



**HAL**  
open science

# L'embolisation portale résorbable répétée : stimulus de la régénération hépatique

Martin Gaillard

► **To cite this version:**

Martin Gaillard. L'embolisation portale résorbable répétée : stimulus de la régénération hépatique. Chirurgie. Université Paris Saclay (COmUE), 2019. Français. NNT : 2019SACLS512 . tel-02724800

**HAL Id: tel-02724800**

**<https://theses.hal.science/tel-02724800v1>**

Submitted on 2 Jun 2020

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

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

# L'embolisation portale résorbable répétée : stimulus de la régénération hépatique

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay  
préparée à l'Université Paris-Sud

École doctorale n°569 Innovation thérapeutique : du fondamental à  
l'appliqué (ITFA)  
Spécialité de doctorat: Sciences chirurgicales

Thèse présentée et soutenue à Clamart, le 10 décembre 2019, par

**M. Martin Gaillard**

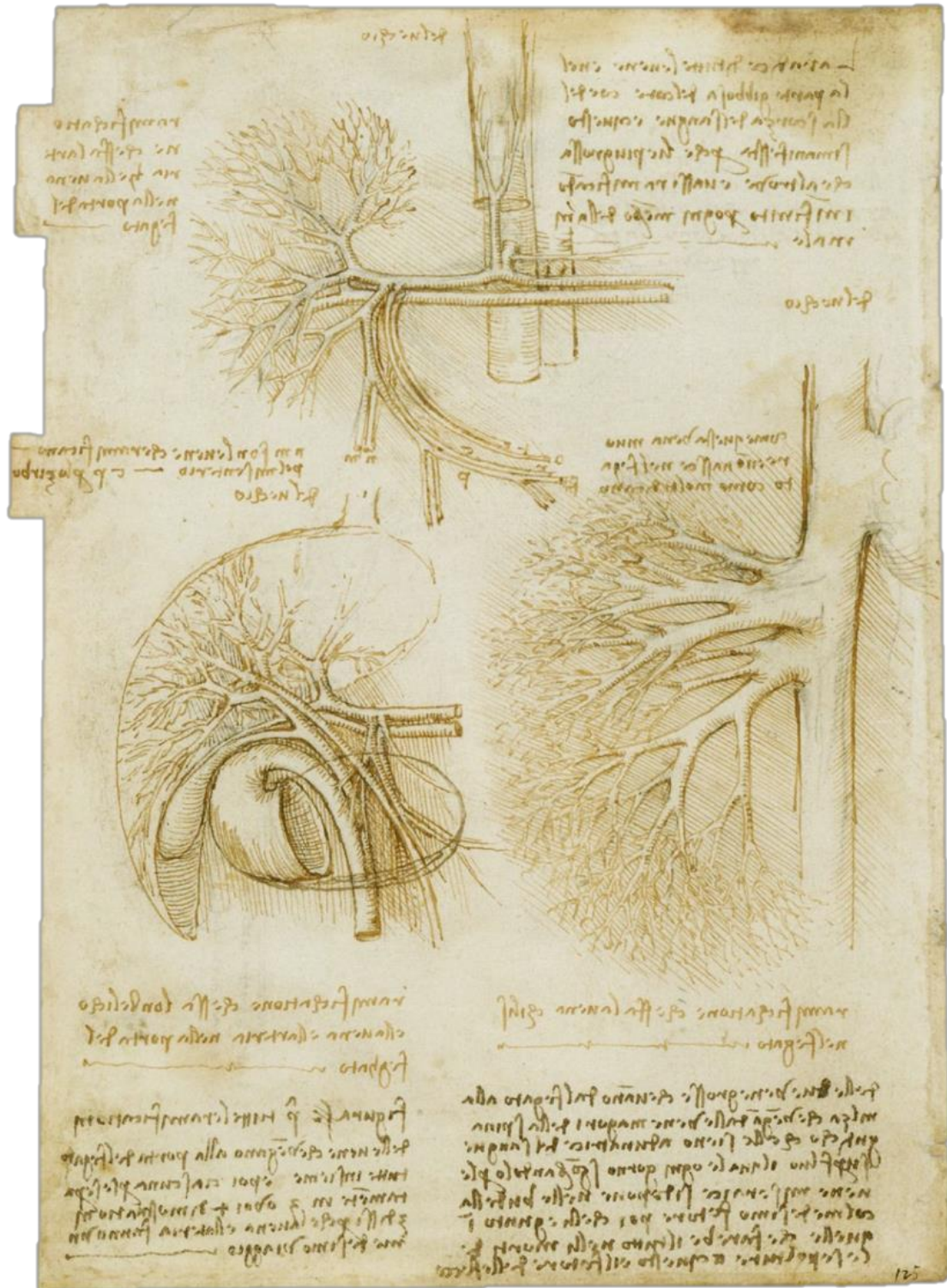
Composition du Jury :

|   |                       |
|---|-----------------------|
| M. Gabriel Perlemuter<br>Professeur, Université Paris Saclay      | Président             |
| M. David Fuks<br>Professeur, Université Paris Descartes           | Rapporteur            |
| M. Maxime Ronot<br>Professeur, Université Paris Diderot           | Rapporteur            |
| M. Thomas Lilin<br>Docteur, Université Paris Est                  | Examineur             |
| M. Ibrahim Dagher<br>Professeur, Université Paris Saclay          | Directeur de thèse    |
| Mme Anne Dubart-Kupperschmitt<br>Docteur, Université Paris Saclay | Co-Directeur de thèse |

Co-encadrement :

M. Hadrien Tranchart  
Docteur, Université Paris Saclay





Les vaisseaux du foie, planche anatomique par Léonard de Vinci, c. 1508

## Foye

Partie noble de l'animal où on prétend que se fait la sanguification, qui est le principe & la source des veines, dont ensuite se fait la distribution par tout le corps. Il est situé en l'hypocondre droit sous le diaphragme & les fausses costes. Sa substance est continuë, quoy qu'Hippocrate le divise en cinq lobes ; ce qui ne se trouve vray qu'aux bestes à quatre pieds. Sa chair ressemble à du sang figé ou caillé, ou rosti par la chaleur : ce qui a fait qu'Erastistrate le premier l'a appelé *Parenchyme*, c'est à dire, *Effusion* ou *amas de sang*. C'est du *foye* que sort le sang qui entre dans les grands vaisseaux de la veine porte & de la veine cave. Platon a creu que c'estoit le principe de l'amour : d'où est venu ce mot Latin, *Cogit amare jecur* ; & on tient que les poltrons & les goulus l'ont plus grand que les autres. Sa figure est ronde du costé droit, mais du costé gauche il s'amenuise & aboutit presque en angle aigu. Sa partie de dessous est cave ou creuse ; mais la superieure, qu'on appelle sa teste, est gibbeuse, polie & ronde comme une voute : ce qui fait que les Grecs l'ont appelé *hepar*, c'est à dire, *suspendu & vouté*. Les Latins l'ont appelé *jecur*, comme qui diroit, *juxta cor*, c'est à dire, *auprés de l'estomac*, que les Anciens appelloient *coeur* : & les François l'appellent *foye*, parce que, comme dit du Laurens, c'est le foyer ou la cuisine où se cuit & se prepare le sang.

## REMERCIEMENTS

En premier lieu, je tiens à remercier le directeur de cette thèse, le **Professeur Ibrahim Dagher**, pour m'avoir guidé dans ces travaux de recherche et m'avoir fait confiance en m'intégrant dans son équipe. Je mesure chaque jour la chance que j'ai de travailler à vos côtés et je suis honoré et fier d'être votre élève.

Je tiens également à remercier le **Docteur Anne Dubart-Kupperschmitt**, qui a codirigé ces travaux, m'a accueilli avec bienveillance et attention dans son laboratoire. Je te suis très reconnaissant de m'avoir donné le goût de la recherche scientifique, que je compte bien continuer à cultiver dans le futur.

Ma gratitude va également au **Professeur Gabriel Perlemuter**, qui m'a fait l'honneur de présider le jury de la soutenance de cette thèse, au **Professeur David Fuks** et au **Professeur Maxime Ronot**, qui me font l'honneur d'être les rapporteurs de cette thèse, ainsi qu'au **Docteur Thomas Lilin**, qui est l'examineur de cette thèse et nous a accompagné dans nos expérimentations chez le porc. Je vous remercie très sincèrement.

Une mention spéciale va au **Docteur Hadrien Tranchart**, pour le vrai compagnonnage qu'il m'a offert non seulement au laboratoire, mais également à l'hôpital et à la faculté. C'est une joie quotidienne de travailler avec toi et de partager ton amitié. Je te remercie du fond du cœur.

Je remercie également chaleureusement le **Docteur Panagiotis Lainas** et le **Docteur Carmelisa Dammaro**, qui m'ont épaulé au cours de cette thèse dans notre vie hospitalière. J'ai de la chance de compter parmi vos amis.

Je remercie ceux qui, par leur expertise ou leur aide à la paille ou à l'animalerie, ont participé aux différents projets de ce travail de thèse. Je pense ici aux équipes des unités INSERM U972 puis U1193 et particulièrement le **Professeur Emmanuel Hornez** avec qui nous avons travaillé chez le porc, le **Docteur Marcellin Koffi** dont j'ai poursuivi les travaux chez le rat, mes co-thésards les **Docteurs Clara Steichen, Jérôme Caron** et **Eleanor Luce**, le **Professeur**

**Jean-Jacques Candelier** avec qui j'ai partagé bien plus qu'un bureau. Je tiens à remercier également le **Docteur Tuan Huy Nguyen** de l'unité INSERM U1064 à Nantes pour ses conseils sur la transplantation d'hépatocytes, le **Docteur Olivier Trassard** de l'Institut Biomédical de Bicêtre pour son aide précieuse lors des séances aux microscope, le **Docteur Sophie Maitre** du service de Radiologie à l'hôpital Antoine Béclère pour ses recommandations sur l'embolisation portale, le **Docteur Hélène Mammeri** du service de Biochimie-Hormonologie à l'hôpital Antoine Béclère pour son aide sur les dosages biochimiques, au **Docteur Séverine Rémy** pour sa participation au projet de transplantation d'hépatocytes chez le rat. Merci également aux équipes des différents plateaux techniques qui nous ont accueillis, toujours avec gentillesse : l'animalerie de l'Institut André Lwoff de l'INSERM, la plateforme d'Imageries du Vivant de l'Université Paris Descartes, le centre de recherche biomédical de l'Ecole National Vétérinaire d'Alfort et particulièrement à **Benoit Lecuelle** pour sa compétence et sa bonne humeur au cours des expérimentations chez le porc.

Je souhaite enfin remercier ma famille pour leur soutien indéfectible : ma femme **Rhéa** et ma fille **Izïa**, mes parents **Hélène** et **Jean-Louis**, ma sœur **Juliette**.

**TABLE DES MATIERES**

|  |           |
|--|-----------|
| <b>PREMIERE PARTIE : INTRODUCTION</b>  | <b>17</b> |
| Chapitre 1 - Régénération hépatique et Applications thérapeutiques                             | 19        |
| 1.1 Mécanismes d'hypertrophie hépatique  | 21        |
| 1.1.1 Augmentation de la pression portale  | 21        |
| 1.1.2 Phase d'induction de la régénération   | 21        |
| 1.1.3 Phase de progression ou de prolifération   | 22        |
| 1.1.4 Phase d'arrêt de la régénération   | 23        |
| 1.2 Chirurgie hépatique et insuffisance hépatique postopératoire                               | 23        |
| 1.2.1 Conséquences des hépatectomies   | 23        |
| 1.2.2 Prédiction du risque d'insuffisance hépatique postopératoire                             | 24        |
| 1.2.2.1 Tests biologiques  | 24        |
| 1.2.2.2 Volumétrie hépatique   | 25        |
| 1.2.2.3 Différences entre volume et fonction   | 25        |
| 1.2.3 Stratégies d'hypertrophie du FFR   | 27        |
| 1.2.3.1 Obstruction (ligature ou embolisation) portale   | 27        |
| 1.2.3.2 Embolisation de la veine hépatique   | 30        |
| 1.2.3.3 Bipartition hépatique associée à la ligature portale pour<br>hépatectomie (dite ALPPS) | 31        |
| 1.2.4 Faisabilité du deuxième temps  | 32        |
| 1.3 Amélioration de la prise de greffe au cours de la transplantation d'hépatocytes            | 34        |
| 1.3.1 Maladies métaboliques héréditaires hépatiques  | 34        |
| 1.3.2 Transplantation d'hépatocytes  | 35        |
| 1.3.3 Méthodes d'amélioration de la prise de greffe hépatocytaire                              | 36        |
| 1.3.3.1 Modèles comportant une lésion hépatique  | 37        |
| 1.3.3.2 Modèles génétiquement modifiés   | 37        |



|  |    |
|--|----|
| 1.3.3.3 Modèles de régénération hépatique                              | 38 |
| 1.3.3.3.1 Hépatectomie majeure   | 38 |
| 1.3.3.3.2 Ligature portale partielle                                   | 38 |
| 1.3.3.3.3 Embolisation portale partielle                               | 39 |
| 1.3.3.3.4 Embolisation volumétrique                                    | 39 |
| <br>   |    |
| Chapitre 2 - Embolisation portale partielle                            | 43 |
| <br>   |    |
| 2.1 Embolisation portale partielle (définitive)                        | 44 |
| 2.1.1 Intérêt de l'EPP en chirurgie hépatique                          | 44 |
| 2.1.1.1 Accès au système porte   | 44 |
| 2.1.1.2 Procédure et agents d'embolisation non résorbables             | 45 |
| 2.1.1.3 Intérêt de l'embolisation du segment IV                        | 47 |
| 2.1.1.4 Tolérance et complications                                     | 47 |
| 2.1.2 Intérêt de l'EPP au cours de la transplantation d'hépatocytes    | 49 |
| 2.1.2.1 Etude de l'amélioration de la prise de greffe hépatocytaire    | 49 |
| 2.1.2.2 Etude de l'efficacité métabolique                              | 50 |
| <br>   |    |
| 2.2 Embolisation portale partielle résorbable                          | 53 |
| 2.2.1 Intérêt de l'EPPR en chirurgie hépatique                         | 53 |
| 2.2.1.1 Résultats de l'EPPR chez l'animal                              | 54 |
| 2.2.1.2 Résultats de l'EPPR chez l'homme                               | 58 |
| 2.2.1.3 Intérêt de l'EPPR pour les procédures d'embolisation complexes | 60 |
| 2.2.2 Intérêt de l'EPPR pour de la transplantation d'hépatocytes       | 61 |
| <br>   |    |
| 2.3 Embolisation portale partielle résorbable répétée                  | 63 |
| 2.3.1 Intérêt de l'EPPRR en chirurgie hépatique                        | 63 |
| 2.3.2 Intérêt de l'EPPRR en transplantation hépatique à donneur vivant | 64 |
| 2.3.3 Intérêt de l'EPPRR pour la transplantation d'hépatocytes         | 65 |

|   |            |
|---|------------|
| <u>DEUXIÈME PARTIE : RÉSULTATS</u>  | <u>73</u>  |
| <i>Liver regeneration following repeated reversible portal vein embolization in an experimental model</i>                               | 75         |
| <i>Minimally invasive liver preconditioning for hepatocyte transplantation</i>  | 93         |
| <i>Improving hepatocyte engraftment following hepatocyte transplantation using repeated reversible portal vein embolization in rats</i> | 107        |
| <i>Liver regeneration and recanalization time-course following repeated reversible portal vein embolization in swine</i>                | 125        |
| <u>TROISIEME PARTIE : DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES</u>   | <u>157</u> |
| <u>QUATRIEME PARTIE : CONCLUSION GENERALE</u>   | <u>163</u> |
| <u>BIBLIOGRAPHIE</u>  | <u>165</u> |
| <u>ANNEXES</u>  | <u>177</u> |

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ALPPS : associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy

CT : computed tomography

EGF : epidermal growth factor

EGF-R : epidermal growth factor receptor

ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay

EPP : embolisation portale partielle

EPPR : embolisation portale partielle résorbable

EPPRR : embolisation portale partielle résorbable répétée

FFR : futur foie restant

GFP : green fluorescent protein

HGF : hepatocyte growth factor

IL-6 : interleukine 6

iPSC : induced pluripotent stem cells

LDL : low density lipoprotein

LPP : ligature portale partielle

MMHH : maladies métaboliques héréditaires hépatiques

qPCR : quantitative polymerase chain reaction

SLIT : suspension with a lentiviral vector and immediate transplantation

SPECT : single-photon emission computed tomography

TGF- $\alpha$  : transforming growth factor  $\alpha$

TGF- $\beta$  : transforming growth factor  $\beta$

THDV : transplantation hépatique à donneur vivant

The : transplantation d'hépatocytes

TNF- $\alpha$  : tumor necrosis factor  $\alpha$

TP : temps de prothrombine

UGT1A1 : UDP-glucuronosyl-transférase 1A1

VHR : volume hépatique résiduel

VHT : volume hépatique total

## LISTE DES FIGURES

**Figure 1** Les phases du cycle cellulaire au cours de la régénération hépatique

**Figure 2** Evaluation de la fonction hépatique par scintigraphie à la 99mTc-mébrofénine

**Figure 3** Description du principe d'hépatectomie en deux temps avec ligature portale partielle pour résection complète d'une tumeur gastro-intestinale associée à des métastases hépatiques bilobaires

**Figure 4** Description de la technique d'hépatectomie majeure après embolisation portale partielle pour résection d'une tumeur hépatique

**Figure 5** Description de la technique d'ALPPS (associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy) pour résection d'une tumeur hépatique

**Figure 6** Procédure d'autotransplantation d'hépatocytes corrigés *ex vivo* par transduction à l'aide d'un vecteur viral

**Figure 7** Etapes de la procédure d'embolisation portale

**Figure 8** Effet de l'embolisation portale sur la prise de greffe hépatocytaire

**Figure 9** Etude de l'efficacité métabolique chez le lapin Watanabe

**Figure 10** Profil lipidique des lapins Watanabe après THE transduits

**Figure 11** Tolérance de la procédure d'EPPR chez le macaque

**Figure 12** Reperméabilisation des branches portales après EPPR chez le macaque

**Figure 13** Impact de l'EPPR sur la prolifération hépatocytaire et la régénération hépatique

**Figure 14** Portographies avant et immédiatement après embolisation résorbable de la branche portale droite

**Figure 15** Reconstructions 3D de scanners réalisés avant et après embolisation résorbable

**Figure 16** Prise de greffe à court terme (J14) après EPPR et The

**Figure 17** Intérêt de l'EPPRR au cours de la The chez le rat

**Figure 18** Perfusion de foie de rat



**AVANT-PROPOS**

Les maladies métaboliques héréditaires hépatiques sont des maladies caractérisées par une déficience partielle ou complète d'une enzyme ou d'une protéine du foie. Les autres fonctions hépatiques ainsi que la structure du foie restent initialement conservées. La transplantation hépatique, seul traitement curatif actuellement disponible, est limitée par une pénurie de greffons, des complications chirurgicales spécifiques, et un traitement immunosuppresseur à vie.

La transplantation d'hépatocytes est une thérapie innovante qui pourrait représenter une alternative, moins agressive, à la transplantation hépatique pour la prise en charge des MMHH. Les résultats des essais cliniques de transplantation d'hépatocytes réalisés jusque-là ont montré une correction faible et/ou temporaire du déficit métabolique, et la transplantation hépatique n'a pu être évitée. Une des principales limites des approches de transplantation d'hépatocytes est la faible prise de greffe hépatocytaire. Lors d'une conférence sur la transplantation d'hépatocytes tenue à Londres en 2009, les experts ont insisté sur la nécessité de promouvoir des méthodes applicables en clinique pour améliorer le repeuplement du foie par les hépatocytes thérapeutiques<sup>1</sup>.

Ainsi, notre équipe au laboratoire s'attache depuis plusieurs années au développement de méthodes minimales invasives, particulièrement l'embolisation portale partielle. Cette technique est utilisée en routine en pratique clinique avant hépatectomie majeure pour favoriser la croissance du foie restant afin de diminuer le risque d'insuffisance hépatique postopératoire. Un matériel d'embolisation non résorbable est généralement utilisé car il permet une occlusion vasculaire efficace et permanente. Cependant, dans le cadre de la transplantation d'hépatocytes où le foie embolisé n'est pas destiné à être réséqué, la réalisation d'une embolisation portale partielle temporaire à l'aide d'un matériel résorbable avait tout son sens. Cette technique d'embolisation portale partielle résorbable a donc été mise au point puis utilisée avec succès chez le primate non humain.

Puisque l'embolisation portale partielle résorbable induit une occlusion temporaire, nous avons alors envisagé la possibilité de procéder à une seconde embolisation après reperméabilisation des branches portales. Nous avons fait l'hypothèse qu'une embolisation



portale partielle résorbable répétée pourrait entraîner un stimulus de régénération supplémentaire. Cette technique pourrait avoir un intérêt dans le cadre de la transplantation d'hépatocytes, mais aussi pour la prise en charge des patients nécessitant une hépatectomie majeure, notamment en augmentant les possibilités d'embolisations préopératoires.

Les objectifs du travail de thèse rapporté ici ont été :

- d'évaluer chez le rat l'effet de la répétition du stimulus d'embolisation résorbable en termes de prolifération hépatocytaire et de régénération hépatique
- de mettre au point dans ce modèle un protocole de transplantation d'hépatocytes en association à une embolisation portale résorbable répétée pour améliorer la prise de greffe hépatocytaire
- d'étudier l'impact de l'embolisation portale partielle résorbable répétée sur la prise de greffe hépatocytaire après transplantation d'hépatocytes en comparaison avec une seule embolisation portale partielle résorbable chez le rat
- de démontrer la faisabilité et la tolérance de l'embolisation portale partielle résorbable répétée dans un modèle préclinique chez le porc



**INTRODUCTION**



## CHAPITRE 1

### REGENERATION HEPATIQUE ET APPLICATIONS THERAPEUTIQUES

Le foie est situé sur une position anatomique stratégique, à l'interface entre le tractus digestif et la circulation sanguine générale, ce qui lui permet d'assurer un très grand nombre de fonctions métaboliques et immunitaires. Ces fonctions l'exposent à des agressions variées, ce qui lui vaudrait d'avoir conservé au cours de l'évolution une exceptionnelle capacité de régénération. Les grecs anciens décrivaient déjà ce phénomène dans leur mythologie. Pour avoir dérobé le feu de l'Olympe, le Titan Prométhée fut condamné à être enchaîné sur le Mont Caucase pour y avoir chaque jour le foie dévoré par un aigle. Pendant la nuit, le foie régénérait, procurant à l'aigle une source perpétuelle de nourriture et à Prométhée, un éternel supplice. Des données expérimentales modernes sont venues conforter cette intuition antique. Chez le rongeur, après une hépatectomie partielle des deux tiers, la prolifération des hépatocytes du tiers restant du foie permet à ce dernier de recouvrer sa masse initiale en moins de deux semaines<sup>2</sup>. Il a également été possible de pratiquer plus de douze hépatectomies successives à un rat et d'observer une régénération hépatique complète entre chaque procédure<sup>3</sup>.

La chirurgie est le traitement de choix dans de nombreux cancers hépatiques, offrant la meilleure survie à long terme<sup>4</sup>. Les hépatectomies ont pour conséquences directes une diminution de la masse hépatique fonctionnelle et une réduction du territoire portal. Lorsque la résection est mineure, le retentissement biologique et hémodynamique est le plus souvent minime et sans conséquence clinique. Les résections majeures, en revanche, sont associées à l'apparition d'une hypertension portale et d'une insuffisance hépatique significatives, en particulier lorsqu'il existe une hépatopathie sous-jacente<sup>5,6</sup>. Afin de limiter l'hypertension portale et l'insuffisance hépatocellulaire postopératoires, il est possible de provoquer une atrophie préalable des segments que l'on souhaite réséquer<sup>7</sup>. Cette atrophie s'accompagne d'une hypertrophie compensatrice des segments que l'on souhaite conserver et donc d'une augmentation du volume de parenchyme du futur foie restant au décours de l'hépatectomie. Cette atrophie est provoquée par une interruption de la vascularisation portale, par analogie avec ce que l'on observe chez les patients ayant un cancer du hile envahissant les branches portales<sup>8</sup>.

### 1.1. Mécanismes d'hypertrophie hépatique

Dans les suites d'une résection hépatique (qu'elle soit mineure ou majeure), on observe une prolifération hépatocytaire et une hypertrophie du foie restant afin de revenir au volume total initial<sup>9,10</sup>. Après occlusion portale partielle, on observe progressivement une atrophie du territoire occlus et une hypertrophie du territoire controlatéral<sup>11</sup> avec conservation du volume total du foie.

Il est établi que la régénération mobilise un très grand nombre d'acteurs cellulaires et moléculaires. Ces interactions vont réguler la progression du cycle des différents types cellulaires présents dans le foie (hépatocytes, cellules endothéliales, cellules de Kupffer, lymphocytes, cellules stellaires), ainsi que la survie des hépatocytes exposés à de nombreux stress lors de la régénération. Cependant, l'ensemble des mécanismes de la régénération hépatique et de son arrêt ne sont pas connus à ce jour, qu'il s'agisse de la nature des signaux intercellulaires impliqués, de leur source et de leurs cibles<sup>9,12-18</sup>. Plusieurs phases successives ont été décrites.

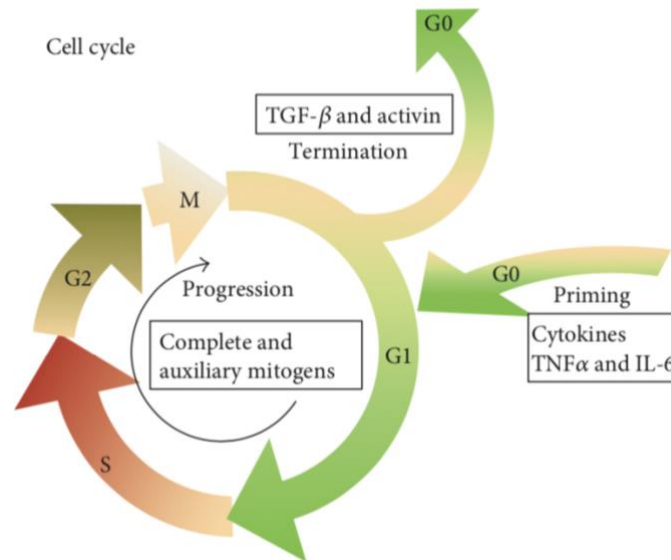
#### 1.1.1. Augmentation de la pression portale

Les mécanismes d'hypertrophie sont en partie liés à l'augmentation de la pression portale<sup>19</sup>. Une pression portale haute provoque des forces de cisaillement (« shear stress »), entraînant le déclenchement de la cascade inflammatoire<sup>20</sup>. Cette augmentation de la pression portale est liée à la redistribution du flux porte, mais également à l'augmentation de la pression des veines hépatiques ipsilatérales.

#### 1.1.2. Phase d'induction de la régénération

A l'état basal, les hépatocytes sont des cellules stables qui se divisent rarement, restant dans un état quiescent dans la phase G0 du cycle cellulaire<sup>17</sup>. Dans les minutes qui suivent l'apparition du stimulus hépatique (hépatectomie, occlusion portale...), l'induction de la régénération hépatique est engendrée par des phénomènes inflammatoires et déclenchée

par la libération de cytokines et de facteurs de croissance. Les cytokines pro-inflammatoires les plus étudiées sont le tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) et l'interleukine 6 (IL-6). Les cellules de Kupffer représentent la principale source de TNF- $\alpha$  et d'IL-6<sup>21-25</sup>. La phase d'induction se termine par l'entrée des hépatocytes dans le cycle cellulaire.



**Figure 1** Les phases du cycle cellulaire au cours de la régénération hépatique<sup>26</sup>.

### 1.1.3. Phase de progression ou de prolifération

Cette deuxième phase voit la conversion des hépatocytes de la phase G1 du cycle cellulaire à la mitose. Les molécules impliquées dans la prolifération hépatocytaire (identifiées par la culture *in vitro* d'hépatocytes primaires et par l'expérimentation chez l'animal) comprennent l'hépatocyte growth factor (HGF), le transforming growth factor  $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ), l'epidermal growth factor (EGF), et son récepteur (EGF-R)<sup>27</sup>. L'EGF initie le processus de réplication des hépatocytes et accentue l'action du TGF- $\alpha$  dont la production est induite par le TNF- $\alpha$ . L'EGF-R est présent sur tous les types cellulaires hépatiques et son nombre doublerait quelques heures après une hépatectomie<sup>28</sup>. L'HGF est principalement produit par les cellules de Ito mais également par les cellules de Kupffer, les cellules endothéliales et les plaquettes<sup>26,29</sup>.



#### 1.1.4. Phase d'arrêt de la régénération

Au cours de cette dernière phase, apparaît un arrêt de la prolifération associé à une apoptose compensatrice<sup>13,30</sup>. Les mécanismes contrôlant cette apoptose sont peu étudiés. Les principaux facteurs anti-prolifératifs identifiés sont le transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) et l'activine A<sup>31,32</sup>.

**En conclusion**, la régénération hépatique est un processus complexe, et de nombreuses zones d'ombre subsistent quant à la nature des signaux impliqués, leur source et leurs cibles. Elle est contrôlée par un ensemble de cytokines, facteurs de croissance et régulateurs métaboliques, qui contribuent à un vaste réseau d'interactions cellulaires impliquant tous les types cellulaires du foie ainsi que l'ensemble de l'organisme. Ces interactions vont réguler la progression du cycle des cellules hépatiques ainsi que la survie des hépatocytes exposés à de nombreux stress lors de la régénération.

### 1.2. Chirurgie hépatique et insuffisance hépatique postopératoire

#### 1.2.1. Conséquences des hépatectomies

Après hépatectomie, la prolifération hépatocytaire va tendre à reconstituer la masse hépatique totale<sup>9,10</sup> et à normaliser la fonction hépatique. La prolifération des hépatocytes commence au niveau des zones péri-portales pour s'étendre vers les zones centrolobulaires<sup>33</sup>. Chaque hépatocyte effectue en moyenne une à deux divisions puis chaque type de cellules non parenchymateuses entre à son tour en division<sup>17</sup>.

Il existe un pic de régénération pendant lequel un nombre maximal de cellules entrent en même temps en division. Chez la souris, le pic de division se situe 48 heures après l'hépatectomie<sup>34,35</sup>, alors que chez le rat ce pic se situe environ à 24 heures<sup>36</sup>. Chez l'homme, le pic de prolifération est probablement plus tardif mais il n'est pas clairement établi. Après une hépatectomie majeure (chez un patient présentant un foie sain) la régénération

hépatique permet d'atteindre à 7 jours, 1 mois et 1 an de l'intervention chirurgicale 64%, 71% et 85% du volume du foie total pré-opératoire<sup>37</sup>.

La capacité de régénération du foie n'est cependant pas sans limite. Il existe un risque d'insuffisance hépatique postopératoire pouvant mener au décès du patient. L'insuffisance hépatique postopératoire est définie par la détérioration de la capacité du foie à assurer ses fonctions de synthèse, d'excrétion et de détoxification. Cette détérioration peut être transitoire et récupérer lorsque le foie a régénéré et son volume augmenté. Dans d'autres cas, elle peut se poursuivre jusqu'au décès du patient. Lorsque l'insuffisance hépatique postopératoire est sévère, le taux de mortalité est estimé à 54%<sup>38</sup>. Après la résection, la fonction hépatique peut être suivie à l'aide du taux de prothrombine (TP) et de la bilirubinémie. Il a été évalué que 5 jours après l'intervention, un TP inférieur à 50% et une bilirubinémie supérieure à 50 µmol/L étaient corrélés à un risque de décès postopératoire supérieur à 50%<sup>39</sup>.

Le risque d'insuffisance hépatique postopératoire dépend du volume du futur foie restant (FFR) mais est aussi fortement influencé par le caractère pathologique du parenchyme hépatique sous-jacent (stéatose, cholestase, inflammation, fibrose), l'âge du patient, l'incidence d'un saignement peropératoire important, la nécessité d'une transfusion allogénique ou l'apparition d'un sepsis postopératoire<sup>40-42</sup>.

Il est donc essentiel, particulièrement avant hépatectomie majeure et a fortiori en cas de parenchyme pathologique, d'évaluer le risque d'insuffisance hépatique engendré par la résection.

### 1.2.2. Prédiction du risque d'insuffisance hépatique post opératoire

#### 1.2.2.1. Tests biologiques

Les tests biologiques sanguins standards ont été les premiers à être développés, et restent les plus utilisés dans la détermination de la fonction hépatique. Les scores composites, tels que les scores Child-Pugh<sup>43</sup> et le Model for End-stage Liver Disease (MELD)<sup>44</sup>, peuvent être utilisés

pour quantifier le risque d'insuffisance hépatique après hépatectomie. Dans les pays asiatiques, la clairance du vert d'indocyanine est un test quantitatif largement utilisé chez les patients devant subir une hépatectomie majeure (ou hépatectomie mineure sur hépatopathie)<sup>45</sup>. La limite principale de ces tests est de ne pouvoir évaluer que la fonction hépatique du foie en place, et non la fonction hépatique du FFR.

#### 1.2.2.2. Volumétrie hépatique

En pratique clinique, l'évaluation est aujourd'hui basée sur l'analyse de la volumétrie hépatique à partir d'un scanner préopératoire<sup>46</sup>. Celle-ci permet de mesurer le volume hépatique total (VHT) et le volume hépatique résiduel (VHR) du FFR après résection. La méthode la plus utilisée pour prédire le risque d'insuffisance hépatique postopératoire après une hépatectomie majeure (en particulier chez les patients présentant une hépatopathie chronique préexistante) est le calcul du rapport VHR/VHT.

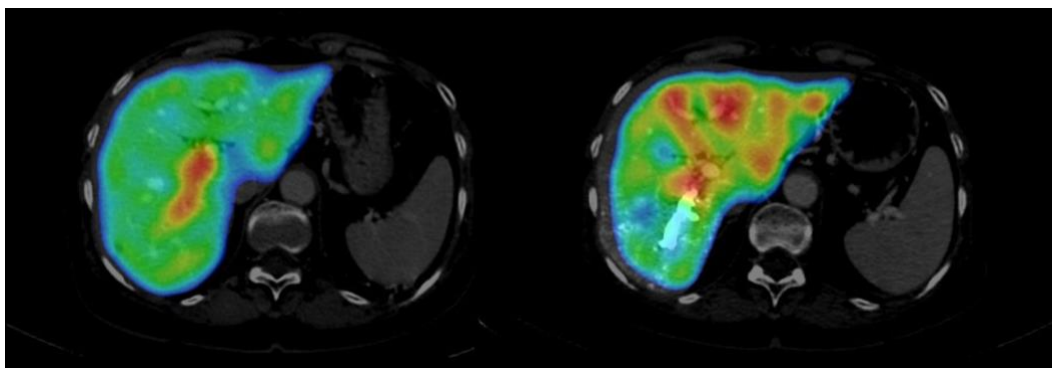
On estime que ce rapport doit être d'au moins 20% pour les foies non pathologiques et d'au moins 40% pour les foies cirrhotiques<sup>47</sup>. La présence d'une stéatose hépatique, voire d'une stéato-hépatite, altère également la capacité de régénération du foie et implique d'augmenter le seuil de volume de FFR entre 30 et 40 % du foie total<sup>48</sup>. Les drogues de chimiothérapie peuvent avoir une toxicité propre sur le parenchyme hépatique sous forme de stéatose ou stéato-hépatite induite (*chemotherapy-associated steato-hepatitis* ou CASH) et/ou d'atteintes vasculaires du foie comme le syndrome d'obstruction sinusoidale lié à l'oxaliplatine (« blue liver »). Pour limiter le risque d'insuffisance hépatique postopératoire, ces lésions nécessitent également d'augmenter le seuil acceptable de volume de FFR à 30–40 % du foie total<sup>48,49</sup>. Une autre méthode consiste à rapporter le VHR au poids corporel. Un rapport supérieur à 0,5% serait plus spécifique que le rapport VHR/VHT pour prédire le risque d'insuffisance hépatique et de mortalité postopératoire<sup>50</sup>.

#### 1.2.2.3. Différence entre volume et fonction

Si la volumétrie est la méthode la plus utilisée pour prédire l'insuffisance hépatique postopératoire, la corrélation entre le volume du FFR et sa fonction prévisible reste sujet à

débat<sup>51</sup>, particulièrement en cas de foie pathologique. De fait, après hépatectomie, les hépatocytes quiescents entrent en mitose. Les hépatocytes divisés ne sont cependant pas fonctionnels, ayant une faible zone de contact sinusoidale et n'étant pas encore intégrés dans l'architecture finale du foie<sup>30</sup>. Ce n'est seulement qu'à partir du 4<sup>ème</sup> jour que les cellules stellaires de Ito produisent une matrice extracellulaire permettant de rétablir la connexion indispensable entre les hépatocytes et les cellules endothéliales<sup>18,52</sup>. L'hypertrophie résulte principalement d'une prolifération d'hépatocytes immatures au début de la régénération hépatocellulaire, et alors même qu'est apparue l'hypertrophie du FFR, les hépatocytes divisés ne sont pas capables d'assurer leur fonction. Ainsi, l'évaluation volumétrique du FFR pourrait ne pas révéler réellement sa réserve fonctionnelle.

L'étude de la fonction du FFR serait un outil plus pertinent pour prédire le risque d'insuffisance hépatique postopératoire. L'apport des techniques de médecine nucléaire permet aujourd'hui de mesurer la fonction de tout ou partie du foie grâce à la scintigraphie hépatobiliaire à la 99mTc-mébrofénine (Cholediam®)<sup>53</sup>. Ce traceur est capté par l'hépatocyte et excrété dans la bile, ce qui permet une évaluation chiffrée de la fonction hépatique grâce à une acquisition de type SPECT/CT. Il a été démontré que l'augmentation de la fonction du FFR survient avant celle de son volume et que fonction et volume du FFR sont mal corrélés après embolisation portale<sup>54</sup>. Cette technique réalisable en routine devrait s'imposer dans le futur et remplacer les évaluations volumétriques.



**Figure 2** Evaluation de la fonction hépatique par scintigraphie à la 99mTc-mébrofénine<sup>55</sup>  
Images de SPECT/CT avant (à gauche) et 3 semaines après (à droite) embolisation portale droite montrant une augmentation de la fonction du foie gauche.

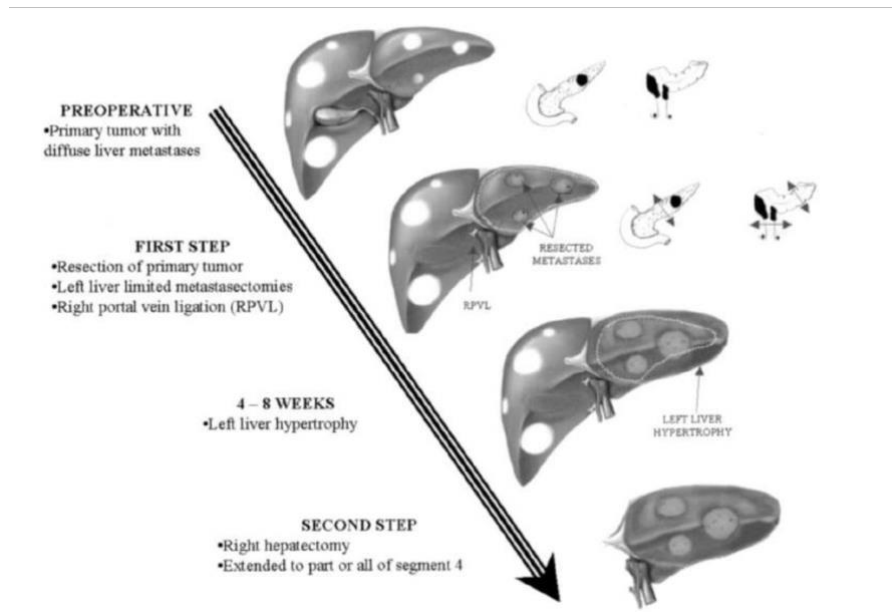
### 1.2.3. Stratégies d'hypertrophie du FFR

#### 1.2.3.1. Obstruction (ligature ou embolisation) portale

L'occlusion partielle de la veine porte avant résection hépatique majeure est devenue un standard lorsque le volume du FFR est insuffisant et contre-indique le geste chirurgical. Elle permet de préparer le foie à la future hépatectomie<sup>56,57</sup>. Diverses techniques ont été rapportées pour améliorer la tolérance et l'efficacité de cette procédure.

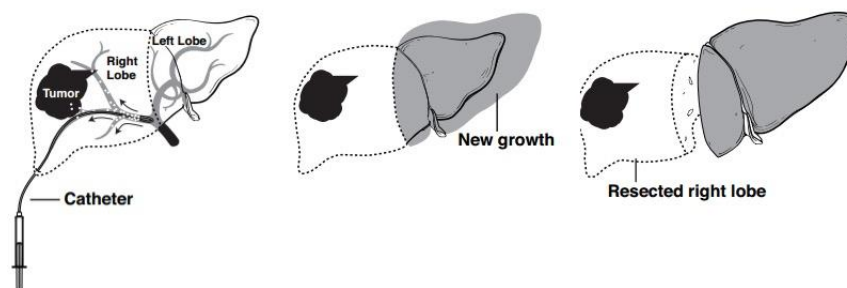
De manière similaire à la résection hépatique, cette obstruction entraîne des modifications hémodynamiques et la sécrétion de nombreux médiateurs, résultant en une atrophie du foie secondairement réséqué et une hypertrophie du FFR<sup>58</sup>.

La capacité régénératrice du foie suite à l'occlusion de la veine porte a été démontrée pour la première fois dans les années 1920 chez le lapin<sup>59</sup>. La ligature partielle de la veine porte (LPP) chirurgicale a ensuite été transposée à l'homme dans les années 1960, dans le cadre d'une résection hépatique étendue en deux temps en raison de tumeurs bilatérales. Cette ligature doit être réalisée sous anesthésie générale, par laparotomie ou par laparoscopie<sup>60</sup>, après dissection du pédicule hépatique. Cette approche est particulièrement intéressante lorsqu'une première intervention est envisagée avant l'hépatectomie majeure, par exemple la résection d'une tumeur colique ou une ou plusieurs résections mineures controlatérales. Dans ce cas, la première intervention comporte la résection de la tumeur primitive et/ou l'exérèse des métastases (par des résections mineures) dans un des lobes du foie ainsi qu'une LPP concernant le foie controlatéral. Après hypertrophie du FFR, on réalisera l'hépatectomie majeure au cours d'une seconde intervention.



**Figure 3** Description du principe d'hépatectomie en deux temps avec ligature portale partielle pour résection complète d'une tumeur gastro-intestinale associée à des métastases hépatiques bilobaires<sup>11</sup>.

La première embolisation portale partielle (EPP) radiologique préopératoire a été rapportée en 1986<sup>61</sup>. Techniquement, l'embolisation d'une branche de la veine porte (le plus souvent de la branche portale droite) peut être réalisée par voie percutanée radiologique ou par voie chirurgicale. L'EPP radiologique est réalisée par voie trans-hépatique percutanée. Bien qu'une anesthésie générale soit souvent nécessaire, l'EPP peut être réalisée sous anesthésie locale. L'EPP chirurgicale est pratiquée par laparotomie après cathétérisation d'une veine iléo-colique. Elle n'est plus utilisée à moins que l'EPP percutanée ne soit un échec.



**Figure 4** Description de la technique d'hépatectomie majeure après embolisation portale partielle pour résection d'une tumeur hépatique (d'après Memorial Sloan Kettering Cancer Center).

En pratique clinique, il a été montré que la régénération hépatique après obstruction définitive chez des patients non-cirrhotiques est composée d'une période précoce de régénération intense qui dure 3 semaines, suivie d'une période de stable augmentation (plateau) du volume résiduel fonctionnel hépatique<sup>62</sup>. Un scanner d'évaluation avec une volumétrie est généralement réalisé entre 4 et 8 semaines après cette obstruction. C'est sur la base de cet examen qu'est prise la décision d'une éventuelle intervention chirurgicale.

Les résultats concernant la meilleure méthode d'hypertrophie hépatique (EPP *versus* LPP) sont contradictoires. Certaines études ont suggéré que l'EPP entraînait une régénération hépatique supérieure à la LPP<sup>63,64</sup>. La principale explication serait une obstruction plus distale des branches portales au cours d'une embolisation, favorisant l'interruption des communications intra-hépatiques porto-portales. Le foie humain étant très peu lobulé, les communications intra-hépatiques sont importantes, ce qui le rend potentiellement plus sensible à une obstruction distale. Cependant, certaines études n'ont pas observé de différence en termes de régénération entre ces deux approches<sup>56,65-68</sup> et la question n'est pas clairement résolue.

Le taux de complications mineures après EPP ou LPP est d'environ 20%. Le taux de complications majeures (abcès hépatique, cholangite, thrombose du tronc porte ou thrombose portale controlatérale) est estimé à moins de 5%<sup>69</sup>.

L'objectif de ces procédures d'hypertrophie du FFR est de diminuer le risque d'insuffisance hépatique postopératoire, et ainsi d'augmenter le taux de résécabilité des lésions hépatiques, permettant à des patients initialement non opérables d'accéder au traitement chirurgical. Cependant, bien que l'obstruction portale par EPP ou LPP puisse augmenter le volume du FFR jusqu'à 40% en 3 à 8 semaines<sup>66</sup>, le deuxième temps de la procédure n'est parfois pas envisageable du fait d'une régénération insuffisante du foie chez environ 5% des patients<sup>70</sup>, motivant le développement de techniques alternatives.

### 1.2.3.2. Embolisation de la veine hépatique

Ainsi, l'embolisation veineuse hépatique a été proposée comme procédure de sauvetage pour les patients ayant une croissance du FFR insuffisante après une EP droite<sup>71</sup>.

Elle consiste à occlure une (ou deux) veine hépatique (par voie trans-jugulaire ou trans-hépatique) sous guidage radiologique. Des plugs vasculaires sont positionnés dans la veine hépatique ipsilatérale à l'EPP de manière à interrompre le flux sanguin, entraînant une congestion dans la zone qui était drainée par la veine hépatique embolisée, une atrophie de cette zone et une hypertrophie du foie restant. Il est suggéré que l'obstruction du drainage veineux hépatique entraîne par congestion du flux sinusoidal une augmentation indirecte de la pression portale, et ce, même après EPP. Ceci serait lié à la néocirculation collatérale et à la perfusion interlobaire alimentant en partie le flux sanguin portal du foie embolisé<sup>72</sup>. L'embolisation de la veine hépatique pourrait donc induire une hypertrophie par une augmentation de la pression portale dans le lobe non embolisé.

Cette stratégie associant EPP et embolisation veineuse hépatique a initialement été proposée en séquentiel comme technique de sauvetage<sup>71</sup>. Hwang et al. ont notamment rapporté l'utilisation de cette approche chez 12 patients nécessitant une hépatectomie droite. La tolérance de la procédure était bonne, et la croissance du FFR était de 28%. Sur les 9 patients finalement opérés, aucun n'a présenté d'insuffisance hépatique postopératoire.

La biembolisation veineuse et portale combinée a été rapportée comme étant une procédure sûre avec des effets satisfaisants sur l'hypertrophie du FFR, possiblement meilleure que l'EPP seule et l'embolisation veineuse et portale séquentielle, permettant une augmentation du FFR comprise entre 53% et 63% à trois semaines<sup>72,73</sup>. Ces résultats prometteurs et les limites de ces procédures doivent être évalués dans le contexte d'études comparatives.

Cette approche est séduisante, cependant elle nécessite deux embolisations comportant chacune des risques spécifiques. Hwang et al. ont rapporté après biembolisation

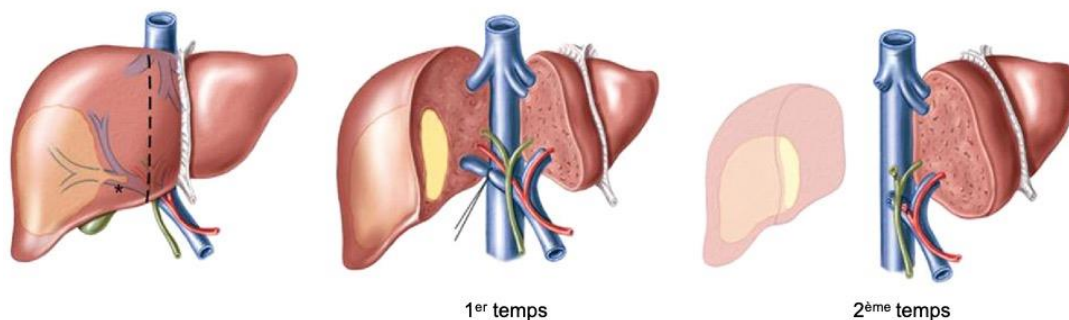


séquentielle au début de leur expérience, une embolisation accidentelle de la veine hépatique médiane chez deux patients (sans morbidité spécifique)<sup>74</sup>. Au cours des deux études évaluant la biembolisation combinée, aucune complication spécifique liée à l'embolisation n'a été rapportée.

#### 1.2.3.3. Bipartition hépatique associée à la ligature portale pour hépatectomie en deux temps (dite ALPPS)

La bipartition hépatique associée à la ligature portale pour hépatectomie en deux temps (communément appelée ALPPS pour associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy) est une procédure de résection hépatique en deux temps qui a été décrite par Schnitzbauer et al. en 2012<sup>75</sup>.

Au cours du premier temps, on réalise la section du parenchyme hépatique dans le plan de la future hépatectomie associée à une LPP controlatérale au FFR. La parenchymotomie est réalisée du côté droit du ligament falciforme (pour une hépatectomie droite élargie au segment IV) ou à travers la scissure portale principale (pour une hépatectomie droite). Chez les patients présentant des lésions hépatiques bilobaires, s'y associe la résection de l'ensemble des lésions présentes dans le FFR. Les branches artérielles restent perméables. Le deuxième temps doit être réalisé une à deux semaines après le premier temps, sous couvert d'une évaluation volumétrique satisfaisante du FFR. Il consiste en la résection complète du lobe ou du foie droit après section de l'artère hépatique homolatérale, du canal biliaire et de la veine hépatique concernés.



**Figure 5** Description de la technique d'ALPPS (associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy) pour résection d'une tumeur hépatique<sup>76</sup>.

L'ALPPS permet une croissance accélérée du FFR, du fait de la transection parenchymateuse, comparativement à la LPP seule<sup>77</sup>. Ceci permet une diminution du risque de progression de la maladie cancéreuse entre les deux temps, et le volume théoriquement suffisant du FFR est à ce stade obtenu, réduisant le risque d'insuffisance hépatique postopératoire. Parmi les mécanismes proposés, il est suggéré que l'interruption des collatéralités portales et artérielles intra-hépatiques (par la transection parenchymateuse associée à la LPP) induise une redistribution du débit sanguin portal et une réponse inflammatoire déclenchant la libération de facteurs de croissance, constituant un stimulus de régénération. L'hémi-foie ligaturé mais artérialisé agirait comme un foie auxiliaire permettant au FFR de tolérer l'hyper-débit portal<sup>78</sup>. L'ALPPS permet une régénération hépatique majeure du FFR, pouvant dépasser 75% une semaine après le premier temps<sup>79</sup>.

La critique principale de l'ALPPS est la morbi-mortalité importante observée initialement<sup>75</sup>. Les critères précis permettant de sélectionner les patients pouvant bénéficier de cette approche devraient permettre de réduire la morbidité et la mortalité de l'ALPPS. Dans une méta-analyse récente, la mortalité était de 2% après le premier temps et de 12% après le second temps<sup>80</sup>. Certaines procédures dérivées de l'ALPPS ont récemment été proposées, telles que les mini-ALPPS ou les ALPPS partiels qui consistent en une transection parenchymateuse partielle afin de diminuer le risque de nécrose du segment IV. Ces procédures permettent d'obtenir une bonne hypertrophie du FFR tout en diminuant la morbidité, elles restent en cours d'évaluation<sup>81</sup>.

#### 1.2.4. Faisabilité du deuxième temps

Les procédures sus-décrites visant à hypertrophier le FFR avant hépatectomie ont pour objectifs d'augmenter la résécabilité et de diminuer les complications postopératoires, même si une hypertrophie suffisante ne garantit pas nécessairement de bons résultats chirurgicaux et oncologiques.

Certaines inquiétudes portent sur le risque de récurrence tumorale provoquée ou accélérée par une augmentation de la sécrétion de facteurs de croissance qui pourrait profiter aux cellules tumorales<sup>82,83</sup>. Une croissance tumorale trop importante pouvant empêcher la

réalisation de la chirurgie, il est plus prudent de traiter préalablement les tumeurs présentes dans le FFR (par radiofréquence ou résection chirurgicale). Toutefois, le taux de récurrence hépatique et la survie globale à 5 ans des patients opérés ne diffèrent pas selon qu'ils aient préalablement subi une EPP ou non, que ce soit dans le cas de lésions primitives<sup>82</sup> ou celui de métastases hépatiques<sup>84</sup>.

La chirurgie de résection hépatique est le plus souvent réalisée environ 4 semaines après l'EPP. Ce délai est considéré comme un bon compromis pour obtenir une hypertrophie satisfaisante du FFR tout en évitant une progression tumorale<sup>85</sup>.

De fait, après obstruction portale (par EPP ou LPP), la résection n'est pas effectuée dans environ 25% des cas<sup>70,86</sup>. La principale raison de non réalisation de l'hépatectomie est la progression de la maladie tumorale chez environ 20% des patients. Dans environ 5% des cas, c'est l'insuffisance d'hypertrophie du FFR qui contre-indique le geste de résection hépatique. Les facteurs identifiés comme empêchant une régénération hépatique satisfaisante sont l'existence d'une hépatopathie chronique (cirrhose ou fibrose)<sup>85</sup>, le diabète<sup>87</sup>, la cholestase<sup>88</sup>, la dénutrition<sup>89</sup>, et possiblement l'âge<sup>90</sup>, le sexe masculin<sup>91</sup>, et les infections virales chroniques<sup>92</sup>.

Dans une étude portant sur l'embolisation veineuse hépatique de sauvetage (c'est-à-dire après EPP de résultat insuffisant), 75% des 12 patients ont pu être opérés. Après biembolisation combinée, 86% des 14 patients ont pu être opérés<sup>73</sup>. La faisabilité du deuxième temps après ALPPS est très élevée, de l'ordre de 98%<sup>80</sup>, probablement grâce à l'intervalle de temps court séparant les deux temps, réduisant le risque de progression tumorale.

**En conclusion**, la réalisation de résections hépatiques étendues pour le traitement de cancers du foie est associée au risque redouté d'insuffisance hépatique postopératoire liée à un volume insuffisant du FFR. De nombreuses stratégies ont été développées afin d'hypertrophier le FFR en préopératoire, et ainsi augmenter le taux de résection tout en diminuant le risque de complication postopératoire. Parmi elles, l'EPP est aujourd'hui la technique la plus utilisée. De nouvelles procédures innovantes ont été développées au

cours des dernières années afin d'augmenter l'hypertrophie du FFR et de permettre à un plus grand nombre de patients d'accéder au traitement chirurgical.

### **1.3. Amélioration de la prise de greffe au cours de la transplantation d'hépatocytes**

#### **1.3.1. Maladies métaboliques héréditaires hépatiques**

Les maladies métaboliques héréditaires hépatiques (MMHH) sont des maladies nombreuses mais individuellement rares, de prévalence très variable (de 1/200 pour l'hémochromatose<sup>93</sup> à 1/1 000 000 pour la maladie de Crigler-Najjar<sup>94</sup>).

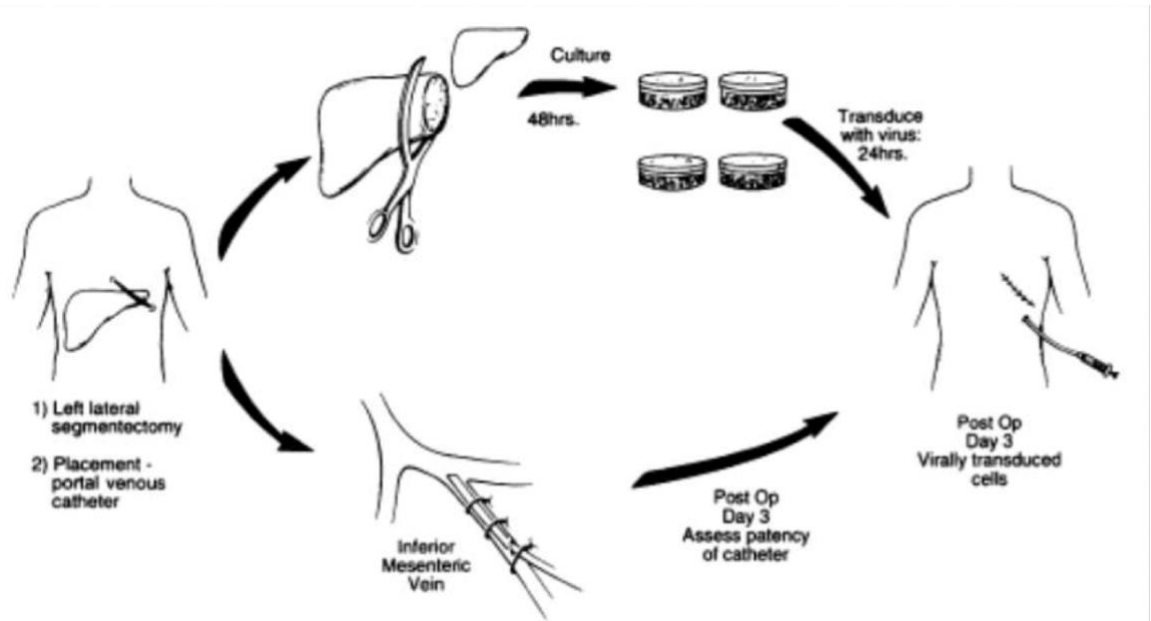
Elles se caractérisent par une déficience partielle ou complète d'une enzyme ou d'une protéine du foie responsable d'une maladie hépatique ou extra-hépatique. Par ailleurs, les autres fonctions hépatiques ainsi que la structure du foie restent initialement conservées. On peut les classer en deux catégories : d'une part les MMHH liées à une anomalie génétique entraînant une modification de la fonction de l'hépatocyte sans accumulation hépatique de métabolites (glycogénoses), et d'autre part les MMHH de « surcharge » liées une atteinte hépatocytaire par accumulation de protéines (maladie de Crigler-Najjar, déficits héréditaires du cycle de l'urée...) ou de métaux (hémochromatose, maladie de Wilson...).

Certaines MMHH peuvent être symptomatiques dès l'enfance et mettre en jeu le pronostic vital. Les traitements actuels sont souvent palliatifs, visant à améliorer la qualité de vie et parfois la survie des patients. La transplantation hépatique est le seul traitement curatif actuellement disponible. Au cours des dix dernières années, près de 50.000 greffes de foie ont été effectuées en Europe, dont environ 3000 pour maladie métabolique héréditaire<sup>95</sup>. Cependant, la transplantation hépatique est limitée par une pénurie de greffons, des complications chirurgicales spécifiques, et un traitement immunosuppresseur à vie.

### 1.3.2. Transplantation d'hépatocytes

La transplantation d'hépatocytes (The) est une thérapie innovante qui pourrait représenter une alternative, moins agressive, à la transplantation hépatique (d'organe) pour la prise en charge des MMHH.

En effet, certaines MMHH ont pour particularité de conserver la structure du foie intacte, notamment sa riche vascularisation, ainsi que ses capacités de régénération. Elles sont donc en théorie d'excellentes cibles pour les approches de thérapies cellulaires qui visent à corriger le déficit de fonction hépatique. La thérapie cellulaire présente théoriquement plusieurs avantages par rapport à la transplantation hépatique. Il s'agit d'une technique potentiellement moins invasive, car les cellules thérapeutiques peuvent être injectées directement dans le système porte à l'aide d'un cathéter<sup>96</sup>. Cette approche peut être répétée si nécessaire<sup>97,98</sup> et n'empêche pas une éventuelle transplantation hépatique secondaire. On peut même imaginer qu'une The pourrait être un traitement d'attente efficace dans le contexte actuel de pénurie de greffon. De plus, un même donneur d'hépatocytes pourrait fournir des hépatocytes à plusieurs receveurs ou au même receveur plusieurs fois<sup>99</sup>. En effet, les hépatocytes peuvent être cryopréservés et seraient donc disponibles à la demande. Une alternative à l'allogreffe d'hépatocytes sains issus d'un donneur est la transplantation autologue d'hépatocytes modifiés *ex vivo* pour restaurer un phénotype normal. La transplantation autologue, en comparaison à l'allogreffe, a pour principal avantage théorique de ne pas entraîner de réaction immunitaire et donc de ne pas nécessiter de traitement immunosuppresseur. Cependant, cette approche nécessite un prélèvement partiel de foie, avec une morbi-mortalité associée.



**Figure 6** Procédure d'autotransplantation d'hépatocytes corrigés *ex vivo* par transduction à l'aide d'un vecteur viral<sup>100</sup>.

Après de nombreux résultats encourageants sur modèle animal, des protocoles de THE pour le traitement de MMHH ont été évalués dans le cadre d'essais cliniques. Toutefois, leur nombre reste extrêmement limité. D'un point de vue général, ces essais ont démontré la faisabilité et la bonne tolérance (dans la grande majorité des cas) des approches de thérapie cellulaire pour le traitement des MMHH. Les résultats de ces essais ont été décevants avec une correction des déficits métaboliques souvent insuffisante ou transitoire<sup>101-104</sup>. La principale limite est le faible pourcentage (0,5%) de la masse hépatique saine reconstituée par les hépatocytes transplantés<sup>105</sup>, liée à une faible prise de greffe hépatocytaire et une mauvaise survie à long terme des cellules transplantées. On considère que l'intégration stable d'un pourcentage restreint (environ 5%) d'hépatocytes sains est suffisante pour obtenir durablement l'effet métabolique désiré<sup>106</sup>. Il est nécessaire de développer des méthodes favorisant l'intégration des hépatocytes thérapeutiques dans le foie et leur multiplication.

### 1.3.3. Méthodes d'amélioration de la prise de greffe hépatocytaire

Différents modèles animaux ont été développés dans le but d'améliorer la prise de greffe hépatocytaire pour le traitement des MMHH. Ce principe de « préconditionnement » est de

favoriser la création d'un « espace physiologique » qui s'accompagne d'un stimulus régénératif favorable à l'intégration des hépatocytes et/ou de donner un avantage prolifératif aux cellules thérapeutiques transplantées par rapport aux cellules résidentes du foie<sup>107</sup>.

Ces méthodes d'amélioration de la prise de greffe hépatocytaire peuvent être classées en trois types principaux, qui peuvent également être combinés.

#### 1.3.3.1. Modèles comportant une lésion hépatique

L'administration de toxiques a été rapportée avec succès chez le modèle murin. Ainsi, par l'induction d'une cytolyse, le tétrachlorure de carbone engendre un « espace physiologique » favorable à l'intégration des hépatocytes transplantés<sup>108</sup>. De même, l'effet anti-mitotique de la rétroisine permet l'arrêt de la prolifération des hépatocytes résidents qui procure un avantage prolifératif aux cellules transplantées<sup>109</sup>. Bien que très efficaces, ces modèles ne sont pas transposables en pratique clinique.

L'utilisation d'une irradiation à l'aide de rayons X a également été rapportée sur modèle animal<sup>110</sup>, montrant une amélioration de la prise de greffe. Ce « préconditionnement » du foie du receveur par radiothérapie favorise la prise de greffe par trois mécanismes<sup>111</sup> : rupture de la barrière endothéliale sinusoidale, inhibition de l'activité phagocytaire des cellules de Kuppfer, apoptose des cellules hépatiques résidentes. L'avantage de l'irradiation est qu'on peut délivrer précisément une dose de rayons X de manière à favoriser la prise de greffe hépatocytaire sans léser définitivement le foie du receveur.

#### 1.3.3.2. Modèles génétiquement modifiés

Il s'agit de modèles animaux génétiquement modifiés et non applicables en pratique clinique. L'avantage prolifératif des hépatocytes transplantés peut être consécutif à un désavantage des cellules du receveur<sup>112,113</sup>, à une augmentation de la capacité de prolifération des hépatocytes destinés à la transplantation<sup>114</sup>, ou à une association des deux<sup>115</sup>.

### 1.3.3.3. Modèles de régénération hépatique

Afin de favoriser la prise de greffe, l'induction d'une régénération hépatique semble être la principale approche applicable en clinique.

#### 1.3.3.3.1. Hépatectomie majeure

Une hépatectomie majeure (de 70%) constitue la référence des modèles de régénération hépatique chez l'animal<sup>16,34,35,65</sup> mais ne saurait être utilisée en pratique clinique. En effet, la morbidité d'une hépatectomie majeure chez l'homme (dans les conditions favorables d'un donneur vivant) est d'environ 20% avec une mortalité d'au moins 0,5%<sup>116</sup>. Ces risques, potentiellement aggravés par l'existence d'une pathologie hépatique et l'association d'une THe, couplés à l'incertitude de l'efficacité de ce traitement seraient difficilement acceptables alors qu'il existe un traitement efficace disponible, bien que lourd, la transplantation hépatique.

#### 1.3.3.3.2. Ligature portale partielle

La LPP est une approche moins invasive que l'hépatectomie majeure. Elle oblige cependant à une procédure chirurgicale.

Notre équipe a évalué l'efficacité d'une LPP pour favoriser la prise de greffe au cours de la THe chez le macaque *Cynomolgus*<sup>107</sup>. Dans ce modèle, un prélèvement du lobe hépatique gauche permettait d'isoler les hépatocytes en vue d'une autotransplantation. Spontanément (sans « préconditionnement »), la prise de greffe maximale était d'environ 2% après autotransplantation de 400 millions d'hépatocytes génétiquement modifiés dans le foie. Ce taux est trop faible pour espérer un résultat métabolique, aussi était-il nécessaire d'avoir recours à un « préconditionnement ». Nous avons d'abord étudié les conséquences d'une ligature de la branche portale antérieure droite (correspondant à 50% du volume hépatique restant) après lobectomie gauche sur la prolifération hépatocytaire<sup>96</sup>. Il a été constaté une prolifération hépatocytaire faible, de l'ordre de 3% et 0,8% dans les lobes non ligaturés à



respectivement 3 et 7 jours de la procédure. A deux mois de la procédure, l'évaluation volumétrique montrait une augmentation du volume des lobes non ligaturés, passant de 36% du volume du foie total initialement à 56% après ligature portale. Quatre singes ont ensuite reçu une autotransplantation d'hépatocytes marqués après lobectomie gauche et ligature portale. Les animaux ont bien toléré la ligature ainsi que la transplantation. Le pourcentage d'hépatocytes transplantés 7 et 15 jours après la THE était de l'ordre de 0,5 à 1,5%.

Cette faible prise de greffe s'explique probablement par la faible prolifération hépatocytaire observée dans cette étude après LPP. La formation de collatérales en intra-parenchymateux a été observée sur certaines portographies réalisées à 7 jours de la ligature. Cette reprise précoce de la vascularisation distale après LPP pourrait expliquer le faible stimulus régénératif ainsi que la prise de greffe observée. Ce phénomène de revascularisation portale après ligature a été constaté également chez le porc<sup>117</sup> et chez l'homme<sup>118</sup>.

#### 1.3.3.3.3. Embolisation portale partielle

Comme évoqué au chapitre 1.2.3.1, l'EPP constitue un stimulus de régénération intéressant, qui a pour avantage par rapport à la LPP de pouvoir être réalisé de manière percutanée. De plus, certaines équipes ont suggéré sur modèle animal ou en pratique clinique que l'EPP pouvait entraîner par rapport à la ligature une plus forte régénération hépatique<sup>63,64,119</sup>. Des résultats contradictoires ont été par la suite rapportés<sup>56,66,67</sup> et la question reste d'actualité. De fait, par la régénération qu'ils induisent et leur caractère peu invasif, les procédés d'EPP présentent un intérêt majeur dans l'amélioration de la prise de greffe hépatocytaire. Ils seront discutés au chapitre 2.

#### 1.3.3.3.4. Embolisation portale volumétrique

Une méthode alternative à l'EPP comme méthode de « préconditionnement » avant THE a récemment été proposée. En effet, si l'EPP permet une régénération hépatique intéressante, celle-ci ne concerne qu'une partie seulement (environ 50%) du volume hépatique. Ceci a pour conséquence une diminution du volume hépatique accessible à la greffe d'hépatocytes, sans compter les risques méconnus liés à l'atrophie du foie embolisé.

Notre équipe a donc proposé une nouvelle approche de stimulation de la régénération hépatique. Nous avons injecté dans le tronc porte des microbilles, réalisant une embolisation portale très distale dans tout le foie. Il s'agit donc de l'embolisation d'un pourcentage du volume global hépatique sans altération anatomique (lobaire) du foie, ainsi appelée embolisation volumétrique. A l'inverse de l'EPP, les hépatocytes transplantés peuvent accéder à l'ensemble du foie et non plus uniquement à la partie non embolisée, ce qui devrait permettre d'augmenter le nombre de cellules injectées et donc transplantées au cours d'une seule procédure.

Chez la souris, cette méthode a permis une amélioration de la prise de greffe hépatocytaire par rapport aux souris témoins (3 *versus* 0.65%). Ces travaux ont été rapportés dans le journal *Transplantation* en 2016<sup>120</sup>. L'auteur de cette thèse a participé à ces travaux qui ne font pas strictement partie de son travail de thèse. L'article publié est proposé en annexe.

**En conclusion**, la THE est une thérapie innovante qui pourrait représenter une alternative, moins agressive, à la transplantation hépatique pour la prise en charge des MMHH. Sa principale limite est la faible prise de greffe hépatocytaire. Différents modèles animaux ont été développés dans le but d'améliorer cette prise de greffe mais peu sont applicables en pratique clinique. Puisqu'elle est capable d'induire un stimulus de régénération en vue d'un « préconditionnement » du foie du receveur, l'EPP présente un intérêt majeur dans l'amélioration de la prise de greffe hépatocytaire après THE.

## CONCLUSIONS

Aux cours des dernières décennies, la capacité du foie à régénérer a été mise à profit pour le développement de thérapies modernes au service des patients. La chirurgie hépatique, traitement de choix de nombreux cancers hépatiques, était hier limitée par le risque d'insuffisance hépatique postopératoire, conséquence d'une résection importante laissant en place un foie de volume insuffisant pour assurer sa fonction. Plusieurs méthodes ont été développées de manière à induire la régénération du FFR après hépatectomie. Parmi elles, l'EPP est devenue une procédure de routine en préopératoire, permettant à plus de patients d'accéder à un traitement chirurgical tout en diminuant le risque d'insuffisance hépatique postopératoire. En thérapie cellulaire, pour le traitement de maladies métaboliques du foie, la régénération hépatique pourrait être un support à l'intégration des hépatocytes thérapeutiques au sein du parenchyme du foie du receveur. Ici encore, l'EPP est une piste intéressante pour préparer le foie à recevoir une THe. Les potentialités de l'EPP seront discutées au chapitre 2.



## CHAPITRE 2

### EMBOLISATION PORTALE PARTIELLE

## 2.1 Embolisation portale partielle (définitive)

### 2.1.1 Intérêt de l'EPP en chirurgie hépatique

Une fois l'indication d'embolisation retenue, la stratégie est anticipée et décidée en collaboration entre les équipes de chirurgie et de radiologie interventionnelle. Une imagerie en coupes (scanner ou imagerie par résonance magnétique avec injection) est nécessaire pour confirmer les segments à emboliser et repérer l'anatomie portale et ses éventuelles variantes afin d'anticiper le geste d'embolisation. Un bilan biologique récent comportant au minimum un bilan de coagulation et un bilan hépatique est également indispensable.

La procédure d'EPP est douloureuse et est donc le plus souvent réalisée sous anesthésie générale. Enfin, il est nécessaire de vérifier avant le début de la procédure la perméabilité portale par échographie. La thrombose de la veine porte du FFR contre-indique en effet la procédure puisque l'embolisation de la branche portale controlatérale résulterait en une privation totale de l'apport veineux portal du foie.

#### 2.1.1.1 Accès au système porte

Plusieurs voies d'abord au réseau portal sont envisageables.

L'abord trans-iléocolique est réalisé par cathétérisme d'une veine iléocolique par voie chirurgicale. Il n'est quasiment plus utilisé depuis l'essor de la radiologie interventionnelle et de l'abord trans-hépatique, notamment du fait de son caractère invasif et des complications potentielles liées à la laparotomie<sup>121</sup>. Il pourrait garder un intérêt lorsque les lésions hépatiques sont nombreuses et/ou volumineuses, rendant l'abord trans-hépatique difficile avec un haut risque de ponction trans-tumorale.

L'abord percutané trans-hépatique sous guidage échographique et fluoroscopique est aujourd'hui l'accès privilégié. Il peut se faire par voie ipsilatérale (à travers le foie à réséquer) ou, au contraire, par voie controlatérale (à travers le FFR). Dans la majorité des cas,

l'embolisation portale précède une hépatectomie droite et vise donc à emboliser l'hémi-foie droit : la voie ipsilatérale correspond donc à un abord trans-hépatique droit, la voie controlatérale à un abord trans-hépatique gauche.

L'abord controlatéral à travers le foie gauche présente comme principal avantage de faciliter le cathétérisme des branches portales droites à emboliser, ainsi que la réalisation de la portographie finale puisque le cathéter ne passe pas au travers du matériel d'embolisation<sup>121</sup>. La ponction à travers le FFR peut léser le parenchyme (hématome, faux anévrisme artériel, bilome...) et fait courir le risque de rendre difficile, voire impossible, l'hépatectomie, mais ces complications sont rares<sup>122</sup>. L'injection du matériel d'embolisation se fait en flux libre, ce qui peut être délicat lorsque la circulation portale est ralentie ou, comme chez certains cirrhotiques, hépatofuge car il existe alors un risque d'embolisation par reflux des territoires que l'on souhaite préserver.

L'abord ipsilatéral présente l'avantage majeur de ne pas risquer d'endommager le FFR. Il peut cependant être parfois difficile de réaliser la ponction en foie non tumoral étant donné la présence de tumeurs parfois multiples au sein du foie à réséquer<sup>122</sup>. L'injection du matériel d'embolisation se fait à contre-courant, après avoir obstrué transitoirement l'origine de la branche par un ballonnet.

Les taux de complications entre ces deux approches étant similaires<sup>122,123</sup>, le choix se fait principalement en fonction de l'affinité et de l'expérience de l'opérateur.

#### 2.1.1.2 Procédure et agents d'embolisation non résorbables

La pression portale est mesurée avant embolisation pour confirmer l'absence d'hypertension portale, notamment chez les patients cirrhotiques. En effet, une hypertension portale avec un gradient de pression supérieur à 12 mmHg représente une contre-indication relative à une hépatectomie majeure et doit faire reconsidérer la réalisation d'une embolisation<sup>124</sup>.

Une fois l'accès obtenu au système porte, une portographie est réalisée afin de visualiser l'anatomie portale et les branches à emboliser, déjà repérées par l'imagerie pré-

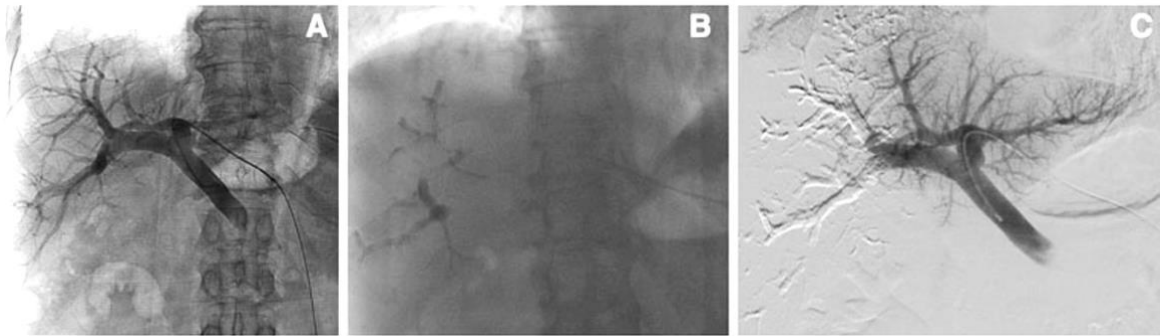
interventionnelle. Les branches portales à emboliser sont ensuite successivement cathétérisées.

De nombreux agents non résorbables ont été utilisés pour l'embolisation portale : les cyanoacrylates (Histoacryl®, Glubran®, Purefill®...), les microparticules, les coils, les plugs, et de l'éthanol absolu. Dans une étude expérimentale menée chez le porc, il a été établi la supériorité de l'Histoacryl® (cyanoacrylate) par rapport aux microparticules<sup>125</sup>, permettant une embolisation définitive avec une hypertrophie satisfaisante du FFR. L'inflammation portale et péri-portale causée par le cyanoacrylate a probablement un effet stimulant la régénération hépatique. Dans une étude rétrospective comparative chez l'homme, il a été montré que l'hypertrophie du FFR après embolisation portale était très supérieure avec le cyanoacrylate qu'avec des microparticules et des coils<sup>126</sup>. De fait, l'embolisation proximale à l'aide de coils ou de plugs, plus facile techniquement, entraînerait la création d'anastomoses portes droite-gauche ou artério-portes, et est donc à éviter<sup>55</sup>.

Le cyanoacrylate doit être mélangé avec du Lipiodol Ultra Fluide®, indispensable pour rendre le mélange radio-opaque et donc visible durant l'injection. Le cyanoacrylate polymérise en quelques secondes au contact du sang. Son administration doit donc se faire au travers d'un cathéter parfaitement rincé au sérum glucosé à 5% pour éviter la polymérisation et donc l'obstruction du cathéter. La libération du mélange est fonction du flux portal, aussi l'opérateur doit-il être attentif à la progression du matériel d'embolisation et au ralentissement du flux déterminant l'arrêt de l'injection.

En fin de procédure, une portographie et une mesure de la pression portale sont réalisées en cas d'abord controlatéral, ce qui est impossible en cas d'abord ipsilatéral. Une embolisation du trajet de ponction peut être réalisée lors du retrait du matériel pour limiter le risque de saignement.





**Figure 7** Etapes de la procédure d'embolisation portale<sup>122</sup>

(A) Portographie initiale après mise en place d'un cathéter dans le tronc porte par abord controlatéral. (B) Embolisation des branches portales droites par un mélange de cyanoacrylate et de lipiodol. (C) Portographie finale après embolisation portale droite ; l'ensemble du système porte droit est occlus alors que la branche portale gauche et ses branches sont perméables.

#### 2.1.1.3 Intérêt de l'embolisation du segment IV

L'embolisation des branches portales à destinée du segment IV avant une hépatectomie droite élargie au segment IV est en théorie justifiée par le faible volume du FFR représenté par les segments II et III<sup>127</sup>. Cependant, elle complique la procédure (cathétérisme difficile, risque de reflux vers le réseau portal gauche pouvant contre-indiquer la chirurgie) et oblige le chirurgien à réséquer complètement le segment IV, ce qui est rarement le cas en pratique.

L'intérêt de l'embolisation des branches portales du segment IV est controversé. Il a été initialement rapporté une amélioration nette du taux d'hypertrophie du lobe gauche après embolisation portale droite + IV<sup>128</sup> mais ces résultats n'ont pas été observés par d'autres équipes expérimentées<sup>129,130</sup>.

#### 2.1.1.4 Tolérance et complications

L'embolisation portale s'accompagne d'une augmentation de la pression dans le système porte. Cette augmentation de pression est observée immédiatement après l'embolisation. Il

est probable qu'elle soit transitoire. Aucune complication hémorragique liée à l'augmentation de la pression portale qui suit l'embolisation (rupture de varices œsophagiennes, gastrite d'hypertension portale) n'a été rapportée. Il est en revanche parfois constaté l'apparition d'une ascite transitoire chez les patients cirrhotiques.

Le risque de la ponction transcutanée est comparable à celui d'une biopsie hépatique. Il est augmenté chez les patients ayant une dilatation des voies biliaires intrahépatiques qui doivent donc être drainées avant l'embolisation. Contrairement à l'embolisation artérielle, l'embolisation portale est très bien tolérée et ne nécessite le plus souvent qu'une hospitalisation de 24 à 48 heures. Elle est également bien tolérée sur le plan biologique. La cytolyse à J1 est habituellement inférieure à 2,5 fois la normale et il n'y a pas de variation significative des enzymes de la cholestase<sup>131</sup>. Les variations de la bilirubinémie et du TP sont minimales et restent dans les limites de la normale chez les patients n'ayant pas d'insuffisance hépatocellulaire.

La principale complication qui puisse survenir au cours de la procédure d'embolisation est la migration du matériel d'embolisation dans les territoires que l'on souhaite préserver. Dans les suites de la procédure, le risque d'insuffisance hépatique transitoire est plus important chez les patients cirrhotiques<sup>132</sup>. L'embolisation portale peut être considérée chez ces patients comme un test de tolérance préopératoire : si le foie ne peut tolérer l'embolisation portale, l'hypertrophie du FFR ne sera pas suffisante et la résection hépatique élargie ne doit pas être envisagée<sup>82</sup>.

Dans une revue systématique incluant 1791 patients<sup>85</sup>, un taux de mortalité de 0,1% a été rapporté (une embolie pulmonaire et une cholangite avec choc septique). Les complications majeures étaient la thrombose porte (0,8%), l'embolisation de vaisseaux non-cibles (0,6%), l'hématome intra-parenchymateux (0,4%), l'abcès hépatique (0,4%) et la fistule biliaire (0,3%). Les principaux effets indésirables de l'embolisation portale étaient la fièvre (37%), l'élévation des transaminases (35%) et la douleur abdominale (23%).

### 2.1.2 Intérêt de l'EPP au cours de la transplantation d'hépatocytes

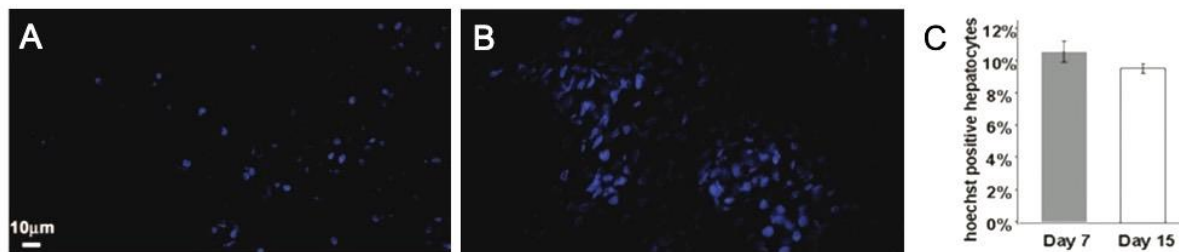
Comme discuté au chapitre 1.2.3.1, l'avantage de l'EPP sur la ligature portale est de pouvoir être réalisée de manière percutanée. De plus, certaines études ont suggéré que l'EPP entraînait une régénération hépatique supérieure à la LPP<sup>63,64</sup>, ce qui induirait un stimulus de régénération plus intéressant que la LPP pour promouvoir la prise de greffe hépatocytaire, même si d'autres études n'ont pas observé de différence en termes de régénération entre ces deux approches<sup>56,65-68</sup>. Ces raisons ont poussé notre équipe à étudier l'intérêt d'une EPP pour promouvoir la prise de greffe hépatocytaire après The.

#### 2.1.2.1 Etude de l'amélioration de la prise de greffe hépatocytaire

Afin d'appliquer le même modèle d'autotransplantation que décrit au chapitre 1.3.3.2 (c'est-à-dire une autotransplantation d'hépatocytes isolés à partir d'une lobectomie gauche puis marqués au Hoechst, un colorant nucléaire fluorescent), il a été réalisé chez le macaque des embolisations portales définitives à l'aide de cyanoacrylate (Histoacryl®)<sup>96</sup>. Sur huit singes ayant subi la procédure, un singe est mort d'une thrombose portale complète suite à un reflux du matériel d'embolisation dans le secteur postérieur du foie droit. Les sept autres animaux ont bien supporté l'ensemble du protocole expérimental. La pression portale était monitorée pendant l'embolisation. Elle s'élevait légèrement pour revenir progressivement au chiffre de base. L'étude histologique à court terme ne montrait pas de phénomène inflammatoire important ; on observait une dilatation des sinusoides les premiers jours suivant l'embolisation. Les biopsies hépatiques à 9 mois montraient une architecture hépatique normale sans signes d'hyperplasie nodulaire régénérative. La régénération hépatique était supérieure après EPP qu'après LPP du même territoire. Le pourcentage d'hépatocytes en division était de 23% et 11% à respectivement 3 jours et 7 jours de la procédure dans les segments non embolisés.

Trois singes ont eu par la suite une autotransplantation d'hépatocytes isolés après EPP à l'Histoacryl®. Des biopsies hépatiques ont été faites 7 et 15 jours après la transplantation. Le pourcentage d'hépatocytes marqués retrouvés était nettement supérieur après EPP (entre

8 et 12%) par rapport à celui observé après ligature portale (entre 1 à 2%). L'intégration des cellules transplantées par l'expression de protéines de jonctions intercellulaires ainsi que leur prolifération a par ailleurs été démontrée.



**Figure 8** Effet de l'embolisation portale sur la prise de greffe hépatocytaire<sup>96</sup>

(A et B) Examen au microscope à fluorescence des hépatocytes transplantés marqués au Hoechst à J3 et J15 de la THe, respectivement, au sein des lobes non embolisés. (C) Evaluation quantitative de la proportion d'hépatocytes transplantés dans les lobes non embolisés, à J7 et J15 de la THe.

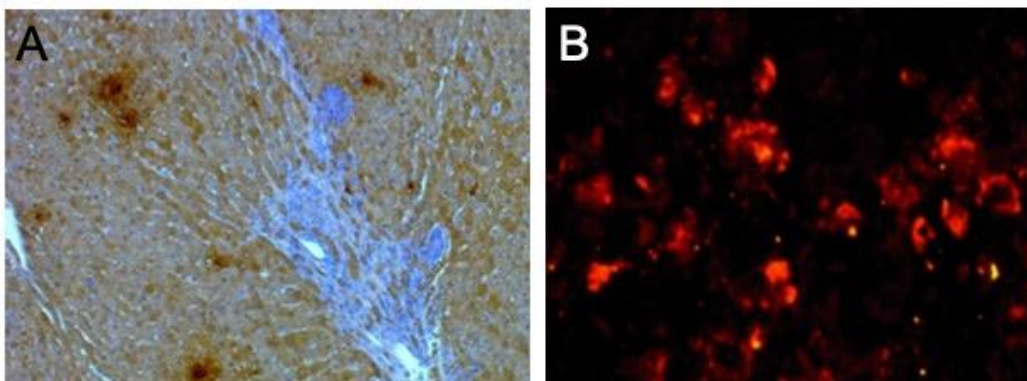
#### 2.1.2.2 Etude de l'efficacité métabolique

La finalité de la THe est d'induire un effet métabolique chez un individu porteur d'une MMHH. Il n'existe pas de modèle simien de MMHH, aussi avons-nous développé un protocole d'autotransplantation d'hépatocytes (similaire à ce qui a été développé chez le macaque) chez le lapin Watanabe, modèle animal de l'hypercholestérolémie familiale. L'hypercholestérolémie familiale est une maladie génétique autosomique dominante potentiellement mortelle liée à une mutation du gène codant pour le récepteur aux lipoprotéines de basse densité (low density lipoprotein, LDL) entraînant une hypercholestérolémie sévère et une maladie cardiovasculaire précoce<sup>133</sup>.

Le protocole développé chez le lapin hypercholestérolémique est celui d'une thérapie génique *ex vivo*. Elle nécessite : l'isolement d'hépatocytes à partir d'une lobectomie gauche, un transfert du gène efficace dans les hépatocytes déficients, une THe modifiés avec une prise de greffe hépatocytaire optimale et une expression stable du transgène permettant le rétablissement de la fonction hépatocytaire. Il avait précédemment été rapporté une nouvelle

approche de transduction au cours de laquelle les hépatocytes étaient transduits en suspension à l'aide d'un vecteur lentiviral puis immédiatement transplantés (dite SLIT)<sup>134</sup>.

La faisabilité et l'efficacité de notre approche a donc été testée chez des lapins normaux et des lapins Watanabe<sup>135</sup>. L'ensemble de la procédure chirurgicale était bien toléré. La technique de SLIT permettait une transduction d'environ 70% des hépatocytes isolés à partir du lobe gauche du lapin Watanabe. L'EPP permettait une intégration des hépatocytes transduits et transplantés à hauteur de  $1,3 \pm 0,7\%$  à J7. Cette prise de greffe était inférieure à celle observée chez le modèle de macaque, ce qui peut être partiellement expliqué par un plus faible nombre de cellules transplantées et le taux de transduction. Les analyses par qPCR ont démontré la survie à long terme (8 semaines après la THE) des hépatocytes transduits en détectant la présence de 0,04 copies du vecteur intégré par génome diploïde. Les analyses *in vitro* menées sur les hépatocytes issus du lapin hypercholestérolémique puis transduits par technique de SLIT, ont démontré la correction du phénotype par la présence sur ces cellules du récepteur aux LDL, ainsi que la capture et la fixation de LDL marquées.

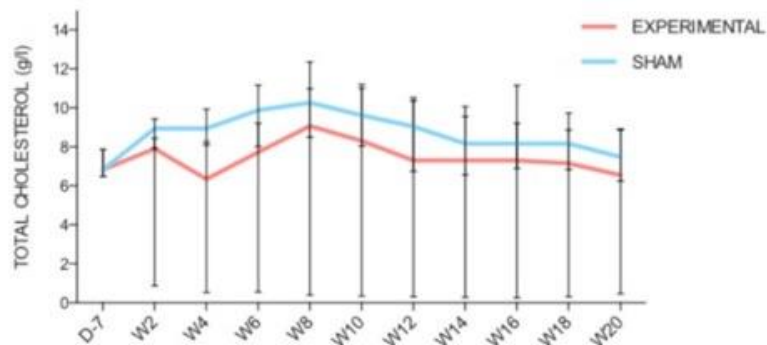


**Figure 9** Etude de l'efficacité métabolique chez le lapin Watanabe<sup>135</sup>

(A) Examen immunohistochimique (20x) des lobes non embolisés montrant les hépatocytes transduits marqués par le GFP à J7 de la THE chez un lapin Watanabe. (B) Examen au microscope à fluorescence de la capture *in vitro* des particules de LDL fluorescentes par le récepteur aux LDL sur les hépatocytes transduits.

La démonstration d'une efficacité métabolique *in vivo* a été évaluée secondairement<sup>136</sup>. Le protocole décrit plus haut de thérapie génique *ex vivo* a été appliqué à

deux groupes de lapins Watanabe recevant soit des hépatocytes transduits, soit des hépatocytes non transduits. La tolérance clinique et biologique était bonne. Le taux de transduction des hépatocytes était de 64,5%. L'analyse lipidique a été réalisée sur sept lapins dans chacun des deux groupes. Quatre semaines après la THE, le niveau médian de cholestérol total était abaissé dans le groupe expérimental, sans atteindre de différence statistique (8,9 [8,0-9,8] g/L *versus* 6,3 [0,5-8,3] g/L ;  $P=0,171$ ).



**Figure 10** Profil lipidique des lapins Watanabe après THE transduits<sup>136</sup>

D : Day, W : week.

Ces travaux ont été rapportés dans le *Journal of Surgical Research* en 2016. L'auteur de cette thèse a participé à ces travaux qui ne font pas strictement partie de son travail de thèse. L'article publié est proposé en annexe.

Ces résultats n'étaient pas à la hauteur de ceux espérés. Plusieurs hypothèses ont été évoquées pour justifier ces résultats mitigés. Premièrement, la fragilité du modèle qui a nécessité une adaptation du protocole avec la réduction du nombre d'hépatocytes transplantés et la nécessité de les injecter par voie splénique plutôt que par voie portale (comme cela était réalisé chez le macaque). Il a d'ailleurs été démontré qu'environ 55% des hépatocytes injectés dans la rate finissaient par migrer vers le foie<sup>137</sup>. Une réaction immunitaire contre le récepteur aux LDL humain a probablement participé à atténuer l'effet métabolique observé. En effet, il n'a pas été possible de cloner le gène de lapin et c'est finalement le gène humain du récepteur aux LDL qui a été utilisé. Un test ELISA réalisé 2 semaines après l'expérimentation a montré un taux significatif d'anticorps dirigés contre le

récepteur aux LDL humain. Alors que les récepteurs humain et de lapin ont la même affinité pour le LDL humain<sup>138</sup>, les séquences des gènes de lapin et humain codant pour ce récepteur ne présentent que 75% d'homologie et des différences de structure ont été décrites<sup>139</sup>.

**En conclusion**, l'EPP définitive est une procédure sûre, bien tolérée, dont les risques sont très faibles. Elle permet la réalisation d'une hépatectomie chez environ 75% des patients. Utilisée comme méthode de « préconditionnement » avant THE, l'EPP a permis une augmentation substantielle de la prise de greffe hépatocytaire. Nous avons pu secondairement démontrer en appliquant notre protocole d'autotransplantation d'hépatocytes une correction partielle et temporaire d'un déficit métabolique dans un modèle animal de MMHH. D'autres expérimentations sur un nombre plus important d'animaux seront nécessaires pour confirmer ces données.

## 2.2 Embolisation portale partielle résorbable (EPPR)

### 2.2.1 Intérêt de l'EPPR en chirurgie hépatique

D'un point de vue général, l'agent d'embolisation idéal doit être le mieux toléré par le patient, tout en permettant une résection hépatique majeure sans insuffisance hépatique postopératoire. Nous l'avons vu, en pratique clinique, un matériel d'embolisation non résorbable est généralement employé car il permet une obstruction définitive et stable de la branche portale vascularisant les segments de foie qui sont destinés à être reséqués lors de l'hépatectomie. De plus, certains auteurs ont suggéré qu'une EPP non résorbable entraînait une hypertrophie hépatique plus importante et plus rapide<sup>140,141</sup>. Ces agents d'embolisation non résorbables ont cependant des inconvénients potentiels.

D'une part, il existe un risque de migration accidentelle de particules non résorbables dans un territoire portal sain, ou pire encore, d'extension du thrombus portal, notamment chez des patients dont le flux portal est déjà diminué (comme en cas de cirrhose) qui contre-indiquerait la résection. Dans une méta-analyse récente rapportant les résultats de l'EPP au cyanoacrylate chez 603 patients<sup>70</sup>, une migration mineure du matériel d'embolisation est

survenue dans 8 (1.3%) cas, une migration importante dans 2 (0.3%) cas, et une thrombose portale dans 3 (0.5%) cas. Seulement un patient a été finalement récusé pour la chirurgie du fait d'une thrombose mésentérique-porte.

En réalité, la cause principale de non résection était une progression de la maladie tumorale chez 114 patients (18.9%). Dans cette situation, le traitement de la maladie hépatique requiert souvent une prise en charge multi-étapes, incluant des techniques radiologiques, endovasculaires ou chirurgicales<sup>124,142</sup>. L'utilisation d'agents d'embolisation non résorbables peut éventuellement contre-indiquer certains traitements (comme une chimio-embolisation artérielle). Puisqu'il permet une revascularisation des branches portales, l'utilisation d'un agent résorbable pourrait diminuer les lésions induites sur le foie embolisé et finalement non réséqué, et accroître les possibilités de combinaisons de traitement en cas d'évolution tumorale péjorative.

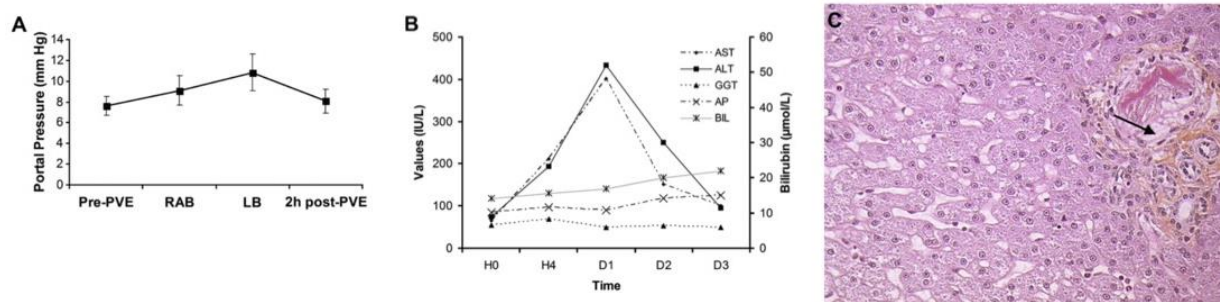
#### 2.2.1.1 Résultats de l'EPPR chez l'animal

Huang et al. ont rapporté en 2006 les résultats d'une étude comparative menée chez le chien<sup>143</sup>. L'un des groupes subissait une EPPR à l'aide de bandes de gélatines (de 10 x 1 mm) injectées avec du sérum physiologique dans les branches portales à emboliser. Dans ce groupe, la portographie réalisée à 4 semaines de l'embolisation montrait une reperméabilisation des branches embolisées. Il n'existait enfin pas de modification des volumes des lobes non embolisés. Les auteurs concluaient à l'absence d'efficacité des bandes de gélatine pour induire une hypertrophie hépatique.

Cependant en 2008, notre équipe a publié les résultats d'une technique d'EPPR chez le macaque<sup>144</sup>. Le matériel résorbable utilisé était une poudre de gélatine (Curaspon®). Une embolisation d'environ 70% du foie du singe était réalisée (l'équivalent en pourcentage du volume hépatique d'une EPP droite chez l'homme). Neuf macaques ont eu une EPPR de la branche gauche (30-35% du volume hépatique) et de la branche du secteur antérieur droit (25-30% du volume hépatique).



L'EPPR était bien tolérée, sans augmentation importante de la pression portale durant ou après l'embolisation. Aucun cas de thrombose porte n'a été détecté. L'augmentation du niveau des transaminases sanguines était plus importante que celle observée au cours d'autres embolisations réalisées à l'aide de cyanoacrylate chez le même modèle animal<sup>96</sup>. Une cytolyse plus importante après EPPR à l'aide de poudre de gélatine pouvait s'expliquer par certaines spécificités de cette approche. En effet, l'utilisation de poudre de gélatine permet une obstruction veineuse plus complète s'étendant des branches portales principales jusqu'aux branches distales, de petit calibre, ayant comme résultat une obstruction au niveau des sinusoides et de plus importantes lésions directes au niveau des hépatocytes. Cependant, la cytolyse se normalisait 3 jours après l'EPPR. Des biopsies hépatiques effectuées 15 jours après l'EPPR ont montré l'absence de réaction inflammatoire dans les espaces portes ainsi que l'absence de nécrose hépatocytaire.

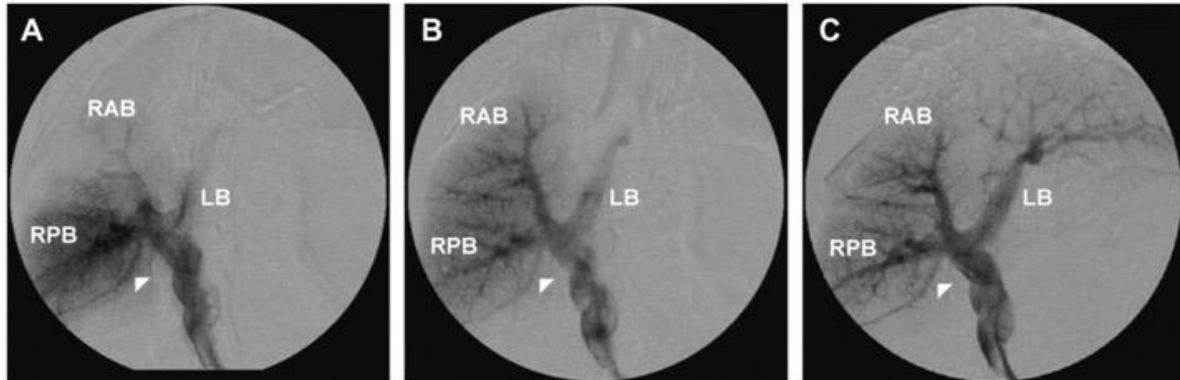


**Figure 11** Tolérance de la procédure d'EPPR chez le macaque<sup>144</sup>

(A) Evolution de la pression portale avant puis immédiatement après l'embolisation (portal vein embolization, PVE) des branches antérieure droite (RAB, right anterior branch) et gauche (LB, left branch), puis 2 heures après embolisation. (B) Valeurs moyennes des tests biologiques hépatiques après EPPR au cours du temps en heures (H) et en jours (days, D) : AST, aspartate aminotransferase ; ALT, alanine aminotransferase ; GGT, gamma glutamyl transpeptidase ; AP, alkaline phosphatase ; BIL, bilirubine totale. (C) Examen histologique (20x) d'un lobe embolisé 3 jours après EPPR montrant du matériel d'embolisation résorbable dans la branche portale (flèche), une dilatation sinusoidale sans signe de nécrose.

La reperméabilisation portale après EPPR était étudiée à l'aide de portographies successives. L'occlusion des segments embolisés restait complète pendant 6-8 jours puis une

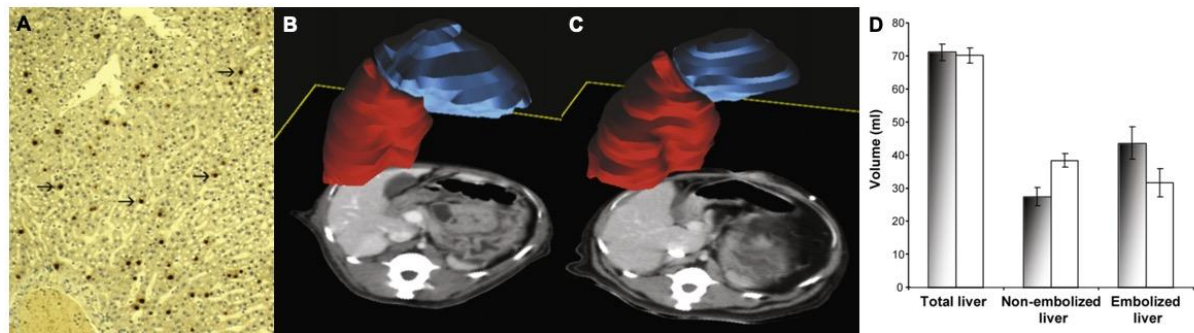
reperméabilisation progressait des veines proximales vers la périphérie. Le système porte était complètement reperméabilisé au bout de 2 semaines.



**Figure 12** Reperméabilisation des branches portales après EPPR chez le macaque<sup>144</sup>

Portographies successives après EPPR montrant une reperméabilisation progressive de la partie proximale des branches antérieure droite (right anterior branch, RAB) et gauche (left branch, LB) à J8 (A), une revascularisation complète du lobe antérieur droit à J12 (B), une revascularisation complète du foie total à J14 (C). La branche portale postérieure droite (RPB, right posterior portal branch) n'a pas été embolisée.

Malgré la réversibilité et la courte durée de l'occlusion portale, l'EPPR a induit une prolifération hépatocytaire importante dans les segments hépatiques non embolisés. Cette embolisation a permis une prolifération hépatocytaire de 13,5%, 10,5% et 9,1% à J3, J5 et J7, respectivement. Cette cinétique était très proche de celle observée après EPP non résorbable dans le même modèle animal<sup>96</sup>. Des scanners effectués avant et après embolisation ont montré une importante augmentation du volume du foie non embolisé, de l'ordre de 40% un mois après EPPR (passant de 27,4 mL à 38,4 mL,  $P < 0,01$ ). Ces modifications de volume étaient stables à un an de la procédure (38,5 mL).



**Figure 13** Impact de l'EPPR sur la prolifération hépatocytaire et la régénération hépatique (A) Examen histologique (10x) des lobes non embolisés montrant de nombreux hépatocytes en division après marquage au BrdU. (B et C) Volumétrie des lobes non embolisés (en rouge) et embolisés (en bleu) respectivement avant et 1 mois après EPPR. (C) Volumes du foie total, des lobes non embolisés, et des lobes embolisés avant (en gris) et après EPPR.

En 2012, Van den Esschert et al. ont comparé l'effet de plusieurs matériaux d'embolisation sur la régénération hépatique chez le lapin blanc de Nouvelle Zélande<sup>145</sup>. La procédure était bien tolérée. La reperméabilisation après EPPR était quasi-complète à J7. Après EPPR, l'hypertrophie des lobes non embolisés était de  $17,2 \pm 9,5\%$  à J3 et de  $26,4 \pm 13,1\%$  à J7. La régénération hépatique (par évaluation volumétrique) et la prolifération hépatocytaire (par évaluation immunohistochimique du Ki67) étaient significativement supérieures à J7 dans les groupes ayant subi une EPP définitive avec un matériel non résorbable par rapport au groupe ayant subi une EPPR.

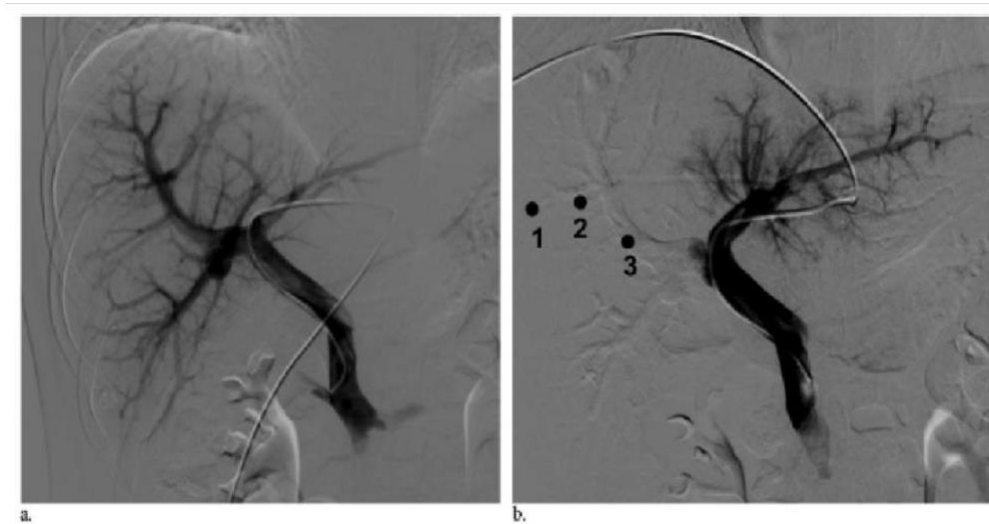
Wirsching et al. ont rapporté en 2017 les résultats d'une étude menée chez la souris, comparant les résultats d'une EPP définitive à l'aide d'un matériel non résorbable à une EPPR<sup>146</sup>. La procédure était bien tolérée. A 30 jours de la procédure, l'hypertrophie des lobes non embolisés était similaire après EPPR et EPP non résorbable ( $103 \pm 26\%$  and  $129 \pm 13\%$ ,  $P=0.11$ ).

### 2.2.1.2 Résultats de l'EPPR chez l'homme

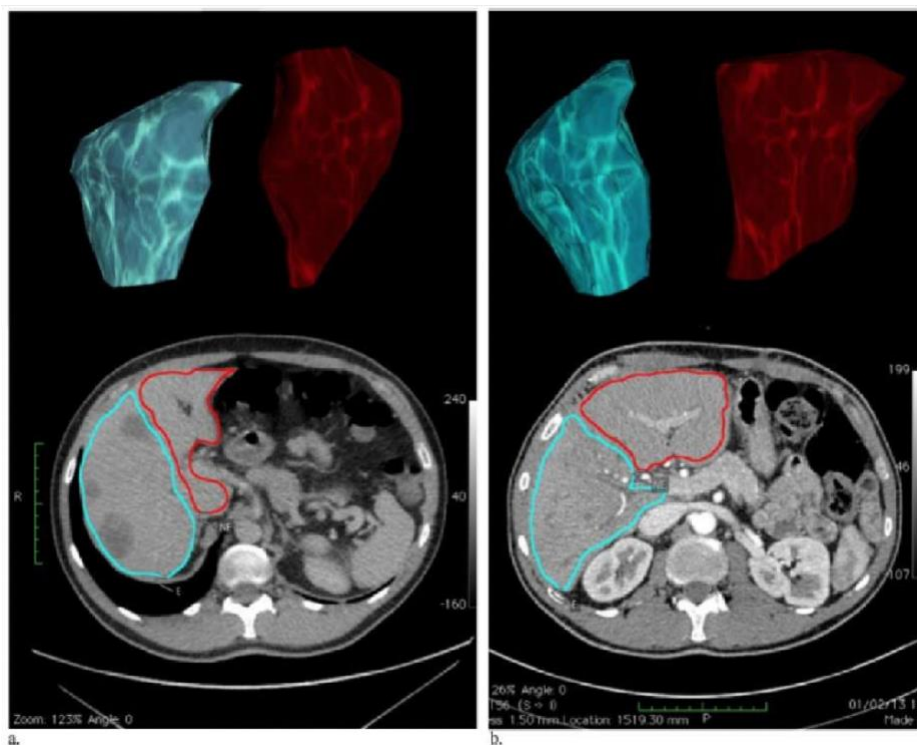
L'utilisation d'un agent résorbable à des fins d'embolisation portale chez l'homme a principalement été rapportée par des séries asiatiques<sup>147,148</sup>. Le matériau d'embolisation est obtenu à partir de bandes ou de fractions de bandes d'éponge de gélatine. Si le pourcentage d'hypertrophie rapporté par ces séries semble inférieur à celui obtenu dans les séries rapportant l'utilisation de cyanoacrylate (17,8-38,8% *versus* 27,5-69,4%)<sup>85</sup>, le taux de réalisation de l'hépatectomie n'apparaît pas réduit en cas d'EPPR.

Suite aux résultats encourageants obtenus chez le macaque<sup>144</sup>, l'EPPR à l'aide de poudre de gélatine a été appliquée en pratique clinique à l'hôpital Antoine Béchère. Les résultats d'une série de 20 patients ayant subi une EPPR avant hépatectomie ont été rapportés en 2015<sup>149</sup>. Le but de cette étude pilote de faisabilité était d'examiner l'effet de l'EPPR à l'aide de poudre de gélatine chez des patients adultes nécessitant une résection hépatique majeure et de discuter les éventuels avantages de cette approche.

Parmi les 20 patients, 6 présentait une cirrhose. La procédure a été réalisée avec succès chez tous les patients et la résection hépatique a finalement pu être effectuée chez 15 d'entre eux. Le principal résultat de cette étude est que l'EPPR a entraîné une hypertrophie suffisante du FFR (29%) pour pouvoir systématiquement envisager une chirurgie. Le FFR était notamment assez important en volume pour envisager la chirurgie chez les 5 patients qui n'ont finalement pas été opérés du fait d'une progression concomitante de la maladie tumorale. Seul un patient cirrhotique a présenté une décompensation d'ascite après l'hépatectomie, résolutive sous traitement médical.



**Figure 14** Portographies avant (a) et immédiatement après (b) embolisation résorbable de la branche portale droite. Une obstruction sectorielle (3), segmentaire (2) et sous-segmentaire (1) est visible.



**Figure 15** Reconstructions 3D de scanners réalisés avant (a) et après (b) embolisation résorbable (foie embolisé en bleu, foie non embolisé en rouge).

Le pourcentage d'hypertrophie du foie non embolisé (29%) était inférieur à celui observé dans notre modèle préclinique<sup>144</sup> et à celui observé par certaines équipes ayant utilisé un agent non résorbable<sup>141</sup>. Cependant, dans notre modèle de primate, environ 70% du foie était systématiquement embolisé, ce qui a entraîné une hypertrophie de 40% du FFR. De plus, 7 patients dans notre étude présentaient un parenchyme hépatique sous-jacent pathologique, ce qui a pu diminuer l'efficacité de l'EPPR. Dans la littérature, l'intervalle du taux d'hypertrophie du FFR après embolisation est large, allant de 8%<sup>150</sup> à 64%<sup>141</sup>. Ce taux dépend du type de matériau d'embolisation utilisé, du parenchyme hépatique sous-jacent et du volume de foie embolisé. Le seuil exact du taux minimal d'hypertrophie du FFR nécessaire est peu clair, comme celui du seuil minimal du volume du FFR. Les études futures devraient s'intéresser au taux d'hypertrophie du FFR nécessaire à la réalisation d'une hépatectomie dans de bonnes conditions plutôt que centrer l'analyse sur ce seul taux d'hypertrophie.

L'embolisation à l'aide d'un agent non résorbable était initialement considérée comme inapte à induire une régénération hépatique notamment sur la base des résultats obtenus chez le chien<sup>143</sup>. L'efficacité de notre technique d'EPPR à l'aide de poudre de gélatine pourrait être liée à sa capacité à entraîner une obstruction veineuse distale. En effet, la gélatine avait été utilisée sous forme de bandes, entraînant une obstruction proximale du système porte et une possible reperméabilisation plus rapide des lobes après embolisation.

Ces résultats préliminaires ont servi de base à l'élaboration d'une étude clinique de phase II qui a été mise au point avec l'aide de l'unité de recherche clinique (URC) Paris-Sud et la Fédération de Recherche en Chirurgie (FRENCH). Elle a été retenue en 2015 dans le cadre d'un projet hospitalier de recherche clinique (étude EMBORES, investigateur principal : Pr. Dagher). Cette étude multicentrique est actuellement en cours.

### 2.2.1.3 Intérêt de l'EPPR pour les procédures d'embolisation complexes

Dans notre étude chez l'homme<sup>149</sup>, l'EPPR a notamment été réalisée en toute sécurité chez 3 patients ayant nécessité une embolisation étendue. Un des patients a eu une EPPR de la branche portale gauche associée à une embolisation de la branche du secteur antérieur droit, un second patient a eu une EPPR de la branche portale droite et de la branche du segment IV

et un troisième patient ayant un antécédent de lobectomie gauche a subi une embolisation portale droite. Au cours de l'embolisation du premier patient (embolisation portale gauche étendue au secteur antérieur droit) une fuite limitée de produit d'embolisation dans le secteur postérieur s'est produite. Cet incident n'a eu aucune conséquence néfaste particulière. L'utilisation d'un agent non résorbable dans ce cas aurait pu entraîner une embolisation portale complète et irréversible, ce qui est une complication redoutée (bien que très rare) et grave de l'EPP. La majorité des équipes qui réalisent des embolisations portales recommandent que l'EPP soit réalisée dans une unique branche portale<sup>151</sup>. Une EPPR est potentiellement plus sûre et son utilisation pourrait permettre à plus de patients de recevoir une embolisation portale étendue (cinq segments hépatiques).

### 2.2.2 Intérêt de l'EPPR pour la transplantation d'hépatocytes

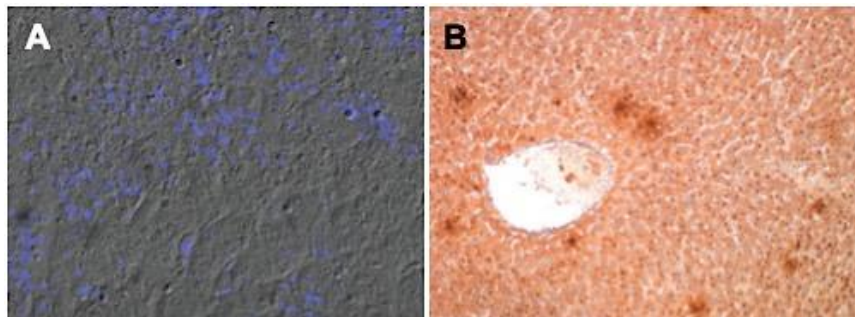
Malgré de bons résultats en termes de prise de greffe hépatocytaire après EPP non résorbable, une obstruction définitive d'une branche portale serait difficilement envisageable dans le cadre d'un essai sur la THE. En effet, elle exposerait le patient à un risque d'extension du thrombus au tronc porte. Par ailleurs l'évolution à long terme d'un lobe embolisé et non réséqué n'est pas documentée. Il était donc essentiel de développer une technique d'EPP temporaire capable d'induire une régénération hépatique pour améliorer la prise de greffe hépatocytaire.

La technique d'EPPR à l'aide de poudre de gélatine avait été développée par notre équipe chez le macaque<sup>144</sup>. Cette approche a dans un deuxième temps été appliquée dans le même modèle dans le cadre de la THE<sup>152</sup>. Une lobectomie gauche (représentant environ 20% du volume du foie total) était réalisée en vue de l'isolement des hépatocytes. Les hépatocytes isolés étaient ensuite marqués au Hoechst ou à la GFP (dans ce cas après transduction des hépatocytes à l'aide d'un lentivirus exprimant la GFP). Une autotransplantation de ces hépatocytes marqués était réalisée après EPPR.

La procédure était bien tolérée. Malgré une augmentation temporaire des transaminases, il n'a pas été noté de réaction inflammatoire, immunitaire ou de nécrose hépatocytaire liée au produit d'embolisation ou aux cellules transduites par le lentivirus.

L'expression du Hoechst à 14 jours de la transplantation était d'environ 7%. A plus long terme (8 à 16 semaines), on observait 2% d'expression de la GFP. En prenant en compte le taux de transduction de 35%, cela correspondait à une prise de greffe stable par rapport à ce qu'il avait été observé à 14 jours de la greffe.

La prolifération des hépatocytes greffés, marqués au Hoechst ou transduits par le lentivirus exprimant la GFP, a été démontrée par la présence des clusters cellulaires deux semaines après la transplantation, suggérant que les cellules transplantées avaient participé à la régénération hépatique.



**Figure 16** Prise de greffe à court terme (J14) après EPPR et THE

(A) Image de microscopie à fluorescence d'hépatocytes marqués au Hoechst. (B) Etude immunohistochimique dirigée contre la GFP avec marquage des hépatocytes transplantés exprimant la GFP après transduction.

Ces résultats ont permis l'élaboration d'une étude clinique portant sur la transplantation d'hépatocytes allogéniques après EPPR pour le traitement du déficit congénital du cycle de l'urée. Elle a été retenue en 2009 dans le cadre d'un projet hospitalier de recherche clinique (investigateur principal : Pr. Dagher). Ce projet a été abandonné.

**En conclusion**, notre équipe a mis au point une procédure d'embolisation temporaire à l'aide d'un matériel résorbable. Chez le primate non humain, la reperméabilisation complète des branches portales embolisées est atteinte deux semaines après l'EPPR. Avec une bonne tolérance, elle a permis une hypertrophie suffisante du FFR pour envisager une



chirurgie hépatique. L'EPPR a également été appliquée dans notre protocole d'autotransplantation d'hépatocytes chez le primate. Notre équipe a démontré une prise de greffe hépatocytaire suffisante pour espérer un effet métabolique, stable à moyen terme. Les projets d'application clinique n'ont pas abouti.

### **2.3 Embolisation portale partielle résorbable répétée (EPPRR)**

La technique d'embolisation que nous avons mise au point étant temporaire, nous nous sommes naturellement demandés si ce stimulus pouvait être répété. Le premier questionnement était essentiellement de l'ordre du fondamental : peut-on induire de manière répétée un stimulus de régénération ? Par la suite, après le développement d'une technique d'embolisation portale partielle résorbable répétée (EPPRR), quel pourraient en être les intérêts en pratique clinique et dans le cadre de la transplantation d'hépatocytes ?

#### **2.3.1 Intérêt de l'EPPRR en chirurgie hépatique**

La mise au point d'une technique capable d'induire une régénération répétée d'une partie du foie pourrait être intéressante d'un point de vue clinique. En effet, si la chirurgie représente le traitement de choix dans de nombreuses pathologies cancéreuses hépatiques, primitives ou secondaires, offrant la meilleure survie à long terme<sup>4</sup>, la majorité des patients présentant des tumeurs hépatiques ne peuvent accéder à un traitement chirurgical. A titre d'exemple, environ 15 à 25% des patients touchés par des métastases hépatiques d'un cancer colorectal présentent une maladie jugée inopérable au moment du diagnostic et ne peuvent bénéficier d'une résection complète de leurs lésions hépatiques<sup>153</sup>.

Comme discuté au chapitre 1, l'insuffisance hépatique postopératoire constitue la principale cause de décès après résection hépatique<sup>46,154</sup>. Le risque d'insuffisance hépatique est directement lié au volume du FFR. Ainsi, la répétition du stimulus d'embolisation pourrait favoriser une croissance forte du foie non embolisé et permettre ainsi une chirurgie chez des patients présentant initialement un très petit FFR, notamment en cas de parenchyme hépatique pathologique. Cette situation peut se présenter par exemple chez des patients

opérés plusieurs fois de résections hépatiques pour des métastases d'un cancer colorectal et ayant reçu de manière concomitante des cures répétées de chimiothérapie. En cas de nouvelle récurrence hépatique, cette technique pourrait permettre une hépatectomie majeure préservant moins de trois segments hépatiques ce qui pour l'instant est rarement envisageable.

Nous l'avons vu, l'EPPR a permis d'envisager une chirurgie de résection hépatique chez tous les patients de notre série rétrospective<sup>149</sup>. Cinq patients (25%) n'ont pu être réséqués du fait d'une progression de la maladie tumorale, ce qui s'approche du taux de 18,9% rapporté dans une méta-analyse récente<sup>70</sup>. Dans cette étude, la deuxième raison pour laquelle les patients n'ont pu être opérés était une hypertrophie insuffisante du FFR après embolisation, dans 4,0% des cas. Ainsi, en cas d'hypertrophie insuffisante après EPPR, il serait envisageable de répéter la procédure d'embolisation pour stimuler la régénération du FFR. L'EPPRR pourrait dans ce contexte devenir une stratégie de sauvetage à la manière de l'embolisation veineuse hépatique après EPP non résorbable.

Enfin, l'EPPRR pourrait trouver un rôle en cas de nécessité d'une chirurgie hépatique accélérée. De fait, la plupart des équipes chirurgicales réalisent l'hépatectomie majeure plus de 30 jours après EPP<sup>155</sup>. La répétition rapide du stimulus pourrait éventuellement entraîner une régénération accélérée du FFR et permettre ainsi une chirurgie hépatique plus précoce. Cette stratégie pourrait être utile chez les patients atteints par des métastases hépatiques bilobaires d'un cancer colorectal. Une EPPRR pourrait s'intégrer dans une approche chirurgicale classique en deux temps et représenterait une alternative à la stratégie d'ALPPS évoquée au chapitre 1.

### 2.3.2 Intérêt de l'EPPRR en transplantation hépatique à donneur vivant

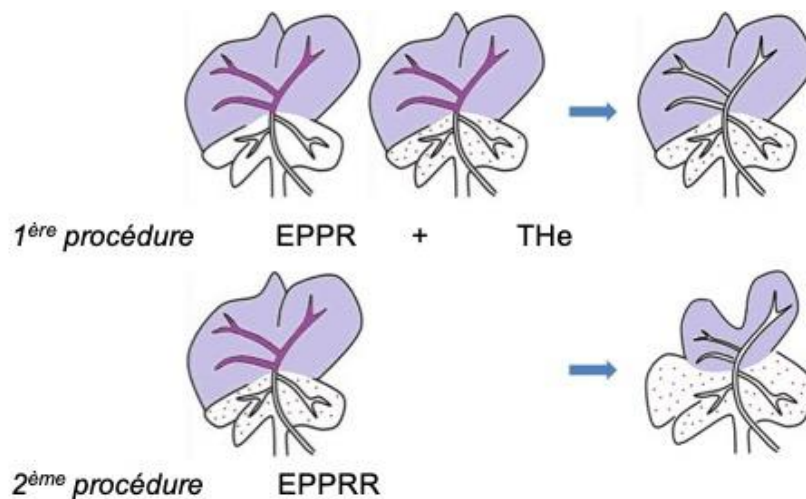
La transplantation hépatique à donneur vivant (THDV) est une alternative à la transplantation hépatique à donneur cadavérique pour remédier à la pénurie d'organe et éviter le décès sur liste d'attente des patients présentant une insuffisance hépatique terminale.

En transplantation pédiatrique, le prélèvement chez un donneur adulte d'un lobe gauche remplit les conditions de masse parenchymateuse du greffon suffisantes avec un risque acceptable pour le donneur, puisque l'exérèse hépatique ne dépasse pas 30% du foie. Les différentes techniques de prélèvement et d'implantation du lobe gauche ont été rapportées en détail et sont aujourd'hui standardisées<sup>156</sup>. Une THDV d'adulte à adulte est généralement réalisée après prélèvement du foie droit du donneur, qui correspond à 60-70% du volume total du foie<sup>157</sup>. D'un point de vue chirurgical, une hépatectomie droite constitue une procédure plus importante qu'une hépatectomie gauche. Puisque cette dernière est associée à une morbidité moindre, le prélèvement du foie gauche peut être préférable au prélèvement du foie droit. Cependant, les receveurs d'un greffon hépatique gauche sont plus susceptibles de développer un « small for size syndrome » du fait d'un volume hépatique insuffisant pour assurer une fonction hépatocellulaire correcte.

Ainsi, l'hypertrophie d'un futur greffon gauche chez le donneur avant prélèvement pourrait s'inscrire dans cette stratégie. On pourrait même imaginer réaliser le prélèvement d'une lobectomie gauche. La réalisation d'une EPPRR du reste du foie du donneur (foie droit et segment IV) devrait permettre d'hypertrophier le lobe gauche qui pourrait ainsi être prélevé puis transplanté chez le receveur.

### 2.3.3 Intérêt de l'EPPRR pour la transplantation d'hépatocytes

La technique d'EPPRR que nous avons mis au point chez le rat<sup>158</sup> pourrait avoir un intérêt dans le cadre de la transplantation d'hépatocytes. En entraînant un second stimulus de régénération hépatique, l'EPPRR favoriserait la multiplication des hépatocytes thérapeutiques transplantés et donc leur nombre. Par ailleurs, une atrophie supplémentaire du territoire embolisé entraînerait automatiquement une augmentation du pourcentage de cellules thérapeutiques dans la masse hépatique totale. On pourrait même imaginer répéter plusieurs fois l'embolisation portale dans le but d'augmenter le nombre d'hépatocytes thérapeutiques au détriment des hépatocytes natifs.



**Figure 17** Intérêt de l'EPPRR au cours de la The chez le rat

Au cours de la première procédure, l'EPPR est associée à la The pour promouvoir la prise de greffe hépatocytaire. Après reperméabilisation des branches portales embolisées, la deuxième procédure consiste en une EPPRR pour favoriser la multiplication des hépatocytes transplantés au cours de la première procédure.

**En conclusion,** la mise au point d'un stimulus permettant une régénération hépatique répétée pourrait avoir plusieurs intérêts : une hypertrophie maximale du FFR avant hépatectomie majeure étendue, une procédure de sauvetage en cas d'hypertrophie insuffisante au cours des stratégies en deux temps chez les patients porteurs de métastases bilobaires, une répétition du stimulus de régénération hépatique afin d'entraîner une prolifération des cellules greffées après une première The.

## CONCLUSIONS

L'EPP définitive est une procédure sûre et efficace, et son intérêt au cours de la THe a pu être démontré chez l'animal, permettant une prise de greffe satisfaisante et un effet métabolique. Dans le but de proposer une approche moins invasive pour le « préconditionnement » du foie, notre équipe a développé une EPP temporaire à l'aide d'un matériel résorbable. La capacité de cette EPPR à induire une régénération hépatique a été démontrée chez le primate non humain et a ensuite été appliquée avec succès en pratique clinique. Le stimulus de régénération engendré par l'EPPR a également été utilisé au cours de la THe pour améliorer la greffe d'hépatocytes autologues chez le primate non humain, permettant d'améliorer substantiellement la prise de greffe hépatocytaire. Puisque l'EPPR est responsable d'une occlusion portale temporaire, la possibilité d'une deuxième embolisation à l'issue de la reperméabilisation portale pourrait induire un stimulus de régénération supplémentaire. Cette EPPRR présente plusieurs intérêts potentiels en chirurgie du foie et pour la THe.



**OBJECTIFS**

Notre équipe a développé une approche d'embolisation portale temporaire, l'EPPR, qui induit efficacement un stimulus de régénération hépatique. Cette technique est utilisée en pratique clinique courante dans le cadre de la chirurgie hépatique de manière à hypertrophier le FFR et permettre une résection hépatique majeure. En effet, un faible volume du FFR peut contre-indiquer la chirurgie pour certains patients, les privant ainsi du principal traitement curatif des lésions malignes du foie.

L'induction d'une régénération hépatique est une approche qui a été utilisée dans de nombreux modèles animaux afin de favoriser la prise de greffe hépatocytaire au cours de la The pour le traitement des MMHH. La majorité de ces modèles animaux ne sont pas transposables chez l'homme car ils présentent des risques importants ou mal évalués pour les patients. Le caractère temporaire de l'EPPR fait d'elle une technique intéressante pour préparer le foie du receveur à recevoir les hépatocytes transplantés. Notre équipe a pu démontrer son efficacité dans ce contexte.

Puisque l'EPPR est responsable d'une occlusion portale temporaire, nous avons envisagé la possibilité de procéder à une deuxième embolisation à l'issue de la reperméabilisation portale. La répétition du stimulus de régénération permettrait d'amplifier la prolifération hépatocytaire et donc la régénération hépatique. Cette EPPRR pourrait présenter plusieurs intérêts potentiels, en chirurgie du foie afin d'obtenir une hypertrophie majeure, et pour la The afin d'entraîner une prolifération des cellules greffées après une première The, augmentant le nombre d'hépatocytes thérapeutiques. Ces hypothèses ont servi de base au travail de thèse présenté ici.

Les principaux objectifs de ce travail ont été d'étudier les effets d'une EPPRR dans deux buts précis : favoriser la régénération hépatique afin d'élargir les possibilités de prise en charge des patients nécessitant une hépatectomie ; favoriser la prise de greffe au cours de la The pour le traitement des MMHH.

Dans un premier temps, nous avons mis au point chez le rat la technique d'EPPRR visant à induire un stimulus répété de régénération hépatocytaire. Dans un deuxième temps,



nous avons mis au point un protocole de THe après EPPR chez le rat afin d'évaluer l'utilisation de l'EPPRR avant THe. Enfin, nous avons évalué dans une étude préclinique de faisabilité l'effet de l'EPPRR dans un modèle porcin.



**RESULTATS**



**Liver regeneration following repeated reversible  
portal vein embolization in an experimental model**

**Hadrien TRANCHART, Marcellin KOFFI, Martin GAILLARD,  
Panagiotis LAINAS, Christian POÛS, Patrick GONIN, Tuan Huy  
NGUYAN, Anne DUBART-KUPPERSCHMITT, Ibrahim DAGHER**

***Br J Surg* 2016; 103(9):1209-19**

## PRESENTATION DE L'ARTICLE

Notre équipe a développé chez le primate non humain une technique efficace d'EPPR à l'aide de poudre de gélatine (Gelita-Spon® ; Gelita Medical, Eberbach, Germany)<sup>144</sup>. Cette embolisation temporaire a une durée d'environ 2 semaines et permet une régénération hépatique efficace et stable. Ces résultats ont été confirmés chez l'homme dans une étude préliminaire de faible effectif<sup>149</sup>. Le caractère résorbable de l'agent d'embolisation nous a permis d'envisager de répéter ce stimulus pour espérer une régénération encore plus importante. Notre idée était de démontrer la faisabilité technique, la qualité et la réversibilité de la procédure d'EPPRR et d'évaluer son efficacité en termes de régénération hépatocytaire.

Bien que le modèle du primate non humain soit celui à partir duquel l'EPPR avait été mise au point et qu'il soit plus proche de l'homme, nous avons décidé d'utiliser le modèle du rat pour des questions de diminution des coûts, d'accessibilité et de simplicité d'expérimentation. La procédure d'embolisation que nous avons cherché à développer chez le rat devait intéresser les branches des lobes médian et latéral gauche, correspondant à 70% du volume total du foie<sup>159</sup>. Lors des étapes de mise au point, la principale limite technique de notre procédure était liée à la petite taille des vaisseaux du rat, nous obligeant à utiliser une concentration plus faible de matériel résorbable que celle que nous avons utilisée chez le singe<sup>144</sup> et que nous utilisons actuellement chez l'homme<sup>149</sup>. Chez le primate, nous avons utilisé un microcathéter d'angiographie après ponction d'une veine mésentérique pour emboliser de façon sélective les branches portales de la distalité vers les branches proximales sous contrôle scopique<sup>144</sup>. Cette approche n'était pas envisageable chez le rat et nous avons dû ponctionner directement les branches portales que nous souhaitions emboliser. Cette technique plus invasive entraînait un saignement qui nous a obligés à diminuer la taille de l'aiguille de ponction et donc la concentration du produit d'embolisation. Cette nouvelle concentration permettait cependant une occlusion complète des branches et du tronc commun des lobes médian et latéral gauche du foie, ce qui a pu être attesté par portographie.

Chez le primate, la reperméabilisation des branches portales embolisées était complète à 14 jours de l'EPPR<sup>144</sup>. Chez le rat, le contrôle par portographie réalisée après le même délai (à J14) montrait une reperméabilisation complète du réseau veineux portal. Par ailleurs, il a été démontré que plus de 90% de la régénération hépatique survient au cours des 7 premiers jours après occlusion portale partielle chez le rat<sup>160</sup>, aussi nous n'attendions pas d'effet supplémentaire du stimulus de prolifération avec un intervalle de temps plus long. Ainsi, l'intervalle de temps entre la première EPPR et l'EPPRR a été déterminé à 14 jours.

# Liver regeneration following repeated reversible portal vein embolization in an experimental model

H. Tranchart<sup>1,2,3,5</sup>, G. M. Koffi<sup>1,2,3</sup>, M. Gaillard<sup>1,2,3,5</sup>, P. Lainas<sup>1,2,3,5</sup>, C. Poüs<sup>6</sup>, P. Gonin<sup>4</sup>, T. H. Nguyen<sup>7</sup>, A. Dubart-Kupferschmitt<sup>1,2,3</sup> and I. Dagher<sup>1,2,3,5</sup>

<sup>1</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U1193 and <sup>2</sup>Département Hospitalo-Universitaire Hépatinov, Paul Brousse Hospital, <sup>3</sup>Unité Mixte de Recherche, Paris-Sud University, and <sup>4</sup>Service Commun d'Expérimentation Animale, Gustave Roussy Institut, Villejuif, Departments of <sup>5</sup>Minimally Invasive Surgery and <sup>6</sup>Biochemistry, Antoine-Becclere Hospital, Assistance Publique – Hôpitaux de Paris, Paris-Sud University, Clamart, and <sup>7</sup>INSERM U1064, Hôtel Dieu Hospital, Nantes, France

Correspondence to: Professor I. Dagher, Department of Minimally Invasive Surgery, Antoine-Becclere Hospital, 157 Rue de la Porte de Trivaux, 92141 Clamart cedex, France (e-mail: ibrahim.dagher@abc.aphp.fr)

**Background:** Portal vein embolization (PVE) is used routinely to prevent postoperative liver failure as a result of anticipated insufficient future liver remnant volume following resection. The authors have recently developed a technique for temporary PVE. The aim of this study was to assess the effect of repeated reversible PVE on hepatocyte proliferation and subsequent liver hypertrophy in rodents.

**Methods:** Four treatments were compared ( $n = 21$  rats per group): single reversible PVE, two PVEs separated by 14 days, partial portal vein ligation or sham procedure. The feasibility and tolerance of the procedure were assessed. Volumetric imaging by CT was used to estimate the evolution of liver volumes. After death, the weight of liver lobes was measured and hepatocyte proliferation evaluated by immunostaining.

**Results:** Embolization of portal branches corresponding to 70 per cent of total portal flow was performed successfully in all animals. Repeated PVE induced additional hepatocyte proliferation. Repeated embolization resulted in superior hepatocyte proliferation in the non-occluded segments compared with portal vein ligation (31.1 versus 22.2 per cent;  $P = 0.003$ ). The non-occluded to total liver volume ratio was higher in the repeated PVE group than in the single PVE and sham groups ( $P = 0.050$  and  $P = 0.001$  respectively).

**Conclusion:** Repeated reversible PVE successfully induced additional hepatocyte proliferation and subsequent liver hypertrophy.

## Surgical relevance

Portal vein embolization (PVE) is used routinely to prevent postoperative liver failure as a result of anticipated insufficient future liver remnant volume following resection.

In the present study, a technique of repeated temporary PVE was developed in a rat model; this induced addi-

tional hepatocyte proliferation and an increase in liver volume compared with single embolization.

This novel approach might help induce major hypertrophy of the future remnant liver, which could increase the rate of patients amenable to major liver resections.

Paper accepted 10 February 2016

Published online 3 June 2016 in Wiley Online Library (www.bjs.co.uk). DOI: 10.1002/bjs.10153

## Introduction

Occlusion of one branch of the portal vein results in haemodynamic changes and upregulation of various humoral mediators, leading to atrophy of ipsilateral segments and hypertrophy of contralateral segments<sup>1</sup>. This technique is used routinely to prevent postoperative

life-threatening liver failure as a result of anticipated insufficient future liver remnant (FLR) volume following major liver resection. This partial portal vein occlusion can be performed either by portal vein ligation (PVL)<sup>2</sup> or by portal vein embolization (PVE)<sup>3</sup>.

In clinical practice, a non-absorbable material is generally used for PVE as the embolized liver is subsequently



removed. The present authors have developed a minimally invasive technique of efficient reversible PVE (RPVE) using an absorbable material (Gelfoam® powder; Pfizer, New York, USA) in a primate model<sup>4</sup>. This temporary embolization, lasting approximately 2 weeks, allowed efficient and stable liver regeneration. These results were confirmed recently in a limited preliminary series in clinical practice<sup>5</sup>. RPVE was performed successfully in 20 patients, resulting in a hypertrophy ratio of the non-embolized liver of 29 per cent, and allowing subsequent surgery in 15 patients.

These encouraging results led the authors to consider the possibility of repeated RPVE (RRPVE) to boost liver hypertrophy further. This could potentially lead to an increased number of patients being amenable to major liver resection, especially those with underlying liver disease. In humans, more than 50 per cent of liver growth is obtained within 2 weeks following permanent PVE<sup>6</sup>. The use of an absorbable material could allow a rapid second embolization, at the moment of completion of portal recanalization, maximizing liver hypertrophy by providing an additional regenerative stimulus. Before evaluating this approach in a large animal model, the effect of RRPVE on hepatocyte proliferation and subsequent liver hypertrophy was evaluated in rodents.

## Methods

Male Wistar rats (specific pathogen-free) aged 8–10 weeks and weighing 250–350 g were purchased from Janvier Labs (Saint-Berthevin, France). All animals were housed at the animal facility of Gustave Roussy Institute (Villejuif, France) in filter-topped cages (2 per cage) under clean, non-sterile, standard conditions for at least 5 days before the experiment. Animals were checked daily, fed with standard laboratory chow and given free access to water. All animals were treated in accordance with the European Community laws for animal care. The study was approved by the local ethics committee and by the French Ministry of Research. Study endpoints were defined to avoid unnecessary suffering of animals.

## Operative procedures

Four initial groups were created, each consisting of 14 rats; the first underwent selective RPVE of 70 per cent of portal vein flow (RPVE group), the second received two RPVEs of 70 per cent of portal vein flow separated by 14 days (RRPVE group), the third underwent PVL of 70 per cent of portal vein flow (PVL group), and animals in the fourth group received an injection of saline

into the portal vein (sham group). As permanent PVE is not a standardized procedure in rats, PVL was used as the standard procedure for liver regeneration. Rats were anaesthetized by inhalation of isoflurane/oxygen (Forane®; Baxter, Guyancourt, France). Buprenorphine (0.1 mg per kg bodyweight) was administered intraperitoneally during anaesthesia and repeated subcutaneously 12 h later. Operations were performed through a subcostal laparotomy. A 4/0 polyglactin (Vicryl®; Ethicon, Issy-les-Moulineaux, France) double-layer running suture was used for abdominal closure.

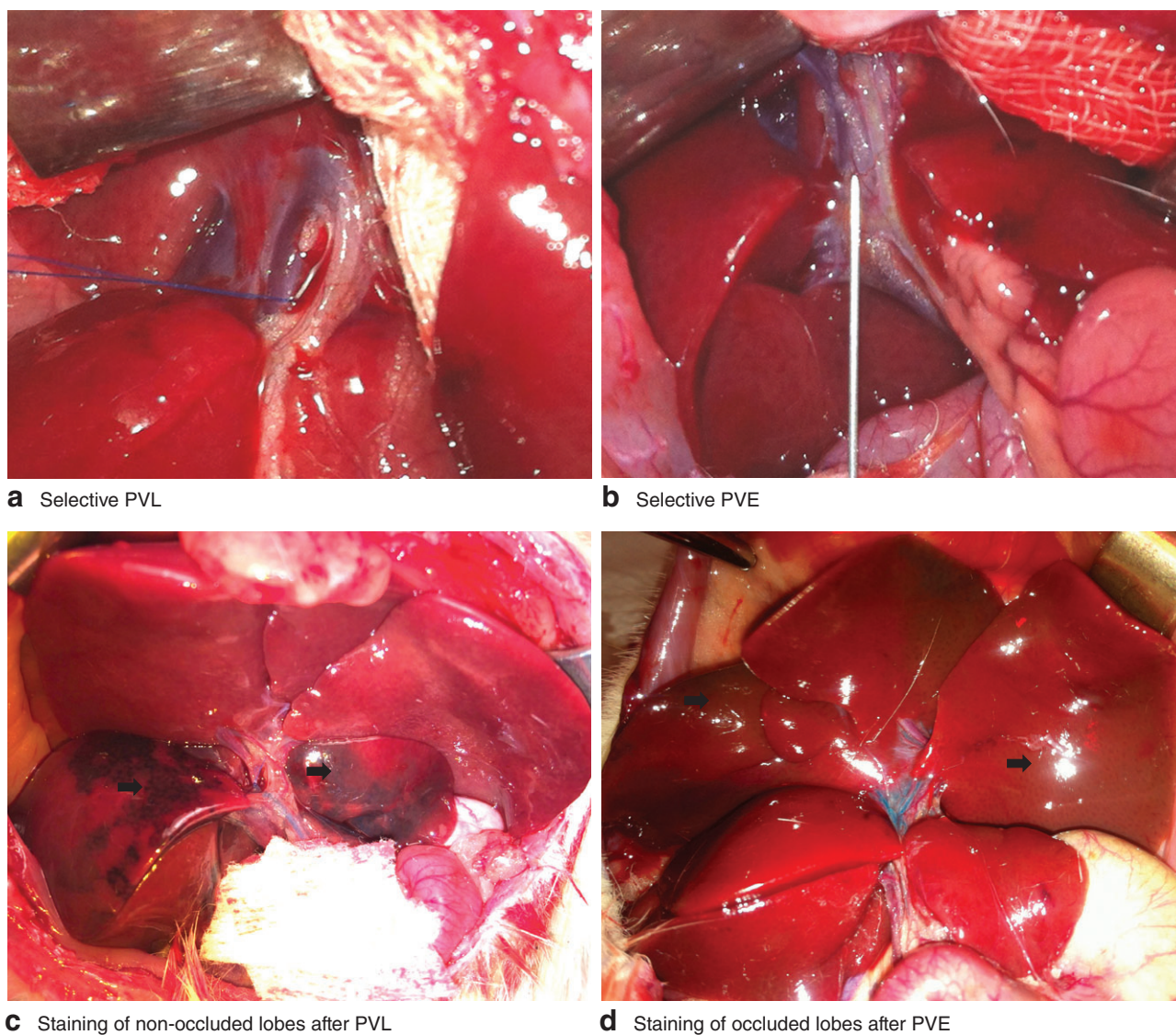
### Portal vein ligation

Selective ligation of the left lateral and median portal vein branches was performed. The right and caudate portal branches were kept patent. After careful dissection of the hepatic artery and biliary duct, the corresponding portal veins were ligated with a 7/0 polypropylene suture (Prolene®; Ethicon) (*Fig. 1*). Blue dye (Patent Blue V®; Guerbet, Roussy, France) was injected into the portal vein after PVL to confirm selective ligation. Before ligation, portography was performed by injecting 1 ml iodixanol (Visipaque® 320 mg/ml; GE Healthcare, Vélizy-Villacoublay, France) to visualize the portal anatomy. The same injection was repeated after PVL to demonstrate correct portal vein occlusion of ligated liver segments (*Fig. 2*).

### Portal vein embolization

Selective PVE of the portal branch of the left lateral and median lobes was performed by direct puncture of the corresponding branch with a 27-G needle (Microflex®; Vygon, Écouen, France). The right and caudate portal branches were left patent. The portal branch was occluded progressively with the powdered form of an absorbable gelatin sponge (Gelita-Spon®; Gelita Medical, Eberbach, Germany). Gelatin powder was suspended in saline (70 g/l) and the mixture was homogenized in a 37°C water bath. About 0.5 ml of the mixture was used for the embolization. Patent Blue V® was added to the embolization mixture in the first seven rats to ensure selective embolization (*Fig. 1*). Portography was used to map the portal branches before embolization and to confirm occlusion of appropriate liver segments after PVE (*Fig. 2*).

In the group of rats receiving RRPVE, the interval between embolizations was 14 days. This time frame was adopted as more than 90 per cent of liver regeneration occurs within 7 days following partial portal occlusion in rats<sup>7</sup>. In the primate non-human model, 14 days



**Fig. 1** Surgical procedure with **a** selective portal vein ligation (PVL) of the median and left lateral lobe branches and **b** selective portal vein embolization (PVE) of the same branch in the rat. Blue staining (arrows) of **c** non-occluded lobes after PVL and **d** occluded lobes after selective PVE

was enough to obtain complete recanalization of occluded portal branches<sup>4</sup>.

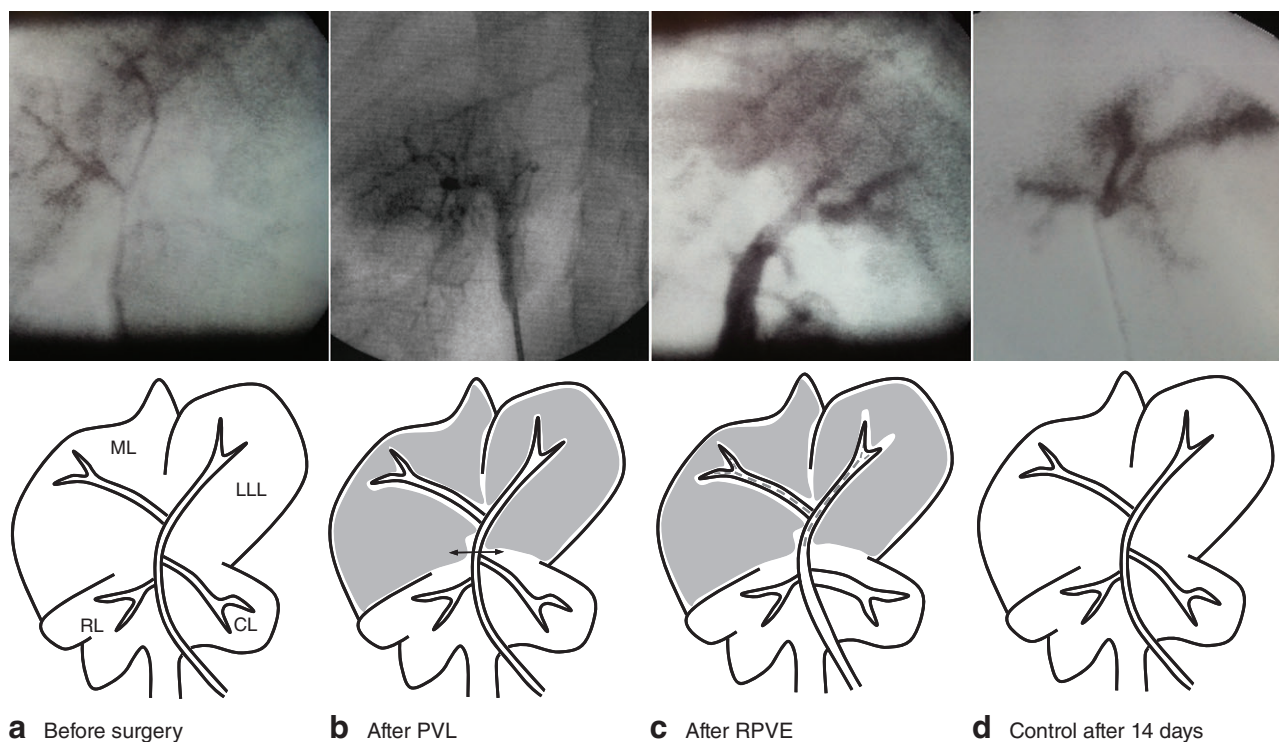
### Liver function tests

Blood samples were obtained from the sublingual vein under general anaesthesia before operation, and 1, 7 and 14 days after the surgical procedure. Samples were centrifuged immediately at 2000g for 6 min. Aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase and conjugated

bilirubin levels were measured in the local biochemistry department.

### Histological examination and liver regeneration assessment

One day after the last surgical procedure, seven rats in each group were killed under general anaesthesia. The remaining seven rats were killed 28 days after the first surgical procedure. Individual liver lobes were removed rapidly and weighed. Lung and small bowel samples were



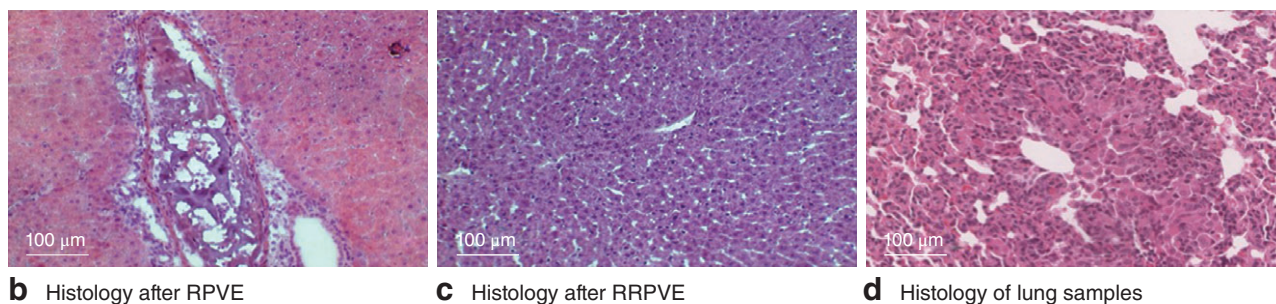
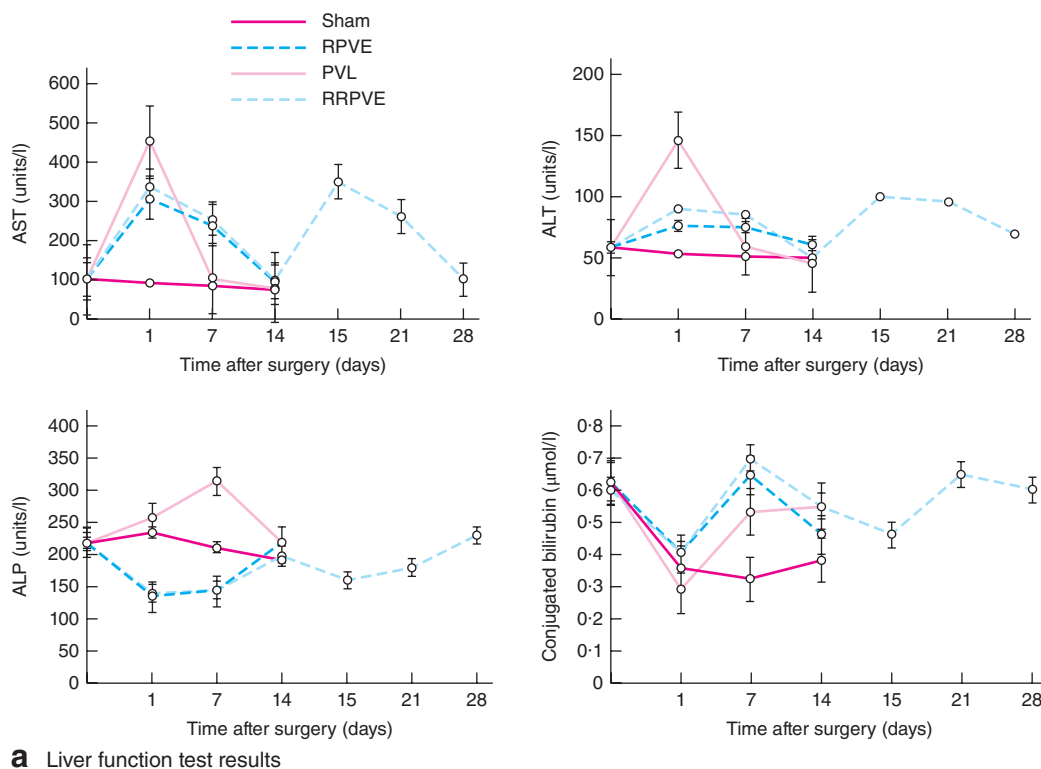
**Fig. 2** Portograms and schematic representations of the median (ML), left lateral (LLL), right (RL) and caudate (CL) lobe branches **a** before surgery and after **b** partial portal vein ligation (PVL) or **c** partial reversible portal vein embolization (RPVE) in the rat. Dilatation of the portal trunk and the CL branch is observed after RPVE (**c**). **d** Control portogram 14 days after reversible embolization shows complete portal recanalization

also collected to verify the absence of embolization material and to serve as a positive control for immunostaining respectively. Samples embedded in water-soluble glycols and resins (Tissue-Tek<sup>®</sup> OCT; Sakura, Villeneuve d'Ascq, France) were frozen in liquid nitrogen.

Liver proliferation was assessed on day 1 after surgery as the number of cycling hepatocytes has been shown to remain stable between 24 and 48 h after PVL in rats<sup>8</sup>. Immunostaining was carried out by incubation of 5- $\mu$ m cryostat sections with a rabbit monoclonal antibody against Ki-67 (ab16667, 1:100; Abcam, Paris, France) overnight at 4°C. Binding of the primary antibody was detected after incubation of slides with a secondary rabbit polyclonal peroxidase-linked antibody (NA9340, 1:100; GE Healthcare) for 1 h at room temperature. Finally, the peroxidase reaction was developed with diaminobenzidine (DAB) (Dako, Carpinteria, California, USA) for 10 min. Sections were counterstained with haematoxylin, dehydrated, cover-slipped and examined under a light microscope. For each biopsy, ten randomly selected sections were analysed, with at least 800 hepatocytes being counted in total.

Apoptosis was detected on days 1 and 28 using the terminal deoxytransferase-mediated dUTP nick-end labelling (TUNEL) method with an *in situ* apoptosis detection kit (Roche Life Science, Indianapolis, Indiana, USA). After fixation, inactivation of intrinsic peroxidase activity and permeabilization of apoptotic cells, frozen sections were incubated with the TUNEL reaction mixture containing terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) and fluorescein-dUTP. The incorporated fluorescein was detected with a peroxidase-conjugated anti-fluorescein antibody. The immunocomplexed peroxidase was visualized with a substrate reaction (DAB), and counterstaining done with haematoxylin. Samples were investigated by light microscopy. Controls for the TUNEL procedure were treated in the same manner as the test samples, except that the TdT enzyme was excluded from the reaction mixtures.

Liver regeneration was assessed by measurement of liver lobe weights 28 days after the first surgical procedure. The ratio of non-occluded liver weight to total liver weight was calculated as animals are still growing at the age of 8–10 weeks and bodyweights can differ. Two additional rats



**Fig. 3 a** Liver function test results before and up to 14 days after reversible portal vein embolization (RPVE), portal vein ligation (PVL), repeated RPVE (RRPVE) and sham operation; values are mean(s.d.). AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; ALP, alkaline phosphatase. Representative histological analysis of embolized segments showing the presence of Gelfoam® powder in a portal vessel and sinusoidal dilatation with no signs of necrosis 24 h after **b** single RPVE and **c** RRPVE; **d** no embolization material was observed in lung samples (haematoxylin and eosin staining of cryostat sections, original magnification ×20)

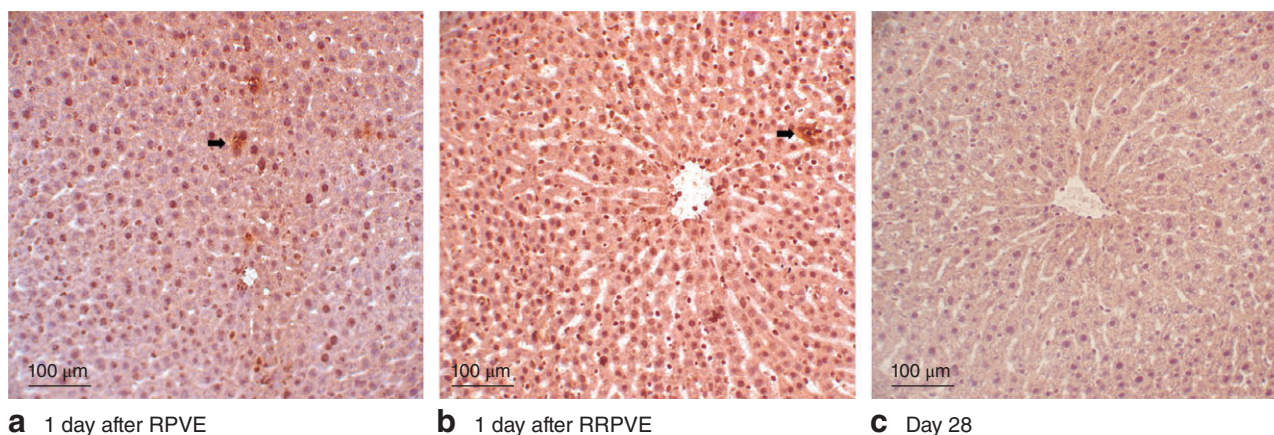
were killed 4 months after RRPVE to assess the long-term evolution of the non-occluded liver weight to total liver weight ratio. These two rats were analysed separately from those killed on day 28.

Volumetric imaging by CT was used in four groups of seven additional rats each, to illustrate the evolution of embolized and non-embolized liver volumes 28 days after the first surgical procedure. Serial scans were carried out with 118-μm continuous slices with a micro-CT scanner (PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, USA), and were enhanced by intravenous injection of contrast.

Volumetric reconstruction was obtained using Osirix® software (Pixmeo, Bernex, Switzerland).

**Statistical analysis**

A power calculation was performed in order to limit the number of animals. One-sided Fisher’s exact test was used to investigate the hypothesis that non-occluded liver weight to total liver weight ratio in the RRPVE group (experimental) was superior to that in the sham group (control). Type I and II error rates were set at 0.025 and 0.2



**Fig. 4** Apoptosis detected by terminal deoxytransferase-mediated dUTP nick-end labelling method on representative sections of liver lobes. Fewer than five apoptotic cells per field are observed in occluded liver lobes on day 1 after a reversible portal vein embolization (RPVE) and **b** repeated RPVE (RRPVE) (black arrow). **c** No labelling was found on day 28 (or in controls) (haematoxylin counterstain, original magnification  $\times 20$ )

respectively. The non-occluded liver weight to total liver weight ratio was expected to be 30 per cent in the sham group and 80 per cent in the RRPVE group, giving a group size of 14 animals.

Continuous variables are expressed as mean(s.d.). The Mann–Whitney *U* test was used to investigate differences between group means. Additionally, based on these results, the Hodges–Lehmann procedure was used to create a confidence interval (c.i.) with a point estimate of median differences between groups. Fisher's exact test was used for comparisons of categorical variables.  $P \leq 0.050$  was considered statistically significant. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism<sup>®</sup> 4 software (GraphPad, San Diego, California, USA).

## Results

Embolization and ligation of the left lateral and median lobe portal branches were performed successfully in all animals. None of the animals developed complete portal vein thrombosis. One animal in the RPVE group died from an unexplained cause, one in the RRPVE had to be killed soon after the second procedure owing to evisceration, and one in the PVL group died during anaesthesia.

Portograms carried out immediately after embolization and ligation confirmed complete obstruction of the left lateral and median lobe portal branches, and the patency of the remaining portal branches to the right and caudate lobes (Fig. 2). Complete recanalization of portal branches was observed after 14 days (just before the second embolization in the RRPVE group).

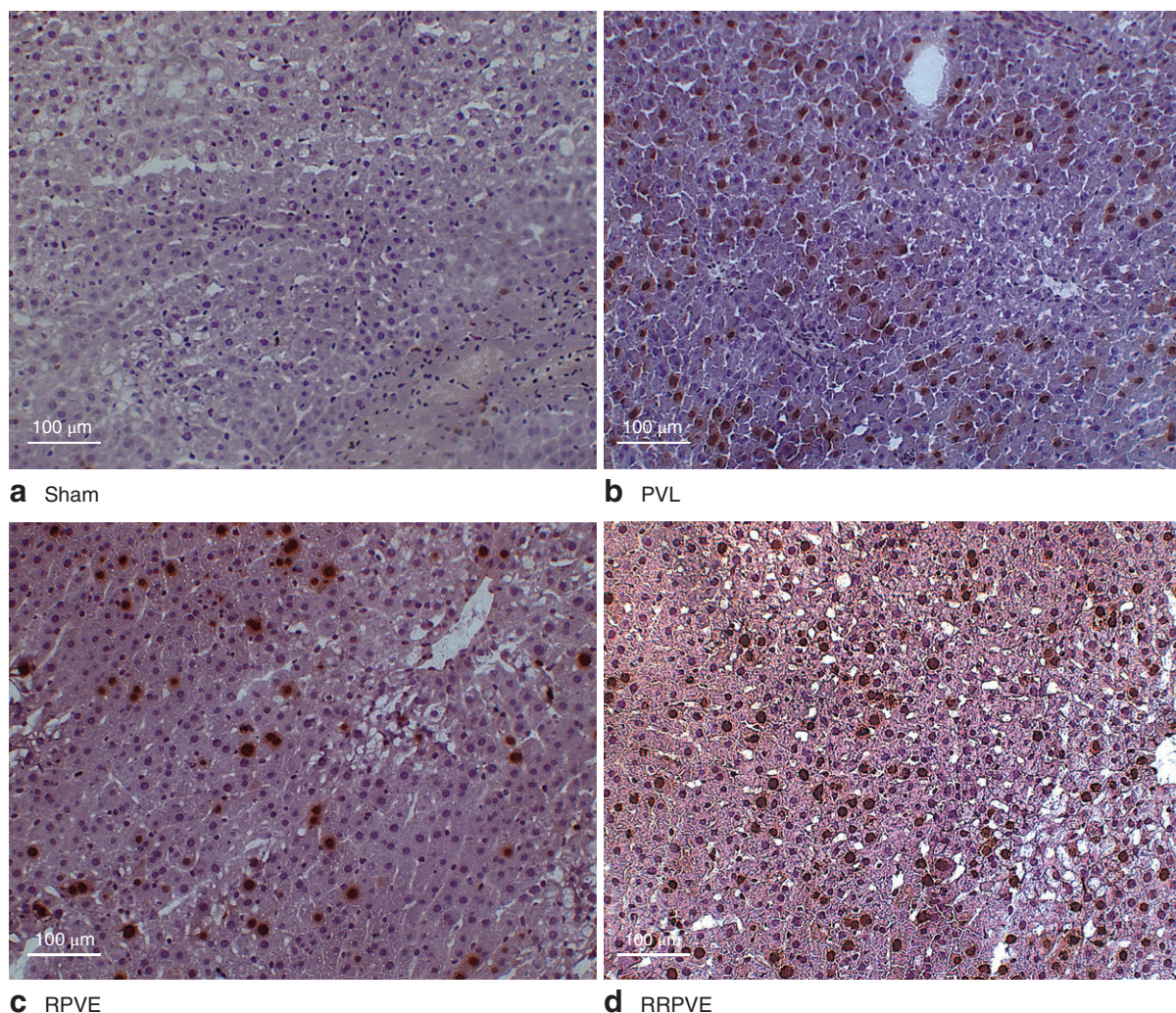
**Table 1** Hepatocyte proliferation (Ki-67 staining) in non-occluded liver lobes on day 1 after reversible embolization, portal ligation or repeated reversible embolization, and in the sham group

|                       | Hepatocyte proliferation (%) |              | <i>P</i> * |
|-----------------------|------------------------------|--------------|------------|
|                       | Right lobe                   | Caudate lobe |            |
| Sham ( <i>n</i> = 7)  | 0.8(0.5)                     | 0.9(0.3)     | 1.000      |
| RPVE ( <i>n</i> = 7)  | 17.3(20.1)                   | 10.4(10.1)   | 0.840      |
| PVL ( <i>n</i> = 7)   | 37.2(11.3)                   | 15.8(10.4)   | 0.090      |
| RRPVE ( <i>n</i> = 7) | 32.7(7.8)                    | 27.7(4.7)    | 0.330      |

Values are mean(s.d.). RPVE, reversible portal vein embolization; PVL, portal vein ligation, RRPVE, repeated RPVE. \*Fisher's exact test.

Serum AST and ALT levels increased transiently, returning to normal values by 7 days after embolization. Serum bilirubin and alkaline phosphatase levels did not change (Fig. 3).

Non-embolized liver parenchyma was histologically normal 24 h and 28 days after RPVE and RRPVE. Moderate sinusoidal dilatation without cell necrosis was observed in the embolized lobes after these procedures. Granulomatous reactions or foreign-body giant cells were not observed in the embolized liver. No embolization material was found in lung samples (Fig. 3). Fewer than five apoptotic cells per field (original magnification  $\times 20$ ) were detected on day 1 in occluded or non-occluded liver lobes (less than 0.01 per cent of liver cells) (Fig. 4). No statistical differences were observed in the number of apoptotic cells per field between the sham, RPVE, PVL and RRPVE groups (data not shown). No TUNEL labelling was found on day 28 or in the controls.



**Fig. 5** Hepatocyte proliferation shown by Ki-67 histoimmunostaining on representative sections of right lobe in **a** sham, **b** portal vein ligation (PVL), **c** partial reversible portal vein embolization (RPVE) and **d** partial repeated RPVE (RRPVE) groups (haematoxylin counterstain, original magnification  $\times 20$ )

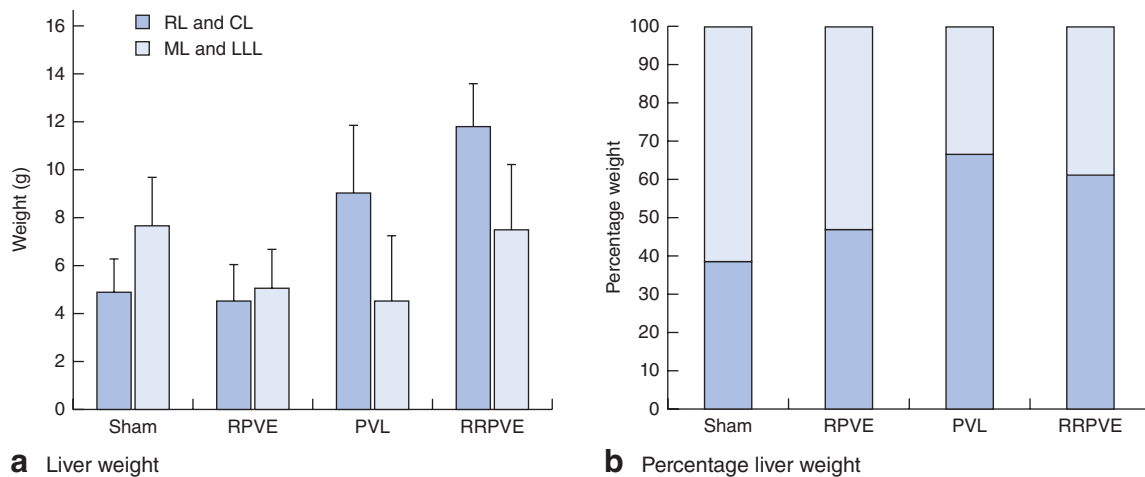
### Hepatocyte proliferation

The mean percentage hepatocyte proliferation in the non-occluded liver lobes (right and caudate) on day 1 after RPVE, PVL and RRPVE, and in the sham group is shown in *Table 1*. Proliferation rates were higher after RRPVE compared with RPVE (31.1 *versus* 15.1 per cent;  $P < 0.001$ ; 95 per cent c.i. for difference 11.1 to 25.3 per cent). Proliferation rates in the right and caudate lobes were also higher after RRPVE than PVL (31.1 *versus* 22.2 per cent;  $P = 0.003$ ; 95 per cent c.i. for difference 1.1 to 16.7 per cent) (*Fig. 5*). Hepatocyte proliferation was not observed in occluded liver lobes (left lateral and median) in any of the groups.

**Table 2** Mean weight of non-occluded and occluded liver lobes 28 days after reversible embolization, portal ligation or repeated reversible embolization, and in the sham group

|                   | Mean weight of liver lobes (g) |              |             |                   |
|-------------------|--------------------------------|--------------|-------------|-------------------|
|                   | Non-occluded                   |              | Occluded    |                   |
|                   | Right lobe                     | Caudate lobe | Median lobe | Left lateral lobe |
| Sham ( $n = 7$ )  | 3.2(1.1)                       | 1.6(0.8)     | 4.0(1.1)    | 3.7(0.5)          |
| RPVE ( $n = 6$ )  | 3.4(1.2)                       | 1.1(0.5)     | 2.6(0.8)    | 2.5(0.8)          |
| PVL ( $n = 6$ )   | 6.0(2.5)                       | 3.0(1.0)     | 2.0(1.0)    | 2.5(1.8)          |
| RRPVE ( $n = 6$ ) | 7.6(2.0)                       | 4.2(0.9)     | 3.5(1.4)    | 4.0(1.7)          |

Values are mean(s.d.). RPVE, reversible portal vein embolization; PVL, portal vein ligation, RRPVE, repeated RPVE.



**Fig. 6 a** Mean (s.d.) and **b** percentage of non-occluded (RL, right lobe; CL, caudate lobe) and occluded (ML, median lobe; LLL, left lateral lobe) liver weight in sham ( $n = 7$ ), reversible portal vein embolization (RPVE) ( $n = 6$ ), portal vein ligation (PVL) ( $n = 6$ ) and repeated reversible RPVE (RRPVE) ( $n = 6$ ) groups

### Liver regeneration

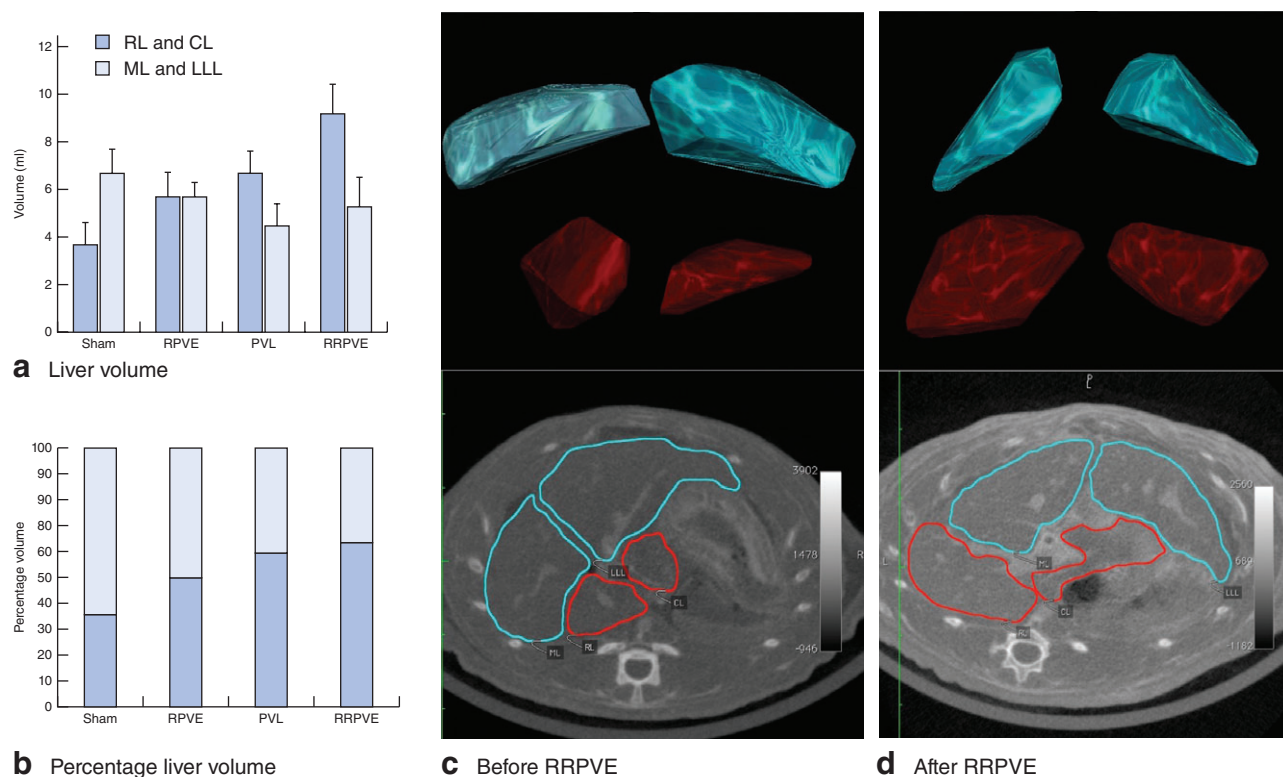
Mean weights of non-occluded liver lobes (right and caudate) and occluded liver lobes (left lateral and median) 28 days after RPVE, PVL, RRPVE and in the sham group are shown in *Table 2*. Non-occluded liver lobe weights were greater in the RRPVE group compared with the RPVE group (11.8(1.7) *versus* 4.5(1.5) g respectively;  $P = 0.005$ ; 95 per cent c.i. for difference 4.6 to 11.0 g), but there was no significant difference between the RRPVE and PVL groups (11.8(1.7) *versus* 9.0(3.2) g respectively;  $P = 0.121$ ; 95 per cent c.i. for difference -0.5 to 6.5 g) (*Fig. 6*). Non-occluded liver lobe weights 28 days after the first surgical procedure represented 38.8(0.0), 47.0(0.2), 66.7(0.2) and 61.1(0.2) per cent of total liver weight in the sham, RPVE, PVL and RRPVE groups respectively. The non-occluded liver weight to total liver weight ratio in the RPVE group was superior to that in the sham group ( $P = 0.050$ ; 95 per cent c.i. for difference 1.7 to 19.2 per cent). This ratio in the RRPVE group was higher than that in the RPVE group ( $P = 0.050$ ; 95 per cent c.i. for difference 7.0 to 32.1 per cent) and in the sham group ( $P = 0.020$ ; 95 per cent c.i. for difference 13.8 to 36.1 per cent) (*Fig. 6b*). However, there was no significant difference in percentage of non-occluded liver weight to total liver weight in the RRPVE and PVL groups ( $P = 0.421$ ; 95 per cent for difference -29.1 to 21.2 per cent). The non-occluded liver weight to total liver weight ratio after RRPVE was similar at 28 days and 4 months after the first surgical procedure (61.1 and 56.2 per cent respectively;  $P = 0.092$ ; 95 per cent c.i. for difference -20.8 to 22.4 per cent).

**Table 3** Mean volume of non-occluded and occluded liver lobes 28 days after reversible embolization, portal ligation or repeated reversible embolization, and in the sham group

|                   | Mean volume of liver lobes (ml) |              |             |                   |
|-------------------|---------------------------------|--------------|-------------|-------------------|
|                   | Non-occluded                    |              | Occluded    |                   |
|                   | Right lobe                      | Caudate lobe | Median lobe | Left lateral lobe |
| Sham ( $n = 7$ )  | 2.2(0.7)                        | 1.5(1.2)     | 3.5(1.5)    | 3.2(0.5)          |
| RPVE ( $n = 7$ )  | 3.9(1.0)                        | 1.8(1.0)     | 2.9(0.5)    | 2.8(0.7)          |
| PVL ( $n = 7$ )   | 4.3(1.2)                        | 2.4(0.7)     | 2.4(0.7)    | 2.1(1.2)          |
| RRPVE ( $n = 7$ ) | 5.3(1.0)                        | 3.9(1.5)     | 3.1(0.5)    | 2.2(1.0)          |

Values are mean (s.d.). RPVE, reversible portal vein embolization; PVL, portal vein ligation, RRPVE, repeated RPVE.

Mean volumes of non-occluded liver lobes and occluded liver lobes 28 days after RPVE, PVL and RRPVE and in the sham group, are shown in *Table 3* and *Fig. 7*. Non-occluded liver lobe volumes 28 days after the first surgical procedure represented 35.5(0.5), 50.1(0.6), 59.8(0.2) and 63.4(0.2) per cent of total liver volume in the sham, RPVE, PVL and RRPVE groups respectively. The non-occluded liver volume to total liver volume ratio in the RPVE group was superior to that in the sham group ( $P = 0.050$ ; 95 per cent c.i. for difference 1.3 to 15.2 per cent). This ratio in the RRPVE group was higher than that in the RPVE group ( $P = 0.050$ ; 95 per cent for difference 7.0 to 15.1 per cent) and the sham group ( $P = 0.001$ ; 95 per cent c.i. for difference 11.8 to 20.1 per cent). There was no significant difference in non-occluded liver volume to total liver volume ratio between the RRPVE and PVL groups ( $P = 0.080$ ; 95 per cent c.i. for difference -4.0 to



**Fig. 7** **a** Mean (s.d.) and **b** percentage of non-occluded (RL, right lobe; CL, caudate lobe) and occluded (ML, median lobe; LLL, left lateral lobe) liver volume in sham, reversible portal vein embolization (RPVE), portal vein ligation (PVL) and repeated reversible RPVE (RRPVE) groups ( $n = 7$  per group). Representative three-dimensional imaging of embolized (blue) and non-embolized (red) liver volumes in a rat **c** before and **d** after RRPVE analysed by CT 28 days after the first surgical procedure

14.0 per cent). The volumetric evolution of liver lobes after RRPVE is shown by CT imaging in *Fig. 7c,d*.

## Discussion

The main finding of this study was that a repeated RPVE stimulus induced additional hepatocyte proliferation, and an increase in liver weight and volume, compared with single RPVE. This pilot study investigated the possibility of inducing repeated hepatocyte proliferation. The first embolization stimulus might lead to changes in local conditions, which are favourable for major hepatocyte proliferation after repetition of the stimulus in non-occluded lobes. This approach was well tolerated in rats, confirming previous results with absorbable embolizing agents in non-human primates<sup>4,9</sup>. Thrombosis of the portal trunk was not observed and recanalization of the embolized portal territory was complete within 14 days after RPVE.

The repeated embolization stimulus was anticipated to improve hypertrophy of non-occluded lobes compared with PVL. However, repeated reversible embolization

resulted in similar hypertrophy of non-occluded segments. In primates, complete recanalization of the embolized portal territory after RPVE was achieved within 2 weeks<sup>4</sup>. Although the non-human primate model is more relevant to the human condition, a rat model was used here because of reduced costs, ease of accessibility and ability to execute the experiments. In this model, the kinetics of portal revascularization were not assessed because of technical difficulties related to repeated portography. Portograms in rats are difficult to obtain, mostly owing to the small size of the portal vessels. Additionally, the increased portal pressure after embolization makes the acquisition of images of the parenchymal phase of perfusion difficult. Portal recanalization may occur earlier in rats. This could explain the decreased hypertrophy after RPVE compared with PVL. However, the use of an absorbable agent may allow a third RPVE, and could maximize hypertrophy of the non-occluded liver. Unfortunately, the rat model would probably be a limitation for the study of such a third embolization. Even if the second RPVE did not increase the rate of postoperative complications, difficulties were



frequently encountered while dissecting portal branches selectively because of considerable adhesions. A third open procedure with portal vein dissection in this rat model does not seem a feasible option. The purpose of this small animal model experiment was to generate a hypothesis. It is the authors' belief that a large animal model, such as swine or primate, would circumvent the limits of the rat model and lead to better liver hypertrophy results. A larger animal model might also allow two or more RPVEs using a percutaneous approach.

Analysis of the hepatocyte proliferation in each lobe revealed a tendency towards an inferior proliferation rate in the caudate lobe compared with the right lobe in the PVL group. This could have influenced the difference between the RRPVE and PVL groups. Accidental partial ligation of the caudate lobe during PVL might explain this finding. However, the proliferation rate was 18 times higher in the caudate lobe after PVL than in sham-operated animals, reflecting the good perfusion of the caudate lobe after PVL. Furthermore, blue dye was injected to verify the selective ligation. Finally, Lorand and colleagues<sup>8</sup> demonstrated previously that hepatocyte proliferation was inferior in the caudate lobe compared with the right lobe at 18 and 28 h after PVL. Analysis of total liver blood flow after PVL showed that important changes occur in the lobar distribution of portal blood flow<sup>10</sup>. These variations might explain the slight delay in hepatocyte cycling observed in the caudate and right lobes.

Furrer and co-workers<sup>7</sup> observed that permanent PVE resulted in a less important regenerative response of the remnant liver than PVL. They showed, in a rat model, that the impaired liver regeneration after PVE could be a consequence of macrophage trapping in the occluded segments owing to a foreign body reaction. Similarly, in the present study a lower regenerative response was observed after single PVE compared with PVL. However, repetition of the embolization stimulus allowed amplification of the regenerative response in this study.

This novel approach could be of interest in clinical practice. First, massive hypertrophy of the FLR could enable liver surgery in patients initially presenting with a very small FLR and underlying liver disease. Such a situation can occur when a patient has already undergone several liver resections for colorectal liver metastases and received numerous concomitant chemotherapy courses. In patients with liver recurrence, this technique could permit major liver resection with preservation of fewer than three liver segments, which is currently rarely conceivable. In patients with bilobar colorectal liver metastases, RRPVE with an interval of 2 weeks in between may allow concomitant

tumour cleaning of the FLR with major contralateral liver resection within 1 month of initial embolization. This strategy could represent an alternative to the classical two-stage procedure or to the more recently described strategy of associating liver partition and portal vein ligation for staged (ALPPS) hepatectomy<sup>11</sup>. Finally, in the long term, it is conceivable that RRPVE of the right portal branch would enable left hepatectomy or even left lateral sectionectomy for liver transplantation from a living adult donor to an adult recipient.

The technique of temporary PVE was initially developed by the authors' team before liver cell transplantation to improve cellular engraftment and induce hepatocyte proliferation<sup>4,9</sup>. The use of an absorbable agent was particularly interesting for this indication because the embolized liver was not subsequently removed. Furthermore, the long-term effects of permanent partial portal occlusion in a non-resected liver are not yet known. In liver cell transplantation, a repeated stimulus for liver regeneration may promote an increase in size of selected liver lobes into which therapeutic liver cells could be engrafted, allowing improved repopulation of the liver by transplanted hepatocytes. The authors' team is currently conducting a study to prove the validity of this approach for cell transplantation. Furthermore, the recent development of hepatocytes derived from induced pluripotent stem cells<sup>12</sup> represents an endless source of hepatocytes for transplantation, which could be coupled with the RRPVE technique to promote liver repopulation.

## Acknowledgements

The authors are grateful to D. Le Denmat and the team from EA 2496 Pathologies Imagerie et Biothérapies de l'Organe Dentaire (Paris Descartes University) for their support and help with the experiments; and thank M. Faron for advice concerning statistical analysis.

This research was supported by the Agence de la Biomédecine, the Association Française d'Etude du Foie and the Fondation de l'Avenir. H.T. was supported by the Association Française contre les Myopathies.

*Disclosure:* The authors declare no conflict of interest.

## References

- 1 Yokoyama Y, Nagino M, Nimura Y. Mechanisms of hepatic regeneration following portal vein embolization and partial hepatectomy: a review. *World J Surg* 2007; **31**: 367–374.
- 2 Aussilhou B, Lesurtel M, Sauvanet A, Farges O, Dokmak S, Goasguen N *et al.* Right portal vein ligation is as efficient as portal vein embolization to induce hypertrophy of the left liver remnant. *J Gastrointest Surg* 2008; **12**: 297–303.

- 3 Abulkhir A, Limongelli P, Healey AJ, Damrah O, Tait P, Jackson J *et al.* Preoperative portal vein embolization for major liver resection: a meta-analysis. *Ann Surg* 2008; **247**: 49–57.
- 4 Lainas P, Boudechiche L, Osorio A, Coulomb A, Weber A, Pariente D *et al.* Liver regeneration and recanalization time course following reversible portal vein embolization. *J Hepatol* 2008; **49**: 354–362.
- 5 Tranchart H, Catherine L, Maitre S, Lainas P, De Laveaucoupet J, Dagher I. Efficient liver regeneration following temporary portal vein embolization with absorbable gelatin sponge powder in humans. *J Vasc Interv Radiol* 2015; **26**: 507–515.
- 6 Ribero D, Abdalla EK, Madoff DC, Donadon M, Loyer EM, Vauthey JN. Portal vein embolization before major hepatectomy and its effects on regeneration, resectability and outcome. *Br J Surg* 2007; **94**: 1386–1394.
- 7 Furrer K, Tian Y, Pfammatter T, Jochum W, El-Badry AM, Graf R *et al.* Selective portal vein embolization and ligation trigger different regenerative responses in the rat liver. *Hepatology* 2008; **47**: 1615–1623.
- 8 Lorand I, Vons C, Nguyen T, Di Rico V, Coulomb A, Franco D *et al.* Portal branch ligation induces efficient retrovirus-mediated gene delivery in rat liver. *J Gene Med* 2004; **6**: 507–513.
- 9 Dagher I, Nguyen TH, Groyer-Picard MT, Lainas P, Mainot S, Guettier C *et al.* Efficient hepatocyte engraftment and long-term transgene expression after reversible portal embolization in nonhuman primates. *Hepatology* 2009; **49**: 950–959.
- 10 Rocheleau B, Ethier C, Houle R, Huet PM, Bilodeau M. Hepatic artery buffer response following left portal vein ligation: its role in liver tissue homeostasis. *Am J Physiol* 1999; **277**: 1000–1007.
- 11 Schnitzbauer AA, Lang SA, Goessmann H, Nadalin S, Baumgart J, Farkas SA *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* 2012; **255**: 405–414.
- 12 Rashid ST, Corbineau S, Hannan N, Marciniak SJ, Miranda E, Alexander G *et al.* Modeling inherited metabolic disorders of the liver using human induced pluripotent stem cells. *J Clin Invest* 2010; **120**: 3127–3136.

## DISCUSSION DE L'ARTICLE

Le résultat principal de ce travail est que l'EPPRR induit chez le rat un stimulus additionnel de prolifération hépatocytaire et une augmentation du poids et du volume des lobes non embolisés en comparaison à une seule EPPR. Le stimulus de régénération consécutif à la première embolisation pourrait entraîner des modifications des conditions locales, qui sont favorables à une prolifération hépatocytaire importante dans les lobes non embolisés lors de la répétition du stimulus.

Cette approche a été bien tolérée par les rats, ce qui confirme les résultats obtenus précédemment chez le primate non humain<sup>144,152</sup>. Nous avons observé un pic de cytolysse à J1 à 3-4 fois la normale. Ces modifications se normalisaient dans les 14 jours suivant l'embolisation. Nous n'avons pas observé de thrombose complète du tronc porte ni d'embolie pulmonaire. La tolérance tissulaire de notre procédure a été aussi démontrée. Les biopsies des lobes embolisés réalisées à J1 après EPPR et J1 après EPPRR n'ont pas montré de nécrose hépatocytaire, et une faible apoptose au sein des lobes embolisés.

Nous espérons que la répétition du stimulus d'embolisation puisse augmenter l'hypertrophie des lobes non embolisés en comparaison à la ligature portale. Cependant, l'EPPRR n'a entraîné qu'une hypertrophie équivalente du foie non embolisé par rapport à la LPP. Un des mécanismes pourrait être une reperméabilisation plus précoce. Chez les primates, les branches portales embolisées étaient complètement reperméabilisées au bout de 14 jours<sup>144</sup>. Chez le rat, nous n'avons pas pu établir précisément la cinétique de reperméabilisation devant des difficultés techniques à répéter les portographies. Les portographies sont en effet difficiles à obtenir dans ce modèle, principalement du fait de la petite taille des vaisseaux portes. De plus, après embolisation, l'augmentation de la pression portale rend difficile l'acquisition d'images de perfusion du parenchyme hépatique. La reperméabilisation portale pourrait survenir plus tôt chez le rat, ce qui pourrait expliquer une moins bonne hypertrophie après EPPR en comparaison à celle obtenue après ligature portale.

Cependant, l'utilisation d'un agent résorbable pourrait permettre une troisième embolisation, ce qui pourrait augmenter encore l'hypertrophie des lobes non embolisés. Malheureusement, le modèle du rat serait certainement limité pour l'étude d'une nouvelle embolisation. En effet, bien que la seconde EPPR n'ait pas fait augmenter le taux de complications postopératoires, nous avons quasi-systématiquement rencontré des difficultés lors de la dissection itérative des branches portales du fait d'adhérences importantes. Une troisième laparotomie avec une nouvelle dissection du hile hépatique et de la veine porte ne semble pas faisable chez le rat. L'objectif de ces expérimentations menées chez le petit animal était de générer des hypothèses. Nous pensons que l'utilisation d'un modèle animal plus gros, tel le porc ou le primate non humain, permettra de dépasser les limites du modèle murin et de montrer de meilleurs résultats en termes d'hypertrophie hépatique. Un modèle de gros animal pourrait permettre d'envisager deux voire trois EPPR à l'aide d'une approche percutanée.

L'analyse de la prolifération hépatocytaire dans chacun des lobes des rats ayant eu une LPP a montré une tendance à moins de prolifération dans le lobe caudé en comparaison au lobe droit. Cela a pu influencer la différence de prolifération observée dans les lobes non embolisés des groupes ayant eu une EPPRR et une LPP. Une ligature accidentelle partielle de la branche du lobe caudé pourrait expliquer ce résultat. Cependant, le taux de prolifération était 18 fois supérieur dans le lobe caudé après ligature portale, en comparaison à celui observé dans le groupe contrôle. De plus, un colorant bleu était injecté après ligature portale afin de vérifier le caractère sélectif de l'occlusion. Enfin, Lorand et al. ont démontré précédemment chez le rat que la prolifération hépatocytaire 18 et 28 heures après LPP était inférieure dans le lobe caudé en comparaison au lobe droit<sup>159</sup>. Les analyses du débit sanguin portal après ligature portale ont montré une variation importante de la distribution du flux porte<sup>161</sup>. Ces variations pourraient expliquer la faible différence de prolifération hépatocytaire observée à J1 dans les lobes caudé et droit.

Furrer et al. ont rapporté chez le rat une moins forte prolifération hépatocytaire dans les lobes non occlus après EPP à l'aide d'un agent non résorbable par rapport à celle observée après LPP<sup>160</sup>. Ils ont suggéré que la plus faible régénération observée après EPP définitive pourrait être une conséquence de l'emprisonnement des macrophages dans les segments

occlus du fait d'une réaction à un corps étranger. De manière similaire, dans notre étude, la régénération était plus faible après EPPR qu'après ligature portale. Cependant, la répétition du stimulus d'embolisation a permis l'amplification de la réponse régénérative.

La technique d'EPPR a été développée initialement par notre équipe afin d'induire une régénération hépatique capable de favoriser la prise de greffe au cours de la THe<sup>144,152</sup>. L'utilisation d'un agent résorbable dans cette indication avait tout son sens étant donné que le foie embolisé n'avait pas pour destinée finale d'être réséqué. De plus, les effets à long terme d'une EPP définitive sur un foie non réséqué ne sont pas connus. Au cours de la THe, une EPPRR pourrait permettre d'induire une prolifération hépatocytaire au sein des lobes dans lesquels les hépatocytes thérapeutiques sont greffés, favorisant ainsi le repeuplement du foie par ces cellules. Cette hypothèse fait l'objet des travaux qui vont suivre.



**Minimally invasive liver preconditioning for  
hepatocyte transplantation in rats**

Martin GAILLARD, Ibrahim DAGHER

*Methods Mol Biol* 2017;1506:193-200

## PRESENTATION DE L'ARTICLE

La technique de l'EPPR et de l'EPPRR chez le rat a pu être mise au point au cours du travail précédent, et nous souhaitons utiliser cette méthode dans ce modèle pour évaluer son intérêt pour améliorer la prise de greffe au cours de la THe.

La THe implique l'obtention d'une solution d'hépatocytes qui puisse être injectée dans le système porte de manière à gagner les sinusoides puis les travées d'hépatocytes. Chez le rat, la méthode adoptée pour la THe est l'injection de cette solution dans la rate du rat receveur. Ce mode de THe par injection intra-splénique<sup>137</sup> et le nombre de cellules à transplanter<sup>162</sup> ont fait l'objet d'études préliminaires et sont aujourd'hui utilisés par la plupart des équipes. Une fois injectés dans la rate, les hépatocytes transplantés gagnent le système porte pour s'intégrer au parenchyme hépatique, d'abord dans les zones péri-portales, avant de gagner l'ensemble du lobule, où ils survivent à long terme<sup>108</sup>.

Cette solution d'hépatocytes viables doit être obtenue immédiatement avant la THe à partir d'un foie de rat donneur. La technique actuellement utilisée de digestion enzymatique a été proposée par Seglen en 1973, et n'a depuis lors plus subi de modifications majeures<sup>163</sup>. Pour ce faire, on commence par pratiquer une perfusion du foie total *in vivo* en deux étapes. La première étape consiste à laver le foie à l'aide d'une solution tampon de manière à obtenir une décoloration homogène. La deuxième étape consiste à digérer la pièce par une solution contenant de la collagénase, rendant la dissociation et la désagrégation des hépatocytes possible. Le foie prend une consistance flasque et des fissures apparaissent sur la capsule. Il est alors prélevé et placé dans du milieu de culture hépatocytaire.

Il s'agit ensuite de procéder à l'isolement des hépatocytes à partir du foie total. On pratique une dissociation mécanique du foie dans le milieu de culture. La suspension cellulaire est alors filtrée et lavée afin d'éliminer les débris cellulaires et de l'enrichir en hépatocytes. Les cellules sont comptées et leur viabilité évaluée. On prépare enfin une fraction de solution cellulaire qui sera injectée pour la THe.



Notre équipe avait l'expérience de l'isolement d'hépatocytes à partir de foie de singe<sup>96,152</sup>, de lapin<sup>135,136</sup>, de souris<sup>120,164</sup>, mais le modèle du rat n'avait pas été utilisé. Pour la poursuite de nos travaux, il était donc nécessaire de mettre au point un protocole de perfusion de foie en vue de l'isolement des hépatocytes pour permettre une THe après « préconditionnement » par EPPR dans ce modèle.

## Minimally Invasive Liver Preconditioning for Hepatocyte Transplantation in Rats

Martin Gaillard and Ibrahim Dagher

### Abstract

In the context of cell transplantation in the liver parenchyma, preconditioning is essential to enhance cell engraftment and liver repopulation. The authors have developed a minimally invasive technique of temporary portal embolization using an absorbable material, called reversible portal vein embolization. We hereby describe the method for isolating hepatocytes from a donor rat before transplanting hepatocytes after reversible portal vein embolization in the recipient.

**Key words** Hepatocyte transplantation, Liver preconditioning, Liver perfusion, Hepatocyte isolation, Portal vein embolization

---

### 1 Introduction

Cell engraftment in the liver parenchyma is one of the limiting steps for cell transplantation. Rodent models have demonstrated that the engraftment efficacy of hepatocytes is low, with up to 70% of transplanted rat hepatocytes remaining trapped in portal spaces [1, 2]. Several approaches have proven to improve cell engraftment, such as liver radiation [3], injection of toxins [4, 5], partial portal ligation [6], or partial hepatectomy [7]. Although these strategies provided the proof of concept that liver preconditioning could enhance cell engraftment and liver repopulation, they cannot be considered clinically acceptable. Causing a similar portal vein occlusion than partial portal ligation, partial portal embolization induces liver regeneration and improves the engraftment of transplanted hepatocytes [8]. It is routinely used in liver surgery in humans as a preoperative method to induce hypertrophy of the remnant normal liver prior to resection of a diseased liver, increasing the number of cancer patients amenable to surgery [9]. Because of the improved availability of radiological interventions, portal vein embolization is commonly performed by a percutaneous transhepatic approach, avoiding invasive surgical techniques. In clinical practice, a

definitive material is used for embolization, since the embolized liver is subject to be removed. We have developed a minimally invasive technique of temporary embolization using an absorbable material [10, 11]. This reversible embolization lasts approximately 2 weeks and allows efficient and stable liver regeneration in the nonembolized lobes. Since the embolized liver is not to be removed in the context of cell transplantation, the use of absorbable embolizing material before hepatocyte transplantation seemed most appropriate. This protocol describes the method for hepatocyte transplantation associated with liver preconditioning using reversible portal partial embolization. Technique for donor liver perfusion and isolation of transplanted hepatocyte is previously described.

---

## 2 Materials

### 2.1 Liver Perfusion

1. Isoflurane for inhalation.
2. Buprenorphine for injection.
3. HEPES buffer, pH 7.65: 0.66% (w/v) NaCl, 0.01% (w/v)  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 0.015% (w/v) KCl, 0.23% (w/v) Fructose and 0.024% (w/v) HEPES in Millipore-quality water. Sterilize the buffer by passing through a 0.22- $\mu\text{m}$  filter; it can be stored at 4 °C for 6 months.
4.  $\text{Ca}^{2+}$ -containing HEPES buffer, pH 7.65: 0.15%  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  in HEPES buffer. Sterilize the buffer by passing through a 0.22- $\mu\text{m}$  filter; it can be stored at 4 °C for 6 months.
5. Collagenase, type I (Clostridiopeptidase A) (stable for months if refrigerated dry). Warm to room temperature before opening the container.
6. 70% (v/v) alcohol.
7. Perfusion apparatus: perfusion pump and tubes connected with 23G needle (*see Note 1*).
8. Thermostated bath.

### 2.2 Hepatocyte Isolation

1. Standard medium: Dulbecco's modified Eagle's medium, containing 50,000 UI of Penicillin-Streptomycin, 1.168 mg/mL of L-glutamine, 1% (w/v) bovine serum albumin, and 0.1% (v/v) fetal bovine serum. Sterilize the medium by passing through a 0.22- $\mu\text{m}$  filter; it can be stored at 4 °C for 6 months.
2. Trypan blue: 0.4% (w/v) in 0.85% (w/v) NaCl.
3. 70  $\mu\text{m}$  filter.
4. 50-mL sterile tubes.
5. Sterile volumetric pipets.
6. Hemocytometer.

7. Light microscope.
8. Centrifuge.

### **2.3 Reversible Partial Portal Vein Embolization**

1. Isoflurane for inhalation.
2. Buprenorphine for injection.
3. Gelatin powder.
4. Normal saline solution: 0.90% (w/v) of NaCl in Millipore-quality water.
5. Injection apparatus: 1 mL syringe, 27G needle with infusion set.

### **2.4 Hepatocyte Transplantation**

1. Cell solution, containing  $1 \times 10^7$  hepatocyte per mL.
2. Injection apparatus: 2 mL syringe, 29G needle with infusion set.
3. 4.0 polyglactin suture.

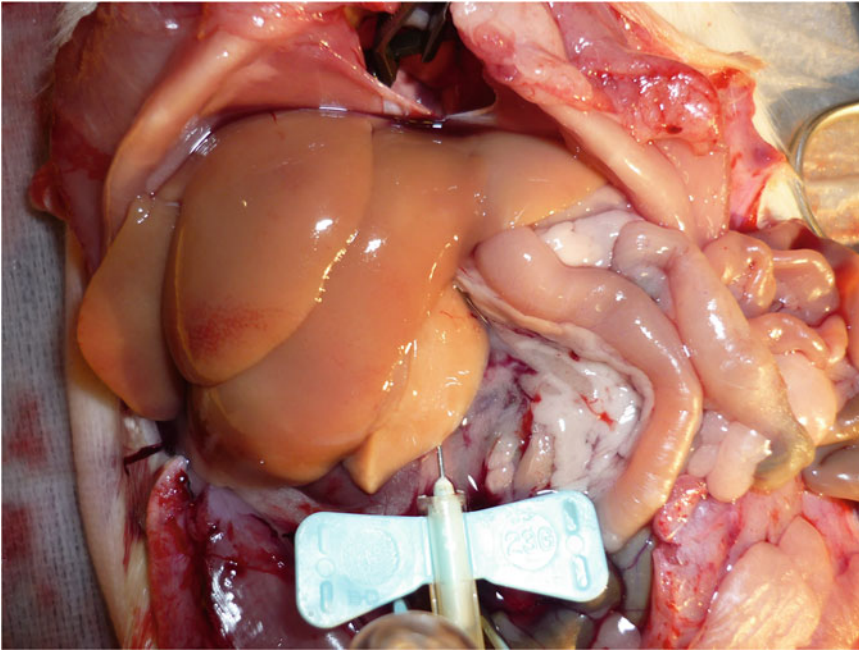
---

## **3 Methods**

### **3.1 Liver Perfusion**

This method describes in situ retrograde liver perfusion in the donor rat.

1. Dissolve 18,960 units of type I collagenase in 300 mL of Ca<sup>2+</sup>-containing HEPES buffer (concentration of collagenase is 63.2 collagenase digestion units/mL). Prepare 300 mL of HEPES buffer. Thermostate both solutions at 42 °C (to obtain 37 °C in the liver) (*see Note 2*).
2. Anesthetize a rat by inhalation of O<sub>2</sub>/isoflurane 3% (decrease to 1–2% after induction). Inject Buprenorphine subcutaneously 0.1 mg/kg body weight for analgesia.
3. Disinfect the rat's abdomen with alcohol. Open the abdomen making a midline incision associated with transverse bilateral subcostal incision. Place bowels to the left side of the rat to expose the inferior vena cava and the portal vein (*see Note 3*).
4. Insert the 23G needle in the inferior vena cava below the liver and above renal veins. The connecting tube must be completely free of air bubbles. Open sternum and diaphragm to access to the inferior vena cava right below the left atrium and clamp at this level (Fig. 1). Start perfusion apparatus and divide the portal vein (*see Note 4*).
5. For the first perfusion step, remove the blood from the liver with 250 mL of HEPES buffer (perfusion rate: 15 mL/min). If the liver does not blanch within a few seconds, it should be discarded. For the second perfusion step, circulate 200 mL of Ca<sup>2+</sup>-containing HEPES buffer with collagenase.
6. When the liver is malleable (stays bended after folding), stop the perfusion and remove the liver from the rat (*see Note 5*).



**Fig. 1** Operating field at the start of liver perfusion. 23G needle is placed in the inferior vena cava, which is clamped above the liver in the thorax

### **3.2 Hepatocyte Isolation**

This procedure must be performed in a laminar flow cabinet to avoid contamination of the cell suspension.

1. Transfer the excised liver to a Petri dish filled with standard medium.
2. Open the Glisson's capsule and suspend the cells in standard medium by mechanic dissociation of the liver. Filter the resulting cell suspension through a sterile 70  $\mu\text{m}$  filter.
3. Centrifuge the cell suspension for 5 min at  $56 \times g$ . Remove the supernatant and wash the cell pellet with standard medium (25 mL/tube). Centrifuge the cell suspension for 5 min at  $56 \times g$ . Repeat the operation twice. Resuspend the cell in 100 mL of standard medium.
4. For determination of cell viability, mix 7  $\mu\text{L}$  of trypan blue solution with 7  $\mu\text{L}$  of cell suspension and place the solution in a hemocytometer. Count the viable (white) and dead (blue) cells under a light microscope (magnification of 20). Only cell suspensions with a viability of 85% or more are used for hepatocyte transplantation.

### **3.3 Reversible Partial Portal Vein Embolization**

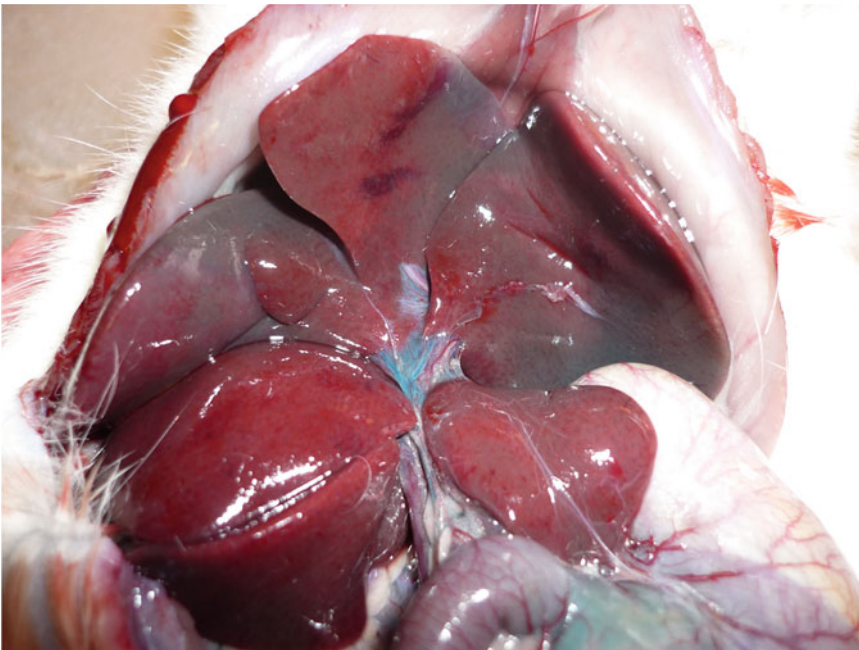
This technique is performed before hepatocyte transplantation in the recipient rat. It consists in a selective reversible portal vein embolization of 70% of the portal vein flow, corresponding to the medial and left lateral lobes of the rat liver. Portal branches for right and caudate lobe stay patent.

1. Prepare embolization material by dissolving 0.07 g/mL of gelatin powder in normal saline solution. Thermostate at 37 °C to homogenize.
2. Anesthetize a rat by inhalation of O<sub>2</sub>/isoflurane 3% (decrease to 1–2% after induction). Inject subcutaneously 0.1 mg/kg body weight for analgesia.
3. Disinfect the rat's abdomen with alcohol. Open the abdomen making a transverse bilateral subcostal incision. Expose the portal vein and its proximal divisions (*see Note 6*).
4. Insert the 27G needle in the portal vein prior to its divisions. Progress within the portal vein, downstream to the branch for the right lobe. Inject slowly 0.3 mL of embolization material (Fig. 2).
5. Remove the needle and rapidly apply a sterile compress on the injection point for hemostasis during 1 min (*see Note 7*).

### 3.4 Hepatocyte Transplantation

Hepatocyte transplantation is performed by splenic injection of the cell suspension.

1. Insert the 29G needle in the spleen parenchyma and slowly inject 2 mL of the cell suspension, containing  $20 \times 10^6$  hepatocytes in 2 mL of standard medium (Fig. 3).



**Fig. 2** Illustration of reversible embolization of the portal branches for left lateral and medial lobes. In this case, a *blue* colorant was added to the embolization material to show selective embolization of the occluded lobes



**Fig. 3** Injection of hepatocyte solution through a 29G needle in the spleen parenchyma

2. Remove the needle and rapidly apply a sterile compress on the injection point for hemostasis during 2 min (*see Note 7*).
3. Close the subcostal laparotomy with 4.0 polyglactin double layer running suture.

---

## 4 Notes

1. Perfusion apparatus must be cleaned and sterilized before use. Type of tubing must be compatible with biological material.
2. The activity of collagenase can present variations related to the provider, the batches, and storage conditions (dry at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). It is recommended to test different batches of collagenase to determine which one best enables the liver perfusion and the isolation of hepatocytes.
3. Perfusion can be carried out with either a nonrecirculating or a recirculating apparatus. This technique describes a nonrecirculating apparatus, meaning that perfusion solution flows from the operating field. Therefore, we recommend placing the rat on a thick cork plate, within a flat and large dish.

Cork allows fixation of the parietal flaps, facilitating the flow of the perfusion solution out of the abdomen.

4. These steps of the procedure must be performed rapidly. It is helpful to stabilize the 23G needle in the inferior vena cava using long 16G piercing needles. All along the perfusion, flow from the portal vein should be undisturbed.
5. Perfusion time should be kept as short as possible, and perfusion should be stopped as soon as the liver has softened sufficiently. When removing the liver, take caution not to damage the Glisson's capsule. The use of cotton swabs is most helpful.
6. Before puncturing the portal vein, perfect exposition of the hepatic pedicle is necessary. It can be obtained by placing a support behind the back of the rat, raising the costal margin. A small humidified compress can be rolled up and placed to lift the medial and lateral lobes up.
7. Carefully humidify the compress before removing to avoid tearing the blood clot.

Special care should be taken to the health condition of the rats, considering type of bedding, light/dark cycle, food composition, feeding schedule, and environmental stress factors.

## References

1. Grompe M (2006) Principles of therapeutic liver repopulation. *J Inher Metab Dis* 29(2–3): 421–425. doi:[10.1007/s10545-006-0311-2](https://doi.org/10.1007/s10545-006-0311-2)
2. Gupta S, Rajvanshi P, Sokhi R, Slehria S, Yam A, Kerr A, Novikoff PM (1999) Entry and integration of transplanted hepatocytes in rat liver plates occur by disruption of hepatic sinusoidal endothelium. *Hepatology* 29(2):509–519. doi:[10.1002/hep.510290213](https://doi.org/10.1002/hep.510290213)
3. Koenig S, Krause P, Schmidt TK, Rave-Fraenk M, Rothe H, Hermann RM, Becker H, Hess CF, Christiansen H (2008) Irradiation as preparative regimen for hepatocyte transplantation causes prolonged cell cycle block. *Int J Radiat Biol* 84(4):285–298. doi:[10.1080/09553000801953359](https://doi.org/10.1080/09553000801953359)
4. Joseph B, Kumaran V, Berishvili E, Bhargava KK, Palestro CJ, Gupta S (2006) Monocrotaline promotes transplanted cell engraftment and advances liver repopulation in rats via liver conditioning. *Hepatology* 44(6):1411–1420. doi:[10.1002/hep.21416](https://doi.org/10.1002/hep.21416)
5. Laconi E, Oren R, Mukhopadhyay DK, Hurston E, Laconi S, Pani P, Dabeva MD, Shafritz DA (1998) Long-term, near-total liver replacement by transplantation of isolated hepatocytes in rats treated with retrorsine. *Am J Pathol* 153(1):319–329. doi:[10.1016/S0002-9440\(10\)65574-5](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65574-5), S0002-9440(10)65574-5 [pii]
6. Ilan Y, Roy-Chowdhury N, Prakash R, Jona V, Attavar P, Guha C, Tada K, Roy-Chowdhury J (1997) Massive repopulation of rat liver by transplantation of hepatocytes into specific lobes of the liver and ligation of portal vein branches to other lobes. *Transplantation* 64(1):8–13
7. Guha C, Parashar B, Deb NJ, Garg M, Gorla GR, Singh A, Roy-Chowdhury N, Vikram B, Roy-Chowdhury J (2002) Normal hepatocytes correct serum bilirubin after repopulation of Gunn rat liver subjected to irradiation/partial resection. *Hepatology* 36(2):354–362. doi:[10.1053/jhep.2002.34516](https://doi.org/10.1053/jhep.2002.34516), S0270913902000393 [pii]
8. Dagher I, Boudechiche L, Branger J, Coulomb-Lhermine A, Parouchev A, Sentilhes L, Lin T, Groyer-Picard MT, Vons C, Hadchouel M, Pariente D, Andreoletti M, Franco D, Weber A (2006) Efficient hepatocyte engraftment in a nonhuman primate model after partial portal vein embolization. *Transplantation* 82(8):1067–1073. doi:[10.1097/01.tp.0000236103.99456.8f](https://doi.org/10.1097/01.tp.0000236103.99456.8f), 00007890-200610270-00011 [pii]

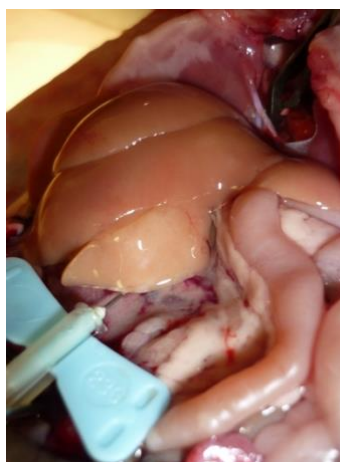


9. de Baere T, Roche A, Elias D, Lasser P, Lagrange C, Bousson V (1996) Preoperative portal vein embolization for extension of hepatectomy indications. *Hepatology* 24(6):1386–1391
10. Dagher I, Nguyen TH, Groyer-Picard MT, Lainas P, Mainot S, Guettier C, Pariente D, Franco D, Weber A (2009) Efficient hepatocyte engraftment and long-term transgene expression after reversible portal embolization in nonhuman primates. *Hepatology* 49(3): 950–959. doi:[10.1002/hep.22739](https://doi.org/10.1002/hep.22739)
11. Lainas P, Boudechiche L, Osorio A, Coulomb A, Weber A, Pariente D, Franco D, Dagher I (2008) Liver regeneration and recanalization time course following reversible portal vein embolization. *J Hepatol* 49(3):354–362. doi:[10.1016/j.jhep.2008.01.034](https://doi.org/10.1016/j.jhep.2008.01.034), S0168-8278(08)00136-0 [pii]

## DISCUSSION DE L'ARTICLE

Ce travail de mise au point préliminaire a permis de déterminer un protocole précis dont la finalité est l'obtention d'hépatocytes viables en suspension dans une solution dont le volume et la concentration étaient déterminés par l'analyse de la littérature. Les étapes d'isolement des hépatocytes à partir du foie perfusé (filtrage, lavages, comptage...) n'ont pas fait l'objet de modifications majeures par rapport au protocole usuel de notre équipe au laboratoire. Il a néanmoins fallu adapter la technique de perfusion de foie.

Nous avons opté pour une perfusion de foie rétrograde plutôt qu'antérograde du fait du petit calibre de la veine porte chez le rat. La veine cave inférieure sous-hépatique était donc « canulée » pendant que la veine cave inférieure sus-hépatique était clampée en intra-thoracique. La pompe à perfusion est alors lancée. La rapidité d'exécution de ces étapes s'est avérée cruciale pour la réussite de la perfusion, évitant la stase sanguine et la création de thrombus dans les vaisseaux intra-hépatiques empêchant le lavage par la solution de perfusion. Le débit de perfusion a dû être adapté : un débit trop lent entraîne la formation de thrombus, un lavage inhomogène et un mauvais rendement hépatocytaire, un débit trop rapide entraîne des fuites du circuit de perfusion et retentit sur la qualité du lavage. La décoloration rapide de la surface du foie obtenue, la veine porte est sectionnée pour permettre l'évacuation du soluté de perfusion, réalisant un lavage rétrograde.



**Figure 18** Perfusion de foie de rat (photographie nominée au concours étudiant de la photographie « La Science en Images » organisé par le Conseil Régional d'Ile-de-France, 2014).

Au cours des travaux antérieurs, le volume d'embolisat nécessaire à la réalisation d'une EPPR chez le rat à des fins de régénération hépatique avait pu être défini à 0,5 mL<sup>158</sup>. Initialement, l'EPPR a donc été réalisée avec 0,5 mL de solution d'EPPR, puis a été suivie de la THe intra-splénique de 2 mL de solution contenant  $20 \cdot 10^6$  hépatocytes. Il a été observé un taux de mortalité élevé du fait d'une thrombose portale aiguë visible en peropératoire, ce qui nous a amené à diminuer le volume d'EPPR. Par la suite, nous avons utilisé un volume d'embolisat de 0,3 mL, volume qui paraissait suffisant pour observer le gonflement du lobe droit (non embolisé), témoignant d'une augmentation de son débit portal. Le volume et la concentration de la solution d'hépatocytes destinée à la transplantation n'a pas été modifié. Il n'a plus été observé de thrombose portale. Ce protocole a pu être utilisé pour la poursuite de nos travaux.



**Improving hepatocyte engraftment following  
hepatocyte transplantation using repeated  
reversible portal vein embolization in rats**

Martin GAILLARD, Hadrien TRANCHART, Panagiotis LAINAS, Olivier  
TRASSARD, Séverine REMY, Ignacio ANEGON, Anne DUBART-  
KUPPERSCHMITT, Ibrahim DAGHER

***Liver Transplant* 2019;25(1):98-110**

## PRESENTATION DE L'ARTICLE

Dans les modèles de petit animal, le principe général utilisé pour la THe a été la perfusion d'hépatocytes issus de donneurs syngéniques à des receveurs, par injection intra-splénique ou dans la veine porte. La prise de greffe est limitée par l'emprisonnement des hépatocytes transplantés dans les espaces porte et détruits par le système immunitaire du receveur<sup>165,166</sup>. La prise de greffe spontanée après THe est donc restreinte, estimée à moins de 1% de la masse hépatique totale<sup>105</sup>. Une prise de greffe suffisante n'a pu être obtenue que lorsque les hépatocytes résidents sont détruits ou bloqués, faisant apparaître le concept du « préconditionnement » du foie du receveur<sup>167</sup>.

Comme discuté au chapitre 1, les mécanismes biologiques et cellulaires précis qui conduisent à une régénération hépatique après embolisation portale ne sont pas encore élucidés, impliquant des voies métaboliques variées, telles celles du TNF- $\alpha$  et de l'IL-6<sup>122</sup>. La question reste également ouverte quant aux mécanismes impliqués dans l'effet de l'EPP comme « préconditionnement » du foie avant THe. On pense que des lésions endothéliales permettent aux cellules transplantées de pénétrer dans les travées hépatocytaires<sup>166</sup>, tandis que la libération de médiateurs inflammatoires facilite le remodelage parenchymateux au cours de la prise de greffe<sup>168</sup>.

Notre équipe s'est attachée au développement de méthodes mini-invasives pour préparer le foie du receveur à recevoir une THe, sans risque et applicable en routine et a développé l'EPPR. Cette technique a permis une augmentation de la prise de greffe après autotransplantation d'hépatocytes chez le primate<sup>152</sup>. Ces résultats nous ont amené à considérer la possibilité de procéder à la répétition de l'EPPR pour améliorer le repeuplement du foie par les hépatocytes transplantés. Nous avons démontré chez le rat que cette EPPR était bien tolérée et qu'elle entraînait un stimulus de régénération additionnel qui pourrait s'avérer utile au cours de la THe pour entraîner un repeuplement du foie du receveur par les hépatocytes transplantés.

L'objectif de ce travail était d'utiliser l'EPPRR pour améliorer encore la prise de greffe. Puisque les hépatocytes transplantés n'ont pas d'avantage sélectif par rapport aux hépatocytes résidents, tous devraient proliférer en réponse au stimulus lié à l'EPPRR dans les lobes non embolisés, et le pourcentage de prise de greffe au sein de ces lobes resterait identique. Cependant, la répétition de l'EPPR devrait entraîner une atrophie des lobes non embolisés, ce qui aurait pour conséquence d'augmenter le pourcentage d'hépatocytes transplantés au sein de la masse cellulaire totale. Dans notre travail précédent chez le rat, la répétition des portographies a montré que la reperméabilisation des branches portales était complète à J14<sup>158</sup>. Ainsi, l'intervalle de temps entre la première EPPR et l'EPPRR a été déterminé à 14 jours. Il est admis que plus de 90% de la régénération hépatique survient au cours des 7 premiers jours après occlusion portale partielle chez le rat<sup>160</sup>, aussi nous n'attendions pas d'effet supplémentaire du stimulus de prolifération avec un intervalle de temps plus long.

# Improving Hepatocyte Engraftment Following Hepatocyte Transplantation Using Repeated Reversible Portal Vein Embolization in Rats

Martin Gaillard,<sup>1-4</sup> Hadrien Tranchart,<sup>1-4</sup> Panagiotis Lainas,<sup>1-4</sup> Olivier Trassard,<sup>5</sup> Séverine Remy,<sup>6</sup> Anne Dubart-Kupperschmitt ,<sup>1-3</sup> and Ibrahim Dagher<sup>1-4</sup>

<sup>1</sup>INSERM U1193, Hôpital Paul-Brousse, Villejuif, France; <sup>2</sup>Département Hospitalo-Universitaire Hépatinov, Hôpital Paul-Brousse, Villejuif, France; <sup>3</sup>Faculté de Médecine Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Orsay, France; <sup>4</sup>Department of Minimally Invasive Surgery, Antoine Beclere Hospital, AP-HP, Clamart, France; <sup>5</sup>Institut Biomédical Bicêtre UMS32, Hôpital Bicêtre, Kremlin-Bicêtre, France; and <sup>6</sup>INSERM U1064, Nantes, France

Hepatocyte transplantation (HT) has emerged as a promising alternative to orthotopic liver transplantation, yet liver preconditioning is needed to promote hepatocyte engraftment. A method of temporary occlusion of the portal flow called reversible portal vein embolization (RPVE) has been demonstrated to be an efficient method of liver preconditioning. By providing an additional regenerative stimulus, repeated reversible portal vein embolization (RRPVE) could further boost liver engraftment. The aim of this study was to determine the efficiency of liver engraftment of transplanted hepatocytes after RPVE and RRPVE in a rat model. Green fluorescent protein-expressing hepatocytes were isolated from transgenic rats and transplanted into 3 groups of syngeneic recipient rats. HT was associated with RPVE in group 1, with RRPVE in group 2, and with sham embolization in the sham group. Liver engraftment was assessed at day 28 after HT on liver samples after immunostaining. Procedures were well tolerated in all groups. RRPVE resulted in increased engraftment rate in total liver parenchyma compared with RPVE ( $3.4\% \pm 0.81\%$  versus  $1.4\% \pm 0.34\%$ ;  $P < 0.001$ ). In conclusion, RRPVE successfully enhanced hepatocyte engraftment after HT and could be helpful in the frame of failure of HT due to low cell engraftment.

*Liver Transplantation 25 98–110 2019 AASLD.*

Received September 14, 2018; accepted October 10, 2018.

Hepatocyte transplantation (HT) has been proposed as a promising alternative to orthotopic liver transplantation to treat liver-based inherited metabolic deficiencies.<sup>(1)</sup> In several clinical trials, isolated hepatocytes have been safely transplanted into the liver for the treatment of Crigler-Najjar syndrome type 1,<sup>(2)</sup>

glycogen storage disease type 1,<sup>(3)</sup> infantile Refsum's disease,<sup>(4)</sup> factor VII deficiency,<sup>(5)</sup> urea cycle disorders,<sup>(6,7)</sup> and phenylketonuria.<sup>(8)</sup> However, disease correction has been incomplete and transient, and the need for liver transplantation has not been averted.<sup>(9)</sup> In a consensus meeting on clinical HT held in London in 2009, experts focused on the need for methods to increase repopulation of the liver with donor hepatocytes because HT into an unconditioned recipient liver results only in low rates of cell engraftment.<sup>(10)</sup> Indeed, spontaneous hepatocyte engraftment following HT is limited, estimated to represent  $<1\%$  of total liver mass.<sup>(11)</sup> In order to obtain clinical improvement of metabolic disorders, a 5%-10% engraftment rate is thought to assure a sufficient quantity of the missing enzyme or protein.<sup>(12)</sup>

In small animal models, the general concept of HT has been the infusion of hepatocytes from syngeneic donors into recipients through intrasplenic or portal

*Abbreviations: ALP, alkaline phosphatase; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; CL, caudate lobe; GFP, green fluorescent protein; HT, hepatocyte transplantation; LLL, left lateral lobe; ML, median lobe; PVE, portal vein embolization; RL, right lobe; RPVE, reversible portal vein embolization; RRPVE, repeated reversible portal vein embolization; SD, standard deviation.*

*Address reprint requests to Hadrien Tranchart, M.D., Ph.D., Department of Minimally Invasive Surgery, Antoine Beclere Hospital, AP-HP, 157, rue de la Porte-de-Trivaux, 92141 Clamart cedex, France. Telephone: +33 1 45 37 43 47; FAX: +33 1 45 37 49 78; E-mail: hadrien.tranchart@aphp.fr*



vein injection. Efficient engraftment is limited because the transplanted hepatocytes become entrapped in portal spaces and are subsequently destroyed by the recipient's immune system.<sup>(13,14)</sup> A significant engraftment occurs only if the resident hepatocytes are destroyed or blocked, developing the concept of liver preconditioning.<sup>(15)</sup> Most of the protocols developed to promote cell engraftment have been based on the use of toxins<sup>(16,17)</sup> or invasive methods such as hepatic irradiation<sup>(18)</sup> or partial hepatectomy.<sup>(19)</sup> These methods have been successful in increasing cell engraftment to sufficient quantities to produce a biological effect. However, these procedures used in small animal models cannot be transferred in clinical practice, and alternative strategies are needed.

Among methods proposed to promote cell engraftment, partial occlusion of portal blood flow was thought to be interesting to develop in a minimally invasive setting. Occlusion of 1 branch of the portal vein results in hemodynamic changes and up-regulation of humoral mediators,<sup>(20)</sup> leading to atrophy of ipsilateral segments and hypertrophy of contralateral segments. This partial portal vein occlusion is routinely achieved in clinical practice by partial portal vein embolization (PVE) to induce hypertrophy of the future remnant liver after hepatectomy and, consequently, to increase the number of cancer patients amenable to surgery.<sup>(21)</sup> A nonabsorbable material is commonly used for embolization because it provides effective and permanent vascular occlusion. Longterm effects are not considered because the embolized liver is generally removed. PVE has been shown to induce hepatocyte proliferation and liver regeneration in rodents<sup>(22)</sup> and swine.<sup>(23)</sup>

Initially, our team applied PVE as liver preconditioning before HT and demonstrated increased cell engraftment in nonhuman primates<sup>(24)</sup> and biological effects in rabbits.<sup>(25,26)</sup> Yet, unlike surgical practice, the embolized segments are not meant to be removed in

the setting of HT; hence, we focused on developing a minimally invasive method for liver preconditioning that would be both safe and routinely applicable. A method of temporary occlusion of the portal vein with an absorbable material (a biological glue) was established. In nonhuman primates, this method called reversible portal vein embolization (RPVE) was shown to stimulate hepatocyte proliferation and liver regeneration.<sup>(27)</sup> Complete recanalization occurred within 2 weeks, avoiding longterm liver scarring. Subsequently, liver preconditioning using RPVE demonstrated efficient repopulation of the liver with transplanted autologous hepatocytes in nonhuman primates.<sup>(28)</sup>

These results led the authors to consider the possibility of repeated reversible portal vein embolization (RRPVE) to further boost liver repopulation. Because RPVE induces a temporary occlusion, it can allow a rapid second embolization at the moment of completion of the portal recanalization, providing an additional regenerative stimulus. In a recent study in rats,<sup>(29)</sup> the authors showed that RRPVE induced additional hepatocyte proliferation and an increase in liver weight and volume when compared with single RPVE. RRPVE was well tolerated, and histological analysis showed no cell necrosis and limited apoptosis. This repeated stimulus could promote liver engraftment after HT, improving repopulation of the liver by transplanted hepatocytes. The purpose of this study was to determine the efficiency of RPVE and RRPVE to promote liver engraftment of transplanted hepatocytes in a rat model.

## Materials and Methods

### ANIMALS

Rats were housed in the animal facility of INSERM UMS 33, Villejuif, France, in filter-topped cages (2 per cage) under clean, nonsterile, standard conditions for at least 5 days before the experiment. Animals were checked daily, fed with standard laboratory chow, and given free access to water. Procedures were approved by the French Ministry of Higher Education and Research (number 02008.02). All animals were treated in accordance with the European Community laws for animal care. Male Sprague-Dawley green fluorescent protein (GFP)-expressing transgenic rats were used as hepatocyte donors, kindly obtained from the animal facility of INSERM 1064, Nantes, France.<sup>(30)</sup> Recipient rats were male Sprague-Dawley (Janvier Labs, St Berthevin, France), weighing 250–350 g,

*This research was supported by the Agence de la Biomédecine, the Association Française d'Etude du Foie, and the Fondation de l'Avenir. Hadrien Tranchart was supported by the Association Française Contre les Myopathies.*

*Copyright © 2018 by the American Association for the Study of Liver Diseases.*

*View this article online at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com).*

*DOI 10.1002/lt.25364*

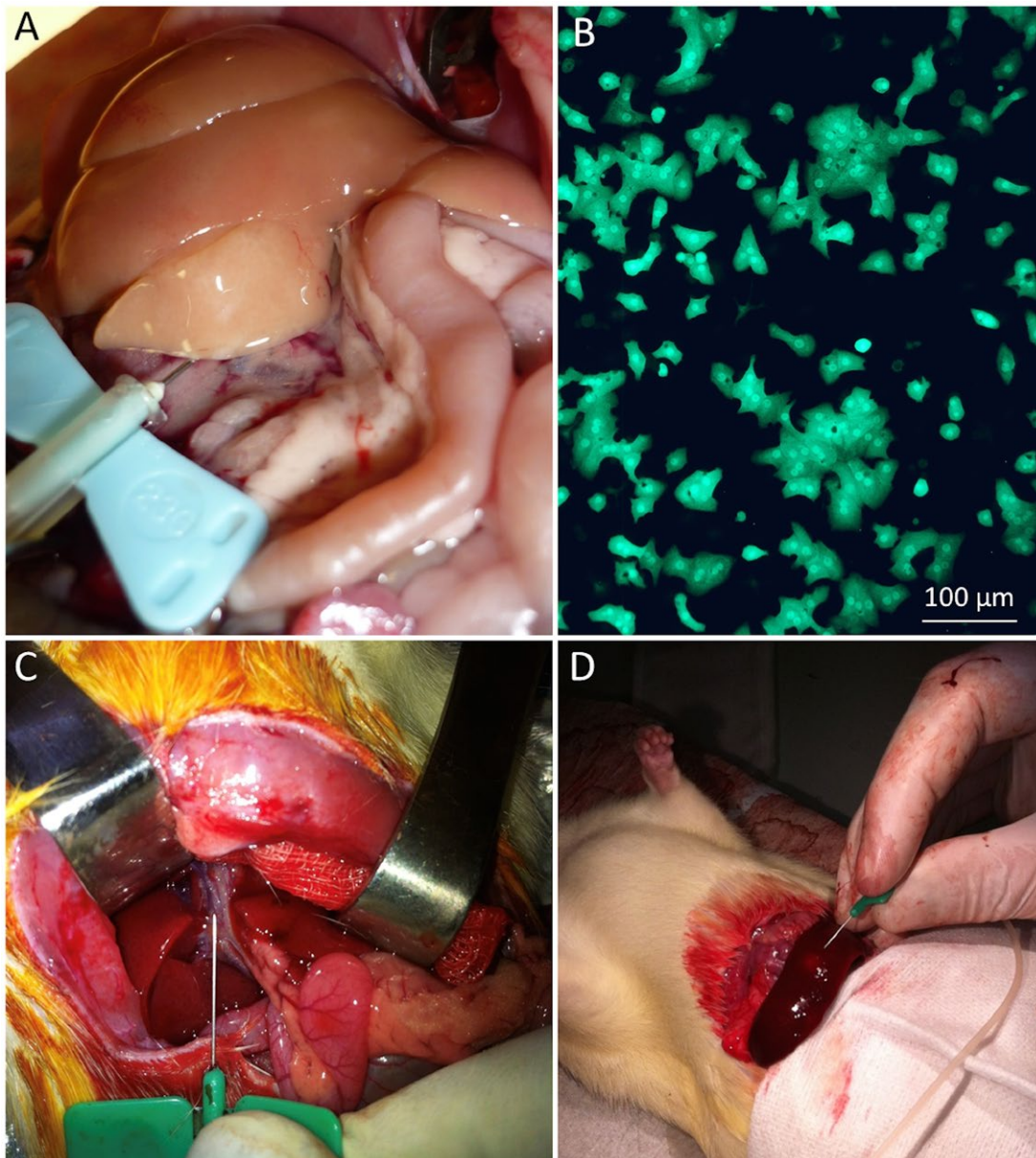
*Potential conflict of interest: Nothing to report.*

aged 8-10 weeks old, and having a syngeneic background to the donor rats. General anesthesia during animal procedures was provided using isoflurane/oxygen (Iso-Vet, Piramal Healthcare, Northumberland, United Kingdom) supplied by a vaporizer at a concentration of 3% for induction and 2% for maintenance. Buprenorphin (Buprécare, Axience, Pantin, France) at the concentration of 0.1 mg/kg body weight was applied intracutaneously during anesthesia for

postoperative analgesia. Study endpoints were defined to avoid unnecessary suffering of the animals.

## HEPATOCTYTE ISOLATION

GFP-expressing hepatocytes were isolated employing 2-step in situ collagenase perfusion of the liver (Worthington, Lakewood, NJ), as previously described<sup>(31)</sup> (Fig. 1A), and then purified from nonparenchymal cells



**FIG. 1.** Experimental procedures. (A) In situ liver perfusion with collagenase in the donor rat. (B) Fluorescence microscopy analysis of freshly isolated hepatocytes showing sustained expression of nuclear GFP. (C) Selective PVE using absorbable material of the portal branches for ML and LLL of the rat liver. (D) HT by splenic injection of the cell suspension.

by sedimentation on Percoll isodensity solution (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). Freshly isolated hepatocytes (Fig. 1B) were resuspended at  $1 \times 10^7$  cells/mL in Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco Life Technologies, Foster City, CA) containing fetal bovine serum, bovine serum albumin, glutamine, and antibiotics. Hepatocyte viability was determined by trypan blue dye exclusion and was maintained at >90% through the experiments. A total of 10 GFP-expressing transgenic rats were killed for hepatocyte isolation.

## LIVER PRECONDITIONING USING RPVE

Surgery was performed as previously described.<sup>(31)</sup> Briefly, procedures were performed through a subcostal laparotomy. Selective catheterization of the portal branch for the left lateral lobe (LLL) and median lobe (ML) was performed by direct puncture of the corresponding branch with a 27-gauge needle (Microflex, Vygon, Écouen, France; Fig. 1C). The portal branch for the LLL and ML was occluded progressively with the powdered form of an absorbable gelatin sponge (Gelita-Spon, Gelita Medical, Eberbach, Germany), performing a selective RPVE of 70% of portal vein flow. The right and caudate portal branches were left patent. Gelatin powder was suspended in saline solution (0.07 g/mL), and the mixture was homogenized in a 37°C water bath. A volume of 0.3 mL of the mixture was used for the embolization. Hemostasis of the injection point was achieved by light compression with a sterile compress.

## HEPATOCTE TRANSPLANTATION

HT was performed immediately after RPVE. After splenic mobilization, GFP-expressing hepatocytes, freshly isolated from the liver of syngeneic donor rat, were transplanted through splenic injection (Fig. 1D). A volume of 2 mL of a suspension containing  $2 \times 10^7$  hepatocytes was slowly injected through a 29-gauge needle. Hemostasis was achieved by light pressure over the puncture site. A 4/0 polyglactin (Vicryl, Ethicon, Issy-les-Moulineaux, France) double-layer running suture was used for abdominal closure.

## REPEATED STIMULUS USING RRPVE

Procedures were performed through an iterative subcostal laparotomy. After cautious adhesiolysis, access

was made to the hepatic pedicle. RRPVE was performed as a RPVE procedure. A time frame of 14 days between the RPVE + HT procedure and RRPVE was adopted from previous experiments.<sup>(29)</sup>

## LIVER SAMPLE COLLECTION

Recipient rats were killed by exsanguination under general anesthesia, and 2 tissue samples were collected from each of the 4 liver lobes and from the spleen. The samples were rapidly embedded in an optimal cutting temperature compound (Tissue-Tek, Sakura, Villeneuve d'Ascq, France), frozen in liquid nitrogen, and then stored at -80°C. Nine frozen sections (5-mm thickness) of each sample were prepared for each rat.

## DETECTION OF TRANSPLANTED HEPATOCYTES

Immunostaining was carried out by incubation of cryostat sections with a mouse monoclonal antibody against GFP (dilution 1:100; Living Colors, Clontech, Mountain View, CA) overnight at 4°C. Binding of the primary antibody was detected after incubation with a secondary sheep anti-mouse polyclonal antibody linked to horseradish peroxidase (dilution 1:100; GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom) for 1 hour at room temperature. Finally, the peroxidase reaction was carried out with diaminobenzidine (Dako, Carpinteria, CA). For specific detection of transplanted hepatocytes within splenic parenchyma, immunostaining was carried out with primary mouse monoclonal antibody against albumin (dilution 1:100; Cedarlane, Burlington, Ontario, Canada). All immunostains were counterstained with hematoxylin-eosin, dehydrated, cover-slipped, and examined under a light microscope (20× magnification).

## TISSUE ANALYSIS

The engraftment ratios of the transplanted hepatocytes in the recipient liver were determined by counting the number of GFP+ cells and expressed as the percentage of GFP+ cells per total number of hepatocytes (approximately 24,000 cells from 30 random areas from the 4 liver lobes for each rat). The ratio of GFP+ hepatocytes in a specific area was also obtained. The sites of engrafted hepatocytes were defined as liver zone 1 (periportal area), zone 2 (intermediate area), or zone 3 (centrilobular area).

## BIOCHEMICAL ANALYSIS OF RAT SERUM

Blood samples were collected through the tail vein under general anesthesia before operation and at days 3, 7, 14, 17, 21, and 28 after transplantation, and they were immediately centrifuged at 2000g for 6 minutes. Aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), and total bilirubin levels were measured in the local biochemistry department.

## EXPERIMENTAL DESIGN

The studies were undertaken in 2 parts.

### Short-term Study of the Distribution of Transplanted Hepatocytes

The first experiment was designed to establish in the short term the engraftment of the infused hepatocytes within the recipient liver. GFP-expressing hepatocytes were transplanted after RPVE into Sprague-Dawley rats ( $n = 15$ ). Recipient rats were killed at days 5, 10, and 28 after the procedure. Transplanted hepatocytes were detected on liver samples after immunostaining.

### Assessment of RRPVE Impact on Hepatocyte Engraftment

In the second part, 3 experimental groups were used (Fig. 2). In group 1, recipients ( $n = 18$ ) were submitted to liver preconditioning using RPVE before HT during the same procedure. In group 2, recipients ( $n = 14$ ) were submitted to this same procedure, followed by a second RPVE 14 days later. In the sham group, recipients ( $n = 5$ ) were submitted to intraportal injection of 0.3 mL of saline before HT. All recipient rats were sacrificed for sample collection 28 days after the HT procedure.

## STATISTICAL METHODS

A power calculation was performed in order to limit the number of animals. The Mann-Whitney U test was used to investigate that hepatocyte engraftment in group 2 (experimental) was 30% superior than in group 1. Type I and II error rates were set at 0.05 and 0.1, respectively. Considering a 25% mortality rate, a group size of 13 animals was determined.

Continuous variables are presented as mean  $\pm$  standard deviation (SD). Categorical variables are presented as percentage values and analyzed using a chi-square test.  $P \leq 0.05$  was considered statistically significant. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 4 software (San Diego, CA).

## Results

### HEPATOCTYTE ISOLATION

The livers of 10 GFP-expressing transgenic donor rats were perfused with collagenase, and 8 livers were selected for the HT procedure. In 2 cases, incorrect catheterization of the inferior vena cava led to insufficient perfusion, and the liver was discarded. Isolation provided a median count of  $3 \times 10^9$  ( $1.9\text{--}5.6 \times 10^9$ ) cells, depending mainly on the liver volume. After Percoll purification, 15%–38% of submitted cells were gathered. Young donor rats gave the best yield. Hepatocyte viability averaged 90% in all cases. Sustained expression of nuclear GFP was observed in isolated hepatocytes during fluorescence microscopy analysis.

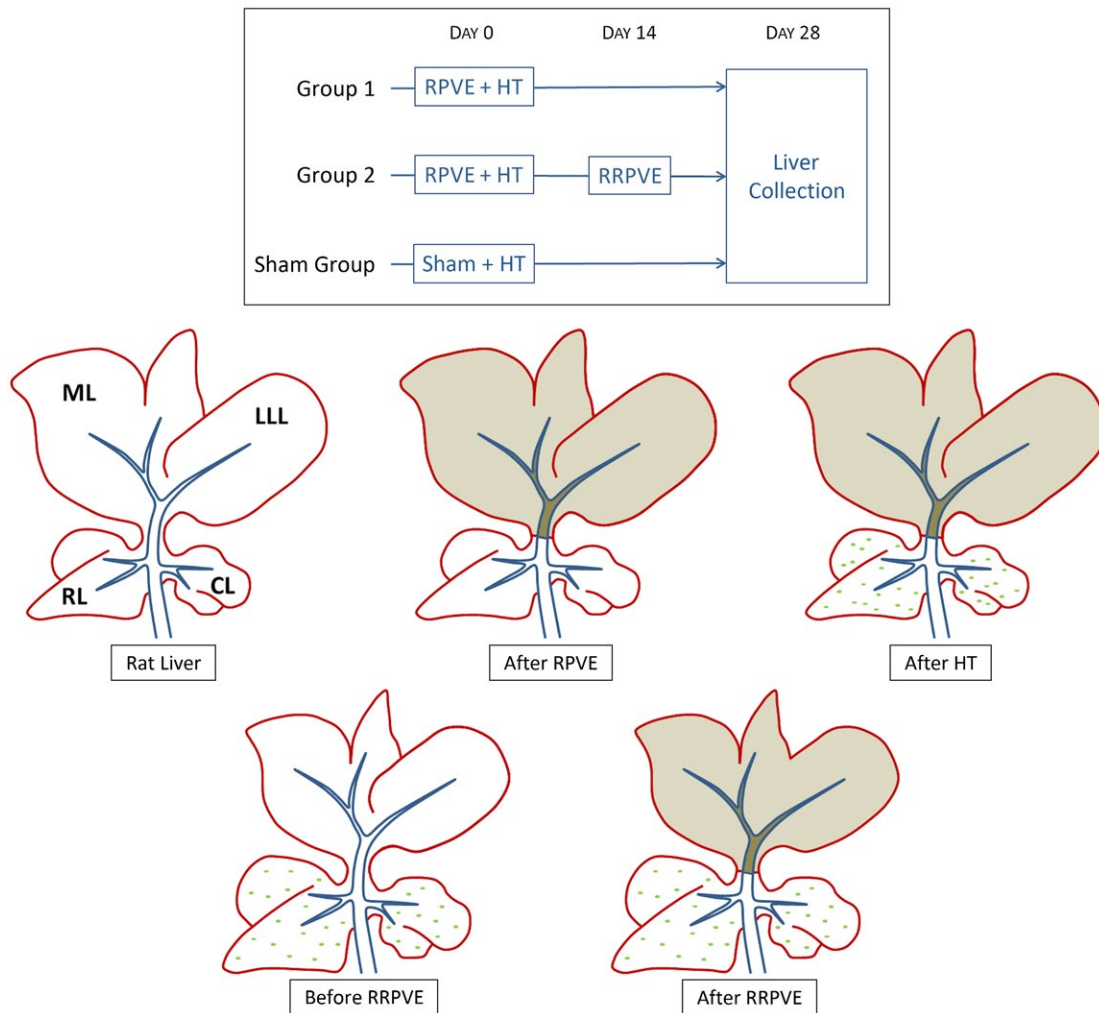
### TOLERANCE OF THE PROCEDURES

#### Mortality and Morbidity

In a preliminary study, selective RPVE was developed in the rat using a volume of 0.5 mL of the absorbable agent.<sup>(29)</sup> The first 2 rats submitted to RPVE and HT presented immediate portal vein thrombosis and death. Consequently, RPVE was performed using 0.3 mL of the absorbable agent, and no further portal vein thrombosis was observed. Two additional deaths occurred in group 1: 1 rat died during anesthesia and 1 from an unexplained cause. Two rats died in group 2 due to bleeding or small bowel injury during adhesiolysis. All rats survived in the sham group. One rat in group 2 was reoperated on 2 hours after the procedure due to evisceration and survived.

### Biochemical Analysis

Acute transient injury was detected by elevated ALT and AST levels on day 3 ( $\approx 2$ -fold), which was less important in the sham group (Fig. 3A,B). The ALT and AST values returned to normal by day 7 in all the



**FIG. 2.** Study protocol. Time frame of experimental groups and diagram of the rat liver during the experimental protocol, showing RPVE of the portal branches for ML and LLL of the rat liver, the portal branches for RL and CL remaining patent, before immediate HT in group 1. The same procedure is followed by a RRPVE 14 days later in group 2.

groups. RRPVE induced moderate transient injury 3 days after the procedure, and ALT and AST values returned to normal 7 days after the procedure. ALP levels declined transiently after each embolization procedure (Fig. 3C), but no impairment of liver function, represented by the total bilirubin level, was observed in any of the groups (Fig. 3D).

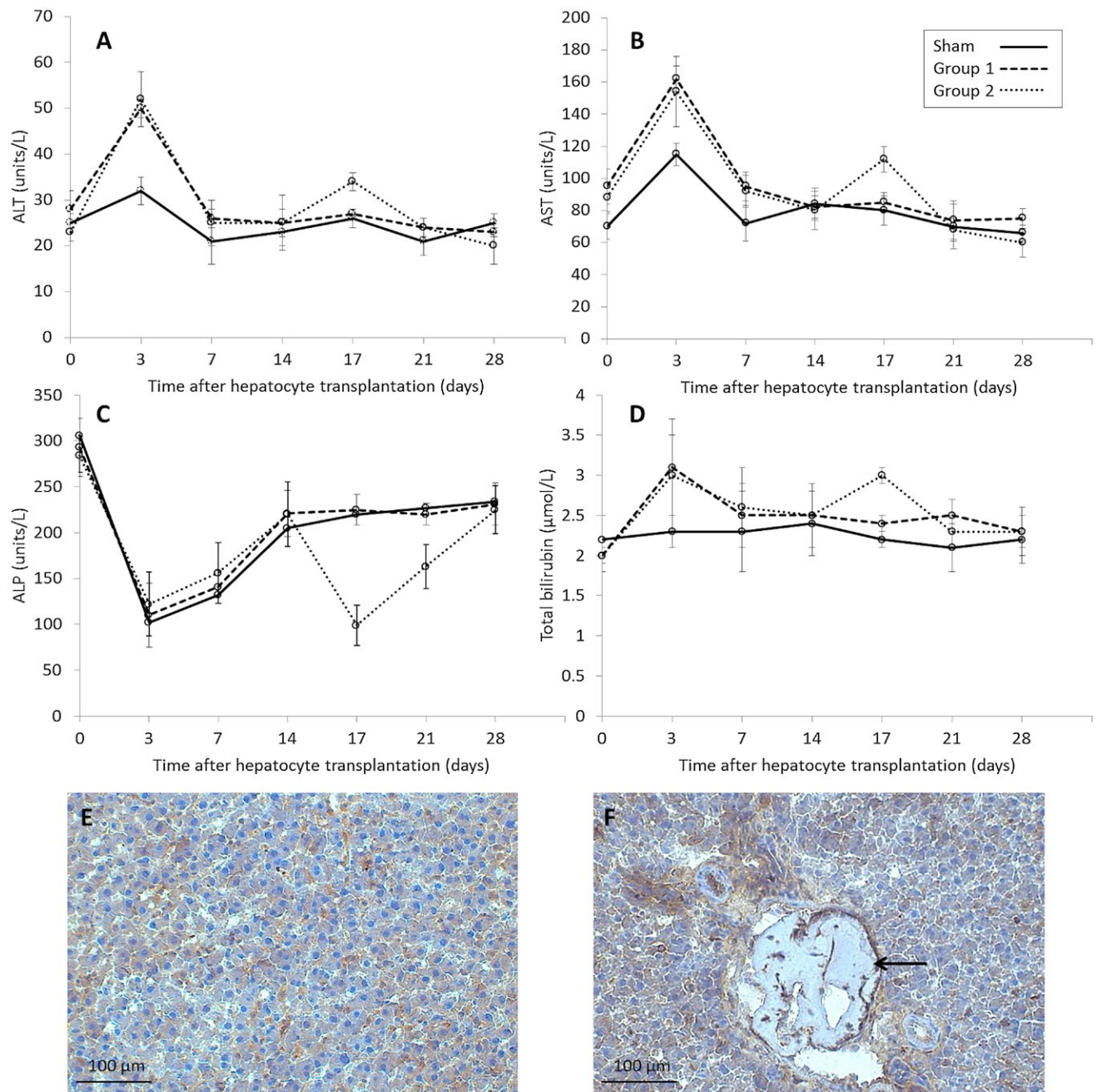
### Histological Analysis

At day 5 after transplantation, histological analysis of embolized lobes did not reveal any cell necrosis (Fig. 3E) or signs of hepatic cellular inflammation. The absorbable embolization material was observed in

distal portal branches at day 5 (Fig. 3F) and was absent at day 10 (not shown). Sinusoidal dilatations were observed in the nonembolized lobes at day 5 (Fig. 4A). Liver histology in the nonembolized lobes returned to normal at day 10 (Fig. 4B).

### SHORT-TERM DISTRIBUTION OF TRANSPLANTED HEPATOCYTES

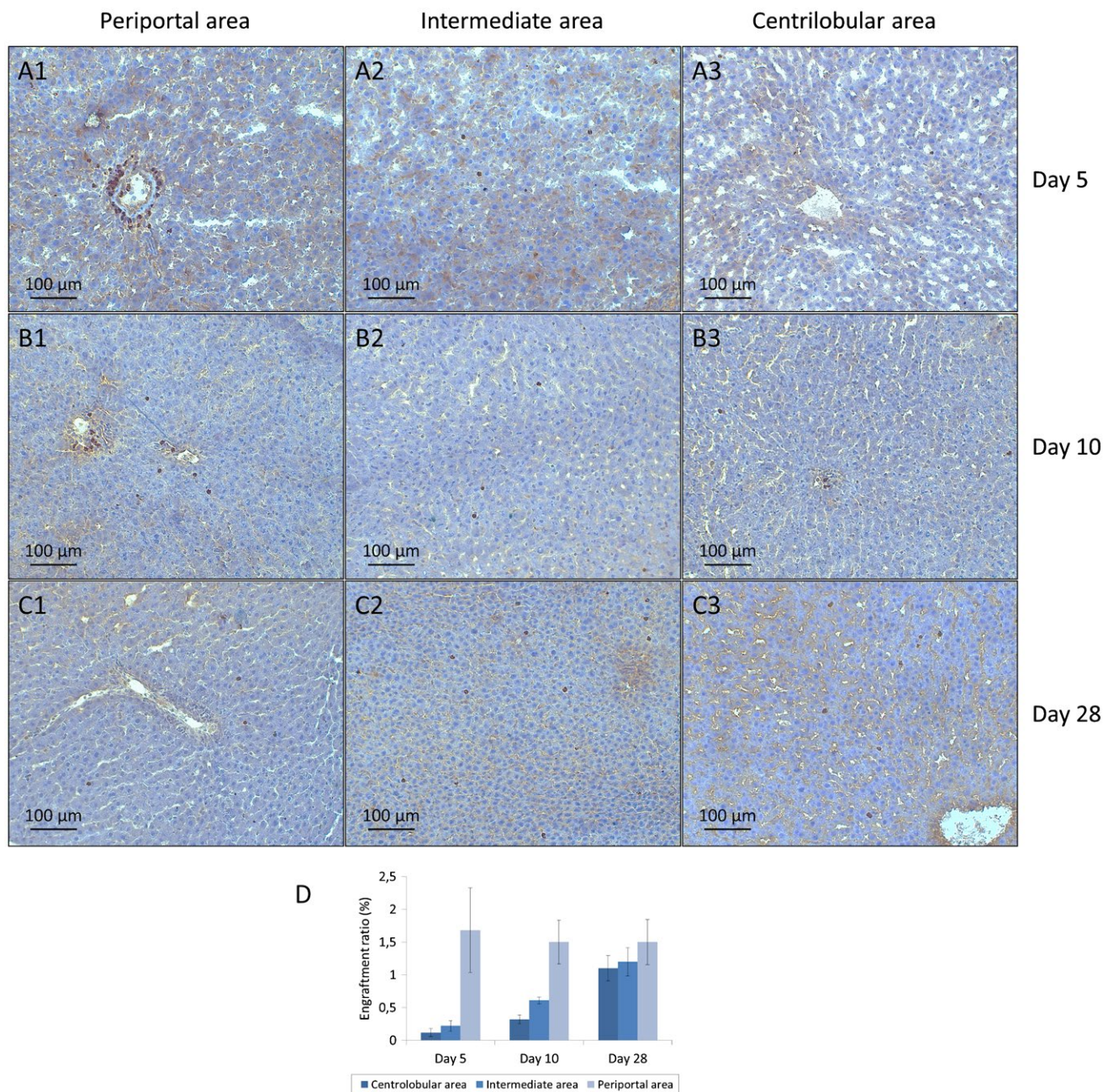
Total mean engraftment ratio in the nonembolized lobes was  $0.77\% \pm 0.43\%$  at day 5,  $0.91\% \pm 0.08\%$  at day 10, and  $1.28\% \pm 0.51\%$  at day 28. At day 5, histological examination of the nonembolized lobes revealed that the donor hepatocytes



**FIG. 3.** Tolerance of the procedures. (A-D) Mean  $\pm$  SD values of liver function tests after successive procedures at different time points. (E,F) Histological analysis after hematoxylin staining on representative frozen sections at day 5 in embolized lobes after transplantation. (E) No cell necrosis was observed. (F) The absorbable embolization material was observed in the distal portal branch at day 5 (arrow).

were predominantly distributed in the periportal area, as mean engraftment ratios were  $1.6\% \pm 1.29\%$ ,  $0.22\% \pm 0.16\%$ , and  $0.12\% \pm 0.12\%$  in the periportal, intermediate, and centrilobular areas, respectively

(Fig. 4A). At day 10, mean engraftment ratios were  $1.5\% \pm 0.04\%$ ,  $0.61\% \pm 0.04\%$ , and  $0.32\% \pm 0.13\%$  in the periportal, intermediate, and centrilobular areas, respectively (Fig. 4B). At day 28, transplanted



**FIG. 4.** Time-course engraftment of GFP-expressing transplanted hepatocytes after RPVE. (A-C) Histological analysis (20×) on representative frozen sections after anti-GFP immunostaining in nonembolized lobes at (A) day 5, (B) day 10, and (C) day 28 after HT associated with RPVE. At each time point, sections of the (1) periportal area, (2) intermediate area, and (3) centrilobular area are represented. (D) Mean ± SD engraftment ratios of transplanted hepatocytes in each area of the hepatic lobule in nonembolized lobes at days 5, 10, and 28 after HT associated with RPVE.

hepatocytes were evenly distributed within the parenchyma, and mean engraftment ratios were 1.5% ± 0.69%, 1.2% ± 0.43%, and 1.1% ± 0.38% in the periportal, intermediate, and centrilobular areas,

respectively (Fig. 4C). Figure 4D shows a marked difference in the zonal distribution of transplanted hepatocytes at days 5, 10, and 28 after RPVE and transplantation procedure.

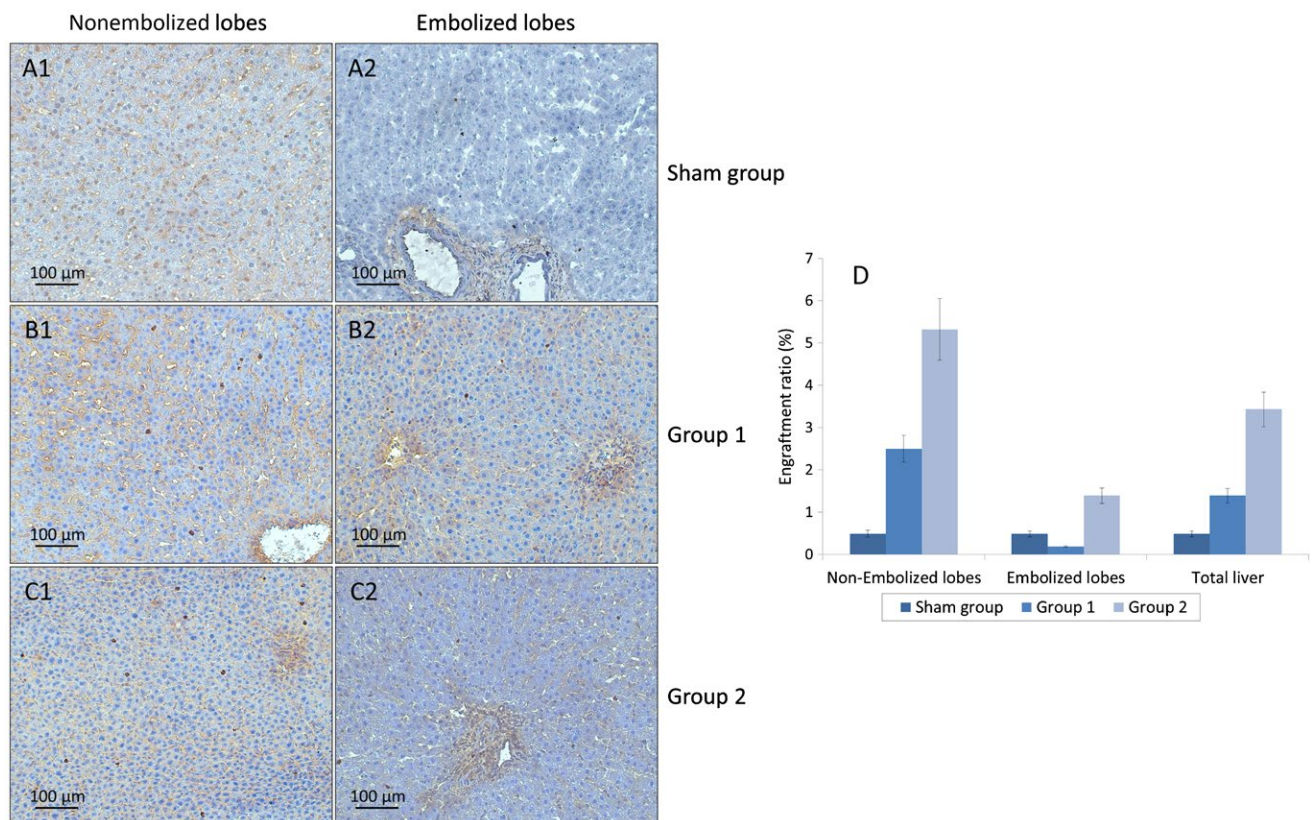
## ASSESSMENT OF RRPVE IMPACT ON HEPATOCYTE ENGRAFTMENT

Mean engraftment ratio of the GFP-expressing transplanted hepatocytes in the total liver parenchyma increased significantly in group 2 compared with group 1 ( $3.4\% \pm 0.81\%$  [ $n = 16$ ] versus  $1.4\% \pm 0.34\%$  [ $n = 12$ ];  $P < 0.001$ ) at day 28. The engraftment ratio in total liver parenchyma was significantly higher in group 1 ( $1.4\% \pm 0.34\%$ ,  $n = 16$  versus  $0.49\% \pm 0.13\%$ ;  $n = 5$ ;  $P < 0.001$ ) and in group 2 ( $3.4\% \pm 0.81\%$ ,  $n = 12$  versus  $0.49\% \pm 0.13\%$ ;  $n = 5$ ;  $P < 0.001$ ) than in the sham group. In the sham group, GFP-expressing transplanted hepatocytes were evenly distributed in non-embolized and embolized lobes at day 28 (Fig. 5A). In groups 1 and 2, GFP-expressing hepatocytes were observed mostly in nonembolized lobes at day

28 (Fig. 5B,C). Figure 5D shows mean engraftment ratios in the experimental groups. The results are summarized in Table 1.

## DETECTION OF TRANSPLANTED HEPATOCYTES IN THE SPLENIC PARENCHYMA

Numerous GFP-expressing cells were observed within the splenic parenchyma at days 10 (Fig. 6A) and 28 (Fig. 6B) after intrasplenic injection of the suspension containing the GFP-expressing hepatocytes. No cell count was performed due to the high number of cells and the heterogeneity of distribution in the splenic parenchyma. In order to confirm that the GFP-expressing cells were the GFP-expressing transplanted hepatocytes, serial sectioning was performed on splenic samples, followed by immunostaining with antibody against GFP and antibody against rat albumin (Fig.



**FIG. 5.** Engraftment of transplanted hepatocytes. (A-C) Histological analysis (20×) on representative frozen sections after immunostaining in the (A) sham group, (B) group 1, and (C) group 2 at day 28 in (1) nonembolized lobes and in (2) embolized lobes. (D) Mean  $\pm$  SD engraftment ratios of GFP-expressing transplanted hepatocytes in nonembolized lobes, embolized lobes, and total liver parenchyma at day 28 in experimental groups.

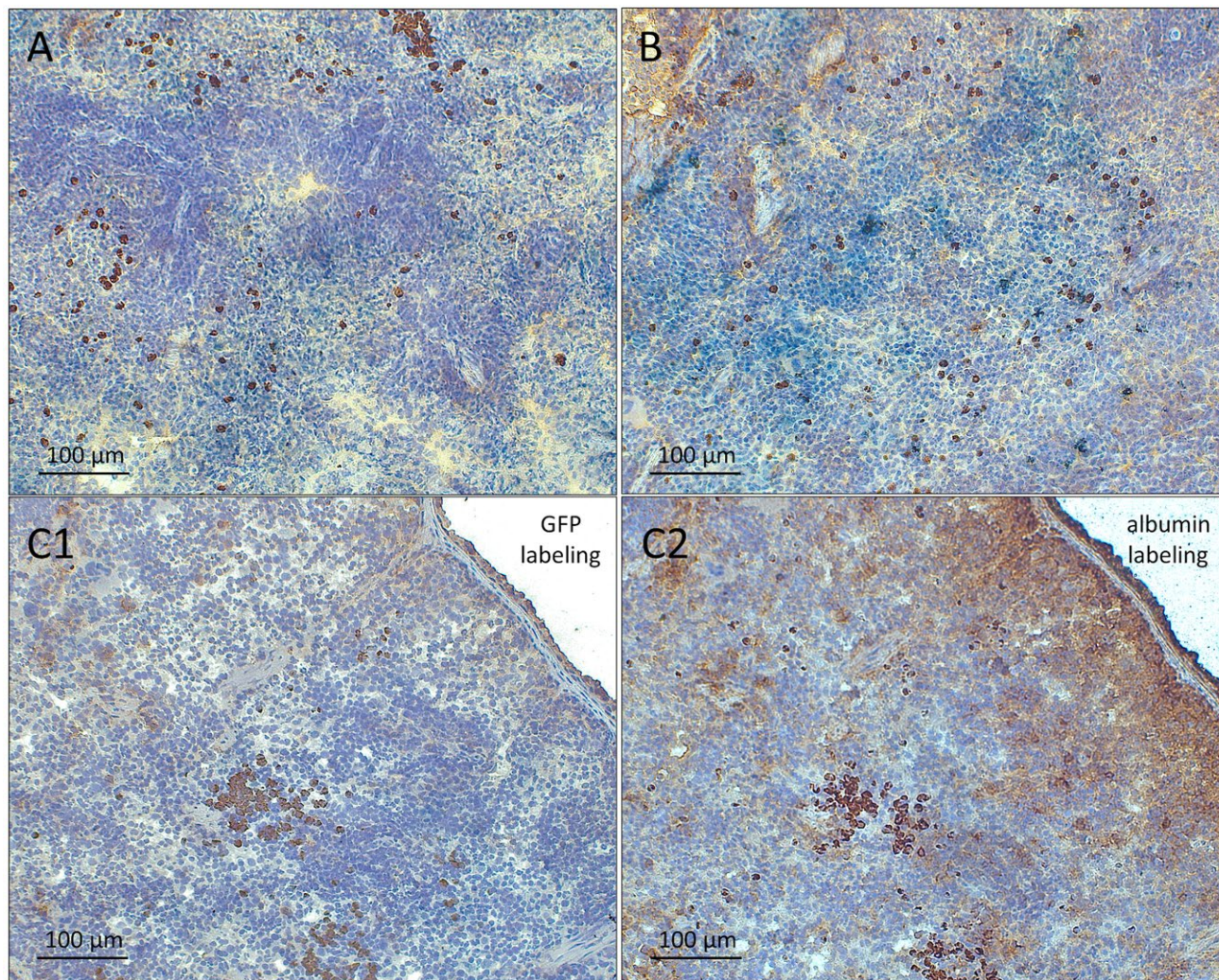


**TABLE 1. Engraftment Ratio of Transplanted Hepatocytes at Day 28**

|                    | Nonembolized Lobes | Embolized Lobes | Total Liver   | P Value* |
|--------------------|--------------------|-----------------|---------------|----------|
| Sham group (n = 5) | 0.49% ± 0.17%      | 0.49% ± 0.13%   | 0.49% ± 0.13% | 1.00     |
| Group 1 (n = 18)   | 2.5% ± 0.63%       | 0.19% ± 0.03%   | 1.4% ± 0.34%  | <0.001   |
| Group 2 (n = 14)   | 5.3% ± 1.5%        | 1.4% ± 0.37%    | 3.4% ± 0.81%  | <0.001   |

NOTE: Data are given as means ± SD.

\*Chi-square test.



**FIG. 6.** Detection of transplanted hepatocytes in the splenic parenchyma. (A-B) Histological analysis (20×) on representative frozen sections after immunostaining against GFP at days (A) 10 and (B) 28 after intrasplenic injection of GFP-expressing hepatocytes. (C) Histological analysis (20×) on representative serial frozen sections after immunostaining against (C1) GFP and (C2) rat albumin at day 28 after intrasplenic injection of GFP-expressing hepatocytes.

6C). Labeling of the same cells was observed within the splenic parenchyma, thereby confirming the presence of GFP-expressing transplanted hepatocytes in the splenic pulp.

## Discussion

Because HT into an unconditioned recipient liver results in low rates of cell engraftment, clinically

applicable methods of liver preconditioning have been developed. In the consensus on clinical HT held in 2009, hepatic irradiation, hepatic resection, and portal embolization have been advocated.<sup>(10)</sup> PVE is regarded as a safe and accepted technique in surgical practice. It is considered a minimally invasive procedure because access to the portal branch is performed using a percutaneous transhepatic approach after a puncture technique with ultrasonic guidance under local anesthesia.<sup>(32)</sup> The precise biological and cellular mechanisms of liver regeneration following portal embolization remain unclear, involving many molecular pathways, such as tumor necrosis factor alpha and interleukins 6 and 1.<sup>(20)</sup> The underlying mechanisms of PVE in liver preconditioning before HT are also open questions. It is thought that endothelial damage allows transplanted cells to enter liver parenchyma,<sup>(14)</sup> whereas the release of inflammatory mediators facilitates parenchymal remodeling during cell engraftment.<sup>(33)</sup>

In an effort to develop a less invasive approach for liver preconditioning, our team focused on a temporary PVE, ie, RPVE. This method was proven to be safe and induced hypertrophy of the nonembolized liver segments in a nonhuman primate model<sup>(27)</sup> and was applied successfully in a preliminary study in humans before liver surgery.<sup>(34)</sup> Consequently, RPVE was used as liver preconditioning to enhance engraftment of autologous hepatocytes in nonhuman primates, and the regenerative response induced by the RPVE significantly increased hepatocyte engraftment, reaching 7.4% in the nonembolized lobe.<sup>(28)</sup> Because RPVE induces a temporary occlusion, the possibility to proceed to a second embolization at the moment of completion of portal recanalization was considered to provide an additional regenerative stimulus. In a rat model, RRPVE induced additional hepatocyte proliferation and an increase in liver weight and volume compared with RPVE.<sup>(29)</sup> In the present study, RRPVE was applied to promote further liver engraftment. Because the transplanted hepatocytes have no selective advantage in comparison with the resident cells, both should proliferate in response to the RRPVE stimulus in the nonembolized lobes, and the engraftment rate in these lobes should not differ. However, the repetition of the RPVE should lead to atrophy of the embolized lobes, increasing the number of the transplanted hepatocytes within the total liver mass. In a previous study in rats, complete recanalization of portal branches was observed at day 14 on repeated portograms.<sup>(29)</sup> Thus, the time lapse between the first procedure and the

RRPVE was decided to be 14 days. Because >90% of liver regeneration occurs within 7 days following partial portal occlusion in rats,<sup>(22)</sup> we did not expect any additional impact of the proliferation stimulus with a longer time interval.

In the preliminary experiments of this study, the aim was to assess the evolution of transplanted GFP-expressing hepatocytes in the host liver. Even though the hepatocyte donor rats had a syngeneic background to donor rats, the expression of GFP could induce an immunological reaction and decrease the survival of transplanted hepatocytes. Recipient rats were killed at days 5, 10, and 28 after the RPVE and HT procedure. At day 5, transplanted hepatocytes were predominantly distributed in the periportal area. Subsequently, distribution of the transplanted hepatocytes tends toward a homogenization within the hepatic lobule. More importantly, the transplanted hepatocytes were still visible at day 28, which was chosen for evaluation of hepatocyte engraftment in the present study. Interestingly, Maeda et al. recently published results regarding the fate of GFP-expressing hepatocytes transplanted in the liver of syngeneic wild-type rats after retrorsine administration.<sup>(35)</sup> Transplanted hepatocytes were still visible at day 28, but the authors demonstrated the disappearance of GFP-expressing hepatocytes at day 42, most likely involving an immunological reaction against GFP.

Procedures were well tolerated in all groups. Two rats in group 2 died because of difficulties accessing the portal pedicle because adhesiolysis is technically demanding in small animals. However, problems related to any relaparotomy should be ruled out because PVE is routinely performed by a transhepatic approach without laparotomy in humans. The results of histological analysis showed that embolization did not result in the necrosis of embolized lobes, inducing only sinusoidal dilatations in the nonembolized lobes. Liver histology returned to normal at day 10. Serum analysis showed a transient increase in aminotransferase levels without impairment of liver function.

In this study, we demonstrated that the repetition of RPVE at 14 days significantly improved hepatocyte engraftment after HT associated with RPVE. This increase was mainly due to improvement of hepatocyte engraftment in nonembolized lobes ( $5.3\% \pm 1.5\%$  in group 2 versus  $2.5\% \pm 0.63\%$  in group 1;  $P < 0.001$ ). Surprisingly, hepatocyte engraftment increased also in embolized lobes ( $1.4\% \pm 0.37\%$  in group 2 versus  $0.19\% \pm 0.03\%$  in group 1;  $P < 0.001$ ). This could be

explained by difficulties of iterative access to the portal pedicle to perform RRPVE that could lead to a suboptimal embolization in some rats. Another hypothesis could be the persistence of transplanted hepatocytes in the splenic pulp that could continue to migrate through the portal vein into liver sinusoids and parenchyma. Longterm correction of the metabolic disorder in an animal model of liver-based metabolic deficiency using HT should be the next step of our approach. In future studies, our aim will be to apply liver preconditioning using RRPVE prior to HT in jaundiced Gunn rats,<sup>(36)</sup> an animal model of Crigler-Najjar syndrome type 1, which is caused by inherited bilirubin-uridine diphosphate glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A1 deficiency.

Previous studies have demonstrated that liver preconditioning using RPVE before HT improved hepatocyte engraftment, up to 7.4% in nonembolized lobes in the nonhuman primate model,<sup>(28)</sup> exceeding the 5% engraftment rate commonly thought to be necessary to obtain clinical improvement. However, a sufficient engraftment rate does not guarantee disease correction because in clinical studies, the function of transplanted cells has been short-lived, mainly because of the inability to treat or diagnose rejection. A general caveat of transplantation of allogenic hepatocytes is that it cannot be repeated. Recent progress in the field of regenerative medicine has set its focus on hepatocyte-like cells, generated from induced pluripotent stem cells,<sup>(37)</sup> that could allow iterative HT. Although fully mature hepatocyte-like cells have not yet been produced, it has been shown that they successfully engraft and pursue their maturation in situ.<sup>(38)</sup> However, safety studies have to be conducted before clinical use of such cells, and to date, the ideal cell type for hepatic regenerative medicine remains the primary hepatocyte. Yet, unlike transplantation of allogenic hepatocytes, RPVE can be repeated, taking advantage of the capacity of hepatocytes to proliferate if a mitotic stimulus is present. Portal embolization is safely and routinely performed in humans through a transhepatic approach, excluding the drawbacks of iterative laparotomy in the small animal model. Thus, RRPVE could be helpful in the frame of failure of HT due to low cell engraftment.

*Acknowledgments:* The authors are grateful to Dr. Helene Mammeri and the Department of Biochemistry, Antoine Beclere Hospital, for their support and help with the biochemical analyses and to Dr. Tuan Nguyen

from INSERM U1064, Nantes University, for conceptual advice.

## REFERENCES

- 1) Dhawan A. Clinical human hepatocyte transplantation: current status and challenges. *Liver Transpl* 2015;21(suppl 1):S39-S44.
- 2) Fox IJ, Chowdhury JR, Kaufman SS, Goertzen TC, Chowdhury NR, Warkentin PI, et al. Treatment of the Crigler-Najjar syndrome type I with hepatocyte transplantation. *N Engl J Med* 1998;338:1422-1426.
- 3) Muraca M, Gerunda G, Neri D, Vilei MT, Granato A, Feltracco P, et al. Hepatocyte transplantation as a treatment for glycogen storage disease type 1a. *Lancet* 2002;359:317-318.
- 4) Sokal EM, Smets F, Bourgeois A, Van Maldergem L, Buts JP, Reding R, et al. Hepatocyte transplantation in a 4-year-old girl with peroxisomal biogenesis disease: technique, safety, and metabolic follow-up. *Transplantation* 2003;76:735-738.
- 5) Dhawan A, Mitry RR, Hughes RD, Lehec S, Terry C, Bansal S, et al. Hepatocyte transplantation for inherited factor VII deficiency. *Transplantation* 2004;78:1812-1814.
- 6) Meyburg J, Das AM, Hoerster F, Lindner M, Kriegbaum H, Engelmann G, et al. One liver for four children: first clinical series of liver cell transplantation for severe neonatal urea cycle defects. *Transplantation* 2009;87:636-641.
- 7) Stéphenne X, Najimi M, Sibille C, Nassogne MC, Smets F, Sokal EM. Sustained engraftment and tissue enzyme activity after liver cell transplantation for argininosuccinate lyase deficiency. *Gastroenterology* 2006;130:1317-1323.
- 8) Stéphenne X, Debray FG, Smets F, Jazouli N, Sana G, Tondreau T, et al. Hepatocyte transplantation using the domino concept in a child with tetrahydropterin nonresponsive phenylketonuria. *Cell Transplant* 2012;21:2765-2770.
- 9) Soltys KA, Soto-Gutiérrez A, Nagaya M, Baskin KM, Deutsch M, Ito R, et al. Barriers to the successful treatment of liver disease by hepatocyte transplantation. *J Hepatol* 2010;53:769-774.
- 10) Puppi J, Strom SC, Hughes RD, Bansal S, Castell JV, Dagher I, et al. Improving the techniques for human hepatocyte transplantation: report from a consensus meeting in London. *Cell Transplant* 2012;21:1-10.
- 11) Ponder KP, Gupta S, Leland F, Darlington G, Finegold M, DeMayo J, et al. Mouse hepatocytes migrate to liver parenchyma and function indefinitely after intrasplenic transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:1217-1221.
- 12) Nicolas CT, Hickey RD, Chen HS, Mao SA, Lopera Higuera M, Wang Y, Nyberg SL. Concise review: liver regenerative medicine: from hepatocyte transplantation to bioartificial livers and bioengineered grafts. *Stem Cells* 2017;35:42-50.
- 13) Allen KJ, Mifsud NA, Williamson R, Bertolino P, Hardikar W. Cell-mediated rejection results in allograft loss after liver cell transplantation. *Liver Transpl* 2008;14:688-694.
- 14) Gupta S, Rajvanshi P, Sokhi R, Sleheria S, Yam A, Kerr A, Novikoff PM. Entry and integration of transplanted hepatocytes in rat liver plates occur by disruption of hepatic sinusoidal endothelium. *Hepatology* 1999;29:509-519.
- 15) Wu YM, Gupta S. Hepatic preconditioning for transplanted cell engraftment and proliferation. *Methods Mol Biol* 2009;481:107-116.
- 16) Joseph B, Kumaran V, Berishvili E, Bhargava KK, Palestro CJ, Gupta S. Monocrotaline promotes transplanted cell engraftment and advances liver repopulation in rats via liver conditioning. *Hepatology* 2006;44:1411-1420.

- 17) Laconi E, Oren R, Mukhopadhyay DK, Hurston E, Laconi S, Pani P, et al. Long-term, near-total liver replacement by transplantation of isolated hepatocytes in rats treated with retrorsine. *Am J Pathol* 1998;153:319-329.
- 18) Yamanouchi K, Zhou H, Roy-Chowdhury N, Macaluso F, Liu L, Yamamoto T, et al. Hepatic irradiation augments engraftment of donor cells following hepatocyte transplantation. *Hepatology* 2009;49:258-267.
- 19) Guha C, Parashar B, Deb NJ, Garg M, Gorla GR, Singh A, et al. Normal hepatocytes correct serum bilirubin after repopulation of Gunn rat liver subjected to irradiation/partial resection. *Hepatology* 2002;36:354-362.
- 20) Denys A, Prior J, Bize P, Duran R, De Baere T, Halkic N, Demartines N. Portal vein embolization: what do we know? *Cardiovasc Intervent Radiol* 2012;35:999-1008.
- 21) Farges O, Belghiti J, Kianmanesh R, Regimbeau JM, Santoro R, Vilgrain V, et al. Portal vein embolization before right hepatectomy: prospective clinical trial. *Ann Surg* 2003;237:208-217.
- 22) Furrer K, Tian Y, Pfammatter T, Jochum W, El-Badry AM, Graf R, Clavien PA. Selective portal vein embolization and ligation trigger different regenerative responses in the rat liver. *Hepatology* 2008;47:1615-1623.
- 23) Wilms C, Mueller L, Lenk C, Wittkugel O, Helmke K, Krupski-Berdien G, 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* 2008;247:825-834.
- 24) Dagher I, Boudechiche L, Branger J, Coulomb-Lhermine A, Parouchev A, Sentilhes L, et al. Efficient hepatocyte engraftment in a nonhuman primate model after partial portal vein embolization. *Transplantation* 2006;82:1067-1073.
- 25) Goulinet-Mainot S, Tranchart H, Groyer-Picard MT, Lainas P, Saloum Diop P, Holopherne D, et al. Improved hepatocyte engraftment after portal vein occlusion in LDL receptor-deficient WHHL rabbits and lentiviral-mediated phenotypic correction in vitro. *Cell Med* 2012;4:85-98.
- 26) Tranchart H, Gaillard M, Diop PS, Goulinet S, Lainas P, Dagher I. Transplantation of genetically modified hepatocytes after liver preconditioning in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit. *J Surg Res* 2018;224:23-32.
- 27) Lainas P, Boudechiche L, Osorio A, Coulomb A, Weber A, Pariente D, et al. Liver regeneration and recanalization time course following reversible portal vein embolization. *J Hepatol* 2008;49:354-362.
- 28) Dagher I, Nguyen TH, Groyer-Picard MT, Lainas P, Mainot S, Guettier C, et al. Efficient hepatocyte engraftment and long-term transgene expression after reversible portal embolization in nonhuman primates. *Hepatology* 2009;49:950-959.
- 29) Tranchart H, Koffi GM, Gaillard M, Lainas P, Poüs C, Gonin P, et al. Liver regeneration following repeated reversible portal vein embolization in an experimental model. *Br J Surg* 2016;103:1209-1219.
- 30) Remy S, Tesson L, Usal C, Menoret S, Bonnamain V, Nerriere-Daguin V, et al. New lines of GFP transgenic rats relevant for regenerative medicine and gene therapy. *Transgenic Res* 2010;19:745-763.
- 31) Gaillard M, Dagher I. Minimally invasive liver preconditioning for hepatocyte transplantation in rats. *Methods Mol Biol* 2017;1506:193-200.
- 32) May BJ, Talenfeld AD, Madoff DC. Update on portal vein embolization: evidence-based outcomes, controversies, and novel strategies. *J Vasc Interv Radiol* 2013;24:241-254.
- 33) Bahde R, Kapoor S, Viswanathan P, Spiegel HU, Gupta S. Endothelin-1 receptor A blocker darusentan decreases hepatic changes and improves liver repopulation after cell transplantation in rats. *Hepatology* 2014;59:1107-1117.
- 34) Tranchart H, Catherine L, Maitre S, Lainas P, De Laveaucoupet J, Dagher I. Efficient liver regeneration following temporary portal vein embolization with absorbable gelatin sponge powder in humans. *J Vasc Interv Radiol* 2015;26:507-515.
- 35) Maeda H, Shigoka M, Wang Y, Fu Y, Wesson RN, Lin Q, et al. Disappearance of GFP-positive hepatocytes transplanted into the liver of syngeneic wild-type rats pretreated with retrorsine. *PLoS ONE* 2014;9:e95880.
- 36) Gunn CK. Hereditary acholuric jaundice in the rat. *Can Med Assoc J* 1944;50:230-237.
- 37) Hannoun Z, Steichen C, Dianat N, Weber A, Dubart-Kupperschmitt A. The potential of induced pluripotent stem cell derived hepatocytes. *J Hepatol* 2016;65:182-199.
- 38) Tolosa L, Caron J, Hannoun Z, Antoni M, López S, Burks D, et al. Transplantation of hESC-derived hepatocytes protects mice from liver injury. *Stem Cell Res Ther* 2015;6:246.

## DISCUSSION DE L'ARTICLE

Au cours des expérimentations préliminaires de ce travail, le but était d'évaluer l'évolution des hépatocytes transplantés exprimant la GFP au sein du foie du rat receveur. Si le sort des hépatocytes transplantés dans le foie de rat non pathologique est documenté à la phase initiale<sup>111,166,169</sup>, leur évolution au sein du parenchyme receveur est peu documentée à moyen terme. De plus, bien que les rats donneurs soient issus d'une lignée syngénique avec les rats receveurs, l'expression de la GFP par les hépatocytes pouvait être responsable d'une réponse immunitaire, réduisant la survie des hépatocytes transplantés. Pour ces raisons, il nous est apparu nécessaire d'étudier l'évolution du repeuplement du parenchyme hépatique receveur par les hépatocytes marqués à des points définis de la phase initiale de la prise de greffe, c'est-à-dire au 5<sup>ème</sup> jour, au 10<sup>ème</sup> jour et au 28<sup>ème</sup> jour de la THe. L'objectif principal de nos travaux étant l'étude de la prise de greffe au 28<sup>ème</sup> jour de la THe, il était indispensable de confirmer la présence d'hépatocytes marqués à ce délai de la greffe. A J5, les hépatocytes transplantés étaient distribués principalement autour des zones péri-portales. Par la suite, la distribution des hépatocytes transplantés avait tendance à s'homogénéiser au sein du lobule hépatique. Plus important, les hépatocytes transplantés étaient toujours visibles à J28, date qui a donc été choisie pour évaluer la prise de greffe dans ces expérimentations. Il est intéressant de noter que Maeda et al. ont publié parallèlement à ce travail les résultats du devenir d'hépatocytes GFP transplantés dans le foie de rats receveurs syngéniques après un « préconditionnement » par administration de rétrovirus<sup>170</sup>. Ici aussi, les hépatocytes étaient toujours visibles à J28, mais les auteurs ont montré la disparition des hépatocytes GFP à J42, probablement liée à une réaction immunitaire contre la GFP.

Les procédures étaient bien tolérées dans tous les groupes expérimentaux. Les expériences antérieures avaient démontré la tolérance hépatique fonctionnelle des procédures d'EPPR et d'EPPRR chez le rat, ainsi que celle de la procédure associant EPPR et THe chez le primate<sup>152</sup>. Toutefois, la tolérance hépatique fonctionnelle de la THe associée à une EPPRR n'était pas documentée. Nous avons pu montrer la faisabilité de l'EPPRR en association avec une THe, avec des taux de morbi-mortalité faibles ou nuls, de même qu'une tolérance tissulaire acceptable : absence de zones de nécrose hépatocytaire dans les lobes

embolisés, dilatation sinusoidale modérée dans les lobes non embolisés, retour à une architecture du parenchyme hépatique normale à J10. Deux rats dans le groupe 2 (celui où une EPPRR était réalisée à 14 jours de la première procédure) sont décédés du fait de difficultés à aborder le pédicule hépatique en lien avec des adhérences tenaces de libération laborieuse chez le petit animal. Toutefois, les problèmes relatifs à une relaparotomie devraient être écartés par la réalisation percutanée de l'embolisation, pratique de routine chez l'être humain.

Nous avons démontré dans ce travail que la répétition de l'EPPR à 14 jours de la procédure associant EPPR et The permettait d'augmenter significativement la prise de greffe. Cette augmentation est principalement liée à l'augmentation de la prise de greffe dans les lobes non embolisés ( $5.3 \pm 1.5\%$  dans le groupe 2 *versus*  $2.5 \pm 0.63\%$  dans le groupe 1 ;  $P < 0.001$ ). De façon surprenante, la prise de greffe augmentait aussi dans les lobes embolisés ( $1.4 \pm 0.37\%$  dans le groupe 2 *versus*  $0.19 \pm 0.03\%$  dans le groupe 1 ;  $P < 0.001$ ). Ceci pourrait être expliqué par les difficultés rencontrées lors de l'abord itératif du pédicule hépatique pour procéder à l'EPPRR qui ont pu mener à une embolisation non optimale chez certains individus. Une autre hypothèse serait liée à la persistance des hépatocytes transplantés dans la rate, qui pourraient continuer à migrer à travers la veine splénique vers les branches portales pour gagner les sinusoides et le parenchyme hépatique. Les perspectives offertes par ce travail seront discutées plus loin.

**Liver regeneration and recanalization time-course  
following repeated reversible portal vein  
embolization in swine**

Martin GAILLARD, Emmanuel HORNEZ, Benoit LECUELLE, Thomas  
LILIN, Anne DUBART-KUPPERSCHMITT, Hadrien TRANCHART,  
Ibrahim DAGHER

**Soumis le 28 octobre 2019**

## PRESENTATION DE L'ARTICLE

Les résultats obtenus lors de l'étude EPPRR chez le rat<sup>158</sup> nous ont permis d'envisager la réalisation d'une EPPRR dans un modèle préclinique de gros animal. Bien que l'EPPR avait été mise au point chez le primate non humain, l'utilisation de ce modèle est limitée par son accessibilité et son coût. Le modèle du porc nous offrait la possibilité d'évaluer la faisabilité de la procédure d'EPPRR par des moyens non envisageables chez le rat, permettant la réalisation des procédures d'embolisation sous contrôle scopique, et facilitant l'évaluation de la reperméabilisation du système porte par des portographies itératives et de l'hypertrophie hépatique par des scanners injectés, deux actes difficiles à pratiquer chez le rat. Nous avons pu en outre utiliser le produit d'embolisation à une concentration identique à celle qui avait été utilisée chez le singe<sup>144</sup> et que nous utilisons en pratique clinique<sup>149</sup>.

Nous avons décidé de coupler cette étude de faisabilité et de tolérance à une étude comparative, afin d'évaluer l'hypertrophie hépatique engendrée par l'EPPRR par rapport à une unique procédure d'EPPR et par rapport à une méthode d'occlusion permanente du flux portal. Contrairement à ce qui a été pratiqué chez le rat, c'est l'EPP à l'aide de cyanoacrylate qui a été retenue, étant la méthode la plus largement utilisée pour l'EPP en pratique clinique<sup>85</sup>.

Chez le primate, la reperméabilisation des branches portales embolisées était complète à 14 jours de l'EPPR<sup>144</sup>. Par ailleurs, il a été démontré que plus de la moitié de la régénération hépatique survient au cours des 2 premières semaines après EPP chez l'homme<sup>62</sup>. Nous n'attendions donc pas d'effet supplémentaire important consécutif au stimulus d'EPPR avec un intervalle de temps plus long, aussi l'intervalle de temps entre la première EPPR et l'EPPRR a été déterminé à 14 jours, similaire à celui que nous avons défini chez le rat<sup>158</sup>.



## **LIVER REGENERATION AND RECANALIZATION TIME COURSE FOLLOWING REPEATED REVERSIBLE PORTAL VEIN EMBOLIZATION IN SWINE**

Martin GAILLARD, MD<sup>1,2,3,4,\*</sup>

Emmanuel HORNEZ, MD<sup>1,2,4</sup>

Benoit LECUELLE, Assistant engineer<sup>5</sup>

Thomas LILIN, DVM, MSc<sup>5</sup>

Anne DUBART-KUPPERSCHMITT, MD, PhD<sup>1,2,3</sup>

Ibrahim DAGHER, MD, PhD<sup>1,2,3,4</sup>

Hadrien TRANCHART, MD, PhD<sup>1,2,3,4</sup>

<sup>1</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U1193, Paul Brousse Hospital, Villejuif, France.

<sup>2</sup>Département Hospitalo-Universitaire Hépatinov, Paul Brousse Hospital, Villejuif, France.

<sup>3</sup>Faculté de Médecine Paris-Sud, Paris-Saclay University, Orsay, France.

<sup>4</sup>Department of Minimally Invasive Surgery, Antoine Béclère Hospital, APHP, Clamart, France.

<sup>5</sup>Center for Biomedical Research, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, 94700, Maisons Alfort, France.

\*All correspondence to : Dr Martin Gaillard, Service de Chirurgie Digestive Minimale Invasive, hôpital Antoine-Béclère, 157, rue de la Porte-de-Trivaux, 92141 Clamart cedex, France. [Martin.gaillard@aphp.fr](mailto:Martin.gaillard@aphp.fr)

# LIVER REGENERATION AND RECANALIZATION TIME COURSE FOLLOWING REPEATED REVERSIBLE PORTAL VEIN EMBOLIZATION IN SWINE

## ABSTRACT

### Objectives

Portal vein embolization (PVE) is an accepted technique to preoperatively increase the volume of the future remnant liver after major hepatectomy. A permanent material is usually preferred since its superiority to induce liver hypertrophy over absorbable material has been demonstrated. Nevertheless, the use of an absorbable material generates a temporary PVE (RPVE) capable of inducing significant liver hypertrophy. In small animal models, the possibility to repeat RPVE (RRPVE) has shown to boost liver hypertrophy further. The aim of this preliminary study was to assess the feasibility and the tolerance of RRPVE in a large animal model, in comparison with permanent PVE (PPVE) and single RPVE.

### Methods

Six female swine (2 per group) were assigned either to single RPVE using powdered gelatin sponge, two RPVEs separated by 14 days or PPVE using N-butyl-cyanoacrylate. The feasibility and tolerance of the procedures were evaluated using portography, liver function tests and histological analysis. Volumetric imaging by computed tomography was used to assess the evolution of liver volumes.

### Results

Embolization of portal branches corresponding to 75% of total liver volume was performed successfully in all animals. Procedures were well tolerated, with transient increase in liver function tests without hepatocellular necrosis. After RPVE, complete recanalization occurred at day 11. Repeated RPVE showed a trend for higher

1 hypertrophy, the non-embolized liver to total liver ratio reaching  $5,2\pm 1,0\%$  in the  
2 RPVE group,  $6,8\pm 0,1\%$  in the RRPVE group and  $5,0\pm 0,3\%$  in the PPVE group.  
3

#### 4 **Conclusions**

5 Repeated RPVE was well tolerated and resulted in liver hypertrophy.  
6  
7

#### 8 **KEYWORDS**

9 Portal Vein

10 Embolization, Therapeutic

11 Liver Regeneration  
12

#### 13 **KEY POINTS**

14 Repeated reversible portal vein embolization could be helpful to prevent liver  
15 insufficiency after major hepatectomy.  
16

17 In this preliminary study in swine, RRPVE was well tolerated and improved liver  
18 hypertrophy.  
19

#### 20 **ABBREVIATIONS**

21 ALP, alkaline phosphatase

22 ALPPS, associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy

23 ALT, alanine aminotransferase

24 CT, computed tomography

25 EL, embolized liver

26 LLL, left lateral lobe

27 LML, left medial lobe

28 NCBA, N-butyl-cyanoacrylate  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

NEL, non-embolized liver

PPVE, permanent portal vein embolization

PVE, portal vein embolization

RLL, right lateral lobe

RML, right medial lobe

RPVE, reversible portal vein embolization

RRPVE, repeated reversible portal vein embolization

TL, total liver (TL)

## INTRODUCTION

1  
2  
3 Preoperative portal vein embolization (PVE) is an established therapy used to  
4  
5 increase the volume of the future remnant liver left in place after major  
6  
7 hepatectomy[1], thus reducing the risk of postoperative liver failure[2], and increasing  
8  
9 the number of patients able to undergo surgery with curative intent[3-5]. In clinical  
10  
11 practice, a non-absorbable material is generally used to perform PVE, because it  
12  
13 seems to have a greater effect on liver hypertrophy[6] than absorbable material,  
14  
15 mostly reported by eastern teams using small blocks of gelatin sponge sheets for  
16  
17 embolization[7; 8]. Nevertheless, there is no recommendation for a specific  
18  
19 material[9]. A previous study has reported the development of a reversible PVE  
20  
21 (RPVE) technique using the powdered form of an absorbable gelatin sponge in a  
22  
23 primate model[10]. This temporary embolization lasted approximately 2 weeks as  
24  
25 iterative portograms showed recanalization progressing from the large proximal veins  
26  
27 to distal branches. RPVE allowed efficient liver regeneration, which remained stable  
28  
29 at one year. These results were confirmed in clinical practice in a preliminary  
30  
31 series[11] of 20 patients, resulting in a hypertrophy ratio of the non-embolized liver of  
32  
33 29% and allowing subsequent surgery in 15 patients (75%), consistent with  
34  
35 literature[12].  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44

45 In humans, it has been reported that more than half of the liver hypertrophy  
46  
47 following permanent PVE is obtained within the first 2 weeks [2]. Thus, an interest of  
48  
49 RPVE is that recanalization of the portal embolized territory allows an early second  
50  
51 embolization, that could maximize liver hypertrophy by providing an additional  
52  
53 regenerative stimulus. This hypothesis was recently reported in rodents[13], in which  
54  
55 repeated RPVE (RRPVE) showed additional hepatocyte proliferation and a  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 cumulative increase in liver hypertrophy in the non-occluded lobes compared with a  
2 single RPVE.  
3

4  
5 The aim of this preliminary study was to assess the feasibility and the  
6 tolerance of RRPVE in a large animal model, in comparison with permanent PVE  
7 (PPVE) and single RPVE.  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## MATERIALS AND METHODS

### Animals

The investigational protocol was approved by the Animal Research Ethic Committee and the experiments were conducted in accordance with the European legislation on animal care and experimentation. The study used 3-month-old female domestic swine weighing  $57.3 \pm 5.7$  kg.

### Experimental design

Six animals (2 per group) were randomly subjected to either of three different approaches: RPVE using powdered gelatin sponge, two RPVEs separated by 14 days or PPVE using N-butyl-cyanoacrylate (NCBA). The swine liver is divided in 4 lobes, designated as right lateral, right medial, left medial and left lateral, each lobe representing approximately 25% of the total liver volume, and is supplied by its own portal branch[14] (**Fig. 1**). During the procedures, 75% of the liver volume (right medial, left medial and left lateral lobes) was excluded from portal flow via embolization. The endpoint of the study was scheduled 28 days after the first procedure, when the animals were euthanized.

### Operative procedures

#### *Anesthesia and intraoperative monitoring*

After premedication with ketamine and xylazine, a central venous catheter was inserted into the right internal jugular vein. General anesthesia was carried out with propofol and morphine before animals were placed in the supine position, intubated and ventilated with a mixture of isoflurane and oxygen. During the procedures, heart

1 rate, blood pressure, peripheral oxygen saturation and central venous pressure were  
2 monitored.  
3

### 4 5 *Surgical procedure* 6

7  
8 In all animals, an upper midline laparotomy was performed. Portal vein access was  
9 achieved through transileocolic approach (**Fig. 2A**) in order to leave in place at the  
10 end of the procedure a venous catheter for acquisition of iterative portograms. After  
11 dissection of a large venous mesenteric branch, a 3-F vascular introducer was  
12 introduced by direct cannulation (Balt Extrusion®). A 2.9-F angiographic  
13 microcatheter (Terumo Progreat®) was placed into the portal trunk. An initial antero-  
14 posterior digital subtraction portography was obtained using a C-arm angiography  
15 system (OEC 9900 Elite, GE Healthcare®) to map the portal branches before  
16 embolization (**Fig. 2B-C**). Portograms were consistently obtained during suspended  
17 respiration by injecting 5-10 mL of iodixanol (Visipaque® 320 mg/mL, GE  
18 Healthcare®). Portal pressure in the portal trunk was measured before and after  
19 embolization in all animals.  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38

### 39 *Reversible portal vein embolization* 40

41  
42 In the RPVE group, embolization was performed with the powdered form of an  
43 absorbable gelatin sponge (Gelita-Spon®, Gelita Medical®), as previously  
44 described[11]. Gelita-Spon® powder was dissolved in a solution of 80% iodixanol  
45 and 20% saline (final concentration of 0.08 g/mL) to suspend the particles of  
46 absorbable gelatin powder completely and to obtain a homogeneous mix visible  
47 during the embolization procedure. Each grain of absorbable gelatin sponge  
48 measures approximately 25 µm in the dry state. After dissolution, the mix becomes  
49 homogeneous, and grains are not measurable. After preparation of the absorbable  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65



1 material, the tip of the microcatheter was placed distally into the left lateral portal  
2 branch under fluoroscopic guidance with the help of a 0.021-inch hydrophilic guide  
3 wire (Terumo Progreat®). The absorbable material was progressively injected until  
4 complete obstruction of the distal branch was achieved. The microcatheter was  
5 slowly pulled back to the start of the portal branch, while injecting the absorbable  
6 material to complete obstruction of its proximal part. Embolization was performed  
7 under fluoroscopic guidance, allowing direct visualization on the portogram map  
8 **(Video)**. Distal and proximal embolization of the left medial and right medial portal  
9 branches were performed using the same technique. A volume of 3.9±0,4 mL of the  
10 absorbable material was used to complete embolization in each of the three portal  
11 branches. Portal branch for right lateral lobe was left patent.

#### 27 *Repeated reversible portal vein embolization*

28  
29  
30 In the RRPVE group, the first embolization was performed as in RPVE group. At the  
31 end of the procedure, the vascular introducer was replaced by the 4.5-F venous  
32 catheter of a perfusion chamber (Celsite®, B. Braun®), placed subcutaneously in the  
33 right subcostal region to make repeated access to the portal vein possible and to  
34 perform iterative portograms. Interval between embolizations was 14 days,  
35 corresponding to the complete recanalization time course in the non-human primate  
36 model[10]. RRPVE was performed with the same procedure that the first RPVE,  
37 embolizing the portal branches of right medial, left medial and left lateral lobes with  
38 the gelatin sponge mix.

#### 53 *Permanent portal vein embolization*

54  
55  
56 In the PPVE group, embolization was performed with NCBA (Histoacryl®, B. Braun).  
57 NBCA was used after mixing with iodixanol at a ratio of 1:1 and injected between  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 flushes of the microcatheter with 5% glucose in order to avoid polymerization of the  
2 NBCA inside the catheter.  
3

#### 4 5 *Post-embolization course* 6

7  
8 At the end of the embolization procedure, the microcatheter was placed in the portal  
9 trunk to repeat the portography and confirm complete occlusion of the embolized  
10 branches and the patency of the non-embolized branches (**Fig. 2D**). Portal pressure  
11 in the portal trunk was measured again after embolization. After recovery from  
12 anesthesia, the animal was returned to the holding facility. Postoperative analgesia  
13 was carried out with transdermal administration of fentanyl. Wellbeing was recorded  
14 daily by a veterinary surgeon.  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24

#### 25 26 **Recanalization time course** 27

28  
29 In the RRPVE group, a venous catheter was left in place in the portal trunk. Portal  
30 recanalization was evaluated by successive portograms using the subcutaneous  
31 chamber. A portogram was taken every 48 hours for each animal, until complete  
32 revascularization of the embolized distal branches was visualized.  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39

#### 40 41 **Liver function tests** 42

43  
44 Blood samples were obtained from the auricular vein before surgery and at days 1, 5  
45 and 14 after each embolization procedure. Alanine aminotransferase (ALT), alkaline  
46 phosphatase (ALP), albumin and bilirubin levels, and prothrombin-time (Quick) were  
47 measured in the institutional biochemistry department.  
48  
49  
50  
51  
52

#### 53 54 **Histological Analysis** 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65

1 On day 7 after embolization, biopsies of each liver lobe were performed by  
2 laparotomy under general anesthesia. On the day of sacrifice, the animal was  
3  
4 euthanized and biopsies were immediately collected from each liver lobe and from  
5  
6 lung parenchyma. The specimens were embedded in water-soluble glycols and  
7  
8 resins (Tissue-Tek® OCT Compound, Sakura Finetek®) and frozen in liquid nitrogen.  
9  
10 After hematoxylin staining, the 6- $\mu$ m cryostat sections were investigated under light  
11  
12 microscope for necrosis and presence of embolization material.  
13  
14  
15  
16

### 17 **Volumetric analysis**

18  
19  
20  
21 The animals underwent computed tomography (CT) under general anesthesia before  
22  
23 and 28 days after the first embolization procedure. Serial scans at 2.5-mm intervals  
24  
25 were enhanced with intravenous bolus injection of contrast at the portal phase.  
26  
27 Volumetric reconstruction was obtained using Myrian® software (Intrasense®).  
28  
29 Measures of total liver (TL), non-embolized liver (NEL) and embolized liver (EL)  
30  
31 volume were obtained. The NEL ratio was calculated as  $NEL/TL \times 100$  before and 28  
32  
33 days after the first embolization procedure. The EL ratio was calculated as  $EL/TL \times$   
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

66  
67  
68  
69  
70  
71  
72  
73  
74  
75  
76  
77  
78  
79  
80  
81  
82  
83  
84  
85  
86  
87  
88  
89  
90  
91  
92  
93  
94  
95  
96  
97  
98  
99  
100  
101  
102  
103  
104  
105  
106  
107  
108  
109  
110  
111  
112  
113  
114  
115  
116  
117  
118  
119  
120  
121  
122  
123  
124  
125  
126  
127  
128  
129  
130  
131  
132  
133  
134  
135  
136  
137  
138  
139  
140  
141  
142  
143  
144  
145  
146  
147  
148  
149  
150  
151  
152  
153  
154  
155  
156  
157  
158  
159  
160  
161  
162  
163  
164  
165  
166  
167  
168  
169  
170  
171  
172  
173  
174  
175  
176  
177  
178  
179  
180  
181  
182  
183  
184  
185  
186  
187  
188  
189  
190  
191  
192  
193  
194  
195  
196  
197  
198  
199  
200  
201  
202  
203  
204  
205  
206  
207  
208  
209  
210  
211  
212  
213  
214  
215  
216  
217  
218  
219  
220  
221  
222  
223  
224  
225  
226  
227  
228  
229  
230  
231  
232  
233  
234  
235  
236  
237  
238  
239  
240  
241  
242  
243  
244  
245  
246  
247  
248  
249  
250  
251  
252  
253  
254  
255  
256  
257  
258  
259  
260  
261  
262  
263  
264  
265  
266  
267  
268  
269  
270  
271  
272  
273  
274  
275  
276  
277  
278  
279  
280  
281  
282  
283  
284  
285  
286  
287  
288  
289  
290  
291  
292  
293  
294  
295  
296  
297  
298  
299  
300  
301  
302  
303  
304  
305  
306  
307  
308  
309  
310  
311  
312  
313  
314  
315  
316  
317  
318  
319  
320  
321  
322  
323  
324  
325  
326  
327  
328  
329  
330  
331  
332  
333  
334  
335  
336  
337  
338  
339  
340  
341  
342  
343  
344  
345  
346  
347  
348  
349  
350  
351  
352  
353  
354  
355  
356  
357  
358  
359  
360  
361  
362  
363  
364  
365  
366  
367  
368  
369  
370  
371  
372  
373  
374  
375  
376  
377  
378  
379  
380  
381  
382  
383  
384  
385  
386  
387  
388  
389  
390  
391  
392  
393  
394  
395  
396  
397  
398  
399  
400  
401  
402  
403  
404  
405  
406  
407  
408  
409  
410  
411  
412  
413  
414  
415  
416  
417  
418  
419  
420  
421  
422  
423  
424  
425  
426  
427  
428  
429  
430  
431  
432  
433  
434  
435  
436  
437  
438  
439  
440  
441  
442  
443  
444  
445  
446  
447  
448  
449  
450  
451  
452  
453  
454  
455  
456  
457  
458  
459  
460  
461  
462  
463  
464  
465  
466  
467  
468  
469  
470  
471  
472  
473  
474  
475  
476  
477  
478  
479  
480  
481  
482  
483  
484  
485  
486  
487  
488  
489  
490  
491  
492  
493  
494  
495  
496  
497  
498  
499  
500  
501  
502  
503  
504  
505  
506  
507  
508  
509  
510  
511  
512  
513  
514  
515  
516  
517  
518  
519  
520  
521  
522  
523  
524  
525  
526  
527  
528  
529  
530  
531  
532  
533  
534  
535  
536  
537  
538  
539  
540  
541  
542  
543  
544  
545  
546  
547  
548  
549  
550  
551  
552  
553  
554  
555  
556  
557  
558  
559  
560  
561  
562  
563  
564  
565  
566  
567  
568  
569  
570  
571  
572  
573  
574  
575  
576  
577  
578  
579  
580  
581  
582  
583  
584  
585  
586  
587  
588  
589  
590  
591  
592  
593  
594  
595  
596  
597  
598  
599  
600  
601  
602  
603  
604  
605  
606  
607  
608  
609  
610  
611  
612  
613  
614  
615  
616  
617  
618  
619  
620  
621  
622  
623  
624  
625  
626  
627  
628  
629  
630  
631  
632  
633  
634  
635  
636  
637  
638  
639  
640  
641  
642  
643  
644  
645  
646  
647  
648  
649  
650  
651  
652  
653  
654  
655  
656  
657  
658  
659  
660  
661  
662  
663  
664  
665  
666  
667  
668  
669  
670  
671  
672  
673  
674  
675  
676  
677  
678  
679  
680  
681  
682  
683  
684  
685  
686  
687  
688  
689  
690  
691  
692  
693  
694  
695  
696  
697  
698  
699  
700  
701  
702  
703  
704  
705  
706  
707  
708  
709  
710  
711  
712  
713  
714  
715  
716  
717  
718  
719  
720  
721  
722  
723  
724  
725  
726  
727  
728  
729  
730  
731  
732  
733  
734  
735  
736  
737  
738  
739  
740  
741  
742  
743  
744  
745  
746  
747  
748  
749  
750  
751  
752  
753  
754  
755  
756  
757  
758  
759  
760  
761  
762  
763  
764  
765  
766  
767  
768  
769  
770  
771  
772  
773  
774  
775  
776  
777  
778  
779  
780  
781  
782  
783  
784  
785  
786  
787  
788  
789  
790  
791  
792  
793  
794  
795  
796  
797  
798  
799  
800  
801  
802  
803  
804  
805  
806  
807  
808  
809  
810  
811  
812  
813  
814  
815  
816  
817  
818  
819  
820  
821  
822  
823  
824  
825  
826  
827  
828  
829  
830  
831  
832  
833  
834  
835  
836  
837  
838  
839  
840  
841  
842  
843  
844  
845  
846  
847  
848  
849  
850  
851  
852  
853  
854  
855  
856  
857  
858  
859  
860  
861  
862  
863  
864  
865  
866  
867  
868  
869  
870  
871  
872  
873  
874  
875  
876  
877  
878  
879  
880  
881  
882  
883  
884  
885  
886  
887  
888  
889  
890  
891  
892  
893  
894  
895  
896  
897  
898  
899  
900  
901  
902  
903  
904  
905  
906  
907  
908  
909  
910  
911  
912  
913  
914  
915  
916  
917  
918  
919  
920  
921  
922  
923  
924  
925  
926  
927  
928  
929  
930  
931  
932  
933  
934  
935  
936  
937  
938  
939  
940  
941  
942  
943  
944  
945  
946  
947  
948  
949  
950  
951  
952  
953  
954  
955  
956  
957  
958  
959  
960  
961  
962  
963  
964  
965  
966  
967  
968  
969  
970  
971  
972  
973  
974  
975  
976  
977  
978  
979  
980  
981  
982  
983  
984  
985  
986  
987  
988  
989  
990  
991  
992  
993  
994  
995  
996  
997  
998  
999  
1000

### 112 **Statistical Analysis**

113  
114  
115  
116  
117  
118  
119  
120  
121  
122  
123  
124  
125  
126  
127  
128  
129  
130  
131  
132  
133  
134  
135  
136  
137  
138  
139  
140  
141  
142  
143  
144  
145  
146  
147  
148  
149  
150  
151  
152  
153  
154  
155  
156  
157  
158  
159  
160  
161  
162  
163  
164  
165  
166  
167  
168  
169  
170  
171  
172  
173  
174  
175  
176  
177  
178  
179  
180  
181  
182  
183  
184  
185  
186  
187  
188  
189  
190  
191  
192  
193  
194  
195  
196  
197  
198  
199  
200  
201  
202  
203  
204  
205  
206  
207  
208  
209  
210  
211  
212  
213  
214  
215  
216  
217  
218  
219  
220  
221  
222  
223  
224  
225  
226  
227  
228  
229  
230  
231  
232  
233  
234  
235  
236  
237  
238  
239  
240  
241  
242  
243  
244  
245  
246  
247  
248  
249  
250  
251  
252  
253  
254  
255  
256  
257  
258  
259  
260  
261  
262  
263  
264  
265  
266  
267  
268  
269  
270  
271  
272  
273  
274  
275  
276  
277  
278  
279  
280  
281  
282  
283  
284  
285  
286  
287  
288  
289  
290  
291  
292  
293  
294  
295  
296  
297  
298  
299  
300  
301  
302  
303  
304  
305  
306  
307  
308  
309  
310  
311  
312  
313  
314  
315  
316  
317  
318  
319  
320  
321  
322  
323  
324  
325  
326  
327  
328  
329  
330  
331  
332  
333  
334  
335  
336  
337  
338  
339  
340  
341  
342  
343  
344  
345  
346  
347  
348  
349  
350  
351  
352  
353  
354  
355  
356  
357  
358  
359  
360  
361  
362  
363  
364  
365  
366  
367  
368  
369  
370  
371  
372  
373  
374  
375  
376  
377  
378  
379  
380  
381  
382  
383  
384  
385  
386  
387  
388  
389  
390  
391  
392  
393  
394  
395  
396  
397  
398  
399  
400  
401  
402  
403  
404  
405  
406  
407  
408  
409  
410  
411  
412  
413  
414  
415  
416  
417  
418  
419  
420  
421  
422  
423  
424  
425  
426  
427  
428  
429  
430  
431  
432  
433  
434  
435  
436  
437  
438  
439  
440  
441  
442  
443  
444  
445  
446  
447  
448  
449  
450  
451  
452  
453  
454  
455  
456  
457  
458  
459  
460  
461  
462  
463  
464  
465  
466  
467  
468  
469  
470  
471  
472  
473  
474  
475  
476  
477  
478  
479  
480  
481  
482  
483  
484  
485  
486  
487  
488  
489  
490  
491  
492  
493  
494  
495  
496  
497  
498  
499  
500  
501  
502  
503  
504  
505  
506  
507  
508  
509  
510  
511  
512  
513  
514  
515  
516  
517  
518  
519  
520  
521  
522  
523  
524  
525  
526  
527  
528  
529  
530  
531  
532  
533  
534  
535  
536  
537  
538  
539  
540  
541  
542  
543  
544  
545  
546  
547  
548  
549  
550  
551  
552  
553  
554  
555  
556  
557  
558  
559  
560  
561  
562  
563  
564  
565  
566  
567  
568  
569  
570  
571  
572  
573  
574  
575  
576  
577  
578  
579  
580  
581  
582  
583  
584  
585  
586  
587  
588  
589  
590  
591  
592  
593  
594  
595  
596  
597  
598  
599  
600  
601  
602  
603  
604  
605  
606  
607  
608  
609  
610  
611  
612  
613  
614  
615  
616  
617  
618  
619  
620  
621  
622  
623  
624  
625  
626  
627  
628  
629  
630  
631  
632  
633  
634  
635  
636  
637  
638  
639  
640  
641  
642  
643  
644  
645  
646  
647  
648  
649  
650  
651  
652  
653  
654  
655  
656  
657  
658  
659  
660  
661  
662  
663  
664  
665  
666  
667  
668  
669  
670  
671  
672  
673  
674  
675  
676  
677  
678  
679  
680  
681  
682  
683  
684  
685  
686  
687  
688  
689  
690  
691  
692  
693  
694  
695  
696  
697  
698  
699  
700  
701  
702  
703  
704  
705  
706  
707  
708  
709  
710  
711  
712  
713  
714  
715  
716  
717  
718  
719  
720  
721  
722  
723  
724  
725  
726  
727  
728  
729  
730  
731  
732  
733  
734  
735  
736  
737  
738  
739  
740  
741  
742  
743  
744  
745  
746  
747  
748  
749  
750  
751  
752  
753  
754  
755  
756  
757  
758  
759  
760  
761  
762  
763  
764  
765  
766  
767  
768  
769  
770  
771  
772  
773  
774  
775  
776  
777  
778  
779  
780  
781  
782  
783  
784  
785  
786  
787  
788  
789  
790  
791  
792  
793  
794  
795  
796  
797  
798  
799  
800  
801  
802  
803  
804  
805  
806  
807  
808  
809  
810  
811  
812  
813  
814  
815  
816  
817  
818  
819  
820  
821  
822  
823  
824  
825  
826  
827  
828  
829  
830  
831  
832  
833  
834  
835  
836  
837  
838  
839  
840  
841  
842  
843  
844  
845  
846  
847  
848  
849  
850  
851  
852  
853  
854  
855  
856  
857  
858  
859  
860  
861  
862  
863  
864  
865  
866  
867  
868  
869  
870  
871  
872  
873  
874  
875  
876  
877  
878  
879  
880  
881  
882  
883  
884  
885  
886  
887  
888  
889  
890  
891  
892  
893  
894  
895  
896  
897  
898  
899  
900  
901  
902  
903  
904  
905  
906  
907  
908  
909  
910  
911  
912  
913  
914  
915  
916  
917  
918  
919  
920  
921  
922  
923  
924  
925  
926  
927  
928  
929  
930  
931  
932  
933  
934  
935  
936  
937  
938  
939  
940  
941  
942  
943  
944  
945  
946  
947  
948  
949  
950  
951  
952  
953  
954  
955  
956  
957  
958  
959  
960  
961  
962  
963  
964  
965  
966  
967  
968  
969  
970  
971  
972  
973  
974  
975  
976  
977  
978  
979  
980  
981  
982  
983  
984  
985  
986  
987  
988  
989  
990  
991  
992  
993  
994  
995  
996  
997  
998  
999  
1000

building further experimental studies with sample size and power calculation.

Continuous variables are expressed as means  $\pm$  SD.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## RESULTS

### Tolerance of the procedures

The embolization of the left lateral, left medial and right medial portal branches was successfully carried out in all animals. No major anatomic variation of the portal vein system was noted. Portography confirmed complete occlusion of the embolized portal vein branches at the end of the procedure in all cases. Portal pressure monitoring showed moderate changes, from  $10.1 \pm 1.8$  mmHg before embolization to  $12.9 \pm 1.4$  mmHg after RPVE,  $11.8 \pm 1.7$  mmHg after RRPVE and  $12.7 \pm 1.1$  mmHg after PPVE.

All animals resumed their normal level of activity within 4 hours after the procedure. None of the animals developed portal vein thrombosis. One animal died on day 10 after RPVE, i.e. 3 days after iterative laparotomy for liver biopsies. No cause of death was identifiable at autopsy. Animal weights before embolization and at D28 are presented in **Table 1**. Variation of body weight before embolization and at D28 was less than 10 per cent in all animals.

Serum ALT levels increased transiently, returning to normal values by day 5 after embolization (**Fig. 3A**). Serum ALP levels decreased transiently 5 days after embolization before returning to normal values by day 14 (**Fig. 3B**). Serum bilirubin and albumin levels and prothrombin time did not change after embolization.

In all groups, pathological studies did not show any notable hepatocellular damage such as liver necrosis on day 7 after embolization in embolized and non embolized liver (**Fig. 3C**). Granulomatous reactions or foreign-body giant cells were not observed in the embolized liver. No necrosis was found in lung samples at day 28.

## Recanalization time course after absorbable embolization

Portograms taken immediately after RPVE confirmed the complete obstruction of left lateral, left medial and right medial portal branches and the patency of right lateral portal branch (**Fig. 4**). When a venous catheter was left in place in the portal trunk, successive portograms were taken every 48 hours after RPVE. The recanalization of the proximal portion of the embolized portal branches occurred at day 4. Complete revascularization of the embolized distal branches was observed at day 11 (**Fig. 4**).

## Liver regeneration

Changes in the liver volume after embolization were assessed after volumetric reconstructions on CT scans (**Fig. 5A and 5B**) in all animals. Volumes of TL, NEL and EL before embolization and at D28 in each animal are presented in **Table 1**. At D28 after embolization, the NEL ratio increased in all animals and represented +4.5% (swine 1) and +5.9% (swine 2) in the RPVE group, +6.7% (swine 3) and +6.9% (swine 4) in the RRPVE group, +4.8% (swine 5) and +5.2% (swine 6) in the PPVE group (**Fig. 5C**).

On day 28, after liver explantation, *ex vivo* volume of each liver lobe was measured in all animals and the *ex vivo* NEL ratio was calculated and compared with the volumetric NEL ratio. The *ex vivo* NEL ratio was 30.8% (swine 1) and 35.0% (swine 2) in the RPVE group, 22.7% (swine 3) and 30.0% (swine 4) in the RRPVE group, 26.3% (swine 5) and 33.1% (swine 6) in the PPVE group. The variation between the *ex vivo* NEL ratio and the volumetric NEL ratio was inferior to 5% in all animals.

## DISCUSSION

1  
2  
3 In this preliminary study in swine, RRPVE was feasible and well-tolerated in all  
4  
5 animals. Assessment of the NEL ratio favors the RRPVE group, in comparison with  
6  
7 permanent PVE (PPVE) and single RPVE. This method could be useful in several  
8  
9 clinical situations, when considerable liver hypertrophy is needed. Indeed, after  
10  
11 disease progression, the second most common reason for not undergoing surgical  
12  
13 resection after PVE is the insufficient hypertrophy of the future remnant liver, as  
14  
15 occurred in 4% of patients in a recent meta-analysis[12]. Among factors inhibiting  
16  
17 liver regeneration after PVE, preexisting chronic liver disease (cirrhosis or fibrosis)[6]  
18  
19 and possibly diabetes[15] have been reported. As the use of an absorbable material  
20  
21 allows complete portal revascularization, the authors successfully developed RRPVE  
22  
23 in an attempt to boost liver hypertrophy in a murine model[13], and here it is  
24  
25 translated to a large animal model. The possibility to generate a massive hypertrophy  
26  
27 of the non-embolized liver could be of interest in clinical practice. Not only it could  
28  
29 enable liver surgery in patients with insufficient hypertrophy of the future remnant  
30  
31 liver, but it may also contribute to complex therapeutic strategies in the treatment of  
32  
33 liver metastases. Such situations can occur in patients with liver recurrence after  
34  
35 several liver resections and numerous chemotherapy courses. Finally, in adult-to-  
36  
37 adult living donor liver transplantation, it is worth considering that RRPVE of the right  
38  
39 portal branch would allow hypertrophy of the future left liver graft, enabling an easier  
40  
41 left hepatectomy (or even left lateral sectionectomy) and saving the right liver in the  
42  
43 donor.  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52

53  
54 Complete recanalization of the embolized portal branches after RPVE was  
55  
56 observed at day 11. In a previous study in primates, complete recanalization was  
57  
58 achieved within 2 weeks after RPVE[10]. This early recanalization does not prevent  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 the increase of the non-embolized liver volume, as demonstrated in primates[10] and  
2 observed in the RPVE group. As a matter of fact, the kinetic of liver regeneration after  
3 permanent PVE consists in a rapid initial liver hypertrophy within 2-3 weeks before  
4 reaching a plateau period[2] when the non-embolized liver volume reaches  
5 approximately 75% of its hypertrophy. In fact, eastern surgeons do not hesitate to  
6 perform major liver resection 3 weeks after PVE. In this study, choice was made to  
7 perform a rapid second RPVE at the moment of completion of portal recanalization,  
8 before liver hypertrophy reaches its plateau, since few additional hypertrophy is  
9 expected after two weeks. There is no recommendation for a precise duration of the  
10 waiting period between PVE and hepatectomy procedures; it should be long enough  
11 to allow hypertrophy and as short as possible to avoid tumor growth, which precludes  
12 surgery. In most series, this waiting period is reported to be 4 to 6 weeks[6]. Thereby,  
13 in this study, the time chosen for CT-scan and volumetric evaluation was 4 weeks.  
14 Assessment of the liver regeneration 4 weeks after the first embolization could result  
15 in underestimation of the final liver hypertrophy in the RRPVE group, when volumetry  
16 is performed two weeks after the second embolization. Nonetheless, in clinical  
17 practice, a short time interval to obtain sufficient hypertrophy minimizes the risk of  
18 tumor progression. Recently, these considerations led hepatic surgeons to perform a  
19 technique of accelerated 2-staged hepatectomy with the acronym ALPPS[16]. This  
20 technique consists in, besides portal vein occlusion, a complete liver partition  
21 separating the future remnant liver from the liver to be resected. Important  
22 hypertrophy rates are obtained in almost all patients, allowing resection of the  
23 diseased liver 7-10 days after the first procedure. However, this strategy may be at  
24 the price of greater morbidity and mortality[17], thus the use of RRPVE in a classical  
25 two-step hepatectomy procedure could be an interesting alternative.  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53

In this feasibility study in swine, assessment of the NEL ratio favors the RRPVE group, without statistical significance considering the number of animals. It should be noted that variation of animal weight was observed during the experiments, without clinical repercussion. Variation of body weight impacted modifications of non-embolized, embolized and total liver volume, though NEL ratio remained consistent. A limit of this study is the lack of hepatocyte proliferation assessment because of technical problems. In a preliminary study in rodents, superior proliferation rates were obtained after RRPVE when compared with RPVE[13]. Hepatocyte proliferation was then evaluated on liver samples collected at day 1 after embolization after immunostaining with a rabbit monoclonal antibody against Ki-67 (ab16667, Abcam, Paris, France). In swine, hepatocyte proliferation consecutive to PVE was reported to peak at day 7[18], therefore in this study liver samples were collected at day 7 after the embolization procedure to assess hepatocyte proliferation using Ki67 immunostaining. A rabbit monoclonal antibody against Ki-67 (ab16667, Abcam, Paris, France) and a rabbit polyclonal antibody against Ki67 validated in pig (ab15580, Abcam, Paris, France) were tested on liver and small bowel sample in different conditions. No specific immunohistochemical staining of replicating swine hepatocytes was observed on light microscopy. As demonstrated in rodents, procedures were well tolerated, inducing minor biological modifications and low morbidity/mortality rates, similar to a single RPVE. Thus, no element was found to oppose a third RPVE with potential higher liver regeneration of the non-embolized liver.

54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

In conclusion, this is the first experimental report of the use of RRPVE in a preclinical model, confirming the feasibility and the temporary nature of the procedure. This method could have several clinical applications, particularly in

situations in which short-term hypertrophy is required or when chronic liver disease  
impairs liver regeneration.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## ACKNOWLEDGEMENTS & DISCLOSURE

The authors declare that there is no conflict of interest.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## REFERENCES

- 1 Liu H, Zhu S (2009) Present status and future perspectives of preoperative portal vein embolization. *Am J Surg* 197:686-690
- 2 Ribero D, Abdalla EK, Madoff DC, Donadon M, Loyer EM, Vauthey JN (2007) Portal vein embolization before major hepatectomy and its effects on regeneration, resectability and outcome. *Br J Surg* 94:1386-1394
- 3 Abdalla EK, Barnett CC, Doherty D, Curley SA, Vauthey JN (2002) Extended hepatectomy in patients with hepatobiliary malignancies with and without preoperative portal vein embolization. *Arch Surg* 137:675-680; discussion 680-671
- 4 Azoulay D, Castaing D, Krissat J et al (2000) Percutaneous portal vein embolization increases the feasibility and safety of major liver resection for hepatocellular carcinoma in injured liver. *Ann Surg* 232:665-672
- 5 Kishi Y, Abdalla EK, Chun YS et al (2009) Three hundred and one consecutive extended right hepatectomies: evaluation of outcome based on systematic liver volumetry. *Ann Surg* 250:540-548
- 6 van Lienden KP, van den Esschert JW, de Graaf W et al (2013) Portal vein embolization before liver resection: a systematic review. *Cardiovasc Intervent Radiol* 36:25-34
- 7 Kakizawa H, Toyota N, Arihiro K et al (2006) Preoperative portal vein embolization with a mixture of gelatin sponge and iodized oil: efficacy and safety. *Acta Radiol* 47:1022-1028
- 8 Kim MJ, Choo SW, Do YS et al (2004) Use of double-occlusion balloon catheter: preoperative portal vein embolization for induction of future remnant liver hypertrophy. *Cardiovasc Intervent Radiol* 27:16-20

- 1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65
- 9 Denys A, Prior J, Bize P et al (2012) Portal vein embolization: what do we know? *Cardiovasc Intervent Radiol* 35:999-1008
- 10 Lainas P, Boudechiche L, Osorio A et al (2008) Liver regeneration and recanalization time course following reversible portal vein embolization. *J Hepatol* 49:354-362
- 11 Tranchart H, Catherine L, Maitre S, Lainas P, De Laveaucoupet J, Dagher I (2015) Efficient liver regeneration following temporary portal vein embolization with absorbable gelatin sponge powder in humans. *J Vasc Interv Radiol* 26:507-515
- 12 Wajswol E, Jazmati T, Contractor S, Kumar A (2018) Portal Vein Embolization Utilizing N-Butyl Cyanoacrylate for Contralateral Lobe Hypertrophy Prior to Liver Resection: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Cardiovasc Intervent Radiol* 41:1302-1312
- 13 Tranchart H, Koffi GM, Gaillard M et al (2016) Liver regeneration following repeated reversible portal vein embolization in an experimental model. *Br J Surg* 103:1209-1219
- 14 Bekheit M, Bucur PO, Wartenberg M, Vibert E (2017) Computerized tomography-based anatomic description of the porcine liver. *J Surg Res* 210:223-230
- 15 Kawarada Y, Sanda M, Kawamura K, Suzaki M, Nakase I, Mizumoto R (1991) Simultaneous extensive resection of the liver and the pancreas in dogs. *Gastroenterol Jpn* 26:747-756
- 16 Schnitzbauer AA, Lang SA, Goessmann H et al (2012) 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

- 17 Eshmuminov D, Raptis DA, Linecker M, Wirsching A, Lesurtel M, Clavien PA (2016) Meta-analysis of associating liver partition with portal vein ligation and portal vein occlusion for two-stage hepatectomy. *Br J Surg* 103:1768-1782
- 18 Duncan JR, Hicks ME, Cai SR, Brunt EM, Ponder KP (1999) Embolization of portal vein branches induces hepatocyte replication in swine: a potential step in hepatic gene therapy. *Radiology* 210:467-477

**TABLE 1. Volumetric liver volumes**

Volumes of total liver (TL), non-embolized liver (NEL), and embolized liver (EL) before embolization and at D28 in each animal.

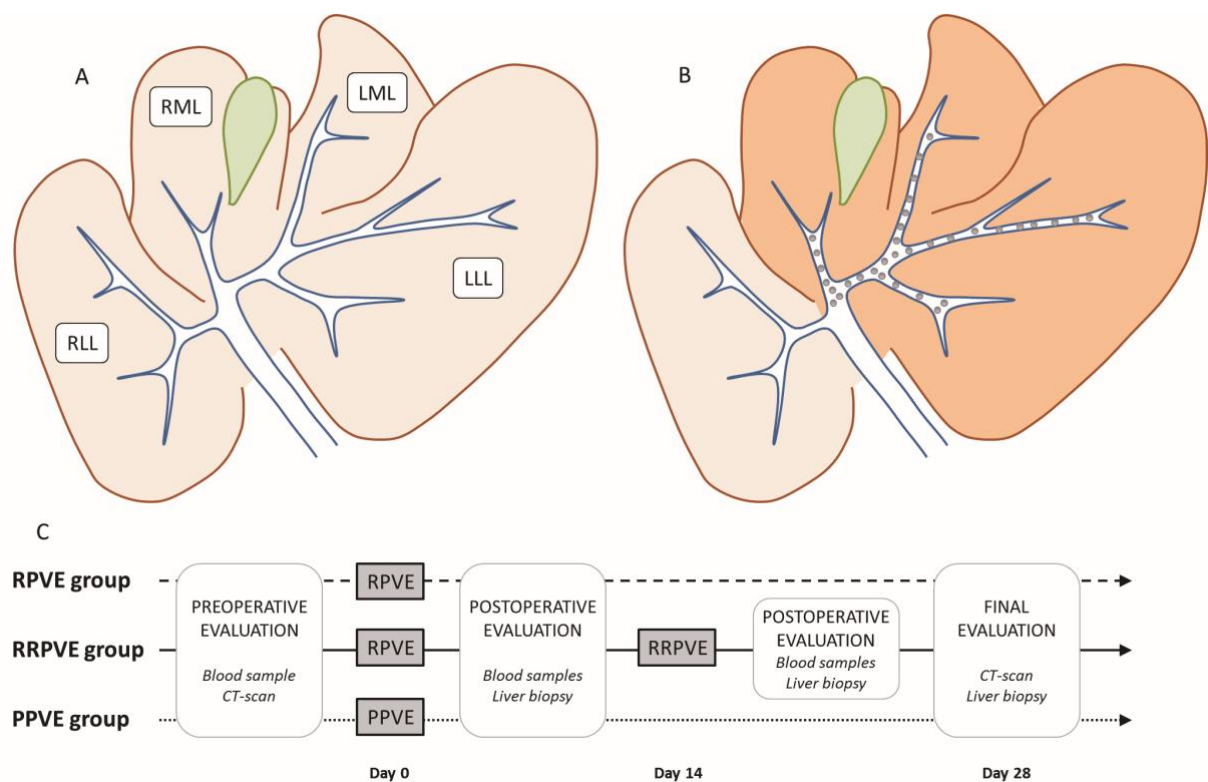
|                   | RPVE group |       |         |       | RRPVE group |       |         |       | PPVE group |       |         |       |
|-------------------|------------|-------|---------|-------|-------------|-------|---------|-------|------------|-------|---------|-------|
|                   | Swine 1    |       | Swine 2 |       | Swine 3     |       | Swine 4 |       | Swine 5    |       | Swine 6 |       |
|                   | D0         | D28   | D0      | D28   | D0          | D28   | D0      | D28   | D0         | D28   | D0      | D28   |
| Animal weight, kg | 65.0       | 59.8  | 60.0    | 54.2  | 48.0        | 51.0  | 52.2    | 51.2  | 61.2       | 57.2  | 52.8    | 54.3  |
| NEL volume, mL    | 351        | 352   | 344     | 265   | 182         | 260   | 270     | 336   | 228        | 346   | 284     | 359   |
| EL volume, mL     | 939        | 758   | 1034    | 592   | 761         | 739   | 773     | 688   | 636        | 764   | 608     | 610   |
| TL volume, mL     | 1290       | 1110  | 1378    | 857   | 943         | 999   | 1043    | 1024  | 864        | 1110  | 892     | 969   |
| NEL ratio         | 27.2%      | 31.7% | 25.0%   | 30.9% | 19.3%       | 26.0% | 25.9%   | 32.8% | 26.4%      | 31.2% | 31.8%   | 37.0% |
| EL ratio          | 72.8%      | 68.3% | 75.0%   | 69.1% | 80.7%       | 74.0% | 74.1%   | 67.2% | 73.6%      | 68.8% | 68.2%   | 63.0% |

**FIGURE 1. Experimental design**

A. Division of the swine liver in 4 lobes, designated as right lateral (RLL), right medial (RML), left medial (LML) and left lateral (LLL) lobes.

B. After embolization of portal branches for RML, LML and LLL, 75% of the liver volume was excluded from portal flow.

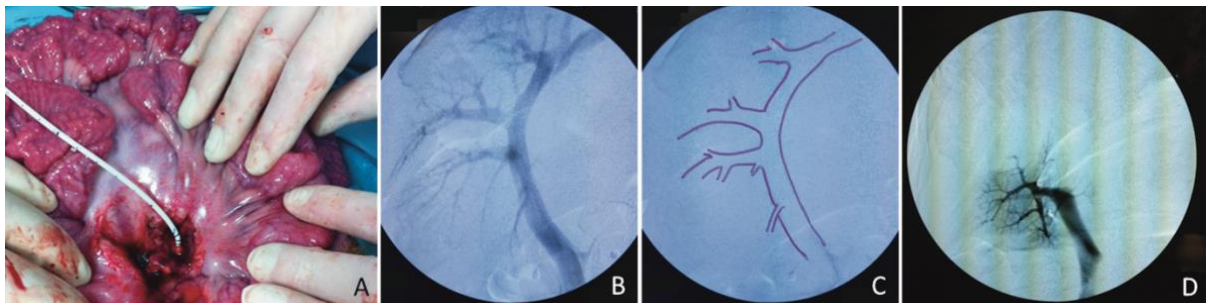
C. Experimental timeline from study initiation (Day 0) to termination (Day 28) in reversible portal vein embolization (RPVE), repeated RPVE (RRPVE) and permanent PVE (PPVE) groups.





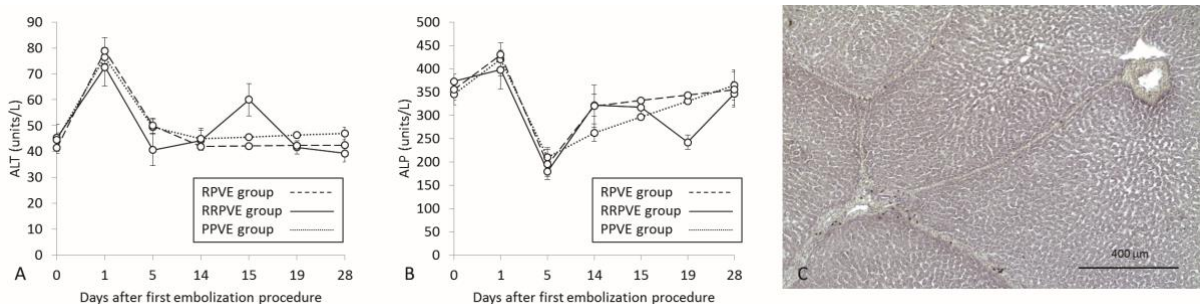
**FIGURE 2. Surgical procedure**

- A. Portal vein access is achieved through transileocolic approach during laparotomy.
- B. Initial portography is obtained by injecting contrast medium.
- C. Mapping of the portal branches is performed before embolization.
- D. Control portography at the end of the embolization showing complete occlusion of the embolized branches and the patency of the non-embolized branches.



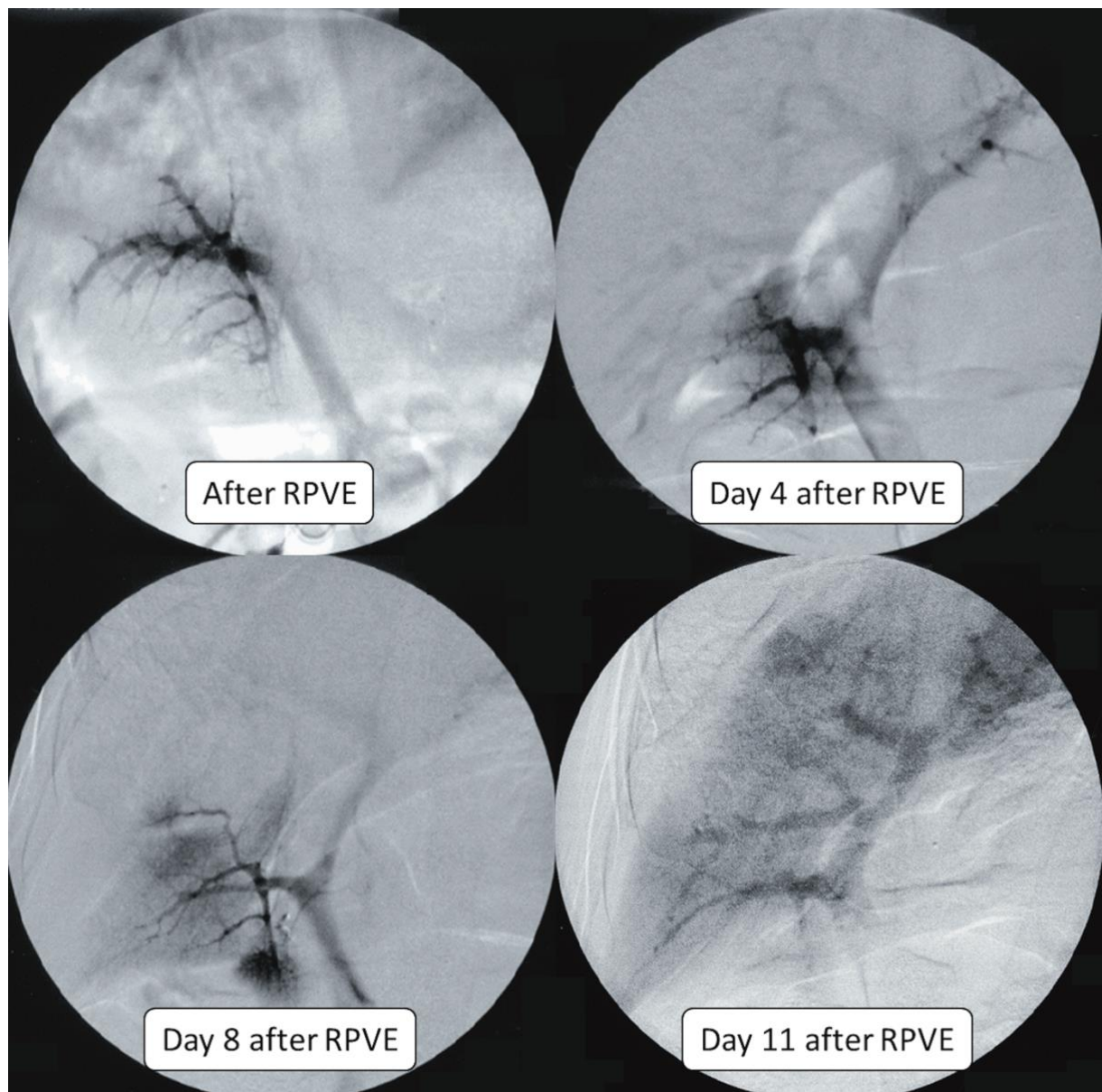
**FIGURE 3. Tolerance of the procedures**

- A-B. Liver function test results before and up to 28 days after reversible portal vein embolization (RPVE), repeated RPVE (RRPVE) and permanent PVE (PPVE); values are mean (± SD). ALT: alanine aminotransferase. ALP: alkaline phosphatase.
- C. Representative histological analysis of embolized segments at day 7 after RPVE.



**FIGURE 4. Recanalization course after RPVE**

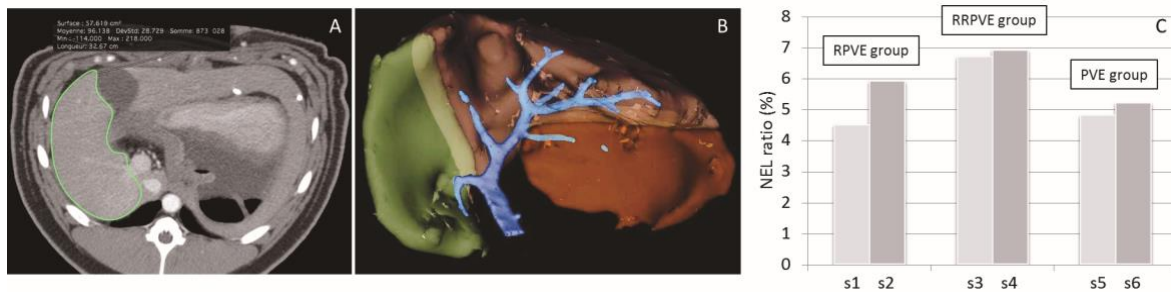
Consecutive portograms immediately and at days 4, 8 and 11 after RPVE. The recanalization of the proximal portion of the embolized portal branches starts at day 4 and complete revascularization of the liver is achieved at day 11.



### FIGURE 5. Assessment of liver hypertrophy

A-B. Representative CT-scan and three-dimensional imaging reconstruction of embolized (brown) and non-embolized (green) liver volumes in a swine at day 28 after RRPVE.

C. Variation of the NEL ratio in each swine (s) at day 28 after reversible portal vein embolization (RPVE), repeated RPVE (RRPVE) and permanent PVE (PPVE).



### VIDEO. Reversible portal vein embolization procedure.

The absorbable embolization material is progressively injected under fluoroscopic guidance until complete obstruction of the distal and proximal branches for the left lateral, left medial and right medial lobes.

## DISCUSSION DE L'ARTICLE

Dans cette étude préclinique chez le porc, la procédure d'EPPRR était réalisable et bien tolérée chez tous les animaux. L'évaluation de l'hypertrophie des lobes non embolisés est en faveur du groupe EPPRR par rapport à une EPP à l'aide de cyanoacrylate et une unique EPPR. La possibilité d'induire une hypertrophie massive du foie non embolisé pourrait être utile dans plusieurs situations cliniques, envisagées au chapitre 2. Cette hypertrophie pourrait notamment permettre la réalisation d'une résection hépatique chez des patients dont l'hypertrophie du FFR consécutive à une première EPPR est insuffisante. Une telle situation peut se produire chez des patients porteurs de métastases hépatiques, ayant déjà subi plusieurs résections et plusieurs lignes de chimiothérapie, et chez qui la stratégie de traitement d'une récurrence hépatique s'avère souvent complexe.

Chez le porc, la reperméabilisation complète des branches embolisées après EPPR était visible à J11, ce qui est concordant avec ce qui avait été observé chez le primate<sup>144</sup>. Cette reperméabilisation précoce n'est pas un frein à l'hypertrophie hépatique, comme cela a pu être démontré chez le singe et constaté dans le groupe EPPR. A vrai dire, il a été rapporté que la cinétique de régénération hépatique après EPP consiste en une hypertrophie initiale rapide au cours des 2-3 premières semaines, avant d'atteindre une période de plateau<sup>62</sup>, lorsque le volume du foie non embolisé est parvenu à environ 75% de son hypertrophie. D'ailleurs, les équipes asiatiques n'hésitent pas à procéder à l'hépatectomie majeure à 3 semaines de l'EPP. Dans cette étude, nous avons choisi de répéter l'EPPR lorsque la reperméabilisation était achevée, soit avant que l'hypertrophie atteigne sa phase de plateau, puisque peu de régénération supplémentaire est attendue après 2 semaines. Il n'y a pas actuellement de recommandation précise sur la durée d'attente qui doit séparer l'embolisation et le geste de résection hépatique. Cet intervalle de temps doit être suffisamment long pour permettre une hypertrophie suffisante, et aussi court que possible pour éviter une croissance tumorale qui contre-indiquerait la chirurgie. La plupart des séries rapporte une durée de 4 à 6 semaines<sup>85</sup>. Nous avons donc choisi un intervalle de 4 semaines après la première procédure d'embolisation pour la réalisation du scanner et de la volumétrie, conscients qu'une évaluation de l'hypertrophie du foie non embolisé 2 semaines après l'EPPRR pourrait résulter

en une sous-estimation de son effet. Cependant, ce choix a été porté compte tenu de la nécessité en pratique clinique d'obtenir une hypertrophie suffisante en un temps court pour diminuer le risque de progression tumorale. Ces considérations ont d'ailleurs conduit les équipes de chirurgie hépatique à la réalisation d'interventions de bipartition hépatique associée à la ligature portale pour hépatectomie en deux temps (dite ALPPS)<sup>75</sup>. Des taux d'hypertrophie importants ont pu être obtenus chez quasiment tous les patients, permettant la réalisation d'une hépatectomie majeure 7 à 10 jours après la première procédure. Cette stratégie est néanmoins grevée d'un taux de morbi-mortalité plus élevée que la stratégie classique<sup>80</sup>. L'EPPRR pourrait représenter ici une alternative intéressante.

Dans cette étude de faisabilité, l'évaluation de l'hypertrophie des lobes non embolisés est en faveur du groupe EPPRR, sans significativité statistique compte tenu du faible effectif. Il faut noter que l'existence de variations du poids des animaux au cours de ces expérimentations, sans répercussion clinique. Ces variations ont entraîné des modifications des volumes des lobes non embolisés, des lobes embolisés, et du foie total, bien que le rapport du volume du foie non embolisé sur le volume du foie total restait cohérent.

Une des limites de cette étude est l'absence d'évaluation de la prolifération hépatocytaire du fait de problèmes techniques. Chez le rat, des taux de prolifération importants avaient été observés après EPPRR par rapport à une unique EPPR<sup>158</sup>. Nous avons alors étudié la prolifération hépatocytaire sur des biopsies hépatiques à J1 de l'embolisation par détection du Ki67 en immunohistochimie. Chez le porc, il a été rapporté que la prolifération hépatocytaire résultant d'une EPP était maximale à J7<sup>171</sup>, et c'est donc ce moment qui a été choisi pour les prélèvements de parenchyme hépatique. Plusieurs anticorps contre le Ki67 ont été testés sur des coupes de foie et d'intestin grêle (tissu dont le taux de prolifération cellulaire est important, utilisé en vue d'un contrôle positif) et dans différentes conditions, sans parvenir à obtenir un marquage satisfaisant des cellules du porc en cours de prolifération.



**DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES**

Les travaux menés lors de ce travail font suite aux résultats obtenus par notre équipe pour le développement d'une technique d'embolisation temporaire qui pourrait jouer un rôle en chirurgie hépatique et au cours de la transplantation d'hépatocytes.

Cette technique d'EPPR à l'aide de poudre de gélatine a démontré sa bonne tolérance et son efficacité chez le primate non-humain<sup>144</sup> avant d'être appliquée chez l'homme<sup>149</sup>. L'utilisation de gélatine résorbable pour l'embolisation portale a été rapporté par le passé dans un faible nombre d'études expérimentales et cliniques avec des résultats inconstants<sup>125,140,141,143,145,147,148</sup>. La particularité de notre approche est que la gélatine est utilisée sous forme de poudre ; diluée dans un mélange de sérum physiologique et de produit radio-opaque, l'ensemble forme un mélange visqueux qui doit être homogénéisé afin de pouvoir passer dans le cathéter d'embolisation. L'intérêt de cette mixture est qu'elle permet une embolisation très distale des branches portales. La reperméabilisation portale se fait donc progressivement, permettant d'induire un stimulus de régénération efficace. Une étude prospective de faisabilité (EMBORES) a été débutée afin de valider cette technique d'EPPR. Elle vise à définir de manière prospective l'efficacité et la tolérance de l'EPPR chez des patients nécessitant une hépatectomie majeure. Cette étude multicentrique a été financée par un projet hospitalier de recherche clinique national 2015. L'objectif principal est de démontrer que l'EPPR permet d'augmenter le volume du FFR de manière similaire à ce qu'il a été rapporté après embolisation portale non résorbable. Le critère de jugement principal est le taux d'hypertrophie du volume FFR sur le volume total du foie évalué par un scanner abdominal 4 à 6 semaines après EPPR. Les objectifs secondaires sont de démontrer des bénéfices liés à l'embolisation (faisabilité technique, faible morbidité, reperméabilisation portale...) et des bénéfices au moment de l'hépatectomie (morbidity per et postopératoire). Cette étude sera réalisée dans 7 centres et inclura 50 patients. Chacun de ces patients sera suivi pendant un an et l'ensemble de l'étude durera 30 mois. Les résultats sont attendus pour fin 2020.

Le premier travail rapporté dans cette thèse concerne l'intérêt de la répétition du stimulus d'EPPR chez le rat<sup>158</sup>. Dans cette étude notre équipe a développé un stimulus additionnel de prolifération hépatocytaire qui permet une augmentation du poids et du volume du foie non embolisé en comparaison à une seule EPPR. Les applications de l'EPPRR



pour la transplantation d'hépatocytes et d'un point de vue clinique pour la chirurgie hépatique pourraient être importantes. Cependant, l'embolisation portale chez le rat et notamment l'EPPRR n'est pas une technique très reproductible. Il nous fallait valider notre approche d'EPPRR et nos résultats dans un modèle de gros animal. Au cours de ce travail mené chez le porc, il a été possible d'effectuer une EPPRR reproductible sous contrôle radiologique dans des conditions tout-à-fait similaires à celles utilisées chez le primate non humain, avec une bonne tolérance et avec des résultats intéressants d'hypertrophie des lobes non embolisés.

En chirurgie hépatique, l'EPPRR pourrait être utilisée pour favoriser une croissance forte du foie non embolisé et permettre ainsi une chirurgie chez des patients présentant initialement un très petit FFR, notamment en cas de parenchyme hépatique pathologique. Cette situation peut se présenter par exemple chez des patients atteints d'une récurrence de métastases hépatiques, déjà opérés antérieurement plusieurs fois de résections hépatiques et ayant reçu plusieurs lignes de chimiothérapie. De même, en cas d'hypertrophie insuffisante après EPPR, il serait envisageable de répéter la procédure d'embolisation pour stimuler la régénération du FFR. L'EPPRR pourrait dans ce contexte devenir une stratégie de sauvetage à la manière de l'embolisation veineuse hépatique après EPP non résorbable. Enfin, la répétition rapide du stimulus d'EPPRR pourrait entraîner une régénération accélérée du FFR et permettre ainsi une chirurgie hépatique plus précoce. Cette stratégie pourrait être utile chez les patients atteints par des métastases hépatiques bilobaires, s'intégrant dans une approche chirurgicale classique en deux temps comme une alternative à la stratégie d'ALPPS évoquée au chapitre 1.

Dans le contexte de la THDV, l'EPPRR pourrait permettre l'hypertrophie d'un futur greffon gauche (foie, voire lobe gauche), dont le prélèvement et l'implantation ont été standardisées pour la transplantation pédiatrique<sup>156</sup>. Dans le cas où une EPPRR du foie droit (voire du foie droit et du segment IV) du donneur est envisagée, il persiste une interrogation sur le risque encouru par le donneur après le prélèvement : il resterait en place un foie droit embolisé, certes reperméabilisé, mais ayant subi une atrophie. Une étude menée chez la souris a récemment investigué la récupération de la fonction du foie embolisé<sup>146</sup>. Après reperméabilisation du foie embolisé par une EPPR, une résection des lobes non embolisés (et hypertrophiés) était réalisée. De manière intéressante, la régénération et la fonction des lobes

embolisés reperméabilisés était conservées.

La technique d'EPPRR pourrait également avoir un intérêt fort pour la THE en favorisant la prise de greffe des cellules thérapeutiques. Nous avons démontré que la répétition du stimulus d'embolisation permettait d'augmenter significativement le repeuplement du foie du receveur. Il nous reste maintenant à évaluer l'intérêt de l'EPPRR dans un modèle animal de MMHH. La correction à long-terme d'un déficit métabolique à l'aide d'une THE constitue en effet la finalité de notre approche. Dans de futurs projets, notre objectif sera d'appliquer l'EPPRR avant THE dans le modèle du rat Gunn, modèle de la maladie de Crigler-Najjar de type I<sup>172</sup>. La maladie de Crigler-Najjar est une maladie métabolique héréditaire hépatique causée par un déficit de l'activité de la bilirubine-glucuronosyl-transférase (UGT1A1), enzyme qui conjugue la bilirubine et permet son excrétion biliaire. La conséquence de ce déficit enzymatique est une hyperbilirubinémie majeure apparaissant dès la naissance, qui peut provoquer des troubles neurologiques graves. Le traitement des patients atteints de la forme de type 1, la plus sévère, est la photothérapie (10 à 12 heures par jour). La seule alternative thérapeutique actuelle est la greffe d'organe. Chez le rat Gunn, la greffe de moins d'1% d'hépatocytes génétiquement modifiés exprimant l'enzyme UGT1A1 suffit pour diminuer significativement l'hyperbilirubinémie de 30%<sup>173</sup>. Cette masse thérapeutique doit pouvoir être largement dépassée par l'utilisation de la technique d'embolisation répétée.

Au regard des résultats des expérimentations menées chez le rat<sup>158</sup> et le porc, aucun élément ne s'oppose à la réalisation d'une troisième (ou d'une énième) EPPR de manière à induire itérativement un stimulus de régénération hépatocytaire à l'aide d'une technique peu invasive. L'association d'une THE à plusieurs EPPRR pourrait permettre l'atrophie complète des lobes embolisés et un repeuplement majeur des lobes non embolisés par des cellules thérapeutiques. On peut donc imaginer corriger de manière définitive certains déficits enzymatiques héréditaires. De plus, on peut imaginer associer de manière itérative l'EPPRR et des transplantations répétées d'hépatocytes. Récemment, une nouvelle source d'hépatocytes a émergé : des hépatocytes produits à partir de cellules souches pluripotentes induites (iPSC). Il est en effet possible de reprogrammer des cellules somatiques en iPSC. Notre équipe a montré en collaboration que les iPSC ont la capacité de se différencier en hépatocytes<sup>174</sup>. Elles

offrent ainsi un grand espoir de « médecine régénérative » pour pallier la pénurie d'organes. Pouvant être dérivées du patient lui-même, elles peuvent être génétiquement-corrigées avant une différenciation en hépatocytes pour une médecine régénérative personnalisée qui s'affranchirait des problèmes immunologiques de l'allogreffe<sup>175</sup>. Un des avantages majeurs des iPSC est qu'elles constituent une source illimitée et de qualité constante d'hépatocytes contrairement aux hépatocytes isolés de biopsies hépatiques. Cela permettrait de s'affranchir de la lobectomie hépatique nécessaire au recueil des hépatocytes du patient, une procédure non dénuée de risque, et d'envisager ainsi des transplantations itératives d'hépatocytes dérivés d'iPSC génétiquement corrigés.



**CONCLUSION GENERALE**

La technique d'EPPR que notre équipe a développée est en cours d'évaluation prospective dans un protocole de recherche clinique multicentrique. Elle représente par ailleurs un stimulus efficace et tout-à-fait applicable d'un point de vue clinique pour un protocole de THe.

En outre, les travaux réalisés au cours cette thèse suggèrent que les capacités de régénération du foie seraient peut-être plus importantes que celles observées jusque-là. Nos expérimentations chez l'animal sur l'EPPRR ont montré qu'on pouvait entraîner une régénération répétée d'une partie du foie avec un intervalle court. Cette capacité a été appliquée au « préconditionnement » du foie avant THe, permettant d'améliorer le repeuplement du foie par les cellules transplantées. Elle ouvre également la voie à de nouvelles possibilités thérapeutiques : régénération maximale du FFR avant hépatectomie majeure étendue, hypertrophie du futur greffon avant prélèvement de foie à partir d'un donneur vivant...

A terme, l'EPPRR pourrait permettre de modeler à la demande l'organisation du foie, favorisant ainsi l'hypertrophie de tel ou tel secteur en fonction des besoins.

**BIBLIOGRAPHIE**

1. Puppi J, Strom SC, Hughes RD, et al. Improving the techniques for human hepatocyte transplantation: report from a consensus meeting in London. *Cell Transplant.* 2012;21(1):1-10.
2. Bucher NL. REGENERATION OF MAMMALIAN LIVER. *International review of cytology.* 1963;15:245-300.
3. Stocker E, Wullstein HK, Brau G. [Capacity of regeneration in liver epithelia of juvenile, repeated partially hepatectomized rats. Autoradiographic studies after continuous infusion of 3H-thymidine (author's transl)]. *Virchows Archiv B, Cell pathology.* 1973;14(2):93-103.
4. Clavien PA, Petrowsky H, DeOliveira ML, Graf R. Strategies for safer liver surgery and partial liver transplantation. *N Engl J Med.* 2007;356(15):1545-1559.
5. Farges O, Malassagne B, Flejou JF, Balzan S, Sauvanet A, Belghiti J. Risk of major liver resection in patients with underlying chronic liver disease: a reappraisal. *Ann Surg.* 1999;229(2):210-215.
6. Kanematsu T, Takenaka K, Furuta T, Ezaki T, Sugimachi K, Inokuchi K. Acute portal hypertension associated with liver resection. Analysis of early postoperative death. *Archives of surgery (Chicago, Ill : 1960).* 1985;120(11):1303-1305.
7. Makuuchi M, Thai BL, Takayasu K, et al. Preoperative portal embolization to increase safety of major hepatectomy for hilar bile duct carcinoma: a preliminary report. *Surgery.* 1990;107(5):521-527.
8. Takayasu K, Muramatsu Y, Shima Y, Moriyama N, Yamada T, Makuuchi M. Hepatic lobar atrophy following obstruction of the ipsilateral portal vein from hilar cholangiocarcinoma. *Radiology.* 1986;160(2):389-393.
9. Court FG, Wemyss-Holden SA, Dennison AR, Maddern GJ. The mystery of liver regeneration. *Br J Surg.* 2002;89(9):1089-1095.
10. Nagy P, Teramoto T, Factor VM, et al. Reconstitution of liver mass via cellular hypertrophy in the rat. *Hepatology.* 2001;33(2):339-345.
11. Kianmanesh R, Sauvanet A, Hentic O, et al. Two-step surgery for synchronous bilobar liver metastases from digestive endocrine tumors: a safe approach for radical resection. *Ann Surg.* 2008;247(4):659-665.
12. Diehl AM, Rai R. Review: regulation of liver regeneration by pro-inflammatory cytokines. *Journal of gastroenterology and hepatology.* 1996;11(5):466-470.
13. Fausto N, Laird AD, Webber EM. Liver regeneration. 2. Role of growth factors and cytokines in hepatic regeneration. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.* 1995;9(15):1527-1536.
14. Fujiyoshi M, Ozaki M. Molecular mechanisms of liver regeneration and protection for treatment of liver dysfunction and diseases. *Journal of hepato-biliary-pancreatic sciences.* 2011;18(1):13-22.
15. Mead JE, Braun L, Martin DA, Fausto N. Induction of replicative competence ("priming") in normal liver. *Cancer Res.* 1990;50(21):7023-7030.
16. Michalopoulos GK. Liver regeneration after partial hepatectomy: critical analysis of mechanistic dilemmas. *Am J Pathol.* 2010;176(1):2-13.
17. Michalopoulos GK, DeFrances MC. Liver regeneration. *Science.* 1997;276(5309):60-66.
18. Taub R. Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nature reviews Molecular cell biology.* 2004;5(10):836-847.



19. Balzan SM, Gava VG, Magalhaes MA, Dotto ML. Outflow modulation to target liver regeneration: something old, something new. *European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology*. 2014;40(2):140-143.
20. Schoen JM, Wang HH, Minuk GY, Lauth WW. Shear stress-induced nitric oxide release triggers the liver regeneration cascade. *Nitric oxide : biology and chemistry*. 2001;5(5):453-464.
21. Blindenbacher A, Wang X, Langer I, Savino R, Terracciano L, Heim MH. Interleukin 6 is important for survival after partial hepatectomy in mice. *Hepatology*. 2003;38(3):674-682.
22. Iwai M, Cui TX, Kitamura H, Saito M, Shimazu T. Increased secretion of tumour necrosis factor and interleukin 6 from isolated, perfused liver of rats after partial hepatectomy. *Cytokine*. 2001;13(1):60-64.
23. Webber EM, Bruix J, Pierce RH, Fausto N. Tumor necrosis factor primes hepatocytes for DNA replication in the rat. *Hepatology*. 1998;28(5):1226-1234.
24. Yamada Y, Fausto N. Deficient liver regeneration after carbon tetrachloride injury in mice lacking type 1 but not type 2 tumor necrosis factor receptor. *Am J Pathol*. 1998;152(6):1577-1589.
25. Yamada Y, Webber EM, Kirillova I, Peschon JJ, Fausto N. Analysis of liver regeneration in mice lacking type 1 or type 2 tumor necrosis factor receptor: requirement for type 1 but not type 2 receptor. *Hepatology*. 1998;28(4):959-970.
26. Tao Y, Wang M, Chen E, Tang H. Liver Regeneration: Analysis of the Main Relevant Signaling Molecules. *Mediators of inflammation*. 2017;2017:4256352.
27. Mangnall D, Bird NC, Majeed AW. The molecular physiology of liver regeneration following partial hepatectomy. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2003;23(2):124-138.
28. Reinehr R, Haussinger D. CD95 death receptor and epidermal growth factor receptor (EGFR) in liver cell apoptosis and regeneration. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2012;518(1):2-7.
29. Maher JJ. Cell-specific expression of hepatocyte growth factor in liver. Upregulation in sinusoidal endothelial cells after carbon tetrachloride. *J Clin Invest*. 1993;91(5):2244-2252.
30. Sakamoto T, Liu Z, Murase N, et al. Mitosis and apoptosis in the liver of interleukin-6-deficient mice after partial hepatectomy. *Hepatology*. 1999;29(2):403-411.
31. Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature*. 2003;425(6958):577-584.
32. Romero-Gallo J, Sozmen EG, Chytil A, et al. Inactivation of TGF-beta signaling in hepatocytes results in an increased proliferative response after partial hepatectomy. *Oncogene*. 2005;24(18):3028-3041.
33. Grisham JW. A morphologic study of deoxyribonucleic acid synthesis and cell proliferation in regenerating rat liver; autoradiography with thymidine-H3. *Cancer Res*. 1962;22:842-849.
34. Lieber A, Peeters MJ, Gown A, Perkins J, Kay MA. A modified urokinase plasminogen activator induces liver regeneration without bleeding. *Human gene therapy*. 1995;6(8):1029-1037.
35. Yoshimura S, Kamada N. Effect of cyclosporin A on liver regeneration following partial hepatectomy in the mouse. *Transplant Proc*. 1989;21(1 Pt 1):911-912.

36. Fabrikant JI. The kinetics of cellular proliferation in regenerating liver. *The Journal of cell biology*. 1968;36(3):551-565.
37. Duclos J, Bhangui P, Salloum C, et al. Ad Integrum Functional and Volumetric Recovery in Right Lobe Living Donors: Is It Really Complete 1 Year After Donor Hepatectomy? *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2016;16(1):143-156.
38. Rahbari NN, Garden OJ, Padbury R, et al. Posthepatectomy liver failure: a definition and grading by the International Study Group of Liver Surgery (ISGLS). *Surgery*. 2011;149(5):713-724.
39. Balzan S, Belghiti J, Farges O, et al. The "50-50 criteria" on postoperative day 5: an accurate predictor of liver failure and death after hepatectomy. *Ann Surg*. 2005;242(6):824-828, discussion 828-829.
40. Capussotti L, Vigano L, Giuliani F, Ferrero A, Giovannini I, Nuzzo G. Liver dysfunction and sepsis determine operative mortality after liver resection. *Br J Surg*. 2009;96(1):88-94.
41. Kishi Y, Abdalla EK, Chun YS, et al. Three hundred and one consecutive extended right hepatectomies: evaluation of outcome based on systematic liver volumetry. *Ann Surg*. 2009;250(4):540-548.
42. Russolillo N, Ratti F, Vigano L, et al. The Influence of Aging on Hepatic Regeneration and Early Outcome after Portal Vein Occlusion: A Case-Control Study. *Annals of surgical oncology*. 2015;22(12):4046-4051.
43. Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2005;42(5):1208-1236.
44. Cucchetti A, Ercolani G, Vivarelli M, et al. Impact of model for end-stage liver disease (MELD) score on prognosis after hepatectomy for hepatocellular carcinoma on cirrhosis. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2006;12(6):966-971.
45. Imamura H, Sano K, Sugawara Y, Kokudo N, Makuuchi M. Assessment of hepatic reserve for indication of hepatic resection: decision tree incorporating indocyanine green test. *Journal of hepato-biliary-pancreatic surgery*. 2005;12(1):16-22.
46. Shirabe K, Shimada M, Gion 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(3):304-309.
47. Vauthey JN, Chaoui A, Do KA, et al. Standardized measurement of the future liver remnant prior to extended liver resection: methodology and clinical associations. *Surgery*. 2000;127(5):512-519.
48. Thirunavukarasu P, Aloia TA. Preoperative Assessment and Optimization of the Future Liver Remnant. *The Surgical clinics of North America*. 2016;96(2):197-205.
49. Shindoh J, Tzeng CW, Aloia TA, et al. Optimal future liver remnant in patients treated with extensive preoperative chemotherapy for colorectal liver metastases. *Annals of surgical oncology*. 2013;20(8):2493-2500.
50. Truant S, Oberlin O, Sergent G, et al. Remnant liver volume to body weight ratio  $\geq$  0.5%: A new cut-off to estimate postoperative risks after extended resection in noncirrhotic liver. *J Am Coll Surg*. 2007;204(1):22-33.

51. Truant S, Baillet C, Deshorgue AC, et al. Drop of Total Liver Function in the Interstages of the New Associating Liver Partition and Portal Vein Ligation for Staged Hepatectomy Technique: Analysis of the "Auxiliary Liver" by HIDA Scintigraphy. *Ann Surg.* 2016;263(3):e33-34.
52. Golse N, Bucur PO, Adam R, Castaing D, Sa Cunha A, Vibert E. New paradigms in post-hepatectomy liver failure. *J Gastrointest Surg.* 2013;17(3):593-605.
53. de Graaf W, van Lienden KP, van Gulik TM, Bennink RJ. (99m)Tc-mebrofenin hepatobiliary scintigraphy with SPECT for the assessment of hepatic function and liver functional volume before partial hepatectomy. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine.* 2010;51(2):229-236.
54. de Graaf W, van Lienden KP, Dinant S, et al. Assessment of future remnant liver function using hepatobiliary scintigraphy in patients undergoing major liver resection. *J Gastrointest Surg.* 2010;14(2):369-378.
55. Piron L, Deshayes E, Escal L, et al. [Portal vein embolization: Present and future]. *Bulletin du cancer.* 2017;104(5):407-416.
56. Capussotti L, Muratore A, Baracchi F, et al. Portal vein ligation as an efficient method of increasing the future liver remnant volume in the surgical treatment of colorectal metastases. *Archives of surgery (Chicago, Ill : 1960).* 2008;143(10):978-982; discussion 982.
57. Farges O, Belghiti J, Kianmanesh R, et al. Portal vein embolization before right hepatectomy: prospective clinical trial. *Ann Surg.* 2003;237(2):208-217.
58. Yokoyama Y, Nagino M, Nimura Y. Mechanisms of hepatic regeneration following portal vein embolization and partial hepatectomy: a review. *World J Surg.* 2007;31(2):367-374.
59. Rous P, Larimore LD. RELATION OF THE PORTAL BLOOD TO LIVER MAINTENANCE : A DEMONSTRATION OF LIVER ATROPHY CONDITIONAL ON COMPENSATION. *The Journal of experimental medicine.* 1920;31(5):609-632.
60. Are C, Iacovitti S, Prete F, Crafa FM. Feasibility of laparoscopic portal vein ligation prior to major hepatectomy. *HPB (Oxford).* 2008;10(4):229-233.
61. Kinoshita H, Sakai K, Hirohashi K, Igawa S, Yamasaki O, Kubo S. Preoperative portal vein embolization for hepatocellular carcinoma. *World J Surg.* 1986;10(5):803-808.
62. Ribero D, Abdalla EK, Madoff DC, Donadon M, Loyer EM, Vauthey JN. Portal vein embolization before major hepatectomy and its effects on regeneration, resectability and outcome. *Br J Surg.* 2007;94(11):1386-1394.
63. Broering DC, Hillert C, Krupski G, et al. Portal vein embolization vs. portal vein ligation for induction of hypertrophy of the future liver remnant. *J Gastrointest Surg.* 2002;6(6):905-913; discussion 913.
64. Wilms C, Mueller L, Lenk 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.* 2008;247(5):825-834.
65. Gallstones and laparoscopic cholecystectomy. *NIH consensus statement.* 1992;10(3):1-28.
66. Aussilhou B, Lesurtel M, Sauvanet A, et al. Right portal vein ligation is as efficient as portal vein embolization to induce hypertrophy of the left liver remnant. *J Gastrointest Surg.* 2008;12(2):297-303.

67. Mueller L, Hillert C, Moller L, Krupski-Berdien G, Rogiers X, Broering DC. Major hepatectomy for colorectal metastases: is preoperative portal occlusion an oncological risk factor? *Annals of surgical oncology*. 2008;15(7):1908-1917.
68. Pandanaboyana S, Bell R, Hidalgo E, et al. A systematic review and meta-analysis of portal vein ligation versus portal vein embolization for elective liver resection. *Surgery*. 2015;157(4):690-698.
69. Denys A, Bize P, Demartines N, Deschamps F, De Baere T. Quality improvement for portal vein embolization. *Cardiovascular and interventional radiology*. 2010;33(3):452-456.
70. Wajswol E, Jazmati T, Contractor S, Kumar A. Portal Vein Embolization Utilizing N-Butyl Cyanoacrylate for Contralateral Lobe Hypertrophy Prior to Liver Resection: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Cardiovascular and interventional radiology*. 2018;41(9):1302-1312.
71. Hwang S, Lee SG, Ko GY, et al. Sequential preoperative ipsilateral hepatic vein embolization after portal vein embolization to induce further liver regeneration in patients with hepatobiliary malignancy. *Ann Surg*. 2009;249(4):608-616.
72. Le Roy B, Perrey A, Fontarensky M, et al. Combined Preoperative Portal and Hepatic Vein Embolization (Biembolization) to Improve Liver Regeneration Before Major Liver Resection: A Preliminary Report. *World J Surg*. 2017;41(7):1848-1856.
73. Guiu B, Quenet F, Escal L, et al. Extended liver venous deprivation before major hepatectomy induces marked and very rapid increase in future liver remnant function. *European radiology*. 2017;27(8):3343-3352.
74. Hwang S, Ha TY, Ko GY, et al. Preoperative Sequential Portal and Hepatic Vein Embolization in Patients with Hepatobiliary Malignancy. *World J Surg*. 2015;39(12):2990-2998.
75. Schnitzbauer AA, Lang SA, Goessmann H, 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*. 2012;255(3):405-414.
76. Vennarecci G, Laurenzi A, Santoro R, Colasanti M, Lepiane P, Ettorre GM. The ALPPS procedure: a surgical option for hepatocellular carcinoma with major vascular invasion. *World J Surg*. 2014;38(6):1498-1503.
77. Machado MA, Makdissi FF, Surjan RC, Basseres T, Schadde E. Transition from open to laparoscopic ALPPS for patients with very small FLR: the initial experience. *HPB (Oxford)*. 2017;19(1):59-66.
78. Alvarez FA, Ardiles V, de Santibanes M, Pekolj J, de Santibanes E. Associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy offers high oncological feasibility with adequate patient safety: a prospective study at a single center. *Ann Surg*. 2015;261(4):723-732.
79. Dupre A, Hitier M, Peyrat P, Chen Y, Meeus P, Rivoire M. Associating portal embolization and artery ligation to induce rapid liver regeneration in staged hepatectomy. *Br J Surg*. 2015;102(12):1541-1550.
80. Eshmuminov D, Raptis DA, Linecker M, Wirsching A, Lesurtel M, Clavien PA. Meta-analysis of associating liver partition with portal vein ligation and portal vein occlusion for two-stage hepatectomy. *Br J Surg*. 2016;103(13):1768-1782.
81. Lang H, de Santibanes E, Schlitt HJ, et al. 10th Anniversary of ALPPS-Lessons Learned and quo Vadis. *Ann Surg*. 2019;269(1):114-119.

82. Aoki T, Kubota K. Preoperative portal vein embolization for hepatocellular carcinoma: Consensus and controversy. *World journal of hepatology*. 2016;8(9):439-445.
83. Elias D, De Baere T, Roche A, Mducreux, Leclere J, Lasser P. 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*. 1999;86(6):784-788.
84. Giglio MC, Giakoustidis A, Draz A, et al. Oncological Outcomes of Major Liver Resection Following Portal Vein Embolization: A Systematic Review and Meta-analysis. *Annals of surgical oncology*. 2016;23(11):3709-3717.
85. van Lienden KP, van den Esschert JW, de Graaf W, et al. Portal vein embolization before liver resection: a systematic review. *Cardiovascular and interventional radiology*. 2013;36(1):25-34.
86. Shindoh J, Vauthey JN, Zimmitti G, et al. Analysis of the efficacy of portal vein embolization for patients with extensive liver malignancy and very low future liver remnant volume, including a comparison with the associating liver partition with portal vein ligation for staged hepatectomy approach. *J Am Coll Surg*. 2013;217(1):126-133; discussion 133-124.
87. Kawarada Y, Sanda M, Kawamura K, Suzaki M, Nakase I, Mizumoto R. Simultaneous extensive resection of the liver and the pancreas in dogs. *Gastroenterologia Japonica*. 1991;26(6):747-756.
88. Tracy TF, Jr., Bailey PV, Goerke ME, Sotelo-Avila C, Weber TR. Cholestasis without cirrhosis alters regulatory liver gene expression and inhibits hepatic regeneration. *Surgery*. 1991;110(2):176-182; discussion 182-173.
89. Skullman S, Ihse I, Larsson J. Influence of malnutrition on regeneration and composition of the liver in rats. *Acta chirurgica Scandinavica*. 1990;156(10):717-722.
90. Iakova P, Awad SS, Timchenko NA. Aging reduces proliferative capacities of liver by switching pathways of C/EBPalpha growth arrest. *Cell*. 2003;113(4):495-506.
91. Shan YS, Hsieh YH, Sy ED, Chiu NT, Lin PW. The influence of spleen size on liver regeneration after major hepatectomy in normal and early cirrhotic liver. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2005;25(1):96-100.
92. Marshall A, Rushbrook S, Davies SE, et al. Relation between hepatocyte G1 arrest, impaired hepatic regeneration, and fibrosis in chronic hepatitis C virus infection. *Gastroenterology*. 2005;128(1):33-42.
93. Powell LW, Seckington RC, Deugnier Y. Haemochromatosis. *Lancet*. 2016;388(10045):706-716.
94. Ebrahimi A, Rahim F. Crigler-Najjar Syndrome: Current Perspectives and the Application of Clinical Genetics. *Endocrine, metabolic & immune disorders drug targets*. 2018;18(3):201-211.
95. Adam R, Karam V, Delvart V, et al. Evolution of indications and results of liver transplantation in Europe. A report from the European Liver Transplant Registry (ELTR). *J Hepatol*. 2012;57(3):675-688.
96. Dagher I, Boudechiche L, Branger J, et al. Efficient hepatocyte engraftment in a nonhuman primate model after partial portal vein embolization. *Transplantation*. 2006;82(8):1067-1073.
97. Fox IJ, Roy-Chowdhury J. Hepatocyte transplantation. *J Hepatol*. 2004;40(6):878-886.
98. Sauer V, Sijaj R, Stoppeler S, et al. Repeated transplantation of hepatocytes prevents fulminant hepatitis in a rat model of Wilson's disease. *Liver transplantation : official*

- publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society.* 2012;18(2):248-259.
99. Vosough M, Moslem M, Pournasr B, Baharvand H. Cell-based therapeutics for liver disorders. *British medical bulletin.* 2011;100:157-172.
  100. Raper SE, Grossman M, Rader DJ, et al. Safety and feasibility of liver-directed ex vivo gene therapy for homozygous familial hypercholesterolemia. *Ann Surg.* 1996;223(2):116-126.
  101. Grossman M, Rader DJ, Muller DW, et al. A pilot study of ex vivo gene therapy for homozygous familial hypercholesterolaemia. *Nature medicine.* 1995;1(11):1148-1154.
  102. Grossman M, Raper SE, Kozarsky K, et al. Successful ex vivo gene therapy directed to liver in a patient with familial hypercholesterolaemia. *Nat Genet.* 1994;6(4):335-341.
  103. Muraca M, Gerunda G, Neri D, et al. Hepatocyte transplantation as a treatment for glycogen storage disease type 1a. *Lancet.* 2002;359(9303):317-318.
  104. Fox IJ, Chowdhury JR, Kaufman SS, et al. Treatment of the Crigler-Najjar syndrome type I with hepatocyte transplantation. *N Engl J Med.* 1998;338(20):1422-1426.
  105. Ponder KP, Gupta S, Leland F, et al. Mouse hepatocytes migrate to liver parenchyma and function indefinitely after intrasplenic transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88(4):1217-1221.
  106. Dhawan A, Puppi J, Hughes RD, Mitry RR. Human hepatocyte transplantation: current experience and future challenges. *Nature reviews.* 2010;7(5):288-298.
  107. Vons C, Loux N, Simon L, et al. Transplantation of hepatocytes in nonhuman primates: a preclinical model for the treatment of hepatic metabolic diseases. *Transplantation.* 2001;72(5):811-818.
  108. Gagandeep S, Rajvanshi P, Sokhi RP, et al. Transplanted hepatocytes engraft, survive, and proliferate in the liver of rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *The Journal of pathology.* 2000;191(1):78-85.
  109. Laconi E, Oren R, Mukhopadhyay DK, et al. Long-term, near-total liver replacement by transplantation of isolated hepatocytes in rats treated with retrorsine. *Am J Pathol.* 1998;153(1):319-329.
  110. Guha C, Sharma A, Gupta S, et al. Amelioration of radiation-induced liver damage in partially hepatectomized rats by hepatocyte transplantation. *Cancer Res.* 1999;59(23):5871-5874.
  111. Yamanouchi K, Zhou H, Roy-Chowdhury N, et al. Hepatic irradiation augments engraftment of donor cells following hepatocyte transplantation. *Hepatology.* 2009;49(1):258-267.
  112. De Vree JM, Ottenhoff R, Bosma PJ, Smith AJ, Aten J, Oude Elferink RP. Correction of liver disease by hepatocyte transplantation in a mouse model of progressive familial intrahepatic cholestasis. *Gastroenterology.* 2000;119(6):1720-1730.
  113. Rhim JA, Sandgren EP, Degen JL, Palmiter RD, Brinster RL. Replacement of diseased mouse liver by hepatic cell transplantation. *Science.* 1994;263(5150):1149-1152.
  114. Karnezis AN, Dorokhov M, Grompe M, Zhu L. Loss of p27(Kip1) enhances the transplantation efficiency of hepatocytes transferred into diseased livers. *J Clin Invest.* 2001;108(3):383-390.
  115. Mignon A, Guidotti JE, Mitchell C, et al. Selective repopulation of normal mouse liver by Fas/CD95-resistant hepatocytes. *Nature medicine.* 1998;4(10):1185-1188.

116. Chan SC, Fan ST, Lo CM, Liu CL, Wong J. Toward current standards of donor right hepatectomy for adult-to-adult live donor liver transplantation through the experience of 200 cases. *Ann Surg.* 2007;245(1):110-117.
117. Krupski G, Broring DC, Wittkugel O, et al. [Formation of portal venous collaterals after ligation of the portal vein for induction of liver regeneration]. *RoFo : Fortschritte auf dem Gebiete der Rontgenstrahlen und der Nuklearmedizin.* 2002;174(10):1281-1284.
118. Denys AL, Abehsera M, Sauvanet A, Sibert A, Belghiti J, Menu Y. Failure of right portal vein ligation to induce left lobe hypertrophy due to intrahepatic portoportal collaterals: successful treatment with portal vein embolization. *AJR American journal of roentgenology.* 1999;173(3):633-635.
119. van den Esschert JW, van Lienden KP, de Graaf W, et al. Portal vein embolization induces more liver regeneration than portal vein ligation in a standardized rabbit model. *Surgery.* 2011;149(3):378-385.
120. Pourcher G, El-Kehdy H, Kanso F, et al. Volumetric Portal Embolization: A New Concept to Improve Liver Regeneration and Hepatocyte Engraftment. *Transplantation.* 2016;100(2):344-354.
121. Orcutt ST, Kobayashi K, Sultenfuss M, et al. Portal Vein Embolization as an Oncosurgical Strategy Prior to Major Hepatic Resection: Anatomic, Surgical, and Technical Considerations. *Frontiers in surgery.* 2016;3:14.
122. Denys A, Prior J, Bize P, et al. Portal vein embolization: what do we know? *Cardiovascular and interventional radiology.* 2012;35(5):999-1008.
123. Abulkhir A, Limongelli P, Healey AJ, et al. Preoperative portal vein embolization for major liver resection: a meta-analysis. *Ann Surg.* 2008;247(1):49-57.
124. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2018;69(1):182-236.
125. de Baere T, Denys A, Paradis V. Comparison of four embolic materials for portal vein embolization: experimental study in pigs. *European radiology.* 2009;19(6):1435-1442.
126. Guiu B, Bize P, Gunthern D, Demartines N, Halkic N, Denys A. Portal vein embolization before right hepatectomy: improved results using n-butyl-cyanoacrylate compared to microparticles plus coils. *Cardiovascular and interventional radiology.* 2013;36(5):1306-1312.
127. Abdalla EK, Denys A, Chevalier P, Nemr RA, Vauthey JN. Total and segmental liver volume variations: implications for liver surgery. *Surgery.* 2004;135(4):404-410.
128. Madoff DC, Abdalla EK, Gupta S, et al. Transhepatic ipsilateral right portal vein embolization extended to segment IV: improving hypertrophy and resection outcomes with spherical particles and coils. *J Vasc Interv Radiol.* 2005;16(2 Pt 1):215-225.
129. de Baere T, Teriitehau C, Deschamps F, et al. Predictive factors for hypertrophy of the future remnant liver after selective portal vein embolization. *Annals of surgical oncology.* 2010;17(8):2081-2089.
130. Kishi Y, Madoff DC, Abdalla EK, et al. Is embolization of segment 4 portal veins before extended right hepatectomy justified? *Surgery.* 2008;144(5):744-751.
131. Imamura H, Shimada R, Kubota M, et al. Preoperative portal vein embolization: an audit of 84 patients. *Hepatology.* 1999;29(4):1099-1105.
132. Di Stefano DR, de Baere T, Denys A, et al. Preoperative percutaneous portal vein embolization: evaluation of adverse events in 188 patients. *Radiology.* 2005;234(2):625-630.

133. Hobbs HH, Brown MS, Goldstein JL. Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Human mutation*. 1992;1(6):445-466.
134. Birraux J, Menzel O, Wildhaber B, Jond C, Nguyen TH, Chardot C. A step toward liver gene therapy: efficient correction of the genetic defect of hepatocytes isolated from a patient with Crigler-Najjar syndrome type 1 with lentiviral vectors. *Transplantation*. 2009;87(7):1006-1012.
135. Goulinet-Mainot S, Tranchart H, Groyer-Picard M-T, et al. Improved Hepatocyte Engraftment After Portal Vein Occlusion in LDL Receptor-Deficient WHHL Rabbits and Lentiviral-Mediated Phenotypic Correction In Vitro. *Cell Medicine*. 2012;4(2):85-98.
136. Tranchart H, Gaillard M, Diop PS, Goulinet S, Lainas P, Dagher I. Transplantation of genetically modified hepatocytes after liver preconditioning in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit. *The Journal of surgical research*. 2018;224:23-32.
137. Gupta S, Aragona E, Vemuru RP, Bhargava KK, Burk RD, Chowdhury JR. Permanent engraftment and function of hepatocytes delivered to the liver: implications for gene therapy and liver repopulation. *Hepatology*. 1991;14(1):144-149.
138. Kita T, Brown MS, Watanabe Y, Goldstein JL. Deficiency of low density lipoprotein receptors in liver and adrenal gland of the WHHL rabbit, an animal model of familial hypercholesterolemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981;78(4):2268-2272.
139. Yamamoto T, Bishop RW, Brown MS, Goldstein JL, Russell DW. Deletion in cysteine-rich region of LDL receptor impedes transport to cell surface in WHHL rabbit. *Science*. 1986;232(4755):1230-1237.
140. de Baere T, Roche A, Elias D, Lasser P, Lagrange C, Bousson V. Preoperative portal vein embolization for extension of hepatectomy indications. *Hepatology*. 1996;24(6):1386-1391.
141. de Baere T, Roche A, Vavasseur D, et al. Portal vein embolization: utility for inducing left hepatic lobe hypertrophy before surgery. *Radiology*. 1993;188(1):73-77.
142. Elias D, Vigano L, Orsi F, et al. New Perspectives in the Treatment of Colorectal Metastases. *Liver cancer*. 2016;6(1):90-98.
143. Huang JY, Yang WZ, Li JJ, Jiang N, Zheng QB. Portal vein embolization induces compensatory hypertrophy of remnant liver. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2006;12(3):408-414.
144. Lainas P, Boudechiche L, Osorio A, et al. Liver regeneration and recanalization time course following reversible portal vein embolization. *J Hepatol*. 2008;49(3):354-362.
145. van den Esschert JW, van Lienden KP, Alles LK, et al. Liver regeneration after portal vein embolization using absorbable and permanent embolization materials in a rabbit model. *Ann Surg*. 2012;255(2):311-318.
146. Wirsching A, Melloul E, Lezhnina K, et al. Temporary portal vein embolization is as efficient as permanent portal vein embolization in mice. *Surgery*. 2017;162(1):68-81.
147. Kakizawa H, Toyota N, Arihiro K, et al. Preoperative portal vein embolization with a mixture of gelatin sponge and iodized oil: efficacy and safety. *Acta radiologica (Stockholm, Sweden : 1987)*. 2006;47(10):1022-1028.
148. Kim MJ, Choo SW, Do YS, et al. Use of double-occlusion balloon catheter: preoperative portal vein embolization for induction of future remnant liver hypertrophy. *Cardiovascular and interventional radiology*. 2004;27(1):16-20.
149. Tranchart H, Catherine L, Maitre S, Lainas P, De Laveaucoupet J, Dagher I. Efficient liver regeneration following temporary portal vein embolization with absorbable gelatin sponge powder in humans. *J Vasc Interv Radiol*. 2015;26(4):507-515.



150. Abdalla EK, Barnett CC, Doherty D, Curley SA, Vauthey JN. Extended hepatectomy in patients with hepatobiliary malignancies with and without preoperative portal vein embolization. *Archives of surgery (Chicago, Ill : 1960)*. 2002;137(6):675-680; discussion 680-671.
151. Azoulay D, Castaing D, Smail A, et al. Resection of nonresectable liver metastases from colorectal cancer after percutaneous portal vein embolization. *Ann Surg*. 2000;231(4):480-486.
152. Dagher I, Nguyen TH, Groyer-Picard MT, et al. Efficient hepatocyte engraftment and long-term transgene expression after reversible portal embolization in nonhuman primates. *Hepatology*. 2009;49(3):950-959.
153. Minagawa M, Makuuchi M, Torzilli G, et al. Extension of the frontiers of surgical indications in the treatment of liver metastases from colorectal cancer: long-term results. *Ann Surg*. 2000;231(4):487-499.
154. Yamanaka N, Okamoto E, Kuwata K, Tanaka N. A multiple regression equation for prediction of posthepatectomy liver failure. *Ann Surg*. 1984;200(5):658-663.
155. Abdalla EK, Hicks ME, Vauthey JN. Portal vein embolization: rationale, technique and future prospects. *Br J Surg*. 2001;88(2):165-175.
156. Tanaka K, Uemoto S, Tokunaga Y, et al. Surgical techniques and innovations in living related liver transplantation. *Ann Surg*. 1993;217(1):82-91.
157. Fan ST, Lo CM, Liu CL. Technical refinement in adult-to-adult living donor liver transplantation using right lobe graft. *Ann Surg*. 2000;231(1):126-131.
158. Tranchart H, Koffi GM, Gaillard M, et al. Liver regeneration following repeated reversible portal vein embolization in an experimental model. *Br J Surg*. 2016;103(9):1209-1219.
159. Lorand I, Vons C, Nguyen T, et al. Portal branch ligation induces efficient retrovirus-mediated gene delivery in rat liver. *J Gene Med*. 2004;6(5):507-513.
160. Furrer K, Tian Y, Pfammatter T, et al. Selective portal vein embolization and ligation trigger different regenerative responses in the rat liver. *Hepatology*. 2008;47(5):1615-1623.
161. Rocheleau B, Ethier C, Houle R, Huet PM, Bilodeau M. Hepatic artery buffer response following left portal vein ligation: its role in liver tissue homeostasis. *The American journal of physiology*. 1999;277(5):G1000-1007.
162. Rajvanshi P, Kerr A, Bhargava KK, Burk RD, Gupta S. Studies of liver repopulation using the dipeptidyl peptidase IV-deficient rat and other rodent recipients: cell size and structure relationships regulate capacity for increased transplanted hepatocyte mass in the liver lobule. *Hepatology*. 1996;23(3):482-496.
163. Seglen PO. Preparation of rat liver cells. 3. Enzymatic requirements for tissue dispersion. *Experimental cell research*. 1973;82(2):391-398.
164. Boudechiche L, Tranchart H, Branchereau S, et al. Improvement of hepatocyte transplantation efficiency in the mdr2<sup>-/-</sup> mouse model by glyceryl trinitrate. *Transplantation*. 2015;99(1):36-40.
165. Allen KJ, Mifsud NA, Williamson R, Bertolino P, Hardikar W. Cell-mediated rejection results in allograft loss after liver cell transplantation. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2008;14(5):688-694.

166. Gupta S, Rajvanshi P, Sokhi R, et al. Entry and integration of transplanted hepatocytes in rat liver plates occur by disruption of hepatic sinusoidal endothelium. *Hepatology*. 1999;29(2):509-519.
167. Wu YM, Gupta S. Hepatic preconditioning for transplanted cell engraftment and proliferation. *Methods Mol Biol*. 2009;481:107-116.
168. Bahde R, Kapoor S, Viswanathan P, Spiegel HU, Gupta S. Endothelin-1 receptor A blocker darusentan decreases hepatic changes and improves liver repopulation after cell transplantation in rats. *Hepatology*. 2014;59(3):1107-1117.
169. Ilan Y, Roy-Chowdhury N, Prakash R, et al. Massive repopulation of rat liver by transplantation of hepatocytes into specific lobes of the liver and ligation of portal vein branches to other lobes. *Transplantation*. 1997;64(1):8-13.
170. Maeda H, Shigoka M, Wang Y, et al. Disappearance of GFP-positive hepatocytes transplanted into the liver of syngeneic wild-type rats pretreated with retrorsine. *PLoS one*. 2014;9(5):e95880.
171. Duncan JR, Hicks ME, Cai SR, Brunt EM, Ponder KP. Embolization of portal vein branches induces hepatocyte replication in swine: a potential step in hepatic gene therapy. *Radiology*. 1999;210(2):467-477.
172. Gunn CK. Hereditary Acholuric Jaundice in the Rat. *Can Med Assoc J*. 1944;50(3):230-237.
173. Nguyen TH, Birraux J, Wildhaber B, et al. Ex vivo lentivirus transduction and immediate transplantation of uncultured hepatocytes for treating hyperbilirubinemic Gunn rat. *Transplantation*. 2006;82(6):794-803.
174. Rashid ST, Corbinau S, Hannan N, et al. Modeling inherited metabolic disorders of the liver using human induced pluripotent stem cells. *J Clin Invest*. 2010;120(9):3127-3136.
175. Yusa K, Rashid ST, Strick-Marchand H, et al. Targeted gene correction of alpha1-antitrypsin deficiency in induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2011;478(7369):391-394.

**ANNEXES**

# Volumetric Portal Embolization: A New Concept to Improve Liver Regeneration and Hepatocyte Engraftment

Guillaume Pourcher, MD, PhD,<sup>1,2,3</sup> Hoda El-Kehdy, PhD,<sup>1,2,3</sup> Frederic Kanso, MD,<sup>1,2,3</sup> Marie-Therese Groyer-Picard,<sup>1,2</sup> Martin Gaillard, MD,<sup>1,2,3</sup> Olivier Trassard, PhD,<sup>4</sup> Istvan Blazsek, PhD,<sup>1,2,3</sup> Hélène Agostini, MD,<sup>3</sup> Anne Dubart-Kupperschmitt, MD, PhD,<sup>1,2,3</sup> and Ibrahim Dagher, MD, PhD<sup>1,2,3</sup>

**Background.** Hepatocyte transplantation has been proposed as an alternative to orthotopic liver transplantation to treat metabolic liver diseases. This approach requires preconditioning of the host liver to enhance engraftment of transplanted hepatocytes. Different methods are currently used in preclinical models: partial hepatectomy, portal ligation or embolization, and radiotherapy or chemotherapeutic drugs. However, these methods carry high risks of complications and are problematic for use in clinical practice. Here, we developed an innovative method called volumetric (distal, partial, and random) portal embolization (VPE), which preserves total liver volume. **Methods.** Embolization was performed in the portal trunk of C57BL6 adult mice with polyester microspheres, to ensure a bilateral and distal distribution. The repartition of microspheres was studied by angiographic and histological analyses. Liver regeneration was evaluated by Ki67 labeling. Optimal conditions for VPE were determined, and the resulting regeneration was compared with that after partial hepatectomy (70%). Labeled adult hepatocytes were then transplanted, and engraftment was compared between embolized ( $n = 19$ ) and nonembolized mice ( $n = 8$ ). Engraftment was assessed in vivo and histologically by tracking labeled cells at day 5. **Results.** The best volumetric embolization conditions, which resulted in the regeneration of 5% of total liver, were  $8 \times 10^6$  ten-micron microspheres infused with a 29 G needle directly into the portal trunk at 3.3  $\mu\text{L/s}$ . In these conditions, transplanted hepatocytes engraftment was significantly higher than that in control conditions (3 vs 0.65%). **Conclusions.** The VPE is a new, minimally invasive, and efficient technique to prepare the host liver for cell transplantation.

(*Transplantation* 2016;100: 344–354)

Inherited metabolic liver diseases involve genetic defects in hepatic enzymes or other metabolic proteins that are normally synthesized by hepatocytes. Orthotopic liver transplantation is the only curative treatment currently available for life-threatening genetic disorders of the liver and acute liver failure. Hepatocytes transplantation has been explored as an alternative to orthotopic liver transplantation for the treatment of metabolic liver diseases in the past 2 decades.<sup>1,2</sup>

However, the low efficiency of cell engraftment and insufficient proliferation leads to a poor outcome.<sup>2</sup> Liver preconditioning is thus crucial to enhance the engraftment and/or the proliferation of donor cells.<sup>3</sup> The liver is the optimal site for hepatocytes transplantation.<sup>3,4</sup> Engraftment in the liver needs 3 steps: deposition in the hepatic sinusoids, migration into the space of Disse, and integration into the liver plates. Less than 30% of transplanted cells ultimately engraft in the recipient liver.<sup>5</sup>

Received 14 March 2015. Revision received 16 August 2015.

Accepted 10 September 2015.

<sup>1</sup> INSERM U972, Paul Brousse Hospital, Villejuif, France.

<sup>2</sup> UMR\_S 972, Faculté de Médecine Paris-Sud, Kremlin Bicêtre, France.

<sup>3</sup> DHU Hepatitov, Paul Brousse Hospital, Villejuif, France.

<sup>4</sup> Institut Biomédical Bicêtre IFR93, Bicêtre Hospital, Kremlin-Bicêtre, France.

This study was supported by INSERM U972. Guillaume Pourcher was supported by NRB (Nouvelles Recherches Biomédicales). Hoda El-Kehdy was supported by AJIAL Mutual Fund (Lebanon), INSERM U972, and Istvan Blazsek was supported by ICIQ.

The authors declare no funding or conflicts of interest.

G.P., H.E.-K., A.D.-K., and I.D. equally contributed to this article.

G.P., principal contribution to the acquisition, analysis, and interpretation of the data; and to the drafting of the article. H.E.-K., principal contribution to the acquisition, analysis, and interpretation of the data; and to the drafting of the article. F.K., substantial contribution to the acquisition, analysis, and interpretation of the data. M.-T.G.-P., contribution to the acquisition of data of the transplantation experiments. M.G., contribution to the acquisition of data of the transplantation

experiments. O.T., contribution to the imaging, analysis and interpretation of data of embolization experiments. I.B., contribution to analysis and interpretation of data of the microangiography experiments. H.A., statistical analysis and interpretation of data. A.D.-K., principal contribution to the conception and design, analysis and interpretation of data, final approval of the version to be published, and agreement to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the article are appropriately investigated and resolved. I.D., corresponding author and principal contributions to the conception and design, analysis and interpretation of data, final approval of the version to be published, and agreement to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the article are appropriately investigated and resolved.

Correspondence: Ibrahim Dagher or Guillaume Pourcher, Department of Abdominal and Minimally Invasive Surgery Antoine Bécère Hospital, APHP, Faculté de Médecine Paris-Sud 157, rue de la Porte de Trivaux, 92141 Clamart Cedex, France. (ibrahim.dagher@aphp.fr; guillaumepourcher@gmail.com).

Copyright © 2016 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

ISSN: 0041-1337/16/10002-344

DOI: 10.1097/TP.0000000000001024

The success of hepatocytes transplantation in many animal models has encouraged a shift toward clinical trials,<sup>6-11</sup> which have demonstrated the feasibility and relevance of this approach, together with good tolerance and safety.<sup>3,12</sup> However, many obstacles remain before the application of this technique for human diseases. The return to preclinical research and the development of new protocols for cell transplantation, gene therapy, and the preparation of the recipient liver are thus essential.

Experiments in animal models have shown that the engraftment of transplanted hepatocytes is improved by damaging endogenous liver cells or impairing their function to make “physiologic” space for transplanted cells and to induce a proliferative stimulus. Some approaches have been evaluated in small or large animals, such as the use of chemotherapeutic drugs,<sup>13-17</sup> partial hepatectomy,<sup>18</sup> portal ligation,<sup>5</sup> and partial portal embolization,<sup>19</sup> either in isolation or in combination with repeated cell transplantation and the administration of hepatic sinusoidal vasodilators.<sup>20,21</sup>

However, some efficient techniques (major hepatectomy, chemotherapeutic drugs) are not acceptable in clinical practice because they carry a high risk.<sup>22-24</sup> Segmental portal embolization currently seems to be the best solution in clinical practice to achieve good regeneration with acceptable risk.<sup>3,25</sup> However, only 30% of the total liver remains after partial embolization or partial hepatectomy<sup>25</sup>; thus, the remaining hepatic volume in which the transplanted hepatocytes may engraft is small.

Here, we developed a new approach that we call volumetric portal embolization (VPE). This method should induce a regenerative signal and preserve the total liver parenchyma for hepatocytes engraftment while remaining clinically acceptable. The principal procedure consists of a partial and random distal embolization of the presinusoidal vessels, which is performed in the whole portal vascular bed. This contrasts with proximal partial portal embolization, which completely occludes portal circulation in some anatomical segments of the liver.

We first aimed to define the appropriate size and quantity of polyester microspheres and the best injection conditions resulting in a homogeneous distal repartition without necrosis or major liver damage. We subsequently studied liver regeneration and hepatocytes engraftment *in vivo* in a mouse model of VPE.

## MATERIALS AND METHODS

### Animals

Four- to 8-week-old C57BL6 mice (male and female) were purchased from Janvier-Labs.com. Experimentation and breeding were performed at the Kremlin-Bicêtre animal facility. All protocols used for animal studies were approved by the French Ministry of Agriculture and ethical committee.

### Hepatectomy

A hepatectomy of approximately 70% was considered the gold standard to trigger liver regeneration as described previously.<sup>26-28</sup> The removed liver lobe was harvested and used as a control for further immune-histochemical analysis.

### Volumetric Portal Embolization

The goal of the method was to trigger liver regeneration without partial hepatectomy or liver damage and to preserve

the entire liver parenchyma for hepatocyte engraftment. Mice were anesthetized intraperitoneally with ketamine/xylazine. The skin of the right upper abdomen and flanks was sterilized, and as for partial hepatectomy, we first performed laparotomy. After exposition of the portal vessels, a 27 or 29 gauge (G) catheter needle (connected to a syringe) was used to puncture the portal vein. Embolization of the main portal vein was performed by injecting microspheres suspended in no more than 600  $\mu\text{L}$  of hydroxyethylamidon. The microspheres were colored, thus easily detectable on histological sections. The precisely calibrated, nonbiodegradable, polyester microspheres (EZ-TRAC) were purchased from IMT Laboratories (San Francisco, CA). Several microsphere sizes (10, 15, 30, 50, 100, and 200  $\mu\text{m}$  diameter) and quantities (from  $10^3$  to  $16 \times 10^6$ ) were tested (Table 1). The diameter of the smallest microsphere roughly corresponds to the size of a mouse hepatocyte and that of the largest microsphere corresponds to the larger diameter of presinusoidal veins.<sup>29,30</sup> Adult C57BL6 mice (25 g) have approximately 1000 hepatic lobules, which vary substantially in terms of the number and size of presinusoidal veins,<sup>29,31</sup> we thus used various quantities and size of microspheres to perform embolization.

We sought to determine optimal conditions to obtain the distal and homogeneous repartition of microspheres in the liver, which we refer to as volumetric partial portal embolization. For this purpose and for the analysis of the hepatic regeneration triggered by the VPE, mice were sacrificed 2 days later to evaluate liver regeneration as well as microsphere distribution. In the best VPE conditions, a group of 6 mice was observed at different time points with blood samples (albumin, bilirubin, alanine aminotransferase [ALT], aspartate aminotransferase [AST],  $\gamma$ -glutamyl transferase, and alkaline phosphatase) and histological analysis after euthanasia at day 2 for 3 mice and day 21 for the 3 other mice to assess the good tolerance of the procedure. Those mice were compared with 3 control mice (without VPE) for the blood samples and histological analysis.

### Colored Hydrogel Microangiography

A microangiography was performed to map the portal branches before, immediately after, and 5 days after VPE using colored alginate hydrogels. Briefly, after intraperitoneal anesthesia, the inferior vena cava was cut, and the whole liver was perfused with 0.9% NaCl to completely remove the blood. Alginate red (AlgRed/CdS) was injected into the right cardiac ventricle to visualize the arteries, and alginate blue (AlgBlue/Ferric ferrocyanide) was injected into the portal vein to visualize the veins. Embolization was performed in 6 mice (group 1) with  $8 \times 10^6$  microspheres of 10  $\mu\text{m}$  in diameter suspended in 0.3 mL 0.9% NaCl and mixed with 0.3 mL of 2% w/v AlgBlue in 0.9% NaCl. The hepatic artery was perfused with 1% AlgRed. In the control group of 6 mice (group 2), microspheres were omitted, and the liver was perfused with 0.6 mL 1% AlgBlue. The colored AlgRed and AlgBlue hydrogels were prepared, and the whole liver was fixed and processed as described previously.<sup>32</sup>

### Hepatocyte Isolation for Transplantation

Primary hepatocytes were isolated from control mice by collagenase perfusion of the whole liver. Briefly, the inferior vena cava was catheterized, the supra vena cava was clamped, and the portal vein was cut to facilitate the circulation of the

**TABLE 1.**

**Results for each condition of VPE: Number and size ( $\mu\text{m}$ ) of the microspheres injected, size of the needle (G), complications (death, necrosis, hemorrhage), percentage of microsphere lost in the injection tube, and the percentage of Ki67 staining**

| Six mice/group   |                        |                 | Percentage of microspheres lost | Hemorrhage | Necrosis (%)  | Death      | Ki67 (%) at D2   |
|------------------|------------------------|-----------------|---------------------------------|------------|---------------|------------|------------------|
| Microspheres     |                        |                 | Median (min-max)                | No. (%)    | Med (min-max) | No. (%)    | Median (min-max) |
| Number           | Size ( $\mu\text{m}$ ) | Needle (G)      |                                 |            |               |            |                  |
| $10^3$           | 200                    | 27              | 91 (89-96)                      | 2 (33)     | 0             | 0          | 4 (3.2-4.3)      |
|                  |                        | 100             | 61 (58-64)                      | 2 (33)     | 0             | 0          | 0 (0-0.1)        |
|                  |                        | 29              | 90 (81-92)                      | 0          | 0             | 0          | 0 (0-0.1)        |
| $4 \times 10^3$  | 100                    | 27              | 90 (84-91)                      | 2 (33)     | 0             | 0          | 1 (0-2)          |
|                  |                        | 29              | 13 (10-16)                      | 0          | 0             | 0          | 3 (2.3-3.2)      |
| $5 \times 10^4$  | 50                     | 27              | 44 (39-48)                      | 2 (33)     | 0             | 0          | 4 (4-4.2)        |
|                  |                        | 29              | 65 (60-65)                      | 0          | 0             | 0          | 4 (3.9-4.1)      |
| $10^5$           | 30                     | 27              | 5 (3-7)                         | 2 (33)     | 10 (8-13)     | 0          | 3 (2-3.2)        |
|                  |                        | 29              | 10 (0-12)                       | 0          | 0             | 0          | 3 (2-3.4)        |
|                  | 50                     | 27              | 70 (68-71)                      | 2 (33)     | 0             | 0          | 4 (3.5-4.3)      |
| $3 \times 10^5$  | 30                     | 27              | 80 (78-83)                      | 0          | 0             | 0          | 4 (3.9-4.1)      |
|                  |                        | 29              | 6 (4-7)                         | 2 (33)     | 11 (8-15)     | 0          | 4 (3.4-4.3)      |
|                  | 50                     | 27              | 15 (14-17)                      | 0          | 0             | 0          | 4 (3.9-4.1)      |
| $6 \times 10^5$  | 30                     | 27              | 85 (83-87)                      | 2 (33)     | 0             | 1 (17)     | 4 (3.8-5)        |
|                  |                        | 29              | 92 (90-95)                      | 0          | 0             | 0          | 3 (2.9-3.5)      |
|                  | 29                     | 19 (9-23)       | 3 (50)                          | 22 (18-25) | 2 (33)        | 5 (4.5-5)  |                  |
| $10^6$           | 30                     | 27              | 25 (22-27)                      | 1 (17)     | 15 (13-18)    | 1 (17)     | 3 (2.7-4)        |
|                  |                        | 29              | 71 (68-74)                      | 0          | 0             | 0          | 1 (0.1-1.2)      |
| $4 \times 10^6$  | 10                     | 27              | 0                               | 2 (33)     | 0             | 0          | 2 (1.2-2.2)      |
|                  |                        | 29              | 0                               | 0          | 0             | 0          | 2 (1-2)          |
|                  | 15                     | 27              | 0                               | 2 (33)     | 0             | 0          | 2 (1.3-3)        |
|                  |                        | 29              | 0                               | 0          | 0             | 0          | 2 (1.7-3)        |
|                  |                        | 29              | 0                               | 0          | 0             | 0          | 1 (0-1)          |
| $8 \times 10^6$  | 10                     | 27              | 0                               | 2 (33)     | 0             | 0          | 5 (4.5-6)        |
|                  |                        | 29 <sup>a</sup> | 0                               | 0          | 0             | 0          | 5 (4-5)          |
|                  | 15                     | 27              | 0                               | 2 (33)     | 0             | 0          | 4 (3.8-5)        |
|                  | 29                     | 0               | 0                               | 0          | 0             | 3 (2-3.2)  |                  |
| $10^7$           | 10                     | 29              | 0                               | 0          | 51 (45-55)    | 0          | 5 (4.9-5.3)      |
| $12 \times 10^6$ | 10                     | 27              | 0                               | 3 (50)     | 70 (66-74)    | 3 (50)     | 12 (11-15)       |
|                  |                        | 29              | 0                               | 2 (33)     | 72 (68-74)    | 0          | 11 (9-12)        |
|                  | 15                     | 27              | 0                               | 3 (50)     | 75 (69-78)    | 2 (33)     | 11 (9-15)        |
|                  |                        | 29              | 0                               | 2 (33)     | 70 (66-74)    | 0          | 10 (8-11)        |
| $14 \times 10^6$ | 10                     | 29              | 0                               | 3 (50)     | 76 (73-78)    | 2 (33)     | 17 (15-20)       |
|                  |                        | 29 <sup>b</sup> | 0                               | 4 (67)     | 82 (76-89)    | 3 (50)     | 20 (19-22)       |
| $16 \times 10^6$ | 10                     | 27              | 0                               | 4 (67)     | 82 (76-89)    | 3 (50)     | 20 (19-22)       |
|                  |                        | 29 <sup>b</sup> | 0                               | 16 (53)    | 82 (76-89)    | 23 (77)    | 19 (18-21)       |
|                  | 15                     | 27              | 0                               | 4 (67)     | 82 (78-86)    | 4 (67)     | 26 (25-26)       |
|                  | 29                     | 0               | 4 (67)                          | 81 (78-85) | 4 (67)        | 20 (19-21) |                  |
| Hepatectomy 70%  |                        |                 | 0                               | 1 (16.6)   | 0             | 0          | 19.5 (18-23)     |

<sup>a</sup> 49 mice in this group.

<sup>b</sup> 30 mice in this group.

infused liquid. After 2 successive washes with Hepes (2 mM KCl, 0.013 M fructose, 0.12 M NaCl, 2.8 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH = 7.65), the liver parenchyma was digested by a Hepes- $\text{Ca}^{2+}$  (Hepes supplemented with 10 mM  $\text{CaCl}_2$ ) collagenase IV solution (Sigma, 0.8 mg/mL). The perfusion rate was fixed at 4 mL/min. The liver was then transferred in plating medium containing Roswell Park Memorial Institute 1640 medium, penicillin, streptomycin, and 10% fetal bovine serum (Hyclone Laboratories, Logan, UT) to obtain hepatocytes by mechanical dissociation with a scalpel and a nipper. After filtration through a 40- $\mu\text{m}$  mesh filter and centrifugation (200g, 10 minutes), the viability of isolated cells was tested by Trypan blue dye exclusion and attachment of the

cells to tissue culture plastic in plating medium. Cells were transplanted only if viability was greater than 95%.

### Hepatocyte Labeling

#### Hoechst Labeling

Freshly isolated hepatocytes were immediately labeled with Hoechst fluorescent dye in a serum-free plating medium (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Ham F12) containing 50  $\mu\text{g}/10^7$  cells in 1 mL of Hoechst. After 30 minutes of incubation at 37°C, the reaction was stopped by adding plating medium supplemented with 10% fetal bovine serum. Before transplantation, hepatocytes were washed 3 times in the plating medium and counted with a hemocytometer.

### 3,3',3''tetramethylindotricarbocynine iodide (XenoLight-DiR from PerkinElmer) Labeling

XenoLight-DiR is a lipophilic, near-infrared fluorescent cyanine dye that inserts into the cell membrane, resulting in specific and stable cell staining with negligible dye transfer between cells.<sup>33</sup>

A total of  $5 \times 10^6$  freshly isolated hepatocytes were immediately labeled with 320  $\mu\text{g}/\text{mL}$  XenoLight-DiR according to the manufacturer's protocol. Cells were incubated for 30 minutes at 37°C and spun down for 3 minutes at 1000 rpm at 4°C. Before transplantation, hepatocytes were washed 3 times in  $1 \times$  phosphate-buffered saline (PBS) and counted with a hemocytometer.

Three mice were sacrificed at day 5 after different tests: mouse 1 received a transplant but was not embolized, control mouse was not embolized and did not receive a transplant, and mouse 3 was both embolized and transplanted with labeled cells.

On each mouse, cell tracking was performed both in vivo and post mortem in the lung, spleen, and liver using a 3CCD Digital Camera (PDE Photo Dynamic Eye C9830; Hamamatsu Photonics K.K., Japan).

### Transplantation

Two groups of mice were compared. The first group underwent VPE in optimal conditions, whereas for the second group, only physiological saline was injected. Immediately after, both groups of mice were transplanted with 1, 2, or  $4 \times 10^6$  labeled (XenoLight-DiR + Hoechst or only Hoechst) hepatocytes, from the same batch of cells, suspended in 100  $\mu\text{L}$  of physiological saline. Hepatocytes were injected with a 29 G needle into the spleen. Moreover, the spleen injection corresponds to a safe and efficient site to transplant hepatocytes.<sup>34-36</sup> We analyzed the percentage of marked cells (MARCEL) at day (D)5 in the liver parenchyma comparing the transplanted Hoechst-marked cell number (TRACEL) at day of surgery (D0) in 3 conditions of transplantation:  $10^6$  ( $n = 7$ ),  $2 \times 10^6$  ( $n = 2$ ) or  $4 \times 10^6$  ( $n = 3$ ) cells.

### Morphometric Analysis

Liver sections of 5- $\mu\text{m}$  thickness were prepared from each of the liver lobes of all animals. The number of engrafted hepatocytes per unit of liver volume was determined as described previously.<sup>20</sup> The number of engrafted cells was evaluated under a microscope by counting Hoechst-labeled hepatocytes in 50 consecutive portal areas. The number of engrafted cells in clusters of various sizes was also documented. This analysis included single cells or those arranged in clusters of 2 to greater than 20 cells each. A minimum of 100 high-power fields ( $\times 400$ ) of tissue from each animal were analyzed. After VPE as described above, DiR-labeled hepatocytes isolated from syngeneic mice, were transplanted through the spleen of C57Bl6 mice. Control groups either received a transplant in parallel with the same batch of isolated hepatocytes without embolization or received only a saline injection in both the portal vein and spleen.

### Tissue Analysis

Chemicals and reagents were purchased from Sigma unless otherwise specified. Liver samples were frozen in Tissue-Tek CRYO-OCT Compound (Miles Inc., Elkhart, IN) in cryomolds with liquid nitrogen, and 5- $\mu\text{m}$  cryostat sections were prepared.

Tissue sections were counterstained with hematoxylin-eosin. Additional markers were detected by histochemical methods as described below.

### Immunohistochemistry of The Regeneration Marker Ki-67

Five-micron liver tissue sections were fixed for 15 minutes in 3.7% formaldehyde. Endogenous peroxidase activity was blocked by incubating the tissue slices for 15 minutes in 3% hydrogen peroxide solution. Tissues were permeabilized with 2 successive 5-min baths of 0.025% Triton X-100. The samples were then incubated for 2 hours in 3% PBS/bovine serum albumin to prevent nonspecific immunostaining. Slides were incubated overnight with monoclonal anti-mouse Ki-67 (1:100; Abcam, Cambridge, MA) in  $1 \times$  PBS. Staining was visualized with a Dako antirabbit antibody (1:500; MILLIPORE, Billerica, MA) followed by incubation with diaminobenzidine chromogenic substrate. The nuclei were counterstained with pure Mayer hematoxylin for 2 minutes. Immunohistochemistry was performed on liver from animals sacrificed 48 hours after hepatectomy and embolization, which corresponds to the peak of regeneration in C57Bl6 mice.<sup>37,38</sup> Ki67-positive nuclei were enumerated for each sample, at a magnification of  $20 \times$ , 15 fields per section, 20 sections per hepatic lobe, cut each 50 microns. Blood vessels were excluded from the analysis. The percentage of proliferating hepatocytes was calculated by the ratio of Ki67-positive nuclei per total hematoxylin stained nuclei, excluding nuclei less than 12  $\mu\text{m}$  in diameter.

### Statistical Analysis

Categorical variables were described by frequencies and percentages. Their distribution was compared between 2 groups with the  $\chi^2$  or Fisher exact tests. Continuous variables were described by frequencies, median, and extremes. Their distribution was compared between 2 groups with the Student *t* test, and if necessary, the nonparametric Wilcoxon test. Correlations were studied with the Spearman coefficient.

Results were considered significant if *P* is less than 0.05. Data were analyzed with SAS 9.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC).

## RESULTS

### Defining Conditions of VPE

We wanted to define the parameters of volumetric partial embolization that induce liver regeneration without tissue damage. A total of 350 mice (age range, 4-8 weeks; weight, 20-30 g) were analyzed including 112 women and 238 men. The sex ratio was equivalent in the different experimental groups, except for the control group that underwent 70% partial hepatectomy, in which 50% were females.

The first parameter to determine was the infusion rate. We used  $1 \times 10^6$  microspheres of 10  $\mu\text{m}$  in diameter that were infused at a rate of either 20  $\mu\text{L}/\text{s}$  or 3.3  $\mu\text{L}/\text{s}$  (3 mice per group). An infusion rate of 20  $\mu\text{L}/\text{s}$  led to the segmental repartition of microspheres, whereas a rate of 3.3  $\mu\text{L}/\text{s}$  led to the distal and homogeneous distribution of microspheres, as determined by histological analysis, corresponding to volumetric repartition (not shown). All subsequent injections were thus performed at the low 3.3  $\mu\text{L}/\text{s}$  flow rate.

The second parameter to determine was the size and quantity of microspheres used. Many conditions were tested with

various sizes and numbers of microspheres on at least 6 mice for each condition.

Table 1 summarizes the different conditions used for VPE and the resulting outcomes, including the effect on liver regeneration measured by Ki67 index at D2 after the embolization.

We initially used a 29G needle (325  $\mu\text{m}$  diameter) to puncture the portal vein. However, many microspheres with a diameter greater than 30  $\mu\text{m}$  were lost in the manifold and syringe, which prevented precise control over the number of injected beads. Furthermore, microsphere loss increased in proportion with the number of microspheres injected. We subsequently tested 27G needles (400  $\mu\text{m}$  diameter). Injections resulted in hemorrhages in one third of mice because the mouse portal vein is very thin. Nonetheless, the bleeding could be stopped by simple compression and did not affect survival.

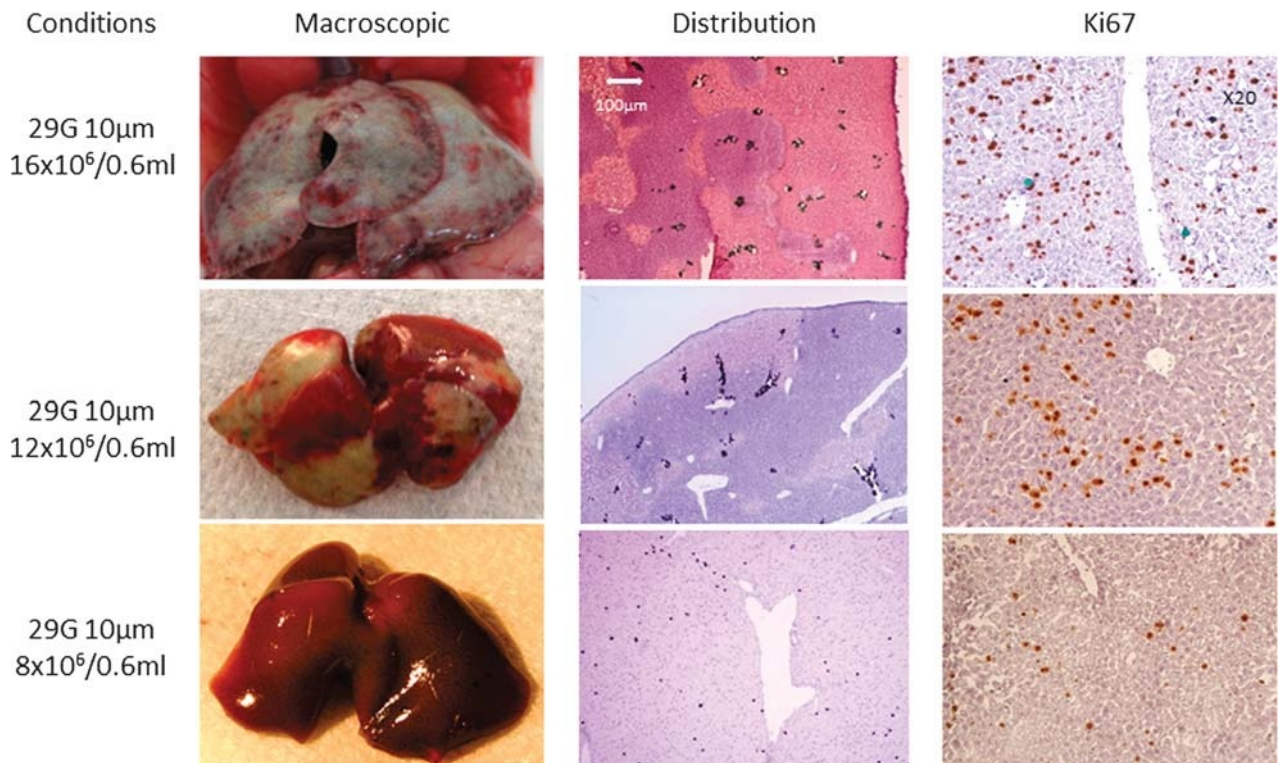
None of the 10- or 15- $\mu\text{m}$  diameter microspheres were lost in the infusion syringe, regardless of the quantity injected. These conditions resulted in the homogeneous distribution of the beads. The injection of  $10 \times 10^6$  or greater of these microspheres resulted in hemorrhages that were associated with necrosis of 50% to 80% of the liver, eventually resulting in death (Table 1, Figure 1).

The optimal distribution of the microspheres in the mouse liver without negative outcomes was obtained with the injection of 4 to  $10 \times 10^6$ , 10- to 15- $\mu\text{m}$  diameter microspheres through a 29G needle at an infusion rate of 3.3  $\mu\text{L/s}$ . Concerning induction of regeneration, we chose two third partial hepatectomy as control because that is the method of reference to trigger liver regeneration. In this group, we observed

a median of 19.5% (range, 18-23%) of Ki67-positive nuclei in the remaining liver (30%) without adverse effects (no complications or death), except for hemorrhage in 1 mouse.

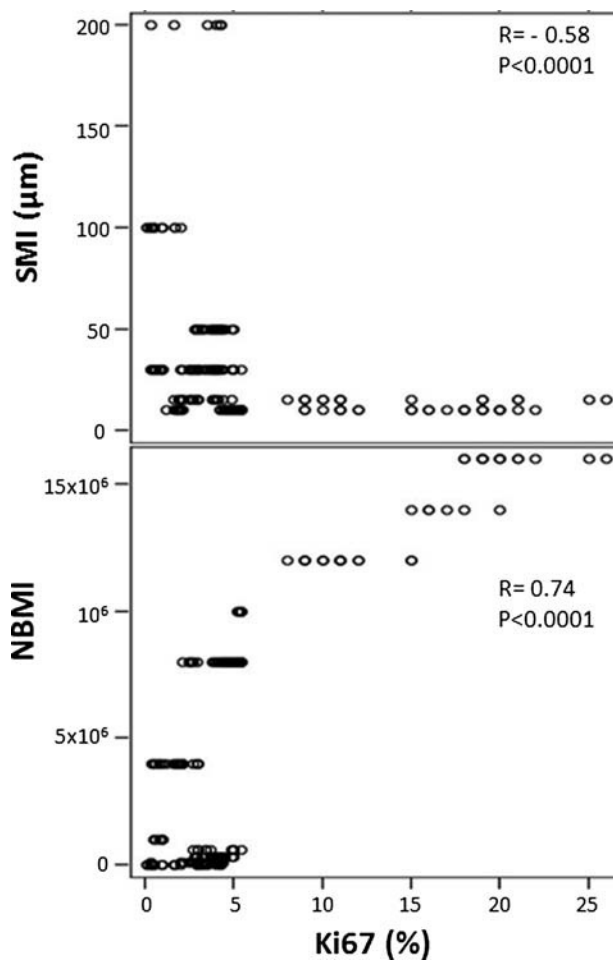
Figure 2 represents the percentage of Ki67-positive cells at D2 after embolization, depending on either the size of the microspheres (upper panel) or the number of microspheres injected (lower panel). Regeneration appeared negatively correlated ( $R = -0.58$ ;  $P < 0.0001$ ) with the size of the microspheres and positively correlated with their number ( $R = 0.74$ ;  $P < 0.0001$ ).

Thus, combining microsphere distribution, adverse effects, and regenerative signal resulting from the VPE, the best condition was the injection of  $8 \times 10^6$ , 10- $\mu\text{m}$  microspheres through a 29G needle at an infusion rate of 3.3  $\mu\text{L/s}$ , which gave rise to a median regenerative rate of 4.9% (4-5) of total liver with random distribution of Ki67-positive cells and no adverse effects. In the experiment to evaluate the hepatic effect of VPE for best condition for the long term, we realized blood samples and histological analysis at day 2 and day 21 to assess the good tolerance of the procedure for the embolized mice. We observed on liver tests an increase of ALT (5 times more than the control group) and AST (4 times more than the control group) and no significant differences for the other liver tests at day 2 after VPE compared with the control. At day 21, hepatic cytolysis persisted with lower rate for AST and ALT with 2 times more than the control group. Histologic analysis shows no differences without inflammation signs for the VPE mice except the presence of colored microspheres in the embolized liver. Of note, the 3 mice, which were kept alive until day 21 after VPE, did not exhibit any complication or abnormality.



**FIGURE 1.** Histological and macroscopic analyses at D2 after VPE using 29G needle and 10- $\mu\text{m}$  microspheres. Three conditions are shown, corresponding to the injection of: 8, 12, or  $16 \times 10^6$  microspheres in 0.6 mL. Pictures in the columns show the macroscopic aspect of the liver (left), the distribution of the colored microspheres (middle), and the result of Ki67 immunolabeling in the liver parenchyma (right).





**FIGURE 2.** Results of Ki67 expression (liver regeneration) after VPE at D2. The graphs represent the percentage of Ki67<sup>+</sup> cells in the liver parenchyma (%) depending on the size (SMI, upper panel) and number (NBMI, lower panel) of microspheres injected. Each point represents 1 mouse, and the correlation was analyzed with Spearman coefficients. NBMI indicates number of microspheres injected; SMI, size of the microspheres.

### Angiography After VPE Using The Optimal Defined Conditions

To visualize and estimate the embolized territory, elicited by VPE, we analyzed the portal flow by colored alginate microangiography immediately (D0), and 5 days (D5) after VPE or physiological serum injection. In the liver after VPE by a mixture of 8 million of 10- $\mu$ m microspheres, at D0 after forward AlgBlue perfusion via the portal vein and AlgRed arterial cardiac perfusion, we show a global blockage of the venous flow with moderate venous dilatation, revealing the cleared, distally not perfused zone (Figure 3A). In the same conditions, control mice identified the robust venous and minor arterial vasculature, respectively, with all liver colorations (Figure 3B). This intralobular “fractal surface landscape” is designed by venous embolization starting where the distal portal vessel diameter decreased to  $\leq 15 \mu\text{m}$ . Five days after VPE, the 2-color angiography revealed normalization of the main venous circulation supported by the portal vein (AlgBlue) and drained by the inferior vena cava (AlgRed). We observed a homogeneous diffusion in the control liver like D0 (Figure 4B), but less dense irrigation of AlgBlue in the whole liver parenchyma with a spotted aspect in group VPE

(Figure 4A), whereas the aspect of AlgRed (vena cava) in VPE group was more visible in embolized sites (Figure 4C).

This experiment thus confirmed the successful completion of VPE, with distal, partial, and random occlusions of presinusoidal portal veins.

### Transplantation After Volumetric Embolization

Four mice were transplanted with double-labeled hepatocytes (XenoLight-DiR + Hoechst) isolated from syngeneic C57Bl6 mice, 2 mice in each group (VPE and control) to enable both in vivo and histological analyses. During this infusion, labeled cells were detected by the photo dynamic eye camera, first in the syringe, then in the spleen and finally reaching the liver 20 to 30 seconds later (Figure 5). In vivo fluorescence analysis at D5 revealed a strong fluorescence signal in mice embolized, whereas the fluorescence signal was barely visible for the transplanted but not embolized mice or absent in control mice (Figure 6A). We performed again fluorescence measurement post mortem on freshly isolated organs to obtain a better quality signal (Figure 6B). The fluorescence signal in the liver was stronger in mice embolized before transplantation than in those that were not embolized before transplantation. Spleens from recipient mice exhibited only a localized signal, which probably corresponded to the injection point. Fluorescence signal was not detected in the lungs of all mice and in the spleen of mice that did not receive transplanted hepatocytes.

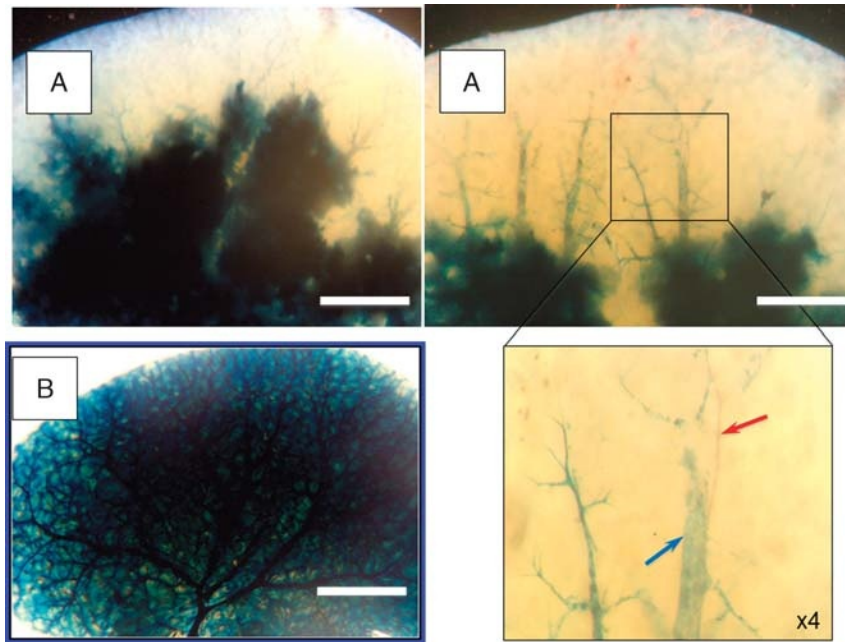
Twenty-seven mice were transplanted with hepatocytes labeled using Hoechst only, 17 with VPE and 8 controls. No death or hemorrhage occurred during the procedures. Histological analysis of the liver at D5 allowed detection of clusters of Hoechst-labeled hepatocytes (Figure 7A) that have engrafted in the liver parenchyma. The median percentage and (range) of engraftment was 3% (2.5-3.2%) in the mice subjected to VPE in optimal conditions ( $n = 14$ ), whereas it was only 0.65% (0.2-0.9%) in the control group ( $n = 8$ ) that received an intraportal injection of hydroxyethylamidon (Figure 7B), and this difference is highly significant ( $P < 0.0001$ ).

Interestingly, the percentage of MARCEL at D5 in the liver parenchyma compared with the TRACEL at D0 in the 3 conditions of transplantation show that increasing the TRACEL did not induce complications and led to an increase of MARCEL with positive correlation ( $R = 0.67$ ;  $P < 0.0001$ ) (Figure 7C).

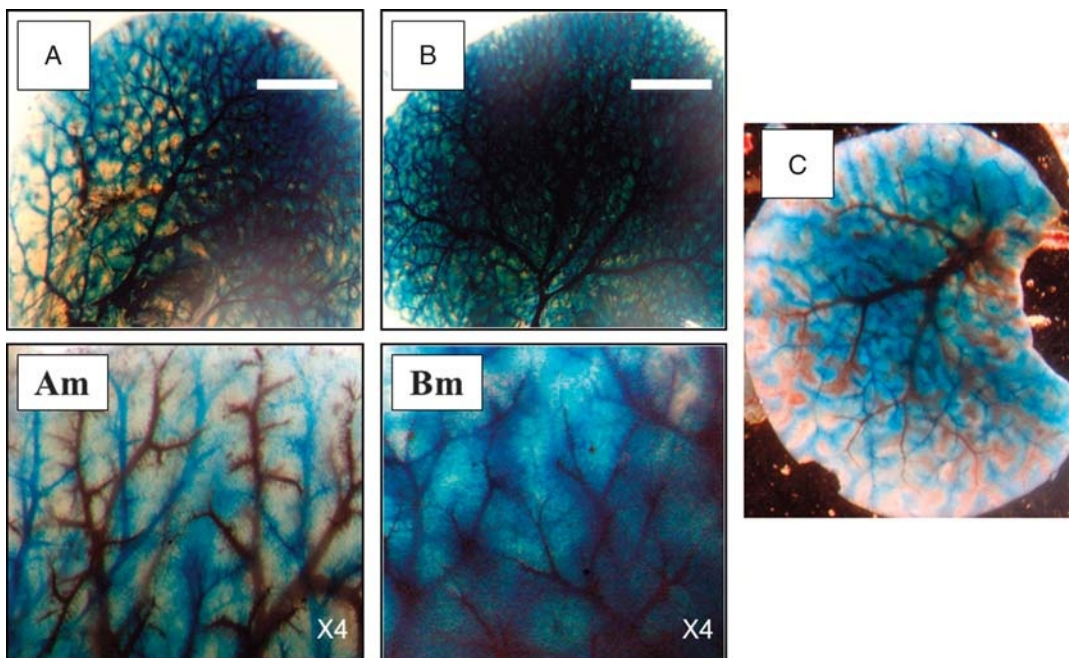
### DISCUSSION

Here, we aimed to develop a method for achieving the new concept of VPE. We reasoned that the random occlusion of part of small distal portal veins upstream from the sinusoid could trigger a regenerative signal and create physiological space for transplanted hepatocytes, as occurs in anatomical portal embolization. This “volumetric” portal embolization would induce the regenerative signal required for efficient hepatocyte engraftment while preserving the anatomy of proximal portal vessels and the volume of the whole organ for the engraftment of transplanted cells.

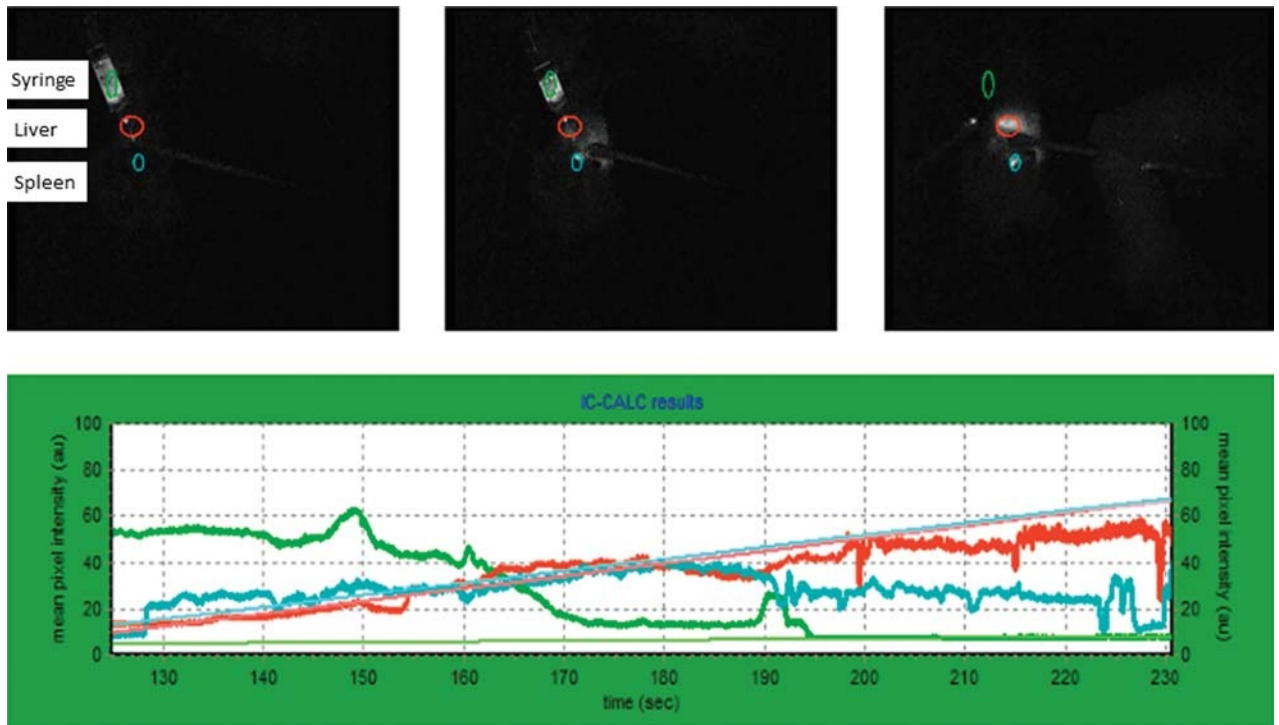
To achieve such a VPE, we chose to use calibrated inert polyester microspheres to limit inflammation in the tissue,<sup>39</sup> which could otherwise lead to engraftment failure.<sup>3</sup> First, we had to determine the correct size of microspheres to obstruct presinusoidal vessels but not the proximal portal vein. Thus, we tested spheres ranging from 10 to 200  $\mu\text{m}$  in diameter, which correspond to variation in the diameter of



**FIGURE 3.** Colored alginate microangiography of control and regenerating liver after VPE at D0. All liver lobes were perfused with PBS, then with blue alginate hydrogel via the portal vein, and with red alginate hydrogel perfusion via the left ventricle to identifies thinner arteries and arterioles. A, A VPE liver with 8 millions of 10- $\mu$ m microspheres (D0) and reveals a net embolization of the centrolobular venous system, stop of the blue alginate leaving the distal zone of lobules empty. By a magnification of the VPE liver image, we can see the distal stop of the embolization and venous distention (blue arrow) colored in blue, without embolization of the arteriole (red arrow) colored in red by alginate. In comparison, panel B shows the fractal arborization of robust venous vasculature in a nonembolized liver control, without any stop at D0. Note, that image acquisition of colored alginate tracked blood vessels was taken after tissue-clearing the whole liver lobes. Scale bars represent 2 mm.



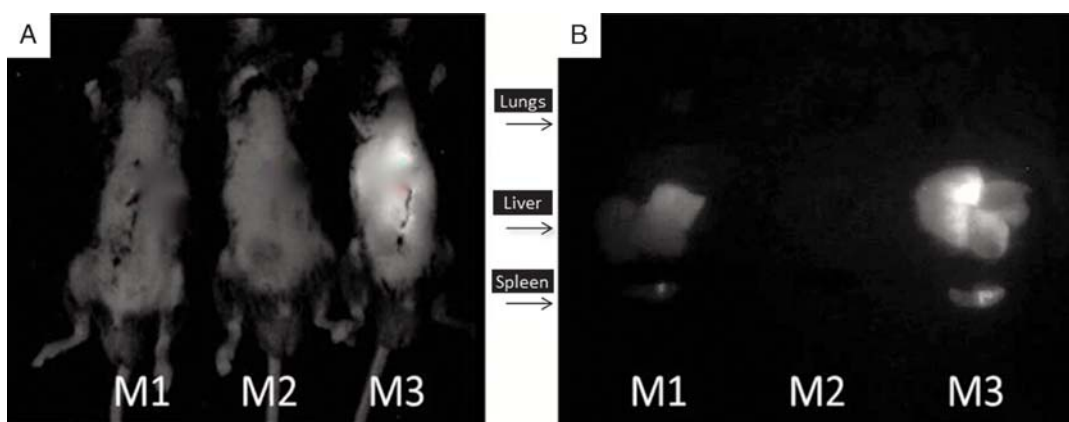
**FIGURE 4.** Colored alginate microangiography of control and regenerating liver following VPE at D5. Five days after portal injection (D5) of microspheres or physiologic serum injection, a 2-color angiography (blue alginate for portal vessels and red alginate for arterial and sus-hepatic vessels) were realized. This angiography reveals the persistence of distal, mainly avascular zone in VPE liver (A). For the control group (B), we show a higher density of blue alginate in the total liver. With magnification (Am, Bm) of the 2 pictures, we confirm those results, and it shows more precisely for VPE liver (Am) in blue the portal vessels and in dark red the sus-hepatic vessels (Am). B, The perfect diffusion of blue alginate in portal vessels gives a blue color domination (B, Bm). C, We show a VPE liver segment at D5 where the release lobules (without blue alginate) from the embolization was colored in red due to efflux through the inferior vena cava as is highlighted. Note, that image acquisition of colored alginate tracked blood vessels was taken after tissue clearing the whole liver lobes. Scale bars represent 2 mm.



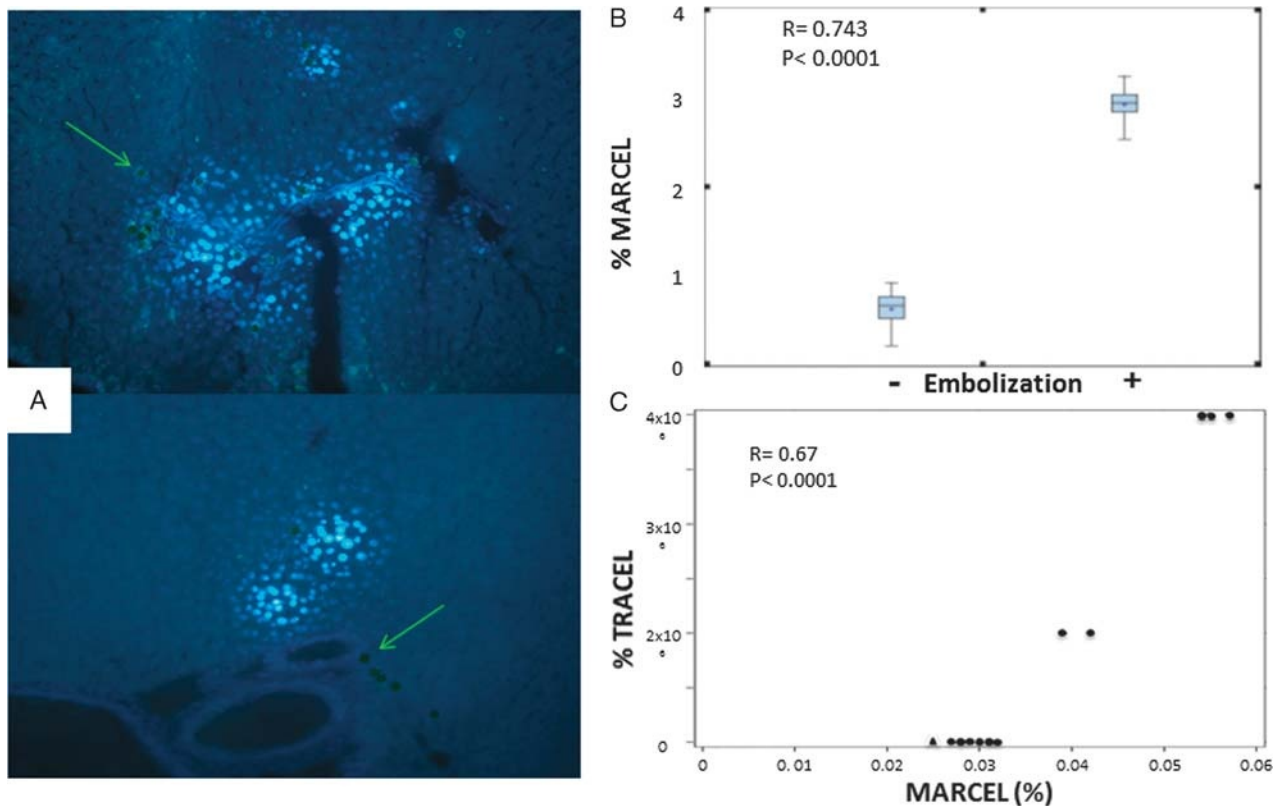
**FIGURE 5.** Quantification of XenoLight-DiR signal in vivo at D0 during the injection of labeled hepatocytes into the spleen for the engraftment of mouse liver after VPE XenoLight DiR signal was quantified with a photo dynamic eye (Hamamatsu Photonics K.K.) camera and VPE was performed in optimal conditions. Green, blue and red lines correspond to signals from cells in the syringe, the spleen and the liver, respectively.

presinusoidal hepatic vessels.<sup>40,41</sup> The suspension volume was limited to 0.6 mL because the circulating blood volume of C57BL6 adult mice is around 1.5 mL.<sup>10,42</sup> Needles of 27G and 29G were used for portal injection to limit both the loss of microspheres in the needle or upstream in the catheter and the hemorrhagic risk due to the puncture of the thin mouse portal vein. We then verified the homogeneous repartition of the microspheres in total liver by histological and vascular analyses. We subsequently compared results of this new method of VPE for inducing liver regeneration with 70% hepatectomy, which is the gold standard method.<sup>24,27</sup> The development of this new liver regeneration stimulation process required numerous animals for setting up the conditions, and the read out necessity for euthanasia. The mouse

model was thus the easiest and the most attainable to establish the proof of principle. Of course, given the limitations of the mouse model and based on the present results, we want to switch to a larger animal model, like pigs, for the future. It has been indeed shown in several animal models that the regeneration peak after hepatectomy or embolization was early.<sup>43,44</sup> To demonstrate liver regeneration, we evidenced the expression of Ki67 antigen in the liver by immunohistochemistry technique because this cell proliferation marker has been extensively used to demonstrate that liver regeneration peak is at 48 hours in the mouse model<sup>45-48</sup> Ki67 labeling after VPE was both positively correlated with the number of microspheres used for embolization and negatively correlated with the diameter of the microspheres. However, this



**FIGURE 6.** Quantification of XenoLight DiR with a PDE camera at D5 mouse 1 (M1) received a transplant but was not embolized; control mouse (M2) was not embolized and did not receive a transplant; and mouse 3 (M3) was embolized and received a transplant. The in vivo analysis of whole animals was shown in panel A. The post mortem analysis of the spleen, lung and liver of the same mice are shown in panel B. PDE indicates photo dynamic eye.



**FIGURE 7.** Analyses of labeled hepatocyte after transplantation. A, Clusters of Hoechst-labeled hepatocytes in the liver parenchyma near a portal space at D5 preceded by VPE in optimal conditions and splenic injection of  $10^6$  transplanted cells (TRACEL) at D0. B, Percentage of marked cells (MARCEL) found in the liver parenchyma at D5 with significant Spearman coefficient for: +: Mice subjected to VPE in optimal conditions. -: Nonembolized mice injected with physiological serum in the portal vein. C, Percentage of MARCEL found at D5 according to the number of TRACEL at D0 for embolized mice show positive correlation with Spearman coefficient.

finding requires confirmation in another animal model with larger portal vessels. Nonetheless, the diameter of sinusoid vessels is similar in C57Bl6 mice and humans.<sup>40,41</sup> We identified macroscopic and histological liver necrosis at D2 in animals injected with the highest numbers of microspheres ( $10$  to  $16 \times 10^6$ ). The percentage of liver tissue undergoing necrosis was positively correlated with the quantity of  $10\text{-}\mu\text{m}$  microspheres injected and reached 50% for  $10^7/0.6\text{ mL}$  and 80% for  $16 \times 10^6/0.6\text{ mL}$ . Necrosis was associated with a high rate of mortality in embolized mice, which reached 70% for the highest quantity of microspheres ( $16 \times 10^6$ ). Death was probably caused by a major (>80%) obstruction of many sinusoid vessels, leading to acute liver failure.<sup>27</sup>

The best conditions, which resulted in the regeneration of 5% of total liver, were  $8 \times 10^6$   $10\text{-}\mu\text{m}$  microspheres infused with a 29G needle directly into the portal trunk at  $3.3\text{ }\mu\text{L/s}$ . Of note, the 3 mice which were kept alive until day 21 after VPE in the best conditions did not exhibit any complication or abnormality. The biologic cytolysis shown at day 2 and day 21 was moderate and directly due to the portal embolization because it was analyzed in clinical practice or animal models,<sup>49,50</sup> and it decreased at D21 and did not have clinical or histological consequences in our experience. These conditions were used in all subsequent experiments.

Hepatocytes engraftment in the liver was analyzed 5 days after injection through the spleen. On the one hand, this delay is necessary because integration of hepatocytes in the liver parenchyma requires up to 5 days.<sup>12</sup> On the other hand, we could not delay this analysis according to Hoechst because

cell marking decreases after D5 and becomes unreliable due to cell division and diffusion.<sup>51,52</sup>

In these conditions, engraftment subsequent to VPE was 3 times more efficient than hepatocytes transplantation alone, demonstrating the interest of VPE in liver cell therapy approaches. We confirmed this improvement by *in vivo* and histological analyses with 2 fluorescent cell markers (XenoLight-DiR and Hoechst, respectively). Markers enabling the analysis of transplanted cells *in vivo* may be useful to assess further the quality of the transplantation.<sup>33</sup> The VPE preserves the total volume of the liver. This important factor is likely to improve cell engraftment because it enables more cells to be transplanted. Furthermore, this approach preserves the maximum number of hepatic vessels, which play an important role in normal liver regeneration<sup>42,53,54</sup> and might decrease portal hypertension after cell transplantation.

Clinical trials have already demonstrated the safety of hepatocyte transplantation, and patients who have undergone hepatocyte transplantation showed the absence of adverse effects and some clinical improvement and/or partial correction of the underlying metabolic defect.<sup>18,24,37</sup>

This therapeutic option will be available for patients with liver failure<sup>33,55</sup> because our method of preparation avoids injuring or removing liver segments.

Finally, our results show that the preservation of proximal portal vessels and whole liver volume enables an increase in the number of transplanted cells, which increases the efficiency of engraftment. Thus, our approach constitutes an important step toward setting up a clinically applicable

technique for liver conditioning to improve the subsequent engraftment of transplanted hepatocytes.

In conclusion, this work demonstrates that VPE, a new minimally invasive technique, is an efficient method to prepare the liver for cell transplantation. However, preclinical studies on larger animals are needed to optimize this method and determine the best conditions for its clinical use.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Arnaud POUILLY (PULSION Medical Systems AG) for the loan of the camera and technical assistance. The authors also thank Nathalie BA (Institut Biomédical Bicêtre IFR93) for technical assistance in the histological analyses.

## REFERENCES

- Dhawan A, Mistry RR, Hughes RD. Hepatocyte transplantation for metabolic disorders, experience at King's College hospital and review of literature. *Acta Gastroenterol Belg*. 2005;68:457–460.
- Weber A, Mahieu-Caputo D, Hadchouel M, Franco D. Hepatocyte transplantation: studies in preclinical models. *J Inher Metab Dis*. 2006;29:436–441.
- Puppi J, Strom SC, Hughes RD, et al. Improving the techniques for human hepatocyte transplantation: report from a consensus meeting in London. *Cell Transplant*. 2012;21:1–10.
- Gupta S, Chowdhary JR. Hepatocyte transplantation: back to the future. *Hepatology*. 1992;15:156–162.
- Gupta S, Gorla GR, Irani AN. Hepatocyte transplantation: emerging insights into mechanisms of liver repopulation and their relevance to potential therapies. *J Hepatol*. 1999;30:162–170.
- Dhawan A, Mistry RR, Hughes RD, et al. Hepatocyte transplantation for inherited factor VII deficiency. *Transplantation*. 2004;78:1812–1814.
- Dutkowski P, De Rougemont O, Mullhaupt B, Clavien PA. Current and future trends in liver transplantation in Europe. *Gastroenterology*. 2010;138:802–809.
- Fox IJ, Chowdhury JR, Kaufman SS, et al. Treatment of the Crigler-Najjar syndrome type I with hepatocyte transplantation. *N Engl J Med*. 1998;338:1422–1426.
- Sokal EM, Smets F, Bourgeois A, et al. Hepatocyte transplantation in a 4-year-old girl with peroxisomal biogenesis disease: technique, safety, and metabolic follow-up. *Transplantation*. 2003;76:735–738.
- Grossman HJ, Grossman VL, Bhattal PS. Hemodynamic characteristics of the intrahepatic portal vascular bed over an extended flow range: a study in the isolated perfused rat liver. *Hepatology*. 1995;21:162–168.
- Kamimura R, Ishii T, Sasaki N, et al. Comparative study of transplantation of hepatocytes at various differentiation stages into mice with lethal liver damage. *Cell Transplant*. 2012;21:2351–2362.
- Hansel MC, Gramignoli R, Skvorak KJ, et al. The history and use of human hepatocytes for the treatment of liver diseases: the first 100 patients. *Curr Protoc Toxicol*. 2014;62:11–14.
- Benten D, Kumaran V, Joseph B, et al. Hepatocyte transplantation activates hepatic stellate cells with beneficial modulation of cell engraftment in the rat. *Hepatology*. 2005;42:1072–1081.
- Enami Y, Bandi S, Kapoor S, et al. Hepatic stellate cells promote hepatocyte engraftment in rat liver after prostaglandin-endoperoxide synthase inhibition. *Gastroenterology*. 2009;136:2356–2364.
- Kim KS, Joseph B, Inada M, Gupta S. Regulation of hepatocyte engraftment and proliferation after cytotoxic drug-induced perturbation of the rat liver. *Transplantation*. 2005;80:653–659.
- Gagandeep S, Sokhi R, Slehra S, et al. Hepatocyte transplantation improves survival in mice with liver toxicity induced by hepatic overexpression of Mad1 transcription factor. *Mol Ther*. 2000;1:358–365.
- Bahde R, Kapoor S, Bandi S, et al. Directly acting drugs prostacyclin or nitroglycerine and endothelin receptor blocker bosentan improve cell engraftment in rodent liver. *Hepatology*. 2013;57:320–330.
- Fitzpatrick E, Mistry RR, Dhawan A. Human hepatocyte transplantation: state of the art. *J Intern Med*. 2009;266:339–357.
- Dagher I, Nguyen TH, Groyer-Picard MT, et al. Efficient hepatocyte engraftment and long-term transgene expression after reversible portal embolization in nonhuman primates. *Hepatology*. 2009;49:950–959.
- Rajvanshi P, Kerr A, Bhargava KK, et al. Efficacy and safety of repeated hepatocyte transplantation for significant liver repopulation in rodents. *Gastroenterology*. 1996;111:1092–1102.
- Boudechiche L, Tranchart H, Branchereau S, et al. Improvement of hepatocyte transplantation efficiency in the mdr2<sup>-/-</sup> mouse model by glyceryl trinitrate. *Transplantation*. 2014.
- Dutkowski P, Clavien PA. Solutions to shortage of liver grafts for transplantation. *Br J Surg*. 2014;101:739–741.
- Rickenbacher A, DeOliveira ML, Tian Y, et al. Arguments against toxic effects of chemotherapy on liver injury and regeneration in an experimental model of partial hepatectomy. *Liver Int*. 2011;31:313–321.
- Wan Z, Zhang XG, Liu ZW, Lv Y. Therapeutic liver repopulation for metabolic liver diseases: advances from bench to bedside. *Hepatol Res*. 2013;43:122–130.
- Dagher I, Boudechiche L, Branger J, et al. Efficient hepatocyte engraftment in a nonhuman primate model after partial portal vein embolization. *Transplantation*. 2006;82:1067–1073.
- Zweifel M, Breu K, Matozan K, et al. Restoration of hepatic mast cells and expression of a different mast cell protease phenotype in regenerating rat liver after 70%-hepatectomy. *Immunol Cell Biol*. 2005;83:587–595.
- Lehmann K, Tschuor C, Rickenbacher A, et al. Liver failure after extended hepatectomy in mice is mediated by a p21-dependent barrier to liver regeneration. *Gastroenterology*. 2012;143:1609–1619.
- Michalopoulos GK. Liver regeneration after partial hepatectomy: critical analysis of mechanistic dilemmas. *Am J Pathol*. 2010;176:2–13.
- Morikawa H, Hachiya K, Mizuhara H, et al. Sublobular veins as the main site of lymphocyte adhesion/transmigration and adhesion molecule expression in the porto-sinusoidal-hepatic venous system during concanavalin A-induced hepatitis in mice. *Hepatology*. 2000;31:83–94.
- Oikawa H, Masuda T, Sato S, et al. Changes in lymph vessels and portal veins in the portal tract of patients with idiopathic portal hypertension: a morphometric study. *Hepatology*. 1998;27:1607–1610.
- LaRue AC, Mironov VA, Argraves WS, et al. Patterning of embryonic blood vessels. *Dev Dyn*. 2003;228:21–29.
- Blazsek I, Clay D, Leclerc P, et al. Purification and processing of blood-forming tissue units, the haematoms, in searching for mammalian stem cell niches. In protocol exchange. Nature .com Nature .com 2013.
- Kalchenko V, Shvitiel S, Malina V, et al. Use of lipophilic near-infrared dye in whole-body optical imaging of hematopoietic cell homing. *J Biomed Opt*. 2006;11:050507.
- Gabelein G, Nussler AK, Morgott F, et al. Intrasplenic or subperitoneal hepatocyte transplantation to increase survival after surgically induced hepatic failure? *Eur Surg Res*. 2008;41:253–259.
- Puppi J, Dhawan A. Human hepatocyte transplantation overview. *Methods Mol Biol*. 2009;481:1–16.
- Gupta S, Yerneni PR, Vemuru RP, et al. Studies on the safety of intrasplenic hepatocyte transplantation: relevance to ex vivo gene therapy and liver repopulation in acute hepatic failure. *Hum Gene Ther*. 1993;4:249–257.
- 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.
- Kurniali PC, O'Gara K, Wang X, et al. The effects of sorafenib on liver regeneration in a model of partial hepatectomy. *J Surg Res*. 2012;178:242–247.
- Van de Casteele M, Sagesser H, Zimmermann H, Reichen J. Characterisation of portal hypertension models by microspheres in anaesthetised rats: a comparison of liver flow. *Pharmacol Ther*. 2001;90:35–43.
- Hammad S, Hoehme S, Friebel A, et al. Protocols for staining of bile canaliculi and sinusoidal networks of human, mouse and pig livers, three-dimensional reconstruction and quantification of tissue microarchitecture by image processing and analysis. *Arch Toxicol*. 2014;88:1161–1183.
- Wisse E, Jacobs F, Topal B, et al. The size of endothelial fenestrae in human liver sinusoids: implications for hepatocyte-directed gene transfer. *Gene Ther*. 2008;15:1193–1199.
- Malato Y, Naqvi S, Schurmann N, et al. Fate tracing of mature hepatocytes in mouse liver homeostasis and regeneration. *J Clin Invest*. 2011;121:4850–4860.
- Furrer K, Tian Y, Pfammatter T, et al. Selective portal vein embolization and ligation trigger different regenerative responses in the rat liver. *Hepatology*. 2008;47:1615–1623.
- Vanheule E, Fan YD, Van Huisse J, et al. Expression of placental growth factor in regenerating livers after partial hepatectomy in the rat. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2011;23:66–75.
- Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ. Liver regeneration. *Hepatology*. 2006;43:545–53.

46. Shimizu T, Togo S, Kumamoto T, et al. Gene expression during liver regeneration after partial hepatectomy in mice lacking type 1 tumor necrosis factor receptor. *J Surg Res*. 2009;152:178–188.
47. Su AI, Guidotti LG, Pezacki JP, et al. Gene expression during the priming phase of liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:11181–11186.
48. Yuan Y, Wu X, Ou Q, et al. Differential expression of the genes involved in amino acids and nitrogen metabolisms during liver regeneration of mice. *Hepato Res*. 2009;39:301–312.
49. Farges O, Belghiti J, Kianmanesh R, et al. Portal vein embolization before right hepatectomy: prospective clinical trial. *Ann Surg*. 2003;237:208–217.
50. Huisman F, van Lienden KP, Damude S, et al. A review of animal models for portal vein embolization. *J Surg Res*. 2014;191:179–188.
51. Uchida N, Fujisaki T, Eaves AC, Eaves CJ. Transplantable hematopoietic stem cells in human fetal liver have a CD34(+) side population (SP) phenotype. *J Clin Invest*. 2001;108:1071–1077.
52. Hightower MJ, Fairfield FR, Lucas JJ. A staining procedure for identifying viable cell hybrids constructed by somatic cell fusion, cybridization, or nuclear transplantation. *Somatic Cell Genet*. 1981;7:321–329.
53. Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ. Liver regeneration. *J Hepatol*. 2012;57:692–694.
54. Ding BS, Nolan DJ, Butler JM, et al. Inductive angiocrine signals from sinusoidal endothelium are required for liver regeneration. *Nature*. 2010;468:310–315.
55. Clavien PA, Petrowsky H, DeOliveira ML, Graf R. Strategies for safer liver surgery and partial liver transplantation. *N Engl J Med*. 2007;356:1545–1559.

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

ScienceDirect

journal homepage: [www.JournalofSurgicalResearch.com](http://www.JournalofSurgicalResearch.com)

# Transplantation of genetically modified hepatocytes after liver preconditioning in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit



Hadrien Tranchart, MD, PhD,<sup>a,b,\*</sup> Martin Gaillard, MD,<sup>a,b</sup>  
 Papa Saloum Diop, MD,<sup>a,b</sup> Sylvie Goulinet, BSc,<sup>a</sup>  
 Panagiotis Lainas, MD, PhD,<sup>a,b</sup> and Ibrahim Dagher, MD, PhD<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>INSERM U1193, Paul Brousse Hospital, Villejuif, France

<sup>b</sup>Department of Minimally Invasive Surgery, Antoine Bécclère Hospital, AP-HP, Paris-Sud University, Clamart, France

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 22 August 2017

Received in revised form

6 November 2017

Accepted 21 November 2017

Available online 22 December 2017

### Keywords:

Hepatocyte transplantation

Cell transplantation

Liver

Gene therapy

Portal vein embolization

## ABSTRACT

**Background:** Hepatocyte transplantation is a potentially less invasive alternative to liver transplantation for treating inherited metabolic liver diseases. We developed an auto-transplantation protocol of *ex vivo* genetically modified hepatocytes combining lentiviral transduction and transplantation after liver preconditioning by partial portal vein embolization. We investigated the metabolic efficiency of this approach in Watanabe rabbits, animal model of familial hypercholesterolemia.

**Methods:** Our autotransplantation experimental protocol was used in two groups of rabbits ( $n = 10$ ), experimental and sham, receiving transduced and control hepatocytes, respectively. Isolated hepatocytes from left liver lobes were transduced using recombinant lentiviruses. Median lobe portal branches were embolized under fluoroscopic control. Functional measurement of low-density lipoprotein (LDL) receptor expression was assessed by LDL internalization assays. Cholesterol level evolution was monitored. Rabbits were killed 20 wk after the procedure.

**Results:** Three rabbits of each group died several hours after hepatocyte transplantation; autopsy revealed portal vein thrombosis in two rabbits from each group. The protocol was therefore modified with hepatocytes being transplanted through splenic injection. Lentiviral hepatocyte transduction efficacy was 64.5%. Fluorescence microscopy revealed Dil-LDL internalization of transduced hepatocytes. Seven rabbits in each group were considered for lipid analysis. Four weeks after autotransplantation, median total cholesterol level decreased in the experimental group, without reaching statistical significance (8.9 [8.0–9.8] g/L versus 6.3 [0.5–8.3];  $P = 0.171$ ). In the experimental group, enzyme-linked immunosorbent assay detected significant antibody expression against human low-density lipoprotein receptor.

**Conclusions:** Autotransplantation protocol allowed a nonstatistically significant improvement of the lipid profile in Watanabe rabbits. Further experiments involving a larger number of animals are necessary to confirm or refute our findings.

© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

\* Corresponding author. Department of Minimally Invasive Surgery, Antoine Bécclère Hospital, 157 rue de la Porte de Trivaux, 92141 Clamart cedex, France. Tel.: +33 (0) 1 45 37 40 37; fax: +33 (0) 1 45 37 49 78.

E-mail address: [hadrien.tranchart@aphp.fr](mailto:hadrien.tranchart@aphp.fr) (H. Tranchart).

0022-4804/\$ – see front matter © 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

<https://doi.org/10.1016/j.jss.2017.11.060>

## Introduction

Hepatocyte transplantation is an innovative and potentially less invasive alternative to orthotopic liver transplantation for the treatment of life-threatening inherited metabolic liver diseases.<sup>1</sup> Autotransplantation of *ex vivo* genetically modified hepatocytes in comparison to allogenic hepatocyte transplantation could allow to overcome problems associated with shortage of donor organs, quality of hepatocyte sources, and immunosuppression.<sup>2–4</sup> However, this approach requires high efficacy of hepatocyte transduction since a limited number of hepatocytes are isolated from each resected liver lobe and subsequently transplanted. In addition, transplanted cells have a low capacity of spontaneous liver engraftment and necessitate the development of preconditioning techniques which would be transposable to clinical practice and promote significant liver repopulation.

Our team has previously developed strategies to overstep the limits of hepatocyte autotransplantation for the treatment of inherited metabolic liver diseases.<sup>1,5–10</sup> Partial portal vein embolization (PVE), a minimally invasive preconditioning approach, has allowed significant improvement of hepatocytes' engraftment.<sup>7,9</sup> Additionally, transduction in suspension of isolated hepatocytes with a lentiviral vector and immediate transplantation (SLIT) has obviated the need for primary culture and allowed important transduction efficacy (up to 90%) resulting in long-term transgene expression.<sup>11</sup> The combination of SLIT and PVE in nonhuman primates resulted in the engraftment of 6% of lentivirally transduced hepatocytes.<sup>9</sup>

Familial hypercholesterolemia (FH) is an inherited autosomal disease due to a mutation in the gene encoding for the low-density lipoprotein receptor (LDLR), leading to severe hypercholesterolemia and premature coronary heart disease.<sup>12,13</sup> The current treatment methods for homozygous FH are generally inefficient (diet, bile acid binding resins, statins) or laborious (low-density lipoprotein [LDL] apheresis).<sup>13</sup> Currently, orthotopic liver transplantation represents the only curative option for these patients but is limited by the shortage of donor livers, the specific morbidity of the procedure and life-long immunosuppression.<sup>13,14</sup> The Watanabe heritable hyperlipidemic (WHHL) rabbit is the only existing large animal model of FH.<sup>15</sup> Like FH patients, WHHL rabbits spontaneously develop hypercholesterolemia and atherosclerosis due to genetic and functional LDLR deficiencies.<sup>16</sup>

In the continuity of our previous experimental studies and before proceeding to clinical experimentation, we aimed to assess the metabolic efficiency of our preclinical model of autotransplantation of *ex vivo* genetically modified hepatocytes in the WHHL rabbit model of inherited metabolic liver disease.

## Materials and methods

### Animals

WHHL male and female rabbits aged between 12 and 16 wk and weighing between 1.8 and 3 kg were purchased from Centre de Production Animale (Olivet, France). All animals were housed

at the animal facility of Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes (Nantes, France) and checked daily. They were maintained in separate cages on a standard diet and kept in 12-h light–dark cycles. All animals were treated in accordance with the European Community laws for animal care. The study was approved by the local ethics committee and by the French Ministry of Research (ARC 02008.02). Study end points were defined to avoid unnecessary suffering of animals.

### Experimental protocol

The complete experimental protocol was established in a first series of New Zealand White rabbits as previously reported.<sup>10</sup> This preliminary study allowed to assess feasibility of the procedure in rabbits; the efficacy of the SLIT + PVE approach in terms of hepatocyte transduction, engraftment, and long-term transgene expression; and the *in vitro* correction of the WHHL hepatocyte phenotype by transduction with a lentiviral vector encoding human LDLR. The aim of the present experimentation was to assess the metabolic efficacy of our approach. Two groups of WHHL rabbits were included in this study, both receiving the complete experimental protocol of autotransplantation. The experimental group was transplanted with transduced hepatocytes, whereas the sham group was transplanted with nontransduced hepatocytes.

### Left lobe resection and permanent partial PVE

Surgery was performed as previously described.<sup>10</sup> Briefly, rabbits were sedated by an intravenous injection of alfaxalone and maintained under isoflurane. A left lobectomy, corresponding to approximately 25% of the liver volume, was carried out through midline laparotomy. A 12-G catheter was positioned in the hepatic vein of the left lobe for hepatocyte isolation. Before surgery, rabbits received prophylactic antibiotherapy by cephalexin (IV), while intravenous morphine was administered, when necessary, for perioperative analgesia.

Permanent PVE was performed by injecting a mixture of cyanoacrylate (Histoacryl, B. Braun Medical, Diegem, Belgium) and lipiodol, as it is frequently the case in clinical practice for future liver remnant hypertrophy in order to prevent postoperative liver failure after liver resection.<sup>17</sup> An initial portogram using a 3-F introducer placed in the superior mesenteric vein was taken to map the portal branches before embolization. Portal branches of the median lobe, corresponding to approximately 45% of the liver volume, were selectively embolized using a microcatheter (Terumo Progreat, Guyancourt, France) that was positioned accordingly under fluoroscopic control. The microcatheter was then replaced by a 3-F venous catheter connected to a perfusion chamber (Access Technologies, Skokie, IL), which was placed subcutaneously in the left anterior thoracic region to provide chronic access to the portal vein. Transdermal fentanyl was used as postoperative analgesic.

### Generation of lentiviral vectors

The self-inactivating lentiviral vector, APOAII.LDLR.WPRE (woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory



element), encodes the human LDLR cDNA under the transcriptional control of the APOAII liver-specific promoter. The pRRL.APOAII.LDLR.WPRE vector plasmids were constructed from the pRRLSINFlap.GFP backbone (a kind gift from Genethon, Evry, France) by inserting the human APOAII regulatory sequences and replacing green fluorescence protein sequence by human LDLR cDNA. Concentrated lentivectors were produced by Vectalys (Toulouse, France). APOAII.GFP.WPRE vectors were similarly produced in order to assess transduction efficiency by fluorescence-activated cell sorting (FACS).

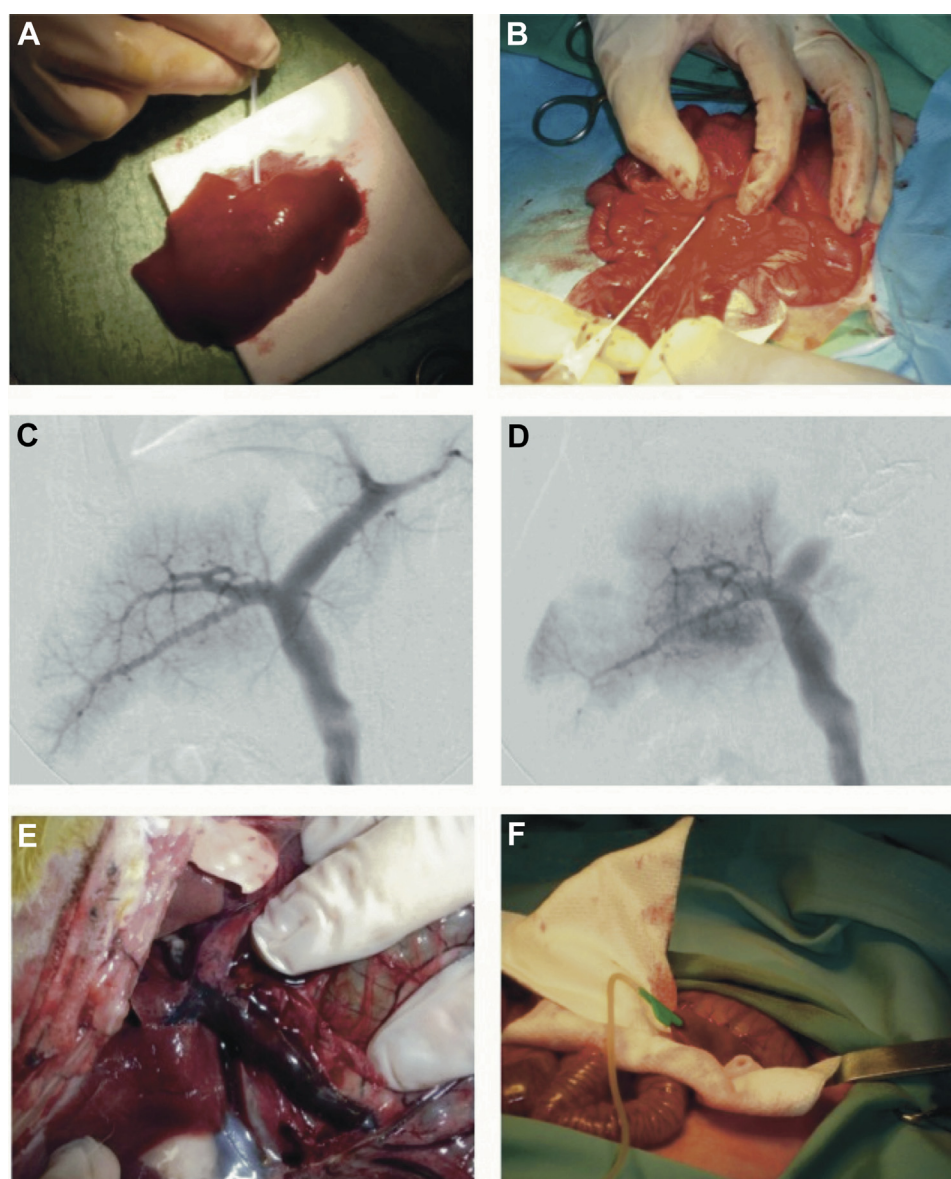
#### Hepatocyte isolation and transduction

Hepatocytes were isolated from the left liver lobe using a two-step collagenase perfusion.<sup>18</sup> Hepatocytes were purified by

sedimentation on 30% Percoll isodensity solution (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). Hepatocyte viability was determined by trypan blue dye exclusion.

The freshly isolated hepatocytes were pelleted ( $50 \times g$ , 5 min) and transduced with recombinant lentiviruses at a cell density of  $1 \times 10^7$  cells/mL in the University of Wisconsin solution (ViaSpan, DuPont Pharmaceuticals, Wilmington, DE) containing 50  $\mu$ M vitamin E succinate (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MI) on ultralow attachment culture plates (Corning, Corning, NY) ( $1 \times 10^8$  cells/plate) at a multiplicity of infection of 30 for 1 h at 37°C without cell agitation.

Samples of transduced and control hepatocytes were plated and cultured at a density of 67,000 cells/cm<sup>2</sup> in hormonally defined and serum-free medium on collagen-coated plates. Transduction efficiency was determined by FACS and fluorescence microscopy 5 d after transduction.



**Fig. 1** – Surgical procedure including left lobectomy (A) and portal vein embolization of the median lobe [introducer placed in the superior mesenteric vein (B), initial portogram (C), and portogram after partial portal vein embolization (D)]. Examination of deceased animal revealing portal vein thrombosis (E). Hepatocyte transplantation performed by splenic puncture (F). (Color version of figure is available online.)

### Functional measurement of LDLR expression by LDL internalization assays

Five days after transduction, cultured hepatocytes were washed to remove dead cells. LDL uptake by hepatocytes was assessed by fluorescence microscopy after incubation of the cells with 10  $\mu\text{g/mL}$  Dil-LDL (Molecular probes, Eugene, OR) for 3 h at 37°C, washed with phosphate-buffered saline, and fixed in 3% formaldehyde.

### Hepatocyte transplantation

Before transplantation, transduced hepatocytes were washed three times in cell plating medium (hormonally defined and serum-containing medium)<sup>18</sup> and then two times in DMEM/Ham's F12 without phenol-red (Invitrogen). Transduced hepatocytes (100 million) were suspended at a density of  $1 \times 10^7$  cells/mL in normal saline containing heparin (20 U/mL) and infused at a flow rate of 0.5 mL/min. Portal pressure was continuously monitored during hepatocyte infusion.

The protocol was modified after the first three rabbits of each group, with hepatocytes being transplanted through splenic injection. A splenic puncture was performed at two different points (cranial and caudal parts) using a 27-G needle. Furthermore, continuous agitation was also applied during infusion to limit the creation of hepatocyte clusters. Finally, a 10-min pause was performed between the two puncture points. Hemostatic control was achieved by compression.

### Liver function tests and cholesterol level

Blood samples were obtained from the marginal vein of the ear 7 d before surgery and every 2 wk after the surgical procedure. Samples were centrifuged immediately at 2000g for 6 min. Aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, gamma glutamyl transpeptidase, and total bilirubin levels were measured at the Routine Biochemistry Department of Nantes veterinary school. Cholesterol levels (high-density lipoprotein and total cholesterol [TC]) as triglyceride levels were measured using commercially available kits (ref: 61,533, ref: 61,248, ref: 61,236, Biomérieux, Marcy-l'Étoile, France).

### ELISA for detection of antibodies against human LDLR

WHHL plasma was screened by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies that bound recombinant human LDLR. Nunc Maxisorp microtiter plates (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) were coated with 100  $\mu\text{L}$ /well of the antigen (ref: 2148-LD/CF, R and D Systems, MN), by overnight incubation at 4°C. Plates were blocked with 5% milk in TBS-Tween; serial dilutions of the WHHL plasma were then added for 1 h at room temperature. After washing plate five times with TBS-Tween, bound antibody was detected after 1 h with peroxidase-conjugated donkey antirabbit total IgG 1:5000 (ref: NA934, Amersham ECL, GE Healthcare). Plates were again washed five times with TBS-Tween. The peroxidase was revealed by incubation with the substrate *o*-phenylenediamine dihydrochloride (Sigma–Aldrich) for 30 min. The reaction was stopped by the addition of 3N HCl, and a

spectrophotometric reading was obtained at 450 nm (Biotek PowerWave HT, Winooski, VT).

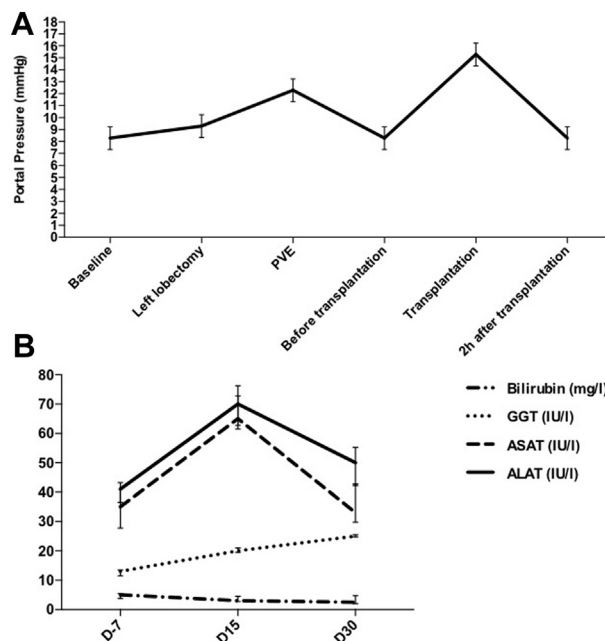
### Histological examination

Twenty weeks after the procedure, rabbits were killed under general anesthesia. Liver, splenic, and lung samples were collected. Samples embedded in water-soluble glycols, and resins (Tissue-Tek OCT; Sakura, Villeneuve d'Ascq, France) were frozen in liquid nitrogen. Sections were stained with hematoxylin, dehydrated, cover-slipped, and examined under a light microscope.

### Statistical analysis

A power calculation was performed in order to limit the number of animals. One-sided Mann–Whitney U test was used to investigate the hypothesis that TC in the experimental group 2 mo after the procedure was inferior to that in the sham group. Type I and II error rates were set at 0.025 and 0.2, respectively. Based on our preliminary results,<sup>10</sup> TC in the experimental group was expected to represent 50% of the TC in the sham group, giving a group size of 10 animals.

Continuous variables are expressed as medians and (interquartile range). The Mann–Whitney U test and the Fisher's exact test were used for comparisons of continuous and categorical variables, respectively.  $P \leq 0.05$  was considered statistically significant. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism4 software (GraphPad, San Diego, CA).



**Fig. 2** – Portal pressure before and after left lobectomy, portal vein embolization and transplantation (A). Liver function test results before and up to 30 d after the procedure (B). ALAT = alanine aminotransferase; ASAT = aspartate aminotransferase; GGT = gamma glutamyl transpeptidase.

## Results

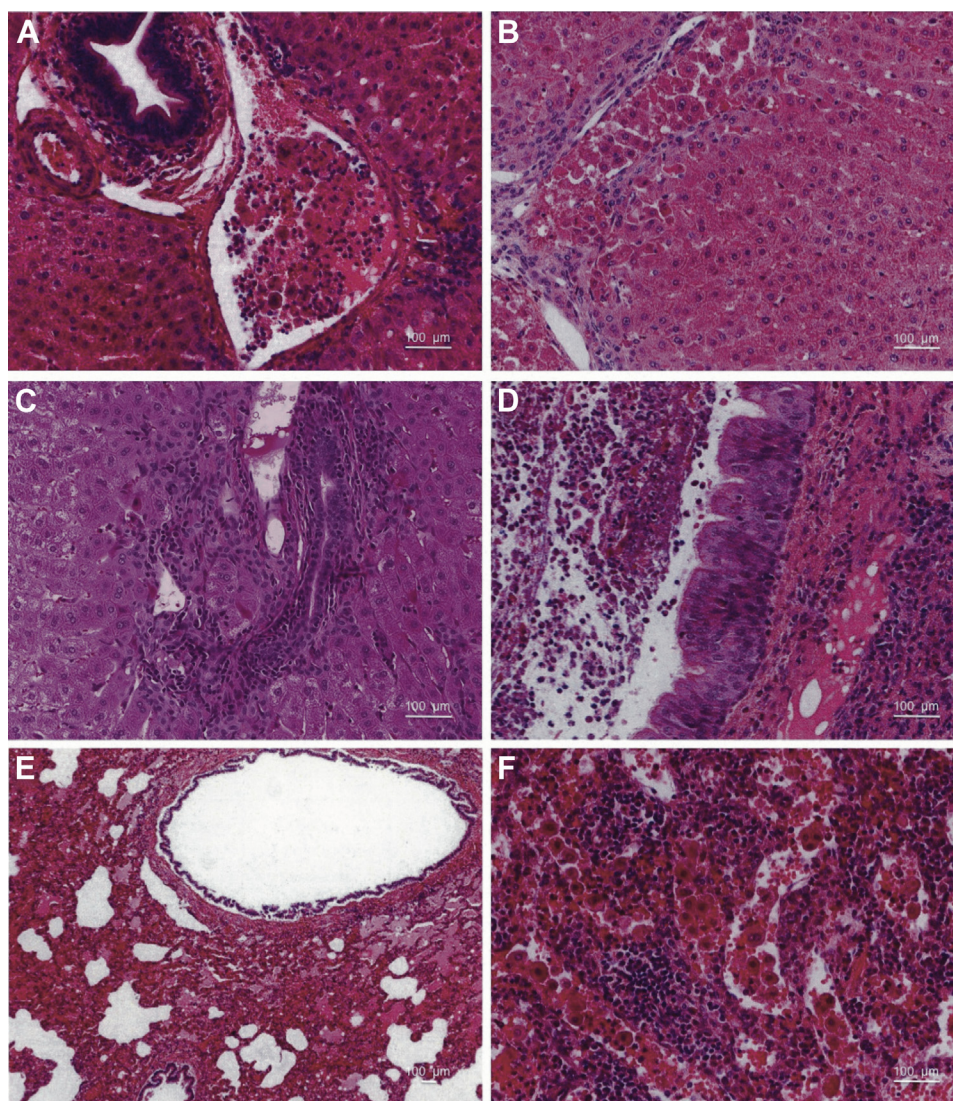
### Tolerance and technical efficiency of the procedure

Left lobectomy, PVE of the median lobe, and transplantation were performed in all animals (Fig. 1A-D). The first three rabbits of sham and experimental groups died several hours after hepatocyte transplantation, and autopsy revealed portal vein thrombosis in two rabbits from each group (Fig. 1E). The two other animals died of unexplained causes. In order to avoid mortality due to portal vein thrombosis, the final part of the hepatocyte transplantation protocol was modified. No catheter was left in the portal vein after PVE, and hepatocyte transplantation was performed through splenic injection (Fig. 1F). Using this modified protocol, all remaining animals survived the entire procedure (seven in each group).

Modifications of portal vein pressure during and after hepatocyte injection were similar to the pattern observed in our preliminary study.<sup>10</sup> Briefly, portal vein pressure increased moderately and transiently after left lobectomy and PVE ( $P = 0.010$ ). A more important increase of portal vein pressure was observed during hepatocyte transplantation ( $P = 0.0001$ ) with rapid return to normal values (Fig. 2A).

Serum aspartate aminotransferase ( $P = 0.020$ ) and alanine aminotransferase ( $P = 0.030$ ) levels increased transiently, returning to normal values within 1 mo after procedures. Serum bilirubin and gamma glutamyl transpeptidase levels did not change significantly ( $P = 1.000$ ) (Fig. 2B).

Histological examination of tissue samples harvested from deceased animals showed transplanted hepatocytes being trapped within portal veins and sinusoidal lumen. Hepatocytes in the process of being integrated were surrounded by an inflammatory reaction (Fig. 3A-C). Lung samples were free of



**Fig. 3** – Histological examination of tissue samples taken from deceased animals showing hepatocytes in the process of being integrated, surrounded by an inflammatory reaction (A, B, C). Lung samples with nonspecific bronchitis lesions (D). Aspect of acute edema of the lung (E). Numerous transplanted hepatocytes observed in the red pulp of the splenic parenchyma (F). (Color version of figure is available online.)

embolization material or transplanted hepatocytes; however, nonspecific bronchitis lesions were frequently seen as it is common in farm animals (Fig. 3D). An aspect of acute edema of the lung was observed in an animal suggesting a decrease of cardiac function (Fig. 3E). Numerous transplanted hepatocytes were observed in the red pulp of the splenic parenchyma (Fig. 3F).

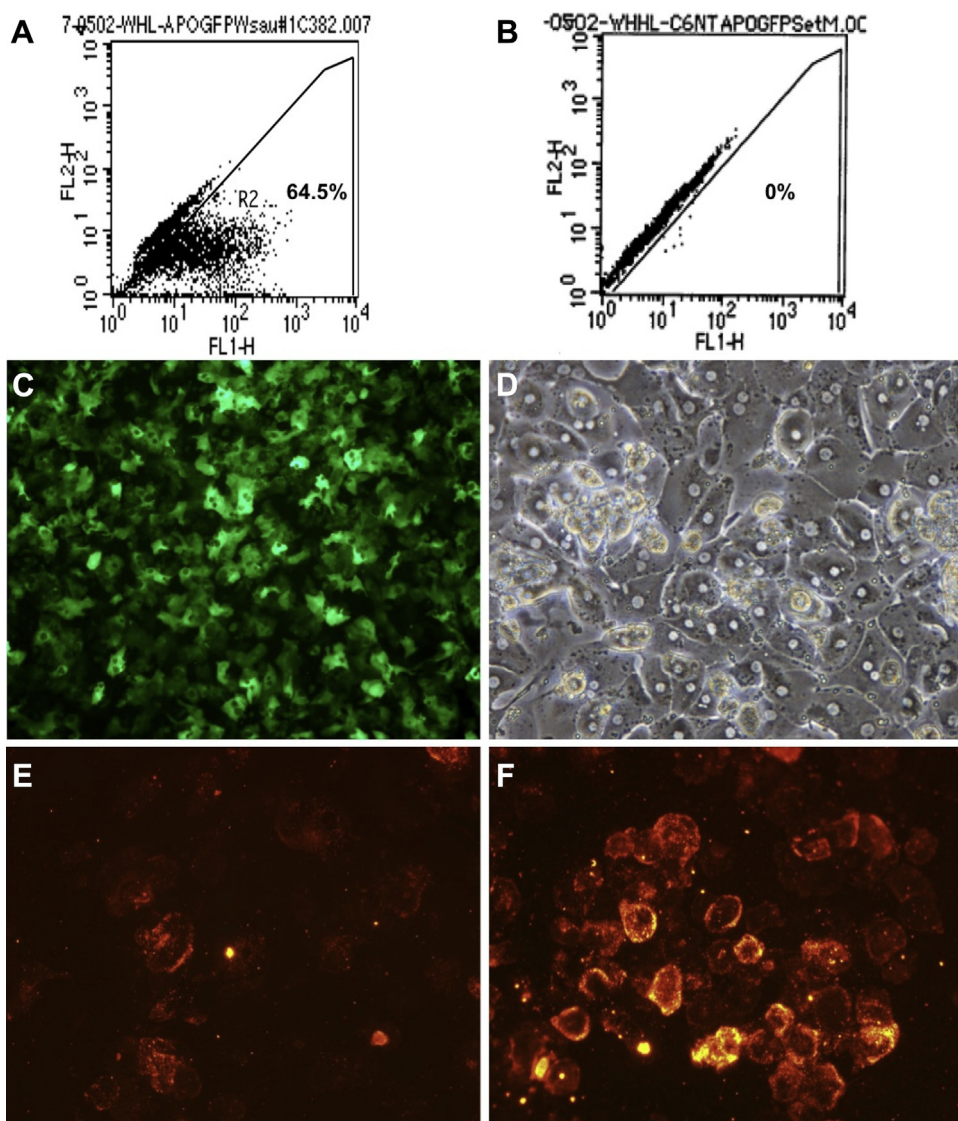
#### WHHL hepatocyte transduction and in vitro functional measurement

The transduction efficacy of WHHL hepatocytes with APOAII.GFP.WPRE vectors was 64.5% at a multiplicity of infection of 30 (Fig. 4A and B). WHHL hepatocytes expressed high levels of green fluorescence protein as demonstrated by FACS and fluorescence microscopy analyses (Fig. 4C).

Transduced cells maintained a regular polygonal shape and contained the two round nuclei that characterize differentiated hepatocytes (Fig. 4D). Fluorescence microscopy revealed that transduced hepatocytes were also able to internalize Dil-LDL, another fluorescent ligand of LDL receptor (Fig. 4E and F).

#### Lipid profile evolution and antibodies against human LDLR detection

Seven rabbits in each group (experimental and sham) were considered for lipid analysis. Four weeks after the procedure, median TC level was decreased in the experimental group compared to sham animals, without, however, reaching statistical significance (8.9 [8.0-9.8] g/L versus 6.3 [0.5-8.3] g/L;  $P = 0.171$ ) (Fig. 5A). Similarly, a nonstatistically significant decrease of median triglyceride level was observed 4 wk after

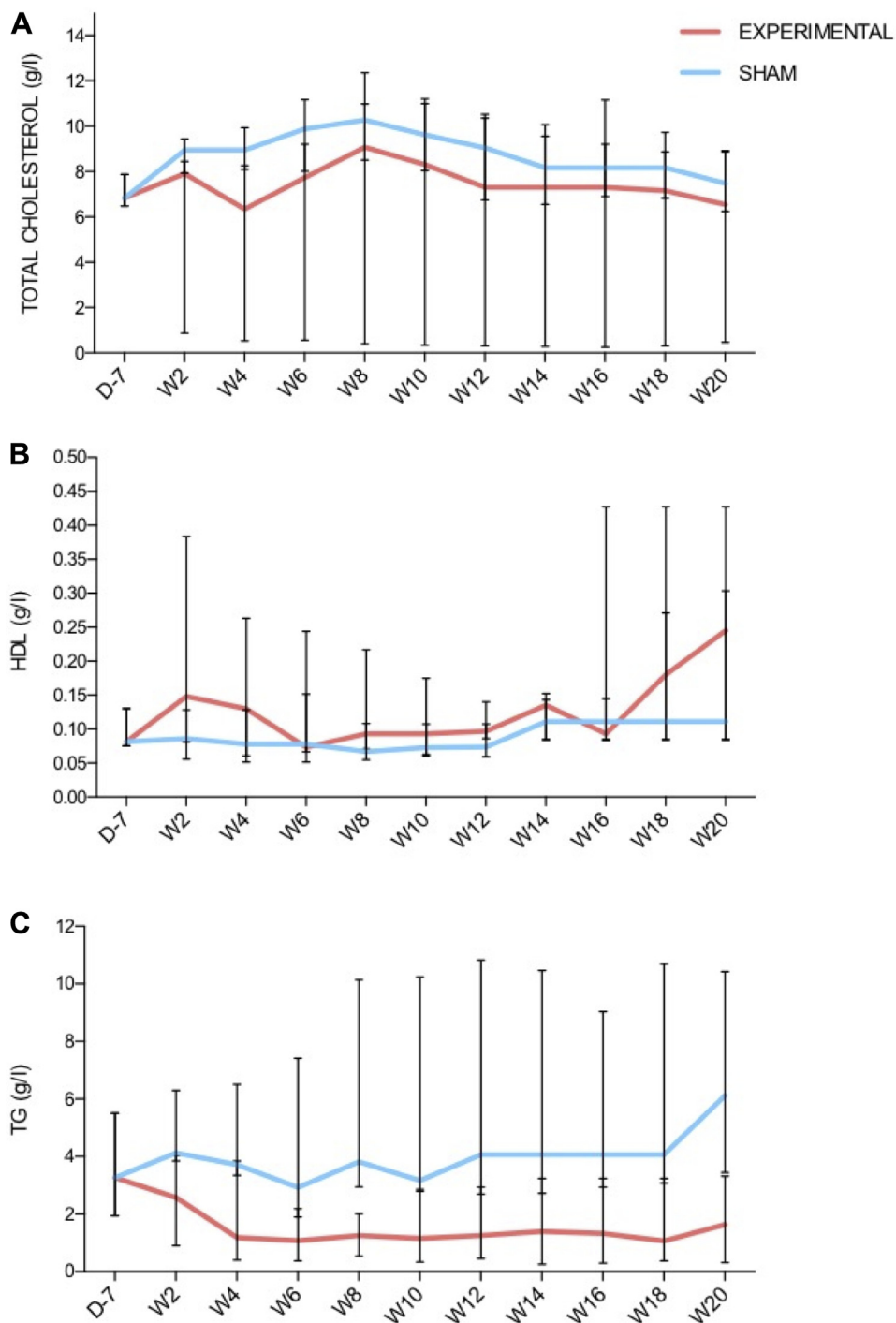


**Fig. 4** – Transduction efficacy assessed by fluorescence-activated cell sorting in transduced (A) and control hepatocytes (B). Hepatocytes expressing high levels of GFP during fluorescence microscopy analyses (C). Transduced cells maintaining a regular polygonal shape and containing the two round nuclei (D). Fluorescence microscopy revealing the internalization of Dil-LDL by transduced cells (E, F). GFP, green fluorescence protein. (Color version of figure is available online.)

the procedure in the experimental group (1.2 [0.4-3.8] g/L versus 3.6 [3.2-6.4] g/L;  $P = 0.125$ ) (Fig. 5C). Finally, median high-density lipoprotein level was increased 2 wk after the procedure in the experimental group, but here again without reaching statistical significance (0.15 [0.08-0.38] g/L versus 0.09 [0.05-0.15] g/L;  $P = 0.48$ ) (Fig. 5B). A significant expression of antibodies against human LDLR was detected by ELISA in the experimental group (Fig. 6).

### Discussion

This comparative study confirms the feasibility of our hepatocyte autotransplantation protocol, including hepatocyte isolation and transduction as well as liver preconditioning by PVE. Furthermore, these results suggest an improvement of lipid profile in the model of the WHHL rabbit which, even if



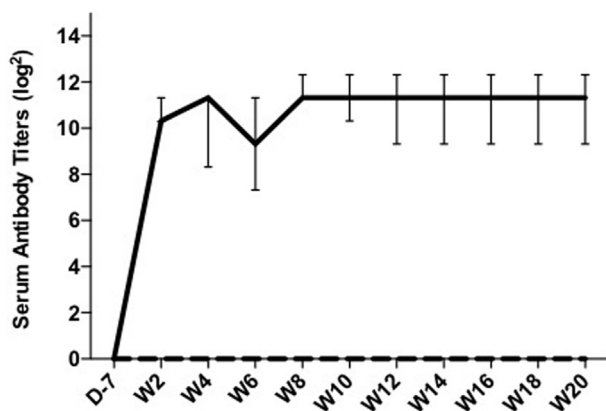
**Fig. 5 – Lipid profile evolution [total cholesterol (A), high-density lipoprotein (B), and triglyceride (C)] in sham and experimental animals. HDL = high-density lipoprotein; TG = triglyceride. (Color version of figure is available online.)**

nonstatistically significant, could be used as a basis for further larger experimental studies.

The feasibility and tolerance of the whole protocol has been already investigated in a preliminary series of New Zealand rabbits as previously reported.<sup>10</sup> The present comparative study, specifically performed in the WHHL rabbit model, confirms the feasibility of our approach. The main limit of the hepatocyte autotransplantation in WHHL rabbits was the already known hypercoagulability of this animal model.<sup>19</sup> While the protocol was well tolerated in primates, hepatocyte transplantation through direct portal vein injection after PVE resulted in systematic fatal portal thrombosis in the WHHL rabbit. Several modifications of the final phase of the protocol, especially hepatocyte transplantation through splenic puncture, were therefore necessary. Hepatocyte transplantation using a splenic injection has been already extensively reported.<sup>20–22</sup> We can speculate that part of the therapeutic transplanted hepatocytes integrate initially the splenic parenchyma and subsequently form small clusters of hepatocytes which migrate progressively to the liver. The spleen would therefore play the role of a sifter. The good tolerance of animals in terms of portal pressure and liver function tests advocates this hypothesis. Besides, intrasplenic transplantation avoided the prolonged catheterization of the portal vein, reducing probably the number of thrombotic events.

The lentiviral vector used allowed to transduce up to 65% of WHHL hepatocytes without observing any toxicity. As previously reported,<sup>23</sup> the addition of vitamin E to the transduction medium overcomes the low infectivity of HIV-1–derived lentiviral vectors related to a species-specific barrier to early steps of infection in nonhuman mammalian cells.<sup>24–26</sup> Besides, as previously observed in a preliminary series with a similar lentivirus,<sup>10</sup> our therapeutic lentiviral vector restored LDLR activity in WHHL hepatocytes as documented by the internalization of Dil-LDL.

The metabolic efficiency of our approach did not meet our expectations. The lipid profile evolution was globally improved in the experimental group compared to sham animals, without reaching, however, statistical significance. Four



**Fig. 6 – Enzyme-linked immunosorbent assay detecting significant antibody expression against human LDLR after hepatocyte transplantation (continuous line: experimental group, dotted line: sham group).**

weeks after the procedure, the median TC level in the experimental group decreased by 30% compared to the respective median TC level observed in the sham group, remaining inferior until the end of experimentation. In 1991, Chowdhury *et al.*<sup>27</sup> reported a 30% to 50% decrease of total serum cholesterol in WHHL rabbits after transplantation of autologous hepatocytes genetically corrected *ex vivo* with recombinant retrovirus. To our knowledge, no other team has been able to reproduce these remarkable results.<sup>27</sup> This metabolic effect was particularly impressive as the retrovirus used in this experimentation had a transduction efficiency of only 20%. Moreover, the liver was not preconditioned before transplantation, except for the limited liver regeneration induced by a 30% partial hepatectomy required to harvest the autologous hepatocytes. However, in the model of autotransplantation used by Chowdhury *et al.*,<sup>27</sup> the number of therapeutic hepatocytes transplanted was twice superior to the number of transplanted hepatocytes in our study. In our WHHL rabbit model, PVE improves hepatocyte engraftment,<sup>10</sup> but the consecutive elevation of portal pressure and the frequency of lethal portal vein thrombosis limits considerably the number of transplanted hepatocytes. This limitation could explain the reduced metabolic efficiency of our protocol. Additionally, the use of splenic injection could have impaired our results. Gupta *et al.*<sup>28</sup> demonstrated in rats that an important number of transplanted hepatocytes (approximately 20%) were retained in the spleen or engrafted in the lungs or pancreas after splenic injection. Only 55% of transplanted hepatocytes translocated to the liver. Additionally, this distribution was consistent 9 mo after splenic injection. In the WHHL model, splenic injection allowed us to overcome the occurrence of portal vein thrombosis, even if the elevation of portal pressure after partial hepatectomy and PVE could have promoted the capture of hepatocytes in the spleen and limited the number of actual therapeutic cells delivered to the liver. In our preliminary study assessing hepatocyte engraftment in the WHHL model, liver repopulation after infusion through the portal vein was 3.5%.<sup>10</sup> Further experimentations should be performed to assess the actual engraftment rate using our complete hepatocyte autotransplantation procedure by splenic injection. Furthermore, an immune reaction against the human LDLR has probably attenuated the metabolic effect observed. Indeed, ELISA detected a significant expression of antibodies against human LDLR in the experimental group 2 wk after the procedure. Despite important efforts, we were not able to clone the LDLR cDNA of the wild-type (New Zealand White) rabbit (data not shown) and therefore decided to use the human LDLR sequence. This decision was also supported by the fact that human LDLR binds rabbit LDL.<sup>29</sup> However, although rabbit and the human receptors have similar affinities for human LDL,<sup>30</sup> rabbit and human LDLR cDNA present only 75% sequence homology and important differences in the structure of respective receptors were described.<sup>31</sup> The immune reaction against human LDLR probably led to a progressive destruction of therapeutic hepatocytes, which could explain the short-term improvement of the lipid profile. Nevertheless, the lipid panel improvement was rather robust given the relative lack of homogeneity of the LDLR and despite the alloimmunity response a lipid improvement effect was still seen.

Our group decided to end the experimentation after 10 procedures performed in each group (and only seven animals alive) for several reasons: (1) the complete protocol is particularly expensive (technical facilities, animal housing, virus production...) and funding was limited, (2) as previously stated, the preliminary results did not meet our expectations, (3) we observed an immune reaction against human LDLR which accelerated the cessation of our protocol.

Further experimentations using the same protocol of autotransplantation after correction of the metabolic deficiency with a lentiviral vector encoding for rabbit LDLR should be planned in the future. The use of immunosuppression could also be considered. However, the fragility of the WHHL model would still be a limit for our approach. Therefore, the development of a more vigorous large animal model of FH could be particularly interesting. Hummel et al.<sup>32</sup> identified in 1990 a family of rhesus monkeys exhibiting a spontaneous hypercholesterolemia associated with an LDLR deficiency. The affected monkeys present a nonsense mutation in exon 6 of the LDLR gene. A primate model for FH would be of great interest, since our complete procedure of autotransplantation was initially developed and tested in primates. However, to our knowledge, no specific experimentations using the rhesus monkey model have been reported.

In conclusion, autotransplantation of *ex vivo* genetically modified hepatocytes and liver preconditioning by partial PVE may be effective in improving the lipid profile in WHHL rabbits. Further experiments that involve a larger number of animals receiving this protocol are necessary to confirm or refute our findings.

## Acknowledgment

The authors are grateful to Marie-Thérèse Groyer-Picard from INSERM U1193, to Delphine Holopherne from the Department of Animal Surgery (Veterinary School of Nantes, Nantes, France), and to Danièle Pariente from the Department of Pediatric Radiology (Bicêtre Hospital, Le Kremlin-Bicêtre, France).

Authors' contributions: H.T. and I.D. participated in research design, in the performance of the research, in the data analysis, and in the writing of the paper. M.G. participated in the writing of the paper. P.S.D. participated in the performance of the research. S.G. participated in the performance of the research. P.L. participated in research design and in the writing of the paper.

This project was supported by Association Française contre les Myopathies (AFM), Fondation de l'Avenir, and INSERM. P. Lainas and H. Tranchart were supported by AFM.

## Disclosure

The authors reported no proprietary or commercial interest in any product mentioned or concept discussed in this article.

## REFERENCES

1. Nguyen TH, Mainot S, Lainas P, et al. *Ex vivo* liver-directed gene therapy for the treatment of metabolic diseases: advances in hepatocyte transplantation and retroviral vectors. *Curr Gene Ther*. 2009;9:136–149.
2. Weber A, Groyer-Picard MT, Franco D, Dagher I. Hepatocyte transplantation in animal models. *Liver Transplant*. 2009;15:7–14.
3. Soltys KA, Soto-Gutierrez A, Nagaya M, et al. Barriers to the successful treatment of liver disease by hepatocyte transplantation. *J Hepatol*. 2010;53:769–774.
4. Dhawan A, Puppi J, Hughes RD, Mitry RR. Human hepatocyte transplantation: current experience and future challenges. *Nature reviews. Gastroenterol Hepatol*. 2010;7:288–298.
5. Vons C, Loux N, Simon L, et al. Transplantation of hepatocytes in nonhuman primates: a preclinical model for the treatment of hepatic metabolic diseases. *Transplantation*. 2001;72:811–818.
6. Parouchev A, Nguyen TH, Dagher I, et al. Efficient *ex vivo* gene transfer into non-human primate hepatocytes using HIV-1 derived lentiviral vectors. *J Hepatol*. 2006;45:99–107.
7. Dagher I, Boudechiche L, Branger J, et al. Efficient hepatocyte engraftment in a nonhuman primate model after partial portal vein embolization. *Transplantation*. 2006;82:1067–1073.
8. Lainas P, Boudechiche L, Osorio A, et al. Liver regeneration and recanalization time course following reversible portal vein embolization. *J Hepatol*. 2008;49:354–362.
9. Dagher I, Nguyen TH, Groyer-Picard MT, et al. Efficient hepatocyte engraftment and long-term transgene expression after reversible portal embolization in nonhuman primates. *Hepatology*. 2009;49:950–959.
10. Goulinet-Mainot S, Tranchart H, Groyer-Picard MT, et al. Improved hepatocyte engraftment after portal vein occlusion in LDL receptor-deficient WHHL rabbits and lentiviral-mediated phenotypic correction *in vitro*. *Cell Med*. 2012;4:85–98.
11. Birraux J, Menzel O, Wildhaber B, et al. A step toward liver gene therapy: efficient correction of the genetic defect of hepatocytes isolated from a patient with Crigler-Najjar syndrome type 1 with lentiviral vectors. *Transplantation*. 2009;87:1006–1012.
12. Hobbs HH, Brown MS, Goldstein JL. Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Hum Mutat*. 1992;1:445–466.
13. Marks D, Thorogood M, Neil HA, Humphries SE. A review on the diagnosis, natural history, and treatment of familial hypercholesterolaemia. *Atherosclerosis*. 2003;168:1–14.
14. Adam R, Karam V, Delvart V, et al. Evolution of indications and results of liver transplantation in Europe. A report from the European liver transplant registry (ELTR). *J Hepatol*. 2012;57:675–688.
15. Havel RJ, Yamada N, Shames DM. Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit. Animal model for familial hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis*. 1989;9:133–138.
16. Buja LM, Kita T, Goldstein JL, Watanabe Y, Brown MS. Cellular pathology of progressive atherosclerosis in the WHHL rabbit. An animal model of familial hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis*. 1983;3:87–101.
17. Azoulay D, Castaing D, Krissat J, et al. Percutaneous portal vein embolization increases the feasibility and safety of major liver resection for hepatocellular carcinoma in injured liver. *Ann Surg*. 2000;232:665–672.
18. Andreoletti M, Loux N, Vons C, et al. Engraftment of autologous retrovirally transduced hepatocytes after

- intraportal transplantation into nonhuman primates: implication for ex vivo gene therapy. *Hum Gene Ther.* 2001;12:169–179.
19. Kondo T, Watanabe YA. Heritable hyperlipemic rabbit. Jikken dobutsu. *Exp Anim.* 1975;24:89–94.
  20. Baumgartner D, LaPlante-O'Neill PM, Sutherland DE, Najarian JS. Effects of intrasplenic injection of hepatocytes, hepatocyte fragments and hepatocyte culture supernatants on D-galactosamine-induced liver failure in rats. *Eur Surg Res.* 1983;15:129–135.
  21. Vroemen JP, Buurman WA, Schutte B, et al. The cytokinetic behavior of donor hepatocytes after syngenic hepatocyte transplantation into the spleen. *Transplantation.* 1988;45:600–607.
  22. Aoki T, Jin Z, Nishino N, et al. Intrasplenic transplantation of encapsulated hepatocytes decreases mortality and improves liver functions in fulminant hepatic failure from 90% partial hepatectomy in rats. *Transplantation.* 2005;79:783–790.
  23. Nguyen TH, Oberholzer J, Birraux J, et al. Highly efficient lentiviral vector-mediated transduction of nondividing, fully reimplantable primary hepatocytes. *Molecular therapy. J Am Soc Gene Ther.* 2002;6:199–209.
  24. Besnier C, Takeuchi Y, Towers G. Restriction of lentivirus in monkeys. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:11920–11925.
  25. Hofmann W, Schubert D, LaBonte J, et al. Species-specific, postentry barriers to primate immunodeficiency virus infection. *J Virol.* 1999;73:10020–10028.
  26. Stremlau M, Owens CM, Perron MJ, et al. The cytoplasmic body component TRIM5alpha restricts HIV-1 infection in old world monkeys. *Nature.* 2004;427:848–853.
  27. Chowdhury JR, Grossman M, Gupta S, et al. Long-term improvement of hypercholesterolemia after ex vivo gene therapy in LDLR-deficient rabbits. *Science.* 1991;254:1802–1805.
  28. Gupta S, Aragona E, Vemuru RP, et al. Permanent engraftment and function of hepatocytes delivered to the liver: implications for gene therapy and liver repopulation. *Hepatology.* 1991;14:144–149.
  29. Young SG, Witztum JL, Casal DC, Curtiss LK, Bernstein S. Conservation of the low density lipoprotein receptor-binding domain of apoprotein B. Demonstration by a new monoclonal antibody, MB47. *Arteriosclerosis.* 1986;6:178–188.
  30. Kita T, Brown MS, Watanabe Y, Goldstein JL. Deficiency of low density lipoprotein receptors in liver and adrenal gland of the WHHL rabbit, an animal model of familial hypercholesterolemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981;78:2268–2272.
  31. Yamamoto T, Bishop RW, Brown MS, Goldstein JL, Russell DW. Deletion in cysteine-rich region of LDL receptor impedes transport to cell surface in WHHL rabbit. *Science.* 1986;232:1230–1237.
  32. Hummel M, Li ZG, Pfaffinger D, Neven L, Scanu AM. Familial hypercholesterolemia in a rhesus monkey pedigree: molecular basis of low density lipoprotein receptor deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87:3122–3126.



**Titre :** L'embolisation portale résorbable répétée : stimulus de la régénération hépatique

**Mots-clés :** embolisation portale ; régénération hépatique ; chirurgie hépatique ; transplantation d'hépatocytes

**Résumé :** Le foie possède une capacité de régénération importante qui lui permet de reconstituer son volume suite à une agression. L'induction d'une régénération hépatique est réalisée en pratique courante en chirurgie hépatique afin de préparer le foie à une hépatectomie majeure. Elle est également utilisée dans de nombreux modèles animaux afin de favoriser la prise de greffe hépatocytaire au cours de la transplantation d'hépatocytes pour le traitement de maladies métaboliques héréditaires hépatiques. Les principaux objectifs de ce travail ont été d'étudier une méthode peu invasive pour induire une importante régénération hépatique : d'une part pour élargir les possibilités de prise en charge des patients nécessitant une hépatectomie, et d'autre part pour favoriser la prise de greffe des hépatocytes transplantés pour le traitement des maladies métaboliques héréditaires hépatiques.

Dans un premier temps, nous avons mis au point chez le rat une technique d'embolisation portale partielle résorbable répétée (EPPRR) visant à entraîner un stimulus additionnel de régénération hépatique. Ces travaux ont validé le concept de la méthode d'EPPRR en montrant une augmentation de la prolifération hépatocytaire et une hypertrophie dans la partie du foie non embolisée.

Ce protocole d'EPPRR a ensuite été appliqué dans un modèle préclinique de gros animal. Nous avons étudié chez le porc les conséquences de l'EPPRR et montré que cette technique était reproductible, bien tolérée, et qu'elle permettait une hypertrophie de la partie du foie non embolisée.

Parallèlement, nous avons appliqué l'EPPRR avant transplantation d'hépatocytes chez le rat. A partir du foie de rats transgéniques exprimant la GFP (green fluorescent protein), nous avons pu isoler des hépatocytes GFP+. Ces cellules ont été transplantées dans le foie de rats receveurs GFP- en association avec une EPPRR. Nous avons montré que le stimulus de régénération répété provoqué par l'EPPRR permettait une augmentation de la prise de greffe.

En conclusion, l'EPPRR est une technique peu invasive capable d'induire une régénérative hépatique efficace. Cette approche pourrait jouer un rôle dans la prise en charge des tumeurs hépatique et l'optimisation de la transplantation d'hépatocytes pour le traitement des maladies métaboliques héréditaires hépatiques.

**Title:** Repeated reversible portal vein embolization: stimulating liver regeneration

**Keywords:** portal vein embolization; liver regeneration; liver surgery; hepatocyte transplantation

**Abstract:** The liver has an important regenerative capacity allowing reconstitution of the hepatic volume after an aggression. The induction of liver regeneration is used in routine clinical practice before liver surgery in order to prepare the liver for major hepatectomy. It is also used in numerous animal models in order to increase hepatocyte engraftment during hepatocyte transplantation for the treatment of inherited metabolic liver diseases. The main objective of this work was to evaluate a minimally invasive approach to induce substantial liver regeneration: firstly, to expand the therapeutic options for patients requiring an hepatectomy, and secondly to increase the engraftment of transplanted hepatocytes for the treatment of inherited metabolic liver diseases.

In a first study, we developed in the rat model a technique of repeated reversible portal vein embolization (RRPVE) to induce an additional stimulus of liver regeneration. This study established the proof of concept of the RRPVE method, showing an increase in hepatocyte proliferation and hypertrophy in the non-embolized liver.

This RRPVE protocol was then used in a preclinical model of large animal. We studied in swine the consequences of the RRPVE and showed that the procedure was reproducible, well tolerated, and allowed hypertrophy of the non-embolized liver.

In parallel, we applied RRPVE before hepatocyte transplantation in the rat model. From the liver of transgenic rats expressing GFP (green fluorescent protein), we were able to isolate GFP+ hepatocytes. These cells were transplanted in the liver of recipient GFP- rats in association with RRPVE. We demonstrated that the repetition of the regeneration stimulus induced by RRPVE allowed increased hepatocyte engraftment.

In conclusion, RRPVE is a minimally invasive technique able to induce efficient liver regeneration. This approach could play a part in the management of hepatic malignancies and the optimization of hepatocyte transplantation in the treatment of inherited metabolic liver diseases.

