon PK, Lip GY, Boos CJ, Stonelake PS, Blann AD. Circulating endothelial cells, endothelial progenitor cells, and endothelial microparticles in cancer. *Neoplasia* 2006; 8: 79-88.
28. Naik RP, Jin D, Chuang E, et al. Circulating endothelial progenitor cells correlate to stage in patients with invasive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2008; 107: 133-8.
29. Richter-Ehrenstein C, Rentzsch J, Runkel S, Schneider A, Schonfelder G. Endothelial progenitor cells in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2007; 106: 343-9.
30. Matsusaka S, Suenaga M, Mishima Y, et al. Circulating endothelial cells predict for response to bevacizumab-based chemotherapy in metastatic colorectal cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2011; 68: 763-8.
31. Malka D, Boige V, Jacques N, et al. Clinical value of circulating endothelial cell levels in metastatic colorectal cancer patients treated with first-line chemotherapy and bevacizumab. *Ann Oncol* 2012; 23: 919-27.
32. Massard C, Borget I, Le Deley MC, et al. Prognostic value of circulating VEGFR2+ bone marrow-derived progenitor cells in patients with advanced cancer. *Eur J Cancer* 2012; 48: 1354-62.
33. Farace F, Bidart JM. Circulating endothelial cells: biomarkers for monitoring activity of antiangiogenic therapy. *Bull Cancer* 2007; 94 Spec N°: S254-259.
34. Bertolini F, Shaked Y, Mancuso P, Kerbel RS. The multifaceted circulating endothelial cell in cancer: towards marker and target identification. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 835-45.
35. Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, et al. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature* 2005; 438: 820-7.
36. Kaplan RN, Rafii S, Lyden D. Preparing the "soil": the premetastatic niche. *Cancer Res* 2006; 66: 11089-93.
37. Hiratsuka S, Nakamura K, Iwai S, et al. MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis. *Cancer Cell* 2002; 2: 289-300.
38. Hiratsuka S, Watanabe A, Sakurai Y, et al. The S100A8-serum amyloid A3-TLR4 paracrine cascade establishes a pre-metastatic phase. *Nat Cell Biol* 2008; 10: 1349-55.
39. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144: 646-74.
40. am Esch JS, Schmelzle M, Furst G, et al. Infusion of CD133+ bone marrow-derived stem cells after selective portal vein embolization enhances functional hepatic reserves after extended right hepatectomy: a retrospective single-center study. *Ann Surg* 2012; 255: 79-85.
41. Drixler TA, Vogten MJ, Ritchie ED, et al. Liver regeneration is an angiogenesis-associated phenomenon. *Ann Surg* 2002; 236: 703-11 (discussion 711-702).
42. Eveno C, Le Henaff C, Audollent R, et al. Tumor and non-tumor liver angiogenesis is traced and evaluated by hepatic arterial ultrasound in murine models. *Ultrasound Med Biol* 2012; 38: 1195-204.
43. Hanan N, Nikfarjam M, Muralidharan V, Christophi C. Liver regeneration stimulates tumor metastases. *J Surg Res* 2007; 138: 284-90.
44. Heinrich S, Jochum W, Graf R, Clavien PA. Portal vein ligation and partial hepatectomy differentially influence growth of intrahepatic metastasis and liver regeneration in mice. *J Hepatol* 2006; 45: 35-42.
45. Panis Y, Ribeiro J, Chretien Y, Nordlinger B. Dormant liver metastases: an experimental study. *Br J Surg* 1992; 79: 221-3.

C. Lim, *et al.*

46. Rashidi B, An Z, Sun FX, *et al.* Minimal liver resection strongly stimulates the growth of human colon cancer in the liver of nude mice. *Clin Exp Metastasis* 1999; 17: 497-500.
47. Bretagnol F, Maggiori L, Zappa M, Sibert A, Vilgrain V, Panis Y. Selective portal vein embolization and colorectal liver metastases in rat: a new experimental model for tumor growth study. *J Surg Res* 2011; 171: 669-74.
48. Maggiori L, Bretagnol F, Sibert A, Paradis V, Vilgrain V, Panis Y. Selective portal vein ligation and embolization induce different tumoral responses in the rat liver. *Surgery* 2011; 149: 496-503.
49. de Haas RJ, Wicherts DA, Andreani P, *et al.* Impact of expanding criteria for resectability of colorectal metastases on short- and long-term outcomes after hepatic resection. *Ann Surg* 2011; 253: 1069-79.
50. Adam R, Aloia TA. Is hepatic resection justified after chemotherapy in patients with colorectal liver metastases and lymph node involvement? *J Clin Oncol* 2009; 27: 1343-5 (author reply 1345).
51. Aussilhou B, Dokmak S, Faivre S, Paradis V, Vilgrain V, Belghiti J. Preoperative liver hypertrophy induced by portal flow occlusion before major hepatic resection for colorectal metastases can be impaired by bevacizumab. *Ann Surg Oncol* 2009; 16: 1553-9.
52. Zorzi D, Chun YS, Madoff DC, Abdalla EK, Vauthey JN. Chemotherapy with bevacizumab does not affect liver regeneration after portal vein embolization in the treatment of colorectal liver metastases. *Ann Surg Oncol* 2008; 15: 2765-72.
53. Brouquet A, Mortenson MM, Vauthey JN, *et al.* Surgical strategies for synchronous colorectal liver metastases in 156 consecutive patients: classic, combined or reverse strategy? *J Am Coll Surg* 2010; 210: 934-41.
54. Capussotti L, Ferrero A, Vigano L, Ribero D, Lo Tesoriere R, Polastri R. Major liver resections synchronous with colorectal surgery. *Ann Surg Oncol* 2007; 14: 195-201.
55. Martin 2nd RC, Augenstein V, Reuter NP, Scoggins CR, McMaster KM. Simultaneous versus staged resection for synchronous colorectal cancer liver metastases. *J Am Coll Surg* 2009; 208: 842-50 (discussion 850-842).
56. Mentha G, Majno PE, Andres A, Rubbia-Brandt L, Morel P, Roth AD. Neoadjuvant chemotherapy and resection of advanced synchronous liver metastases before treatment of the colorectal primary. *Br J Surg* 2006; 93: 872-8.
57. Zalinski S, Mariette C, Farges O, SFCID-ACHBT evaluation committee. Management of patients with synchronous liver metastases of colorectal cancer. Clinical practice guidelines. *J Visc Surg* 2011; 148: e171-82.

ANNEXE 2

Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology. 2013 10:452-462.

Tumour progression and liver regeneration - insights from animal models.

Lim C, Cauchy F, Azoulay D, Farges O, Ronot M, Pocard M.

REVIEWS

Tumour progression and liver regeneration —insights from animal models

Chetana Lim, Francois Cauchy, Daniel Azoulay, Olivier Farges, Maxime Ronot and Marc Pocard

Abstract | Surgery remains the only curative treatment for colorectal liver metastases. For patients with multiple bilobar spread, extended hepatectomy might be required to achieve complete margin-free resection. In such cases, portal vein occlusion has been developed to induce preoperative hypertrophy of the future remnant liver and increase the resectability rate. Evidence now suggests that liver regeneration after hepatectomy and portal vein occlusion has a protumorigenic role, either through an upregulation of growth factors and cytokines or by haemodynamic changes in the blood supply to the liver. Experimental studies have reported a stimulatory effect of liver regeneration on the tumoral volume of liver metastases and on the metastatic potential of cells engrafted in the liver; this effect seems to depend on the timing of hepatectomy and portal vein occlusion. However, the variability of animal tumour models that are used for research in experimental colorectal liver metastases might account for some of the inconsistent and conflicting results. This Review presents clinical and experimental data pertaining to whether liver regeneration causes proliferation of tumour cells. We also analyse the different animal models of colorectal liver metastases in use and discuss current controversies in the field.

Lim, C. et al. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 10, 452–462 (2013); published online 9 April 2013; doi:10.1038/nrgastro.2013.55

Introduction

Liver resection remains the only potentially curative treatment for colorectal liver metastases. The majority (~80%) of patients with colorectal liver metastasis display multinodular and bilobar tumoral involvement at the time of diagnosis, and are therefore deemed initially unresectable.¹ For these patients, portal vein occlusion is used to promote preoperative hypertrophy of the future remnant liver and so increase the resectability rate. However, portal vein occlusion itself has been suggested to have a deleterious effect on tumour growth. Indeed, clinical data now suggest that liver regeneration after portal vein occlusion and liver resection could contribute to tumour growth, which, in turn, could contraindicate surgery. These data also offer a potential explanation for the intrahepatic recurrence of liver metastasis.

A wide range of experimental protocols using animal models have been developed to investigate the interactions between tumour growth and liver regeneration. Liver regeneration is predicted to contribute to tumour progression in three ways. First, upregulation of growth factors and cytokines might be responsible for both hepatocyte and tumour cell proliferation.² Second, an interruption of portal blood flow is associated with a redistribution in hepatic arterial flow,³ which is the main route of vascularization of macroscopic liver metastases, especially when these metastases are small (~2–5 mm).^{4–8} Third, angiogenesis induced by liver regeneration^{9,10} could trigger metastatic growth of dormant micrometastases.^{3,11–13}

This Review reports the results obtained from animal models used to investigate the effects of liver regeneration on tumour progression, analyses how the regenerative process might promote tumour growth and discusses controversies in the field. The criteria for establishing an ideal animal model for the study of colorectal liver metastases are also presented.

Tumour progression and liver regeneration Rationale

The liver has a unique ability to regenerate almost to its optimal volume after liver resection. In this setting, the increased metabolic demands required for the liver remnant contribute to early signalling events that are associated with the onset of liver regeneration. Several prometabolic factors, such as cytokines and growth factors, are activated and induce hepatocyte DNA synthesis and mitosis.¹⁴ These specific regenerative factors might also promote the proliferation of residual cancer cells in the remnant liver.^{2,15}

When the future liver remnant is expected to be insufficient after an extended hepatectomy (defined as <30% of functional liver volume with adequate inflow and outflow), preoperative portal vein occlusion of the future resected liver is usually undertaken¹⁶ to prevent post-hepatectomy liver failure. Portal vein occlusion interrupts the portal flow in the future resected territory leading to its atrophy, and triggering subsequent hypertrophy of the future liver remnant.¹⁷ Portal vein occlusion can be achieved using either portal vein ligation or portal vein embolization. Here again, there is increasing concern that portal vein occlusion might

Unité INSERM U955 (Université Paris 7), Angiogenèse et Recherche Translationnelle, Hôpital Lariboisière, 2 Rue Ambroise Paré, 75010 Paris, France (C. Lim, M. Pocard). Service de Chirurgie Digestive et Hépatobiliaire et Transplantation Hépatique, Hôpital Henri Mondor, 51 Avenue du Maréchal de Lattre de Tassigny, 94010 Créteil, France (D. Azoulay). Service de Chirurgie Hépatobiliaire-Pancréatique et Transplantation Hépatique (F. Cauchy, O. Farges), Service de Radiologie (M. Ronot), Hôpital Beaujon, 100 Boulevard du Général Leclerc, 92110 Clichy, France.

Correspondence to: M. Pocard
marc.pocard@inserm.fr

Competing interests
The authors declare no competing interests.

not only stimulate the proliferation of hepatocytes, but also promote tumour growth.¹⁸ Therefore, in theory, liver regeneration after partial hepatectomy or portal vein occlusion could enhance the growth patterns of micrometastases or stimulate the outgrowth of liver metastases.

Mechanisms

Growth factors and cytokines

The expression of a large number of growth factors and cytokines are upregulated within minutes after a partial hepatectomy^{19–22} or portal vein occlusion,^{23–25} promoting the restoration of normal liver mass or hypertrophy of the nonoccluded liver, respectively, during liver regeneration. These molecules include hepatocyte growth factor (HGF), pro-epidermal growth factor (EGF), vascular endothelial growth factor A (VEGF-A), TNF, IL-6, tumour growth factor β 1 (TGF- β 1) and matrix metalloproteinases (MMPs). These molecules are produced by the different cell types in the liver (namely, kupffer cells, hepatic stellate cells and biliary epithelial cells) and prepare hepatocytes for proliferation.²⁶ Hepatic stellate cells, biliary epithelial cells, kupffer cells and endothelial cells subsequently proliferate. These molecules are also expressed in the majority of human colorectal carcinomas^{27,28} and are reported to have a role in stimulating the growth of colorectal carcinoma cells *in vitro*,^{29,30} promoting cell survival.³¹

Haemodynamic changes

Haemodynamic changes are associated with partial hepatectomy and portal vein occlusion and have a major role in the regenerative response. The liver receives its dual blood supply from the hepatic artery (20%) and the portal vein (80%). Haemodynamic changes after portal vein occlusion are slightly different to those after partial hepatectomy owing to the presence of the occluded liver. However, the process of hepatic regeneration is very similar after both portal vein occlusion and liver resection (Figure 1).

Following partial hepatectomy, it remains unclear whether the modification of portal blood flow after liver resection correlates to the initiation of liver regeneration. However, the portal blood supply is increased in the remnant liver, and hepatic arterial blood inflow is preserved.³² After liver resection, the increased portal blood supply suggests that two different and complementary mechanisms lead to the induction of tumour growth. First, the portal blood flow contains cytokines and growth factors whose marked increase in levels might be responsible for both hepatocyte and tumour cell proliferation, as described earlier.^{33,34} Second, as 'very small' micrometastasis or cancer cell clusters trapped in tiny portal branches are mainly fed by portal blood,³⁴ the increased portal blood supply potentially stimulates micrometastasis growth in the remnant liver lobes.

After portal vein occlusion, the liver can be considered as the association of two different parts: the occluded liver in which the dramatic decrease of the portal blood flow triggers a compensatory increased

Key points

- Clinical data suggest that liver regeneration after partial hepatectomy and portal vein occlusion stimulates the growth of colorectal liver metastases, both in terms of metastatic recurrence and enhanced tumour growth
- Relevant animal models are necessary to provide information on the pathophysiological mechanisms linking liver regeneration with tumour growth
- An ideal animal model should be an immunocompetent rodent with established multiple bilobar liver metastases at the time of hepatectomy or portal vein occlusion, which represents the clinical situation faced by surgeons
- Rodent models have provided reliable evidence that upregulation of circulating growth factors and cytokines, increased arterial blood supply to the liver and angiogenesis have a role in promoting the growth of liver metastases
- The mechanism linking liver regeneration after portal vein occlusion with tumour growth is complex, and might vary according to the occlusion technique used

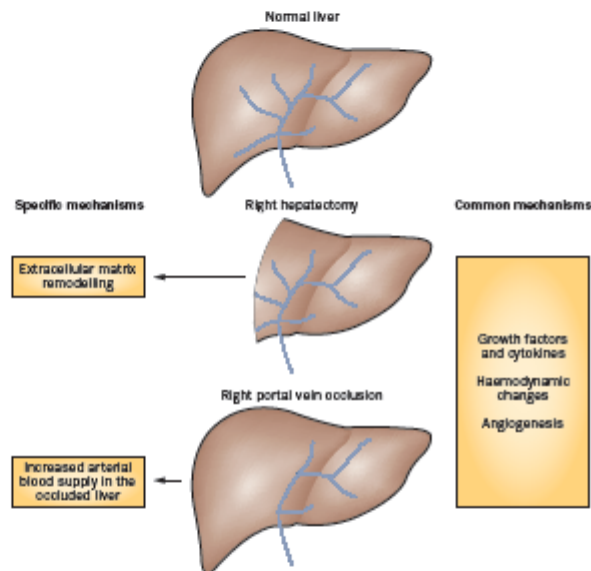


Figure 1 | Common and specific mechanisms of liver regeneration affecting tumour progression. Three common mechanisms affecting tumour progression after portal vein occlusion and liver resection have been proposed—upregulation of growth factors and cytokines, alteration in hepatic blood supply and liver-regeneration-induced angiogenesis stimulating metastatic growth of dormant micrometastases. Two specific mechanisms affecting tumour progression include extracellular matrix remodelling after partial hepatectomy and increased arterial blood supply in the occluded liver after portal vein occlusion.

arterial perfusion (known as the hepatic arterial buffer response^{35–37}); and the nonoccluded liver, which is comparable to the remnant liver after liver resection. In the occluded liver, engraftment and tumour growth might be initially inhibited as a result of the reduced portal blood flow and delayed angiogenesis.³⁸ The restoration of blood perfusion resulting from the increased hepatic arterial supply,^{39–41} and a massive induction of growth factor expression might, on the other hand, promote tumour growth, as macroscopic liver metastases are mainly fed by the hepatic artery.³ In the nonoccluded

REVIEWS

Table 1 | Studies of colorectal liver metastases after portal vein embolization

Study	Number of patients	Tumour growth during liver regeneration	
		Embolized liver	Nonembolized liver
Elias et al. (1999) ³³	3	Progression	NA
Kokudo et al. (2001) ³²	18	Progression	New tumours
Barbero et al. (2003) ³³	6	Progression	NA
Lindner et al. (2006) ³⁴	19	Progression	NA
Pamecha et al. (2009) ³⁴	22	Progression	NA
Hoekstra et al. (2012) ³⁴	28	Progression	New tumours

Abbreviation: NA, not applicable.



Figure 2 | Bilobar colorectal liver metastases in a 72-year-old man showing a tumoral volume increase in both lobes after portal vein embolization. Contrast-enhanced CT a, b | before and c, d | 4 weeks after right portal vein embolization. The embolization material corresponds to the hyperattenuating endovascular filling (white arrowhead in panel c). The tumour volume increase is clearly depicted in the left liver lobe (arrows in panels a, c). The post-portal vein embolization CT scan also shows the occurrence of a new lesion in segment III (dashed arrow in panel d) and the presence of ascites.

liver, changes similar to those described in the remnant liver after hepatectomy are to be expected.

Extracellular matrix remodelling

The dynamic balance between fibrogenesis and fibrolysis mediated by MMPs are implicated in cancer cell migration. During liver regeneration, MMPs (such as MMP-9 and MMP-2) are upregulated during the first hours after hepatectomy and have an important role in the degradation of the extracellular matrix.⁴² These molecules have been reported to be involved in colorectal cancer progression and liver metastasis.^{14,43} The breakdown of the extracellular matrix in the liver and its resynthesis during liver regeneration could promote tumour metastasis, as tumour cells might detach and subsequently engraft at other hepatic sites.^{39,42,44,45}

Angiogenesis

After partial hepatectomy, liver regeneration is accompanied by intrahepatic angiogenesis,^{4,18} as represented by increases in arterial and portal inflow to the remnant liver and the microvascular architecture.³ Therefore, both arterial and portal vasculogenesis and angiogenesis seem to contribute equally to the development of the liver vascular networks during liver regeneration. Such events suggest that a vascular step occurs in the regenerative process. Indeed, after a first period of hepatocyte proliferation, the amount of endothelial cells and the number of hepatic vessels progressively increase from day 2 to reach a restored microvascular network within 2 weeks.³ As the arterial flow is the main route of vascularization of liver metastases,⁴⁻⁸ this latest phase of the vascular step is therefore likely to promote tumour cell proliferation.

Similarly, restriction of the portal flow in the occluded portion of the liver after portal vein occlusion might also upregulate defence mechanisms such as heat shock 70 kDa protein, heme oxygenase 1 or plasminogen activator inhibitor 1 in response to local hypoxia.^{24,25,38,46} These molecules are involved in promoting angiogenesis and stimulating the growth of colorectal carcinoma cells,⁴⁷⁻⁵¹ and their production in the surrounding liver parenchyma after portal vein occlusion might thus contribute to tumour progression.

Clinical evidence

Tumour progression

Clinical studies suggest that stimulation of tumour growth in patients with colorectal liver metastases occurs during liver regeneration.^{23,52-54} Tumour progression is predicted to occur in two ways—intrahepatic spread and tumour outgrowth.⁵⁴ In practice, intrahepatic spread increases the detectable tumour number and tumour outgrowth leads to tumour invasion of crucial major vessels. A number of hypotheses state that the enhanced tumour growth after portal vein occlusion could be explained by the process of liver regeneration combining cytokines, growth factors and an increased arterial blood supply, as described earlier. By contrast, induction of new tumours (which are therefore recurrent tumours) after portal vein occlusion and resection suggest the presence of dormant micrometastases that have been positively stimulated by liver regeneration. However, whether these new tumours are truly new tumours or occult lesions that were already present, but not detectable by conventional imaging, before portal vein embolization or liver resection remains controversial.

Tumour growth (and therefore intrahepatic recurrence) after liver resection might also be explained by the combination of several confounding factors, such as the absence or limited standardization of staging technique before surgery, positive resection margins and the aggressive oncologic features of the disease. Table 1 summarizes relevant clinical studies reporting the progression of colorectal liver metastases after portal vein embolization. In most of these studies, the volume of liver metastases in both remnant (nonembolized) and/or embolized livers increases after portal vein embolization

REVIEWS

(Figure 2).^{23,52–56} Interestingly, one series of five patients (including three cases of colorectal cancer) who underwent portal vein embolization showed that the growth of metastases was more rapid than that of the surrounding parenchyma in the nonoccluded liver.⁵³ Similar results were reported in a comparative series of 28 patients with colorectal liver metastases, which emphasized that portal vein embolization was associated with an increased rate of tumour growth, increased occurrence of new tumours in the future remnant liver and increased recurrent tumours after resection when compared with patients who did not undergo portal vein embolization.⁵⁴ However, the results of these studies should be interpreted with caution because of the numerous biases inherent to retrospective series, as well as the limited number of patients studied.

Dropout after portal vein occlusion

In clinical practice, patients with bilobar hepatic metastases can undergo a two-stage hepatectomy. The first step comprises clearance of the hepatic lesions in the future remnant liver and ligation or embolization of the contralateral portal vein; the second step consists of the resection of all residual metastases.⁵⁷ However, a dropout rate from such strategies is consistently observed and has been reported to occur in as many as 35% of the patients with colorectal liver metastases.^{38,57,58} On the one hand, approximately one-third^{57,58} of these patients do not qualify for resection because of portal vein occlusion technical failure, including insufficient hypertrophy⁵⁸ and complications related to the occlusion procedure itself. On the other hand, two-thirds of these patients dropout as a result of substantial tumour progression,⁵⁸ thereby precluding reasonable oncologic resection. Above all, it has been suggested that the high dropout rate after portal vein occlusion is associated with abysmal long-term outcome, worse than that observed in similar patients undergoing chemotherapy alone.⁵⁸

Strategies to reduce the dropout rate

Reducing the dropout rate after portal vein occlusion could be undertaken using two complementary approaches: preventing tumour progression during the regenerating period and emphasizing liver hypertrophy. Even if routine use of chemotherapy does not systematically guarantee a reduced rate of progression after portal vein occlusion,⁶⁰ several studies have established that traditional regimens containing oxaliplatin and irinotecan do not impair liver hypertrophy after portal vein occlusion⁶¹ and these regimens could therefore be safely used during the regenerative interval. By contrast, the effect of targeted therapies on liver regeneration is more controversial. Aussilhou *et al.*⁶² reported that bevacizumab could impair hypertrophy of the future remnant liver after portal vein occlusion in preparation for major hepatectomy. In contrast to these findings, Zorzi *et al.*⁶³ found that preoperative chemotherapy with bevacizumab did not affect liver regeneration after portal vein embolization, concluding that liver resection could be performed safely in patients treated

Table 2 | Comparison of the partial hepatectomy and portal vein occlusion models

Characteristics	Partial hepatectomy	Portal vein occlusion
Technique	Minor or major hepatectomy according to the number of liver lobes resected	Embolization or ligation
Reproducibility	Easy to perform	Technically demanding
Animals	Mouse and rats	More practical in rats than mice
Time of injection into portal vein or spleen	Before, during or after the procedure	Before or during the procedure
Analysis of tumour cell proliferation	Remnant portion of the liver	Both occluded and nonoccluded portion of the liver

Box 1 | Criteria for animal models for studying liver regeneration and tumour growth

- The model should mimic all aspects of the metastatic development in humans
- The ideal model should be immunocompetent animals with established liver micrometastases, multiple bilobar liver metastases at the time of hepatectomy or portal vein occlusion, which represents the clinical situation faced by surgeons
- The model should mimic the human tumour microenvironment
- An orthotopic model is superior to subcutaneous models of liver metastases, as it adequately reflects the interactions between tumour cells and microenvironment
- Orthotopic models of colorectal liver metastases are obtained by injecting tumour cells either into the spleen or the portal vein for bilobar macroscopic and micrometastases, or directly under the capsule of the liver for unilobar macrometastases
- Orthotopic injection of tumour cells in the caecal wall is less often used, as the formation of liver metastases is unpredictable
- The model should be inexpensive and easy to manipulate, and adequate in terms of ethical considerations

with bevacizumab before portal vein embolization. Other interval therapeutic strategies, such as associated radiofrequency ablation⁶⁴ or intra-arterial chemotherapy injection,⁶⁵ have shown encouraging results in preventing tumour progression during the regeneration period. However, as none of these findings have been validated in large series, their routine use in clinical practice cannot yet be recommended.

Several strategies aimed at further enhancing liver hypertrophy after portal vein occlusion have been described. The first study by Hwang *et al.*,⁶⁶ reported that, in a series of nine patients, preoperative sequential application of portal vein embolization and hepatic vein embolization could be safely performed and seemed effective in facilitating contralateral liver regeneration by inducing more severe liver damage than portal vein embolization alone. In 2012, Schnitzbauer and colleagues⁶⁷ reported that combining right portal vein ligation and *in situ* splitting provided marked and rapid hypertrophy of functional liver tissue. This strategy enables the time interval between first-step and second-step surgeries to be reduced, thus, theoretically, preventing tumour progression. However, the observed impressive hypertrophy as a consequence of additional *in situ* splitting seems to challenge that which is observed after traditional portal vein occlusion. Of note, this approach, which is now commonly known as the ALPPS (associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy) procedure,⁶⁸ could enable curative resection of

REVIEWS

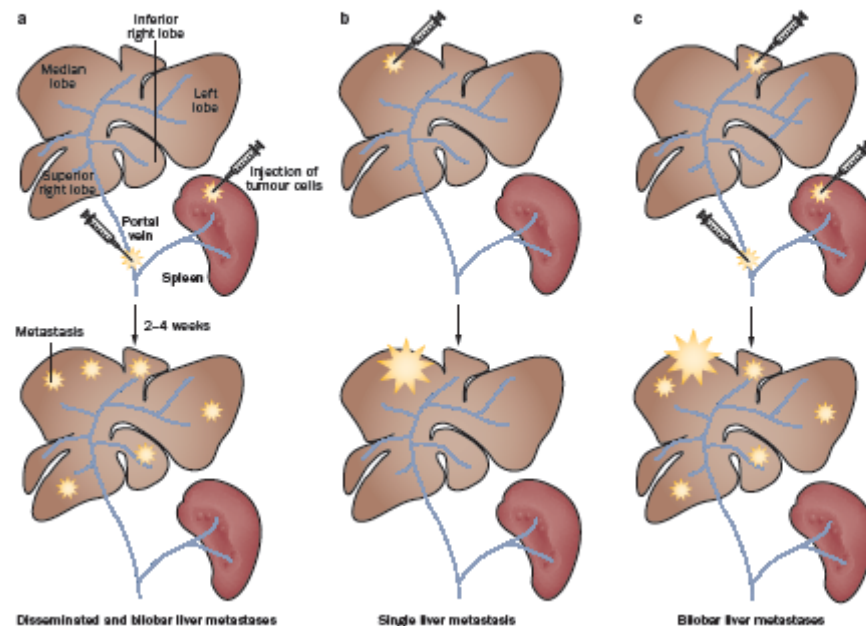


Figure 3 | Theoretical basis for a rat model of colorectal liver metastasis for studying liver-regeneration-associated tumour growth. Experimental models of colorectal liver metastasis that use orthotopic injection or implantation of tumour tissue or cells into immunocompetent rats optimally mimic human tumour pathogenesis and effectively mimic the clinical situations faced by surgeons. **a** | A model of disseminated and bilobar liver micrometastases was established by intraportal or intrasplenic injection of colon cancer cells. **b** | A model of single liver macrometastasis was established by subcapsular injection of tumour cells or implantation of tumour tissue. **c** | A model of bilobar liver metastases including one single macrometastasis was established by sequential intraportal (or intrasplenic injection) and subcapsular injections of tumour cells.⁶⁴ The left liver includes the median and the left lobes; the right liver includes the superior and inferior lobes. The median and left lobes account for 70% of the total liver volume.

marginally resectable liver tumours or metastases in patients who might otherwise have been regarded as unresectable. Nevertheless, several clinicians have raised concerns that such rapid hypertrophy could paradoxically promote tumour progression and jeopardize the oncologic outcome of these patients. Future studies will be needed to address these controversies as well as to provide confirmation of the positive preliminary results. Finally, strategies that are undertaken to further accentuate liver hypertrophy, such as sequential transarterial chemembolization and portal vein embolization for patients with hepatocellular carcinoma⁶⁹ or bile duct ligation,⁷⁰ even if appealing in theory, clearly lack validation in the specific setting of colorectal liver metastases.

To conclude, even though data have provided some support for the hypothesis that tumour progression occurs during liver regeneration and leads to patient dropout before resection, various confounding factors, such as the absence or limited standardization of staging technique before surgery, positive resection margins and the aggressive oncologic features of the disease limit the validity of the findings. As controlled clinical studies

comparing the two procedures with control patients are unlikely to occur owing to the ethical issues of giving a sham operation to patients, additional animal studies are urgently needed.

Experimental models of liver regeneration

Modelling liver regeneration

The best-characterized and most studied experimental model of liver regeneration has been a two-thirds partial hepatectomy in rodents (Table 2). The attractiveness of this model is based on three main attributes. First, the model is convenient to use, is accessible and has a relatively low cost when compared with other animals. Second, it enables efficient and rapid liver regeneration as a consequence of the proliferation of normally quiescent hepatocytes; indeed, original liver mass restoration occurs within ~7 days.¹⁴ Third, the model has high levels of reproducibility and relevancy, considering the absence of injury to the remnant liver tissue, which minimizes potential confounders bias in the interpretation of whether the induced signals are specific to the regenerative response itself.⁷¹

REVIEWS

In practice, most studies have been performed in rats because they are larger than mice and hepatectomy is technically easier. In a rat model of liver regeneration after partial hepatectomy, two of the four liver lobes are removed, which represents ~two-thirds of liver weight.⁷² To achieve the same result in mice, resection of four of the seven liver lobes is required.⁷³ Traditionally, partial hepatectomy is classified as major or minor resection. In rats, major hepatectomy consists of the resection of the left lateral and median liver lobes (representing 70% of the liver volume),^{74,75} whereas minor hepatectomy is the resection of one lobe (accounting for 37% of the liver volume).

Experimental models of liver regeneration induced by portal vein occlusion have also been extensively used to investigate regenerative mechanisms; these models have proven to be comparable with those used to model partial hepatectomy.⁷⁶ Here again, rodents have also been shown to both practically and reliably assess the effects of portal vein ligation and embolization on hypertrophy of the future remnant liver.^{76–79} Although the anatomy of the human and the rodent liver are somehow different (that is, four lobes in rats, seven lobes in mice and eight segments in humans), it is technically possible to create an experimental model that is clinically relevant. The human right liver accounts for 60% of the total liver volume, which is approximately the same proportion as the left liver in rodents.⁸⁰ Animal models have therefore been based on the occlusion of the left liver, which leads to the exclusion of the same hepatic territories as those which are resected during partial hepatectomy.⁷⁶

Rabbits⁸¹ and minipigs⁸² have also been used to investigate hypertrophy and liver regeneration induced by portal vein occlusion. Yet, these models did not meet all the required criteria for an animal model of liver metastases (that is reproducibility, practical and ethical considerations, and cost-effectiveness).

The ideal model of colorectal liver metastases

An ideal animal tumour model should be an immunocompetent rodent with established multiple bilobar liver metastases at the time of hepatectomy or portal vein occlusion, which represents the clinical situation faced by surgeons (Box 1). An orthotopic model is superior to a subcutaneous xenograft model because the former reproduces, as closely as possible, the key biological behaviours of human colorectal cancers including haematogenous dissemination of colorectal cancer cells through the portal vein and all aspects of the metastatic development (from micrometastases to macrometastases). However, establishing high-quality orthotopic models is technically more demanding. Models of liver metastases using either immunodeficient or immunocompetent rodents are usually obtained by injecting tumour cells either into the spleen, the portal vein for bilobar macroscopic and micrometastases or directly under the capsule of the liver for unilobar macrometastases (Figures 3,4). These procedures are efficient and practical because they consistently produce liver tumours within ~1 month. By contrast, the formation of liver metastases after the injection of tumour

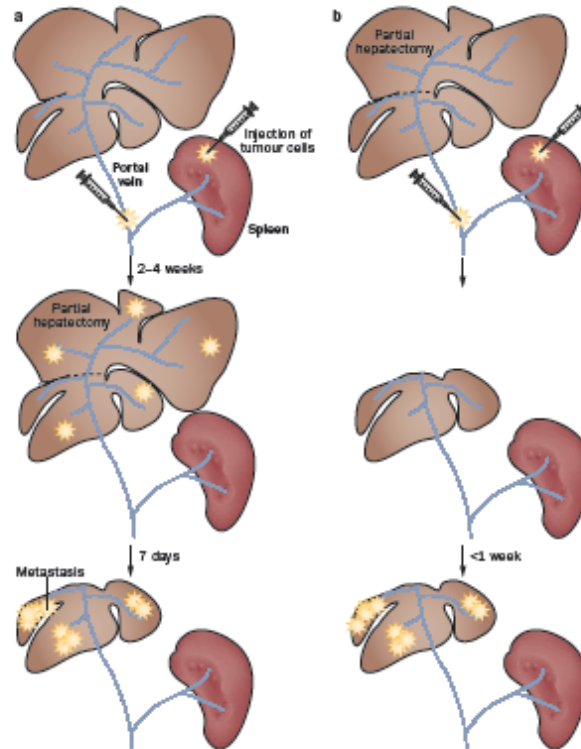


Figure 4 | Theoretical description of a stepwise model for studying the influence of partial hepatectomy on colorectal liver metastases growth. **a |** To study the influence of liver regeneration on tumour volume of already present colorectal liver metastases, a model of bilobar micrometastases was established by intraportal or intrasplenic injection of tumour cells into immunocompetent rats. Macroscopic disseminated nodules were obtained for 2–4 weeks. Partial hepatectomy of 70% of the total liver volume (resection of the median and left lobes) was performed. Approximately 7 days later, the mice showed evidence of the right liver lobes regeneration and a greater tumour volume than sham-hepatectomized mice. **b |** To study the influence of liver regeneration on the metastatic potential of tumour cells engrafted in the liver, a model of 70% partial hepatectomy were performed before or at the same time as intrasplenic or intraportal injection of tumour cells. Several days later, the mice showed evidence of the right liver lobes volume increase and more liver metastatic nodules than sham-hepatectomized mice.

cells in the caecal wall is unpredictable,⁸³ and is therefore used less frequently. The tumoral model described by Maggiari *et al.*^{73,84} mimics, as closely as possible, the clinical situation of a patient with bilobar multiple liver metastases, including a right liver metastasis and a left liver with both macrometastases and micrometastases. In this model, a single macroscopic liver metastasis was obtained by direct injection of tumour cells under the liver capsule, and multiple bilateral liver metastases were induced by intraportal injection of tumour cells.

In summary, these two models of partial hepatectomy and portal vein occlusion are relevant to assess tumour

REVIEWS

Table 3 | Rodent models of partial hepatectomy assessing the outgrowth of colorectal liver metastases

Rodent	Inoculation site (colon cancer cell line)	Type of hepatectomy	Delay between hepatectomy and tumour cell injection	Criteria to assess tumour growth	Comments	Study
BDX rats	Intraportal (DOK 12)	70% PH	8 weeks after injection*	Number of rats with macroscopic liver metastases 12 weeks after injection	Undetectable liver micrometastases might have been present at 8 weeks after injection and might have been stimulated by liver regeneration ¹	Paris et al. (1992) ¹³
CBA mice	Intrasplenic (MoCR)	70% and 30% PH	Same time or 6 days before injection	Tumour volume at 21 days	Increase in tumour growth occurred after 70% PH, when the liver metastases were induced 6 days after ¹	Harun et al. (2007) ¹⁴
WAG rats	Intraportal (CC531)	70% and 30% PH	Same time	Number of liver metastases and liver weight 4 weeks after injection	The number of metastatic nodules was increased after 30% and 70% PH ¹ Liver weight increased after 70% PH	Slooter et al. (1995) ¹⁵
WAG rats	Subcapsular right lobe (CC531)	70% PH	Same time	Liver and tumour weights 3 weeks after injection	Enhanced tumour growth in the remnant liver after PH ¹	De Jong et al. (1995) ¹⁶
Nude mice	Intrahepatic* middle lobe (Co-3 and AC3603)	30% PH	Same time	Tumour volume at 30 days	30% PH stimulated tumour growth in the liver ¹	Rashidi et al. (1999) ¹⁷
BALB/c mice	Intrasplenic (CT-26)	70% PH	7 days after injection	Morphometric analysis ratio of tumour:normal liver on HE slides of specimen at 14 days	Although not statistically significant, tumour growth after PH decreased ¹ TGF- β 1 (secreted by tumour cells) might have an anti-mitogenic effect on hepatocytes	Heinrich et al. (2006) ¹⁸

* Hepatectomy was performed in rats with undetectable macroscopic liver metastases. ¹ Tumour tissues were transplanted into the liver. ² Compared with tumour growth in sham-operated animals. Abbreviations: HE, haematoxylin and eosin; PH, partial hepatectomy; TGF- β 1, tumour growth factor β 1.

growth during liver regeneration. In such a setting, immunocompetent rodents reflect the normal immune status of patients with colorectal liver metastases and enable the study of the natural history and treatments of liver metastases. Subcapsular as well as intrasplenic or intraportal injection are reliable models and provide the most accurate *in vivo* experimental model of the development of liver metastases.

Surgery and tumour progression

Partial hepatectomy

Outgrowth of liver metastases

Multiple experimental studies have reported the effect of partial hepatectomy on the growth of already established liver metastases or the occurrence of new liver lesions in rodent models (summarized in Table 3).^{13,14,15,16-17} Most of these results reflect the effect of liver regeneration on metastatic potential and tumour implantation rather than on the growth of micrometastases, as partial hepatectomy was performed either immediately after or before tumour implantation.

The degree of partial hepatectomy has been described as an important factor for tumour growth. Experimental evidence suggests that the degree of hepatectomy is correlated with the incidence and intensity of tumour growth.^{14,16} Indeed, these rodents had a markedly higher percentage of proliferating tumour cells after resection than the control rodents (animals undergoing sham operation). This finding could probably be explained by the fact that a larger hepatectomy (that is, two-thirds rather than one-third) potentially leads to the production of increased levels of growth factors and cytokines

to restore the liver to its functional size.^{18,19} Additionally, one study reported that induction of tumour growth occurred predominantly during the late phase of liver regeneration.²⁰ In this study, the percentage of liver metastases was considerably higher in the resected mice group than in the sham-hepatectomy control group, when liver metastases were induced 6 days after partial hepatectomy (major or minor). By contrast, no statistically significant difference was observed between these groups when liver metastases were induced immediately after liver resection. Possible explanations for these findings include: the expression of liver regeneration factors such as MMPs (mentioned earlier), which have been reported to be upregulated in human colorectal liver metastases,^{4b} and the fact that these factors are released late during the process of liver regeneration.¹⁴

Induction of new lesions

In contrast to the outgrowth of already established liver metastases, a positive stimulation of liver regeneration after hepatectomy on the growth of undetectable microscopic 'dormant' liver metastases was reported in only one study.¹² In this study, a model of bilobar multiple colorectal liver metastases was first induced by injection of tumour cells into the portal vein of rats. Rats with no macroscopic liver metastases were divided into three groups 8 weeks later: control group ($n=15$), surgery group (animals undergoing 70% partial hepatectomy; $n=13$) and ciclosporin group (10 mg/kg per day; $n=15$). Tumour growth was assessed at 12 weeks (4 weeks after hepatectomy) after the injection of tumour cells. The researchers showed that 62% of rats in the surgery group

REVIEWS

Table 4 | Rodent models of portal vein occlusion assessing the outgrowth of colorectal liver metastases

Rodent	Inoculation site (colon cancer cell line)	Type of portal vein occlusion (% of initial liver volume)	Delay between occlusion and cell injection	Criteria to assess tumour growth	Tumour growth		Study
					Occluded liver	Nonoccluded liver	
BALB/c mice	Subcapsular left liver lobes (CT-26)	Ligation of portal vein to medial and left lateral lobes (70%)	Same time	Analysis of tumour volume on HE slides of specimen	Tumour growth was reduced during the first 7 days, but increased by day 21 ^a . This finding was explained by the recovery of blood flow by the hepatic arterial response and increased angiogenic growth factor expression	NA	Kolmar <i>et al.</i> (2009) ⁷⁶
BDIX rats	Intrahepatic left medial liver lobe (DHDK 12)	Embolization of left medial and lateral lobes (70%)	7 days after injection	Analysis of tumour volume on HE slides of specimen	Tumour growth was decreased in the embolized lobes ^a	NA	Bretagnol <i>et al.</i> (2011) ⁷⁷
BDIX rats	Intrahepatic at day 0 intraportal at day 7* (DHDK 12)	Ligation and embolization of portal vein to medial and lateral lobes (70%)	8 days after intrahepatic injection	Analysis of tumour volume on HE slides of specimen	Tumour growth was accelerated in occluded lobes after ligation ^a	Tumour growth was accelerated in nonoccluded lobes after ligation and embolization	Maggioli <i>et al.</i> (2011) ⁷⁸
BALB/c mice	Intraportal (CT-26)	Ligation of portal vein to median and left lateral lobes (70%)	7 days after injection	Analysis of tumour volume on HE slides of specimen	Tumour growth was markedly accelerated in ligated lobes ^a	NA	Sakai <i>et al.</i> (2010) ⁷⁹
BALB/c mice	Intrasplenic (CT-26)	Ligation of portal vein to median and left lateral lobes (70%)	7 days after injection	Analysis of ratio of tumour:normal liver on HE slides of specimen	Tumour growth was substantially increased after ligation ^a . No data available regarding the tumour growth in the occluded and nonoccluded liver lobes		Heinrich <i>et al.</i> (2006) ⁸⁰

*Model of bilobar metastases with a single macrometastasis. ^aCompared with the control group (sham-operated). Abbreviations: HE, haematoxylin and eosin; NA, not available.

and 80% of rats in the ciclosporin group had macroscopic liver metastases compared with 20% of rats in the control group. Thus, the authors suggested that early recurrences within the remnant liver after major hepatectomy could be explained by the presence of dormant micro-metastases that are stimulated by liver regeneration and ciclosporin-induced immunosuppression.

Portal vein occlusion

In the clinical setting, the question still remains as to whether a two-stage approach to remove tumours in the nonembolized liver lobe during surgery is justified. Indeed, tumour progression after portal vein occlusion could occur either by induction of new metastases in the nonoccluded liver (the future remnant liver) or an increase of tumour volume in the occluded liver.

Outgrowth of liver metastases

The influence of liver regeneration on the tumoral response in the occluded liver seems to vary according to the occlusion technique. Embolization leads to a reduction of tumour growth volume,⁷⁷ whereas ligation leads to an increased tumour volume.^{74,78} These contrasting results might account for the different haemodynamic portal flow changes, as described earlier. Indeed, ligation could induce the formation of early porto-portal collateral vessels; this phenomenon is less likely to occur after embolization than after ligation.⁸⁰ An increase in blood supply through these collateral vessels might enhance tumour growth. In the case of portal branch ligation, an initial inhibition of

the implantation and growth of tumours during days 6–18 after injection was suggested to occur, which was then followed by a delayed acceleration of tumour growth.⁷⁸ This hypothesis is probably a consequence of both early inhibition of tumour growth related to the restriction of portal blood flow and late acceleration of growth after the compensatory redistribution of arterial blood perfusion to maintain the total liver bloodflow. This latter result has been corroborated by the study of Heinrich *et al.*⁸¹ in which the growth of liver metastases was substantially increased after portal vein ligation when compared with sham-operated mice. In addition, this study suggested that the growth factors and cytokines expressed during liver regeneration are predominantly acting locally as neither portal vein ligation nor hepatectomy increased tumour growth of lung metastases.⁸¹

Induction of new lesions

Multiple experimental studies have reported the influence of portal vein occlusion on tumour growth (summarized in Table 4).^{76,77–79,81} All of these animal models were induced with tumour cells before or during portal vein occlusion. Both of the techniques (that is, portal vein ligation or portal vein embolization) markedly increase tumour growth volume in the nonoccluded liver.⁷⁸

In conclusion, several rodent models of partial hepatectomy and portal vein occlusion have been tested to assess how new liver metastases implantation or growth of established liver metastases are influenced by liver regeneration. The extent of partial hepatectomy seems to be an associated factor involved in tumour growth.

REVIEWS

The delayed acceleration of tumour growth in the occluded liver after portal vein occlusion could have potentially negative consequences in practice, including the risk of contraindication of liver resection and the risk of a bad oncologic prognosis caused by tumour spreading. However, whether liver regeneration is associated with progression or regression of tumour cells in these experiments remains controversial. The heterogeneity in the design of animal models as well as the different timing of hepatectomy or occlusion of the portal vein before or after administration of different tumour cell lines could affect the results obtained in these studies.

Emerging concepts

New approaches have been developed to enhance liver regeneration in response to different types of liver injury caused by drugs, toxins, resection or acute viral diseases.⁹² Progenitor cell therapies using transplantation of bone-marrow-derived cells, such as hematopoietic stem cells, mesenchymal stem cells or endothelial progenitor cells, have shown promising results in animal models. Although the clinical use of these bone-marrow-derived stem cells for repair or regeneration within the liver is still scarce, one prospective clinical paper from 2012 suggested that these cells could enhance liver regeneration after portal vein occlusion.⁹³ Nonetheless, studies have also reported the potential risks of tumour growth when using these bone-marrow-derived stem cells.^{94,95} The future of developing stem-cell therapies, or indeed targeting stem cells themselves in liver metastasis is likely to require a more thorough understanding of the relationship between liver regeneration and tumour growth.

Conclusions

Compelling evidence indicates that liver regeneration after portal vein occlusion and liver resection promotes tumour progression in patients with colorectal liver metastases. Thus, the clinical concern remains as to whether a two-stage approach for patients with multiple bilateral colorectal liver metastases is justified. Animal models of partial hepatectomy and portal vein occlusion have contributed to our improved understanding of the influence of liver regeneration on tumour progression. From the rodent models described in this Review several features are clear. Animal models that mimic the clinical situation faced by surgeons are required to provide information of pathophysiological mechanisms underlying the association between liver regeneration and tumour growth. Moreover, although the exact mechanisms are still unclear, liver regeneration might not only stimulate tumour outgrowth, but also induce the activation of dormant micrometastases. These features suggest that the indications for portal vein occlusion should remain strict, and reserved only for patients with objective, initially nonresectable liver metastases.

Review criteria

For this Review, we used our collections of published articles related to liver regeneration and tumour progression. An additional search for relevant articles was performed in PubMed. The keywords used were "liver regeneration", "colorectal", "liver metastases", "tumour growth", "tumour progression", "portal vein embolization", "portal vein ligation", "hepatectomy", and "liver resection", alone and in combination. All articles identified were English-language, full-text papers. We also searched the reference lists of identified studies for further relevant papers.

- Adam, R. Chemotherapy and surgery: new perspectives on the treatment of unresectable liver metastases. *Ann. Oncol.* 14 (Suppl. 2), ii13–ii16 (2003).
- Christophi, C., Harun, N. & Rftis, T. Liver regeneration and tumor stimulation —a review of cytokine and angiogenic factors. *J. Gastrointest. Surg.* 12, 966–980 (2008).
- Evano, C. et al. Tumor and non-tumor liver angiogenesis is traced and evaluated by hepatic arterial ultrasound in murine models. *Ultrasound Med. Biol.* 38, 1195–1204 (2012).
- Ferrara, N. VEGF as a therapeutic target in cancer. *Oncology* 69 (Suppl. 3), 11–16 (2005).
- Ishigami, S. I. et al. Predictive value of vascular endothelial growth factor (VEGF) in metastasis and prognosis of human colorectal cancer. *Br. J. Cancer* 78, 1379–1384 (1998).
- Takahashi, Y., Kitadai, Y., Bucana, C. D., Cleary, K. R. & Ellis, L. M. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer. *Cancer Res.* 55, 3964–3968 (1995).
- Takahashi, Y. et al. Vessel counts and expression of vascular endothelial growth factor as prognostic factors in node-negative colon cancer. *Arch. Surg.* 132, 541–546 (1997).
- Tokunaga, T. et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA isoform expression pattern is correlated with liver metastasis and poor prognosis in colon cancer. *Br. J. Cancer* 77, 998–1002 (1998).
- Ding, B. S. et al. Inductive angiocrine signals from sinusoidal endothelium are required for liver regeneration. *Nature* 468, 310–315 (2010).
- Orlitzky, T. A. et al. Liver regeneration is an angiogenesis-associated phenomenon. *Ann. Surg.* 238, 703–711 (2002).
- Holmgren, L., O'Reilly, M. S. & Folkman, J. Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat. Med.* 1, 149–153 (1995).
- Murray, C. Tumour dormancy: not so sleepy after all. *Nat. Med.* 1, 117–118 (1995).
- París, Y., Ribeiro, J., Chretien, Y. & Nordlinger, B. Dormant liver metastases: an experimental study. *Br. J. Surg.* 79, 221–223 (1992).
- Michalopoulos, G. K. Liver regeneration. *J. Cell. Physiol.* 213, 286–300 (2007).
- Paschos, K. A. & Bird, N. C. Liver regeneration and its impact on post-hepatectomy metastatic tumour recurrence. *Anticancer Res.* 30, 2161–2170 (2010).
- Um, C. & Farges, O. Portal vein occlusion before major hepatectomy in patients with colorectal liver metastases: rationale, indications, technical aspects, complications and outcome. *J. Vasc. Surg.* 149, e85–e96 (2012).
- Yokoyama, Y., Nagino, M. & Nimura, Y. Mechanisms of hepatic regeneration following portal vein embolization and partial hepatectomy: a review. *World J. Surg.* 31, 367–374 (2007).
- de Graaf, W., van den Esscheert, J. W., van Lienden, K. P. & van Gulik, T. M. Induction of tumor growth after preoperative portal vein embolization: is it a real problem? *Ann. Surg. Oncol.* 16, 423–430 (2009).
- Gorden, D. L. et al. Resident stromal cell-derived MMP-9 promotes the growth of colorectal metastases in the liver microenvironment. *Int. J. Cancer* 121, 495–500 (2007).
- Michalopoulos, G. K. & Khan, Z. Liver regeneration, growth factors, and amphiregulin. *Gastroenterology* 128, 503–506 (2005).
- Tsushima, H. et al. Circulating transforming growth factor β 1 as a predictor of liver metastasis after resection in colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.* 7, 1258–1262 (2001).
- Yoon, S. S. et al. Profile of plasma angiogenic factors before and after hepatectomy for colorectal cancer liver metastases. *Ann. Surg. Oncol.* 13, 353–362 (2006).
- Kokudo, N. et al. Proliferative activity of intrahepatic colorectal metastases after preoperative hemihepatic portal vein embolization. *Hepatology* 34, 267–272 (2001).
- Shimizu, Y. et al. Elevated mitochondrial gene expression during rat liver regeneration after portal vein ligation. *Hepatology* 22, 1222–1229 (1995).
- Starkel, P. et al. After portal branch ligation in rat, nuclear factor κ B, interleukin-6, signal

REVIEWS

- transducers and activators of transcription 3, c-fos, c-myc, and cjun are similarly induced in the ligated and nonligated lobes. *Hepatology* 29, 1463–1470 (1999).
26. Bohm, F., Kohler, U. A., Speicher, T. & Werner, S. Regulation of liver regeneration by growth factors and cytokines. *EMBO Mol. Med.* 2, 294–305 (2010).
 27. Homel, J. & Daud, A. I. Spectrum of activity and mechanism of action of VEGF/FGF inhibitors. *Cancer Control* 14, 285–294 (2007).
 28. Otte, J. M. et al. Functional expression of HGF and its receptor in human colorectal cancer. *Digestion* 61, 237–246 (2000).
 29. Brozek, W. et al. Differentiation-dependent expression and mitogenic action of interleukin-6 in human colon carcinoma cells: relevance for tumour progression. *Eur. J. Cancer* 41, 2347–2354 (2005).
 30. Nabeshima, K. et al. Hepatocyte growth factor/scatter factor induces not only scattering but also cohort migration of human colorectal adenocarcinoma cells. *Int. J. Cancer* 78, 750–759 (1998).
 31. Byrne, A. M., Bouchier-Hayes, D. J. & Harnsey, J. H. Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). *J. Cell. Mol. Med.* 9, 777–794 (2005).
 32. Michalopoulos, G. K. Liver regeneration after partial hepatectomy: critical analysis of mechanistic dilemmas. *Am. J. Pathol.* 176, 2–13 (2009).
 33. Marubashi, S. et al. Effect of portal hemodynamics on liver regeneration studied in a novel portocaval shunt rat model. *Surgery* 136, 1028–1037 (2004).
 34. Yamenitis, S. D. et al. An experimental approach of the Doppler perfusion index of the liver in detecting occult hepatic metastases: histological findings related to the hemodynamic measurements in Wistar rats. *Eur. Radiol.* 10, 417–424 (2000).
 35. Elpel, C., Abshagen, K. & Vollmar, B. Regulation of hepatic blood flow: the hepatic arterial buffer response revisited. *World J. Gastroenterol.* 16, 6048–6057 (2010).
 36. Lauth, W. W. Regulatory processes interacting to maintain hepatic blood flow constancy: vascular compression, hepatic arterial buffer response, hepatorenal reflex, liver regeneration, escape from vasoconstriction. *Hepatology* 37, 891–903 (2007).
 37. Lauth, W. W., D'Almeida, M. S., McQuaker, J. & D'Aleo, L. Impact of the hepatic arterial buffer response on splanchnic vascular responses to intravenous adenosine, isoproterenol, and glucagon. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 66, 807–813 (1988).
 38. Kolmar, O. et al. Tumour growth following portal branch ligation in an experimental model of liver metastases. *Br. J. Surg.* 97, 917–926 (2010).
 39. Kolmar, O. et al. Portal branch ligation induces a hepatic arterial buffer response, microvascular remodeling, normoxigenation, and cell proliferation in portal blood-deprived liver tissue. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 292, G1534–G1542 (2007).
 40. Richter, S., Vollmar, B., Mucke, I., Post, S. & Menger, M. D. Hepatic arteriole-portal venular shunting guarantees maintenance of nutritional microvascular supply in hepatic arterial buffer response of rat livers. *J. Physiol.* 531, 193–201 (2001).
 41. Yokoyama, Y. et al. Hepatic arterial flow becomes the primary supply of sinusoids following partial portal vein ligation in rats. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 21, 1567–1574 (2006).
 42. Olla, E. W. et al. Matrix metalloproteinase-9 is an important factor in hepatic regeneration after partial hepatectomy in mice. *Hepatology* 44, 540–549 (2006).
 43. Illmann, M. et al. MMP-9 is differentially expressed in primary human colorectal adenocarcinomas and their metastases. *Mol. Cancer Res.* 4, 293–302 (2006).
 44. Matsuyama, Y., Takao, S. & Aikou, T. Comparison of matrix metalloproteinase expression between primary tumors with or without liver metastasis in pancreatic and colorectal carcinomas. *J. Surg. Oncol.* 80, 105–110 (2002).
 45. Alwayn, I. P. et al. A critical role for matrix metalloproteinases in liver regeneration. *J. Surg. Res.* 145, 192–198 (2008).
 46. Mueller, L. et al. Tumor growth-promoting cellular host response during liver atrophy after portal occlusion. *Liver Int.* 25, 994–1001 (2005).
 47. Bajou, K. et al. Absence of host plasminogen activator inhibitor 1 prevents cancer invasion and vascularization. *Nat. Med.* 4, 923–928 (1998).
 48. Bussieres, J., Megias, J., Terencio, M. C. & Alcaraz, M. J. Heme oxygenase-1 inhibits apoptosis in Caco-2 cells via activation of Akt pathway. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38, 1510–1517 (2006).
 49. Jozkowicz, A., Was, H. & Dulak, J. Heme oxygenase-1 in tumors: is it a false friend? *Antioxid. Redox Signal.* 9, 2099–2117 (2007).
 50. Nylandsted, J. et al. Eradication of glioblastoma and breast and colon carcinoma xenografts by Hsp70 depletion. *Cancer Res.* 62, 7139–7142 (2002).
 51. Tanaka, S. et al. Antiapoptotic effect of haem oxygenase-1 induced by nitric oxide in experimental solid tumour. *Br. J. Cancer* 88, 902–909 (2003).
 52. Barbato, B. et al. Preoperative right portal vein embolization in patients with metastatic liver disease. *Metastatic Liver Volumes after RPVE. Acta Radiol.* 44, 98–102 (2003).
 53. Elias, D. et al. During liver regeneration following right portal embolization the growth rate of liver metastases is more rapid than that of the liver parenchyma. *Br. J. Surg.* 96, 784–788 (1999).
 54. Hoekstra, L. T. et al. Tumor progression after preoperative portal vein embolization. *Ann. Surg.* 256, 812–817 (2012).
 55. Lindner, P. et al. Extended right-sided liver resection for colorectal liver metastases —Impact of percutaneous portal venous embolisation. *Eur. J. Surg. Oncol.* 32, 292–296 (2006).
 56. Parnachea, V. et al. Long-term survival and disease recurrence following portal vein embolisation prior to major hepatectomy for colorectal metastases. *Ann. Surg. Oncol.* 16, 1202–1207 (2009).
 57. Wicherts, D. A. et al. Long-term results of two-stage hepatectomy for resectable colorectal cancer liver metastases. *Ann. Surg.* 248, 994–1005 (2008).
 58. Brouquet, A. et al. High survival rate after two-stage resection of advanced colorectal liver metastases: response-based selection and complete resection define outcome. *J. Clin. Oncol.* 29, 1083–1090 (2011).
 59. Ribero, D. et al. Portal vein embolization before major hepatectomy and its effects on regeneration, resectability and outcome. *Br. J. Surg.* 94, 1386–1394 (2007).
 60. Muratore, A. et al. Chemotherapy between the first and second stages of a two-stage hepatectomy for colorectal liver metastases: should we routinely recommend it? *Ann. Surg. Oncol.* 19, 1310–1315 (2012).
 61. Goere, D. et al. Chemotherapy does not impair hypertrophy of the left liver after right portal vein obstruction. *J. Gastrointest. Surg.* 10, 365–370 (2006).
 62. Aussilhou, B. et al. Preoperative liver hypertrophy induced by portal flow occlusion before major hepatic resection for colorectal metastases can be impaired by bevacizumab. *Ann. Surg. Oncol.* 16, 1553–1559 (2009).
 63. Zord, D., Chun, Y. S., Madoff, D. C., Abdalla, E. K. & Vauthey, J. N. Chemotherapy with bevacizumab does not affect liver regeneration after portal vein embolization in the treatment of colorectal liver metastases. *Ann. Surg. Oncol.* 15, 2765–2772 (2008).
 64. Elias, D. et al. Simultaneous percutaneous right portal vein embolization and left liver tumor radiofrequency ablation prior to a major right hepatic resection for bilateral colorectal metastases. *HepatoGastroenterology* 51, 1788–1791 (2004).
 65. Selner, N. et al. Downstaging colorectal liver metastases by concomitant unilateral portal vein ligation and selective intra-arterial chemotherapy. *Br. J. Surg.* 93, 587–592 (2006).
 66. Hwang, S. et al. Sequential preoperative ipsilateral hepatic vein embolization after portal vein embolization to induce further liver regeneration in patients with hepatobiliary malignancy. *Ann. Surg.* 249, 608–616 (2009).
 67. Schmitz, A. A. et al. Right portal vein ligation combined with in situ splitting induces rapid left lateral liver lobe hypertrophy enabling 2-staged extended right hepatic resection in small-for-size settings. *Ann. Surg.* 255, 405–414 (2012).
 68. de Santibanes, E. & Clavien, P. A. Playing Play-Doh to prevent postoperative liver failure: the “ALPPS” approach. *Ann. Surg.* 255, 415–417 (2012).
 69. Ogata, S. et al. Sequential arterial and portal vein embolizations before right hepatectomy in patients with cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Br. J. Surg.* 93, 1091–1098 (2006).
 70. Dokmak, S. & Belghiti, J. Which limits to the “ALPPS” approach? *Ann. Surg.* 256, e6 (2012).
 71. Rudnick, D. A. & Davidson, N. O. Functional relationships between lipid metabolism and liver regeneration. *Int. J. Hepatol.* 2012, 549241 (2012).
 72. Higgins, G. M. & Anderson R. Experimental pathology of the liver. *Arch. Path. Lab. Med.* 12, 186–202 (1931).
 73. Greene, A. K. & Puder, M. Partial hepatectomy in the mouse: technique and perioperative management. *J. Invest. Surg.* 16, 99–102 (2003).
 74. Harun, N., Nikfarjam, M., Muralidharan, V. & Christoph, C. Liver regeneration stimulates tumor metastases. *J. Surg. Res.* 138, 284–290 (2007).
 75. Slooter, G. D., Marquet, R. L., Jeekel, J. & Ijzermans, J. N. Tumour growth stimulation after partial hepatectomy can be reduced by treatment with tumour necrosis factor α . *Br. J. Surg.* 82, 129–132 (1995).
 76. Fumer, K. et al. Selective portal vein embolization and ligation trigger different regenerative responses in the rat liver. *Hepatology* 47, 1615–1623 (2008).
 77. Bretagnol, F. et al. Selective portal vein embolization and colorectal liver metastases in rat: a new experimental model for tumor growth study. *J. Surg. Res.* 171, 669–674 (2011).
 78. Maggioni, L. et al. Selective portal vein ligation and embolization induce different tumoral responses in the rat liver. *Surgery* 149, 496–503 (2011).

REVIEWS

79. Sakai, N. et al. Portal vein ligation accelerates tumor growth in ligated, but not contralateral lobes. *World J. Gastroenterol.* 16, 3816–3826 (2010).
80. Aller, M. A. et al. The value of microsurgery in liver research. *Liver Int.* 29, 1132–1140 (2009).
81. van den Esscher, J. W. et al. Portal vein embolization induces more liver regeneration than portal vein ligation in a standardized rabbit model. *Surgery* 149, 378–385 (2011).
82. Wilms, C. et al. Comparative study of portal vein embolization versus portal vein ligation for induction of hypertrophy of the future liver remnant using a mini-pig model. *Ann. Surg.* 247, 825–834 (2008).
83. de Jong, G. M., Aarts, F., Hendriks, T., Boerman, O. C. & Bleichrodt, R. P. Animal models for liver metastases of colorectal cancer: research review of preclinical studies in rodents. *J. Surg. Res.* 154, 167–176 (2009).
84. Maggiori, L., Bretagnol, F., Wagner, M., Habbeil, C. & Paris, Y. Bilobar colorectal liver metastases: a new model for preclinical studies. *Int. J. Exp. Pathol.* 93, 414–420 (2012).
85. de Jong, K. P. et al. The effect of partial hepatectomy on tumor growth in rats: in vivo and in vitro studies. *Hepatology* 22, 1263–1272 (1995).
86. Ikeda, Y. et al. Preliminary report of tumor metastasis during liver regeneration after hepatic resection in rats. *Eur. J. Surg. Oncol.* 21, 188–190 (1995).
87. Rashid, B. et al. Minimal liver resection strongly stimulates the growth of human colon cancer in the liver of nude mice. *Chn. Exp. Metastasis* 17, 497–500 (1999).
88. Fausto, N. Liver regeneration. *J. Hepatol.* 32, 19–31 (2000).
89. Mangnall, D., Bird, N. C. & Majed, A. W. The molecular physiology of liver regeneration following partial hepatectomy. *Liver Int.* 23, 124–138 (2003).
90. Denys, A. L. et al. Failure of right portal vein ligation to induce left lobe hypertrophy due to intrahepatic portoportal collaterals: successful treatment with portal vein embolization. *AJR Am. J. Roentgenol.* 173, 633–635 (1999).
91. Heinrich, S., Jochum, W., Graf, R. & Clavien, P. A. Portal vein ligation and partial hepatectomy differentially influence growth of intrahepatic metastasis and liver regeneration in mice. *J. Hepatol.* 45, 35–42 (2006).
92. Riehle, K. J., Dan, Y. Y., Campbell, J. S. & Fausto, N. New concepts in liver regeneration. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 26 (Suppl. 1), 203–212 (2011).
93. van Esch, J. S. et al. Infusion of CD133+ bone marrow-derived stem cells after selective portal vein embolization enhances functional hepatic reserves after extended right hepatectomy: a retrospective single-center study. *Ann. Surg.* 255, 79–85 (2012).
94. Audouliet, R. et al. Bone marrow-derived endothelial and hematopoietic precursors cells enhance the metastasis of colon cancer in an orthotopic murine model. *Int. J. Cancer.* 129, 2304–2305 (2011).
95. Shinagawa, K. et al. Mesenchymal stem cells enhance growth and metastasis of colon cancer. *Int. J. Cancer* 127, 2323–2333 (2010).

Author contributions

C. Lim researched data for the article. C. Lim, F. Cauchy and M. Pocard wrote the article. All of the authors substantially contributed to the discussion of content and reviewed and edited the manuscript before submission.

ANNEXE 3

Annals of Surgery. 2016 263 (Lettre à l'éditeur)

Infusion of CD133 + bone marrow-derived stem cell after selective portal vein embolization enhances functional hepatic reserves after extended right hepatectomy.

Lim C, Audollent R, Pocard M, Azoulay D.

LETTER TO THE EDITOR

Infusion of CD133+ Bone Marrow–derived Stem Cell After Selective Portal Vein Embolization Enhances Functional Hepatic Reserves After Extended Right Hepatectomy

To the Editor:

We have read with great interest the article by am Esch et al, titled "Infusion of CD133+ Bone Marrow–derived Stem Cells After Selective Portal Vein Embolization Enhances Functional Hepatic Reserves After Extended Right Hepatectomy."¹ This study presents the therapeutic application of bone marrow–derived stem cells (BMSCs) in humans with the intent to enhance hepatic hypertrophy before major hepatectomy. The authors compared the impact of portal vein injection of CD133+ BMSCs after portal vein embolization (PVE + BMSC) with PVE alone on liver regeneration of left liver remnant (segments II/III) before extended right hepatectomy for mostly malignant tumors. They reported a significantly greater increase in the future remnant liver volume at post-operative days 14 after PVE in the PVE + BMSC group than that in the PVE group, which allowed curative resection in 88% of patients (9/11 in PVE + BMSC and 8/11 in PVE). The results of this study are very promising; however, the following points must be addressed.

First, the too small remnant liver is the first cause of liver failure, which is, in turn, the first cause of postoperative mortality after liver resection.² PVE has been demonstrated to be a safe and efficient method for inducing sufficient hypertrophy of the future remnant liver and to overcome this major complication.³ However, controversy remains as to how to initiate and enhance liver regeneration in patients in whom PVE alone is insufficient (disease progression limiting the waiting period after PVE, diabetes mellitus, underlying liver disease, prolonged chemotherapy).

Second, the contribution of BMSCs in liver regeneration is a seductive concept. BMSCs have been shown experimentally to

participate in liver regeneration both after liver resection and of the liver graft after orthotopic liver transplantation.⁴ Initial translational studies have established the safety and feasibility of direct administration of BMSCs, rather than demonstrating efficacy in enhancing liver regeneration in acute and chronic liver disease.⁵ However, the mechanisms by which BMSCs contribute to hepatocyte proliferation or to liver repair remain unclear. There is currently neither proof of concept nor validated animal models demonstrating evidence for the participation of BMSCs in enhancing liver proliferation after PVE.

Third, in our experimental studies, we hypothesized that the mechanism by which BMSCs may repopulate the regenerating liver after PVE, which represents a stimulus for liver proliferation of nonembolized liver, is angiogenesis. Angiogenesis plays an important role in restoring liver function after hepatectomy⁶ and can be induced by several hepatic stresses, such as hypoxia.⁷ Our hypothesis was further supported by the observation that in animal models of ischemia, circulating endothelial progenitor cells incorporated into sites of active angiogenesis.⁸ Congruent with the observation that angiogenesis resulting from ischemia in the occluded liver lobes,⁹ concomitant with endothelial progenitor cell mobilization, may be associated with a more regenerative liver. We assessed this hypothesis in a reliable rat model of mesenchymal stem cells via portal vein administration mixed after PVE (1) to evaluate the potential risk factors that need to be considered before the clinical application: safety, effectiveness, different mode, amount of volume of tissue infused and site of administration (portal, hepatic artery, or ectopic site), rate of complications (hemorrhage, thrombosis), and hepatic encephalopathy; (2) to evaluate the impact of mesenchymal stem cell administration in enhancing liver regeneration after PVE; and (3) to better understand the molecular pathways of interaction between mesenchymal stem cells and hepatocytes (data not yet published).

Fourth, the potential risk of tumor growth by tumor microenvironment, BMSC interactions, and possibly by previous modification of the premetastatic site before cancer cells arrival leads to the emergence of the concept of the premetastatic niche.¹⁰ However, it has also been reported that tumor progression can occur after PVE alone in embolized and nonembolized liver lobes.¹¹ We have shown that the injection of BMSCs into a mouse tail vein enhanced the metastatic progression in an orthotopic murine model of liver metastasis with a significantly greater number of micro- or macrometastases (56% vs 20% in the PBS group;

$P < 0.05$).¹² In addition, we found by immunofluorescent staining of cut liver specimens that BMSCs localized to the tumor invasion front and colocalized with endothelial cells. Even if the authors reported that the local recurrence and the occurrence of distant metastases were alike among the 3 groups, there is a theoretical rationale for supporting this risk and it should not be overlooked.

Fifth, the authors reported no procedure-related complications with the ileocolic catheterization with open laparotomy. In our extensive experience, we have demonstrated that a transhepatic ipsilateral portal vein approach is widely feasible.³ However, the potential risks of portal vein injection of cells have not been well characterized. Bucher et al¹³ reported that the percutaneous approach of islet transplantation was more significantly associated with increased morbidity (thrombosis and intra-abdominal hematoma) than the laparotomy approach, irrespective of the volume of tissue infused.

In conclusion, although PVE remains an effective procedure both to induce liver regeneration and to increase future remnant liver volume, this study reported for the first time that the therapeutic application of BMSCs in humans with the intent to enhance liver regeneration processes was at least safe and did not complicate liver resection. We are currently experiencing a wave of enthusiasm for clinical trials in which stem cells are used to enhance liver regeneration for a variety of diseases, based on promising results in animal models and initial translational studies. However, we should not overlook some essential precautions and carefully reanalyze both the risks and potential benefits to patients.

Chetana Lim, MD

Unité Inserm U965, équipe "Angiogenèse et Recherche Translationnelle"
Hôpital Lariboisière
Institut des Vaisseaux et du Sang
Paris, France
Service de Chirurgie Digestive et Hépatobiliaire et Transplantation hépatique
Hôpital Henri Mondor
Creteil, France

Raphaële Audouin, MD

Unité Inserm U965
équipe "Angiogenèse et Recherche Translationnelle"
Hôpital Lariboisière
Institut des Vaisseaux et du Sang
Paris, France
Département médico-chirurgical de pathologie digestive
Hôpital Lariboisière
Paris, France

Disclosure: None of the authors has any source of funding or any other kind of personal conflicts of interest related to this letter.

Copyright © 2015 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

ISSN: 0003-4932/14/263-05-0821

DOI: 10.1097/SLA.0000000000000404

Marc Pocard, MD, PhD

Unité Inserm U965

équipe "Angiogenèse et

Recherche Translationnelle"

Hôpital Lariboisière

Institut des Vaisseaux et du Sang

Paris, France

Département médico-chirurgical de

pathologie digestive

Hôpital Lariboisière

Paris, France

Université Paris-Diderot

Paris, France

Daniel Azoulay, MD, PhD

Service de Chirurgie Digestive

Hépatobiliaire et Transplantation hépatique

Hôpital Henri Mondor

Université Paris-Est

Créteil, France

daniel.azoulay.hmn@gmail.com

REFERENCES

1. van Biech JS, Schmelzle M, Punt G, et al. Infusion of CD133+ bone marrow-derived stem cells after selective portal vein embolization enhances functional hepatic reserves after extended right hepatectomy: a retrospective single-center study. *Ann Surg*. 2012;255:79–85.
2. Shinde K, Shimada M, Goto T, et al. Postoperative liver failure after major hepatic resection for hepatocellular carcinoma in the modern era with special reference to remnant liver volume. *J Am Coll Surg*. 1999;188:304–309.
3. Widiarta DA, de Haas RJ, Andreasi P, et al. Impact of portal vein embolization on long-term survival of patients with primarily unresectable colorectal liver metastases. *Br J Surg*. 2010;97:240–250.
4. Stachfield BM, Forbes SJ, Wigney SJ. Prospects for stem cell transplantation in the treatment of hepatic disease. *Liver Transpl*. 2010;16:827–836.
5. Ezzi TM, Dhar DK, Newsome PN, et al. Use of hepatocyte and stem cells for treatment of post-resectional liver failure: are we there yet? *Liver Int*. 2011;31:773–784.
6. Mochida S, Ishikawa K, Inao M, et al. Increased expressions of vascular endothelial growth factor and its receptors, Flt-1 and KDR/Flk-1, in regenerating rat liver. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996;226:176–179.
7. Mishchenko A, Bauer T, Salceda S, Cao J. Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression in vitro and in vivo. *Lab Invest*. 1994;71:374–379.
8. Asahara T, Marchant T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997;275:964–967.
9. Bilodeau M, Aubry MC, Hode R, et al. Evaluation of hepatocyte injury following partial ligation of the left portal vein. *J Hepatol*. 1999;30:29–37.
10. Peinado H, Lavastola S, Lyden D. The secreted factors responsible for pre-metastatic niche formation: old sayings and new thoughts. *Semin Cancer Biol*. 2011;21:139–146.
11. de Graaf W, van den Boschert JW, van Liesden KP, et al. Induction of tumor growth after preoperative portal vein embolization: is it a real problem? *Ann Surg Oncol*. 2009;16:423–430.
12. Audoulet R, Evens C, Contreras JO, et al. Bone marrow-derived endothelial and hematopoietic precursors cells enhance the metastasis of colon cancer in an orthotopic murine model. *Int J Cancer*. 2011;129:2304–2305.
13. Budner P, Mahe Z, Boico D, et al. Mortality associated with intraportal islet transplantation. *Transplant Proc*. 2004;36:1119–1120.

Reply:

We would like to thank Dr Lim and coauthors for their valuable comments and suggestions on our novel concept of autologous CD133+ bone marrow stem cell (BMSC) application to promote liver proliferation subsequent to portal venous embolization (PVE).¹

First, we agree on the necessity for new strategies to overcome the problem of insufficient future liver remnant volume gain after PVE. Parallel to the concept of therapeutic utilization of BMSCs,^{1,2} we were recently able to present a second strategy to gain sufficient prospective liver remnant volume before surgery in cases of insufficient PVE responders.³ In that regard, we demonstrated early experience with a modulated surgical technique of trisegmentectomy as a 2-stage resection approach with in situ liver transection along the falciform ligament and complete portal isolation of all but liver segments II and III. In selected cases, an adequate future liver remnant volume was reached before the second surgical step resecting the extended right liver lobe. We believe that both concepts will reach acceptance with the right inclusion criteria utilized.

Second, although mechanisms, how BMSCs contribute to liver regeneration is still widely unexplored. We recently published preclinical data on therapeutically administered CD133+ BMSCs to promote hepatocyte proliferation after 70% resection, as demonstrated by significant increases in Ki67 expression.⁴ In addition, we demonstrated that EctoNTPDase1 (CD39) on CD133+ BMSCs play a significant role in that context. However, we do agree on the necessity to expand research on mechanisms and efficacy of BMSCs to therapeutically promote hepatic regeneration.

Third, colocalization to sites of angiogenesis (latter should be a vital part of a non-parenchymal proliferating infrastructure in the context of liver regeneration), as proposed by Dr Lim and colleagues could give some hints to possible mechanisms involved in BMSC-mediated liver regeneration. However, it does not necessarily give conclusive proof of their main contribution in liver regeneration. In a warm ischemia-isolated perfused rat liver model with

in situ imaging, we demonstrated extravasation of CD133+ BMSCs from sinusoids 10 to 30 minutes after addition to the perfusate (unpublished data). Facing the low number of mobilized hematopoietic stem cells in scenarios of liver regeneration after liver resection (unpublished data and others), modulation of the local regeneration capacity mediated by humoral factors and/or horizontal gene transfer or substitution of local stem cell niches may represent major aspects of the contribution of bone marrow stem cells in the context of liver regeneration rather than facile replacement or transdifferentiation to parenchymal liver cells. We recently show in preclinical settings that subsets of hematopoietic BMSCs boost liver regeneration after 70% hepatectomy by modulating vascular inflammation in an interleukin 18-dependent manner.⁵ These findings may point to the importance of immunological reactions involved in the course of hepatic repair and suggests hematopoietic BMSCs as modulators of vascular inflammation.

It may be of some interest whether cells are administered by portal or arterial route. For our concept, there need to be significant aspects to favor arterial application, as one would have to cannulate the arterial system of the liver in addition to the portal approach. We believe that our concept may also have implications for the therapy of other hepatic pathophysiological scenarios without direct access to the portal vein. We incorporated questions inclusive of the most effective site of application in a comprehensive, ongoing research program to address many aspects for CD133+ hematopoietic BMSC that Lim et al evaluated for mesenchymal stem cells (MSC), which are obviously different than hematopoietic stem cells. Here, we would like to mention major concerns that are widely discussed for MSC therapy in liver regeneration. A potential of those cells for promotion of hepatic fibrosis needs to be addressed in research programs involving MSC as well as their role in hepatic repair.^{6,7}

Fourth, potential impact of any kind of regeneration and proliferation promotion on the growth of proliferating tumors is critical for the judgement whether such a therapy in patients with neoplastic diseases does more good than bad to the patient. Although we did not observe negative impact on tumor growth and survival due to CD133+ BMSC-treatment, we do exclude patients with macroscopic evident tumorous lesions in the hepatic segments III/IV to be expanded for BMSC-co-treatment.

Fifth, we can draw on many experiences with all techniques of portal disruption that are open portal ligation as well as the percutaneous-transhepatic approach⁸ and the open ileocolic approach¹ for the subsequent PVE procedure. We chose the latter for our

Disclosure: The authors declare no conflicts of interest.
DOI: 10.1097/SLA.0000000000000849

Marc Pocard, MD, PhD

Unité Inserm U965

équipe "Angiogenèse et

Recherche Translationnelle"

Hôpital Lariboisière

Institut des Vaisseaux et du Sang

Paris, France

Département médico-chirurgical de

pathologie digestive

Hôpital Lariboisière

Paris, France

Université Paris-Diderot

Paris, France

Daniel Azoulay, MD, PhD

Service de Chirurgie Digestive

Hépatobiliaire et Transplantation hépatique

Hôpital Henri Mondor

Université Paris-Est

Créteil, France

daniel.azoulay.hmn@gmail.com

REFERENCES

1. van Biech JS, Schmelzle M, Punt G, et al. Infusion of CD133+ bone marrow-derived stem cells after selective portal vein embolization enhances functional hepatic reserves after extended right hepatectomy: a retrospective single-center study. *Ann Surg*. 2012;255:79–85.
2. Shinde K, Shimada M, Goto T, et al. Postoperative liver failure after major hepatic resection for hepatocellular carcinoma in the modern era with special reference to remnant liver volume. *J Am Coll Surg*. 1999;188:304–309.
3. Widiarta DA, de Haas RJ, Andreani P, et al. Impact of portal vein embolization on long-term survival of patients with primarily unresectable colorectal liver metastases. *Br J Surg*. 2010;97:240–250.
4. Stachfield BM, Forbes SJ, Wigney SJ. Prospects for stem cell transplantation in the treatment of hepatic disease. *Liver Transpl*. 2010;16:827–836.
5. Ezzi TM, Dhar DK, Newsome PN, et al. Use of hepatocyte and stem cells for treatment of post-resectional liver failure: are we there yet? *Liver Int*. 2011;31:773–784.
6. Mochida S, Ishikawa K, Inao M, et al. Increased expressions of vascular endothelial growth factor and its receptors, Flt-1 and KDR/Flk-1, in regenerating rat liver. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996;226:176–179.
7. Mishchenko A, Bauer T, Salceda S, Cao J. Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression in vitro and in vivo. *Lab Invest*. 1994;71:374–379.
8. Asahara T, Marchant T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997;275:964–967.
9. Bilodeau M, Aubry MC, Hode R, et al. Evaluation of hepatocyte injury following partial ligation of the left portal vein. *J Hepatol*. 1999;30:29–37.
10. Peinado H, Lavastola S, Lyden D. The secreted factors responsible for pre-metastatic niche formation: old sayings and new thoughts. *Semin Cancer Biol*. 2011;21:139–146.
11. de Graaf W, van den Boschert JW, van Liesden KP, et al. Induction of tumor growth after preoperative portal vein embolization: is it a real problem? *Ann Surg Oncol*. 2009;16:423–430.
12. Audoulet R, Evens C, Contreras JO, et al. Bone marrow-derived endothelial and hematopoietic precursors cells enhance the metastasis of colon cancer in an orthotopic murine model. *Int J Cancer*. 2011;129:2304–2305.
13. Budker P, Mahe Z, Boico D, et al. Mortality associated with intraportal islet transplantation. *Transplant Proc*. 2004;36:1119–1120.

Reply:

We would like to thank Dr Lim and coauthors for their valuable comments and suggestions on our novel concept of autologous CD133+ bone marrow stem cell (BMSC) application to promote liver proliferation subsequent to portal venous embolization (PVE).¹

First, we agree on the necessity for new strategies to overcome the problem of insufficient future liver remnant volume gain after PVE. Parallel to the concept of therapeutic utilization of BMSCs,^{1,2} we were recently able to present a second strategy to gain sufficient prospective liver remnant volume before surgery in cases of insufficient PVE responders.³ In that regard, we demonstrated early experience with a modulated surgical technique of trisegmentectomy as a 2-stage resection approach with in situ liver transection along the falciform ligament and complete portal isolation of all but liver segments II and III. In selected cases, an adequate future liver remnant volume was reached before the second surgical step resecting the extended right liver lobe. We believe that both concepts will reach acceptance with the right inclusion criteria utilized.

Second, although mechanisms, how BMSCs contribute to liver regeneration is still widely unexplored. We recently published preclinical data on therapeutically administered CD133+ BMSCs to promote hepatocyte proliferation after 70% resection, as demonstrated by significant increases in Ki67 expression.⁴ In addition, we demonstrated that EctoNTPDase1 (CD39) on CD133+ BMSCs play a significant role in that context. However, we do agree on the necessity to expand research on mechanisms and efficacy of BMSCs to therapeutically promote hepatic regeneration.

Third, colocalization to sites of angiogenesis (latter should be a vital part of a non-parenchymal proliferating infrastructure in the context of liver regeneration), as proposed by Dr Lim and colleagues could give some hints to possible mechanisms involved in BMSC-mediated liver regeneration. However, it does not necessarily give conclusive proof of their main contribution in liver regeneration. In a warm ischemia-isolated perfused rat liver model with

in situ imaging, we demonstrated extravasation of CD133+ BMSCs from sinusoids 10 to 30 minutes after addition to the perfusate (unpublished data). Facing the low number of mobilized hematopoietic stem cells in scenarios of liver regeneration after liver resection (unpublished data and others), modulation of the local regeneration capacity mediated by humoral factors and/or horizontal gene transfer or substitution of local stem cell niches may represent major aspects of the contribution of bone marrow stem cells in the context of liver regeneration rather than facile replacement or transdifferentiation to parenchymal liver cells. We recently show in preclinical settings that subsets of hematopoietic BMSCs boost liver regeneration after 70% hepatectomy by modulating vascular inflammation in an interleukin 18-dependent manner.⁵ These findings may point to the importance of immunological reactions involved in the course of hepatic repair and suggests hematopoietic BMSCs as modulators of vascular inflammation.

It may be of some interest whether cells are administered by portal or arterial route. For our concept, there need to be significant aspects to favor arterial application, as one would have to cannulate the arterial system of the liver in addition to the portal approach. We believe that our concept may also have implications for the therapy of other hepatic pathophysiological scenarios without direct access to the portal vein. We incorporated questions inclusive of the most effective site of application in a comprehensive, ongoing research program to address many aspects for CD133+ hematopoietic BMSC that Lim et al evaluated for mesenchymal stem cells (MSC), which are obviously different than hematopoietic stem cells. Here, we would like to mention major concerns that are widely discussed for MSC therapy in liver regeneration. A potential of those cells for promotion of hepatic fibrosis needs to be addressed in research programs involving MSC as well as their role in hepatic repair.^{6,7}

Fourth, potential impact of any kind of regeneration and proliferation promotion on the growth of proliferating tumors is critical for the judgement whether such a therapy in patients with neoplastic diseases does more good than bad to the patient. Although we did not observe negative impact on tumor growth and survival due to CD133+ BMSC-treatment, we do exclude patients with macroscopic evident tumorous lesions in the hepatic segments III/IV to be expanded for BMSC-co-treatment.

Fifth, we can draw on many experiences with all techniques of portal disruption that are open portal ligation as well as the percutaneous-transhepatic approach⁷ and the open ileocolic approach¹ for the subsequent PVE procedure. We chose the latter for our

Disclosure: The authors declare no conflicts of interest.
DOI: 10.1097/SLA.0000000000000849

clinical study first, as general anesthesia was required for BM-aspiration adding no additional anesthesiological risks by choosing the access of the safer open ileocolic cannulation. Second open access offered us the opportunity to exclude local irresectability due to tumor spread beyond segment I and IV to VIII by manual and intraoperative ultrasound evaluation of the peritoneal cavity including left lateral liver segments.

Beyond safety of the procedure, we believe that we were able to give some data on clinical efficacy of our novel approach. Furthermore, we recently substantiated these investigations with preclinical data on mechanisms and efficacy of therapeutically transfused CD133+ BMSC to promote hepatic proliferation. Our multi-center, placebo-controlled randomized trial that is about to be initiated will give more founded answers on some of the key questions that we addressed and still address in our experimental and translational research program and that were also mentioned by Dr Lim and colleagues.

Jan Schulte am Esch, MD
Heinrich Heine University of Dueseldorf
Germany

jan.schulteamesch@uni-duesseldorf.de
jan.schulteamesch@med.uni-duesseldorf.de

Moritz Schmelzle, MD
Department of General
Visceral and Transplantation Surgery
Charité University of Berlin Campus Mitte

Constanze Duhme, PhD
Heinrich Heine University of Dueseldorf
Germany

Guenter Fuerst, MD
Heinrich Heine University of Dueseldorf
Germany

Simon C. Robson, MD, PhD
Harvard Medical School, Boston, MA

Johannes G. Bode, MD
Andreas Krieg, MD
Stefan A. Topp, MD
Dieter Haussinger, MD, PhD
Heinrich Heine University of Dueseldorf
Germany

Wolfram T. Knoefel, MD
Heinrich Heine University of Hamburg,
Germany

REFERENCES

1. Schulte am Esch J, Schmelzle M, Duhme C, et al. Infusion of CD133+ bone marrow-derived stem cell after selective portal vein embolization enhances functional hepatic reserves after extended right hepatectomy. *Ann Surg.* 2012;255:79–85.
2. Schulte am Esch J II, Knoefel WT, Klein M, et al. Portal application of autologous CD133+ bone marrow cells to the liver: a novel concept to support hepatic regeneration. *Stem Cells.* 2009;23:463–470.
3. Knoefel WT, Gabor I, Rehders A, et al. In situ liver transection with portal vein ligation for rapid growth of the future liver remnant in two-stage liver resection. *Br J Surg.* 2013;100:388–394.
4. Schmelzle M, Duhme C, Junger W, et al. CD39 modulates hematopoietic stem cell recruitment and promotes liver regeneration in mice and humans after partial hepatectomy. *Ann Surg.* 2013;257:693–701.
5. Valfé A, Bonzo L, Ferrero I, Cavanza C, et al. Human mesenchymal stem cells as a two-edged sword in hepatic regenerative medicine: engraftment and hepatocyte differentiation versus profibrogenic potential. *Gut.* 2008;57:223–231.
6. Forbes SJ. Stem cell therapy for chronic liver disease—choosing the right tools for the job. *Gut.* 2008;57:153–155.
7. Broering DC, Hillert C, Krupicki G, et al. Portal vein embolization vs. portal vein ligation for induction of hypertrophy of the future liver remnant. *J Gastroint Surg.* 2002;6:905–913.

ANNEXE 4

Digestive Disease and Science. 2014 59:2030-2031 (Editorial)

Ischemia-reperfusion injury and regrowth of liver cancers: to clamp or not to clamp?

Lim C, Azoulay D.

Ischemia–Reperfusion Injury and Regrowth of Liver Cancers: To Clamp or Not to Clamp?

Chetana Lim · Daniel Azoulay

Published online: 27 July 2014
© Springer Science+Business Media New York 2014

Although resection remains the only potentially curative treatment for most patients with primary and secondary liver malignancies, the large majority of patients will experience recurrence. Factors reported to adversely affect the risk of local recurrence after surgery include tumor biology as well as surgical factors such as blood loss and transfusion during surgery. In this issue of *Digestive Diseases & Sciences*, Orzi et al. [1] discuss the relationship between hepatic ischemia–reperfusion injury and cancer recurrence. The authors have to be commended for their thoughtful analysis of the available data regarding this unresolved question.

Hepatic ischemia–reperfusion injury is an important cause of liver damage occurring during liver resection [2, 3] and during liver transplantation [4]. During liver surgery, hepatic pedicle clamping (the so-called Pringle Maneuver) efficiently reduces bleeding and transfusion during hepatic transection; intermittent occlusion of the inflow pedicle with intervals of reperfusion reduces this ischemia–reperfusion injury and the consequences of splanchnic congestion and therefore decreases injury to the liver parenchyma. In liver transplantation, the liver graft is particularly exposed to ischemia–reperfusion injury as a result of damage during organ procurement and frequent hemodynamic instability, preservation under cold ischemia, and graft reperfusion with a phase of warm ischemia between portal and arterial reperfusion.

It has been suggested, despite the lack of robust evidence, that ischemia–reperfusion per se is pro-tumorigenic. Although the exact mechanisms are still unclear, this might occur either through an upregulation of hypoxia-induced growth factors and cytokines, angiogenic factors, or inflammation [5, 6]. Moreover, the presence of underlying hepatic parenchymal injury such as steatosis might increase susceptibility of the liver to ischemia–reperfusion injury [7]. In this review, the authors present experimental and clinical data, indicating that hepatic ischemia–reperfusion injury increases the rate of cancer cell proliferation, analyzes how the ischemia process might promote tumor growth, and discusses a number of strategies to limit the negative effects of these injuries. The authors clearly state that extrapolation of data obtained from the rodent models described in this review should be applied cautiously to the results of clinical studies due to the numerous biases inherent to retrospective series, as well as the limited number of patients studied.

Although the review is well written and balanced, it will likely raise several questions, since it is not a systematic review of the literature, but rather a narrative evaluation. Thus, some articles might have been omitted, especially those reporting negative results [8]. Since most of the studies focused on liver metastases from colorectal primaries and on hepatocellular carcinoma, there is concern that the underlying liver parenchymal injury was independently correlated with recurrence in several studies, suggesting the influence of potential confounders, such as cirrhosis or metabolic syndrome [9].

Although we agree that animal models provide strong data regarding the impact of liver clamping (and ischemia–reperfusion) on the risks of recurrence, the heterogeneity in experimental study design combined with wide variations among experimental surgical procedures (e.g., duration of

C. Lim · D. Azoulay (✉)
Service Chirurgie Digestive, Hépatobilio-Pancréatique et
Transplantation Hépatique, Hôpital Henri Mondor, Assistance
Publique Hôpitaux de Paris (AP-HP), 51 Avenue De Laette
De Tassigny, 94010 Créteil, France
e-mail: daniel.azoulay@hmn.aphp.fr

clamping, species) could adversely affect the interpretability of the data obtained.

Interestingly, several recent findings might add new insights to the issue. Our group has reported in a mouse model of colorectal liver metastases that hepatic ischemia-reperfusion injury mobilized bone marrow-derived progenitor cells, making the liver tissue microenvironment more pro-angiogenic, which subsequently enhanced colorectal cancer cell engraftment and metastasis growth [10]. It is conceivable that all of these bone marrow-derived progenitor cells may participate in angiogenesis and vasculogenesis in tumors that recur after surgery, a supposition that can be tested experimentally.

In the clinic, the question still remains as to whether routine Pringle maneuver is justified. In our opinion to clamp or not to clamp systematically is not the right question: Surgeons must adapt to the situation in the operating room and clamp when needed relying on the old surgical adage “better clamping than bleeding.”

Conflict of interest None.

References

1. Orci LA, Lacotte S, Oldani G, et al. The role of hepatic ischemia-reperfusion injury and liver parenchymal quality on cancer recurrence. *Dig Dis Sci*. 2014. doi:10.1007/s10620-014-3182-7.
2. Azoulay D, Del Gaudio M, Andreani P, et al. Effects of 10 minutes of ischemic preconditioning of the cadaveric liver on the graft's preservation and function: the ying and the yang. *Ann Surg*. 2005;242:133–139.
3. Azoulay D, Lucidi V, Andreani P, et al. Ischemic preconditioning for major liver resection under vascular exclusion of the liver preserving the caval flow: a randomized prospective study. *J Am Coll Surg*. 2006;202:203–211.
4. Zhai Y, Petrowsky H, Hong JC, et al. Ischaemia-reperfusion injury in liver transplantation—from bench to bedside. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2012;10:79–89.
5. Tamagawa K, Horiuchi T, Uchinami M, et al. Hepatic ischemia-reperfusion increases vascular endothelial growth factor and cancer growth in rats. *J Surg Res*. 2008;148:158–163.
6. van der Bilt JD, Soeters ME, Duyverman AM, et al. Perinecrotic hypoxia contributes to ischemia/reperfusion accelerated outgrowth of colorectal micrometastases. *Am J Pathol*. 2007;170:1379–1388.
7. Chu MJ, Hickey AJ, Phillips AR, Bartlett AS. The impact of hepatic steatosis on hepatic ischemia-reperfusion injury in experimental studies: a systematic review. *Biomol Res Int*. 2013;2013:192029.
8. Weiss MJ, Ito H, Araujo RL, et al. Hepatic pedicle clamping during hepatic resection for colorectal liver metastases: no impact on survival or hepatic recurrence. *Ann Surg Oncol*. 2012;20:285–294.
9. Cauchy F, Zalinski S, Dokmak S, et al. Surgical treatment of hepatocellular carcinoma associated with the metabolic syndrome. *Br J Surg*. 2012;100:113–121.
10. Lin C, Broqueres-You D, Brouland JP, et al. Hepatic ischemia-reperfusion increases circulating bone marrow-derived progenitor cells and tumor growth in a mouse model of colorectal liver metastases. *J Surg Res*. 2013;184:888–897.