



Effets antitumoraux des anesthésiques locaux dans le cancer du sein

Thiên-Nga Chamaraux-Tran

► To cite this version:

Thiên-Nga Chamaraux-Tran. Effets antitumoraux des anesthésiques locaux dans le cancer du sein. Pharmacologie. Université de Strasbourg, 2019. Français. NNT : 2019STRAJ021 . tel-02383360

HAL Id: tel-02383360

<https://theses.hal.science/tel-02383360>

Submitted on 27 Nov 2019

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

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

Université de Strasbourg

École Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé (ED414)

Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC)

CNRS UMR 7104 – INSERM U1258 – Université de Strasbourg – Illkirch, France

Thèse

Présentée par Thiên-Nga CHAMARAUX-TRAN

Soutenue publiquement le 29 mai 2019

Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Strasbourg

Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé

Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Effets antitumoraux des anesthésiques locaux dans le cancer du sein

Thèse dirigée par Madame le Docteur Catherine-Laure TOMASETTO (IGBMC, Illkirch, France)
et

Monsieur le Professeur Pierre DIEMUNSCH (HUS, Strasbourg, France)

Rapporteurs externes

Madame le Professeur Hawa KEITA-MEYER (APHP, Paris, France)

Monsieur le Professeur Emmanuel SAMAIN (Université de Franche-Comté, Besançon, France)

Examinatrice externe

Madame le Docteur Marie-Odile PARAT (UQ School of Pharmacy, Brisbane, Australie)

Examineur interne

Remerciements

À Madame le Docteur Catherine TOMASETTO,

Je ne vous serai jamais assez reconnaissante pour toute l'aide et tout le soutien que vous m'avez apportés tout au long de ce travail. Je vous remercie de m'avoir fait confiance et permis de me consacrer pendant une année à plein temps à ce travail par le biais du *PhD program* de l'IGBMC et ainsi avoir pu concilier vie familiale et recherche. Ces 5 années à vos côtés ont été pour moi une grande richesse intellectuelle et humaine.

À Monsieur le Professeur Pierre DIEMUNSCH,

Je vous remercie de votre encadrement depuis mon internat jusqu'à maintenant et de la confiance que vous m'avez toujours accordée. Votre enthousiasme concernant les effets antitumoraux potentiels des anesthésiques locaux auront changé ma carrière à jamais.

À Madame le Professeur Hawa Keita-Meyer,

Que vous ayez accepté de juger mon travail est une immense fierté, vous qui êtes pour moi un modèle et que j'admire depuis mon internat.

À Madame le Docteur Marie-Odile Parat,

Vous me faites l'honneur de faire partie de mon jury de thèse et cela est pour moi une véritable chance, comme ce jour où je vous ai rencontrée. Merci de m'avoir ouvert les portes du monde de l'onco-anesthésie.

À Monsieur le Professeur Emmanuel Samain,

Je vous remercie de m'avoir fait l'honneur de juger ce travail.

Soyez assuré de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

À Monsieur le Docteur Yannick Goumon,

Je te remercie de m'avoir fait la faveur de juger cette thèse. Ton enthousiasme et ton dynamisme sont tellement motivants.

À Mme le Docteur Marie-Christine RIO,

Merci de m'avoir ouvert les portes de votre laboratoire de recherche lors de mon internat. Votre encadrement m'a permis d'acquérir une véritable démarche scientifique.

À Madame le Professeur Hélène Beloeil,

Merci pour votre soutien tout au long de ce travail de recherche, vous êtes pour moi un véritable guide.

À Chérif et au Dr Aprahamian, pour leurs aide et conseils,

Au Professeur Namer et à Elisa pour leur aide en métabolomique,

À Julien Pottecher,

Merci pour ta constante disponibilité à mon égard, ton soutien et d'avoir toujours été de bon conseil.

À Gauthier, Pan et Tobias pour tous ces échanges sur l'onco-anesthésie.

À Corinne Wendling,

Je te remercie pour ton aide tout au long de ces années. Tu as toujours su bien me guider et veiller sur moi à l'IGBMC.

À Fabien et Nassim pour leurs conseils avisés, à Madame le Professeur Mathelin et Madame le Professeur Marie-Pierre Chenard pour leur bienveillance. À Toshi-sensei, pour ses éclairages.

À mes co-doctorants, Léa, Laetitia, Amélie (tu vois, je pense à toi, moi !), Thomas, Arthur et Bing, à Massimo et à Célestine. Merci à vous pour tous ces bons moments au labo (et pour Amélie, aussi à la maison !).

À Muriel et Claudine pour leur aide au FACS, à Patricia pour son enthousiasme. À Elvire, Marcel, Yves et Erwan pour leur aide en microscopie. À Betty pour son aide en culture cellulaire. À Céline Keime pour son aide en bioinformatique.

À mon équipe d'anesthésie en gynécologie-obstétrique d'Hautepierre et du CMCO,

merci à tous pour votre soutien indéfectible et de m'avoir dégagé du temps dans cette dernière ligne droite malgré l'adversité. Un grand merci Marie-Hélène, Carole, Adeline, Valentina, Ianina, Rita, Chafef, Claudia, Vincent, Rottoto, Liviu, Guillaume et même Antoine-qui-nous-

a-lâché ! À Géraldine, Annie, Thomas, Benji pour votre bienveillance, à Maryse, toujours prête à m'aider. À Hortense, qui me manque.

À Gabrielle et Sandrine, toujours là pour m'aider.

À toute l'équipe de l'EA 3072, qui a vu mes premiers pas en recherche et en particulier à Anne-Laure, pour ton soutien et ton amitié.

À tous ceux qui m'ont formée, que j'ai formés et aux patients qui ont fait de moi qui je suis aujourd'hui.

À Corinne, Hong-An et Carole pour toutes ces années d'externat,

À Claire, Camille, Cécile, Baptiste, Thibault, membres fondateurs de la Clinique des Maîtres du Monde,

À Julie, Martial, Mihaela, Mihary, Ivania, Jérôme, Isabelle, Benjamin,

Merci pour toutes ces preuves d'amitié ces derniers temps !

À Quynh-Anh, mon autre soeur

À bà nội,

À Thiên-Thanh et Thiên-Anh,

À mon père,

À Benoît, avec tout mon amour,

Merci pour ton soutien sans faille et ta patience.

À Héloïse et Corentine, mes lidocaïnes à moi,

« *Toute la science du monde ne vaut pas les larmes des enfants.* » a écrit Dostoïevski... Merci d'avoir fait preuve de patience lorsque je me consacrais à ce travail. J'espère que vous serez toujours autant fière de moi que je suis fière de vous.

En mémoire de ma mère et de ma grand-mère.

Ce travail est soutenu par un contrat de recherche de la Société Française d'Anesthésie et de Réanimation, merci au conseil scientifique de la SFAR pour la confiance témoignée.

Table des matières

Liste des abréviations	9
Liste des illustrations	10
Liste des publications et des communications	13
Avant-propos.....	17
Introduction.....	18
Le cancer du sein : premier cancer féminin	19
Épidémiologie	19
Processus d'oncogenèse	19
Classification moléculaire des cancers du sein	20
Prise en charge thérapeutique	21
La période périopératoire est une période à haut risque.....	25
Théories des métastases.....	25
Métastases d'origine périopératoire ?	26
Effet de l'anesthésie sur le cancer	28
Effet des techniques anesthésiques sur le cancer	29
Effets des principaux médicaments utilisés en anesthésie sur la progression tumorale.....	33
Les anesthésiques locaux	53
Propriétés physico-chimiques des anesthésiques locaux	53
Pharmacocinétique des anesthésiques locaux	53
Pharmacodynamie des anesthésiques locaux	55
Action au niveau du canal sodique	55
Toxicité des anesthésiques locaux	57
Allergies aux anesthésiques locaux.....	58
Utilisation des solutions d'émulsion lipidique en cas d'intoxication systémique aux anesthésiques locaux	58
Conduite à tenir en cas d'intoxication aux anesthésiques locaux	59
La lidocaïne.....	61
Mécanismes d'action de la lidocaïne	61
Pharmacocinétique de lidocaïne	62
Anesthésiques locaux et chirurgie mammaire	64
Utilisation clinique de la lidocaïne en systémique	64
Infiltration péricicatricielle.....	65
Instillation d'AL à travers les drains de Redon.....	65

Bloc paravertébral	66
Les blocs pectoraux.....	66
Résultats.....	68
Objectifs de la thèse	69
Effets antitumoraux de la lidocaïne sur des cellules de cancer du sein : étude in vitro et in vivo 70	
Études des mécanismes moléculaires d'action antitumorale de la lidocaïne.....	81
APPROCHE GLOBALE	81
Optimisation des expériences.....	81
Qu'est-ce que le découplage mitochondrial ?	85
RNA-seq	97
Modification de l'empreinte métabolomique par la lidocaïne	127
Analyse de l'expression protéique	133
Approche globale : conclusion	139
APPROCHE PAR GENE CANDIDAT	141
Surexpression des canaux sodiques voltages dépendant dans le cancer du sein	141
Génération de clones de MDA-MB-231 ne surexprimant plus le canal sodique voltage-dépendant.....	141
Croissance cellulaire	142
Viabilité des cellules.....	143
Test de clonogénicité.....	144
Colonies en soft agar	148
Approche par gène candidat : conclusion.....	151
Discussion et perspectives.....	153
Annexes.....	158
Matériels et méthodes.....	159
Culture cellulaire.....	159
Les lignées cellulaires.....	159
Milieux de culture cellulaire	159
PBS : Phosphate-Buffered Saline	160
Trypsine	160
Supports utilisés en culture cellulaire.....	160
Protocoles utilisés en culture cellulaire	160
Évaluation de la viabilité et prolifération cellulaire	161
Test colorimétrique au MTT	161

Test de viabilité Cell Titer Glo [®]	162
Test de viabilité au cristal violet	163
Test de clonogénicité.....	163
Test de soft agar	164
Test d'adhésion cellulaire.....	164
Évaluation du profil métabolomique par analyse RMN HRMAS.....	164
Préparation des échantillons	164
Équipement et conditions expérimentales.....	165
Séquences d'impulsions utilisées.....	165
Extraction d'ARN.....	167
Western blot.....	168
Extraction protéique	168
Migration en gel SDS-PAGE.....	168
Immunoblot	168
Liste d'anticorps.....	169
Cytométrie de flux	169
FITC annexine V	169
Dosage du cholestérol et de la sphingomyéline membranaires par FACS.....	169
Génération de clones de MDA-MB-231 ne surexprimant plus le canal sodique voltage-dépendant	169
Cellules HEK293T	169
Production lentivirale	170
Infection lentivirale	171
Analyses statistiques.....	171
Rapport d'analyse du RNAseq.....	172
Références bibliographiques	184

Liste des abréviations

AG : anesthésie générale
AIVOC : Anesthésie intraveineuse à objectif de concentration
AL : Anesthésiques locaux
ALR : Anesthésie locorégionale
ASA : American Society of Anesthesiologists
ATP : Adénosine triphosphate
bFGF : basic fibroblast growth factor
BPV : bloc paravertébral
CRHF : facteur de libération de corticotropine
CTC : cellules tumorales circulantes
CTD : cellules tumorales disséminées
COX-2 : cyclooxygénase-2
DMSO : diméthylsulfoxyde
EGFR : récepteur de l'EGF (Epidermal Growth Factor)
EL : Emulsion lipidique
ERK : Extracellular signal-regulated kinase
GABA : acide γ -aminobutyrique
HER2 : Human Epidermal growth factor Receptor de type II
HIF : Hypoxia Inducible Factors
HUVEC : cellules endothéliales de veine ombilicale humaines
ICAM-1 : Intercellular Adhesion Molecule
IARC : International Agency for Research on Cancer
IL : interleukine
IVSE : Intraveineuse à la seringue électrique
JNK : c-Jun N-terminal kinase
LPS : Lipopolysaccharide
LIDO : Lidocaïne
MAPK : Mitogen activated protein kinases
MEOPA : mélange équimolaire oxygène-protoxyde d'azote 50 %/50 %
MMP : métalloprotéinase
MRD : Minimal Residual Disease
MTT : bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium
N₂O : protoxyde d'azote
NK : cellules natural killer
NF- κ B : nuclear factor-kappa B
NMDA : N-méthyl-D-aspartate
OMS : Organisation mondiale de la Santé
PDGF : platelet-derived growth factor
PGE₂ : prostaglandine E₂
PKC : Protéine kinase C
RCP : réunion de concertation disciplinaire
RE : récepteur aux œstrogènes
RP : récepteur à la progestérone
TNF-alpha : tumor necrosis factor
VEGF vascular endothelial growth factor

Liste des illustrations

Liste des figures

Figure 1 Viabilité des cellules MDA-MB-231 exposées à des doses croissantes de lidocaïne selon technique de MTT.....	82
Figure 2 Comparaison de la viabilité des cellules MDA-MB-231 exposées à des doses croissantes de lidocaïne pendant 4h selon technique de MTT ou de Cell Titer Glo [®]	84
Figure 3 Comparaison de la viabilité des cellules MDA-MB-231 exposées à des doses croissantes de lidocaïne pendant 24h selon technique de MTT ou de Cell Titer Glo [®]	85
Figure 4 Représentation de la chaîne de transport d'électrons et des processus d'oxydoréduction conduisant à la phosphorylation oxydative à travers la membrane interne de la mitochondrie.	87
Figure 5 Représentation de la chaîne de transport d'électrons sur la membrane mitochondriale interne et du phénomène de découplage mitochondrial par l'intermédiaire d'une protéine découplante UCP.	89
Figure 6 Comparaison de la viabilité des cellules selon technique de MTT ou de Cristal Violet.	91
Figure 7 Test clonogénique : variabilité du nombre de colonies formées après exposition à des doses croissantes de lidocaïne.....	92
Figure 8 Adhésion cellulaire des cellules MDA-MB-231 exposées à des doses croissantes de lidocaïne.	93
Figure 9 Croissance indépendante de l'ancrage.....	95
Figure 10 Apoptose.	97
Figure 11 Nuage de point comparant le nombre de transcrits de gènes en moyenne normalisée pour chaque condition (Lidocaïne versus Contrôle).	98
Figure 12 Représentation schématique des interactions récepteurs/matrice extra cellulaire.	106
Figure 13 Représentation schématique de la voie PI3K-AKT.....	106
Figure 14 Représentation schématique de l'adhésion focale.	107
Figure 15 Modulation des voies de signalisation par la lidocaïne	109
Figure 16 Modulation des composants cellulaires par la lidocaïne.....	110
Figure 17 Modulation des processus biologiques par la lidocaïne.....	111
Figure 18 Répression de voies de signalisation par la lidocaïne	112
Figure 19 Répression de processus biologiques après exposition à la lidocaïne.....	113
Figure 20 Représentation graphique des Scores d'enrichissement des 20 ensembles de gènes les plus surexprimés après analyse par GSEA.....	117
Figure 21 Spectre 1D 1H CPMG HRMAS de cellules MDA-MB-231.	128
Figure 22 Exemple d'un spectre 2D 1H-13C HSQC obtenu à partir d'un échantillon de cellules MDA-MB-231 exposées à la lidocaïne	129
Figure 23 représentation de l'analyse du réseau métabolique d'après les résultats ADEMA des cellules MDA-MB-231 exposées à la lidocaïne	131
Figure 24 Analyse de l'expression de protéines AKT, AKT phosphorylé, mTOR et mTOR phosphorylé dans les cellules MDA-MB-231 exposées à des doses croissantes de lidocaïne.....	134

Figure 25 Analyse du taux de FAK phosphorylé dans les cellules MDA-MB-231 exposées à des doses croissantes de lidocaïne.....	135
Figure 26 Analyse de l'expression de la protéine SRC et sa phosphorylation dans les cellules MDA-MB-231 exposées à des doses croissantes de lidocaïne.....	136
Figure 27 Analyse de l'expression de ERK1/2 dans les cellules MDA-MB-231 exposées à des doses croissantes de lidocaïne.....	136
Figure 28 Analyse de l'expression de caspase 3 clivée dans les cellules MDA-MB-231 exposées à des doses croissantes de lidocaïne.....	137
Figure 28 Analyse de l'expression de la Flotilline-1 dans les cellules MDA-MB-231 exposées à des doses croissantes de lidocaïne.....	138
Figure 29 Changement de la composition lipidique des membranes de cellules MDA-MB-231 exposées à la lidocaïne.....	139
Figure 30 Expression protéique du canal sodique voltage-dépendant après transfection lentivale.	142
Figure 31 Croissance cellulaire des lignées MDA-MB-231 shCTL, shSCN5A1 et shSCN5A2	143
Figure 32 Viabilité des cellules MDA-MB-231 selon l'expression du canal sodique voltage-dépendant.	144
Figure 33 Test de clonogénicité des cellules MDA-MB-23 selon l'expression du canal sodique voltage-dépendant.	145
Figure 34 Sensibilité à lidocaïne des cellules MDA-MB-231 en test de clonogénicité en fonction de l'expression du canal sodique voltage-dépendant.	147
Figure 35 Croissance indépendante de l'ancrage des cellules MDA-MB-231 en fonction de l'expression du canal sodique voltage-dépendant.....	149
Figure 36 Sensibilité à lidocaïne des cellules MDA-MB-231 en test de soft agar en fonction de l'expression du canal sodique voltage-dépendant en termes de nombre de colonies.....	150
Figure 37 Sensibilité à lidocaïne des cellules MDA-MB-231 en test de soft agar en fonction de l'expression du canal sodique voltage-dépendant en termes de taille de colonies.	150
Figure 38 Sensibilité à lidocaïne des cellules MDA-MB-231 en test de soft agar en fonction de l'expression du canal sodique voltage-dépendant en termes de périmètre des colonies.....	151
Figure 39 Sensibilité à lidocaïne des cellules MDA-MB-231 en test de soft agar en fonction de l'expression du canal sodique voltage-dépendant en termes d'index de circularité.....	151

Liste des tableaux

Tableau 1 Études référencées sur clinicaltrials.gov sur la récurrence après chirurgie carcinologique en cas d'utilisation d'anesthésiques locaux.....	32
Tableau 2 Identification ENSEMBL et nom des gènes réprimés sous lidocaïne	99
Tableau 3 Identification ENSEMBL et nom des gènes surexprimés sous lidocaïne.....	102
Tableau 4 Effet de la lidocaïne sur les Hallmarks d'après analyse GSEA.	118
Tableau 5 Les 20 processus canoniques les plus régulés à la hausse après l'exposition à la lidocaïne.....	120

Tableau 6 Les 20 processus canoniques les plus régulés à la baisse après l'exposition à la lidocaïne.....	120
Tableau 7 Les 20 processus en termes GO dont les gènes sont dérégulés par la lidocaïne.....	121
Tableau 8 Les 20 processus cellulaires (termes GO) dont les gènes sont dérégulés par l'exposition à la lidocaïne.	123
Tableau 9 Comparaison des résultats de l'expression de gènes du RNA-seq avec les données de la littérature.	125
Tableau 10 Valeurs issues de la quantification des différents métabolites exprimés en mM, en moyenne $\pm$ écart- type.....	130
Tableau 11 Séquences des nucléotides incorporés au vecteur pLKO.1-puro pour interférence d'ARN.	170

Liste des publications et des communications

Articles publiés en rapport avec la thèse

1. Chamaraux-Tran T-N, Piegeler T. The Amide Local Anesthetic Lidocaine in Cancer Surgery-Potential Antimetastatic Effects and Preservation of Immune Cell Function? A Narrative Review. *Front Med.* 2017;4:235.
2. Chamaraux-Tran T-N, Mathelin C, Aprahamian M, Joshi GP, Tomasetto C, Diemunsch P, et al. Antitumor Effects of Lidocaine on Human Breast Cancer Cells: An In Vitro and In Vivo Experimental Trial. *Anticancer Res.* 1 janv 2018;38(1):95-105.
3. Chamaraux-Tran T-N, Beloeil H. Solvent Matters! *Anesthesiology.* 2018;128(2):422-3.

Posters en tant que 1er auteur

1. *Metabolomic Impact of Lidocaine on Breast Cancer Cell Lines*, T.N. Chamaraux- Tran, N. Dali-Youcef, E. Ruhland, G.P. Joshi, C.Tomasetto, E. Noll, I.J. Namer, P. Diemunsch, *Anesthesiology* 2018, San Francisco, 2018
2. *Modulation du profil métabolomique d'une lignée de cellules cancéreuses du sein par la lidocaïne*, T.N. Chamaraux- Tran, N. Dali-Youcef, E. Ruhland, G.P. Joshi, C.Tomasetto, E. Noll, I.J. Namer, P. Diemunsch, *Congrès de la Société Française d'Anesthésie et de Réanimation*, Paris, 2018
3. *Safety of intraperitoneal injection of liposomal bupivacaine in rats*, T.N. Chamaraux-Tran, F. Marchegiani, G. Bischoff, M. Aprahamian, G. Averous, G. Joshi, P. Diemunsch, CY Akladios, *4th Global conference on Perioperative Medicine. Care of the Cancer Patient*, London, 2016
4. *Anti-tumor effects of Lidocaine on various breast cancer cell lines: an in vitro and in vivo study*, T.N. Chamaraux-C. Akladios, M. A. Charton, M.C. Rio, C. Mathelin, C. Tomasetto, P. Diemunsch, *Congrès du 40^{ème} anniversaire de la Société Internationale de Sénologie*, Strasbourg, 2016
5. *Pratique autonome des anesthésies locales par les internes de spécialité chirurgicale : enquête dans le Grand Est*, T.N. Chamaraux-Tran, L. Strasbach, E. Noll, A. Charton, P. Diemunsch, *Session encadrée de communications libres : Internes et anesthésie-réanimation, congrès de la Société Française d'Anesthésie et de Réanimation*, Paris, 2016

6. *Lidocaine inhibits peritoneal proliferation of breast cancer cells but not ovarian cancer cell*, T.N. Chamaraux-Tran, C. Akladios, A. Charton, M. Aprahamian, C. Tomasetto, C. Mathelin, P. Diemunsch. Anesthesiology 2015, San Diego, 2015
7. *La lidocaïne inhibe in vivo la prolifération péritonéale de cellules de cancer mammaire mais pas ovarien*, T.N. Chamaraux-Tran, C. Akladios, M. Aprahamian, A. Charton, C. Tomasetto, C. Mathelin, Pierre Diemunsch. Congrès de la Société Française d'Anesthésie et de Réanimation, Paris, 2015
8. *In vitro effects of Lidocaine on viability and migration of various breast cancer cell lines*, T.N. Chamaraux-Tran, A. Charton, M.C. Rio, C. Mathelin, C. Tomasetto, P. Diemunsch. 3rd Global conference on Perioperative Medicine. Care of the Cancer Patient, Amsterdam, 2015
9. *Anti-tumor effect of lidocaine on human breast cancer cells but not on ovarian cells in vivo*, T.N. Chamaraux-Tran, C. Akladios, M. Aprahamian, C. Tomasetto, C. Mathelin, P. Diemunsch. 3rd Global conference on Perioperative Medicine. Care of the Cancer Patient, Amsterdam, 2015
10. *Anti-tumor effect of lidocaine on various breast cancer cells*, T.N. Chamaraux-Tran, A. Charton, E. Noll, J. Pottecher, M.C. Rio, B. Geny, C. Mathelin, C. Tomasetto, P. Diemunsch. 1st Congress of Physiology and Integrative Biology (CPBI) and 84th Congress of French Physiological Society (SFP), Strasbourg, 2015

Communications orales nationales

1. *La lidocaïne inhibe in vivo la prolifération péritonéale de cellules de cancer mammaire mais pas ovarien*, T.N. Chamaraux-Tran, C. Akladios, M. Aprahamian, A. Charton, C. Tomasetto, C. Mathelin, Pierre Diemunsch. Session encadrée de communications libres : ALR, congrès de la Société Française d'Anesthésie et de Réanimation, Paris, 2015
2. *Pratique autonome des anesthésies locales par les internes de spécialité chirurgicale : enquête dans le Grand Est*, T.N. Chamaraux-Tran, L. Strasbach, E. Noll, A. Charton, P. Diemunsch, Session encadrée de communications libres : Internes et anesthésie-réanimation, congrès de la Société Française d'Anesthésie et de Réanimation, Paris, 2016
3. *ALR : Une prévention de la récurrence des cancers ?*, T.N. Chamaraux-Tran, session à thème ALR et outcomes, congrès de la Société Française d'Anesthésie et de Réanimation, Paris, 2018
4. *ALR et Adjuvants, lesquels ? comment ?*, T.N. Chamaraux-Tran, ESRA European-Day, 2ème Congrès National d'Actualisation en ALR, Nancy, 2019

Communications orales internationales

1. *Metabolomic Impact of Lidocaine on Breast Cancer Cell Lines*, T.N. Chamaraux- Tran, N. Dali-Youcef, E. Ruhland, G.P. Joshi, C.Tomasetto, E. Noll, I.J. Namer, P. Diemunsch, Session Track: Fundamentals of Anesthesiology (FA), Young Investigator: Basic Science, Anesthesiology 2018, San Francisco, 2018
2. *Metabolomic Impact of Lidocaine on Breast Cancer Cell Lines*, T.N. Chamaraux- Tran, Workshop on Fundamental research in breast cancer, 20th World Congress of Senologic International Society on Breast Healthcare, Strasbourg 2018

« L'anesthésique n'est donc pas un poison spécial du système nerveux : il anesthésie tous les éléments, tous les tissus en engourdissant, en arrêtant momentanément leur irritabilité nutritive. »

Claude Bernard, 1875

Avant-propos

Treize ans se sont déjà écoulés depuis la publication d'une petite étude rétrospective suggérant un effet protecteur de l'anesthésie locorégionale contre les récidives tumorales après chirurgie carcinologique mammaire (1). Petite étude qui a ouvert un nouveau pan de recherche en anesthésie. Parallèlement aux études cliniques prospectives en cours dont le but est de confirmer cet effet protecteur, des études fondamentales s'attachent à découvrir les mécanismes sous-tendant cet effet. Cliniciens et chercheurs travaillent ainsi en tandem pour faire évoluer la prise en charge périopératoire des patients opérés pour cancer.

En tant qu'anesthésiste-réanimateur dans un service de gynécologie-obstétrique, c'est tout naturellement que je me suis intéressée aux effets de l'anesthésie en chirurgie carcinologique mammaire et en particulier aux effets directs de la lidocaïne sur la progression tumorale.

Après avoir fait des rappels généraux sur le cancer du sein, j'explique dans une revue narrative pourquoi la période périopératoire est une période à haut risque dans la prise en charge des patients atteints de cancer puis comment l'anesthésie peut jouer un rôle dans ce contexte et notamment quels sont les effets des anesthésiques locaux dans ce contexte. Une revue de la littérature sur les effets potentiellement anti-tumoraux de la lidocaïne termine l'introduction.

Le travail expérimental sera présenté en 3 parties :

- Je me suis tout d'abord attachée à montrer un effet antitumoral de la lidocaïne sur des cellules de cancer du sein *in vitro* puis *in vivo*,
- La seconde partie s'attache à mettre en évidence des mécanismes moléculaires expliquant les effets de la lidocaïne sur le cancer du sein par une approche globale s'aidant d'outils « omics »,
- La troisième partie teste l'hypothèse d'une action de la lidocaïne sur le canal sodique voltage-dépendant surexprimé dans une lignée de cellules cancéreuses dites triple-négatives.

Enfin la discussion permettra une ouverture sur les effets potentiels de l'utilisation de la lidocaïne en chirurgie carcinologique mammaire.

Introduction

Le cancer du sein : premier cancer féminin

Épidémiologie

Avec 18 078 957 nouveaux cas et 9 555 027 décès en 2018, le cancer reste la première cause de mortalité dans le monde. Avec des projections dépassant les 16,3 millions de décès en 2040, c'est un enjeu majeur de santé publique (Source Globocan 2018, OMS).

Avec 58 968 nouveaux cas en France métropolitaine en 2017 (sources Institut national du cancer INCa), le cancer du sein est le premier cancer féminin en termes d'incidence. Bien qu'il y ait eu une diminution des taux d'incidence et de mortalité de l'ordre de -1,5% par an en moyenne entre 2005 et 2012, il est toujours la cause de 11 883 décès estimés en 2017, soit 18,2 % des décès féminins par cancer, et près de 8 % de l'ensemble des décès par cancer, tous sexes confondus, avec un âge médian au moment du décès de 73 ans. La survie nette standardisée sur l'âge s'est améliorée, elle est actuellement de 87 % à 5 ans et 76 % à 10 ans.

En France, en 2015, il a été recensé 75 327 exérèses de cancer du sein¹ et donc tout autant d'actes anesthésiques en lien avec cette chirurgie.

Processus d'oncogénèse

L'oncogénèse est un processus complexe qui fait intervenir plusieurs facteurs. Deux théories s'affrontent de manière dichotomique : la théorie des mutations somatiques ou *somatic mutation theory* (SMT) où l'accumulation des mutations dans le génome d'une cellule normale unique est responsable des transformations d'une telle cellule en un néoplasme et la théorie du champ d'organisation tissulaire ou *tissue organization field theory* (TOFT) où le cancer est une maladie des tissus, où les cancérigènes et les mutations dans la lignée germinale peuvent altérer les interactions normales entre le stroma et l'épithélium adjacent, l'état par défaut de toutes les cellules étant la prolifération (2). Toujours est-il que l'oncogénèse reste un mécanisme progressif résultant d'événements épigénétiques et génétiques favorisant l'acquisition de propriétés particulières aux cellules cancéreuses. En 2000, Hanahan et Weinberg ont déterminé dans une revue les six caractéristiques des cellules cancéreuses ou *Hallmarks* du cancer (3) :

- l'autonomie en signaux de croissance
- l'insensibilité aux signaux inhibiteurs de la croissance
- la capacité à échapper à l'apoptose

¹ La chirurgie ambulatoire dans le cancer – Évolutions de 2010 à 2015, Fiche d'analyse, collection Les Données, INCa, avril 2018

- la capacité à se répliquer indéfiniment
- l'induction de l'angiogenèse
- la capacité à former des métastases.

Ces *hallmarks* ont été réactualisés en 2011 et quatre autres caractéristiques s'y sont ajoutées (4):

- la dérégulation du métabolisme énergétique cellulaire
- la capacité à échapper à la surveillance par le système immunitaire
- l'induction de l'inflammation
- l'instabilité et les mutations du génome.

Schématiquement, le processus d'oncogenèse comprend plusieurs étapes : une phase d'initiation où la cellule va acquérir des propriétés de « *hallmarks* », une phase d'expansion clonale où la tumeur primitive va croître sous le contrôle de l'environnement et induire l'angiogenèse pour assurer l'arrivée de nutriments et d'oxygène nécessaires à son développement puis une phase de progression où des cellules tumorales vont acquérir des propriétés invasives et migratoires. Dans la phase d'invasion et de métastases, les cellules cancéreuses vont réorganiser le microenvironnement et dégrader les composants de la matrice extracellulaire pour s'échapper dans la circulation vasculaire ou lymphatique.

Classification moléculaire des cancers du sein

Il existe différentes classifications des cancers du sein (clinique, histologique, moléculaire). Dans le cadre de cette thèse, nous nous attarderons sur la classification moléculaire issue de la conférence de consensus de Saint-Gallen dont peuvent découler les thérapeutiques (5). Les cancers du sein sont ainsi classés dans 3 sous-groupes principaux les *luminal-like*, les HER2+ et les triple-négatifs.

Luminal-like

Ces tumeurs surexpriment le récepteur aux œstrogènes (RE) et/ou le récepteur à la progestérone (RP) et représentent 60% des cancers diagnostiqués. Elles possèdent un profil moléculaire proche de celui des cellules luminales différenciées des canaux mammaires et expriment des marqueurs luminaux comme les cytokératines 8/18 et 19. Il existe trois sous-types :

- *luminal A* : ce groupe RE+/RP+/HER2-, de statut prolifératif faible (Ki67 faible), est traité par hormonothérapie exclusive sauf si facteurs de risque associés.
- *luminal B/HER2-* : ce groupe RE+ et/ou RP+, HER2-, de statut prolifératif fort (Ki67 fort), est traité par hormonothérapie +/- chimiothérapie.

- *Luminal B/HER2+* : ce groupe RE+ et/ou RP+, HER2+, de statut prolifératif indifférent, est traité par hormonothérapie, chimiothérapie et trastuzumab.

HER2+

Ces tumeurs surexpriment le récepteur HER2 (Human Epidermal growth factor Receptor de type II) et seraient issues d'un progéniteur luminal tardif. Elles concernent environ 20% des cancers. Initialement de très mauvais pronostic, elles bénéficient aujourd'hui de thérapies ciblées par anticorps dirigés contre le récepteur HER2, par exemple l'herceptin (Trastuzumab ®). Il existe deux sous-types :

- *Luminal B/HER2* : ce groupe RE+ et/ou RP+, HER2+, est traité par hormonothérapie, chimiothérapie et trastuzumab.
- *HER2+ non luminal* : ce groupe RE-/RP-/HER2+ est traité par chimiothérapie et trastuzumab.

Triple-négatif

Ces tumeurs n'expriment aucun des trois récepteurs : ni RE, ni RP, ni HER2, d'où leur nom de triple négatif. Elles expriment au moins un des marqueurs des cellules basales comme les cytokératines 5 et 6, la vimentine. Elles représentent 10% des cancers du sein. De prise en charge difficile, ces tumeurs de mauvais pronostic sont traitées par chimiothérapie. Il existe deux sous-types :

- *basal-like* : ces tumeurs seraient issues de progéniteurs luminaux, et non basaux. Elles représentent un sous-groupe moléculaire hétérogène de tumeurs.
- *claudin-low* : ces tumeurs seraient issues des cellules souches mammaires. Elles ont une expression faible des claudines, et de l'E-cadhérine, caractéristique de la transition épithélio-mésenchymateuse.
- *Normal-like* : de pronostic intermédiaire, ces tumeurs présentent un profil moléculaire proche du tissu mammaire normal. Ce sous-groupe est remis en question du fait d'une grande proportion de cellules épithéliales normales.

Prise en charge thérapeutique

La prise en charge des cancers du sein est multidisciplinaire. Elle s'appuie sur des référentiels issus de groupe de travail pluridisciplinaires. Nous résumerons ici quelques principes en nous appuyant sur le référentiel des réseaux régionaux de cancérologie d'Alsace (CAROL), de Bourgogne (ONCOBOURGOGNE), de Champagne-Ardenne (ONCOCHA), de Franche-

Comté (ONCOLIE) et de Lorraine (ONCOLOR), qui tiennent compte des recommandations nationales et qui sont disponibles sur le site OncoLogiK².

Les outils thérapeutiques

La chirurgie

Exérèse de la tumeur primaire

La chirurgie pour cancer du sein peut être conservatrice. Il s'agit de l'exérèse complète de la lésion cancéreuse, avec obtention de berges saines et d'un résultat esthétique acceptable. Elle n'est possible que si la tumeur est unique ou assez petite ou dans le cas de deux foyers proches et après accord de la patiente.

La chirurgie non conservatrice consiste en une mastectomie totale. Il s'agit de retirer la totalité de la glande mammaire.

Une chirurgie reconstructrice (ou oncoplastie) peut être associée à ces gestes.

Lymphadénectomie sélective et curage axillaire

En cas de carcinome invasif, la chirurgie mammaire s'accompagne d'un geste chirurgical axillaire homolatéral, appelé « technique du ganglion sentinelle ». Il s'agit de repérer par double détection isotopique et colorimétrique les premiers ganglions recevant le drainage lymphatique axillaire du sein et de les retirer pour analyse extemporanée. En cas d'envahissement de ces ganglions sentinelles, un curage axillaire sera effectué par exérèse d'au moins 10 ganglions.

La radiothérapie

La radiothérapie complète la chirurgie. Elle a pour objectif d'éliminer les cellules cancéreuses résiduelles du lit tumoral par émissions de rayons X à haute énergie émis en faisceau. Elle peut être localisée au niveau de la glande mammaire, de la paroi thoracique ou des aires ganglionnaires selon les facteurs de risques.

La chimiothérapie

La chimiothérapie est un cocktail de médicaments cytotoxiques dont le but est d'inhiber la prolifération et entraîner la mort cellulaire. Non sélective, elle touche les cellules cancéreuses mais également les cellules saines et est à l'origine d'effets secondaires importants. De ce fait, l'administrer d'une chimiothérapie doit être discutée en réunion de concertation disciplinaire (RCP) en prenant en compte la balance bénéfice/risque en diminution du risque de rechute locorégionale ou à distance et les effets indésirables. Les protocoles actuels comportent 4 à 8 cures, espacées de 21 jours. Les schémas thérapeutiques les plus souvent utilisés sont :

² <http://oncologik.fr/referentiels/interregion/sein-principes-de-prise-en-charge>

- 6 FEC 100: 5-fluoro-uracile (5FU) + epirubicine + cyclophosphamide
- 3 FEC 100 puis 3 TXT : TXT = Taxotère® = docétaxel
- 4 AC : Adryamicine® (= doxorubicine) + cyclophosphamide
- 4 AC puis 4 TXT
- 6 TAC : Taxotère® = docétaxel + Adryamicine® (= doxorubicine) + cyclophosphamide.

L'hormonothérapie

Une hormonothérapie est prescrite en cas de tumeurs hormonosensibles (RE + et/ou RP+) pour une durée de 5 ans. Elle a pour but soit d'inhiber la synthèse d'estrogène, soit de bloquer les récepteurs hormonaux.

Avant la ménopause, les anti-estrogènes sont indiqués. Ils inhibent de façon compétitive la liaison de l'œstradiol à ses récepteurs. Le tamoxifène (Nolvadex®) est indiqué première intention.

Après la ménopause, les anti-aromatases sont indiqués. Ils inhibent l'aromatase, bloquant la conversion des androgènes en estrogènes. L'exemestane (Aromasine®) est un inhibiteur stéroïdien, il agit comme un analogue des androgènes. L'anastrozole (Arimidex®) et le létrozole (Femara®) sont des inhibiteurs non stéroïdiens, qui se lient à l'enzyme de manière non compétitive.

La castration chirurgicale par ovariectomie peut être discutée en cas de contre-indication à l'hormonothérapie.

Thérapie ciblée

Les thérapies ciblées anti-HER2 ont amélioré le pronostic des tumeurs HER2+.

Le trastuzumab (Herceptin®) est un anticorps monoclonal humanisé ciblant la partie extracellulaire du récepteur HER2. Il est indiqué en traitement adjuvant après chirurgie, chimiothérapie et radiothérapie ou en traitement du cancer du sein métastatique.

Le lapatinib (Tyverb®) est un inhibiteur de tyrosine kinase qui inactive le récepteur HER2. Il est indiqué dans les cancers du sein métastatiques avec localisation cérébrale.

Stratégie thérapeutique

La stratégie thérapeutique du cancer du sein est validée en RCP et va schématiquement dépendre du statut *in situ*, invasif ou métastatique de la maladie. Elle prend en compte la biologie moléculaire des tumeurs et obéit à des arbres décisionnels établis par des réunions de consensus.

Cancers *in situ*

La chirurgie conservatrice ou non conservatrice est proposée d'emblée. Un geste axillaire peut être associé en cas de lésion palpable ou de suspicion de micro-invasion. La chirurgie est suivie d'une radiothérapie de la glande mammaire.

Cancers invasifs

Si la tumeur est supérieure à 3cm ou en cas de cancer du sein inflammatoire, un traitement néo-adjuvant par chimiothérapie, hormonothérapie +/- thérapie ciblée est parfois nécessaire pour diminuer la taille de la tumeur avant la chirurgie. Celle-ci est conservatrice ou non conservatrice, et accompagnée d'un geste axillaire homolatéral. La chirurgie est contre-indiquée en cas de cancer du sein inflammatoire. En cas de chirurgie conservatrice, la radiothérapie de la glande mammaire est systématique. Elle conserve certaines indications en cas de mastectomie totale. Selon les facteurs pronostiques associés, elle comprend l'irradiation de la paroi thoracique et/ou les aires ganglionnaires.

Le traitement adjuvant sera guidé par l'examen anatomopathologique des pièces opératoires :

- traitement par chimiothérapie s'il n'y a pas de surexpression des récepteurs hormonaux et HER2
- traitement par hormonothérapie +/- chimiothérapie en cas de surexpression des récepteurs hormonaux et sans surexpression d'HER2
- traitement par chimiothérapie + thérapie ciblée anti-HER2 en cas de surexpression des récepteurs HER2 sans surexpression des récepteurs hormonaux
- traitement par chimiothérapie + thérapie ciblée + hormonothérapie en cas de surexpression des hormonaux et HER2.

Cancer du sein métastatique

Le traitement de la maladie métastatique n'est pas curatif et a pour but de préserver la qualité de vie. De ce fait, la chirurgie n'est pas indiquée. Les biopsies de la tumeur primaire et des métastases peuvent guider la stratégie thérapeutique. Un traitement par radiothérapie peut être proposé après RCP, il peut être locorégional ou irradier les aires envahies en cas de métastases cérébrales, osseuses, hépatiques ou pulmonaires. Quatre situations sont possibles en cas de chimiothérapie, hormonothérapie et/ou thérapie ciblée :

- Tumeurs triples négatives (récepteurs HER2-/RH-) : traitement par chimiothérapie
- Tumeurs lumineuses (récepteurs HER2-/RH+) : traitement par hormonothérapie +/- chimiothérapie en cas d'évolution rapide

- Tumeurs HER2 non lumineales (récepteurs HER2+/ RH-) : traitement de 1^{ère} intention par taxanes +trastuzumab, ou anthracycline + taxane ; en 2^{nde} ligne capecitabine + lapatinib
- Tumeurs HER2 lumineales (récepteurs HER2+/RH+) : traitement par chimiothérapie + trastuzumab ou hormonothérapie + trastuzumab.

La période périopératoire est une période à haut risque

L'exérèse de la tumeur primaire est donc un élément essentiel du traitement dans le cancer du sein non métastatique. Mais la période périopératoire peut être une période critique dans la progression tumorale. En effet, la récurrence après chirurgie carcinologique mammaire suit un modèle bimodal : si 50-80% des récurrences (locales ou à distances) se produisent entre 3 à 6 ans après chirurgie, on retrouve un pic précoce dans les 18 mois postopératoires laissant à penser que ce pic pourrait être favorisé par l'agression physique que peuvent provoquer l'exérèse chirurgicale et l'anesthésie (6–10). Or, l'apparition de métastases précoces après chirurgie mammaire est source de plus mauvais pronostic comparée aux situations avec métastases d'emblée ou d'apparition tardive (11,12).

Théories des métastases

Plusieurs théories ont été développées afin d'expliquer le rôle favorisant de la chirurgie dans l'apparition de métastases et se trouvent dans les théories des processus métastatiques eux-mêmes (13) :

- Théorie du terreau et de la graine (*soil and seed*) (14,15) : développée par Paget à la toute fin du XIX^{ème} siècle, celle-ci est basée sur ses observations sur les métastases et les différents modèles de diffusion du cancer après analyse post-mortem de 735 cas de cancer du sein. La distribution des métastases se faisant préférentiellement au niveau du foie, du cerveau et des poumons, contrairement à d'autres cancers comme celui de la prostate qui n'avait tendance à s'étendre seulement aux os, il en conclut une théorie de « la dépendance de la graine (la cellule cancéreuse) par rapport au terreau (l'organe touché par la métastase) ».
- La théorie du filtre et du flux : défendue par Ewing dans les années 1920, il s'agit d'une théorie mécanique où le siège des métastases dépend des voies de drainage veineux : le drainage par la veine porte augmentant le risque de métastase hépatique, celui par les veines caves les métastases pulmonaires et le drainage par la veine pulmonaire les métastases systémiques (cerveau, os)(16,17).

- La théorie du *homing* ou nostocytose qui est la faculté d'une cellule circulante de reconnaître le site où elle peut se multiplier ou acquérir de nouvelles fonctions, grâce à la formation de pré-niches (18–20). Cette théorie allie les deux précédentes, partant du constat notamment que des tissus très vascularisés comme la rate et les muscles sont rarement le siège de métastases (rate, muscle).
- Les voies de dissémination des métastases sont la voie hématogène (17), lymphatique (21) et périneurale (22).

Métastases d'origine périopératoire ?

Ces processus métastatiques pourraient être favorisés pendant la période périopératoire. En effet, cette période courte mais charnière dans le parcours thérapeutique du patient pourrait paradoxalement favoriser l'expansion de la maladie (23,24) en recréant des conditions favorables aux métastases.

Exérèse chirurgicale et persistance de cellules tumorales

L'exérèse chirurgicale de la tumeur primaire est la pierre angulaire de la majeure partie des tumeurs solides dont le cancer du sein. Le défaut de marges de résection saines favorise les récurrences locorégionales après chirurgie conservatrice du sein (25–27). La présence de maladie résiduelle ou MRD (Minimal Residual Disease) qui comprend la présence de cellules tumorales circulantes (CTC) ou disséminées (CTD) fait également partie des facteurs de mauvais pronostic dans ce type de cancer (28). Or, plusieurs études ont montré que le geste chirurgical libérait des CTC dans la circulation sanguine ou augmentait leur taux lorsqu'elles étaient déjà présentes en période préopératoire (29–31). Ces CTC sont un facteur pronostique de métastases, leur présence entraînant notamment une stimulation de l'angiogenèse (30). Chez les patientes présentant des métastases avant la chirurgie, l'élévation du taux de CTC en période postopératoire est un facteur pronostique péjoratif indépendant de survie à long terme (32,33). Cette libération de cellules issues de la tumeur primaire au moment de son exérèse pourrait ainsi favoriser la dissémination métastatique à des sites secondaires comme développés dans les différentes théories sur la génération de métastases.

Inflammation, stress périopératoire et progression antitumorale

L'inflammation joue un rôle clé dans la progression tumorale (34). Du fait de nombreux facteurs tels que l'anxiété, le traumatisme tissulaire ou la mise en jeu des mécanismes de nociception, la période périopératoire entraîne une sécrétion importante de catécholamines et de prostaglandines (35,36). Par exemple, les dommages tissulaires liés à la chirurgie entraînent

eux-mêmes une augmentation de prostaglandine PGE2 au niveau de la zone d'exérèse (37). Or les tumeurs mammaires secrètent déjà des taux élevés de prostaglandine PGE2 via l'expression de la cyclooxygénase COX-2 par les cellules cancéreuses elles-mêmes ou le stroma, facilitant la lymphangiogenèse et les métastases lymphatiques par liaison de PGE2 aux récepteurs aux prostaglandines des cellules tumorales, immunitaires ou endothéliales lymphatiques (38). Dans une étude sur le poisson zèbre, PGE2 joue également un rôle dans le recrutement de neutrophiles dans les processus de cicatrisation et stimule la croissance et prolifération de cellules pré-tumorales à proximité (39,40). De même, les récepteurs adrénergiques sont surexprimés dans certaines tumeurs mammaires et jouent un rôle dans le mécanisme d'invasion (41). De plus, presque tous les leucocytes expriment des récepteurs aux catécholamines (42) et aux prostaglandines (43) et des travaux chez la souris ont montré que la fonction des cellules immunitaires pouvait être altérée par les catécholamines et les prostaglandines et que l'inhibition de ces deux mécanismes, par bêtabloquants et inhibiteurs de COX-2 pouvaient prévenir la survenue de métastases (44,45). La période périopératoire pourrait ainsi recréer des conditions favorables à l'expansion de la maladie.

Dysfonction des cellules Natural Killer

Les cellules Natural killer (NK) sont des lymphocytes non-T (CD3-) non-B (CD19-), caractérisés chez l'humain par les marqueurs CD56, CD16 et NK. Elles font partie de la première ligne de défense de l'organisme. Elles sont capables d'éliminer sélectivement les cellules tumorales ou infectées, tout en sécrétant des cytokines qui vont stimuler et orienter la réponse des lymphocytes B et T (46). Or il peut exister une dysfonction des NK au sein de l'infiltrat des tumeurs mammaires assurant une tolérance de ce lymphocyte antitumoral vis-à-vis de la tumeur, sans altération des NK plasmatiques (47). Le geste chirurgical est suivi d'une diminution de l'activité des NK (48). Cette diminution peut atteindre 50% le jour suivant la chirurgie et ne retourner aux valeurs normales qu'au bout d'une semaine (49). Un axe de recherche actuel est la préservation des fonctions cytotoxiques des NK pendant la période

périopératoire (50). Ainsi le « préconditionnement » de ces cellules par le vaccin contre la grippe permet de préserver ces fonctions en cas de chirurgie et diminue le taux de métastases post-opératoires dans un modèle murin (51).

Libération des facteurs de croissance pendant la période périopératoire

L'acte chirurgical est suivi d'une augmentation des facteurs de croissance proangiogéniques tels que le *vascular endothelial growth factor* (VEGF), le *basic fibroblast growth factor* (bFGF), le *transforming growth factor beta* (TGF-beta), l'*heparin-binding epidermal growth factor (EGF)-like growth factor* (HB-EGF) ou encore le *platelet-derived growth factor* (PDGF) (52–54). Ce phénomène est plus marqué au cours la chirurgie carcinologique que lors de l'exérèse de kystes bénins (55). Il favorise la néovascularisation et l'accélération de la croissance de possibles métastases (54).

La réduction des facteurs anti-angiogéniques par l'exérèse chirurgicale

O'Reilly *et al.* avaient montré dès 1994 que l'exérèse de la tumeur primitive pouvait concourir à la croissance et la néovascularisation des métastases dans un modèle murin (56). En effet, l'exérèse de la tumeur était suivie d'une flambée des métastases. Ceci n'était pas expliqué par le stress chirurgical car le groupe témoin bénéficiait d'une incision de la peau et d'une manipulation de la tumeur qui mimait ainsi le geste chirurgical. Ce phénomène d'inhibition serait lié à la sécrétion d'un inhibiteur de l'angiogenèse, l'angiostatine, par la tumeur primitive.

Tous ces facteurs peuvent faire le terreau (*soil*) des cellules restées dans le lit tumoral ou qui auraient pu entrer dans la circulation lors de la mobilisation de la tumeur primaire. Il a été montré dans le contexte de reprise du lit tumoral pour être en marges saines après chirurgie conservatrice du sein, une suractivation des récepteurs HER2 des cellules tumorales persistantes, ce processus pourrait être lié aux déséquilibres de la période périopératoire précédemment évoqués (57). Plus inquiétant, les cas de récurrences de cancer après chirurgie reconstructrices appuient également l'hypothèse d'une réactivation de cellules dormantes par la chirurgie (58).

Effet de l'anesthésie sur le cancer

Contrôler la période périopératoire est donc un enjeu important dans le cancer du sein d'autant plus que cette maladie est de plus en plus considérée comme une maladie d'emblée systémique (59). Il est donc légitime de penser que l'anesthésie peut moduler ce risque. Ainsi plusieurs études se sont intéressées à l'impact des techniques et des drogues de l'anesthésie sur le cancer.

Effet des techniques anesthésiques sur le cancer

Dès 1977, Fried *et al.* avaient observé un taux de survie plus important chez les patientes opérées d'un cancer du sein qui avaient bénéficié d'une anesthésie par halothane *versus* éther (60). Mais c'est depuis l'étude d'Exadaktylos *et al.* (1) que l'on a réellement pris conscience de l'effet potentiel des techniques d'anesthésie sur la survie en post-opératoire d'une chirurgie carcinologique. Cette étude rétrospective et observationnelle incluait 129 patientes ayant subi une mastectomie avec ou sans curage axillaire :

- 50 d'entre elles avaient bénéficié d'un bloc paravertébral (BPV) associé à une AG
- 79 avaient eu une AG et des morphiniques en postopératoire

Le suivi a duré en moyenne 32 mois. Une récurrence ou des métastases ont été trouvées chez 6 % des patientes du groupe ayant reçu le BPV contre 24 % dans le groupe ayant reçu une AG seule. Il a ainsi été suggéré que le BPV pour chirurgie du cancer du sein pouvait réduire le risque de récurrence ou de métastase à distance.

Ces résultats sont concordants avec des études sur l'animal qui ont montré que l'anesthésie locorégionale permettait de diminuer le stress chirurgical et l'incidence des métastases (61,62). Par ailleurs, l'équipe dont fait partie Exadaktylos a montré *in vitro* que le sérum des patientes ayant bénéficié d'une AG par propofol et BPV pour un cancer du sein inhibait la prolifération, mais pas la migration, des cellules tumorales de manière plus importante que celui des patientes ayant reçu une AG par halogénés et morphiniques (63). Donnant une nouvelle dimension aux stratégies de prise en charge de la douleur en périopératoire en chirurgie carcinologique, cette étude a fait l'objet de nombreux débats (64) mais a ouvert la voie vers un nouveau champs de recherche en anesthésie pour chirurgie carcinologique (65). Ce domaine a d'ailleurs gagné le rang de recherche prioritaire dans notre spécialité pour plusieurs sociétés savantes (66,67).

Si des études prospectives randomisées contrôlées sont nécessaires, d'autres études rétrospectives ont montré l'intérêt de l'ALR combinée ou non à une AG dans la survie des patients. Dans la chirurgie pour cancer de la prostate, Biki *et al.* ont montré que les patients ayant bénéficié d'une analgésie péridurale en plus d'une AG avaient un risque moindre de récurrence (68). En revanche, il n'y aurait pas d'effet positif de l'ALR dans le cancer du côlon (69) ou celui de l'utérus (70). Ces études sont malheureusement rétrospectives et donc peu robustes. Des études randomisées, référencées dans www.clinicaltrials.gov sont actuellement en cours, mais les résultats ne sont toujours pas connus, pire certaines ont été retirées ou non réactualisées. Nous les avons identifiées grâce aux mots clés « Regional Anesthesia », « recurrence » et « Cancer » (41 occurrences) et « local anesthetics » et « cancer surgery » (89

occurrences) puis sélectionnées celles dont la survie sans récurrence est soit le critère d'évaluation principal ou secondaire dans le tableau 1.

Début de l'étude	Nom de l'étude	NCT	Promoteur	Type de cancer	Nombre de patients à inclure	Technique d'anesthésie	Durée de survie sans récurrence	Fin estimée	Statut	dernière mise à jour
2007	Regional Anesthesia in Colon Rectal Surgery	NCT00684229	The Cleveland Clinic	colorectal	2500	APD vs morphine IV	5 ans (critère principal)	2022	retiré (faute de recrutement)	juil-05
2007	Regional Anesthesia and Endometrial Cancer Recurrence (ECA/R)	NCT00531349	The Cleveland Clinic	endomètre	1700	APD vs opioïdes	suivi tous les 6 mois	2012	retiré (faute de recrutement)	juil-05
2008	Comparing Local Anesthesia With General Anesthesia for Breast Cancer Surgery	NCT00938171	Mackay Memorial Hospital, Taiwan	sein	40	AL Vs AG	5 ans (critère secondaire)	2011	inconnu	2009
2009	IV Lidocaine for Patients Undergoing Primary Breast Cancer Surgery: Effects on Postoperative Recovery and Cancer Recurrence	NCT01204242	University of Virginia	sein	80	Lidocaïne IVSE vs placebo	5 ans (critère secondaire)	non indiqué	inconnu	août-11
2010	Regional Anesthesia and Lung Cancer Recurrence	NCT01179308	The Cleveland Clinic	poumon	1532 (n'en a recruté que 67)	APD vs opioïdes	5 ans (critère principal)	2013	interrompue du fait du faible taux de recrutement	août-15
2011	Epidural Versus Patient-controlled Analgesia for Reduction in Long-term Mortality Following Colorectal Cancer Surgery (EPICOL)	NCT01318161	Örebro University, Sweden	colorectal	300	APD (anesthésie et analgésie) vs AG	5 ans (critère principal)	2021 (au lieu de 2018)	recrutement en cours	août-18
2011	Randomized Controlled Trial to Assess Blockade of Voltage Gated Sodium Channels During Surgery in Operable Breast Cancer	NCT01916317	Tata Memorial Hospital	sein	1600	injection péritumorale de lidocaïne avant incision Vs	5 ans (critère principal)	12/2023 (au lieu de 2021)	actif, ne recrute plus	déc-18
2012	Analgesia and Pancreatic Cancer Surgery	NCT01929915	National Taiwan University Hospital	pancréas	150	APD vs PCA	1 an (critère secondaire)	2015	inconnu	juil-15
2012	Anesthesia and Cancer Recurrence in Malignant Melanoma	NCT01588847	University Hospital Muenster	mélanome	230	Rachi vs AG	5 ans (suivie globale)	2019	inconnu	juil-05
2013	The Effect of Combined General/Regional Anesthesia on Cancer Recurrence in Patients Having Lung Cancer Resections	NCT02840227	The Cleveland Clinic	poumon	2000	APD vs opioïdes	3 ans (critère principal)	2021	recrutement en cours	nov-18
2014	Epidural Anesthesia/Analgesia and Outcome of Patients After Lung Cancer Surgery	NCT02801409	Peking University First Hospital	poumon	396	APD (anesthésie et analgésie) vs AG + PCA	2 ans (critère principal)	nov-19	actif, ne recrute plus	mars-19
2014	Effects of Postoperative Pain Management on Immune Function After Laparoscopic Resection of Colorectal Cancer	NCT02012244	Severance Hospital	colorectal	100 (finalement 60)	infiltration péricicatricielle	1 an (critère secondaire)	2014	complet	janv-16
2015	the Influence of General Anesthesia on Tumor Metastasis and Recurrence	NCT02474511	Renji Hospital	foie	300	AL vs AG	3 ans (critère principal)	2019	inconnu	juin-15

2016	Anesthesia and Postoperative Outcome in Colorectal Cancer Patients	NCT02786329	Institutul Regional de Gastroenterologie & Hepatologie Prof. dr. Octavian Fodor	colorectal	450	Lido IVSE	5 ans (critère principal)	2021	recrutement en cours	août-18
2017	USG PECS vs LIA for Breast Cancer Surgery	NCT03555227	National Health Service, United Kingdom	sein	110	PECS2 vs infiltration cicatricielle	1 an (critère secondaire)		complète	nov-18
2017	PECS-2 for Breast Surgery	NCT03117894	Umeå University	sein	200	PECS2 par ropivacaine vs AG seule	3 à 5 ans (critère secondaire)	2018	inconnu	mai-17
2017	Effects of Regional Nerve Block on Cancer Recurrence	NCT03134430	The first affiliated hospital of nanchang university	côlon, rectum, foie, poumon	400	ALR vs placebo	5 ans (critère principal)	2023	actif, ne recrute plus	mai-18
2017	Evaluation of Post-operative Biochemical Recurrence in Patients Submitted to Radical Prostatectomy Under General Opioid-free Anesthesia Compared to Conventional General Anesthesia	NCT03212456	Instituto do Cancer do Estado de São Paulo	prostate	200	TAP (OFA) vs opioïdes	2 ans (élévation PSA, critère principal)	2020	recrutement en cours	juil-17
2018	The Difference of Two Year Recurrence Rate According to Anesthetic Method During Transurethral Resection of Bladder Mass in Patients With Non-muscle Invasive Bladder Cancer: Prospective, Randomized, Clinical Phase II Study	NCT03597087	Seoul National University Hospital	vessie	289	Rachi vs AG	2 ans (critère principal)	2022	n'a pas encore démarré	juil-18
2019	GENe Expression After Regional or General ANesthesia in Patients Undergoing Breast Cancer Surgery (GENEXAN)	NCT03779685	Azienda Ospedaliera San Gerardo di Monza	sein	100	BPV vs AG	/6 mois pendant 7 ans	2021	n'a pas encore démarré	déc-18
2019	The Effect of Analgesic Modalities on Long Term Outcomes Following Open Liver Resection (LIVER 3)	NCT03813953	University of Edinburgh	foie	160	APD vs infiltration péricicatricielle	5 ans (critère secondaire)	2019	n'a pas encore démarré	janv-19

Tableau 1 Études référencées sur clinicaltrials.gov sur la récurrence après chirurgie carcinologique en cas d'utilisation d'anesthésiques locaux.

Parmi ces études, il faut noter celle de l'équipe d'Exadaktylos, qui propose le même travail mais de façon prospective et dont le protocole a déjà fait l'objet d'une publication (71). Cette nouvelle étude prospective rencontre des difficultés logistiques : la principale est l'étalement dans la durée du recrutement sur 10 ans. Débuté en 2008, ce protocole prenait en compte les taux de récurrence de l'époque, or, depuis, l'amélioration de la prise en charge en cancérologie mammaire a drastiquement fait diminuer ce taux. Un nouveau calcul basé sur le taux de récurrence actuel a montré qu'il fallait inclure deux fois plus de patientes, prolongeant ainsi la phase de recrutement et retardant d'autant la possibilité d'exploiter des résultats de survie à 5 ans. Ceci est d'autant plus dommage qu'une étude ancillaire avait montré des cellules tumorales exposées *in vitro* au sérum de patientes de cette étude proliféraient moins bien en cas d'anesthésie associée au BPV qu'en cas d'AG seule (72). Par ailleurs, une autre critique à cette étude prospective concerne la grande différence des protocoles d'anesthésie des deux groupes. En effet, le groupe bénéficiant du BPV emploie du propofol comme agent hypnotique entretenant l'anesthésie générale alors que le groupe contrôle est sous anesthésie générale balancée par halogénés. Or, des études *in vitro* ont montré que les halogénés favorisaient la prolifération cellulaire (73) alors que le propofol aurait un effet inhibiteur (74). Il sera ainsi difficile de faire la part des choses entre l'effet du propofol et du bloc paravertébral. De même, de nouvelles techniques d'ALR sont apparues depuis l'élaboration du protocole de recherche : les PEC blocs et le retour de la lidocaïne intraveineuse à visée analgésique. De plus, l'hypothèse suggérant un effet délétère de la morphine, utilisée comme antalgique « *rescue* » dans le groupe AG, dans le cancer reste controversée, des équipes ayant montré à l'inverse un effet protecteur de cette drogue dans le cancer du sein dans un modèle *in vivo* ou dans la polarisation des macrophages (75).

Effets des principaux médicaments utilisés en anesthésie sur la progression tumorale

Toujours est-il qu'en attendant les résultats de ces études prospectives, des chercheurs fondamentalistes ont étudié les effets des différents médicaments de la pharmacopée des anesthésistes afin de déterminer si ces médicaments jouaient un rôle direct dans la progression tumorale d'origine périopératoire.

Toute technique d'anesthésie fait appel à différents médicaments, que cela soit pour l'induction de l'anesthésie, son entretien ou encore pour l'analgésie per- et post-opératoire.

L'anesthésie générale (AG) est un acte médical qui a pour but d'induire la perte temporaire et réversible de la conscience et de la perception douloureuse à l'aide de médicaments (drogues anesthésiques) administrés par voie intraveineuse et/ou inhalatoire. L'anesthésie locorégionale (ALR), quant à elle, bloque de manière transitoire la transmission des messages nerveux dans une zone du corps prédéfinie par injection d'anesthésiques locaux à proximité d'un nerf périphérique ou du neuraxe, afin d'y pratiquer une intervention chirurgicale, un examen médical ou un traitement qui seraient douloureux. Le patient reste ainsi conscient. AG et ALR peuvent être combinées. Ces deux techniques font appel à différents médicaments ou drogues anesthésiques. Différentes études ont cherché à étudier les répercussions de ces différentes molécules sur le cancer. En voici une revue de la littérature.

Agents anesthésiques volatils

Les agents anesthésiques volatils, utilisés seuls ou en anesthésie balancée sont les drogues les plus utilisées pour l'AG. De nombreuses études s'intéressant à ces drogues inhalées ont montré des résultats divergents.

Halothane

L'halothane, ancien agent halogéné qui n'est plus utilisé dans les pays occidentaux à cause de sa toxicité hépatique, aurait un impact important sur le cancer. Dès 1986, Katzav *et al.* ont montré son effet dépresseur immunitaire sur les cellules NK, entraînant une accélération de la croissance des cellules tumorales métastatiques dans modèle murin ayant subi une exérèse de carcinome pulmonaire de Lewis (76). En 1994, Waxler *et al.* ont montré que la stimulation de l'activité inhibitrice des protéinases par l'exposition chronique à l'halothane de souris atteintes de mélanome n'avait pas d'effet protecteur contre l'envahissement métastatique au niveau pulmonaire mais inhibait la prolifération cellulaire, avec une diminution de la taille de ces métastases pulmonaires comparé à des souris non exposées (77). Valtcheva *et al.* ont aussi montré que l'halothane pouvait entraîner *in vitro* des dommages des membranes cellulaires voire l'apoptose de cellules de carcinome pulmonaire (cellules A 549) (78).

Plus récemment, Kvolic *et al.* ont comparé les effets de l'halothane, du sevoflurane et de l'isoflurane sur différentes lignées cellulaires humaines et ont montré un potentiel antitumoral plus important de l'halothane, avec une inhibition de la croissance cellulaires de deux lignées malignes : Hep-2 (cancer laryngé) et Caco-2 (cancer du côlon) comparé à une lignée de fibroblastes (WI-38)(73), associée à une diminution de la synthèse d'ADN, d'ARN et de protéines. La diminution de la synthèse protéique était également retrouvée pour une autre lignée de cancer colique (SW-620). De plus, une fragmentation de l'ADN (signant l'apoptose

cellulaire) était observée pour les Caco-2 et les MIA PaCa-2 (cancer du pancréas). Le mécanisme d'apoptose était confirmé pour les différentes lignées cellulaires par l'exposition des phosphatidylsérines à la membrane externe des cellules cancéreuses. Par ailleurs, il a été montré dans un modèle animal que l'halothane supprimait l'activité des cellules NK (79,80) et favorisait la fixation pulmonaire de cellules tumorales circulantes d'adénocarcinome mammaire (MADB100) (80). Enfin, une étude préliminaire plus récente utilisant des puces à ADN a montré qu'il y avait une différence dans l'expression de gènes d'une lignée de cellules cancéreuses du sein, les MCF-7, après exposition à des agents anesthésiques volatils anciens (halothane, N2O et enflurane) ou récents (isoflurane, sevoflurane ou desflurane) sans pouvoir dire quels gaz seraient à privilégier dans la chirurgie carcinologique (81).

Isoflurane

Dans leur étude, Kvolik *et al.* avaient montré que l'effet inhibiteur de la prolifération cellulaire de l'isoflurane était minime par rapport aux autres halogénés (73). De plus, cet agent inhalé altérerait *in vitro* la libération de cytokines par les cellules NK (82). Zhang *et al.*, travaillant sur la maladie d'Alzheimer, avaient mis en évidence sur plusieurs études un effet pro-apoptotique de l'isoflurane, comparé au desflurane, sur des cellules de neurogliome H4 humaines. Cet effet mettrait en jeu la mitochondrie via la voie Bcl2/bax et la production de radicaux libres de l'oxygène (83). Ces résultats sont toutefois à tempérer, car ils ont également été obtenus sur des neurones primaires. Dans une étude *in vitro* sur sang total, l'isoflurane, comparé à un autre gaz anesthésiant (le xénon), inhiberait l'activation de NF- κ B et entraînerait aussi une moindre production de TNF-alpha et d'IL6 des monocytes en présence de LPS (84). Pourtant, dans une expérience clinique comparant deux techniques anesthésiques, anesthésie intraveineuse à objectif de concentration (AIVOC) par propofol et remifentanyl et anesthésie balancée utilisant de l'isoflurane chez des patients ayant bénéficié d'une cholécystectomie par laparotomie, les marqueurs pro-inflammatoires (IL-6 et TNF-alpha) étaient plus élevés et le marqueur anti-inflammatoire IL-10 moins élevé dans le groupe « isoflurane » (85).

Sevoflurane

Le sevoflurane est un gaz halogéné fréquemment utilisé en anesthésie balancée. Dans l'étude de Kvolik *et al.*, son action sur la croissance cellulaire est dépendante du temps d'exposition pour certaines lignées cellulaires (73). Si la croissance cellulaire est diminuée de façon significative après 6 heures d'exposition pour les lignées Caco-2 et SW620, on observe une augmentation de la prolifération des cellules HEP-2 après 2 heures d'exposition, suivie d'une diminution significative. On n'observe pas de changement pour les deux autres lignées MIA

PaCa-2 et WI-38. Müller-Edenborn *et al.* ont montré que cet halogéné diminuerait la production de MMP-9 dans la chirurgie d'exérèse de cancer colorectal et par ce biais limiterait l'invasion des cellules tumorales circulantes (86). À l'inverse, Ecimovic *et al.* ont quant à eux montré que le sevoflurane augmentait la prolifération, la migration et l'invasion de cellules cancéreuses du sein *in vitro* (87). De plus, ce gaz inhibe la libération d'IL-1 bêta et de TNF-alpha des cellules NK, mais pas d'IL-2 (82).

Desflurane

Le desflurane est l'halogéné le plus récent et le plus apprécié pour sa faible solubilité permettant un réveil rapidement après l'arrêt de son administration. Du fait de son utilisation plus récente, les études sur son effet sur le cancer sont moins importantes. Dans l'étude de Huitink *et al.* utilisant des puces à ADN, il faisait partie du groupe des agents volatils récents qui entraînaient une diminution de l'expression de certains gènes au sein des cellules MCF-7 (81). Comparé au sevoflurane, il entraînerait une moindre réponse au stress au cours d'une chirurgie sous coelioscopie (88).

Fraction inspirée en oxygène

Outre les agents halogénés, la fraction inspiratoire en oxygène aurait également un effet sur la survie des patients atteints de cancer. Ainsi, en 2012, l'analyse en sous-groupe de l'étude randomisée PROXI avait montré que la ventilation peropératoire avec une fraction inspirée en oxygène de 80% contre 30% était associée à une augmentation significative de la mortalité à long terme chez les patients ayant bénéficié d'une chirurgie à but carcinologique comparée aux patients n'ayant pas de cancer (89). Ceci est peu intuitif lorsqu'on sait que les cellules cancéreuses se sont adaptées à un environnement pauvre en oxygène, notamment par l'activation de la voie HIF-1 (90).

Protoxyde d'azote

Utilisé comme analgésiant sous forme de mélange équimolaire oxygène-protoxyde d'azote 1 :1 (MEOPA) ou comme adjuvant aux halogénés, le protoxyde d'azote (N₂O) a intéressé les cancérologues du fait de son impact sur le métabolisme des folates. En effet, cette propriété permettrait de limiter la prolifération des cellules cancéreuses dans les leucémies (91,92). Toutefois, le N₂O aurait un effet synergique avec le méthotrexate, son utilisation serait ainsi à éviter après une cure de chimiothérapie incluant du méthotrexate (93). Concernant les tumeurs solides, une étude clinique randomisée a montré une altération du métabolisme des aminoacides chez les patients cancéreux (94). Enfin, il limite l'inflammation en bloquant la transcription de NF-κB après stimulation par TNF-alpha dans un modèle *in vitro* de cellules endothéliales

veineuses ombilicales humaines (95). Toutefois, une étude randomisée n'a pas montré d'augmentation du risque de récurrence lors du suivi à long terme (4 à 8 ans après une chirurgie colorectale) chez les patients ayant reçu du N₂O versus du nitrogène (96).

Xénon

Le xénon est un gaz noble dont l'utilisation en anesthésie reste limitée devant son coût important. Il n'y a pas d'étude sur son effet direct sur le cancer mais concernant l'inflammation les résultats se contredisent, ainsi il bloquerait la transcription de NF- κ B après stimulation par TNF- α de cellules endothéliales veineuses ombilicales humaines (HUVEC)(95) et mais dans une autre étude le comparant à l'isoflurane, il augmenterait l'activité de NF- κ B (84).

Agents anesthésiques intraveineux

Le propofol

Hypnotique le plus utilisé pour induire l'anesthésie, le propofol est également l'alternative à une anesthésie balancée aux halogénés dans le cadre de son utilisation en AIVOC.

Dans un modèle animal difficilement transposable en clinique, son infusion pendant 4 semaines chez des souris préviendrait les métastases par inhibition de l'invasion et de la prolifération cellulaire cancéreuse (97). Cet effet protecteur pourrait passer par l'immunité anti-tumorale via les lymphocytes T dont l'activité est préservée sous propofol (98). De plus, le propofol n'altérerait pas l'activité des cellules NK (80). Dans un autre modèle *in vitro* de migration sur HUVEC, la migration leucocytaire était inhibée sous propofol (99).

Ainsi, devant les propriétés anti-tumorales du propofol, il a été proposé de l'associer à des molécules anticancéreuses, du docosahexaénoate (DHA) ou de l'eicosapentaénoate (EPA), dans le traitement du cancer du sein. En effet, le propofol-DHA et le propofol-EPA inhiberaient l'adhésion et la migration cellulaire et induiraient l'apoptose des cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 (100). Par ailleurs, le propofol réduirait l'invasion et la migration de ces mêmes cellules par diminution de la sécrétion des MMP et inhibition de la voie NF- κ B (74). Une étude récente a montré que le propofol inhiberait la formation de mammosphères *in vitro* via PDL-1(101). Au contraire, Garib *et al.* ont observé une augmentation de la migration de cellules MDA-MB-468 par activation de récepteurs à l'acide γ -aminobutyrique (GABA) par le propofol (102). Dans une étude clinique précédemment citée, l'utilisation de propofol et remifentanyl en AIVOC diminuait la sécrétion de facteurs pro-inflammatoires par rapport à une anesthésie balancée utilisant de l'isoflurane chez des patients ayant bénéficié d'une cholécystectomie par laparotomie (85). De même, les patients anesthésiés par propofol présentaient des marqueurs de stress chirurgical moins élevés que ceux anesthésiés par

sévoflurane après lobectomie pour cancer du poumon (103). Si les études cliniques randomisées visant à comparer la survie sans récurrence entre patients anesthésiés par halogénés et par propofol sont en cours, une étude rétrospective incluant plus de 7000 patients opérés d'une chirurgie carcinologique a montré une meilleure survie globale dans le groupe propofol (plus de 50%) (104). En revanche, une autre étude rétrospective s'intéressant à plus de 7600 patientes opérées d'un cancer du sein ne retrouvait pas de différence en termes de survie globale ou sans récurrences entre les patientes anesthésiées par halogénés ou propofol (105). Toujours est-il que la dernière méta-analyse du *Global Onco-Anesthesia Research Collaboration Group* suggère toujours une meilleure survie sans récurrence en cas d'anesthésie totale intraveineuse par propofol (106).

Étomidate

L'étomidate est un hypnotique de courte durée d'action utilisé par voie intraveineuse. Il est indiqué pour l'induction des anesthésies générales et en médecine d'urgence pour l'intubation en séquence rapide. Il est particulièrement recommandé pour l'induction de l'anesthésie chez les patients à risque d'instabilité hémodynamique (en cas d'insuffisance cardiaque notamment). Connu pour avoir des effets dépresseurs cortico-surrénaux, même après injection d'une dose unique (107,108), son utilisation doit être précautionneuse chez les patients ayant un traitement par corticoïdes. Il n'aurait pas d'effet sur la migration cellulaire, d'après l'étude de Garib *et al.* (102).

Kétamine

La kétamine est un agent anesthésique à forte dose et un antalgique à faible dose. Elle est indiquée dans l'induction anesthésique dans les situations d'état de choc, en cas de tamponnade ou d'asthme aigu grave notamment et dans les inductions anesthésiques extrahospitalières. À faible dose, la kétamine est un antalgique adjuvant épargneur morphinique et peut être utilisée dans les douleurs chroniques, notamment celles qui échappent aux morphinomimétiques. Katzav *et al.* avaient montré qu'elle déprimait l'activité des cellules NK dans un modèle murin ayant subi une exérèse de carcinome pulmonaire de Lewis, facilitant la progression de métastases (76). Ces résultats sont confirmés dans l'étude de Melamed *et al.*, où elle réduirait l'activité des cellules NK et faciliterait ainsi les métastases pulmonaires (80). Au contraire, en application clinique, l'analyse en sous-groupe d'une étude a montré que de petites doses de kétamine à visée analgésique réduisaient la dépression périopératoire des cellules NK chez des femmes ayant subi une intervention maxillo-faciale (109). *In vitro*, plusieurs études ont montré un effet inhibiteur de la kétamine sur l'inflammation (110–113) et récemment, il a été montré

que la kétamine augmentait la synthèse de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 dans les cellules MDA-MB-231, favorisant ainsi la prolifération et l'invasion cellulaire (114).

Thiopental

Le thiopental est un barbiturique d'action brève utilisé pour l'induction de l'anesthésie, le plus souvent en séquence rapide, même s'il est peu à peu remplacé par le propofol.

Dès la fin des années 1970, Lundy *et al.* l'ont suspecté de favoriser la croissance de métastases pulmonaires dans un modèle animal par le biais d'une dépression de l'immunité à médiation cellulaire (115) et ont par la suite documenté leur hypothèse par plusieurs études (116–118). Duncan *et al.* ont également retrouvé ces résultats en observant que l'activité *in vitro* de leucocytes provenant d'une souche de souris spontanément capable de rejeter des cellules tumorales YAAC-1 était considérablement diminuée après exposition au thiopental (119). Dans un autre modèle *in vitro* de migration sur HUVEC, la migration leucocytaire était inhibée sous thiopental (120). Dans l'étude de Katzav *et al.*, le thiopental n'altérait pas l'activité des cellules NK lors de l'exérèse de carcinome pulmonaire de Lewis dans un modèle murin (76) alors que dans un modèle d'hyperthermie induite par cet hypnotique chez le rat, l'activité des NK était diminuée et favorisées la formation de métastases pulmonaire via des mécanismes adrénergiques en cas d'injection de cellules tumorales syngéniques (121). En revanche, il diminuerait la production de TNF-alpha et inhiberait la voie NF-κB dans des cellules de gliome humaines A-172 (122) ou des lymphocytes T humains (123).

Les opioïdes

Les morphiniques sont largement utilisés au cours de la prise en charge du cancer, que cela soit en anesthésie balancée, en analgésie postopératoire ou dans le traitement des douleurs chroniques des patients cancéreux. Il existerait un lien entre douleur postopératoire et apparition de métastases faisant de l'analgésie postopératoire un enjeu majeur de la prise en charge du cancer (124). Toutefois, les morphiniques altéreraient la réponse immunitaire (125).

Fentanyl

Le fentanyl est un analgésique opioïde dont le potentiel analgésique vaut environ 80 fois celui de la morphine. Il est utilisé en anesthésie balancée ou dans le traitement des douleurs chroniques. Dans un modèle murin d'inoculation intrafémorale de cancer osseux, fentanyl et morphine ont montré leur efficacité antinociceptive et ont diminué les lésions cancéreuses intraosseuses (126). Au contraire, dans un autre modèle murin d'inoculation de cellules tumorales MADB106, le fentanyl augmentait la rétention pulmonaire de cellules cancéreuses et le nombre de métastases et diminuait l'activité des cellules NK (127). En clinique, il a été

montré que la dose de fentanyl administrée en peropératoire influait sur la dépression de l'activité des cellules NK de patients bénéficiant d'une chirurgie abdominale (128). Ainsi si des doses faibles de fentanyl (bolus d'1 µg/kg puis une dose additionnelle de 5 µg/kg) permettaient de récupérer l'activité des cellules NK après 24h, l'utilisation de fortes doses (dose unique de 75-100 µg/kg) entraînait une diminution persistante de cette activité. Toutefois, dans une autre étude, la réponse pro-inflammatoire était diminuée lors de l'utilisation de fortes doses (70-100 µg/kg) ou des doses intermédiaires (23-30 µg/kg) de fentanyl par rapport l'utilisation de faibles doses (2-4 µg/kg) sans effet protecteur sur l'activité des cellules NK (129).

Remifentanil

Le remifentanil est un analgésique majeur, dérivé synthétique de la morphine, d'action extrêmement brève, qui en fait un agent de choix pour l'anesthésie de courte durée. Peu d'études recherchant un effet sur le cancer ont été publiées, elles concernent essentiellement son utilisation en neurochirurgie, car son élimination rapide, permet d'évaluer les fonctions cognitives postopératoires dans un délai assez court. En revanche, sa répercussion sur l'inflammation est étayée par quelques publications. Cronin *et al.* ont montré qu'une administration de 8 heures de remifentanil n'affectait pas l'activité des cellules NK chez des volontaires sains (130), et Jaeger *et al.* qu'il n'avait pas d'effet sur le *burst* oxydatif des neutrophiles dans un modèle d'inflammation *in vitro* (131). Dans une étude clinique citée précédemment, son utilisation en AIVOC avec le propofol, limitait l'inflammation postopératoire par rapport à une anesthésie balancée utilisant l'isoflurane (85).

Sufentanil

Le sufentanil est le dérivé morphinique le plus utilisé en anesthésie, il peut être utilisé en AIVOC, en anesthésie balancée ou encore en anesthésie locorégionale (rachianesthésie ou péridurale). Il est 5 à 10 fois plus puissant que le fentanyl. Comme le remifentanil, nous n'avons pas recensé d'études sur son effet sur le cancer. En revanche, utilisé en adjuvant à la ropivacaïne dans une analgésie péridurale pour prostatectomie radicale, il entraînait une moindre réponse au stress chirurgical (132). Dans un modèle animal d'endotoxémie, il inhiberait la réponse inflammatoire, endocrinienne et métabolique (133). De même, il altérerait la migration leucocytaire dans un modèle *in vitro* de migration sur HUVEC (134).

Morphine

La morphine est l'antalgique le plus utilisé dans le cancer. Ses effets sur la prolifération tumorale ont été largement étudiés avec des résultats contradictoires. Dès 1986, Simon et Arbo ont montré que l'administration de morphine entraînait une augmentation de la croissance

métastatique chez le rat alors que des antagonistes des récepteurs mu diminuaient cet effet (135). Au contraire, Yeager et Colacchio ont montré qu'*in vivo*, dans un modèle murin, les injections de morphine diminuaient la dissémination et la prolifération des cellules tumorales circulantes (136), ces résultats ont également été retrouvés dans les études de Kuraishi *et al.*, qui ont montré que l'analgésie procurée par la morphine inhibait la prolifération tumorale et les métastases dans un modèle d'inoculation de mélanome chez le rat (137). Dans une étude clinique, l'activité des cellules NK était inchangée chez les patients ayant reçu une analgésie par morphine en postopératoire d'une chirurgie carcinologique alors que le tramadol augmentait cette activité anti-tumorale (138). *In vitro*, la morphine inhiberait l'adhésion et l'invasion de cellules cancéreuses coliques 26-L5 (139). D'autres expériences suggèrent que l'inhibition de la prolifération cellulaire de lignées cancéreuses passerait par la phosphorylation de p53 (140), ou en tout cas confirmerait une apoptose cellulaire induite par la morphine (141,142). Toutefois la morphine aurait des effets déprimeurs sur l'immunité. Ainsi, les animaux recevant de la morphine de manière chronique présentaient une atrophie du thymus et de la rate, avec diminution de la production de lymphocytes. La morphine altérerait également la réponse mitogène des lymphocytes T et B, la production d'anticorps, l'activité des cellules NK, la phagocytose et les propriétés antibactériennes des neutrophiles et monocytes, si bien qu'un vaccin contre ces effets antidépresseurs immunitaire et à visée anti-tumorale a été proposé par une équipe taiwanaise (143).

Tramadol

Le tramadol est un analgésique d'action centrale indiqué dans le traitement des douleurs modérées à sévères. Sacerdote *et al.* avaient montré que son administration augmentait l'activité des cellules NK comparées à la morphine (138) et une autre étude a montré que son administration avant ou après laparotomie prévenait de la dépression de l'activité des cellules NK induite par la chirurgie et protégerait ainsi contre les métastases pulmonaires dans un modèle animal (144).

Agonistes $\alpha 2$

Les agonistes $\alpha 2$, comme leur nom l'indique, stimulent les récepteurs adrénergiques $\alpha 2$, mais ont aussi dans une moindre mesure une affinité avec les récepteurs $\alpha 1$. Mimant les effets de la noradrénaline au niveau des récepteurs $\alpha 2$, ils provoquent une inhibition du système nerveux sympathique, sont responsables d'une diminution de la vigilance, de la nociception et du tonus musculaire. Leur action sur les récepteurs adrénergiques $\alpha 1$ provoque quant à elle une vasoconstriction périphérique et une hypertension.

Deux molécules sont utilisées en France en anesthésie en prémédication ainsi qu'en antalgiques, notamment en analgésie multimodale : la clonidine et la dexmedetomidine. Ces médicaments potentialisent les effets des hypnotiques et sont de plus en plus utilisés dans le cadre de l'Opioid Free Anesthesia ou OFA, qui est une technique d'anesthésie émergente se passant de l'usage de morphiniques pour l'analgésie peropératoire, avec une préférence pour la dexmedetomidine qui a une meilleure sélectivité pour les récepteurs α_2 (145–148). Contre toute attente, dans une étude récente, l'utilisation de dexmédétomidine augmentait la charge tumorale sur des modèles de métastases chez les rats et souris (149,150) alors que des données rétrospectives cliniques ne montraient pas plus de récives après chirurgie pour cancer du sein ou du poumon dans le cadre de l'utilisation de clonidine (151).

Les curares

Les curares sont utilisés pour faciliter l'intubation trachéale, assurer le relâchement musculaire durant la chirurgie et accessoirement faciliter la ventilation contrôlée. Des études ont montré que le cisatracurium et l'atracurium avaient un effet pro-apoptotique sur des lignées cellulaires humaines (HUVEC et HepG2), contrairement au mivacurium (152,153). Une nouvelle approche impliquant le système cholinergique dans le cancer du poumon et le mésothéliome suggère qu'antagoniser le système cholinergique par les curares limiterait la prolifération tumorale (154).

Les anesthésiques locaux

L'anesthésie locorégionale a montré un intérêt dans la survie des patients après chirurgie carcinologique dans des études rétrospectives. Certains auteurs se sont intéressés à l'effet direct des AL sur le cancer.

Ropivacaïne

La ropivacaïne est un anesthésique local de la famille des amino-amides indiquée dans les rachianesthésies, les anesthésies péridurales et certains blocs périphériques. Elle est très fréquemment utilisée en analgésie obstétricale, en association avec la morphine et ses dérivés. Il est également possible de l'utiliser en infiltration des sites opératoires pour diminuer les douleurs postopératoires.

Les effets de cet AL sur la fonction de la protéine kinase-C ont été étudiés *in vitro* sur des cellules de neuroblastome (SK-N-MC), s'il semblait qu'il y ait un effet inhibiteur direct de l'AL sur la protéine kinase C purifiée, cet effet ne serait pas retrouvé sur les cellules. En revanche, il entraînerait un découplage mitochondrial de cellules tumorales d'Ehrlich, en stimulant la production aérobie de lactates, en inhibant la respiration mitochondriale et en activant les

ATPases mitochondriales (155). L'étude de Piegeler *et al.* a montré qu'en plus de l'inhibition de la migration cellulaire et de l'activation de Src et la phosphorylation d'ICAM-1 des cellules cancéreuses pulmonaires H838, la ropivacaïne à faible concentration inhibait l'activité basale de Src (156). José *et al.* ont quant à eux montré que l'inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses passait par la diminution du métabolisme mitochondrial par la ropivacaïne et la lévobupivacaïne (157). Lucchinetti *et al.* ont étudié les effets de la ropivacaïne sur les cellules souches mésenchymateuses, qui sont impliquées dans la cicatrisation et la croissance tumorale (158). Leurs travaux ont pu mettre en évidence l'inhibition *in vitro* de la prolifération, de la différenciation et de la respiration mitochondriale de ces cellules souches après exposition à 100 μ M de ropivacaïne.

Procaïne

La procaïne est un anesthésique local de la famille des amino-esters dont l'utilisation a été délaissée dans les pays occidentaux devant les risques toxiques et allergiques plus importants et une durée d'action plus courte que les amino-amides. Depuis 2013, elle est de nouveau commercialisée sous forme de chloroprocaïne en France, pour un usage en chirurgie ambulatoire de la rachianesthésie.

Dans une étude *in vitro* sur cellules MCF-7, cet AL stopperait la mitose par déméthylation de l'ADN (159). Enfin, avec le cisplatine, il entre dans la synthèse d'une molécule anti-cancéreuse, le cis-diaminechloro-[2-(diéthylamino) ethyl 4-amino-benzoate, N(4)]-chloride platinum (II) monohydrochloride monohydrate, qui a une action antiproliférative sur les lignées cellulaires de neuroblastome, de cancer pulmonaire à petites cellules, de cancer des ovaires et de leucémies (160).

La lidocaïne

La lidocaïne est au centre de mon travail de thèse, outre les résultats présentés dans la partie expérimentale j'ai participé à l'écriture d'une revue de la littérature publiée dans Frontiers. Dans cette revue, nous avons décrit les potentiels effets anti-tumoraux de la lidocaïne en chirurgie carcinologique (161).



The Amide Local Anesthetic Lidocaine in Cancer Surgery—Potential Antimetastatic Effects and Preservation of Immune Cell Function? A Narrative Review

Thiên-Nga Chamaraux-Tran^{1,2*} and Tobias Piegeler³

¹Département d'Anesthésie et Réanimation Chirurgicale, Hôpital Hautepierre, CHU Strasbourg, Strasbourg, France, ²Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Unité Mixte de Recherche 7104, Centre National de la Recherche Scientifique, U964 Institut National de Santé et de Recherche Médicale, Université de Strasbourg, Illkirch, France,

³Department of Anesthesiology and Intensive Care Medicine, University Hospital Leipzig, Leipzig, Germany

OPEN ACCESS

Edited by:

Pan Pantziarka,
Anticancer Fund, Belgium

Reviewed by:

Patrice Forget,
Vrije Universiteit Brussel, Belgium
Donal Buggy,
University College Dublin, Ireland

*Correspondence:

Thiên-Nga Chamaraux-Tran
thiennga.chamaraux-tran@
chru-strasbourg.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Regulatory Science,
a section of the journal
Frontiers in Medicine

Received: 03 October 2017

Accepted: 06 December 2017

Published: 20 December 2017

Citation:

Chamaraux-Tran T-N and Piegeler T
(2017) The Amide Local Anesthetic
Lidocaine in Cancer Surgery—
Potential Antimetastatic Effects and
Preservation of Immune Cell
Function? A Narrative Review.
Front. Med. 4:235.
doi: 10.3389/fmed.2017.00235

Surgical removal of the primary tumor in solid cancer is an essential component of the treatment. However, the perioperative period can paradoxically lead to an increased risk of cancer recurrence. A bimodal dynamics for early-stage breast cancer recurrence suggests a tumor dormancy-based model with a mastectomy-driven acceleration of the metastatic process and a crucial role of the immunosuppressive state during the perioperative period. Recent evidence suggests that anesthesia could also influence the progress of the disease. Local anesthetics (LAs) have long been used for their properties to block nociceptive input. They also exert anti-inflammatory capacities by modulating the liberation or signal propagation of inflammatory mediators. Interestingly, LAs can reduce viability and proliferation of many cancer cells *in vitro* as well. Additionally, retrospective clinical trials have suggested that regional anesthesia for cancer surgery (either with or without general anesthesia) might reduce the risk of recurrence. Lidocaine, a LA, which can be administered intravenously, is widely used in clinical practice for multimodal analgesia. It is associated with a morphine-sparing effect, reduced pain scores, and in major surgery probably also with a reduced incidence of postoperative ileus and length of hospital stay. Systemic delivery might therefore be efficient to target residual disease or reach cells able to form micrometastasis. Moreover, an *in vitro* study has shown that lidocaine could enhance the activity of natural killer (NK) cells. Due to their ability to recognize and kill tumor cells without the requirement of prior antigen exposure, NKs are the main actor of the innate immune system. However, several perioperative factors can reduce NK activity, such as stress, pain, opioids, or general anesthetics. Intravenous lidocaine as part of the perioperative anesthesia regimen would be of major interest for clinicians, as it might bear the potential to reduce the risk of cancer recurrence or progression patients undergoing cancer surgery. As a well-known pharmaceutical agent, lidocaine might therefore be a promising candidate for oncological drug repurposing. We urgently need clinical randomized trials assessing the protective effect of lidocaine on NKs function and against recurrence after cancer surgery to achieve a “proof of concept.”

Keywords: lidocaine, natural killer T-cells, breast cancer, perioperative period, inflammation, immune system

INTRODUCTION

Surgery is a main part of the treatment of most cancers. In 2015, 80% of the 15.2 million new diagnosis cases of cancer needed surgery (1). However, the perioperative period might be critical: the long-term follow-up of a cohort of 1,173 patients who underwent mastectomy for breast cancer suggested a bimodal recurrence pattern with an early broad peak at about 18 months after surgery and a second one at about 60 months. If the second peak might be the natural outcome of the breast cancer disease, the first one might result from an early escape of cancer cells from dormancy as well as for recurrence driven by surgery (2). Several competing hypotheses have been proposed to explain this phenomenon (3): surgery might lead to pro-tumorigenic inflammatory changes during the perioperative period, such as increased levels of pro-inflammatory cytokines, prostaglandins, or catecholamines, which might also affect the competence of parts of the innate immune system, such as natural killer (NK) cells, which are crucial for the detection and disintegration of circulating tumor cells (CTCs) (4). The surgical stimulus might also increase levels of growth factors like vascular endothelial growth factor (VEGF), basic fibroblast growth factor, transforming growth factor beta (TGF- β), heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor, or platelet-derived growth factor, which have all been linked to tumor growth and metastasis (5–7). By inducing this pro-inflammatory environment in combination with its effects on immune surveillance, surgery itself might therefore enhance cancer cell dissemination and escape from immune surveillance and other hallmarks of cancer such as entrapment, invasion, migration, adhesion, or increasing of NETs (3). Added to the fact that primary tumor removal may promote tumor cell dissemination (8, 9), those effects could enhance establishment of new metastatic foci or accelerate growth of micrometastases (5).

As anesthesia is a key element of the perioperative period, it has been hypothesized that it could possibly also have an influence on cancer recurrence after surgery. On the one hand, some anesthetic and analgesic drug receptors are overexpressed in tumor tissues and are associated with metastasis (10). On the other hand, several retrospective studies have suggested an impact of anesthesia on cancer survival (11); notably, regional anesthesia might be associated with a reduced risk of cancer relapse or recurrence in some studies, although there are also studies reporting no effect (12–14). One of the proposed hypotheses to explain these observations may be related to the anti-inflammatory effects of local anesthetics (LAs) affecting proliferation, migration, or invasion of cancer cells as well (15–17). This review aims at summarizing different properties of amide-linked LAs bearing the potential to exert antitumor or antimetastatic effects. Lidocaine might be of particular interest, as this LA can be used intravenously for multimodal analgesia (18). Perioperative intravenous (IV) lidocaine has already been shown to reduce postoperative pain and opioid requirements (19), appears to be safe, and might not only reduce inflammatory markers but also the length of hospitalization, e.g., after colorectal surgery (20). The drug might therefore be an ideal candidate for a clinical trial evaluating the effects of amide-linked LAs on recurrence after cancer surgery.

ANTI-INFLAMMATORY EFFECTS OF LAs IN VITRO AND IN VIVO

Anti-inflammatory effects of LAs are well-known and have been studied extensively (21). However, the influence of LAs on the integrity of the endothelial barrier might be crucial for a possible inhibitory effect on the generation of metastasis during the perioperative period (14). CTCs—released into the circulation from the primary tumor during surgical removal of the latter—are able to form new (microscopic) metastatic lesions (22, 23), which will finally determine the patient's fate, even after a complete surgical removal of the primary tumor (24, 25). Endothelial barrier function is mostly regulated by Src protein tyrosine kinase (Src) and the activation of the enzyme will lead to a loss in endothelial barrier integrity *via* phosphorylation of its main substrate caveolin-1 at tyrosine 14 and several subsequent signal transduction pathways finally leading to the disruption of tight junctions and an increase in neutrophil adhesion and transmigration (26, 27), which might also be able to ease the extravasation of CTCs from the circulation (28). Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is crucial for the adhesion and transmigration of neutrophils to the endothelium, thus aggravating the inflammatory response (29, 30). Additionally, phosphorylation of ICAM-1 is not only Src-dependent but also leads to an increase in neutrophil binding and transmigration (31). Src is activated by certain inflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor alpha (TNF α), which is released at increasing concentrations—possibly due to surgical stress—during the perioperative period (32, 33). Therefore, the endothelial barrier might be impaired and the formation of new metastatic sites might be favored (14, 34). However, there is evidence that the amide LAs, such as lidocaine and ropivacaine, might be able to attenuate the inflammatory response in the endothelium, which might then lead to a preservation of endothelial barrier integrity (35, 36). In a model of experimental acute lung injury triggered by tracheal instillation of bacterial lipopolysaccharide, ropivacaine was able to attenuate the formation of pulmonary edema and neutrophil transmigration, most certainly by decreasing Src and ICAM-1 expression in rats and mice (37, 38). Data from *in vitro* experiments using human lung microvascular endothelial cells incubated with TNF α and ropivacaine or lidocaine suggested that the drugs might be able to preserve endothelial barrier function by inhibiting signal transduction by the cytokine receptor TNFR1, which subsequently also lead to less Src and ICAM-1 activation and/or phosphorylation (39).

Neutrophil transmigration has also been demonstrated to be a factor influencing CTC extravasation and metastasis, as the CTCs might use the activated leukocytes as some sort of “facilitator” for their own transmigration by binding of cancer cell ICAM-1 to neutrophilic CD11b (integrin α M) (40, 41). Therefore—at least in terms of CTC extravasation—it might be beneficial that LAs seem to impair neutrophil activation and priming (42–44).

ANTI-INFLAMMATORY = ANTIMETASTATIC?

There is a large overlap between inflammatory signaling pathways found to be crucial in inflammation as well as in cancer (17, 45, 46).

For instance, Src kinase is also involved in signal transduction leading to cancer cell migration, cytoskeleton changes, invasion, proliferation, and the extravasation of CTCs (45, 47–49). Src activation and ICAM-1 phosphorylation in cancer cells can not only be induced by incubation with TNF α but also be blocked by clinically relevant concentrations of lidocaine and ropivacaine (16). Furthermore, the inhibition of Src activation by amide LAs also has an impact on the activation of Akt and focal adhesion kinase (15), a pathway which might also have a crucial role in triple negative breast cancer and is currently investigated for the development of new targeted therapies (48). A decrease in TNF α -induced secretion of cancer cell matrix metalloproteinase 9—an enzyme necessary for the degeneration of the extracellular matrix by malignant cells (50)—in combination with a subsequent decrease in invasiveness *in vitro* has also been linked to the inhibition of Src activation by the LAs (15). Interestingly though, depending on the cell type used, the observed effects on cancer cell invasiveness have both been shown to be either independent (Src-dependent mechanism in non-small-cell lung cancer cells) or dependent (sodium channel variant Na_v1.5 in colon cancer cells) on the blockade of the voltage-gated sodium channel (VGSC) (16, 51). Cancer growth might also be affected by LAs, as lidocaine has been shown to induce apoptosis and suppress tumor growth in human breast tumor cells (52) as well as in other tumor cells *in vitro* (15, 16, 53–57). Interestingly, it might also be able to sensitize breast cancer cells against chemotherapeutic drugs (58).

Besides these already well-established *in vitro* effects, a very recent study showed encouraging results regarding a possible inhibition of tumor growth by lidocaine in a xenograft model *in vivo* (54): cells originating from a human hepatocellular carcinoma cell line have been injected subcutaneously into immunocompromised mice, which then have been subject to treatment with lidocaine (30 mg/kg) twice a week injected into the peritoneal cavity. Compared to control, lidocaine treatment was able to reduce the growth of the tumor. Furthermore, it was also found to be as effective as treatment with cisplatin (3 mg/kg, once per week) and was even able to increase the sensitivity of the tumor against cisplatin, which the authors related to an increased induction of apoptosis by the LA (54). In another study, the phenomenon of enhancing the effectiveness of a chemotherapeutic agent has been linked to the fact that lidocaine was demonstrated to induce demethylation of deoxyribonucleic acid in breast cancer cells, thus interfering with the cells' epigenetics, i.e., their regulation of gene expression (59).

In humans, many studies retrospectively analyzed the effects of the use of regional anesthesia and LAs in patients undergoing cancer surgery. Several studies showed a potential beneficial effect (12, 60–62), while others did not (63–66). So far, no data from adequately powered randomized controlled trials (RCTs) are available and therefore the authors of a recent Cochrane review concluded that there is currently only “inadequate” evidence for a potential beneficial effect of the perioperative use of regional anesthesia in cancer patients (67). However, these inconclusive findings might, at least in part, be explainable by the large heterogeneity of studies, tumors, and patients alike (14). Moreover, the intermediate outcomes of RCT so far have been encouraging: in a pilot study utilizing blood samples from patients undergoing

breast cancer surgery (NCT 00418457), the serum of women anesthetized with propofol and paravertebral block induced more apoptosis in a triple-negative breast cancer cell line compared to serum derived from women exposed to sevoflurane and an opioid-based regimen (68). In addition, these two different anesthetic techniques might also have an impact on serum concentrations of factors contributing to tumor progression after surgery: propofol plus paravertebral block increased the level of TGF- β , whereas sevoflurane together with opioids increased the level of VEGF-C 24 h after surgery (69). But as both TGF- β and VEGF-C are involved in the regulation of tumorigenesis (70, 71), these findings are insufficient to favor any of those two techniques.

EFFECTS ON THE IMMUNE SYSTEM: IMPLICATION FOR MALIGNANT DISEASES

The Central Role of the Immune System in Cancer

Immunosurveillance by the innate immune system plays a crucial role in the early stages of carcinogenesis and is a promising target to treat breast cancer (72, 73). NK cells drive this process and play a key role in detecting abnormal growth and subsequent activation and recruitment of other immune cells to eliminate cancer cells (74). Moreover, NK dysfunction can lead to breast cancer progression (75), and restoring NK activity is currently under investigation as part of the treatment regimen for breast cancer (76). A derangement of immune processes is a common event during the perioperative period and might lead to severe disturbances, e.g., of NK cell function with subsequent enhanced dissemination of CTCs (77), as NK cell activity can be impaired for up to 7 days after breast cancer surgery (78). Furthermore, surgery shifts the balance of T-helper (Th)1/Th2 toward the Th2 humoral response, a phenomenon which also exerts pro-tumor actions (79, 80).

Impact of LAs on Cell-Mediated Immunity

The impact of LAs on antitumor immunity and NK cell function is still contradictory. Thus, a meta-analysis comparing the effect of spinal or epidural anesthesia with general anesthesia failed to demonstrate any enhancement of NK cell function after neuraxial anesthesia, due to a significant degree of heterogeneity of the five eligible studies (81). However, the choice of the anesthetic technique might still have an impact on NK cell function: according to a pilot study from the already mentioned RCT evaluating patients undergoing breast cancer surgery with two different anesthetic regimens (propofol + paravertebral block vs. sevoflurane + opioids only, NCT 00418457), serum of women anesthetized with propofol plus paravertebral block for breast cancer surgery impaired the antitumor activity of NK cells much less than that of women exposed to sevoflurane and opioids (68). Turning more specifically to lidocaine, this LA might also affect NK cell activity differently, depending on the concentration used: from the early 1980s until the 2000s, *in vitro* studies have shown that lidocaine might compromise NK cell activity, but the experimental concentrations tested were high (from 0.2 to 5 mg/ml

whereas a level of 5 µg/ml is toxic) and were not compatible with concentrations found after a systemic use of the drug (82–84). However, more recently Ramirez et al. have shown that lidocaine at lower and clinically relevant concentrations (10^{-8} to 10^{-6} M) may instead preserve cytotoxicity of isolated human NK cells (85). Whether LAs might also affect other immune cells, e.g., lymphocytes, remains controversial: proliferation of Jurkat cells, an immortalized human T lymphocyte cell line commonly used to study T cell signaling or the expression of various chemokines, was decreased by lidocaine *via* the induction of apoptosis (86, 87) or *via* a dose-dependent inhibition of the cytokines IL-2 and TNF-α (88). It is difficult to translate those *in vitro* results to a clinical immunosuppressive effect of lidocaine because Jurkat cells are derived from the peripheral blood of a patient with T cell leukemia and express the uncontrolled characteristics of cancer cells (89). More physiologically, lidocaine also had an immunosuppressive effect on isolated mouse T cells derived from Peyer's patches (90) and reduced the secretion of pro-inflammatory cytokines in freshly isolated peripheral blood T cells (88). In addition, lidocaine inhibited the differentiation of Th1 cell responses of mice dendritic cells (91). However, all these experiments again used excessive lidocaine concentrations and therefore a translation into daily clinical use might be rather difficult. On the contrary, under clinical conditions, Yardeni et al. have shown that intraoperative IV lidocaine in combination with patient-controlled epidural analgesia was able to preserve lymphocyte response to phytohemagglutinin-M compared with a control group receiving only normal saline. This suggests that lidocaine might be able to reduce immune dysfunction as induced by the surgical stimulus (92). These results were later confirmed by Wang et al. who have shown that IV lidocaine might also preserve the balance of Th1/Th2 after radical hysterectomy for cervical cancer, whereas Th1/Th2 imbalance might favor tumor cells to escape immune surveillance and clearance (93). All those clinical data suggested an enhanced effect of lidocaine on immunity and might support its clinical use during the perioperative period. While intraoperative IV lidocaine failed to confirm an opioid sparing effect after breast cancer surgery in two studies (94, 95), those same trials have shown a decrease of the incidence and severity of persistent postsurgical pain at the same time (95, 96). One of the hypotheses argued by the authors to explain those results is the impact of the anti-inflammatory properties of lidocaine.

Because the *in vitro* results remain unclear and the clinical mechanisms of action of lidocaine on immune functions are unsettled, it seems urgent to design a clinical trial to study the impact of IV lidocaine on immune function and cancer surveillance and follow the patient to see if an immune modulation during surgery may have an impact on outcome after breast cancer surgery.

“FROM BENCH-TO-BEDSIDE” APPLICATION FOR IV LIDOCAINE IN ONCOLOGY?

We have summarized above a lot of promising data—in particular detailed evidence of plausible direct and putative mechanisms of

action—to support a new use of lidocaine in oncologic patients as it bears the potential to serve as a “repurposing candidate” drug (97).

First of all it is a well-known drug, commonly used in multimodal analgesia (98) with a well-established an evaluated toxicologic and pharmacokinetic profile for this purpose (99–101).

However, a number of steps have to be undertaken before repurposing IV lidocaine for oncologic diseases. Unfortunately, there is no reliable clinical evidence of its oncological effects available right now. Therefore, we urgently need randomized controlled clinical trials to test the hypothesis of lidocaine's antitumor effects at clinically relevant doses as suggested by the large amount of *in vitro* and *in vivo* evidence.

So far, the oncological properties of lidocaine were mainly assessed by retrospective studies or secondary analyses of patients enrolled in published clinical trials which were not powered and designed to study other effects or outcome parameters (14). In order to test the hypothesis that lidocaine might have an antitumor or antimetastatic effect, patients would have to be randomized to receive IV lidocaine at relevant doses for perioperative analgesia or placebo. Possible outcome measures could, for instance, be the disease-free survival after a long-term follow-up or the impact of lidocaine on inflammatory or NK cytotoxic functions after surgery. Identifying subgroups of procedures and surgeries where patients are responsive to lidocaine would be useful to demonstrate a protective effect of this LA against recurrence and metastasis. This strategy might help to avoid the inconsistent results of studies on protective effect of regional anesthesia (14). Thus, patients undergoing colorectal or breast cancer surgery could be of interest as those surgeries imply a high risk of local or distant relapse, even after achieving a complete surgical resection (102). Additionally, some phenotypes of those cancers overexpress one of the main targets of lidocaine: the VGSC which might also be involved in the process of metastasis (103).

CONCLUSION

Due to its large therapeutic margin, strong anti-inflammatory properties and potential beneficial impact on the innate immune surveillance system, lidocaine might be an ideal candidate for drug repurposing in cancer, which might potentially affect the patients' outcome dramatically. Besides the already proven favorable effects of perioperative IV lidocaine application on, e.g., post-operative pain and inflammation, patients with (breast) cancer might also benefit from an antimetastatic effect, ideally associated with a subsequent increase in recurrence-free and overall survival. However, due to the fact that there is currently not enough clinical evidence to support this hypothesis, we urgently call for clinical trials evaluating the effects of perioperative lidocaine during cancer surgical period to answer the question once and for all: is there a beneficial effect or not?

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Both authors contributed equally to this work.

FUNDING

This study was funded by the grant ANR-10-LABX-0030-INRT, a French State fund managed by the Agence Nationale de la Recherche under the frame program “Investissements

d’Avenir” labeled ANR-10-IDEX-0002-02. Thiên-Nga Chamaraux-Tran is an IGBMC International PhD Program fellow supported by LabEx INRT funds and her research was supported by SFAR (French society of Anesthesia and Intensive Care) France.

REFERENCES

- Sullivan R, Alatise OI, Anderson BO, Audisio R, Autier P, Aggarwal A, et al. Global cancer surgery: delivering safe, affordable, and timely cancer surgery. *Lancet Oncol* (2015) 16(11):1193–224. doi:10.1016/S1470-2045(15)00223-5
- Retsky M, Demicheli R, Hrushesky W, Baum M, Gukas I. Surgery triggers outgrowth of latent distant disease in breast cancer: an inconvenient truth? *Cancers (Basel)* (2010) 2(2):305–37. doi:10.3390/cancers2020305
- Tohne S, Simmons RL, Tsung A. Surgery for cancer: a trigger for metastases. *Cancer Res* (2017) 77(7):1548–52. doi:10.1158/0008-5472.CAN-16-1536
- Ramirez MF, Ai D, Bauer M, Vauthey JN, Gottumukkala V, Kee S, et al. Innate immune function after breast, lung, and colorectal cancer surgery. *J Surg Res* (2015) 194(1):185–93. doi:10.1016/j.jss.2014.10.030
- Abramovitch R, Marikovsky M, Meir G, Neeman M. Stimulation of tumour growth by wound-derived growth factors. *Br J Cancer* (1999) 79(9–10):1392–8. doi:10.1038/sj.bjc.6690223
- Curigliano G, Petit JY, Bertolini F, Colleoni M, Peruzzotti G, de Braud F, et al. Systemic effects of surgery: quantitative analysis of circulating basic fibroblast growth factor (bFGF), vascular endothelial growth factor (VEGF) and transforming growth factor beta (TGF-beta) in patients with breast cancer who underwent limited or extended surgery. *Breast Cancer Res Treat* (2005) 93(1):35–40. doi:10.1007/s10549-005-3381-1
- Hornbrey E, Han C, Roberts A, McGrouther DA, Harris AL. The relationship of human wound vascular endothelial growth factor (VEGF) after breast cancer surgery to circulating VEGF and angiogenesis. *Clin Cancer Res* (2003) 9(12):4332–9.
- Choy A, McCulloch P. Induction of tumour cell shedding into effluent venous blood breast cancer surgery. *Br J Cancer* (1996) 73(1):79–82. doi:10.1038/bjc.1996.14
- McCulloch P, Choy A, Martin L. Association between tumour angiogenesis and tumour cell shedding into effluent venous blood during breast cancer surgery. *Lancet* (1995) 346(8986):1334–5. doi:10.1016/S0140-6736(95)92345-4
- Connolly C, Madden SE, Buggy DJ, Gallagher HC. Expression of anaesthetic and analgesic drug target genes in excised breast tumour tissue: association with clinical disease recurrence or metastasis. *PLoS One* (2017) 12(5):e0177105. doi:10.1371/journal.pone.0177105
- Sekandarzad MW, van Zundert AAJ, Lirk PB, Doornebal CW, Hollmann MW. Perioperative anesthesia care and tumor progression. *Anesth Analg* (2017) 124(5):1697–708. doi:10.1213/ANE.0000000000001652
- Exadaktylos AK, Buggy DJ, Moriarty DC, Mascha E, Sessler DI. Can anesthetic technique for primary breast cancer surgery affect recurrence or metastasis? *Anesthesiology* (2006) 105(4):660–4. doi:10.1097/00000542-200610000-00008
- Weng M, Chen W, Hou W, Li L, Ding M, Miao C. The effect of neuraxial anesthesia on cancer recurrence and survival after cancer surgery: an updated meta-analysis. *Oncotarget* (2016) 7(12):15262–73. doi:10.18632/oncotarget.7683
- Piegeler T, Hollmann MW, Borgeat A, Lirk P. Do amide local anesthetics play a therapeutic role in the perioperative management of cancer patients? *Int Anesthesiol Clin* (2016) 54(4):e17–32. doi:10.1097/AIA.0000000000000119
- Piegeler T, Schlappfer M, Dull RO, Schwartz DE, Borgeat A, Minshall RD, et al. Clinically relevant concentrations of lidocaine and ropivacaine inhibit TNFalpha-induced invasion of lung adenocarcinoma cells in vitro by blocking the activation of Akt and focal adhesion kinase. *Br J Anaesth* (2015) 115(5):784–91. doi:10.1093/bja/aeu341
- Piegeler T, Votta-Velis EG, Liu G, Place AT, Schwartz DE, Beck-Schimmer B, et al. Antimetastatic potential of amide-linked local anesthetics: inhibition of lung adenocarcinoma cell migration and inflammatory Src signaling independent of sodium channel blockade. *Anesthesiology* (2012) 117(3):548–59. doi:10.1097/ALN.0b013e3182661977
- Votta-Velis EG, Piegeler T, Minshall RD, Aguirre J, Beck-Schimmer B, Schwartz DE, et al. Regional anaesthesia and cancer metastases: the implication of local anaesthetics. *Acta Anaesthesiol Scand* (2013) 57(10):1211–29. doi:10.1111/aas.12210
- Collinsworth KA, Kalman SM, Harrison DC. The clinical pharmacology of lidocaine as an antiarrhythmic drug. *Circulation* (1974) 50(6):1217–30. doi:10.1161/01.CIR.50.6.1217
- Weibel S, Jokinen J, Pace NL, Schnabel A, Hollmann MW, Hahnenkamp K, et al. Efficacy and safety of intravenous lidocaine for postoperative analgesia and recovery after surgery: a systematic review with trial sequential analysis. *Br J Anaesth* (2016) 116(6):770–83. doi:10.1093/bja/aew101
- Herroeder S, Pecher S, Schonherr ME, Kaulitz G, Hahnenkamp K, Friess H, et al. Systemic lidocaine shortens length of hospital stay after colorectal surgery: a double-blinded, randomized, placebo-controlled trial. *Ann Surg* (2007) 246(2):192–200. doi:10.1097/SLA.0b013e31805dac11
- Hollmann MW, Durieux ME. Local anesthetics and the inflammatory response: a new therapeutic indication? *Anesthesiology* (2000) 93(3):858–75. doi:10.1097/00000542-200009000-00038
- Bellahcene A, Castronovo V, Ogbureke KU, Fisher LW, Fedarko NS. Small integrin-binding ligand N-linked glycoproteins (SIBLINGs): multifunctional proteins in cancer. *Nat Rev Cancer* (2008) 8(3):212–26. doi:10.1038/nrc2345
- Glodblatt SA, Nadel EM. Cancer cells in the circulating blood. *Cancer Prog* (1963) 92:119–40.
- Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med* (2004) 351(8):781–91. doi:10.1056/NEJMoa040766
- Piegeler T, Winder T, Kern S, Pestalozzi B, Schneider PM, Beck-Schimmer B. Detection of circulating tumor cells in patients with esophagogastric or pancreatic adenocarcinoma using the CellSearch(R) system: an observational feasibility study. *Oncol Lett* (2016) 12(2):1513–8. doi:10.3892/ol.2016.4809
- Hu G, Minshall RD. Regulation of transendothelial permeability by Src kinase. *Microvasc Res* (2009) 77(1):21–5. doi:10.1016/j.mvr.2008.10.002
- Muller WA. Mechanisms of leukocyte transendothelial migration. *Annu Rev Pathol* (2011) 6:323–44. doi:10.1146/annurev-pathol-011110-130224
- Garcia-Roman J, Zentella-Dehesa A. Vascular permeability changes involved in tumor metastasis. *Cancer Lett* (2013) 335(2):259–69. doi:10.1016/j.canlet.2013.03.005
- Basit A, Reutershan J, Morris MA, Solga M, Rose CE Jr, Ley K. ICAM-1 and LFA-1 play critical roles in LPS-induced neutrophil recruitment into the alveolar space. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* (2006) 291(2):L200–7. doi:10.1152/ajplung.00346.2005
- Hu G, Vogel SM, Schwartz DE, Malik AB, Minshall RD. Intercellular adhesion molecule-1-dependent neutrophil adhesion to endothelial cells induces caveolae-mediated pulmonary vascular hyperpermeability. *Circ Res* (2008) 102(12):e120–31. doi:10.1161/CIRCRESAHA.107.167486
- Liu G, Vogel SM, Gao X, Javadi K, Hu G, Danilov SM, et al. Src phosphorylation of endothelial cell surface intercellular adhesion molecule-1 mediates neutrophil adhesion and contributes to the mechanism of lung inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2011) 31(6):1342–50. doi:10.1161/ATVBAHA.110.222208
- Riedel B, Browne K, Silbert B. Cerebral protection: inflammation, endothelial dysfunction, and postoperative cognitive dysfunction. *Curr Opin Anaesthesiol* (2014) 27(1):89–97. doi:10.1097/ACO.0000000000000032
- Schmidt A, Bengtsson A, Tylman M, Blomqvist L. Pro-inflammatory cytokines in elective flap surgery. *J Surg Res* (2007) 137(1):117–21. doi:10.1016/j.jss.2006.05.040
- Piegeler T, Beck-Schimmer B. Anesthesia and colorectal cancer – the perioperative period as a window of opportunity? *Eur J Surg Oncol* (2016) 42(9):1286–95. doi:10.1016/j.ejso.2016.05.004

35. de Klaver MJ, Buckingham MG, Rich GF. Lidocaine attenuates cytokine-induced cell injury in endothelial and vascular smooth muscle cells. *Anesth Analg* (2003) 97(2):465–70. doi:10.1213/01.ANE.0000073162.27208.E9
36. de Klaver MJ, Weingart GS, Obrigg TG, Rich GF. Local anesthetic-induced protection against lipopolysaccharide-induced injury in endothelial cells: the role of mitochondrial adenosine triphosphate-sensitive potassium channels. *Anesth Analg* (2006) 102(4):1108–13. doi:10.1213/01.ane.0000200310.39031.1f
37. Blumenthal S, Borgeat A, Pasch T, Reyes L, Booy C, Lambert M, et al. Ropivacaine decreases inflammation in experimental endotoxin-induced lung injury. *Anesthesiology* (2006) 104(5):961–9. doi:10.1097/0000542-200605000-00012
38. Piegeler T, Dull RO, Hu G, Castellon M, Chignalia AZ, Koshy RG, et al. Ropivacaine attenuates endotoxin plus hyperinflation-mediated acute lung injury via inhibition of early-onset Src-dependent signaling. *BMC Anesthesiol* (2014) 14:57. doi:10.1186/1471-2253-14-57
39. Piegeler T, Votta-Velis EG, Bakhshi FR, Mao M, Carnegie G, Bonini MG, et al. Endothelial barrier protection by local anesthetics: ropivacaine and lidocaine block tumor necrosis factor- α -induced endothelial cell Src activation. *Anesthesiology* (2014) 120(6):1414–28. doi:10.1097/ALN.0000000000000174
40. Wu QD, Wang JH, Condron C, Bouchier-Hayes D, Redmond HP. Human neutrophils facilitate tumor cell transendothelial migration. *Am J Physiol Cell Physiol* (2001) 280(4):C814–22. doi:10.1152/ajpcell.2001.280.4.C814
41. Lin YC, Shun CT, Wu MS, Chen CC. A novel anticancer effect of thalidomide: inhibition of intercellular adhesion molecule-1-mediated cell invasion and metastasis through suppression of nuclear factor- κ B. *Clin Cancer Res* (2006) 12(23):7165–73. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-1393
42. Fischer LG, Bremer M, Coleman EJ, Conrad B, Krumm B, Gross A, et al. Local anesthetics attenuate lysophosphatidic acid-induced priming in human neutrophils. *Anesth Analg* (2001) 92(4):1041–7. doi:10.1097/0000539-200104000-00044
43. Picardi S, Cartellieri S, Groves D, Hahnenkamp K, Gerner P, Durieux ME, et al. Local anesthetic-induced inhibition of human neutrophil priming: the influence of structure, lipophilicity, and charge. *Reg Anesth Pain Med* (2013) 38(1):9–15. doi:10.1097/AAP.0b013e31827a3cbe
44. Hollmann MW, Gross A, Jelacin N, Durieux ME. Local anesthetic effects on priming and activation of human neutrophils. *Anesthesiology* (2001) 95(1):113–22. doi:10.1097/0000542-200107000-00021
45. Kim MP, Park SI, Kopetz S, Gallick GE. Src family kinases as mediators of endothelial permeability: effects on inflammation and metastasis. *Cell Tissue Res* (2009) 335(1):249–59. doi:10.1007/s00441-008-0682-9
46. Kobayashi H, Boelte KC, Lin PC. Endothelial cell adhesion molecules and cancer progression. *Curr Med Chem* (2007) 14(4):377–86. doi:10.2174/092986707779941032
47. Guarino M. Src signaling in cancer invasion. *J Cell Physiol* (2010) 223(1):14–26. doi:10.1002/jcp.22011
48. Massihnia D, Galvano A, Fanale D, Perez A, Castiglia M, Incorvaia L, et al. Triple negative breast cancer: shedding light onto the role of pi3k/akt/mTOR pathway. *Oncotarget* (2016) 7(37):60712–22. doi:10.18632/oncotarget.10858
49. Kawai N, Tsuji S, Tsujii M, Ito T, Yasumaru M, Kakiuchi Y, et al. Tumor necrosis factor α stimulates invasion of Src-activated intestinal cells. *Gastroenterology* (2002) 122(2):331–9. doi:10.1053/gast.2002.31023
50. Lenglet S, Mach F, Montecucco F. Matrix metalloproteinase-9: a deleterious link between hepatic ischemia-reperfusion and colorectal cancer. *World J Gastroenterol* (2012) 18(48):7131–3. doi:10.3748/wjg.v18.i48.7131
51. Baptista-Hon DT, Robertson FM, Robertson GB, Owen SJ, Rogers GW, Lydon EL, et al. Potent inhibition by ropivacaine of metastatic colon cancer SW620 cell invasion and NaV1.5 channel function. *Br J Anaesth* (2014) 113(Suppl 1):i39–48. doi:10.1093/bja/aeu104
52. Chang YC, Liu CL, Chen MJ, Hsu YW, Chen SN, Lin CH, et al. Local anesthetics induce apoptosis in human breast tumor cells. *Anesth Analg* (2014) 118(1):116–24. doi:10.1213/ANE.0b013e3182a94479
53. Chang YC, Hsu YC, Liu CL, Huang SY, Hu MC, Cheng SP. Local anesthetics induce apoptosis in human thyroid cancer cells through the mitogen-activated protein kinase pathway. *PLoS One* (2014) 9(2):e89563. doi:10.1371/journal.pone.0089563
54. Xing W, Chen DT, Pan JH, Chen YH, Yan Y, Li Q, et al. Lidocaine induces apoptosis and suppresses tumor growth in human hepatocellular carcinoma cells in vitro and in a xenograft model in vivo. *Anesthesiology* (2017) 126(5):868–81. doi:10.1097/ALN.0000000000001528
55. Jiang Y, Gou H, Zhu J, Tian S, Yu L. Lidocaine inhibits the invasion and migration of TRPV6-expressing cancer cells by TRPV6 downregulation. *Oncol Lett* (2016) 12(2):1164–70. doi:10.3892/ol.2016.4709
56. Wang HW, Wang LY, Jiang L, Tian SM, Zhong TD, Fang XM. Amide-linked local anesthetics induce apoptosis in human non-small cell lung cancer. *J Thorac Dis* (2016) 8(10):2748–57. doi:10.21037/jtd.2016.09.66
57. Le Gac G, Angenard G, Clement B, Laviolle B, Coulouarn C, Beloeil H. Local anesthetics inhibit the growth of human hepatocellular carcinoma cells. *Anesth Analg* (2017) 125(5):1600–9. doi:10.1213/ANE.0000000000002429
58. Li K, Yang J, Han X. Lidocaine sensitizes the cytotoxicity of cisplatin in breast cancer cells via up-regulation of RAR β 2 and RASSF1A demethylation. *Int J Mol Sci* (2014) 15(12):23519–36. doi:10.3390/ijms151223519
59. Lirk P, Berger R, Hollmann MW, Fiegl H. Lidocaine time- and dose-dependently demethylates deoxyribonucleic acid in breast cancer cell lines in vitro. *Br J Anaesth* (2012) 109(2):200–7. doi:10.1093/bja/aes128
60. Schlagenhauff B, Ellwanger U, Breuninger H, Stroebel W, Rassner G, Garbe C. Prognostic impact of the type of anaesthesia used during the excision of primary cutaneous melanoma. *Melanoma Res* (2000) 10(2):165–9. doi:10.1097/00008390-200004000-00009
61. Biki B, Mascha E, Moriarty DC, Fitzpatrick JM, Sessler DI, Buggy DJ. Anesthetic technique for radical prostatectomy surgery affects cancer recurrence: a retrospective analysis. *Anesthesiology* (2008) 109(2):180–7. doi:10.1097/ALN.0b013e31817f5b73
62. Christopherson R, James KE, Tableman M, Marshall P, Johnson FE. Long-term survival after colon cancer surgery: a variation associated with choice of anesthesia. *Anesth Analg* (2008) 107(1):325–32. doi:10.1213/ane.0b013e3181770f55
63. Myles PS, Peyton P, Silbert B, Hunt J, Rigg JR, Sessler DI, et al. Perioperative epidural analgesia for major abdominal surgery for cancer and recurrence-free survival: randomised trial. *BMJ* (2011) 342:d1491. doi:10.1136/bmj.d1491
64. Ismail H, Ho KM, Narayan K, Kondalsamy-Chennakesavan S. Effect of neuraxial anaesthesia on tumour progression in cervical cancer patients treated with brachytherapy: a retrospective cohort study. *Br J Anaesth* (2010) 105(2):145–9. doi:10.1093/bja/aeq156
65. Lacassie HJ, Cartagena J, Branes J, Assel M, Echevarria GC. The relationship between neuraxial anesthesia and advanced ovarian cancer-related outcomes in the Chilean population. *Anesth Analg* (2013) 117(3):653–60. doi:10.1213/ANE.0b013e3182a07046
66. Cummings KC III, Xu F, Cummings LC, Cooper GS. A comparison of epidural analgesia and traditional pain management effects on survival and cancer recurrence after colectomy: a population-based study. *Anesthesiology* (2012) 116(4):797–806. doi:10.1097/ALN.0b013e31824674f6
67. Cakmakaya OS, Kolodzie K, Apfel CC, Pace NL. Anaesthetic techniques for risk of malignant tumour recurrence. *Cochrane Database Syst Rev* (2014) 11:CD008877. doi:10.1002/14651858.CD008877.pub2
68. Jaura AI, Flood G, Gallagher HC, Buggy DJ. Differential effects of serum from patients administered distinct anaesthetic techniques on apoptosis in breast cancer cells in vitro: a pilot study. *Br J Anaesth* (2014) 113(Suppl 1):i63–7. doi:10.1093/bja/aet581
69. Looney M, Doran P, Buggy DJ. Effect of anesthetic technique on serum vascular endothelial growth factor C and transforming growth factor beta in women undergoing anesthesia and surgery for breast cancer. *Anesthesiology* (2010) 113(5):1118–25. doi:10.1097/ALN.0b013e3181f79a69
70. Fabregat I, Fernando J, Mainez J, Sancho P. TGF- β signaling in cancer treatment. *Curr Pharm Des* (2014) 20(17):2934–47. doi:10.2174/13816128113199990591
71. Wang CA, Tsai SJ. The non-canonical role of vascular endothelial growth factor-C axis in cancer progression. *Exp Biol Med* (Maywood) (2015) 240(6):718–24. doi:10.1177/1535370215583802
72. Stoll G, Ma Y, Yang H, Kepp O, Zitvogel L, Kroemer G. Pro-necrotic molecules impact local immunosurveillance in human breast cancer. *Oncoimmunology* (2017) 6(4):e1299302. doi:10.1080/2162402X.2017.1299302

73. Kroemer G, Senovilla L, Galluzzi L, Andre F, Zitvogel L. Natural and therapy-induced immunosurveillance in breast cancer. *Nat Med* (2015) 21(10):1128–38. doi:10.1038/nm.3944
74. Gillard-Bocquet M, Caer C, Cagnard N, Crozet L, Perez M, Fridman WH, et al. Lung tumor microenvironment induces specific gene expression signature in intratumoral NK cells. *Front Immunol* (2013) 4:19. doi:10.3389/fimmu.2013.00019
75. Mamesier E, Pradel LC, Thibault ML, Drevet C, Zouine A, Jacquemier J, et al. Peripheral blood NK cells from breast cancer patients are tumor-induced composite subsets. *J Immunol* (2013) 190(5):2424–36. doi:10.4049/jimmunol.1200140
76. Shenouda MM, Gillgrass A, Nham T, Hogg R, Lee AJ, Chew MV, et al. Ex vivo expanded natural killer cells from breast cancer patients and healthy donors are highly cytotoxic against breast cancer cell lines and patient-derived tumours. *Breast Cancer Res* (2017) 19(1):76. doi:10.1186/s13058-017-0867-9
77. Ben-Eliyahu S, Page GG, Yirmiya R, Shakhar G. Evidence that stress and surgical interventions promote tumor development by suppressing natural killer cell activity. *Int J Cancer* (1999) 80(6):880–8. doi:10.1002/(SICI)1097-0215(19990315)80:6<880::AID-IJC14>3.0.CO;2-Y
78. McCulloch PG, MacIntyre A. Effects of surgery on the generation of lymphokine-activated killer cells in patients with breast cancer. *Br J Surg* (1993) 80(8):1005–7. doi:10.1002/bjs.1800800824
79. Cata JP, Wang H, Gottumukkala V, Reuben J, Sessler DI. Inflammatory response, immunosuppression, and cancer recurrence after perioperative blood transfusions. *Br J Anaesth* (2013) 110(5):690–701. doi:10.1093/bja/ae068
80. Ogawa K, Hirai M, Katsube T, Murayama M, Hamaguchi K, Shimakawa T, et al. Suppression of cellular immunity by surgical stress. *Surgery* (2000) 127(3):329–36. doi:10.1067/msy.2000.103498
81. Conrick-Martin I, Kell MR, Buggy DJ. Meta-analysis of the effect of central neuraxial regional anesthesia compared with general anesthesia on postoperative natural killer T lymphocyte function. *J Clin Anesth* (2012) 24(1):3–7. doi:10.1016/j.jclinane.2011.09.001
82. Krog J, Hokland M, Ahlburg P, Parner E, Tonnesen E. Lipid solubility- and concentration-dependent attenuation of in vitro natural killer cell cytotoxicity by local anesthetics. *Acta Anaesthesiol Scand* (2002) 46(7):875–81. doi:10.1034/j.1399-6576.2002.460719.x
83. Renzi PM, Ginns LC. Effect of lidocaine on natural killer activity: rapid inhibition of lysis. *Immunopharmacol Immunotoxicol* (1990) 12(3):417–37. doi:10.3109/08923979009006471
84. Takagi S, Kitagawa S, Oshimi K, Takaku F, Miura Y. Effect of local anaesthetics on human natural killer cell activity. *Clin Exp Immunol* (1983) 53(2):477–81.
85. Ramirez ME, Tran P, Cata JP. The effect of clinically therapeutic plasma concentrations of lidocaine on natural killer cell cytotoxicity. *Reg Anesth Pain Med* (2015) 40(1):43–8. doi:10.1097/AAP.0000000000000191
86. Boselli E, Duflo F, Debon R, Allaouchiche B, Chassard D, Thomas L, et al. The induction of apoptosis by local anesthetics: a comparison between lidocaine and ropivacaine. *Anesth Analg* (2003) 96(3):755–6. doi:10.1213/01.ANE.0000047201.85815.9D
87. Werdehausen R, Braun S, Essmann F, Schulze-Osthoff K, Walczak H, Lipfert P, et al. Lidocaine induces apoptosis via the mitochondrial pathway independently of death receptor signaling. *Anesthesiology* (2007) 107(1):136–43. doi:10.1097/01.anes.0000268389.39436.66
88. Lahat A, Ben-Horin S, Lang A, Fudim E, Picard O, Chowers Y. Lidocaine down-regulates nuclear factor-kappaB signalling and inhibits cytokine production and T cell proliferation. *Clin Exp Immunol* (2008) 152(2):320–7. doi:10.1111/j.1365-2249.2008.03636.x
89. Schneider U, Schwenk HU, Bornkamm G. Characterization of EBV-genome negative “null” and “T” cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int J Cancer* (1977) 19(5):621–6. doi:10.1002/ijc.2910190505
90. Kawasaki T, Kawasaki C, Sata T, Chaudry IH. Lidocaine suppresses mouse Peyer's patch T cell functions and induces bacterial translocation. *Surgery* (2011) 149(1):106–13. doi:10.1016/j.surg.2010.03.024
91. Jeon YT, Na H, Ryu H, Chung Y. Modulation of dendritic cell activation and subsequent Th1 cell polarization by lidocaine. *PLoS One* (2015) 10(10):e0139845. doi:10.1371/journal.pone.0139845
92. Yardeni IZ, Beilin B, Mayburd E, Levinson Y, Bessler H. The effect of perioperative intravenous lidocaine on postoperative pain and immune function. *Anesth Analg* (2009) 109(5):1464–9. doi:10.1213/ANE.0b013e3181bab1bd
93. Wang HL, Yan HD, Liu YY, Sun BZ, Huang R, Wang XS, et al. Intraoperative intravenous lidocaine exerts a protective effect on cell-mediated immunity in patients undergoing radical hysterectomy. *Mol Med Rep* (2015) 12(5):7039–44. doi:10.3892/mmr.2015.4235
94. Terkawi AS, Durieux ME, Gottschalk A, Brenin D, Tiouririne M. Effect of intravenous lidocaine on postoperative recovery of patients undergoing mastectomy: a double-blind, placebo-controlled randomized trial. *Reg Anesth Pain Med* (2014) 39(6):472–7. doi:10.1097/AAP.0000000000000140
95. Grigoras A, Lee P, Sattar F, Shorten G. Perioperative intravenous lidocaine decreases the incidence of persistent pain after breast surgery. *Clin J Pain* (2012) 28(7):567–72. doi:10.1097/AJP.0b013e31823b9cc8
96. Terkawi AS, Sharma S, Durieux ME, Thammishetti S, Brenin D, Tiouririne M. Perioperative lidocaine infusion reduces the incidence of post-mastectomy chronic pain: a double-blind, placebo-controlled randomized trial. *Pain Physician* (2015) 18(2):E139–46.
97. Pantziarka P, Bouche G, Meheus L, Sukhatme V, Sukhatme VP, Vikas P. The repurposing drugs in oncology (ReDO) project. *Ecancermedicallscience* (2014) 8:442. doi:10.3332/ecancer.2014.442
98. Dunn LK, Durieux ME. Perioperative use of intravenous lidocaine. *Anesthesiology* (2017) 126(4):729–37. doi:10.1097/ALN.0000000000001527
99. McCarthy GC, Megalla SA, Habib AS. Impact of intravenous lidocaine infusion on postoperative analgesia and recovery from surgery: a systematic review of randomized controlled trials. *Drugs* (2010) 70(9):1149–63. doi:10.2165/10898560-000000000-00000
100. Mooney JJ, Pagel PS, Kundu A. Safety, tolerability, and short-term efficacy of intravenous lidocaine infusions for the treatment of chronic pain in adolescents and young adults: a preliminary report. *Pain Med* (2014) 15(5):820–5. doi:10.1111/pme.12333
101. Daykin H. The efficacy and safety of intravenous lidocaine for analgesia in the older adult: a literature review. *Br J Pain* (2017) 11(1):23–31. doi:10.1177/2049463716676205
102. Pantziarka P, Bouche G, Sullivan R, Ilbawi AM, Dare AJ, Meheus L. Perioperative therapies – enhancing the impact of cancer surgery with repurposed drugs. *Eur J Surg Oncol* (2017) 43(11):1985–8. doi:10.1016/j.ejso.2017.08.010
103. Martin F, Ufodiama C, Watt I, Bland M, Brackenbury WJ. Therapeutic value of voltage-gated sodium channel inhibitors in breast, colorectal, and prostate cancer: a systematic review. *Front Pharmacol* (2015) 6:273. doi:10.3389/fphar.2015.00273

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2017 Chamaraux-Tran and Piegeler. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Depuis cet article, d'autres études intéressantes sont parues concernant l'effet antitumoral de la lidocaïne. D'Agostino *et al.* ont ainsi montré *in vitro* que la lidocaïne inhibait la migration et l'invasion de cellules de cancer du sein MDA-MB-231 en interférant avec le récepteur aux chimiokines CXCR4 et perturbant ainsi le remodelage de l'actine (162). Dans un modèle murin de cancer du sein où des cellules syngéniques de carcinome mammaire 4T1 étaient injectées de manière orthotopique dans la glande mammaire des souris BALB/c, l'administration de lidocaïne lors de la chirurgie d'exérèse prévenait l'apparition de métastases pulmonaires en synergie avec le cisplatine (163) ou seule lors d'une anesthésie par sevoflurane (164).

Notre revue de la littérature concernant l'impact de l'anesthésie sur le cancer montre que les drogues anesthésiques peuvent interférer dans les voies de signalisation cellulaire et ainsi avoir un effet sur la prolifération, l'angiogenèse et l'apoptose de cellules cancéreuses. Mais l'application clinique reste difficile, certaines données se contredisant entre les différentes études expérimentales et les résultats obtenus en clinique. Ce point peut être expliqué par le fait que les agents anesthésiques sont utilisés en synergie. Par ailleurs, ils joueraient également un rôle sur la réponse immunitaire, dont la préservation en périopératoire est un enjeu majeur de prévention des récidives locales et des métastases (165) et sur les cellules souches mésenchymateuses, impliquées dans la cicatrisation et la croissance tumorale (158). Dans une revue de la littérature, Tavare *et al.* évoquent le rôle des facteurs induits par l'hypoxie ou HIF (Hypoxia Inducible Factors) dans la récurrence cancéreuse (166). Ces protéines sont régulées par l'absence d'oxygène et agissent comme facteurs de transcription du VEGF, d'autres protéines impliquées dans l'angiogenèse et de chimiokines. Leur régulation par les agents anesthésiques est largement étudiée dans l'ischémie-reperfusion, notamment dans le préconditionnement pharmacologique et ces effets pourraient avoir un impact sur les cellules cancéreuses. D'autres paramètres, comme l'analgésie avec épargne morphinique ou autre effet potentialisateur des drogues entre elles, sont également à prendre en compte. Kurosawa rappelait également dans une revue qu'il n'existait actuellement aucune recommandation formelle pour la prise en charge anesthésique des patients cancéreux et qu'outre les médicaments de l'anesthésie, des situations rencontrées en périopératoire et gérées par l'anesthésiste-réanimateur, telles que l'hypothermie, l'hyperglycémie, l'hypotension et la transfusion de produits sanguins, jouaient un rôle dans la dépression immunitaire (167).

Parmi ces données, les effets de la lidocaïne sont ceux qui nous intéressent dans notre travail expérimental car son application clinique fait déjà partie de la pratique quotidienne, notamment

en chirurgie mammaire où les patientes bénéficient de l'infiltration de la zone opératoire et des aires ganglionnaires. Par ailleurs, la lidocaïne intraveineuse préviendrait les douleurs postopératoires persistantes dans ce type de chirurgie (168). Ainsi, après avoir rappelé la pharmacocinétique des anesthésiques locaux, nous étudierons les effets directs de la lidocaïne sur la prolifération et la migration de cellules cancéreuses mammaires.

Les anesthésiques locaux

Propriétés physico-chimiques des anesthésiques locaux

Les anesthésiques locaux (AL) sont des agents pharmacologiques bloquant la transmission nerveuse au niveau de la moelle épinière, des ganglions spinaux, des nerfs périphériques, des plexus nerveux et des terminaisons nerveuses. Les AL sont des amines aromatiques, généralement des bases faibles en solution aqueuse.

Ce sont des molécules amphiphiles dont la structure de base est constituée :

- d'un cycle aromatique insaturé aux propriétés lipophiles
- d'un groupement amine (secondaire ou tertiaire) aux propriétés hydrophiles (169)
- d'une chaîne intermédiaire courte (2-3 C) aliphatique reliant le cycle aromatique et le groupement amine. Cette chaîne intermédiaire (liaison ester (-COO-) ou amide (NHCO-)) détermine la classe des anesthésiques locaux : amino-ester ou amino-amide.

Les différents éléments qui composent cette chaîne déterminent sa liposolubilité, ses propriétés de liaison aux protéines et son affinité au site d'action. Les structures du cycle aromatiques et du groupement amine déterminent les propriétés physico-chimiques des anesthésiques locaux. Les AL amides ont moins d'effets secondaires que les AL esters, ceux-ci n'étant presque plus utilisés en France. Les molécules les plus employées sont : la lidocaïne, la mépivacaïne, la bupivacaïne et la ropivacaïne.

Ils comportent tous un carbone (C) asymétrique à l'origine de deux stéréo-isomères racémiques, sauf la lidocaïne.

Afin de les rendre solubles dans l'eau, les AL, qui sont basiques, sont préparés sous forme de chlorhydrate. Leur pH est ainsi acide (entre de 3 à 5). Leur tamponnement au niveau tissulaire par des ions bicarbonates libère la forme basique non ionisée qui agit dans les nerfs.

Pharmacocinétique des anesthésiques locaux

Liaison aux constituants du sang

La liaison des amides aux érythrocytes est faible et constante. La liaison aux protéines plasmatiques est en revanche plus importante, de l'ordre de 65% à 95%. Elle détermine la fraction libre dans le sérum, susceptible de franchir les barrières cellulaires. Les amides se lient essentiellement à l'albumine, qui, du fait de sa forte concentration plasmatique (environ 40 g/l) a une forte capacité de fixation malgré sa faible affinité et à l'orosomucoïde (170) moins prépondérant dans l'organisme mais dont l'affinité pour les AL est forte.

Concentration au site d'action et absorption

En dehors de l'utilisation de la lidocaïne en intraveineux, les concentrations d'AL sont particulièrement élevées au site d'action grâce à leur mode d'administration par injection locale. Leur durée d'action est conditionnée par leur vitesse de résorption systémique qui varie en fonction du site d'injection, de l'âge, du poids ou encore chez la femme enceinte en raison de modifications de la vascularisation ou de la quantité de graisse au niveau local.

Distribution des anesthésiques locaux

Le phénomène de distribution des anesthésiques locaux est important. En effet, lors d'une injection unique, la courbe de concentration artérielle croise celle de concentration veineuse au bout de 2 à 3 heures puis les concentrations s'équilibrent après environ 12 à 18 heures d'administration (171). Pour les amides, le volume de distribution est d'environ 1,5 à 2 L/kg. De ce fait, l'injection intravasculaire accidentelle est sans conséquence s'il s'agit d'une petite dose d'AL et si elle n'est pas réitérée.

Clairance des AL selon les différents organes

La clairance des médicaments par les organes dépend du temps de transit au travers de l'organe et des constantes d'association et de dissociation avec les protéines et les hématies. Après leur absorption au niveau systémique, les molécules d'AL arrivent au poumon où une grande partie est retenue. Le poumon joue ainsi le rôle de filtre protecteur contre la toxicité des AL au niveau systémique. Toutefois, ce système protecteur est vite saturé. Les molécules non filtrées rejoignent ensuite le cerveau ou le cœur via la circulation artérielle, sites les plus exposés à la toxicité des AL. Au niveau cérébral, l'extraction des AL est rapide en cas d'administration en bolus (en cas d'injection accidentelle généralement). En revanche, en administration continue, la toxicité est la même qu'à la concentration de sa fraction libre systémique.

Au niveau cardiaque, la part extraite par le myocarde est relativement faible, sans phénomène d'accumulation et avec une élimination rapide. Ces caractéristiques expliquent la récupération d'une activité cardiaque spontanée après manœuvre de réanimation cardiopulmonaire. Au niveau hépatique, la clairance des amides dépend de leur coefficient d'extraction hépatique (supérieur à 60% pour la lidocaïne et mépivacaïne ou inférieur à 40% pour la bupivacaïne). En cas de coefficient d'extraction hépatique élevé, la clairance hépatique est limitée par le débit hépatique, alors qu'en cas de coefficient d'extraction bas, la clairance sera dépendante de la liaison des AL à l'albumine et à l'orosomucoïde essentiellement.

Les AL sont utilisés depuis des décennies en analgésie obstétricale, aussi leur passage transplacentaire est un phénomène depuis longtemps étudié. Les concentrations libres d'AL

s'équilibrent de part et d'autre du placenta. Toutefois, le seuil de toxicité fœtale est abaissé devant un pH fœtal plus acide et une demi-vie allongée des AL chez les nouveau-nés (172).

Métabolisme et élimination des anesthésiques locaux

Les esters sont hydrolysés dans le sérum et le foie par les pseudocholinestérases.

L'élimination des amides est liée à la clairance hépatique. En effet, les amides sont métabolisés au niveau cytochrome P450 et les métabolites sont excrétés par le rein.

Pharmacodynamie des anesthésiques locaux

Les AL agissent en bloquant de façon réversible la transmission de l'influx nerveux le long des axones. Ce mécanisme est concentration- et dose-dépendant. Initialement, ils allongent la durée du potentiel d'action par l'inhibition des canaux sodiques voltage-dépendants des neurones, limitant sa propagation puis l'augmentation de concentration des AL au niveau d'un nerf s'accompagne d'une diminution de l'excitabilité membranaire, jusqu'à ce qu'aucun stimulus ne déclenche de potentiel d'action.

Action au niveau du canal sodique

Le canal sodique est une volumineuse glycoprotéine composée d'une sous-unité α et des sous-unités β . La sous-unité α possède quatre protéines ayant six domaines transmembranaires et qui forment un pore hydrophile. Un domaine transmembranaire est sensible à la différence de potentiel électrique intermembranaire. Lorsque le voltage atteint un seuil défini, le canal s'ouvre brutalement et laisse entrer les ions sodium à l'intérieur de la cellule puis le canal s'inactive quelques millisecondes plus tard par fermeture du pore. Les AL agissent par obstruction du pore central. Le bloc est dit phasique car son intensité s'accroît avec la fréquence de stimulation (173).

Chronologie du bloc nerveux

L'action analgésique des AL provient de l'interruption de l'influx au niveau des fibres nerveuses, principalement des fibres C amyéliniques et des fibres peu myélinisées $A\delta$ conduisant la douleur. La sensibilité aux AL variant selon l'épaisseur des fibres nerveuses, le bloc nerveux s'applique progressivement. Tout d'abord, on observe un blocage sympathique (postganglionnaire) et une perte de la sensibilité thermique (par atteinte des fibres C, moins épaisses), puis un blocage de la douleur aiguë (fibres $A\delta$), une perte du tonus musculaire (fibres $A\gamma$), de la sensibilité tactile (fibres $A\beta$) et enfin un bloc moteur associé une perte de la sensibilité kinesthésique (proprioception) (par atteinte des fibres $A\alpha$, les plus épaisses).

Autres propriétés des anesthésiques locaux

Propriétés anti-inflammatoires intrinsèques

Les AL possèdent des propriétés anti-inflammatoires intrinsèques et peuvent moduler la réponse inflammatoire (174). Ainsi, Blumenthal *et al.* ont montré que la ropivacaïne atténue la réponse inflammatoire induite par le LPS dans un modèle cellulaire de syndrome de détresse respiratoire aigu (SDRA) (175). Dans un modèle animal de douleur postopératoire d'origine inflammatoire, la bupivacaïne peut modifier la réponse inflammatoire systémique secondaire à un traumatisme local par inhibition de la production systémique de cytokines. Ces propriétés ne résulteraient pas du blocage des canaux sodiques par les AL car l'administration de tétródotoxine, un bloqueur spécifique des canaux sodiques, ne modifie pas la production systémique des médiateurs de l'inflammation (176).

Action anti-oxydante des anesthésiques locaux

Le stress oxydant est impliqué dans l'amplification de la réponse inflammatoire et la production de cytokines pro-inflammatoires. Leduc *et al.* ont mis en évidence les propriétés anti-oxydantes de la bupivacaïne sur la peroxydation lipidique (177). Les AL inhibent la production d'anion superoxyde par les polynucléaires neutrophiles via un mécanisme impliquant la voie de signalisation des récepteurs transmembranaires couplés à la protéine G (178).

Action des anesthésiques locaux sur la voie des MAPK

Les MAPK jouent un rôle fondamental dans la transduction du signal cellulaire. Elles sont régulées par une cascade de phosphorylation. Trois de ces kinases notamment (Extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-Jun N-terminal kinase (JNK) et p38 MAPK), activées par des voies différentes, jouent un rôle dans l'inflammation. Il existe une activation des deux isoformes de ERK (ERK 1/2) au niveau des neurones médullaires après inflammation périphérique. Plusieurs études démontrent le rôle de p38 MAPK dans la signalisation de la douleur. Au niveau du ganglion de la racine dorsale des neurones primaires sensitifs, p38 MAPK est activée par l'inflammation périphérique et par une lésion nerveuse. Svensson *et al.* ont mis en évidence son rôle clef dans la facilitation de la signalisation nociceptive au niveau médullaire (179). Les AL peuvent agir sur la voie des MAPK. Ainsi Tan *et al.* ont montré que des AL pouvaient inhiber *in vitro* l'activation d'ERK médiée par le récepteur muscarinique par un mécanisme autre que celui des canaux sodiques (180). Dans une autre étude, la bupivacaïne inhiberait *in vitro* l'activation de ERK par blocage de l'influx calcique au niveau médullaire (181). Ces données suggèrent l'existence de sites d'action de la bupivacaïne à la fois pré- et post-synaptiques

(respectivement au niveau des terminaisons des afférences nociceptives et des neurones de la corne dorsale de la moelle).

Action des anesthésiques locaux sur le système adrénergique et sympathique

Sur le plan clinique, l'implication du système sympathique dans les phénomènes d'hyperalgésie inflammatoire associés à l'algodystrophie est connue. Les patients souffrant d'algodystrophie peuvent fréquemment développer un syndrome douloureux bilatéral associé à des signes neurovasculaires dans les suites d'un traumatisme unilatéral. Les symptômes cliniques sont variés et peuvent toucher le système nerveux sympathique, le système somatomoteur et somatosensoriel. L'intérêt d'un bloc nerveux périphérique continu a été rapporté dans le traitement de cette maladie. L'administration continue périnerveuse d'AL permet un soulagement complet, une mobilisation précoce et une sortie de l'hôpital plus précoce chez des enfants souffrant d'algodystrophie (182).

Action des anesthésiques locaux sur les récepteurs N-méthyl-D-aspartate (NMDA)

L'activation des récepteurs NMDA est un facteur clé dans le développement de l'hyperalgésie. *In vitro*, tous les AL peuvent inhiber l'activation des récepteurs NMDA par des mécanismes indirects et variés (183). Ainsi, la bupivacaïne agirait au niveau de deux sites distincts du récepteur NMDA : un site lié à la glycine (co-agoniste obligatoire des récepteurs NMDA) et un site non lié à la glycine (184).

Action des AL sur la mitochondrie

Les AL altèrent le métabolisme énergétique par découplage mitochondrial *in vitro* (185). Dans un modèle animal, les AL diminuent significativement l'activité enzymatique de la chaîne respiratoire (186). Par ailleurs, le signal pro-apoptotique de la lidocaïne après administration intrathécale passe par la mitochondrie (187).

Toxicité des anesthésiques locaux

Effets toxiques systémiques

L'effet « stabilisateur de membrane » des AL peut avoir des répercussions graves sur le système nerveux central et cardiovasculaire.

La prévention de la toxicité systémique des AL lors de leur utilisation en anesthésie locale et locorégionale passe par le respect des posologies, la rigueur du geste technique et la surveillance continue du patient pendant la procédure. La SFAR a notamment publié plusieurs « recommandations formalisées d'experts » (RFE) (188) et « recommandations pour la pratique clinique » (RPC) (189,190) à ce sujet. Une quantité excessive d'AL, une modification de la pharmacocinétique, une injection intravasculaire accidentelle peuvent entraîner une

intoxication aux AL. La résorption systémique dépend de la vascularisation au niveau du site d'injection et de la faible lipophilie de l'AL. D'autres facteurs peuvent également être impliqués dans les mécanismes de toxicité (déséquilibre hydro-électrolytique, état de dénutrition avec hypoalbuminémie ou encore l'état de l'équilibre acidobasique).

Neurotoxicité des anesthésiques locaux

L'extraction des AL au niveau cérébral étant rapide, les signes neurologiques d'intoxication aux AL précèdent toujours les signes cardiaques (sauf en cas d'élévation très rapide des taux plasmatiques des AL).

Les premiers symptômes sont d'abord subjectifs : paresthésies péribuccales, goût métallique dans la bouche, acouphènes, vertiges. Puis apparaissent des signes objectifs : diplopie, tremblements des extrémités, logorrhée, confusion, myoclonies et convulsions (191). Les convulsions sont dues à une désynchronisation neuronale des structures corticales et sous corticales probablement liée à une diminution du tonus neuronal inhibiteur qui dépend surtout du système GABAergique et de la conductance chlorée (192). Un coma peut survenir à un taux plasmatique très élevé par blocage généralisé des canaux sodiques.

Cardiotoxicité des anesthésiques locaux

La toxicité cardiaque concerne la conduction et la contractilité cardiaque (191).

On peut observer des troubles de l'excitabilité et de la conduction, des arythmies, une diminution de la contractilité myocardique et une vasodilatation périphérique. Une bradycardie et un allongement de l'espace PR apparaissent en premier, suivis par des complexes QRS élargis. Apparaissent ensuite des troubles du rythme à type de tachycardie et de fibrillation ventriculaire par un phénomène de réentrée. Les arythmies par réentrée sont favorisées en cas d'acidose ou de dyskaliémie.

Allergies aux anesthésiques locaux

L'arrêt de l'utilisation des esters a permis de réduire la fréquence des réactions allergiques de type I médiées par les IgE. Les allergies aux amino-amides sont extrêmement rares et surtout liées aux adjuvants contenus dans la préparation (notamment le méthylparabène).

Utilisation des solutions d'émulsion lipidique en cas d'intoxication systémique aux anesthésiques locaux

L'utilisation des solutions d'émulsion lipidique (EL) en 2006 a révolutionné la prise en charge des intoxications aux AL, qui, avant cette date, consistait en une réanimation symptomatique classique (193).

Cette nouvelle approche thérapeutique a été proposée à la suite des travaux expérimentaux de Weinberg *et al.* qui ont montré en 1998 que l'infusion d'une émulsion lipidique à base d'huile de soja, utilisée habituellement comme solution de nutrition parentérale, pouvait prévenir (en prétraitement) les effets systémiques d'une intoxication aux AL ou conduire au succès d'une réanimation après arrêt cardiaque par intoxication à la bupivacaïne chez le rat anesthésié (194). D'autres travaux de la même équipe ont confirmé ces résultats chez le chien (195) et dans un modèle de cœur isolé de rat (196).

Plusieurs mécanismes d'action sont proposés pour expliquer l'efficacité des EL dans cette indication. Une des premières hypothèses est l'action directe des AL sur le bio-énergétisme mitochondrial, en effet les AL peuvent bloquer la chaîne respiratoire mitochondriale (185) et entraînent également à un découplage mitochondrial (197), aboutissant à une diminution, voire un arrêt de la production d'adénosine triphosphate (ATP). Les EL pourraient agir comme une source d'énergie directe pour le myocarde en contrebalançant les effets délétères des AL. Les acides gras disponibles dans les EL fourniraient les substrats nécessaires pour la respiration mitochondriale dans le cœur, aboutissant à une production d'ATP et ainsi à l'augmentation du débit cardiaque (198). Cet effet est à relativiser car les concentrations d'AL nécessaires pour observer ces effets métaboliques sont 1000 fois plus importantes que celles observées lors d'intoxication systémique aux AL.

Un second mécanisme serait la stimulation directe des canaux calciques potentiel-dépendants (Cav) myocardiques par les acides gras à chaînes longues qui peuvent entraîner une augmentation dose-dépendante du courant calcique et donc procurer un effet inotropique direct intéressant dans la réanimation cardiaque de l'intoxication systémique aux AL (199).

Enfin, le mécanisme d'action majeur est la captation rapide des molécules d'AL par les gouttelettes lipidiques. Ainsi Mazoit *et al.* avaient montré qu'à l'équilibre, on pouvait doser 3000 molécules de bupivacaïne dans une solution d'Intralipide® contre une seule dans l'eau plasmatisée (200).

Conduite à tenir en cas d'intoxication aux anesthésiques locaux

Fort de ces données expérimentales et de plusieurs cas cliniques ayant rapporté l'utilisation avec succès des émulsions lipidiques en cas de toxicité systémique aiguë des anesthésiques locaux, la SFAR a établi un protocole de prise en charge, disponible sur son site internet :

INTOXICATION AUX ANESTHÉSIQUES LOCAUX

SUSPECTER (et donc traiter)

- ☐ goût métallique
- ☐ Dysarthrie
- ☐ Vertiges, nausées, acouphènes
- ☐ Secousses musculaires
- ☐ Malaise
- ☐ dysesthésies bucco-linguales

CONFIRMER

- ☐ Injection d'AL :
 - Intravasculaire : signes immédiats
 - Résorption : retardée
- ☐ Neurologique :
 - Céphalée, paresthésie
 - Convulsion, Coma
- ☐ Cardiaque :
 - BAV, Tdr Ventriculaire
 - Hypotension, collapsus
 - ACR

Appel à l'aide
STOP Chirurgie

TRAITER

- ☐ Arrêt injection Anesthésiques locaux
- ☐ Oxygénothérapie ou $FiO_2 = 1$ (Intubation si ACR ou convulsions généralisées)
- ☐ Réanimation cardio-respiratoire : cf ACR
 - Pas de doses importantes d'adrénaline → augmente la durée du bloc
 - Pas d'amiodarone (effet additif avec les AL)
- ☐ Emulsion Lipidique à 20%: Intralipide 20% : 3ml/kg en bolus (70kg= 210ml) ou Medialipide 20%: 6 à 9ml/kg en bolus, à répéter si symptomatologie persistante
- ☐ Benzodiazépines si convulsions prolongées
- ☐ Surveillance monitorée pendant minimum 6 heures
- ☐ Dosage du toxique (prélèvement tube sec)



SFAR
Société Française d'Anesthésie et de Réanimation

Réalisée en 2016 par le CAMR

Références: www.lipidrescue.org;

www.alr13.com/medias/files/intoxication-aux-anesthetiques-locaux-sfar-2010-1.pdf

La lidocaïne

Décrite dès 1948 (201), la lidocaïne a plusieurs domaines d'application en anesthésie-réanimation : comme anti-arythmique par voie systémique (202), pour la réalisation d'anesthésies locales et locorégionales (203–206) (ALRIV, infiltration, bloc nerveux périphérique, péridurales et rachianesthésie), comme analgésique lors des inductions anesthésiques et en peropératoire (207–209), comme traitement de la douleur chronique de type neuropathique (210,211). Nous nous intéresserons ici à ses mécanismes d'action par voie systémique et en infiltration.

Mécanismes d'action de la lidocaïne

L'action analgésique de la lidocaïne intraveineuse est le fruit de ses multiples mécanismes d'action, résultant de son interaction avec les canaux sodiques et de ses effets directs ou indirects avec différents récepteurs et voies de transmission nociceptive.

Action classique de la lidocaïne sur les canaux sodiques périphériques et centraux

La transmission du stimulus nociceptif périphérique dépend de la présence des canaux sodiques voltage-dépendants. Ceux-ci peuvent être retrouvés sur les neurones sensitifs périphériques (NaV 1.8 et NaV 1.9) et sur les neurones sensitifs du système nerveux sympathique (NaV 1.7) (212). Il existe également un sous-type embryonnaire de canaux sodiques (NaV 1.3) dont la présence est décrite dans les neurones périphériques endommagés. Ce sous-type, surexprimé au niveau des lésions périphériques, est associé à la douleur neuropathique et est la cible de la lidocaïne dans le traitement de la douleur chronique (213). Même à faible dose, la lidocaïne peut agir sur l'hyperalgésie centrale post-opératoire en bloquant les canaux sodiques résistants à la tétrodontoxine (sur les mécano-nocicepteurs) au niveau de la moelle épinière et des racines dorsales (214).

Mécanismes analgésiques passant par d'autres voies que celle des canaux sodiques

Administrée par voie intraveineuse, la lidocaïne entraîne une augmentation de la concentration d'acétylcholine dans le liquide cébrospinal. Ceci permet d'obtenir une analgésie par inhibition de la douleur descendante par liaison aux récepteurs muscariniques M3 (215), inhibition des récepteurs à la glycine (216) et possible relargage d'opioïdes endogènes (217). De plus, la lidocaïne agit au niveau de la moelle épinière en réduisant directement et indirectement la dépolarisation post-synaptique médiée par les récepteurs NMDA et neurokines (218). Dans des modèles animaux, la lidocaïne appliquée sur les racines nerveuses avant leur lésion, préviendrait les douleurs neuropathiques par une moindre libération d'acides aminés excitateurs (219) et une moindre activation des cellules microgliales (220).

Action de la lidocaïne sur les membranes phospholipidiques

Des études physico-chimiques ont montré que la lidocaïne avait un mode d'entrée différent de la bupivacaïne dans les membranes phospholipidiques, avec une affinité plus importante pour la face interne de la bicouche membranaire (221).

De fortes concentrations de lidocaïne peuvent également altérer la continuité des membranes cellulaires grâce aux propriétés détergentes des AL, analogues aux surfactants, causant notamment des lésions nerveuses irréversibles (222). Ce mécanisme peut également expliquer l'activité antimicrobienne concentration-dépendante de la lidocaïne sur les *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* (223) et *Streptococcus pneumonia* (224).

Propriétés anti-inflammatoires de la lidocaïne

La lidocaïne intraveineuse réduit la réponse inflammatoire à l'ischémie tissulaire et atténue les dommages tissulaires induits par les cytokines endothéliales et vasculaires par le biais d'un mécanisme impliquant les canaux potassiques ATP-sensibles mitochondriaux (225). Elle inhibe l'activation des polynucléaires neutrophiles, leur adhésion, démargination, chimiotactisme et sécrétion de médiateurs comme les cytokines (174). Elle agit également sur d'autres voies : prostaglandines, leucotriènes, thromboxanes, histamine... (226).

Pharmacocinétique de lidocaïne

Les effets thérapeutiques, secondaires et toxiques de la lidocaïne dépendent de sa concentration plasmatique. Bien qu'il existe un chevauchement entre les concentrations thérapeutiques et celles où des effets secondaires peuvent être observés, la cible thérapeutique communément admise est une concentration plasmatique de lidocaïne entre 2 et 5 µg/mL, les effets secondaires subjectifs pouvant être observés entre 3 et 6 µg/mL et les effets toxiques aux alentours de 10 µg/mL chez la personne âgée (227). Les cas de cardiotoxicité ont été observés pour des concentrations plasmatiques de 21 µg/mL (228). La masse molaire de la lidocaïne étant de 234,33 g/mol, la concentration systémique maximale tolérable serait de 6 µg/mL soit à 25 µM en condition expérimentale.

La diffusion de la lidocaïne se fait selon un modèle bi-compartmental où le compartiment central comporte la circulation sanguine et les organes nobles (foie, cœur, cerveau, poumon et rein) et le compartiment périphérique les organes moins bien perfusés (muscle, peau et graisse). Avec une demi-vie de distribution très courte, inférieure à 10 minutes, la phase d'équilibre entre le plasma et le compartiment central est très rapide et détermine le délai d'action de la lidocaïne. La demi-vie d'élimination, entre 90 et 120 minutes est le reflet du métabolisme hépatique et de

la redistribution du médicament. La biotransformation hépatique est la principale voie d'élimination. 60 à 70% de la lidocaïne est éliminée par le premier passage hépatique. Ainsi, le métabolisme de la lidocaïne est dépendant du débit hépatique. Et bien qu'étant une base faible, avec une élimination urinaire pH-dépendante, la part rénale de son métabolisme est infime.

À partir des travaux de Rowland *et al.* et Thomson *et al.* sur la pharmacocinétique de la lidocaïne (229,230), Waller avait proposé deux équations permettant de calculer les doses de bolus et d'infusion continue de lidocaïne nécessaire à un sujet sain :

- $DC (\mu g) = C_p (\mu g / mL) \times V_c (mL/kg)$
- $DE (\mu g / min) = C_p (\mu g / mL) \times Cl (mL/min/kg)$

où DC est la dose de charge, C_p la concentration plasmatique V_c le volume de distribution dans le compartiment central, DE la dose d'entretien et Cl la clairance de la lidocaïne (227). Ainsi en partant d'un volume de distribution central d'environ 0,5 L/kg chez le sujet sain, une dose de charge de 1 mg/kg permet d'obtenir une concentration plasmatique de 2 $\mu g/mL$. Pour une clairance de 10 mL/min/kg, une dose d'entretien de 10 $\mu g/kg/min$ permet de maintenir une concentration plasmatique de 1 $\mu g/mL$ de lidocaïne. Afin d'obtenir rapidement une concentration plasmatique efficace, Waller propose l'association d'un bolus et d'une administration continue.

L'insuffisance cardiaque entraîne une diminution du volume de distribution et de la clairance plasmatique. De même, l'insuffisance hépatique prolonge la demi-vie d'élimination et diminue la clairance plasmatique de la lidocaïne. Ainsi, ces changements de paramètres pharmacocinétiques contre-indiquent l'utilisation systémique de la lidocaïne à visée analgésique chez les patients atteints de ces défaillances d'organes. En revanche, il a été montré que ni le volume de distribution, ni la clairance plasmatique n'étaient atteints en cas d'insuffisance rénale, permettant l'utilisation de la lidocaïne aux mêmes posologies que chez les sujets sains (230).

Anesthésiques locaux et chirurgie mammaire

Les anesthésiques locaux sont utilisés de manière fréquente en chirurgie mammaire afin d'assurer l'analgésie per et post-opératoire.

Utilisation clinique de la lidocaïne en systémique

La lidocaïne intraveineuse, à visée analgésique, administrée en continu a fait l'objet de plusieurs études randomisées, contrôlées et en double-aveugle, notamment en chirurgie viscérale. Dans une méta-analyse publiée en 2008 portant sur 8 études, l'administration continue de lidocaïne en per- et post-opératoire améliorait la réhabilitation post-opératoire et diminuait la durée d'hospitalisation (208). Les protocoles d'administration sont variables mais proposent généralement un bolus suivi d'une administration continue qui s'arrêtait à la fin de l'intervention ou au maximum 24 heures après. Ainsi, Saadawy *et al.* proposent l'administration d'un bolus de 2 mg/kg, 15 minutes avant l'induction de l'anesthésie puis une administration continue de 2 mg/kg/h jusqu'à la fin de l'intervention pour les cholécystectomies par voie laparoscopique. Ce protocole permet une diminution de la consommation de fentanyl peropératoire et de morphine post-opératoire, des scores de douleur et de la durée de l'iléus (231). De Oliveira *et al.* ont montré qu'un protocole d'un bolus de 1,5 mg/kg suivi d'une administration intraveineuse de 2 mg/kg/h jusqu'à la fin de la chirurgie améliorait la réhabilitation post-opératoire en chirurgie bariatrique par voie coelioscopique par une moindre consommation d'opioïdes (232). Dans la chirurgie carcinologique mammaire Grigoras *et al.*, ont proposé un protocole analgésique comportant un bolus d'1,5 mg/kg de lidocaïne avant l'induction anesthésique suivi d'une administration continue de 1,5 mg/kg/h stoppée une heure après la fermeture de la peau. Cette prise en charge a permis la diminution de l'incidence et de la sévérité de la douleur persistante post-opératoire (168). La prévention des douleurs chroniques post-mammectomies a été confirmée en post hoc d'une autre étude (233) ainsi que dans une étude pilote récente (234).

La tolérance de la lidocaïne intraveineuse est correcte au vu des études publiées. Les taux plasmatiques étant toujours inférieurs au seuil de toxicité. Aucun accident cardiaque n'a jamais été rapporté dans la littérature pour les protocoles d'analgésie à la lidocaïne intraveineuse. Ces données sont toutefois à relativiser : les patients ayant des comorbidités sévères étant systématiquement exclus de ces études randomisées. Dans une revue récente, Beaussier *et al.* ont rappelé les propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques chez les sujets sains et présentant des comorbidités ainsi que les bénéfices attendus en période périopératoire (228).

Infiltration péricatricielle

L'analgésie par infiltration consiste en l'injection d'un agent anesthésique dans un espace sous-cutané ou une paroi musculo-aponévrotique afin d'empêcher la formation du message douloureux par blocage des rameaux terminaux de plusieurs nerfs. Par ailleurs, l'infiltration seule peut suffire pour un acte chirurgical mineur comme la cure de hernie inguinale ou elle peut être associée à une analgésie systémique ou locorégionale (235).

Les études concernant la pratique des infiltrations au cours de la chirurgie du sein ont été reprises dans une méta-analyse qui conclut à l'absence d'efficacité de l'infiltration péricatricielle sur la douleur postopératoire (236). Il faut toutefois tempérer ces résultats, la chirurgie mammaire étant une chirurgie pariétale, dont la douleur varie en fonction du type d'intervention, plus ou moins délabrante, et de la nécessité d'un curage axillaire.

Après cette méta-analyse, une étude randomisée en double aveugle retrouvait une diminution de la douleur au repos et à la mobilisation durant les six premières heures postopératoires mais pas de prévention des douleurs chroniques (237). Pourtant, il a été montré dans le cadre spécifique de la chirurgie du sein, que plus la douleur aiguë postopératoire était sévère, plus il existait un risque de douleur chronique (238).

En revanche, Schell *et al.* ont montré qu'il existe un effet bénéfique de l'irrigation postopératoire continue d'AL avec une diminution de la douleur post-opératoire immédiate et une moindre consommation en morphine (239). Sidiropoulou *et al.*, ont comparé l'efficacité d'une infiltration continue d'AL pendant 24 heures *versus* un bloc paravertébral (BPV) chez des patientes opérées d'une mastectomie avec curage axillaire. La consommation d'opioïdes était similaire, les scores de douleur faibles dans les deux groupes, mais il existait une supériorité du BPV en postopératoire immédiat (après 4 heures) puis de l'infiltration après 16 heures, l'infiltration continue d'AL pouvant ainsi être proposée comme alternative efficace au BPV (240). L'infiltration locale tumescente permet également de réduire les douleurs post-opératoires et la consommation de morphine après chirurgie de réduction mammaire (241). Si les résultats en termes d'analgésie restent discutables, les infiltrations d'AL restent une pratique clinique assez répandue.

Instillation d'AL à travers les drains de Redon

En cas de mastectomie totale et/ou curage axillaire, un drain de Redon est mis en place en fin d'intervention afin de drainer les exsudats du site opératoire. L'instillation d'anesthésiques locaux à travers ces drains permet d'améliorer l'analgésie post-opératoire des 12 premières heures environ (242,243).

Bloc paravertébral

La technique analgésique de référence dans la chirurgie du sein reste le bloc paravertébral qui consiste en l'injection d'un anesthésique local à proximité des racines des nerfs rachidiens, juste après leur sortie du canal médullaire, lorsque ceux-ci se situent au contact des apophyses transverses. Une méta-analyse de 4 études a montré que le BPV permettait de diminuer significativement la douleur 6 et 12 heures après l'intervention (236).

Si le BPV semble efficace sur la douleur postopératoire immédiate, son intérêt après 24 heures ne semble pas évident. En effet, deux essais cliniques prospectifs et randomisés comparant une anesthésie générale seule et une AG associée à un BPV chez des patientes devant subir une chirurgie du sein ont confirmé une diminution significative de la douleur en postopératoire immédiat dans le groupe ayant reçu le BPV. En revanche, après sortie de la salle de réveil et une semaine après la chirurgie, il n'existait plus de différence significative entre les groupes (244,245).

Comme pour les infiltrations, les résultats sur la douleur aiguë sont sans doute dus au fait que pour les interventions les plus courantes, la douleur postopératoire est facilement contrôlée par une analgésie systémique multimodale. Le BPV pourrait avoir un effet bénéfique sur les interventions plus délabrantes, susceptibles de provoquer une douleur plus intense.

En ce qui concerne la douleur chronique, Kairaluoma *et al.*, ont montré un effet protecteur du BPV, en comparant dans une étude randomisée, prospective et en double insu, la douleur 6 et 12 mois après chirurgie du sein chez des patientes recevant une anesthésie générale et des patientes ayant bénéficié d'un BPV avant l'anesthésie générale. La douleur au repos et en mouvement était moins importante dans le groupe ayant reçu le BPV à 12 mois. Par ailleurs, il existait une corrélation entre la consommation de paracétamol codéiné durant les 14 premiers jours postopératoires et la présence de douleurs du creux axillaire, au repos et neuropathique 12 mois après (246).

Les blocs pectoraux

Les blocs « plan » ou « plane blocks » consistent à injecter des AL entre deux muscles pour bloquer l'influx des nerfs sensitifs se trouvant entre eux. Plusieurs plane blocks ont été développés par Blanco pour la chirurgie mammaire.

Le « pec block » I (PECS I)

Le PECS I bloque le nerf pectoral latéral et la branche terminale du nerf pectoral médial : il correspond au bloc du muscle grand pectoral. Cette technique est proposée pour les reconstructions mammaires par prothèse rétro pectorale. (247)

L'association du « pec block » I au BPV est recommandée dans la chirurgie reconstructrice du sein. Ces deux techniques améliorent l'analgésie postopératoire.

Le « pec block » II (PECS II)

L'injection d'AL entre les muscles petit pectoral et dentelé antérieur bloque le nerf intercostal brachial et les branches latérales des troisième et quatrième nerfs intercostaux. Ce bloc est recommandée lors d'un abord de la chaîne ganglionnaire axillaire et lors d'une chirurgie des quadrants latéraux du sein et peut-être associé au PECS I lors d'une reconstruction mammaire (248).

Les « pecs » combinés

Cette technique associe PECS I et II. Une étude prospective randomisée comparant le BPV aux « pecs » combinés sur des femmes opérées d'une mastectomie avec un curage axillaire ont montré une durée d'analgésie plus longue, une épargne morphinique et une EVA plus basse jusqu'à 12 h après l'intervention dans le groupe PECS. En revanche, les scores EVA étaient plus élevés 18 et 24 heures après l'opération, au repos comme en mouvement (249).

Le « serratus plane block »

Ce bloc consiste à bloquer les rameaux cutanés latéraux issus des nerfs intercostaux par injection d'AL à proximité du muscle serratus, en superficie ou en profondeur. La réalisation du curage axillaire ou la recherche du ganglion sentinelle peut plus s'avérer complexe lorsque le bloc est réalisé en superficie, le repérage des nerfs long thoracique et/ou thoraco-dorsal en neurostimulation étant plus difficile, l'injection profonde permettant de contourner ce problème (250).

Ainsi, l'utilisation des anesthésiques locaux et notamment de la lidocaïne est fréquente en chirurgie mammaire. Dans notre pratique clinique à l'hôpital de Haute-pierre, étant donné les résultats en termes d'analgésie et la facilité d'administration, nous avons choisi de combiner l'analgésie par lidocaïne intraveineuse mise en place dès l'induction de l'anesthésie et maintenue pendant le séjour en salle de surveillance post-interventionnelle et l'instillation de 150 mg de naropéine (un autre anesthésique local) pendant 15 minutes à travers les drains de Redon en fin d'intervention.

Résultats

Objectifs de la thèse

Devant les données cliniques et expérimentales concernant l'effet des AL sur des cellules cancéreuses, nous avons voulu rechercher leur action sur des cellules cancéreuses mammaires. Notre choix s'est porté sur la lidocaïne car elle est utilisée en pratique clinique à la fois en infiltration mais également par voie intraveineuse. Par ailleurs, sa pharmacocinétique et pharmacodynamie sont largement documentées.

Notre hypothèse est que la lidocaïne a un effet antitumoral direct dans le cancer du sein. Nous avons ainsi cherché à étudier son effet sur différentes lignées de cellules cancéreuses mammaires ainsi que sur une lignée de cellules mammaires non-tumorales.

Dans un premier temps, nous avons observé les effets antitumoraux de la lidocaïne sur un panel de différentes cellules cancéreuses de sein *in vitro* et *in vivo*. Nos expériences sont rapportées dans un article publié en 2018 dans Anticancer Research (251).

Viabilité et migration cellulaires ont été mesurées sur une lignée épithéliale bénigne (MCF-10A) et 3 lignées cellulaires représentant 3 phénotypes principaux de cancer de sein, les cancers hormonaux-dépendants (MCF-7), les cancers sur-exprimant HER2 (SkBr3) et les cancers triple-négatifs (MDA-MB-231). La viabilité de ces 4 lignées était altérée par la lidocaïne et la migration cellulaire était également altérée sur la lignée triple négative et la lignée surexprimant HER2, alors que la lignée bénigne n'était pas altérée. La lignée triple négative avait une plus grande sensibilité à la lidocaïne *in vitro*, nous avons voulu vérifier dans un modèle animal de carcinose péritonéale si la lidocaïne conservait des propriétés antitumorales *in vivo*. Ainsi à des doses utilisables en clinique, la lidocaïne a des propriétés antitumorales *in vitro* et *in vivo*.

Dans un deuxième temps nous avons étudié les mécanismes d'action de la lidocaïne sur les cellules cancéreuses du sein. Deux stratégies ont été suivies : une approche globale visant à isoler et identifier les gènes dérégulés par la lidocaïne par analyse comparative des transcriptomes de cellules contrôles versus cellules traitées ; par une approche par gène-candidat afin de vérifier si l'action de la lidocaïne passait par sa cible pharmacologique la plus connue : le canal sodique voltage-dépendant.

Effets antitumoraux de la lidocaïne sur des cellules de cancer du sein : étude in vitro et in vivo

L'article est accessible via le lien suivant : <http://ar.iiarjournals.org/content/38/1/95.abstract>

L'article est accessible via le lien suivant : <http://ar.iiarjournals.org/content/38/1/95.abstract>

L'article est accessible via le lien suivant : <http://ar.iiarjournals.org/content/38/1/95.abstract>

L'article est accessible via le lien suivant : <http://ar.iiarjournals.org/content/38/1/95.abstract>

L'article est accessible via le lien suivant : <http://ar.iiarjournals.org/content/38/1/95.abstract>

L'article est accessible via le lien suivant : <http://ar.iiarjournals.org/content/38/1/95.abstract>

L'article est accessible via le lien suivant : <http://ar.iiarjournals.org/content/38/1/95.abstract>

L'article est accessible via le lien suivant : <http://ar.iiarjournals.org/content/38/1/95.abstract>

L'article est accessible via le lien suivant : <http://ar.iiarjournals.org/content/38/1/95.abstract>

L'article est accessible via le lien suivant : <http://ar.iiarjournals.org/content/38/1/95.abstract>

L'article est accessible via le lien suivant : <http://ar.iiarjournals.org/content/38/1/95.abstract>

Études des mécanismes moléculaires d'action antitumorale de la lidocaïne

Notre article étant essentiellement descriptif, il était essentiel de proposer des hypothèses mécanistiques.

Afin de mettre en évidence les mécanismes d'action de la lidocaïne sur les cellules cancéreuses du sein, nous avons deux stratégies : une approche globale visant à isoler et identifier les gènes dérégulés par la lidocaïne grâce au séquençage des ARN messagers et une approche par gène-candidat afin de vérifier si l'action de la lidocaïne passait par sa cible pharmacologique la plus connue : le canal sodique voltage dépendant.

APPROCHE GLOBALE

Optimisation des expériences

Afin de mettre en évidence les mécanismes d'actions de la lidocaïne dans le cancer du sein, nous avons réalisé une analyse de l'expression différentielle des gènes à partir de données RNA-Seq. Pour ce faire, il fallait tout d'abord optimiser les manipulations et déterminer une concentration et un temps d'exposition à la lidocaïne optimal en vue d'extraire l'ARN à envoyer au séquençage. Nous avons donc réalisé plusieurs expérimentations mesurant l'effet-dose de la lidocaïne sur les mécanismes de cancérogenèse. Comme la lidocaïne entraîne la mort cellulaire, nous voulions isoler des transcrits dérégulés en amont de cet effet en utilisant une dose sub létale. L'objectif étant de déterminer si certains gènes sont plus exprimés dans des conditions d'exposition Lidocaïne versus Contrôle.

Choix de la lidocaïne

Dans l'article (251), nous avons utilisé deux formes de lidocaïne, une forme soluble dans l'éthanol absolu, la Lidocaïne, référence L7757, Sigma, PM : 234,34g/mol) que nous nommerons ici Lido OH et une forme soluble dans l'eau, la Lidocaïne hydrochloride monohydrate, référence L5647, Sigma, PM : 288,81g/mol). Les tests de viabilité et de migration avaient à l'époque étaient réalisés avec de la Lido OH tandis que les tests en soft agar ont été réalisés avec la Lidocaïne hydrochloride.

Nous avons ainsi tout d'abord refait des tests de MTT avec les deux formes de lidocaïne. Le test de viabilité au MTT montrait des résultats différents en fonction de la forme de lidocaïne utilisée (figure 1).

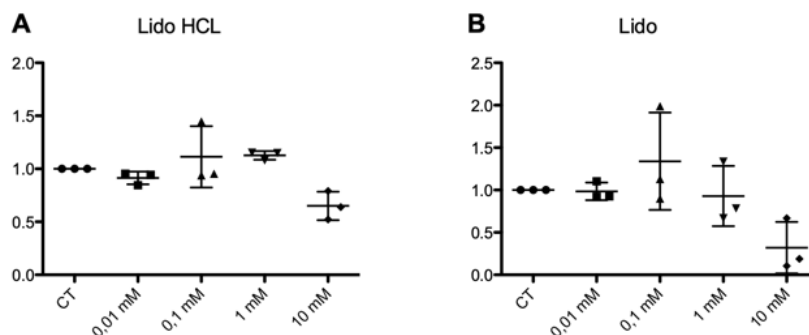


Figure 1 Viabilité des cellules MDA-MB-231 exposées à des doses croissantes de lidocaïne selon technique de MTT. Variation de l'intensité de signal rapportée à la condition contrôle (CTL) après 4h d'exposition à des concentrations croissantes de lidocaïne hydrochloride monohydrate (A) ou lidocaïne OH (B), $n=3$ et chaque condition est réalisée en triple.

En effet, après une exposition de 4h à la concentration de 1mM, le signal de viabilité des cellules augmentait de 12,7% pour les cellules exposées à la lidocaïne hydrochloride monohydrate, tandis qu'il décroissait de 7% pour les cellules exposées à la lidocaïne éthanol. A 10mM, le signal diminuait respectivement de 34% et 68%.

Les données de la littérature ont montré que l'éthanol pouvait avoir un effet inhibiteur sur la croissance tumorale à forte dose (252,253) ou au contraire favoriser des processus de tumorigénèse à faible dose (254). De plus, des études ont montré que certaines molécules présentaient des propriétés antitumorales sous forme alcoolique et perdaient ces propriétés sous forme hydrosolubles (255,256). Ces données, ajoutées au fait que le volume de solvant était trop important, ont fait que pour le reste des expérimentations, nous avons utilisé la lidocaïne hydrochloride monohydrate. En effet, selon la fiche produit, la solubilité des deux formes de lidocaïne est de 50 mg/mL, ce qui conduisait à des solutions mères présentant des concentrations à 0,1731 M et 0,2134 M. Ainsi, de grands volumes de solutions étaient nécessaires pour obtenir les concentrations finales maximales utilisées dans nos expériences : pour obtenir une concentration de 10mM, le volume de Lidocaïne + solvant occupait 5,78 et 4,76% respectivement. Il nous a donc paru nécessaire de concentrer la solution mère au maximum. Ainsi pour la lidocaïne hydrochloride monohydrate, il a été possible de diluer la poudre à la concentration de 500 mg/mL et obtenir un PM=1,73M. En revanche, cette étape de « concentration » n'a pu être réalisée avec lidocaïne soluble dans l'éthanol. En effet, lorsque la solution mère était à une concentration X10 de 2,1M, son incorporation au milieu de culture pour obtenir une concentration finale de 10mM engendrait un précipité blanchâtre. Cette réaction disparaissait lorsque la solution mère était concentrée à 0,42 M (soit X2 la concentration préconisée par le fabricant).

Cette réflexion sur le solvant m'a permis par ailleurs d'écrire une lettre à l'éditeur concernant un article publié dans *Anesthesiology* (257) dans lequel la méthodologie était peu précise concernant la forme de lidocaïne utilisée.

Choix de la technique de viabilité et problème du découplage mitochondrial

Parallèlement aux expérimentations permettant le choix de la meilleure formulation, nous avons également dû adapter nos expérimentations de viabilité/croissance.

Les techniques permettant de mesurer la viabilité/croissance disponibles au laboratoire colorimétrique au sel de tétrazolium (MTT) et bioluminescent (Cell Titer Glo), se basent sur le fonctionnement de la mitochondrie. Or, il pourrait y avoir un impact de la lidocaïne sur cet organe indépendant de l'effet sur la viabilité globale. Il était donc nécessaire de contrôler la pertinence du test par MTT pour nos expériences. Ainsi, différentes techniques de mesure ont été réalisées sur les cellules MDA-MB-231.

Test colorimétrique au MTT

Le test colorimétrique au MTT est une technique quantitative qui a été élaboré par Mosmann en 1983 (258). Il permet d'évaluer la viabilité et la prolifération cellulaires. Il est basé sur la transformation par les cellules du sel de tétrazolium MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium) en cristaux bleus de formazan par la succinate déshydrogénase au sein de leurs mitochondries. Après la solubilisation des cristaux par DMSO, la coloration ainsi formée est mesurée en spectrophotométrie à une longueur d'onde de 595 nm. On observe ainsi l'effet sur la viabilité et la prolifération des cellules exposées ou non à un anesthésique local.

Test de viabilité par dosage de l'ATP Cell Titer Glo®

Le test bioluminescent Cell Titer-Glo® est un réactif permettant de déterminer la viabilité cellulaire grâce à la quantification de l'ATP cellulaire témoin de l'activité métabolique. La lyse des cellules permet de libérer l'ATP qui est ensuite exploité pour une réaction luciférine/luciférase. Le signal luminescent généré est corrélé à la viabilité cellulaire.

Test au cristal violet

Le test de cytotoxicité des cellules au cristal violet (CV) est l'une des méthodes couramment utilisées pour détecter la viabilité cellulaire ou la cytotoxicité des médicaments.

Le cristal violet est un colorant triarylméthane qui peut se lier à des molécules de type ribose telles que l'ADN dans les noyaux. Normalement, les cellules adhérentes mortes se détacheront des plaques de culture cellulaire et seront retirées de la population des cellules viables pendant

les étapes de lavage. La coloration CV peut être utilisée pour quantifier l'ADN total de la population restante et ainsi déterminer la viabilité cellulaire. La coloration CV est directement proportionnelle à la biomasse cellulaire et peut être mesurée à 570 nm.

Comparaison entre technique de MTT et technique de Cell Titer Glo ©

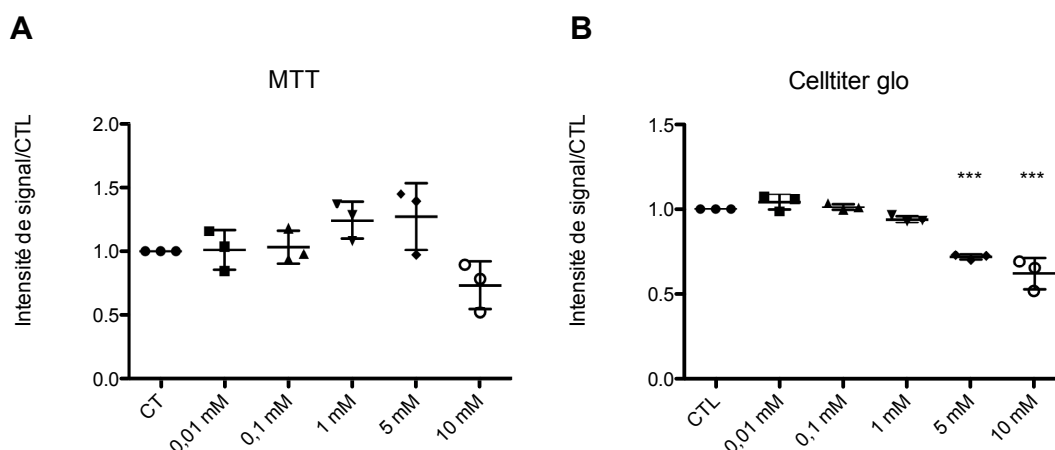


Figure 2 Comparaison de la viabilité des cellules MDA-MB-231 exposées à des doses croissantes de lidocaïne pendant 4h selon technique de MTT ou de Cell Titer Glo ©. Variation de formazan (A, technique de MTT) ou d'ATP (B, technique de Cell Titer Glo©) rapportée à la condition contrôle (CTL) après 4h d'exposition à des concentrations croissantes de lidocaïne. ANOVA : $F(5,12)=4,13$; $p=0,0204$ (A) et ANOVA : $F(5,12)=48,18$; $p<0,0001$ (B) suivi d'un test de comparaison multiple de Dunnett *** : $p<0,0001$; $n=3$, chaque condition étant réalisée en sextuple.

Dans un premier temps nous avons comparé la viabilité cellulaire après 4 heures d'exposition à la lidocaïne par tests de MTT et Cell Titer Glo. La viabilité était donc estimée par la quantité de cristaux de Formazan formés ou par la quantité d'ATP produites par les cellules après exposition pendant 4 heures à de la lidocaïne ou au contrôle.

Si les variations de signal après 4 heures d'exposition étaient significativement différentes par test d'ANOVA dans les deux tests, nous avons des résultats opposés quant au sens de variation (figure 2). Ainsi aux concentrations de 1, 5 et 10 mM de lidocaïne, l'intensité d'ATP décroissait de 6, 28 et 38 % respectivement par rapport au contrôle, tandis que la production de formazan variait de +24, +27 et -27% (ANOVA : $F(5,12)=4,13$; $p=0,0204$ pour le MTT et $F(5,12)=48,18$; $p<0,0001$ pour le Cell Titer Glo © suivi d'un test de comparaison multiple de Dunnett où il y avait une différence significative entre la concentration à 5 et 10 mM comparé au CTL avec $p<0,0001$. La différence semblait s'estomper après 24h d'exposition (figure 3), ANOVA : $F(5,12)=16,37$; $p<0,0001$ pour le MTT suivi d'un test de comparaison multiple de Dunnett où il y avait une différence significative entre la concentration à 10 mM comparé au CTL avec $p<0,0001$.

t F(5,12)=376,7 ; p<0,0001 pour le Cell Titer Glo © suivi d'un test de comparaison multiple de Dunnett où il y avait une différence significative entre la concentration à 1, 5 et 10 mM comparé au CTL avec p<0,0001.

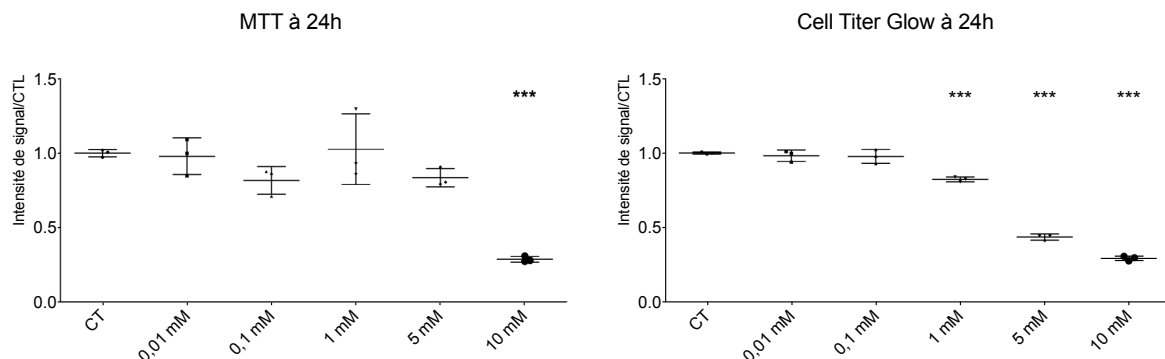


Figure 3 Comparaison de la viabilité des cellules MDA-MB-231 exposées à des doses croissantes de lidocaïne pendant 24h selon technique de MTT ou de Cell Titer Glo ®. Variation de formazan (A, technique de MTT) ou d'ATP (B, technique de Cell Titer Glo®) rapportée à la condition contrôle (CTL) après 24h d'exposition à des concentrations croissantes de lidocaïne, un test réalisé en triple.

Ces résultats pouvaient résulter d'un potentiel effet découplant de la lidocaïne sur les mitochondries de nos cellules. En effet, le test au MTT mesure la formation de formazan par la succinate déshydrogénase ou complexe II de la chaîne respiratoire mitochondriale, tandis que le test de Cell Titer Glo© mesure quant à lui le produit final de la chaîne : la phosphorylation de l'ADP en ATP par l'ATP-Synthétase ou complexe V.

Qu'est-ce que le découplage mitochondrial ?

L'ATP est l'énergie nécessaire à une majorité de processus biologiques. Elle est générée dans la mitochondrie par le processus de phosphorylation oxydative.

Structure de la mitochondrie

Les mitochondries sont des organites à double membrane (interne et externe) retrouvés dans les cellules eucaryotes. La membrane externe est une bicouche phospholipidique perméable aux molécules nutritives, ions, ATP, et ADP via des porines qui permettent le passage de molécules de 10 kDa. La membrane interne, organisée en replis appelés cristae qui augmente sa surface totale, est électivement perméable à l'oxygène, au CO₂, à l'eau et à certaines protéines via la chaîne de transport des électrons (la chaîne respiratoire, formée des complexes I ou NADH déshydrogénase ou complexe I, de la succinate déshydrogénase ou complexe II, de la coenzyme Q-cytochrome c réductase ou complexe III, de la cytochrome c oxydase ou complexe IV et de l'ATP synthétase ou complexe V) et des transporteurs de protéines. L'espace entre les deux

membranes s'appelle l'espace intermembranaire. La membrane interne renferme la matrice mitochondriale. Ces deux espaces jouent un rôle important dans la phosphorylation oxydative.

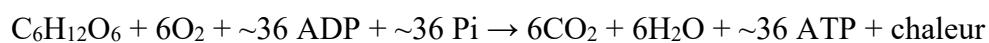
Production d'énergie par la mitochondrie

La fonction principale de la mitochondrie est la conversion de l'énergie par la respiration cellulaire. Les autres fonctions sont le contrôle de l'apoptose et la programmation de mort cellulaire, le stockage du calcium et la signalisation calcique, la synthèse des stéroïdes, la production de radicaux libres (RLO) et leur clairance etc. Afin de comprendre le découplage mitochondrial, il est important de rappeler les fonctions de phosphorylation oxydative mais également de production de RLO au sein de la mitochondrie.

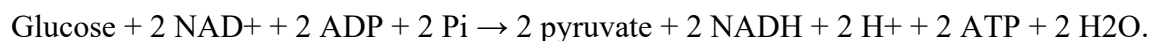
Couplage de la chaîne respiratoire mitochondriale

Les travaux de Peter Mitchell sur transfert d'énergie (259), et ceux de Paul D. Boyer et John E. Walker sur les mécanismes enzymatiques conduisant à la synthèse l'ATP (260,261) ont été récompensés par 2 prix Nobel de chimie.

Le processus de respiration cellulaire aérobie débute dans le cytosol et s'achève au niveau de la membrane mitochondriale interne. Elle peut être résumée par cette équation globale :



La conversion énergétique est un processus chimique de libération de l'énergie contenue dans le glucose. La première étape est la glycolyse dans le cytoplasme. Ce processus est régulé par différentes enzymes cytoplasmiques et aboutit à la transformation d'une molécule de glucose en deux molécules de pyruvate. Les produits de la glycolyse sont 2 molécules d'ATP, 2 molécules de pyruvates et 2 molécules de NADH (nicotinamide adenine dinucleotide).



Puis la respiration aérobie prend place dans la mitochondrie. C'est un mécanisme complexe utilisant l'oxygène comme accepteur final d'électron.

Un processus de décarboxylation convertit le pyruvate en acétyl-CoA et CO₂.

Puis l'acétyl-CoA est utilisé dans le cycle d'acide citrique (Cycle de Krebs) où il est totalement oxydé en CO₂ et H₂O, produisant du NADH mais aussi du FADH₂ (reduced flavin adenine dinucleotide) qui stocke l'énergie

Ensuite le NADH et le FADH₂ sont oxydés en NAD⁺ et FAD par la chaîne de transport d'électrons (CTE). La CTE est formée de plusieurs complexes à travers la membrane interne. 3 sont des pompes à protons : les complexes I, III et IV. En effet, les réactions redox à travers les complexes I et III sont couplés à la sortie de protons issus de la matrice. Ce processus génère un "gradient d'hydrogène" appelée force proton motrice (fpm) à travers la membrane interne de la mitochondrie.

Enfin la fpm est utilisée pour produire en grande quantité de l'ATP via la phosphorylation oxydative. En effet, le complexe V ou ATP synthase utilise l'énergie de ce gradient électrochimique de part et d'autre de la membrane interne pour phosphoryler l'ADP en ATP.

La fpm est composée de deux éléments: le ΔpH , qui est le gradient de pH à travers la membrane interne et le $\Delta\psi\text{m}$ (ou potentiel de membrane mitochondrial, qui est la différence entre le potentiel électrique du cytoplasme et de la matrice mitochondriale). La fpm peut être représentée par l'équation suivante :

$$\text{fpm} = \Delta\psi\text{m} - 61,5\log_{10} \Delta\text{pH}$$

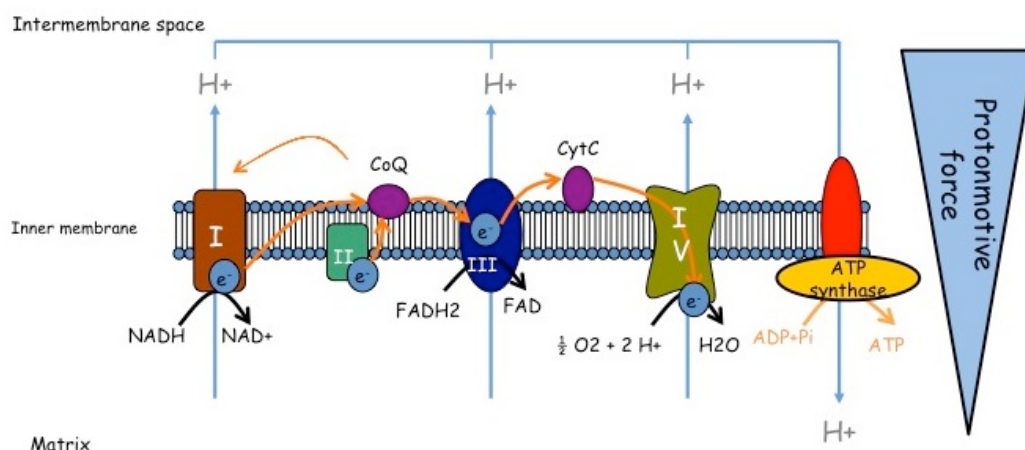


Figure 4 Représentation de la chaîne de transport d'électrons et des processus d'oxydoréduction conduisant à la phosphorylation oxydative à travers la membrane interne de la mitochondrie.

La production de radicaux libres mitochondriaux

Il a été montré dans des conditions physiologiques que le transport de certains électrons à transfert la chaîne respiratoire ne parvenaient pas à leur accepteur final qu'est l'oxygène et ne formaient donc pas une molécule d'H₂O mais des radicaux libres d'oxygènes (RLO), notamment l'anion superoxyde (O₂⁻) et le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (262,263). La mitochondrie dispose de plusieurs moyens pour éliminer les RLO : via son système

enzymatique (superoxyde dismutase, catalase et glutathion peroxidase), via des oligo-éléments (cuivre, zinc, fer, sélénium) ou vitamines A, C et E présents dans la mitochondrie.

Les RLO sont impliqués dans différents processus physiologiques et peuvent être impliqués dans des voies de signalisation ou de régulation. Ils peuvent également être rencontrés en grande quantité dans des situations de stress cellulaire telles que l'ischémie–reperfusion (264,265), hypoxie–réoxygénation (266), le diabète (267), la toxicité lipidique (268,269), être favorisé par des traitement toxiques(270), dans toutes ces situations les capacités anti-oxydantes sont dépassées. Les RLO peuvent être relargués dans le cytoplasme et engendrer des dommages conduisant au stress oxydatif et à des lésions cellulaires.

[Le découplage mitochondrial](#)

$\Delta\psi_m$ et RLO sont corrélés (271). Une petite augmentation du $\Delta\psi_m$ conduit à la formation de RLO tandis que son abaissement diminue la production de RLO. Un découplage mitochondrial modéré abaisse le $\Delta\psi_m$ et ainsi le taux de RLO sans compromettre de manière importante l'efficacité de la phosphorylation oxydative (272).

Le découplage mitochondrial permet le retour de protons de l'espace intermembranaire dans la matrice sans production d'ATP. Décrite par Nicholls en 1974 (273), cette fuite de protons abaisse le $\Delta\psi_m$ et augmente l'activité de la chaîne respiratoire (274). Cette fuite peut-être basale, en fonction la composition en acides gras de la membrane interne (275) ou être induite par des protéines localisées à travers la membrane interne : les protéines découplantes. La 1^{ère}, décrite en 1978, UCP1 (Uncoupling Protein 1), ou thermogénine est présente chez les petits animaux hibernants (276,277). Localisée dans le tissu brun, elle est impliquée dans la thermogénèse sans frisson. Le rôle des autres UCP, UCP2, ubiquitaire et UCP3 (dans le muscle squelettique) est plus controversé. Activés dans des conditions extrêmes (jeûne, exercice intense, régime hautement calorique...), ils pourraient être un mécanisme protecteur contre le stress oxydatif et ses conséquences(278). Leur activation conduirait à un abaissement du $\Delta\psi_m$ et une diminution des RLO (271).

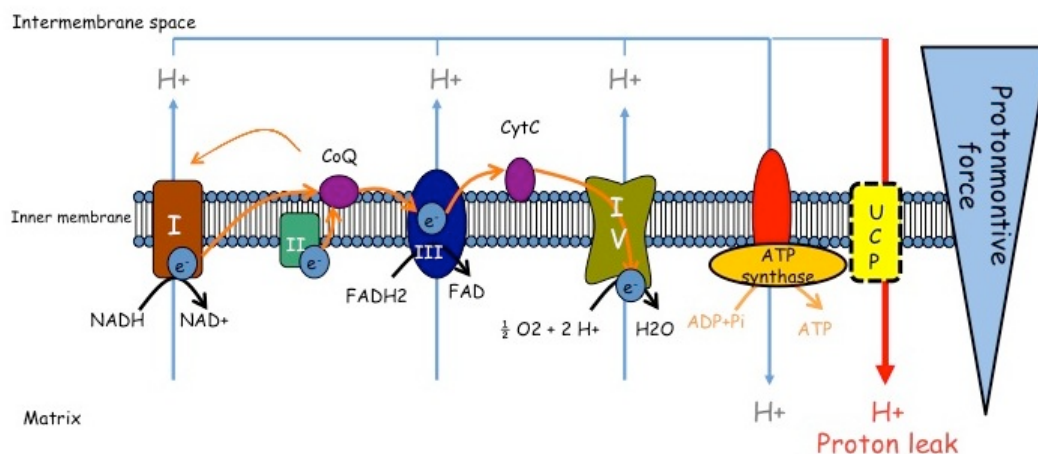


Figure 5 Représentation de la chaîne de transport d'électrons sur la membrane mitochondriale interne et du phénomène de découplage mitochondrial par l'intermédiaire d'une protéine découplante UCP.

Anesthésiques locaux et découplage mitochondrial

Les propriétés découplantes des anesthésiques locaux ont déjà été décrites dans la littérature. En 1972, Papa rapportait déjà les effets découplants des anesthésiques locaux (279). La dibucaïne augmentait l'influx protonique de mitochondries isolées de l'espace intermembranaire vers la matrice mitochondriale. Ce turnover protonique conduisait à une augmentation de la dissipation énergétique et la diminution de la phosphorylation oxydative. Garlid à quant à lui montré que les amino-amides, aux propriétés hydrophobes, découplaient la mitochondrie de la même manière que le carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP) protonophore connu (280).

Les propriétés découplantes de la bupivacaïne, autre AL lipophile, ont également été décrites par Dabadie et impliquait également la voie protonophore (281). A l'opposé, la ropivacaïne, serait moins découplante, du fait de sa faible lipophilie (282). Le processus protonophore impliqué dans les propriétés découplantes des AL s'effectuerait plutôt à travers des canaux que par un transport actif à travers la membrane (283). Les anesthésiques locaux auraient également un pouvoir découplant par perturbation directe des complexes de la chaîne respiratoire (284).

MTT versus cristal violet

Afin de mesurer la viabilité avec un test n'impliquant pas la mitochondrie, nous avons donc comparé le test de viabilité/croissance au MTT avec celui au cristal violet qui a l'avantage de refléter le taux l'ADN et ainsi nous assurer que nos résultats ne soient pas perturbés par l'action directe des AL sur la mitochondrie. Nous avons ainsi chercher à mesurer la viabilité par ces deux techniques après 3 temps d'exposition : 4 heures, 24 h et 48h. Après 4 heures

d'exposition, si on se base sur le test au MTT, la quantité de cristaux de formazan formés augmentait de manière dose dépendante avec la lidocaïne sans différence significative (ANOVA : $F(4,10)=1,154$; $p=0,3867$), tandis que la quantité d'ADN semblait décroître (ANOVA : $F(4,10)=0,1818$; $p=0,9426$). A partir de 24h d'exposition en revanche, la quantité de formazan et d'ADN décroissaient toutes deux de manière dose dépendante, avec une différence significative entre la condition contrôle et la concentration de 10mM de lidocaïne (ANOVA : $F(4,10)=37,38$; $p<0,0001$ et ANOVA : $F(4,10)=6,686$; $p=0,0069$ respectivement) et cela persistait à 48h (ANOVA : $F(4,10)=52,56$; $p<0,0001$ et ANOVA : $F(4,10)=34,35$; $p<0,0001$)/

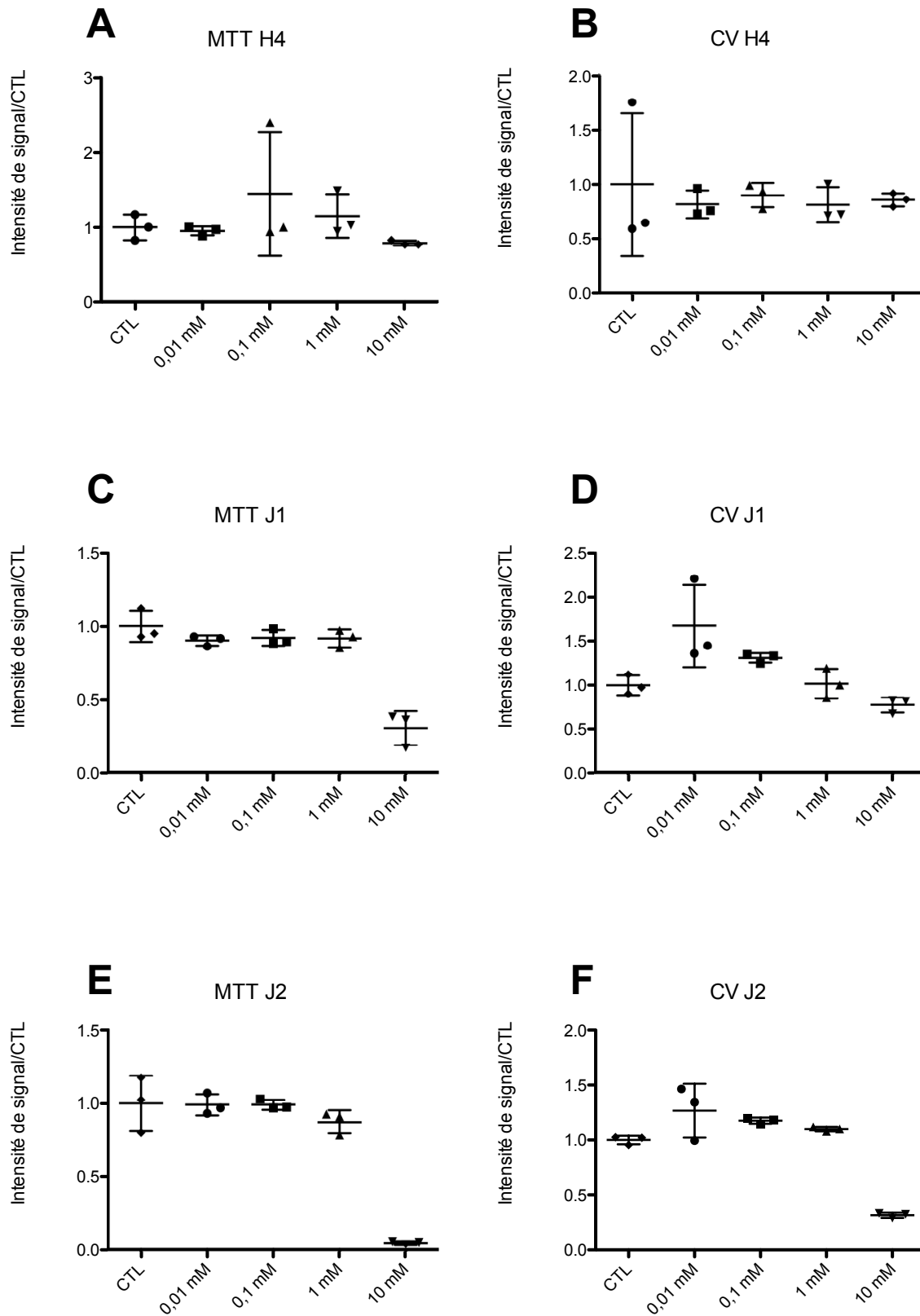


Figure 6 Comparaison de la viabilité des cellules selon technique de MTT ou de Cristal Violet. Variation de formazan (A, C et E, technique de MTT) ou d'ADN (B,D,F technique de Cristal Violet) rapportée à la condition contrôle (CTL) après 4 (A,B), 24 (C,D) et 48h (E,F) d'exposition à des concentrations croissantes de lidocaïne, un test réalisé en triple.

Outre la croissance et la viabilité, nous avons également réalisé des tests de clonogénicité, d'adhésion cellulaire et de prolifération en absence de substrat (soft agar colony formation) et un test d'apoptose par annexine V.

Test de clonogénicité

Le test de clonogénicité est un test d'efficacité d'étalement cellulaire. Il mesure la capacité des cellules à proliférer et à former des clones, après forte dilution dans du milieu de culture. Ce test a été employé sur des cellules exposées à la lidocaïne ou à l'excipient seul. Seules les cellules ayant survécu au traitement gardent la capacité à former des clones en culture.

Après avoir poussé dans des T75, les cellules sont décollées, comptées et réensemencées dans des boîtes 6 puits à la concentration de 200 cellules dans 2 mL de milieu complet et de lidocaïne à doses croissantes (de 0,001mM à 10 mM) ou au contrôle. Le test est réalisé de manière indépendante 3 fois, chaque condition est réalisée en triple. Les boîtes de culture sont incubées pendant 7 jours afin de permettre le développement des clones. Les clones sont ensuite exposés au MTT pendant 30 minutes, les boîtes sont photographiées pour compter les colonies à l'aide d'une macro Fiji puis le MTT est dissous au DMSO et l'intensité lue au spectrophotomètre. Suite à l'exposition à la Lidocaïne, le nombre de colonies diminue de manière dose-dépendante (ANOVA : $F(5,12)=86,96$; $p<0,0001$) et ainsi que la croissance évaluée par MTT (ANOVA : $F(5,12)=42,68$; $p<0,0001$) suivi d'un test de Dunnett montrant une baisse significative de la croissance de l'ordre de -35,7% ($p<0,01$) dès la concentration de 1mM .

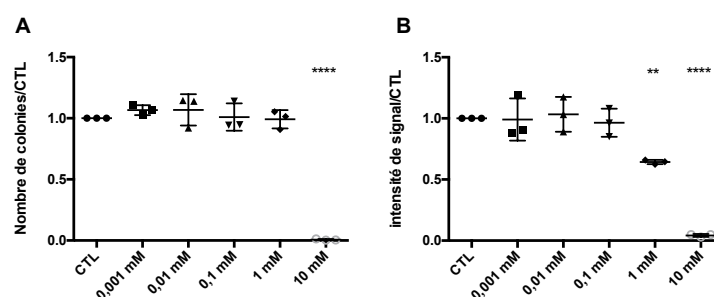


Figure 7 Test clonogénique : variabilité du nombre de colonies formées après exposition à des doses croissantes de lidocaïne par rapport à la condition contrôle, par décompte direct du nombre de colonies (A) (ANOVA : $F(5,12)=86,96$; $p<0,0001$, suivie d'un test de Dunnett **** : $p<0,00001$) et par mesure de l'intensité de signal (test de MTT) (B) (ANOVA : $F(5,12)=42,68$; $p<0,0001$, suivie d'un test de Dunnett ** : $p<0,01$ et **** : $p<0,00001$).

Test d'adhésion cellulaire

Le test d'adhésion cellulaire mesure la capacité des cellules à adhérer au fond du puits après avoir été décollées au préalable et après avoir été exposées à la lidocaïne à doses croissantes ou à son contrôle.

Après avoir poussé dans des T75, les cellules sont décollées, comptées et réensemencées dans des boîtes 96 puits à la concentration de 30000 cellules dans 0,1mL de milieu complet et de lidocaïne à doses croissantes. Les cellules sont incubées pendant 90 min afin de permettre leur adhésion au fond du puit. Le milieu est ensuite aspiré, les cellules sont rincées deux fois au PBS puis fixées à l'éthanol absolu pendant 10 minutes puis colorées au cristal violet. Le cristal violet est ensuite dissous dans du SDS et l'intensité est lue au spectrophotomètre. La lidocaïne diminue la capacité des cellules à adhérer au fond du puit (ANOVA : $F(5,18)=17,35$; $p<0,0001$ suivi d'un test de comparaison multiple de Dunnett où $p<0,001$ à 10mM).

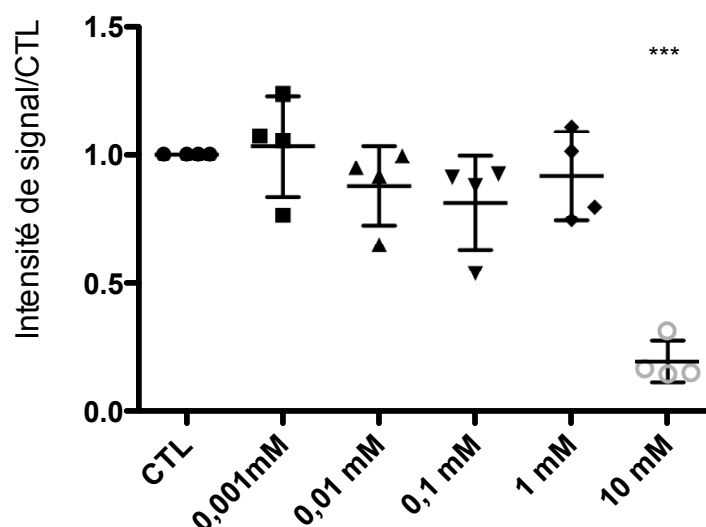


Figure 8 Adhésion cellulaire des cellules MDA-MB-231 exposées à des doses croissantes de lidocaïne rapportée à la condition contrôle. ANOVA : $F(5,18)=17,35$; $p<0,0001$ suivi d'un test de comparaison multiple de Dunnett *** : $p<0,0001$; $n=4$, chaque condition étant réalisée en sextuple.

Test de Soft Agar

Le test de soft agar est un test clonogénique qui mesure la capacité de croissance indépendante de l'ancrage, c'est-à-dire la propriété des cellules tumorales à pousser dans un milieu semi-solide et donc sans adhérer à une surface (285). C'est une caractéristique des cellules tumorales invasives et métastatiques. Ainsi, les cellules, diluées à faible concentration sont mises en culture dans une gélose composée de milieu de culture et d'agar +/- lidocaïne pendant plusieurs jours. Leur croissance est alors quantifiée par l'ajout de MTT qui sera métabolisé par les cellules tumorales. Les boîtes sont ensuite photographiées et les colonies sont comptées, leur

taille, leur périmètre et leur index de circularité mesurés par une macro sur Fiji. Un index de circularité à 1 correspond à une circularité parfaite.

Nous avons ainsi mis en culture pendant 14 jours des cellules dans du soft agar dans lequel a été incorporé des doses croissantes de lidocaïne (0,001 ; 0,01 ; 0,1 et 1mM) ou son contrôle, n=4, chaque condition était réalisée en triple.

Le nombre de colonies formées décroissait de manière dose dépendante (ANOVA : $F(4,15)=33,03$; $p<0,0001$), de même que leur surface (ANOVA : $F(4,14)=36,29$; $p<0,0001$), leur périmètre (ANOVA : $F(4,14)=16,41$; $p<0,0001$) et leur index de circularité (ANOVA : $F(4,14)=36,29$; $p<0,0001$).

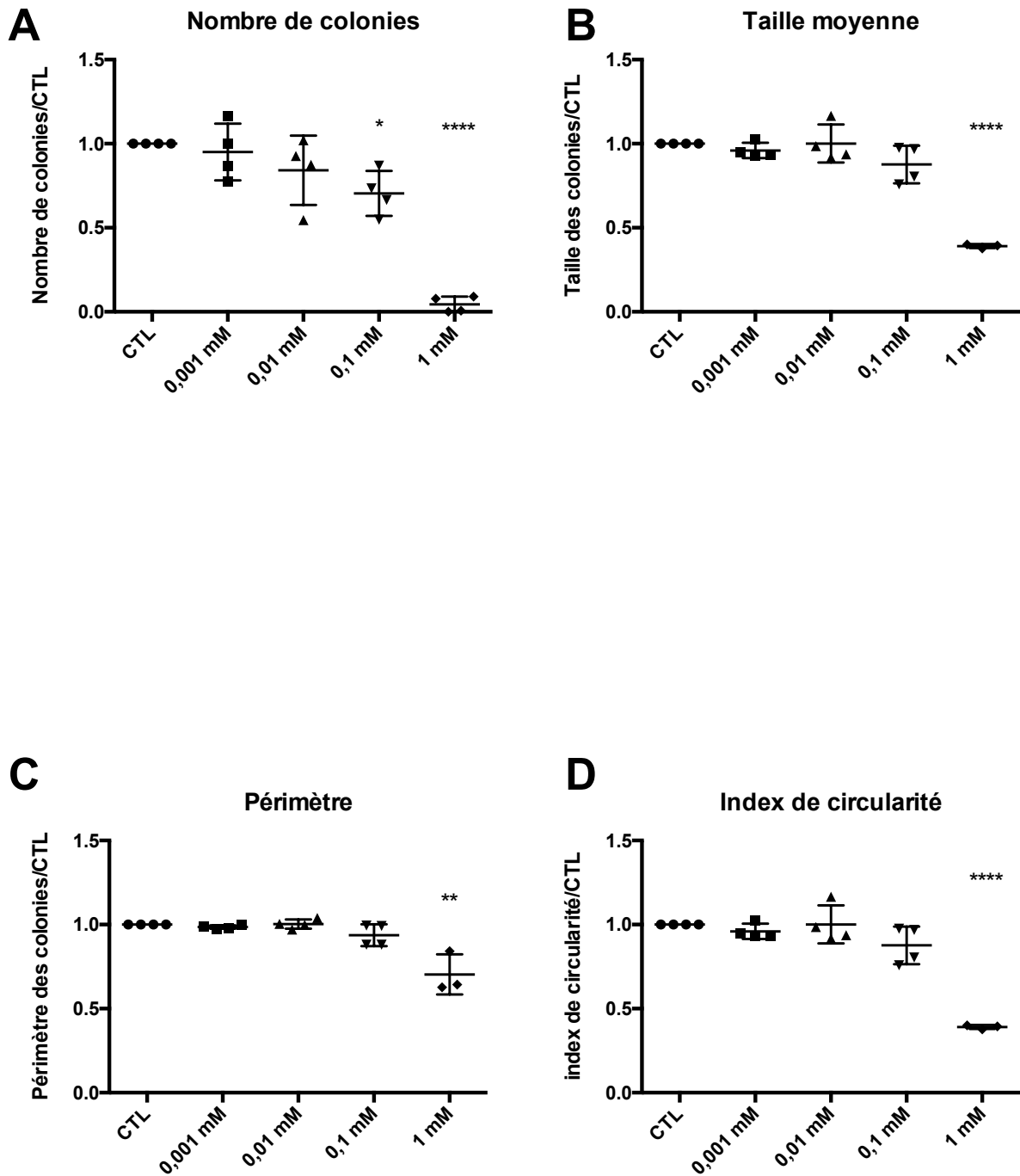


Figure 9 Croissance indépendante de l'ancrage. Variation du nombre (A), de la taille moyenne (B), du périmètre moyen (C) et de l'index de circularité des colonies de cellules MDA-MB-231 en soft agar exposées à des doses croissantes de lidocaïne, rapportée à la condition contrôle, n=4, chaque condition est réalisée en triple.

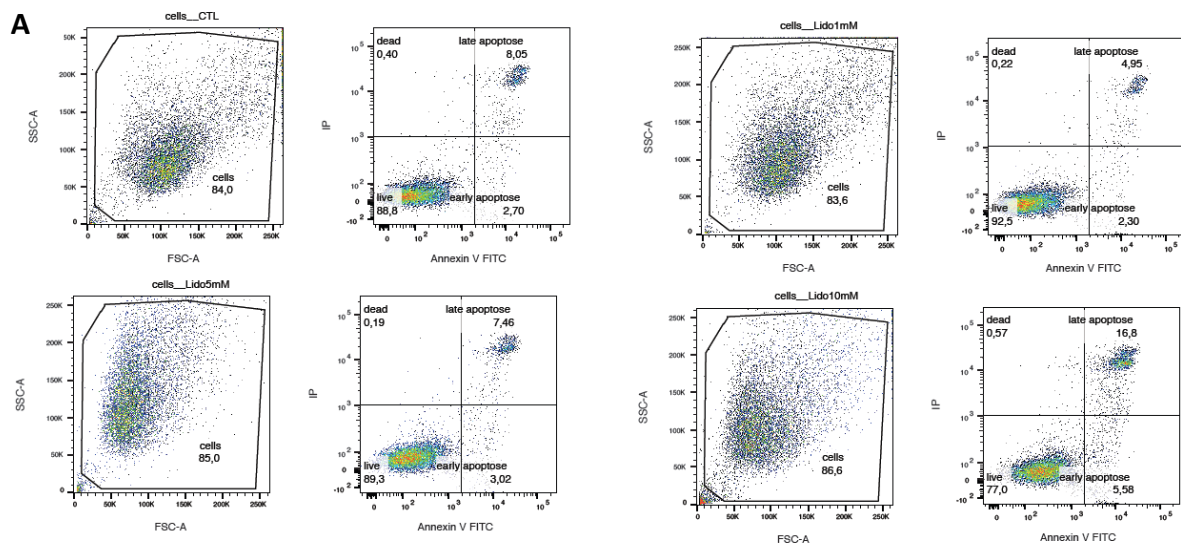
FACS Annexine V

Dans une cellule normale, les phosphatidylsérines membranaires sont situées sur la face interne de la membrane uniquement. Lors de l'entrée de la cellule en apoptose, elles sont délocalisées et exprimées des deux côtés de la membrane.

L'annexine V a une forte affinité pour ces phosphatidylsérines et va donc marquer les cellules apoptotiques.

L'IP se fixe également à l'ADN des cellules ayant perdu l'intégrité de leur membrane et permet de discriminer par double marquage les cellules en apoptose tardive des cellules en apoptose précoce.

Nous avons exposé des cellules à de la lidocaïne à doses croissantes (1, 5 et 10 mM) ou au contrôle pendant 24h. Les cellules sont ensuite décollées et marquées à l'annexine V et à l'IP puis passées au FACS. Le pourcentage d'apoptose est faible (22% à la concentration de 10 mM) mais il est significativement différent par rapport à la condition contrôle pour l'apoptose tardive et l'apoptose totale ($F(3,11)=8,298$; $p=0,0077$ et $F(3,11)=7,823$; $p=0,0092$), le test de Dunnett montre une différence significative entre la condition contrôle et la concentration de 10 mM. Le test d'ANOVA est non-significatif pour l'apoptose précoce.



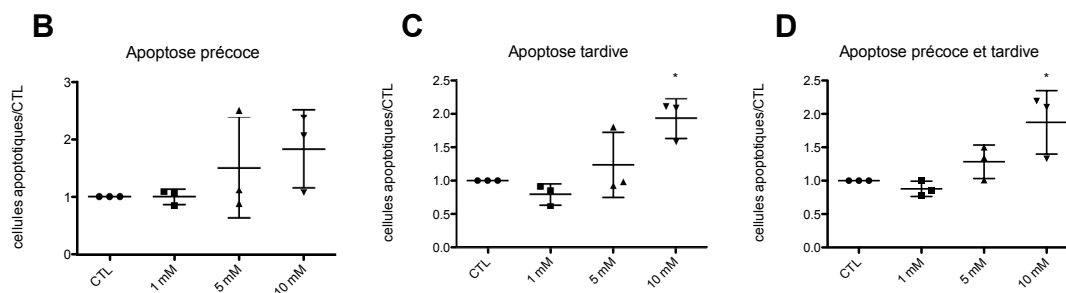


Figure 10 Apoptose : Variation du nombre de cellules en apoptose précoce (B), tardive (C) ou à l'un des deux stades (D) après exposition à des doses croissantes de lidocaïne pendant 24 h par rapport au contrôle.

RNA-seq

A l'issue de nos tests, nous avons choisi la concentration d'1mM de lidocaïne hydrochloride pendant 24h pour réaliser l'extraction des ARN messagers des cellules traitées ou non par lidocaïne en vue de réaliser un RNAseq. En effet à cette condition, la viabilité que cela soit en MTT, CV, Cell Titer Glo ou FACS ne semble pas compromise. De même, l'adhésion ne semble pas compromise à 90min. En revanche, dans nos tests clonogéniques à long terme (Plating Efficiency et Soft Agar), la concentration de 1mM compromet la croissance cellulaire indépendante ou non de l'ancrage.

Les cellules étaient exposées à de la lidocaïne hydrochloride monohydrate à la concentration de 1mM ou au solvant seul pendant 24h, n=3 pour chaque condition. L'ARN était ensuite extrait par Kit RNAease, 1mcg était envoyé à la plateforme GenomEAST de l'IGBMC qui assurait le séquençage haut débit par Illumina HiSeq 4000 S et le traitement bioinformatique des données pour l'analyse de l'expression des gènes. Le rapport se trouve en annexe.

Analyse des résultats du RNAseq

L'analyse de l'expression des gènes retrouve 17 gènes réprimés (figure 11 et tableau 2) et 94 gènes surexprimés (figure 11 et tableau 3) sous lidocaïne lorsqu'on applique les seuils suivants : $\log_2 \text{Fold-Change} < -0,5$ ou $> 0,5$ et $p\text{-ajusté} < 0,05$.

De manière intéressante, la plus connue des cibles pharmacologiques de la lidocaïne, le canal sodique voltage dépendant SCN5A est surexprimé après exposition à cet anesthésique local ($\text{Log}_2 \text{FC} = 0,591819586$ et $p = 0,000275372$ et $p\text{-ajusté} = 0,007409769$). De même, lorsqu'on considère la valeur p non ajustée, on peut noter une réexpression du gène du récepteur HER2 (erbb2) dans cette lignée triple-négative ($\text{Log}_2 \text{FC} = 0,2024475$ et $p = 0,011402347$ et $p\text{-ajusté} = 0,08272872$). PPAR- γ semble également être réexprimé sous lidocaïne ($\text{Log}_2 \text{FC} = 0,18795837$, $p = 0,036961599$ mais $p\text{-ajusté} = 0,169719561$).

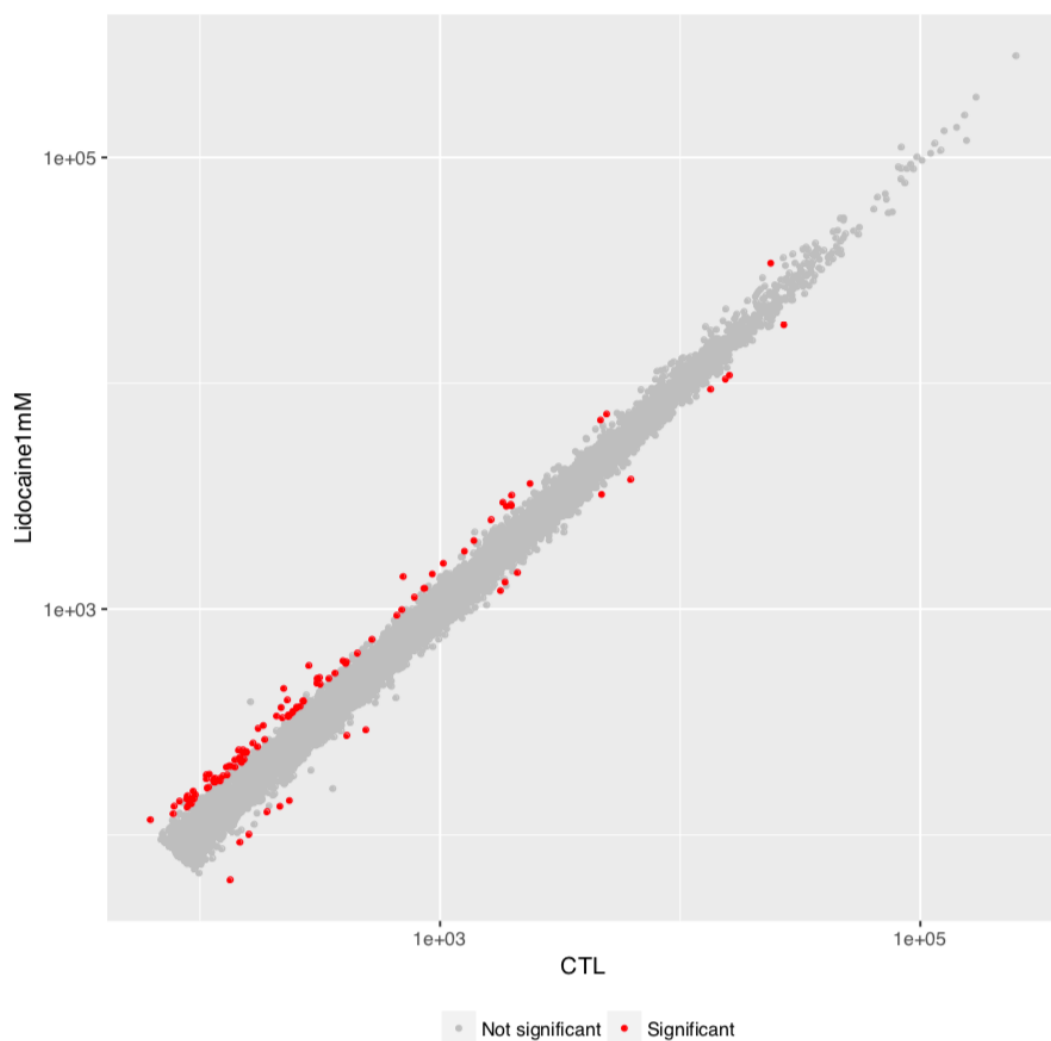


Figure 11 Nuage de point comparant le nombre de transcrits de gènes en moyenne normalisée pour chaque condition (Lidocaïne versus Contrôle). Un pseudo-compte de 1 est ajouté à toutes les valeurs pour représenter les gènes qui ne sont pas exprimés dans une condition. Les gènes dont l'expression est significativement différente sont sélectionnés à l'aide des valeurs seuil suivantes : $\log_2 \text{Fold-Change} < -0,5$ ou $> 0,5$ et $p < 0,05$.

ENSEMBL_GENE_ID	Name
ENSG00000138326	ribosomal protein S24(RPS24)
ENSG00000187837	histone cluster 1 H1 family member c(HIST1H1C)
ENSG00000187514	microRNA 1244-1(MIR1244-1)
ENSG00000198695	NADH dehydrogenase, subunit 6 (complex I)(ND6)
ENSG00000254300	long intergenic non-protein coding RNA 1111(LINC01111)
ENSG00000145331	tRNA methyltransferase 10A(TRMT10A)
ENSG00000270647	TATA-box binding protein associated factor 15(TAF15)
ENSG00000197903	histone cluster 1 H2B family member k(HIST1H2BK)
ENSG00000164167	LSM6 homolog, U6 small nuclear RNA and mRNA degradation associated(LSM6)
ENSG00000144034	TP53RK binding protein(TPRKB)
ENSG00000161970	ribosomal protein L26(RPL26)
ENSG00000228502	
ENSG00000257956	
ENSG00000237550	
ENSG00000242299	
ENSG00000205940	
ENSG00000253785	

Tableau 2 Identification ENSEMBL et nom des gènes réprimés sous lidocaïne

ENSEMBL_GENE_ID	Name
ENSG00000183873	sodium voltage-gated channel alpha subunit 5(SCN5A)
ENSG00000100299	arylsulfatase A(ARSA)
ENSG00000007516	BAI1 associated protein 3(BAIAP3)
ENSG00000071242	ribosomal protein S6 kinase A2(RPS6KA2)
ENSG00000253958	claudin 23(CLDN23)
ENSG00000185567	AHNAK nucleoprotein 2(AHNAK2)
ENSG00000179913	UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 3(B3GNT3)
ENSG00000012124	microRNA 5196(MIR5196)
ENSG00000132561	matrilin 2(MATN2)
ENSG00000132470	integrin subunit beta 4(ITGB4)

ENSG00000183691	noggin(NOG)
ENSG00000198753	plexin B3(PLXNB3)
ENSG00000107902	phospholysine phosphohistidine inorganic pyrophosphate phosphatase(LHPP)
ENSG00000110628	solute carrier family 22 member 18(SLC22A18)
ENSG00000076356	plexin A2(PLXNA2)
ENSG00000161682	family with sequence similarity 171 member A2(FAM171A2)
ENSG00000082781	integrin subunit beta 5(ITGB5)
ENSG00000157613	cAMP responsive element binding protein 3 like 1(CREB3L1)
ENSG00000128510	carboxypeptidase A4(CPA4)
ENSG00000132821	V-set and transmembrane domain containing 2 like(VSTM2L)
ENSG00000135119	ring finger protein, transmembrane 2(RNFT2)
ENSG00000169231	thrombospondin 3(THBS3)
ENSG00000243753	major histocompatibility complex, class I, L (pseudogene)(HLA-L)
ENSG00000179832	maestro heat like repeat family member 1(MROH1)
ENSG00000123384	LDL receptor related protein 1(LRP1)
ENSG00000149527	phospholipase C eta 2(PLCH2)
ENSG00000185339	transcobalamin 2(TCN2)
ENSG00000108840	histone deacetylase 5(HDAC5)
ENSG00000153246	phospholipase A2 receptor 1(PLA2R1)
ENSG00000058085	laminin subunit gamma 2(LAMC2)
ENSG00000040608	reticulon 4 receptor(RTN4R)
ENSG00000204282	TNRC6C antisense RNA 1(TNRC6C-AS1)
ENSG00000135636	dysferlin(DYSF)
ENSG00000182179	microRNA 5193(MIR5193)
ENSG00000100234	TIMP metalloproteinase inhibitor 3(TIMPS)
ENSG00000104368	plasminogen activator, tissue type(PLAT)
ENSG00000157150	TIMP metalloproteinase inhibitor 4(TIMPS)
ENSG00000174837	adhesion G protein-coupled receptor E1(ADGRE1)
ENSG00000101670	lipase G, endothelial type(LIPG)
ENSG00000247095	MIR210 host gene(MIR210HG)
ENSG00000185522	lamin tail domain containing 2(LMNTD2)
ENSG00000168056	latent transforming growth factor beta binding protein 3(LTBP3)
ENSG00000108771	DEH-box helicase 58(DHX58)

ENSG00000104783	potassium calcium-activated channel subfamily N member 4(KCNN4)
ENSG00000214021	tubulin tyrosine ligase like 3(TTLL3)
ENSG00000145107	transmembrane 4 L six family member 19(TM4SF19)
ENSG00000198203	sulfotransferase family 1C member 2(SULT1C2)
ENSG00000226380	microRNA 29a(MIR29A)
ENSG00000142798	heparan sulfate proteoglycan 2(HSPG2)
ENSG00000160326	solute carrier family 2 member 6(SLC2A6)
ENSG00000131069	acyl-CoA synthetase short-chain family member 2(ACSS2)
ENSG00000002587	heparan sulfate-glucosamine 3-sulfotransferase 1(HS3ST1)
ENSG00000186907	reticulon 4 receptor-like 2(RTN4RL2)
ENSG00000143036	solute carrier family 44 member 3(SLC44A3)
ENSG00000205336	adhesion G protein-coupled receptor G1(ADGRG1)
ENSG00000100311	platelet derived growth factor subunit B(PDGFB)
ENSG00000114923	solute carrier family 4 member 3(SLC4A3)
ENSG00000184371	colony stimulating factor 1(CSF1)
ENSG00000149809	transmembrane 7 superfamily member 2(TM7SF2)
ENSG00000188747	NADPH oxidase activator 1(NOXA1)
ENSG00000099953	matrix metalloproteinase 11(MMP11)
ENSG00000170412	G protein-coupled receptor class C group 5 member C(GPRC5C)
ENSG00000137642	sortilin related receptor 1(SORL1)
ENSG00000170955	protein kinase C delta binding protein(PRKCDBP)
ENSG00000129038	lysyl oxidase like 1(LOXL1)
ENSG00000162591	multiple EGF like domains 6(MEGF6)
ENSG00000165757	KIAA1462(KIAA1462)
ENSG00000215182	mucin 5AC, oligomeric mucus/gel-forming(MUC5AC)
ENSG00000163083	inhibin beta B subunit(INHBB)
ENSG00000169026	major facilitator superfamily domain containing 7(MFSD7)
ENSG00000105290	amyloid beta precursor like protein 1(APLP1)
ENSG00000188064	Wnt family member 7B(WNT7B)
ENSG00000141753	insulin like growth factor binding protein 4(IGFBP4)
ENSG00000139211	adhesion molecule with Ig like domain 2(AMIGO2)
ENSG00000170190	solute carrier family 16 member 5(SLC16A5)
ENSG00000134955	solute carrier family 37 member 2(SLC37A2)

ENSG00000187720	thrombospondin type 1 domain containing 4(THSD4)
ENSG00000143847	PTPRF interacting protein alpha 4(PPFIA4)
ENSG00000163453	insulin like growth factor binding protein 7(IGFBP7)
ENSG00000054793	ATPase phospholipid transporting 9A (putative)(ATP9A)
ENSG00000102934	plasmalipin(PLLP)
ENSG00000173546	chondroitin sulfate proteoglycan 4(CSPG4)
ENSG00000150630	vascular endothelial growth factor C(VEGFC)
ENSG00000243449	chromosome 4 open reading frame 48(C4orf48)
ENSG00000108846	ATP binding cassette subfamily C member 3(ABCC3)
ENSG00000205517	ral guanine nucleotide dissociation stimulator like 3(RGL3)
ENSG00000123989	chondroitin polymerizing factor(CHPF)
ENSG00000130304	solute carrier family 27 member 1(SLC27A1)
ENSG00000130522	JunD proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit(JUND)
ENSG00000105963	ArfGAP with dual PH domains 1(ADAP1)
ENSG00000168528	serine incorporator 2(SERINC2)
ENSG00000261286	
ENSG00000261534	
ENSG00000116883	

Tableau 3 Identification ENSEMBL et nom des gènes surexprimés sous lidocaïne

Annotation fonctionnelle de groupes de gènes

Après avoir établi les différents profils d'expression des gènes, nous avons cherché la caractérisation fonctionnelle de groupe de gènes afin d'identifier une ou plusieurs fonctions biologiques qui seraient associées de façon spécifique à la modulation de gènes de façon organisée.

Analyse via DAVID

L'analyse en cluster ING fonctionnel de gènes a été réalisée via le logiciel DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) qui intègre plusieurs bases de données publiques : annotations de *Gene Ontology* GO, Pathways, domaines de Protéines (286). Cet outil de regroupement d'annotations fonctionnelles permet l'identification de groupes d'annotations significativement sur- ou sous-représentés dans une sélection de gènes. La fonctionnalité DAVID Functional Classification tool intègre un algorithme de clustering fonctionnel, pour regrouper des gènes ou des termes GO les plus similaires dans des groupes

distincts et DAVID Functional Annotation Clustering Tool pour le clustering des termes d'annotations.

Ces analyses de réseaux avec surreprésentation, en utilisant la base en ligne DAVID, permettent d'établir si nos gènes sur- ou sous-exprimés étaient susceptibles d'intervenir dans des réseaux biologiques de façon significative. Pour cela nous avons inclus la liste des gènes dont l'expression est significativement modifiée et avons effectué une analyse de surreprésentation. L'analyse via le logiciel DAVID a permis de mettre en évidence 2 clusters pour les gènes réprimés et 17 clusters pour les gènes surexprimés.

Gènes réprimés sous lidocaïne :

Ainsi, 6 des gènes réprimés sont regroupés en 2 clusters fonctionnels impliqués tous les 2 dans la régulation de la transcription (méthylation, acétylation, liaison à l'ADN, épissage) :

- histone cluster 1 H1 family member c (HIST1H1C)
- TATA-box binding protein associated factor 15 (TAF15)
- histone cluster 1 H2B family member k (HIST1H2BK)
- LSM6 homolog, U6 small nuclear RNA and mRNA degradation associated (LSM6)
- ribosomal protein S24 (RPS24)
- TP53RK binding protein (TPRKB)

Gènes surexprimés sous lidocaïne :

Concernant les gènes surexprimés, ceux-ci sont impliqués dans 17 clusters fonctionnels dont certains sont intéressants pour l'étude des mécanismes moléculaires d'action de la lidocaïne, voici ceux que nous avons retenus.

Protéines à la membrane

Tout d'abord, 37 gènes codent pour des protéines transmembranaires et 4 pour des protéines membranaires :

Gènes codant pour des protéines ayant une région transmembranaire :

- sodium voltage-gated channel alpha subunit 5(SCN5A)
- solute carrier family 2 member 6(SLC2A6)
- solute carrier family 44 member 3(SLC44A3)
- adhesion G protein-coupled receptor G1(ADGRG1)
- colony stimulating factor 1(CSF1)
- solute carrier family 4 member 3(SLC4A3)
- claudin 23(CLDN23)
- UDP-GlcNAc

- G protein-coupled receptor class C group 5 member C(GPRC5C)
- transmembrane 7 superfamily member 2(TM7SF2)
- sortilin related receptor 1(SORL1)
- integrin subunit beta 4(ITGB4)
- plexin B3(PLXNB3)
- solute carrier family 22 member 18(SLC22A18)
- family with sequence similarity 171 member A2(FAM171A2)
- plexin A2(PLXNA2)
- cAMP responsive element binding protein 3 like 1(CREB3L1)
- integrin subunit beta 5(ITGB5)
- major facilitator superfamily domain containing 7(MFSD7)
- amyloid beta precursor like protein 1(APLP1)
- ring finger protein, transmembrane 2(RNFT2)
- adhesion molecule with Ig like domain 2(AMIGO2)
- solute carrier family 16 member 5(SLC16A5)
- LDL receptor related protein 1(LRP1)
- solute carrier family 37 member 2(SLC37A2)
- phospholipase A2 receptor 1(PLA2R1)
- ATPase phospholipid transporting 9A (putative)(ATP9A)
- dysferlin(DYSF)
- plasmolipin(PLLP)
- chondroitin sulfate proteoglycan 4(CSPG4)
- ATP binding cassette subfamily C member 3(ABCC3)
- adhesion G protein-coupled receptor E1(ADGRE1)
- chondroitin polymerizing factor(CHPF)
- potassium calcium-activated channel subfamily N member 4(KCNN4)
- solute carrier family 27 member 1(SLC27A1)
- transmembrane 4 L six family member 19(TM4SF19)
- serine incorporator 2(SERINC2)

Gènes codant pour des protéines à la membrane :

- reticulon 4 receptor-like 2(RTN4RL2)
- NADPH oxidase activator 1(NOXA1)

- phospholipase C eta 2(PLCH2)
- reticulon 4 receptor(RTN4R)

Interactions récepteurs/matrice extracellulaire

Ainsi, 5 gènes surexprimés sont impliqués dans les interactions récepteurs/matrice extracellulaire comme illustré dans la figure 12 :

- heparan sulfate proteoglycan 2(HSPG2)
- integrin subunit beta 4(ITGB4)
- integrin subunit beta 5(ITGB5)
- aminin subunit gamma 2(LAMC2)
- thrombospondin 3(THBS3)

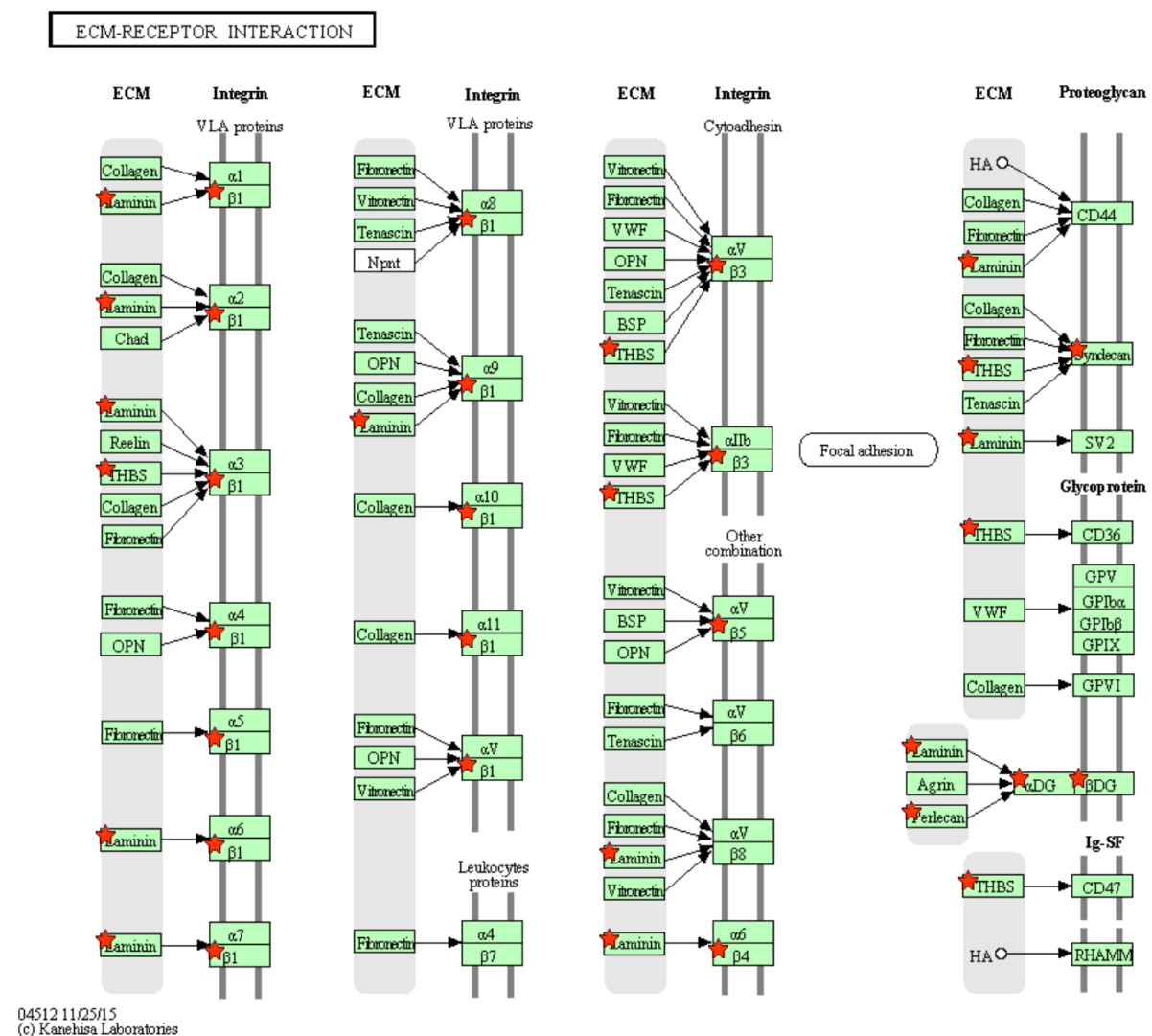


Figure 12 Représentation schématique des interactions récepteurs/matrice extra cellulaire. Les étoiles rouges représentent les protéines dont les gènes sont surexprimés après exposition à la lidocaïne

Voie PI3K-AKT

8 gènes surexprimés sont impliqués dans la voie PI3K-AKT, figure 13 :

- cAMP responsive element binding protein 3 like 1(CREB3L1)
- colony stimulating factor 1(CSF1)
- integrin subunit beta 4(ITGB4)
- integrin subunit beta 5(ITGB5)
- laminin subunit gamma 2(LAMC2)
- platelet derived growth factor subunit B(PDGFB)
- thrombospondin 3(THBS3)
- vascular endothelial growth factor C(VEGFC)

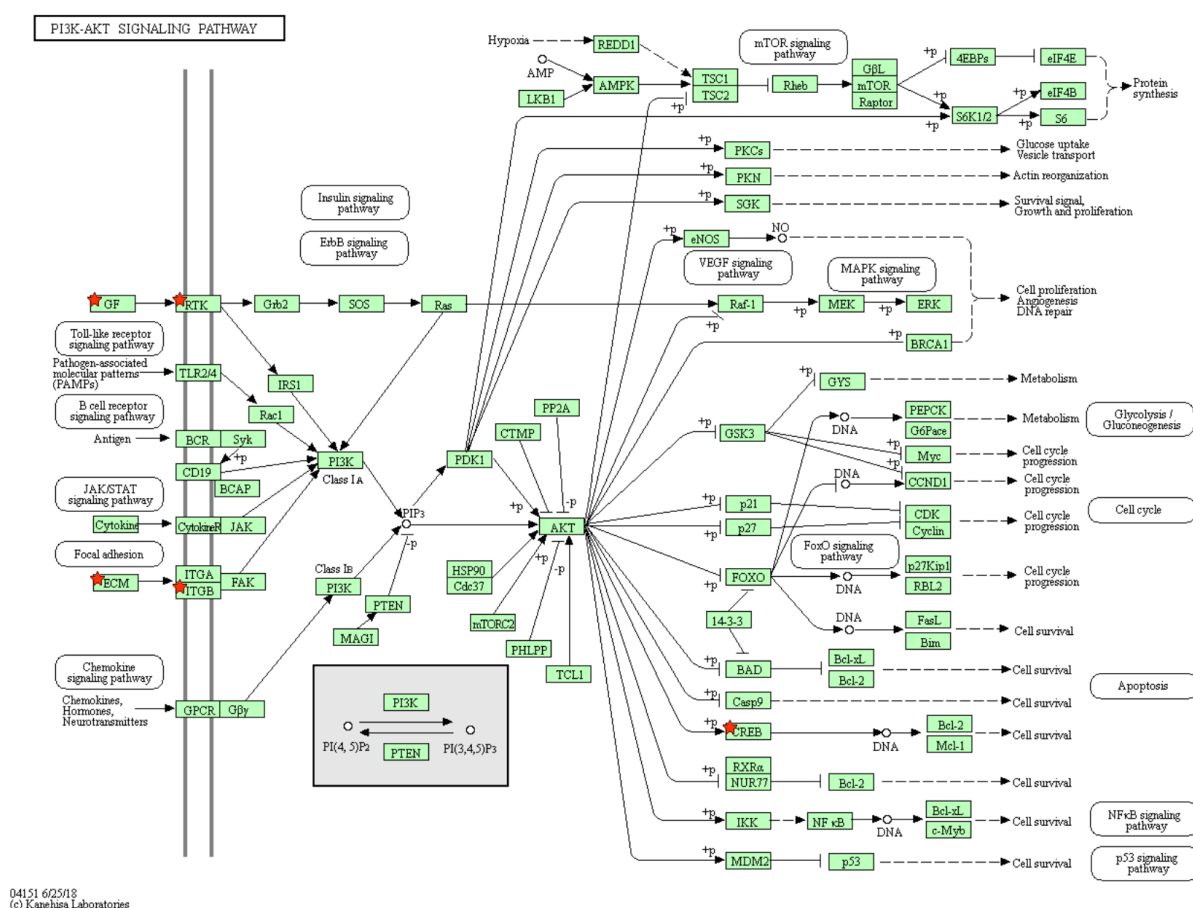


Figure 13 Représentation schématique de la voie PI3K-AKT, les étoiles rouges représentent les protéines dont les gènes sont surexprimés après exposition à la lidocaïne

Adhésion focale

5 de ces gènes ainsi que le VEGFC sont également impliqués dans l'adhésion focale (figure 14) :

- integrin subunit beta 4(ITGB4)
- laminin subunit gamma 2(LAMC2)
- integrin subunit beta 5(ITGB5)
- platelet derived growth factor subunit B(PDGFB)
- vascular endothelial growth factor C(VEGFC)
- thrombospondin 3(THBS3)

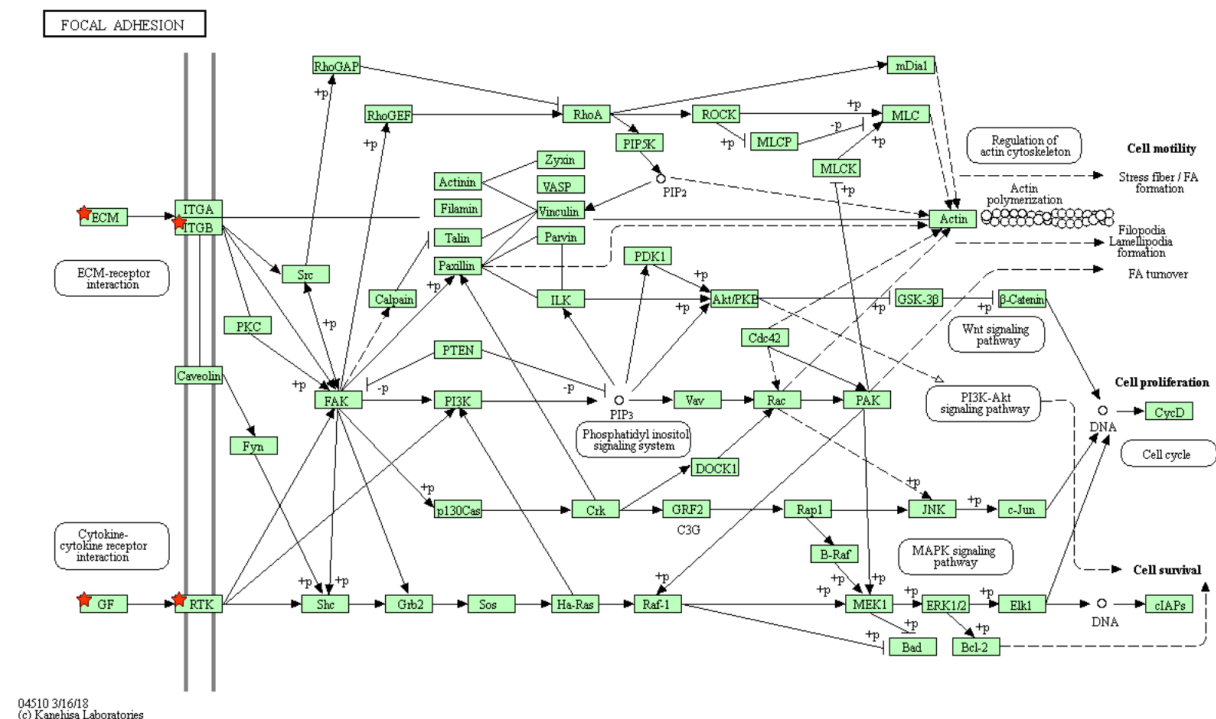


Figure 14 Représentation schématique de l'adhésion focale. Les étoiles rouges représentent des protéines dont les gènes sont surexprimés sous lidocaïne

Liaison au calcium

11 gènes sont impliqués dans la liaison au calcium :

- arylsulfatase A(ARSA)
- LDL receptor related protein 1(LRP1)
- matrilin 2(MATN2)
- phospholipase C eta 2(PLCH2)
- heparan sulfate proteoglycan 2(HSPG2)

- latent transforming growth factor beta binding protein 3(LTBP3)
- multiple EGF like domains 6(MEGF6)
- dysferlin(DYSF)
- thrombospondin 3(THBS3)
- adhesion G protein-coupled receptor E1(ADGRE1)
- matrix metalloproteinase 11(MMP11)

En résumé, les ensembles de gènes dérégulés participent à la traduction de l'ARNm pour ceux qui sont réprimés et sont localisés à la membrane pour ceux surexprimés et sont impliqués dans les processus d'adhésion et dans la voie Pi3K/Akt.

Analyse en réseaux par ConsensusPathDB-human

Une autre façon d'analyser les gènes est l'utilisation de cartes permettant de représenter de manière graphique ces ensembles de gènes sur- ou sous-exprimés par la lidocaïne et les liens entre eux. Pour ce faire, nous avons utilisé le logiciel ConsensusPathDB-human (287) de l'Institut Max Planck qui reprend le principe d'analyser la liste de gènes sur- ou sous-exprimés après exposition à la lidocaïne.

L'analyse des voies de signalisation canoniques met en évidence une dérégulation à la hausse de gènes impliqués dans les processus d'adhésion focale, de la voie PI3K/Akt/mTOR, du VEGF d'organisation de la matrice extracellulaire, du métabolisme des carbohydrates, de l'héparane (figure 15)...

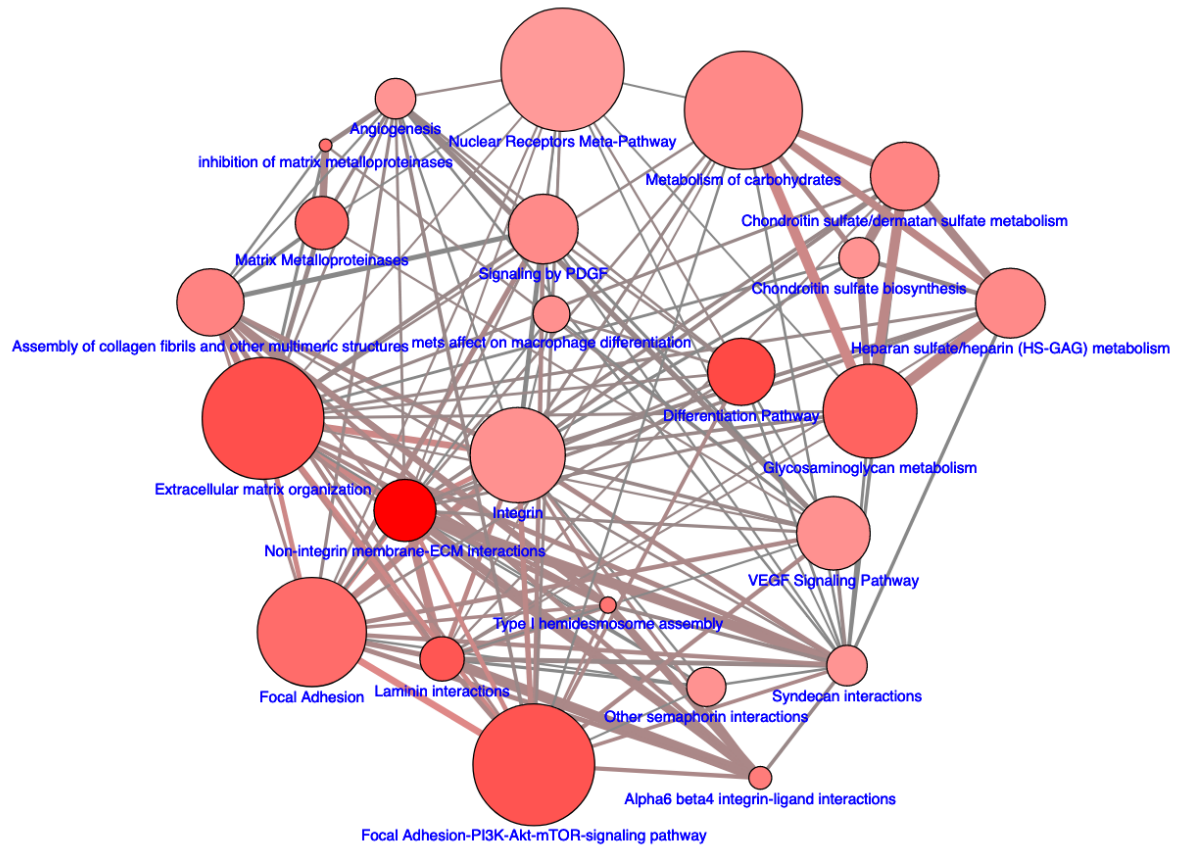


Figure 15 Modulation des voies de signalisation par la lidocaïne : Carte des ensembles de gènes surexprimés après exposition à la lidocaïne, l'annotation ici utilise la bibliothèque des voies de signalisation (KEGG, REACTOME, BIOCARTA, Wikipathways, ONOH, PharmGKB, PID). Plus le diamètre est grand, plus grand est le nombre de gènes surexprimé dans l'ensemble de gènes. L'intensité du rouge est inversement proportionnelle à la valeur du p . Plus le trait est épais, plus grand est le nombre de gènes communs entre deux ensembles.

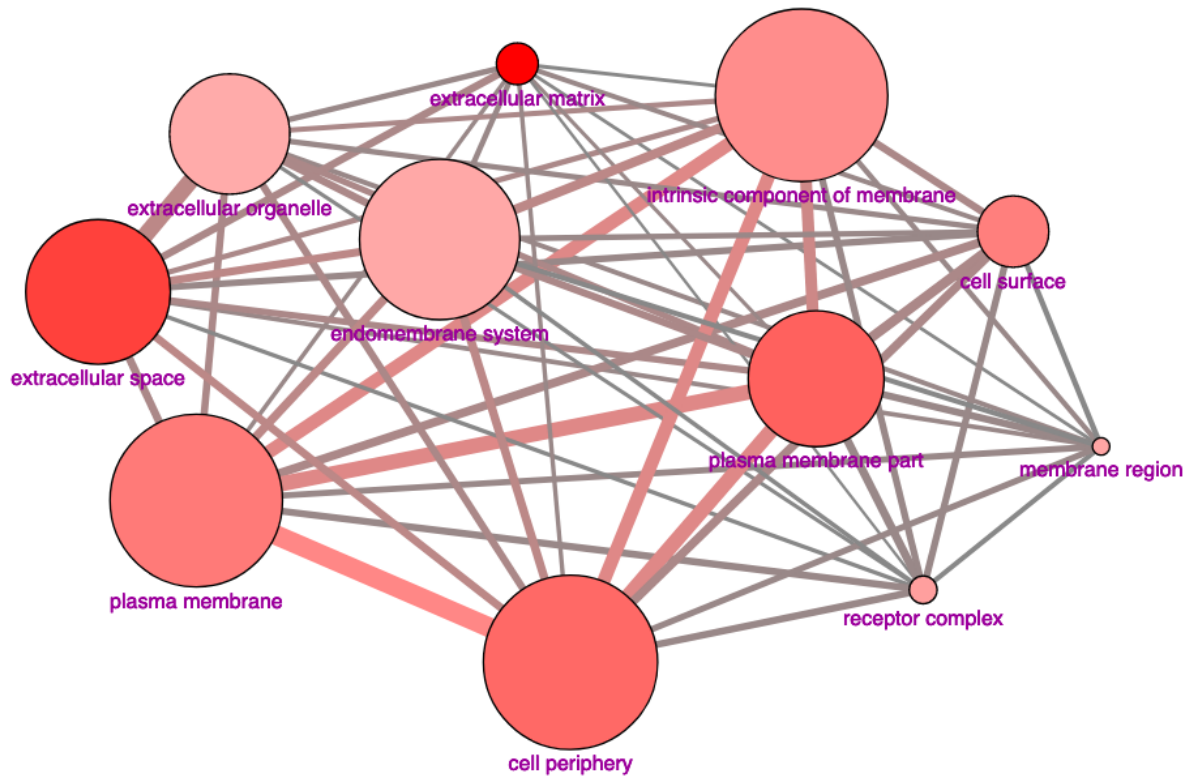


Figure 16 Modulation des composants cellulaires par la lidocaïne : Carte des ensembles de gènes surexprimés après exposition à la lidocaïne, l'annotation ici utilise la bibliothèque Gene Ontology, et le sous-ensemble des composants cellulaires. Plus le diamètre est grand, plus grand est le nombre de gènes surexprimé dans l'ensemble de gènes. L'intensité du rouge est inversement proportionnelle à la valeur du p . Plus le trait est épais, plus grand est le nombre de gènes communs entre deux ensembles.

L'utilisation des termes GO permet d'identifier une surexpression de gènes impliqués dans la morphologie cellulaire : membrane plasmatique, périphérie cellulaire, espace extracellulaire (figure 16), lorsqu'on utilise plus spécifiquement les termes de la bibliothèque des processus biologiques, les gènes surexprimés sont ceux impliqués dans les réponses à des stimuli, à la transduction de signal, à la croissance et à la prolifération, à l'adhésion et à la migration cellulaire (figure 17)

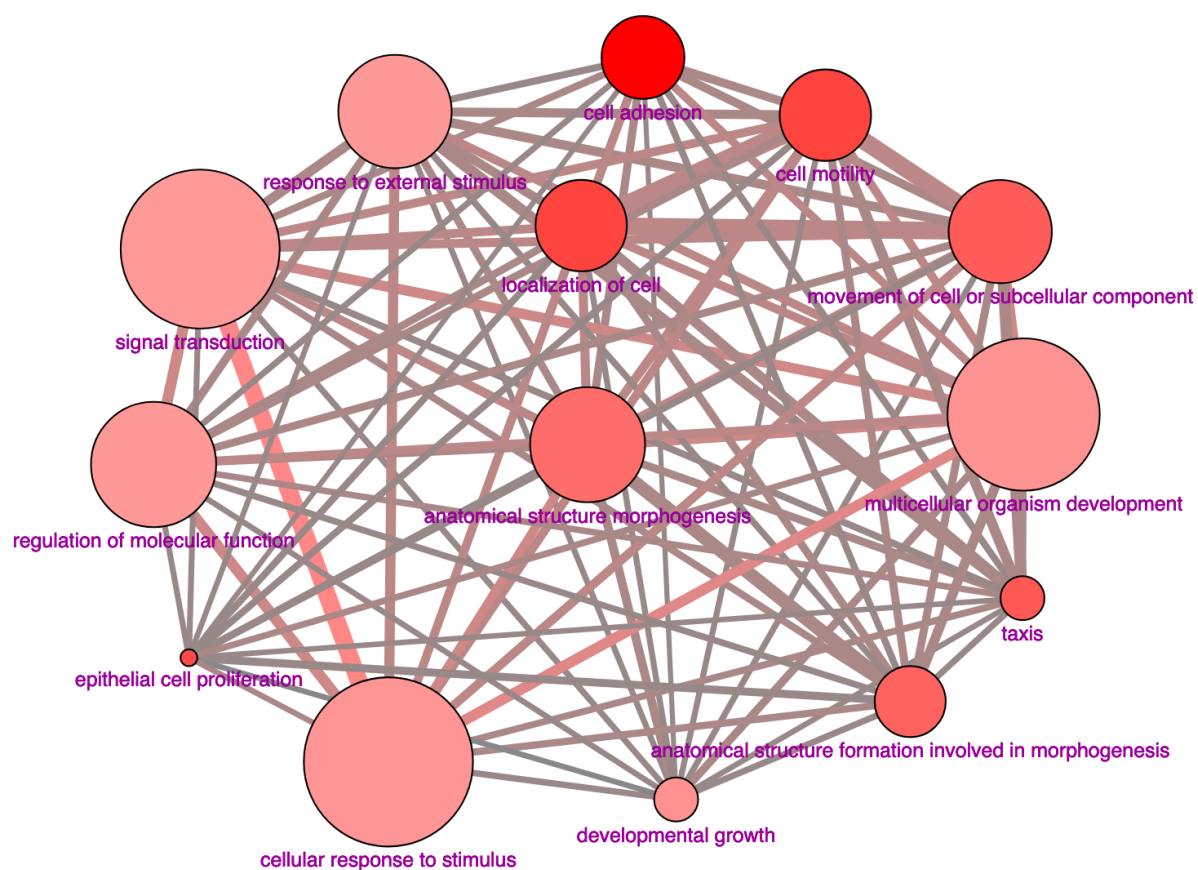


Figure 17 Modulation des processus biologiques par la lidocaïne : Carte des ensembles de gènes surexprimés après exposition à la lidocaïne, l'annotation ici utilise la bibliothèque de Gene Ontology, et le sous-groupe des processus biologiques. Plus le diamètre est grand, plus grand est le nombre de gènes communs aux deux ensembles.

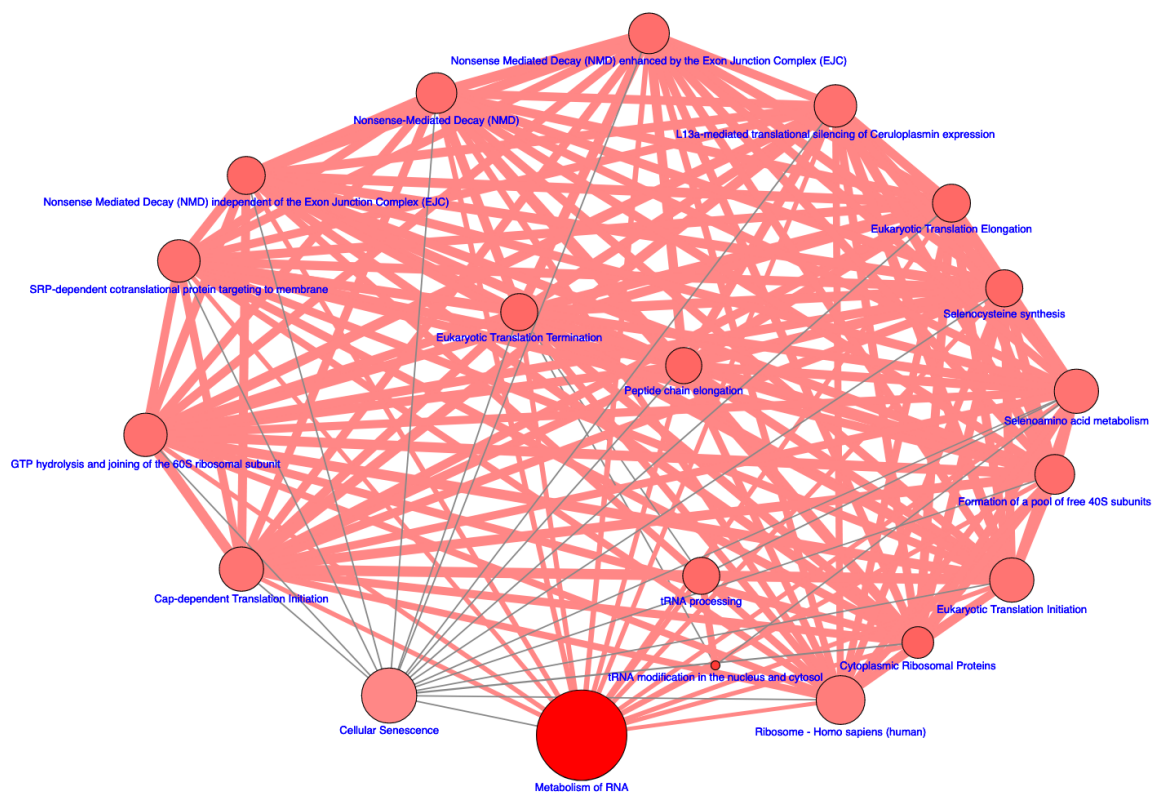


Figure 18 Répression de voies de signalisation par la lidocaïne : Carte des ensembles de gènes réprimés après exposition à la lidocaïne, l'annotation ici utilise la bibliothèque des voies de signalisation (KEGG, REACTOME, Wikipathways). Plus le diamètre est grand, plus grand est le nombre de gènes surexprimé dans l'ensemble de gènes. L'intensité du rouge est inversement proportionnelle à la valeur du p . Plus le trait est épais, plus grand est le nombre de gènes communs entre deux ensembles.

Les gènes réprimés correspondent quant à eux à des processus impliqués dans la traduction de l'ARNm (figure 18) et aux liaisons aux organites (figure 19).

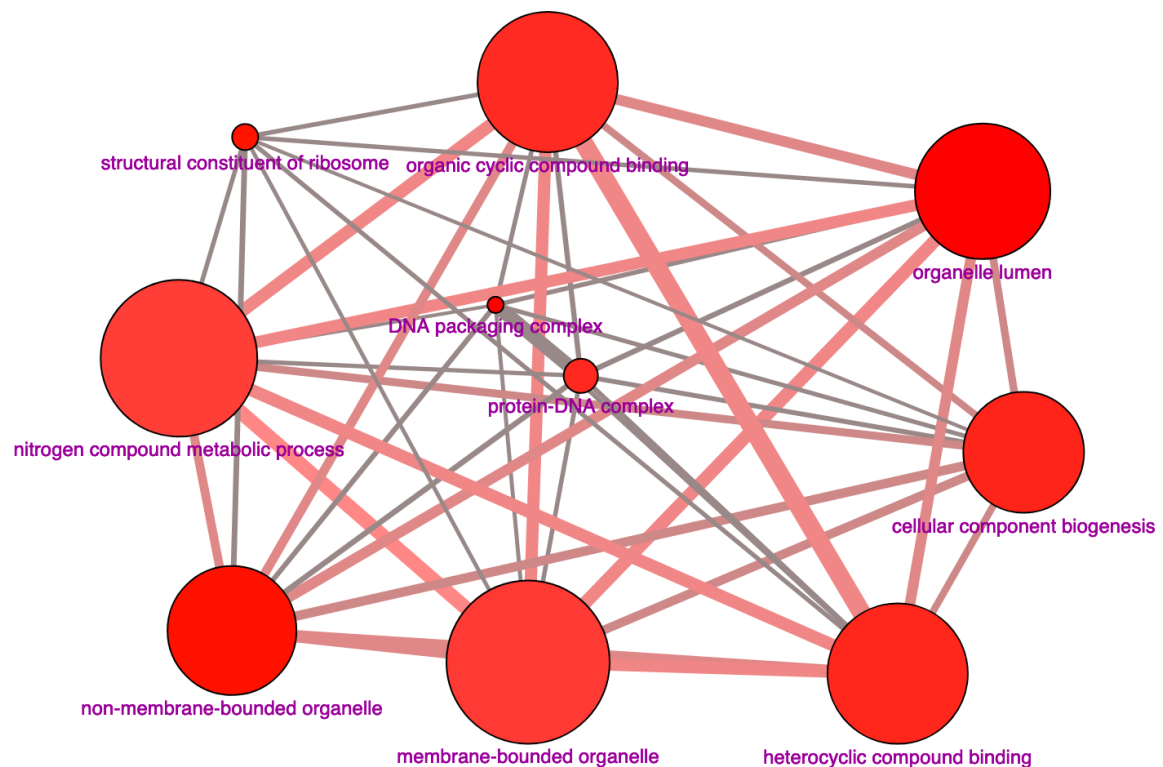


Figure 19 Répression de processus biologiques après exposition à la lidocaïne : Carte des ensembles de gènes réprimés après exposition à la lidocaïne, l'annotation ici utilise la bibliothèque Gene Ontology. Plus le diamètre est grand, plus grand est le nombre de gènes surexprimé dans l'ensemble de gènes. L'intensité du rouge est inversement proportionnelle à la valeur du p . Plus le trait est épais, plus grand est le nombre de gènes communs entre deux ensembles.

L'outil Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)

Les analyses en clustering par DAVID ou par ConsensusPathDB-human ne prennent en compte qu'une liste de gènes (ici réprimés ou surexprimés). Afin d'étudier plus finement la modulation d'expression de gènes par la lidocaïne, nous avons également utilisé le logiciel *Gene Set Enrichment Analysis* GSEA (<http://software.broadinstitute.org/gsea/>) pour faire une analyse de variation d'expression en prenant l'ampleur de la variation d'expression et la significativité de la différence d'expression des gènes. Pour l'analyse de données de RNAseq avec GSEA, nous avons utilisé l'outil GSEA Preranked avec en entrée l'ensemble des gènes avec une métrique associée. Cette méthode permet de calculer des scores d'enrichissement fonctionnel en utilisant la base de données moléculaires Molecular Signature DataBase (MSigDB)(288). Nous avons ainsi utilisé la liste de gènes avec une métrique de rang. La métrique de rang utilisée est la suivante :

$$-\log_{10}(p\text{-value}) * \text{signe}(\log FC)$$

Ainsi, nous avons ordonné les gènes selon la significativité de leur différence d'expression, en prenant en compte le signe de cette différence.

Nous avons donc utilisé en entrée de GSEA l'ensemble des gènes (sans seuil de p-value), ordonnés selon cette métrique et nous l'avons analysée avec plusieurs bibliothèques de la base de données MSigDB :

- *hallmark gene sets* : ces ensembles représentent des états ou des processus biologiques bien définis ayant une expression cohérente
- *curated gene sets* : ensembles de gènes gérés à partir de voies canoniques (KEGG, REACTOME et BIOCARTA).
- *GO sets* : ensembles de termes ontologiques (processus biologiques, composants cellulaires et fonctions moléculaires).

Le résultat principal de l'analyse de l'enrichissement des ensembles de gènes est le score d'enrichissement (SE), qui reflète la mesure dans laquelle un ensemble de gènes est surreprésenté en haut ou en bas de notre liste de gènes classés. Le logiciel calcule les ES en parcourant la liste des gènes classés, en augmentant le score quand un gène est dans l'ensemble de gènes et en le diminuant quand il ne l'est pas. L'ampleur de l'augmentation dépend donc de la corrélation du gène avec le phénotype. L'ES est la déviation maximale à partir de zéro des gènes rencontrés dans la liste. Un ES positif indique l'enrichissement des ensembles de gènes en haut de la liste de classement et un ES négatif indique l'enrichissement des ensembles de gènes au bas de la liste de classement. Le score d'enrichissement est ensuite normalisé (NES). Le NES est la statistique principale pour l'examen des résultats d'enrichissement des ensembles de gènes. En normalisant le score d'enrichissement, le logiciel tient compte des différences dans la taille des ensembles de gènes et dans les corrélations entre les ensembles de gènes et l'ensemble de données d'expression; par conséquent, les scores d'enrichissement normalisés (NES) peut être utilisé pour comparer les résultats d'analyse entre les ensembles de gènes. GSEA génère donc une liste à partir des NES auquel il associe un *false discovery rate* (FDR) ou risque de faux positif exprimé en pourcentage. Ce FDR est la probabilité estimée qu'un gène associé à une NES donnée représente une conclusion faussement positive. Par exemple, un FDR de 25 % indique que le résultat est probablement valide 3 fois sur 4. Le rapport d'analyse de GSEA met en évidence des ensembles de gènes d'enrichissement avec un FDR de moins de 25% comme ceux les plus susceptibles de générer des hypothèses intéressantes et de conduire d'autres recherches. Il y ajoute le calcul de la valeur p permettant d'estimer la

signification statistique du score d'enrichissement pour un seul ensemble de gènes sans ajustement vis-à-vis de la taille des ensembles de gènes et des tests d'hypothèses multiples.

Hallmarks

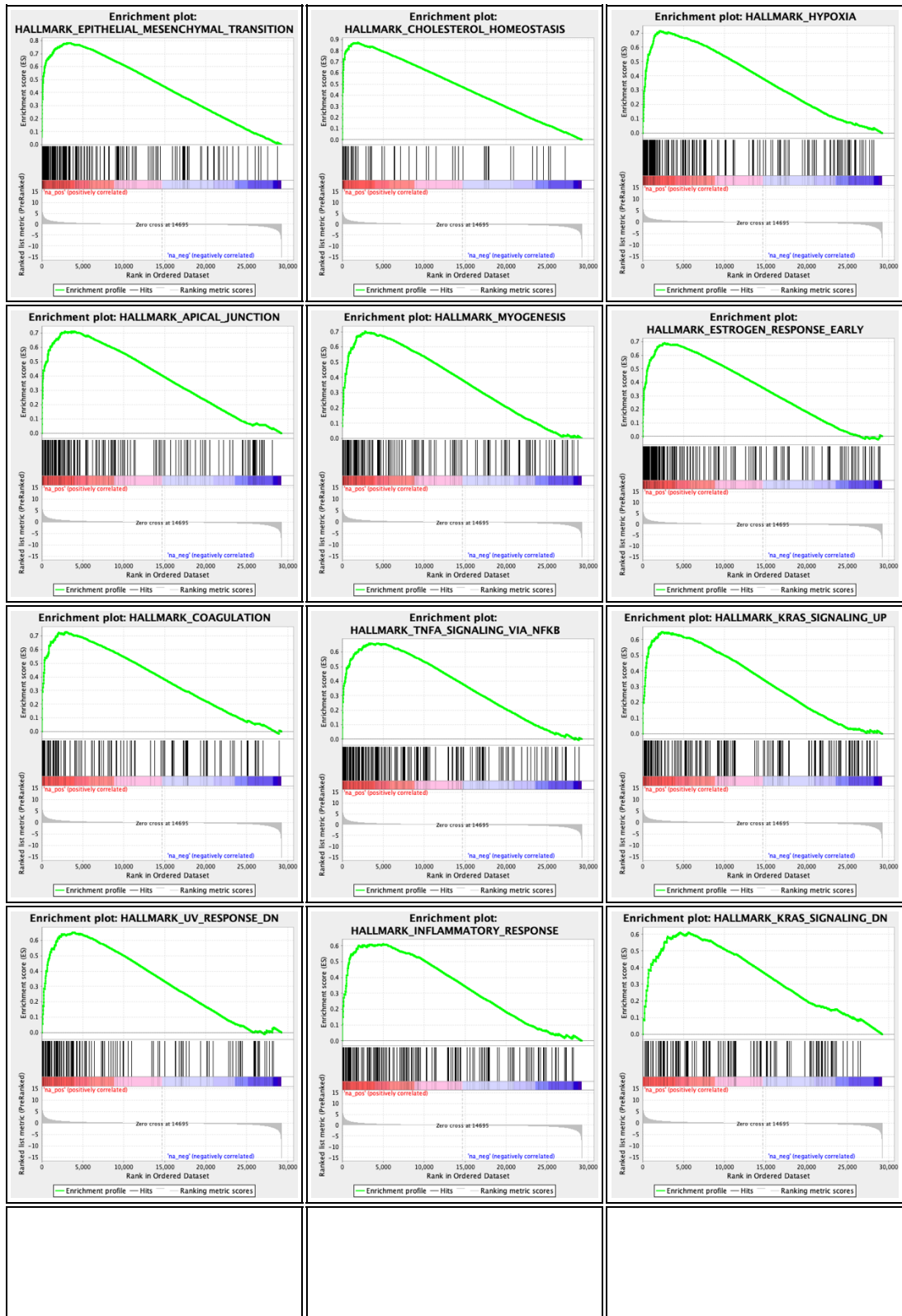
Lorsqu'on procède à l'analyse d'expression différentielle des gènes avec l'ensemble « *Hallmarks* », 36 / 50 ensembles de gènes sont régulés à la hausse lorsque les cellules sont exposées à la lidocaïne, dont 35 ont un FDR < 25%. 23 de ces ensembles de gènes sont enrichis avec un $p < 1\%$ et 29 ont un $p < 5\%$. La représentation graphique des ES des 20 ensembles de gènes les plus surreprésentés se trouve figure 20.

Le nombre d'ensembles de gènes à l'inverse régulés à la baisse est donc de 14 / 50, dont 13 avec un FDR < 25%, 9 ensembles avec un $p < 1\%$ et 10 avec $p < 5\%$.

Les ensembles de gènes concernés sont représentés dans le tableau 4.

Ainsi les voies surexprimées concernent de manière intéressante voies de signalisation d'oncogénèses : des voies de prolifération cellulaire, de l'angiogenèse (KRAS, WNT, p53, NOTCH...), la transition épithélio-mésenchymateuse, le métabolismes de plusieurs lipides tandis que les voies réprimées concernent la transcription, (voie Myc), la réparation de l'ADN, la mitose, la voie de prolifération PI3K/Akt/mTOR, la phosphorylation oxydative et la voie des radicaux libres.

Table: Snapshot of enrichment results



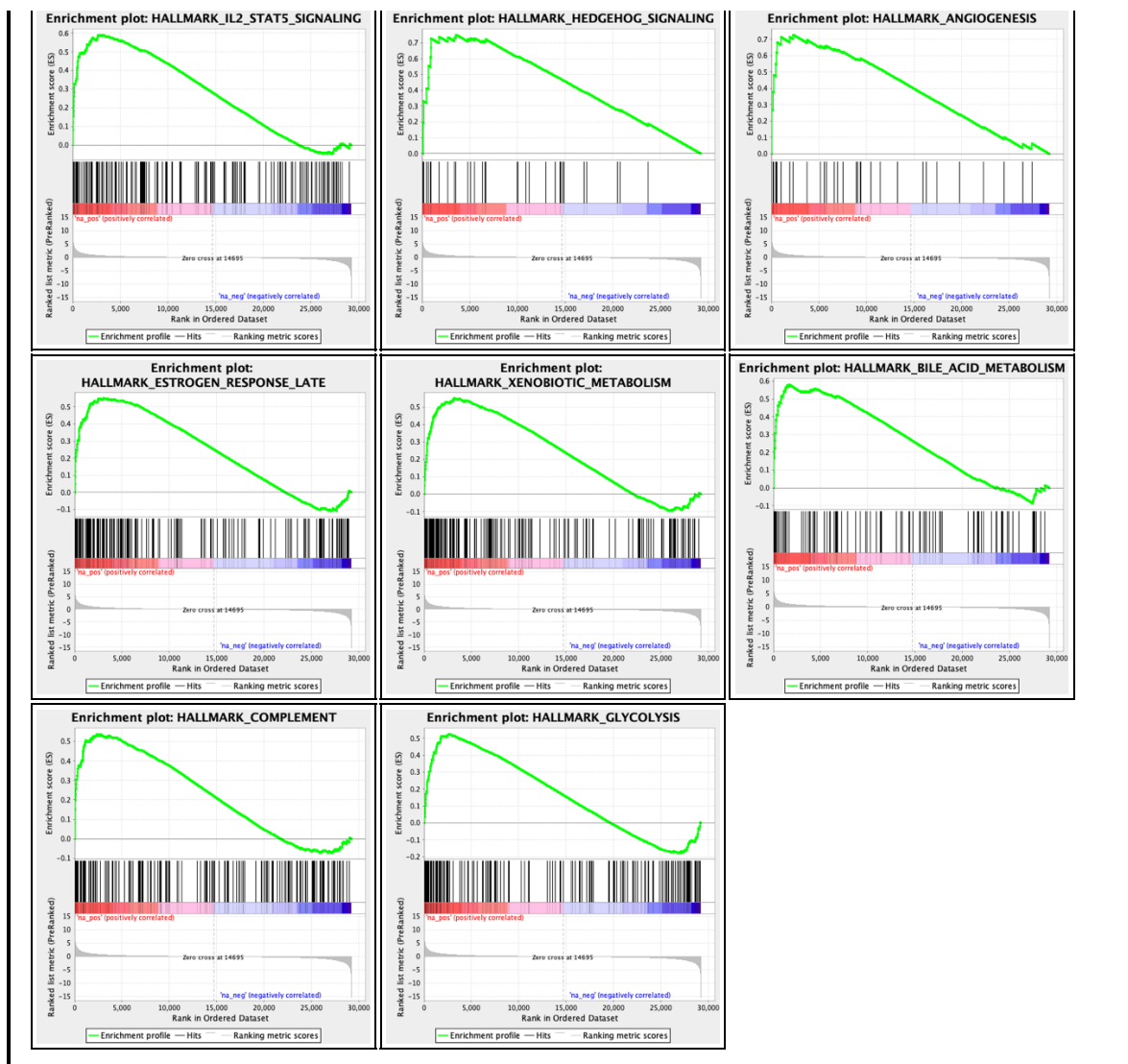


Figure 20 Représentation graphique des Scores d'enrichissement des 20 ensembles de gènes les plus surexprimés après analyse par GSEA.

Processus dans lesquels les gènes sont régulés à la hausse	Processus dans lesquels les gènes sont régulés à la baisse
Transition épithélio-mésenchymateuse	Cibles de MYC (groupe de gènes régulés par MYC)
Homéostasie du cholestérol	Cibles de E2F
Hypoxie	Checkpoint G2M
Jonction apicale	La phosphorylation oxydative
Myogenèse	Cibles de MYC (second groupe de gènes régulés par MYC)
Réponse précoce aux estrogènes	Réparation de l'ADN
Coagulation	Gènes surexprimés lors de l'UPR (unfolded protein response)
Signalisation TNF alpha via NFkappa B	Spermatogénèse
Activation de la voie KRAS	Voie des radicaux libres
Réponse ADN aux UV (gènes réprimés par l'irradiation UV)	Voie mTORC1
Réponse inflammatoire	Réponse ADN aux UV (gènes surexprimés par l'irradiation UV)
Inhibition de la voie KRAS	Voie PI3K/AKT/mTOR
Voie de signalisation IL2-STAT5	Fuseau mitotique
Voie de signalisation Hedgehog	Cellules bêta pancréatiques
Angiogenèse	
Réponse tardive aux estrogènes	
Métabolisme xénobiotique	
Métabolisme des acides biliaires	
Voie du complément	
Glycolyse	
Surface apicale	
Voie de signalisation IL6/JAK/STAT3	
Voie de signalisation TGF bêta	
Métabolisme de l'hème	
Réponse interféron alpha	
Voie de signalisation WNT/beta-caténine	
Apoptose	
Réponse aux androgènes	
Voie NOTCH	
Voie P53	
Péroxisome	
Rejet d'allogreffe	
Métabolisme des acides gras	
Adipogénèse	
Réponse interféron gamma	
Sécrétion protidique	

Tableau 4 Effet de la lidocaïne sur les Hallmarks d'après analyse GSEA : Liste des processus dont les gènes sont surexprimés après exposition à la lidocaïne et ou sous-exprimés après exposition à la lidocaïne lorsqu'on utilise la bibliothèque « Hallmarks » de MSigDB.

Voies canoniques

Lorsqu'on procède à l'analyse d'expression différentielle des gènes avec la bibliothèque des voies canoniques « Curated genes set », 577 ensembles de gènes sur 1003 sont régulés à la hausse dont 291 avec FDR < 25%, 143 ensembles ont un $p < 1\%$ et le nombre d'ensembles augmente à 218 pour $p < 5\%$. A l'inverse, 426 ensembles sont régulés à la baisse dont 249 ont un FDR < 25%, 187 ont un $p < 1\%$ et le nombre passe à 216 pour $p < 5\%$. Nous avons choisi de représenter dans le tableau 5 les 20 ensembles dont la dysrégulation est la plus importante avec les databases KEGG, REACTOME et BIOCARTA (seulement les ensembles avec un $p < 5\%$).

Régulation à la hausse des processus canoniques par la lidocaïne		
KEGG	REACTOME	BIOCARTA
Lysosome	Activité de protéines kinases transmembranaires	Voie Tob1 (activation des cellules T)
Interaction MEC/récepteurs	Molécules d'adhésion cellulaire	Réponse inflammatoire
Cardiomyopathie dilatée	Liaison aux facteurs de croissance	Infarctus myocardique aigue
Cardiomyopathie hypertrophique	Liaison aux intégrines	Voie de la mCalpaïne
Cardiomyopathie arythmogène du ventricule droit	Activité de protéines tyrosine kinases transmembranaires	Voie ALK
Hématopoïèse	Activité lipase	Voie TGF bêta
Adhésion focale	Activité de transporteurs transmembranaires	Voie de l'agrine dans la différenciation post-synaptique
Interaction cytokines/récepteurs	Hydrolyse des ponts O-glycolyl	Voie d'inhibition plaquettaire par l'aspirine
Molécules d'adhésion cellulaire (CAMs)	Transport transmembranaire d'ions inorganiques	Facteurs ETS et différenciation des macrophages
Complément et cascades de coagulation	Liaisons aux glycoprotéines	Régulation des tyrosine kinase par Sprouty
Synthèse stéroïdienne	Récepteurs aux virus	Voie IL10
Guidage axonal	Transport transmembranaire d'anions	Voie intrinsèque d'activation de la prothrombine
Dégradation des glycosaminoglycanes	Transport transmembranaire d'ions métalliques	Polarisation des cellules T
Biosynthèse des O-glycanes	Transport transmembranaire de calcium	Voie des biopeptides
Métabolisme des glycérophospholipides	Activité acetylgalactosaminyltransferase	Voie de l'AEGF dans la cardiopathie hypertrophique
Interaction neuroligand/récepteurs	Activité du facteur de croissance	
Melanogénèse	Transport transmembranaire de cation inorganique divalent	
Biosynthèse du sulfate de chondroïtine	Activité glycosyltransferase	

Carcinome basocellulaire	Activité phospholipase	
Métabolisme des sphingolipides	Liaison à l'héparine	

Tableau 5 Les 20 processus canoniques les plus régulés à la hausse après l'exposition à la lidocaïne.

Reviennent donc la régulation à la hausse de gènes impliqués dans le métabolisme de plusieurs lipides, les interactions membranaires et des voies de signalisation (liées aux protéines kinases).

Régulation à la baisse de processus canoniques par la lidocaïne		
KEGG	REACTOME	BIOCARTA
Spliceosome	Composants du ribosome	Voie du protéasome
Ribosome	Liaison à l'ARNm	Traduction par eIF
Protéasome	Liaison des facteurs de traduction à l'ARN	Régulation de la réplication de l'ADN par les CDK
Maladie de Parkinson	Liaisons aux ARN inversés	Rôle de Pi3K dans l'organisation de l'actine
Dégradation de l'ARN	Initiation de la traduction	Rôle d'ATR et BRCA dans la susceptibilité au cancer
Réparation/excision de nucléotides	Liaison à l'ADN simple brin	Branchement en Y de l'actine
Phosphorylation oxydative	Liaison au complexe ribonucléoprotéique	Voie AKT/mTOR
Cycle cellulaire	Activité ribonucléase	Voies des caspases
Réplication de l'ADN	Liaison aux protéines dépliées	Voie du VEGF
Maladie de Huntington	Activité ATPase dépendante de l'ADN	Voie mitochondriale
Réparation de mésappariement	Activité exonucléase	Voie de co-stimulation lors de l'activation des cellules T
Biosynthèse de aminoacyl-tRNA synthétases	Activité polymérase de l'ARN	Voie mTOR
ARN-polymérase	Activité hélicase de l'ADN	Voie mPR (initiation de la membrane des ovocytes par la progestérone)
Métabolisme des pyrimidines	Activité hélicase dépendante de la purine NTP	
Facteurs de transcription basale	Liaison à l'ADN nucléosomal	
Export de protéines	Activité hélicase	
Recombinaison homologue	Liaison aux petits ARN nucléaires	
Méiose ovocytaire	Activité hélicase de l'ARN	
Maladie d'Alzheimer	Activité exonucléase	
Métabolisme des purines	Liaison à l'ADN endommagé	

Tableau 6 Les 20 processus canoniques les plus régulés à la baisse après l'exposition à la lidocaïne.

Les gènes dérégulés sont ceux concernant la réplication, la transcription et la traduction, le cycle cellulaire et la phosphorylation oxydative.

Ontologie

Gene Ontology

Lorsqu'on procède à l'analyse d'expression différentielle des gènes avec la bibliothèque des termes GO en général, 223 ensembles de gènes sur 409 sont régulés à la hausse dont 183 avec un FDR < 25%, parmi ceux-ci 119 ensembles ont un $p < 1\%$ et cela est porté à 150 lorsqu'on cherche un $p < 5\%$.

A l'inverse, 186 ensembles sont régulés à la baisse dont 161 avec un FDR < 25%, parmi ceux-ci, 119 ensembles ont un $p < 1\%$, cela augmente à 139 si on considère $p < 5\%$.

Régulation à la hausse	Régulation à la baisse
Matrice extracellulaire	Ribosome
Protéines de la matrice extracellulaire	Sous-unité ribosomale
Membrane basale	Complexe spliceosomal
Complexes de récepteurs	Grande sous-unité ribosomale
Composants de la matrice extracellulaire	Ribosome cytosolique
Lumière du Golgi	Partie cytosolique
Vacuoles lytiques	Phase 2 du spliceosome
Lumière de vacuoles	Partie nucléaire
Lumières de lysosomes	Région chromosomique
Granules plaquettaires	Grande sous-unité ribosomale cytosolique
Face externe de la membrane plasmique	Petite sous-unité ribosomale
Composants intrinsèques de la membrane du réticulum endoplasmique	Condensation chromosomique
Lumières de granules de sécrétions	Ribosome organellaire
Granules de sécrétions	Pré-ribosome
Complexes protéiques impliqués dans l'adhésion cellulaire	Complexe protéique de la membrane interne de la mitochondrie
Lumières des granules plaquettaires	Région centromérique du chromosome
Membranes des vacuoles lytiques	Petit complexe ribonucléoprotéique
Complexes de récepteurs à la membrane plasmique	Corps nucléaire
Complexes protéiques impliqués à la membrane plasmique	Complexe protéique de la mitochondrie
Microdomaines membranaires	Région télomérique du chromosome

Tableau 7 Les 20 processus en terme GO dont les gènes sont dérégulés par la lidocaïne.

Reviennent donc une augmentation de protéines localisées à la membrane essentiellement et une répression des gènes impliqués dans la traduction, la mitochondrie et l'organisation des chromosomes.

Composition cellulaire

Lorsqu'on procède à l'analyse d'expression différentielle des gènes avec la bibliothèque des termes GO axés sur la composition cellulaire, 227 sur 476 ensembles sont régulés à la hausse dont 123 avec FDR < 25%, parmi ceux-ci 64 ensembles ont un $p < 1\%$ et le nombre augmente à 91 si on prend une $p < 5\%$.

A l'inverse, 249 ensembles sont régulés à la baisse, dont 182 avec un FDR < 25%, parmi ceux-ci 146 ont un $p < 1\%$, cela augmente à 163 ensembles si on considère $p < 5\%$.

Nous avons représenté dans le tableau 8, les composants cellulaires dont les gènes sont dérégulés.

Régulation à la hausse	Régulation à la baisse
Métabolisme des glycosaminoglycanes (GAG)	Métabolisme de l'ARN
Métabolisme des lipides et des lipoprotéines	Métabolisme de l'ARNm
Métabolisme du sulfate de chondroïtine et de dermatane	Traduction
Interaction des intégrines à la surface cellulaire	Dégradation des ARNm non-sens
Biosynthèse du cholestérol	Régulation de la traduction par 3-UTR
Métabolisme du sulfate d'héparane et héparine	Co-traduction de protéines à la membrane, dépendante de SRP
Métabolisme des phospholipides	Transcription et réplication du virus Influenza
O-glycosylation des mucines	Traitement de l'ARNm
Dégradation des liaisons de sulfate d'héparane aux glycosaminoglycanes (HS-GAG)	Épissage de l'ARNm
Biosynthèse des glycérophospholipides	Cycle du virus Influenza
Biosynthèse des HS-GAG	Élongation de chaînes peptidiques
Synthèse des GAG	Réplication de l'ADN
Organisation des jonctions cellulaires	Traitement des introns coiffés contenant du pré-ARNm
Métabolismes des sphingolipides	Phases M et G1
Transport des cations et anions inorganiques et des aminoacides et oligopeptides	Transcription
Organisation de la matrice extracellulaire	Cycle cellulaire

Réponse à l'élévation cytosolique du calcium dans les plaquettes	Cycle cellulaire mitotique
Biosynthèse des triglycérides	Cycle cellulaire checkpoints
Transports par canaux ioniques	Infection à VIH
Métabolisme des glycosphingolipides	Activation de l'ARNm

Tableau 8 Les 20 processus cellulaires (terme GO) dont les gènes sont dérégulés par l'exposition à la lidocaïne.

Le métabolisme des lipides et l'adhésion cellulaire sont ainsi régulés à la hausse tandis que les processus de cycle cellulaires et de traduction sont dérégulés à la baisse.

Comparaison avec les données de la littérature

Nous avons également comparé nos résultats avec les données de la littérature présentes sous la recherche PubMed : ("lidocaine"[MeSH Terms] OR "lidocaine"[All Fields]) AND ("gene expression"[MeSH Terms] OR ("gene"[All Fields] AND "expression"[All Fields]) OR "gene expression"[All Fields]) AND ("neoplasms"[MeSH Terms] OR "neoplasms"[All Fields] OR "cancer"[All Fields]). 18 articles sont apparus dans la recherche, après 1^{ère} sélection par le résumé, nous avons isolés 8 articles traitant des modifications dans l'expression de gènes sous lidocaïne et comparé avec les niveaux de changement d'expression dans notre RNAseq, les données sont compilées dans le tableau 9. Nous n'avons ainsi pu mettre en évidence de similitude avec notre étude.

Par ailleurs, en dehors de cette recherche systématisée, nous avons également isolé une autre étude sur cellules MDA-MB-231. Mais contrairement à Jiang *et al.*, nous n'avons pas mis en évidence de répression du transcrit de TRPV6 par la lidocaïne dans les cellules MDA-MB-231 (289). Le canal calcique TRPV6 (récepteur transitoire de la famille vanilloïde, numéro 6) est surexprimé dans certains cancers solides et favorise l'accumulation de calcium dans la cellule entraînant la croissance des cellules, leur prolifération et la formation de métastases. Le canal TRPV6 inhibe le signal pro-apoptotique. Son inhibition diminue la croissance des cellules cancéreuses, à leur prolifération et aux métastases. Par ailleurs l'analyse de RNAseq des cellules MDA-MB-231 disponible sur le site Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE)³ ne montre pas de surexpression de ce gène dans les cellules MDA-MB-231 confortant plutôt nos résultats.

³ <https://portals.broadinstitute.org/ccle>

Titre	PMID	Auteur	Cellules	Type d'organe	En synergie avec une autre molécule	Gène surexprimé	Gène réprimé	Niveau RNAseq (Log 2 FC)	Valeur p	P ajusté
Lidocaine inhibits proliferation and induces apoptosis in colorectal cancer cells by upregulating mir-520a-3p and targeting EGFR.	30262429	Qu X et al	SW480, HCT116 et NCM460	Colorectal			EGFR	0,2599121	0,00022899	0,00648919
Effects of Lidocaine-Mediated CPEB3 Upregulation in Human Hepatocellular Carcinoma Cell Proliferation In Vitro.	29850575	Liu H et al	HepG2	Hépatique		CPEB3		0,0927665	0,58350788	0,79361065
Lidocaine sensitizes the cytotoxicity of 5-fluorouacil in melanoma cells via upregulation of microRNA-493.	29442040	Wang Y et al	SK-MEL-2	Mélanome	5-FU		SOX-4	-0,167691	0,184243	0,43720447
Local Anesthetics Inhibit the Growth of Human Hepatocellular Carcinoma Cells.	28857796	Le Gac G et al.	HuH7 et HepaRG	Hépatique		CCNBP1		NR		
							MKI67	0,01736565	0,81675876	0,91959825
						HRK		-1,5370913	0,55875015	
						APC		0,02642748	0,74145743	0,88193015
							DDK1	NR		
Lidocaine inhibits the proliferation of lung cancer by regulating the expression of GOLT1A.	28737263	Zhang L et al	A549 et H1299	Poumon			GOLT1A	2,78341668	0,15559092	
Lidocaine sensitizes the cytotoxicity of cisplatin in breast cancer cells via up-regulation of RARβ2 and RASSF1A demethylation.	25526566	Li K et al.	MCF-7 et MDA-MB-231	Sein	Cisplatine	RARβ2		0,15756107	0,66439615	
						RASSF1A		NR		
Local anesthetics induce apoptosis in human thyroid cancer cells through the mitogen-activated protein kinase pathway.	24586874	Chang YC	8505C et K1	Thyroïde			BLC2	-0,1518037	0,10683447	0,31965875

Lidocaine time- and dose-dependently demethylates deoxyribonucleic acid in breast cancer cell lines in vitro.	22542536	Lirk P et al.	BT-20 et MCF-7	Sein		RASSF1A	RASSF1A	NR		
						MYOD1	MYOD1			
						GSTP1	GSTP1	-0,1369194	0,08853813	0,28711003

Tableau 9 Comparaison des résultats de l'expression de gènes du RNA-seq avec les données de la littérature.

Dans l'étude de Chang YC *et al.* sur les cellules de cancer thyroïdien, une analyse des ARN messagers par microarrays avait isolé quelques ensembles de gènes modifiés par exposition à la lidocaïne, sur les 10 plus importants présentés dans leur article, on peut noter quelques voies présentes dans notre analyse également : le métabolisme des lipides, la voie Hedgehog, la modulation des HDAC et des kinases dépendantes au calcium/calmoduline(290).

Nos résultats devront encore être confirmés par RT-qPCR mais les différentes analyses montrent que la lidocaïne compromet l'expression d'ensembles de gènes impliqués dans la traduction de l'ARN et régulant le cycle cellulaire, la voie de prolifération mTOR/AKT ressort également des analyses. Les ensembles de gènes qui sont en revanche surexprimés concernent la régulation de protéines de surface membranaire, l'interaction avec la matrice extracellulaire, le métabolisme lipidique, des voies de prolifération cellulaire et également d'activation de cellules de l'immunité.

Le niveau d'ARNm n'étant pas tout le temps corrélé au taux de protéines (291,292), il est important de voir en protéomique quel est le niveau réel d'expression des protéines. En effet plusieurs facteurs entrent en jeu dans la dynamique entre le taux d'ARNm et celui des protéines finales. Si à l'état d'équilibre le taux de protéine est influencé par le taux d'ARNm (293,294), un délai entre l'induction de la transcription et celui de la traduction peut aboutir à une augmentation du taux d'ARNm sans élévation du taux de protéines (295). De même, certains gènes peuvent être traduits « à la demande », impliquant un taux basal d'ARNm ne correspond pas forcément au taux de protéines (296,297). De même, les modifications post-transcriptionnelles peuvent avoir un rôle dans le rapport entre ARNm et protéines (298). De manière générale, la synthèse des protéines est soumise à différentes contraintes. Si cela reste à prouver dans les organismes multicellulaires, il a été démontré que pour les organismes unicellulaires, l'expression de gènes est dépendante du coût que la synthèse de protéine implique pour la cellule (299), notamment au niveau énergétique (300) et de l'état du cycle cellulaire dans lequel cette cellule se situe (301). Or les anesthésiques locaux peuvent réduire la production d'ATP chez les levures (302) et le cycle peut être bloqué par les anesthésiques locaux dans des lignées cellulaires humaines (303). De plus, la synthèse protéique est dépendante des ribosomes : les transcrits peuvent entrer en compétition pour être traduits par les ribosomes (304,305) et ceux-ci peuvent avoir une vitesse de différentes sur l'ARN messenger selon les codons notamment et jouer sur l'efficacité de la traduction génétique (306).

Or, les mécanismes de traduction et notamment la machinerie ribosomale semblent affectés par l'exposition à la lidocaïne d'après l'analyse de notre RNAseq. Ceci est également retrouvé dans

la littérature, où la bupivacaïne inactive la protéine kinase ribosomale S6 kinase 1 (S6K1) qui est une protéine kinase conservée régulant de manière négative la voie de signalisation mTOR/PI3-kinase/Akt (307), voie qui est par ailleurs également perturbée dans notre RNAseq. De manière surprenante, elle semble être régulée à la hausse si on prend strictement la liste de gènes présentant une augmentation significative sous lidocaïne alors qu'elle est réprimée si on effectue une analyse GSEA.

Ainsi, il peut être difficile d'interpréter seul la modulation du transcriptome des cellules MDA-MB-231 exposées ou non la lidocaïne.

Modification de l'empreinte métabolomique par la lidocaïne

Dans nos outils « omics » nous avons également eu la possibilité d'établir l'empreinte métabolomique de nos cellules exposées ou non à la lidocaïne.

Ceci était d'autant plus intéressant que nous avions précédemment des résultats discordants entre les tests de MTT et de Cell Titer Glo laissant à penser que la lidocaïne pouvait avoir un effet sur la mitochondrie et donc sur le métabolisme cellulaire de nos cellules d'intérêt. Nous avons donc voulu explorer l'impact de la lidocaïne en métabolomique. Une des hypothèses mécanistiques avancées par José *et al.*, est que du fait de leurs propriétés mitotoxiques, les AL auraient un effet antiprolifératif corrélé au profil bioénergétique des cellules (308). Ainsi, la lévobupivacaïne, qui est comme la lidocaïne un amino-amide, réduit la viabilité proportionnellement au niveau d'utilisation de la glycolyse des cellules cancéreuses laissant à penser que cette molécule cible le métabolisme déviant des lignées cancéreuses. Nous avons donc voulu vérifier si la lidocaïne pouvait avoir un impact sur le profil métabolomique dans le cancer du sein. Pour cela, en collaboration avec le service de médecine nucléaire du Pr Izzie-Jacques Namer, nous avons analysé le profil métabolomique des cellules par RMN HRMAS. La métabolomique est un outil émergent pour phénotyper les cancers solides notamment à la recherche d'empreintes métaboliques prédictives de mauvais pronostic et/ou de la réponse thérapeutique.

Nous avons donc exposé des cellules MDA-MB-231 à de la lidocaïne à la concentration de 0,5mM (n=5) ou au même volume d'eau (n=4) pendant 4h et mesurés les métabolites des échantillons par RMN HRMAS. La mise en évidence des variations d'un groupe de métabolites dans le groupe de cellules exposées à la lidocaïne versus le groupe contrôle a été réalisée en réseau métabolique via l'algorithme ADEMA (Algorithm to Determine Expected Metabolite Level Alteration Using Mutual Informations).

Résultats

Bonne qualité des spectres

Tous les spectres des 9 échantillons analysés étaient de bonne qualité. Deux spectres 1D ^1H CPMG HRMAS de cellules MDA-MB-231 exposées ou non à la lidocaïne sont représentés dans la figure 21. Un exemple de spectre 2D ^1H - ^{13}C HSQC de cellules exposées à la lidocaïne est représenté dans la figure 22. Les 22 métabolites suivants ont été quantifiés : Alanine, Asparagine, Aspartate, Choline, Créatine, Fumarate, Glutamate, Glutamine, Glutathion, Glycérol, Isoleucine, Lactate, Malate, myo-Inositol, Phénylalanine, Phosphocholine, Proline, Taurine, Choline totale, Valine et Glycine. Les valeurs moyennes se trouvent dans le tableau 9. Le glucose et la glycérophosphocholine étaient indosables. On ne retrouvait pas de pic de lidocaïne dans l'analyse de nos différents échantillons confirmant ainsi l'efficacité du lavage de nos cellules lors de la préparation des échantillons.

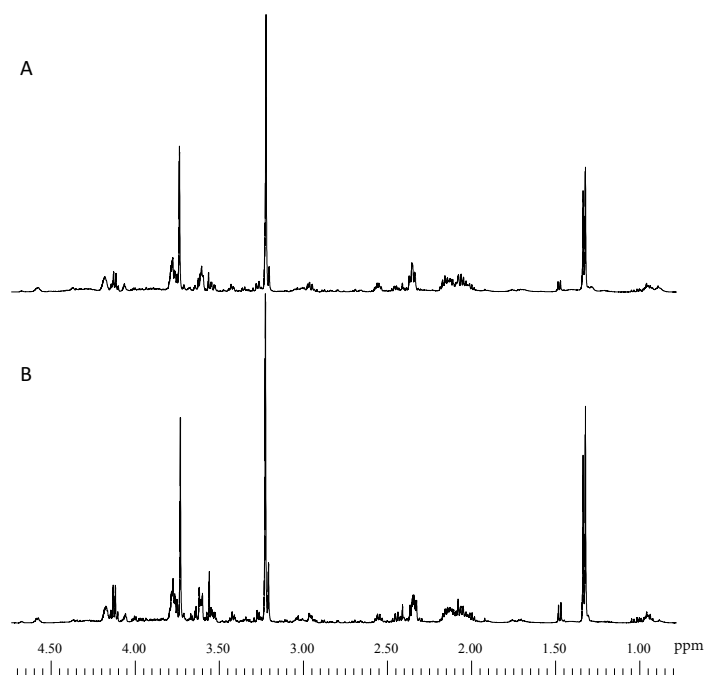


Figure 21 Spectre 1D ^1H CPMG HRMAS de cellules MDA-MB-231 exposées à l'excipient (A) ou à la lidocaïne (B). Les spectres peuvent être comparés car leur intensité a été normalisée par rapport à la masse de l'échantillon examiné.

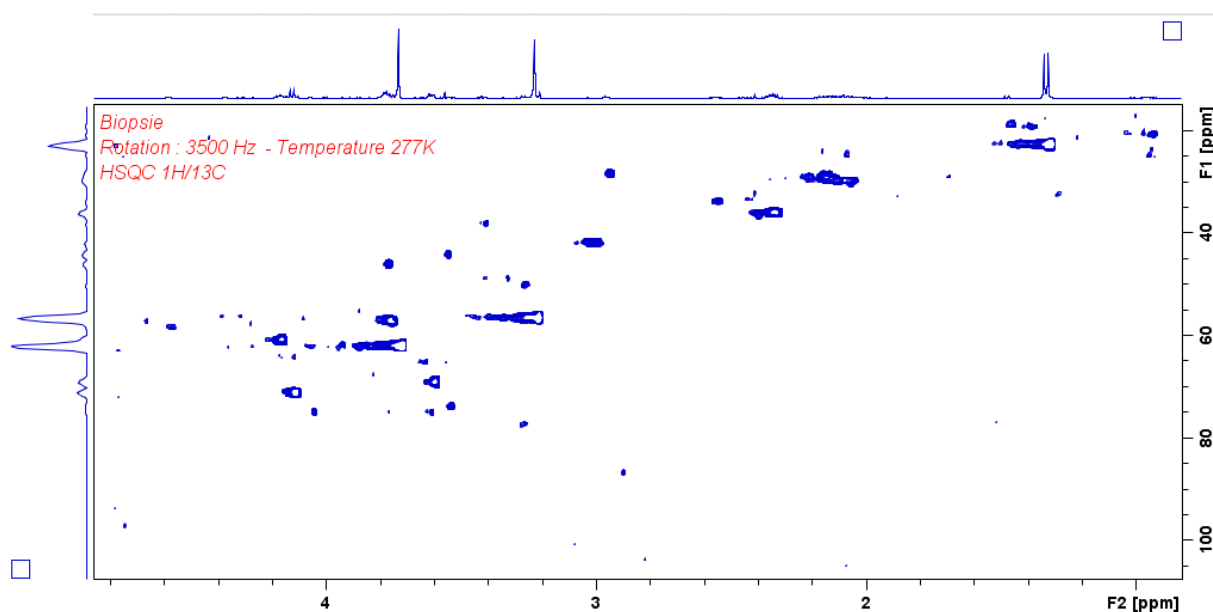


Figure 22 Exemple d'un spectre 2D ^1H - ^{13}C HSQC obtenu à partir d'un échantillon de cellules MDA-MB-231 exposées à la lidocaïne

	Lidocaïne n=5		Contrôle n=4	
	Moyenne (mM)	±écart-type	Moyenne (mM)	± écart type
Acétate	0,139	0,030	0,137	0,019
Alanine	0,758	0,276	0,847	0,081
Asparagine	0,727	0,264	0,828	0,196
Aspartate	0,620	0,287	0,788	0,287
Choline	0,363	0,293	0,354	0,083
Créatine	0,311	0,118	0,386	0,093
Fumarate	0,043	0,020	0,061	0,017
Glutamate	5,882	1,751	6,812	1,396
Glutamine	1,519	0,520	1,692	0,116
Glutathion réduit	2,367	0,404	2,805	0,316
Glycérol	1,213	0,736	1,214	0,258
Isoleucine	0,260	0,081	0,242	0,027
Lactate	9,599	1,468	9,466	1,646
Malate	1,349	0,190	1,985	0,431
Myo-Inositol	1,453	0,591	1,645	0,241
Phénylalanine	0,131	0,041	0,133	0,022
Phosphocholine	3,777	0,949	4,121	0,670
Proline	2,102	0,744	2,314	0,333
Taurine	1,492	0,363	1,607	0,134

Choline Totale	1,943	0,521	2,109	0,356
Valine	0,166	0,063	0,144	0,018
Glycine	1,086	0,605	0,985	0,089

Tableau 10 Valeurs issues de la quantification des différents métabolites exprimés en mM, en moyenne $\pm$ écart-type.

La lidocaïne impacte plusieurs chemins métaboliques et diminue potentiellement le potentiel prolifératif des cellules triple-négatives

L'analyse par l'algorithme ADEMA montre une atteinte de différents chemins métaboliques dans les cellules (figure 23). Ainsi l'exposition à la lidocaïne à la concentration de 500 μ M pendant 4 heures entraîne une baisse du taux de choline totale, choline et phosphocholine. Le taux de taurine est aussi abaissé, de même que les taux d'asparagine, aspartate, malate, fumarate, alanine, myoinositol, glutathion, glutamine, glutamate, proline et créatine. En revanche, les taux de valine et d'isoleucine sont augmentés et les taux de lactate, glycine et acétate sont inchangés. Ainsi les voies des cholines et de la glutaminolyse sont inhibées par la lidocaïne, de même que le cycle de Krebs.

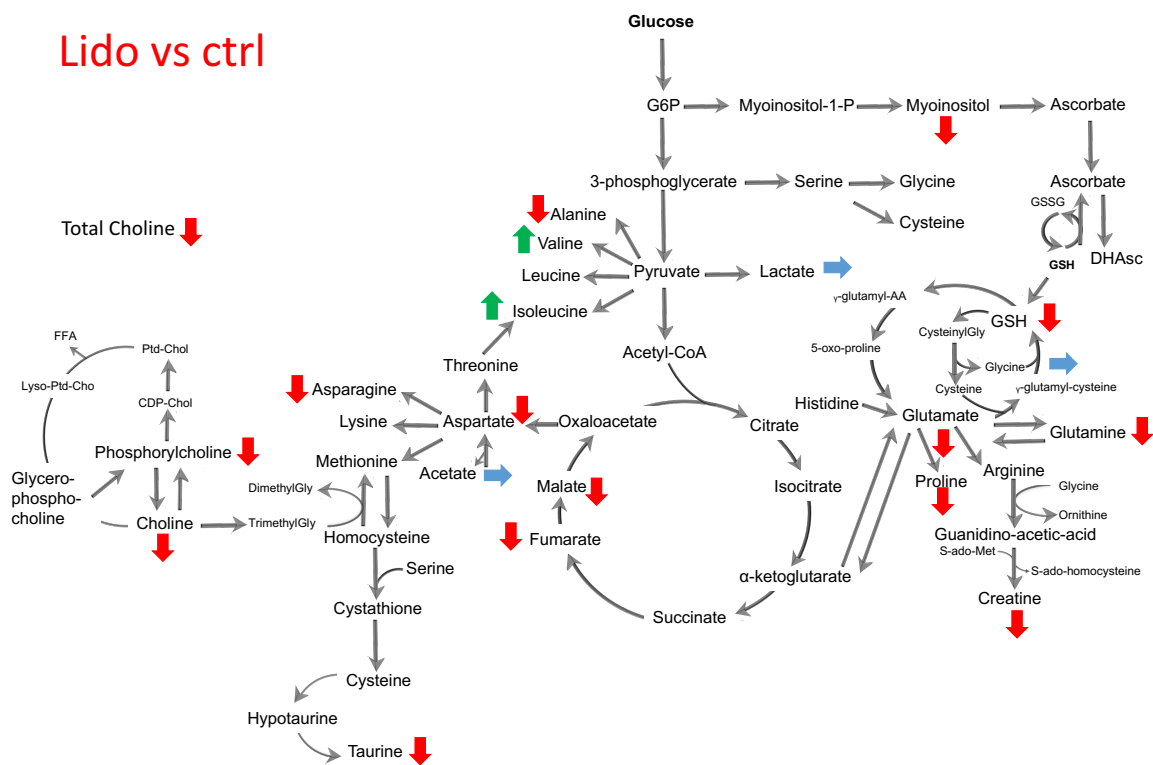


Figure 23 représentation de l'analyse du réseau métabolique d'après les résultats ADEMA des cellules MDA-MB-231 exposées à la lidocaïne (n=5) ou au contrôle (n=4). Les flèches rouges, vertes et bleues indiquent respectivement les métabolites qui diminuent, augmentent ou restent stables lorsque les cellules sont exposées à la lidocaïne par rapport au groupe contrôle.

Ce travail montre que la lidocaïne peut avoir un effet sur le profil métabolomique de cellules cancéreuses. Nous avons montré que la lidocaïne, à la concentration de 500 μ M pendant 4 heures pouvait faire varier le taux de métabolites dans différents chemins métaboliques qui signent le caractère agressif de cellules cancéreuses. Ceci est d'autant plus intéressant que certains effets sur le métabolisme font écho aux changements précédemment mis en évidence dans notre analyse transcriptomique.

Les niveaux élevés de métabolites riches en choline sont principalement dus à l'augmentation du métabolisme des phospholipides et de la synthèse de membrane cellulaire dans les cellules prolifératives. Une glutaminolyse intense favorise la prolifération tumorale et la chimiorésistance, en partie par le biais de l'activation de la voie PI3K/AKT/mTORC1. Le fait que la lidocaïne entraîne une baisse des métabolites dans ces deux voies témoigne de la diminution du potentiel prolifératif des cellules traitées par lidocaïne et ces observations vont dans le sens des travaux montrant une diminution de la prolifération des cellules MDA-MB-231 traitées par lidocaïne (309) et dans le sens également de l'analyse du RNAseq.

Le cycle de Krebs des cellules MDA-MB-231 est également impacté par la lidocaïne. En effet, on note une baisse du fumarate et du malate et de l'alanine. Or, le fumarate inhibe les prolyl-hydroxylases ce qui entraîne une augmentation du taux de HIF-1 α et permet entre autre la survie des cellules cancéreuses en hypoxie (310). Ainsi, la lidocaïne pourrait moduler la voie de prolifération HIF-1. Les gènes impliqués dans le phénomène d'hypoxie sont régulés à la hausse dans notre analyse transcriptomique par GSEA (tableau 4).

Nous avons également mis en évidence une baisse du glutathion sous sa forme réduite (GSH) pouvant être liée à la baisse du myoinositol et donc également de l'ascorbate (non dosé ici) et de ce fait une perturbation du cycle glutathion-ascorbate. De même le taux de glutamate qui est un précurseur du GSH étant abaissé, sa synthèse peut également être compromise par la lidocaïne. De manière intéressante, des gènes de transporteurs du glutamate, habituellement exprimés au niveau des synapses, sont surexprimés dans les cellules MDA-MB-231 exposées à la lidocaïne dans notre RNAseq : le SLC17A7 (Log2 FC = 2,084909133 ; p = 0,008657693) et le SLC1A1 (Log2 FC = 0,327615914 ; p = 0,001747013), laissant à penser que la cellule essaie de compenser la baisse de ce métabolite. Une autre hypothèse serait une consommation du glutathion en réaction à l'augmentation du stress oxydant et ferait écho à une dérégulation des gènes impliqués dans les processus des radicaux libres mais également à un travail récent

étudiant l'impact de la lidocaïne sur des cellules de levure où on observait une baisse initiale du GSH à H+1 mais une augmentation progressive de cet antioxydant à partir de H+2 pouvant être le témoin d'un mécanisme d'adaptation contre le stress oxydant induit par la lidocaïne (302). De même, une étude *in vitro* a montré que la lidocaïne entraînait une baisse du potentiel de membrane mitochondriale et une augmentation de la production de radicaux libres dans des cellules de cancer du poumon non à petites cellules (311). De manière intéressante, une glutathion-peroxydase, GPX3 est régulée à la baisse dans notre RNAseq (Log2 FC = 0,23886377 ; p=0,029069759), renforçant l'idée d'une atteinte de cette voie par la lidocaïne.

Enfin l'absence de glucose et de glycérophosphocholine dans nos prélèvements et les taux comparables en lactates dans les groupes contrôle et lidocaïne indiquent que la voie de glycolyse et la voie de la choline restent fortement actives dans les cellules MDA-MB-231 malgré le traitement par lidocaïne. En effet l'augmentation de la glycolyse dans la cellule tumorale est un phénomène connu depuis longtemps et décrit comme l'effet Warburg (312). Elle est liée à la surexpression tumorale des transporteurs membranaires du glucose, à l'augmentation de l'activité de l'hexokinase impliquée dans la phosphorylation du glucose et à l'augmentation de la glycolyse cellulaire anaérobie par inhibition de la voie oxydative. De même si les taux en glycérophosphocholine (GPC) restent indosables sous lidocaïne, le fait que le taux de phosphocholine (PC) soit abaissé est plutôt en faveur d'une hausse du ratio GPC/PC, ce qui est considéré dans une étude de cohorte chez des patientes ayant bénéficié de biopsies pour carcinome canalaire in situ comme un facteur de bon pronostic (313). De manière intéressante, l'ARNm du gène CHKB qui code pour la choline kinase est augmenté sous lidocaïne dans notre RNAseq (Log2 FC = 0,579039255 ; p=0,042010986). Cette enzyme va phosphoryler la choline en phosphocholine, 1^{ère} étape de la voie de biosynthèse des phosphatidylcholines. De même, l'expression des gènes LPCAT 1 et 3 codant pour la lysophosphatidylcholine acyltransférase sont régulé à la hausse (Log2 FC=0,165323157 ; p=0,049462548 et Log2 FC=0,283129144 ; p=0,0004609 respectivement). La lysophosphatidylcholine acyltransférase catalyse la conversion de la lysophosphatidylcholine en phosphatidylcholine (PC) dans la voie de biosynthèse de la phosphatidylcholine (314).

La phospholipase C delta est également perturbée dans le RNAseq. (Log2 FC=0,233496824 ; p=0,002158761). Elle intervient sur la fonction ester liant le glycérol et le phosphate, libérant un diglycéride et un phosphoalcool. Elle catalyse l'hydrolyse du phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate membranaire (PIP2) en diglycéride et inositol-1,4,5-trisphosphate (IP3) et est activée par ce dernier.

Les effets de la baisse de myoinositol par la lidocaïne sont à étudier. En effet, les inositols ont des propriétés tumorales importantes reprises dans une revue récente (315). Ils peuvent notamment interférer avec la prolifération cellulaire en diminuant par exemple le taux de PI3K ou en inhibant la phosphorylation de pRB ou l'activation d'Akt et donc de NF-kB. Ils peuvent également interférer avec l'invasion cellulaire et la transition épithélio-mésenchymateuse (315).

Ainsi nous avons pu montrer à l'aide de deux outils « omics » que la lidocaïne pouvait déréguler des processus d'oncogenèse tels que la prolifération des cellules (par une modification du métabolisme des lipides et de la voie de la glutaminolyse et de mTOR) ou le stress oxydant.

Analyse de l'expression protéique

L'analyse de l'expression différentielle des gènes par RNAseq et la modification de l'empreinte métabolomique des cellules exposées à la lidocaïne suggère l'implication de plusieurs voies de signalisation.

Étant donnée la multitude de possibilités, nous nous sommes focalisés sur certaines en lien avec nos analyses de transcriptomique et de métabolomique.

La voie PI3K/AKT/mTOR

L'analyse de l'expression différentielle de gènes a montré que les gènes participants à la voie AKT/mTOR étaient dérégulés par la lidocaïne. Si on s'en tenait à la liste de gènes dont l'expression était significativement différente de la condition contrôle, les gènes semblaient surexprimés. En revanche, l'analyse quantitative laisse à penser que l'ensemble des gènes impliqués dans cette voie est sous-exprimé sous lidocaïne. De même, la modulation du profil métabolomique par la lidocaïne montre une diminution de la voie de la glutaminolyse, dont la répercussion dans la littérature est une inhibition de la voie mTOR (316).

Nous avons donc voulu vérifier par Western-blot l'expression protéique de mTOR et de AKT des cellules MDA-MB-231 exposées à des doses croissantes de lidocaïne ou au contrôle pendant 24h. L'expérience a été réalisée de manière indépendante 3 fois. L'intensité de signal des bandes a été normalisée au contrôle de charge qui était la protéine HSP90 puis rapportée à la condition contrôle pour étudier la variation par rapport à ce contrôle. La dispersion est grande pour la protéine mTOR totale et phosphorylée. Les tests d'ANOVA ne retrouvaient pas de variation significative pour les 4 protéines, en revanche, on note une tendance à une diminution de la phosphorylation d'AKT en fonction de la concentration de lidocaïne alors que le taux de la protéine totale reste le même. Le taux de mTOR phosphorylé tend également à diminuer.

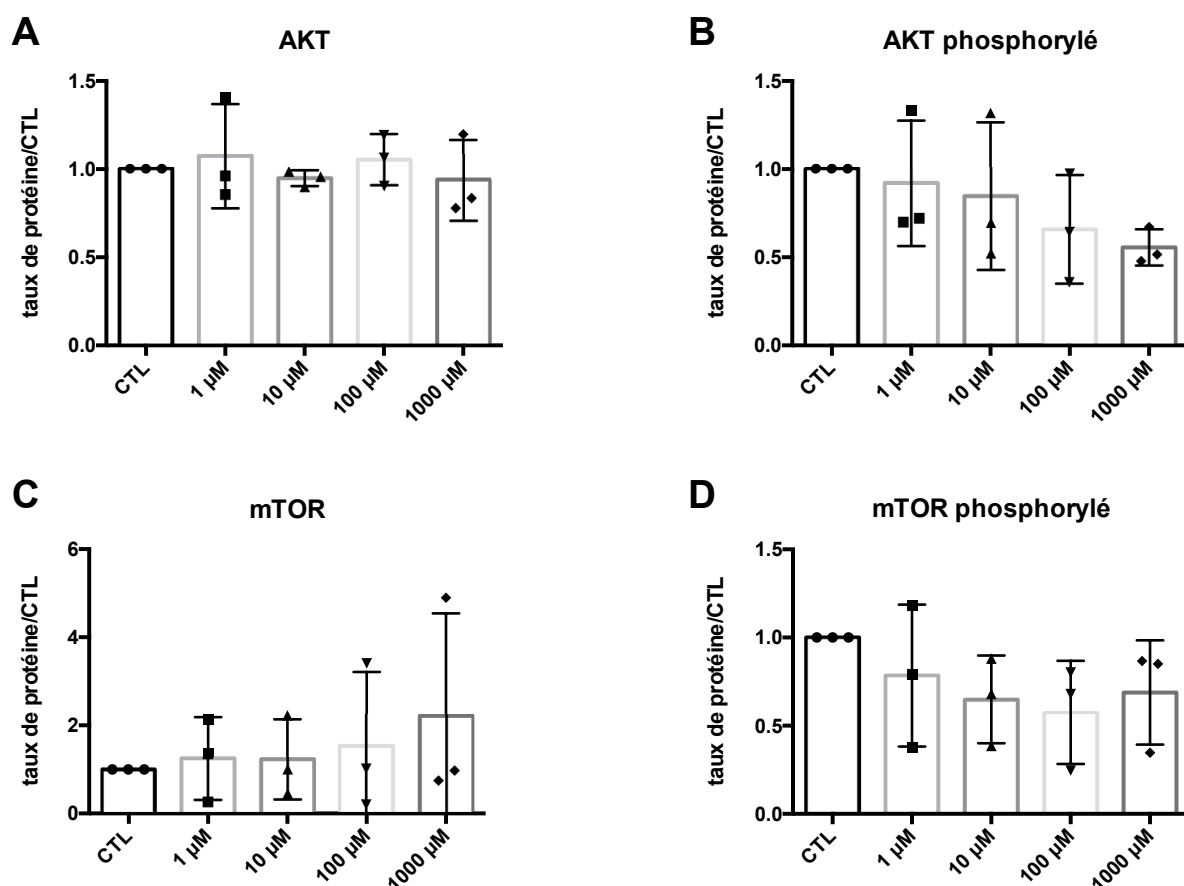


Figure 24 Analyse de l'expression de protéines AKT (A), AKT phosphorylé (B), mTOR (C) et mTOR phosphorylé (D) dans les cellules MDA-MB-231 exposées à des doses croissantes de lidocaïne. Des cellules MDA-MB231 ont été traitées par des doses croissantes de lidocaïne. L'expression des protéines d'intérêt a été analysée par Western Blot, HSP90 est utilisé comme contrôle de charge. La quantification relative est faite par rapport à la condition contrôle CTL. Le graphique montre la moyenne de 3 expériences indépendantes et les barres d'erreur l'écart-type.

FAK

La Focal Adhesion Kinase (FAK) est une kinase ubiquitaire au niveau du complexe d'adhésion cellulaire. Elle peut être activée par les intégrines de la membrane plasmique, par des facteurs de croissance ou par des hormones. Lors de son activation, il y a libération d'un site de grande affinité pour des protéines de la famille des Src où elles vont être phosphorylées participant à l'activation de voies de la signalisation cellulaire régulant le mécanisme de la survie cellulaire, la prolifération cellulaire ou la migration. L'expression de gènes participant à l'adhésion focale étant perturbée dans l'analyse transcriptomique et l'adhésion cellulaire l'étant également dans nos expériences *in vitro*, nous avons voulu regarder l'expression protéique de FAK. Malheureusement, nous avons rencontré des problèmes techniques et seuls les blots exposés aux anticorps anti-FAK phosphorylés ont pu être exploités. Il existe une tendance à l'augmentation de la protéine phosphorylée sans que cela soit statistiquement significatif.

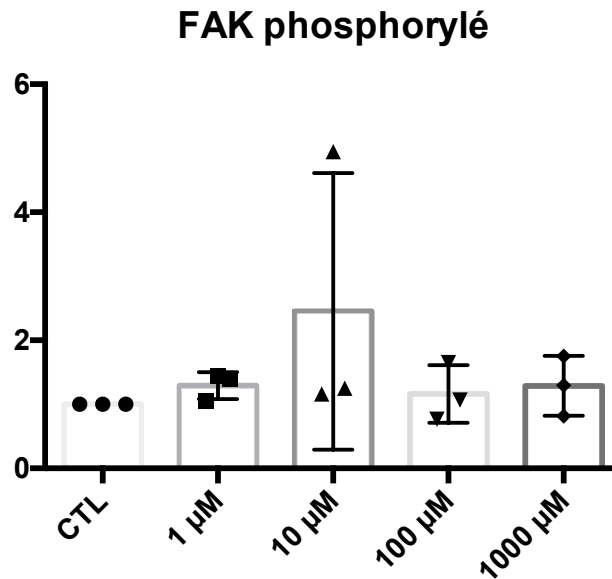


Figure 25 Analyse du taux de FAK phosphorylé dans les cellules MDA-MB-231 exposées à des doses croissantes de lidocaïne. Des cellules MDA-MB231 ont été traitées par des doses croissantes de lidocaïne. Le taux de FAK phosphorylé a été analysé par Western Blot, HSP90 est utilisé comme contrôle de charge. La quantification relative est faite par rapport à la condition contrôle CTL. Le graphique montre la moyenne de 3 expériences indépendantes et les barres d'erreur l'écart-type.

Protéine SRC

La tyrosine kinase cytoplasmique Src est impliquée dans plusieurs voies de signalisation dans le cancer (317,318). Plusieurs arguments nous ont poussés à étudier son expression protéique :

- C'est un régulateur clé de la signalisation induite par les facteurs de croissance et les intégrines dont l'expression est augmentée après exposition à la lidocaïne dans le RNAseq.
- SRC joue également un rôle dans l'adhésion via un complexe FAK-SRC
- La voie de la Calpaïne est régulée à la hausse dans l'analyse du RNAseq. Or cette voie peut moduler l'activation de SRC via le clivage de PTP1B (319,320)
- SRC se situant en aval de la voie AKT/mTOR,
- la phosphorylation de SRC est diminuée après exposition aux anesthésiques locaux dans la littérature (321).

Si les analyses statistiques ne montrent pas de différences significatives, il a une tendance à l'augmentation de la protéine totale qui n'est pas accompagnée par une variation de la forme phosphorylée.

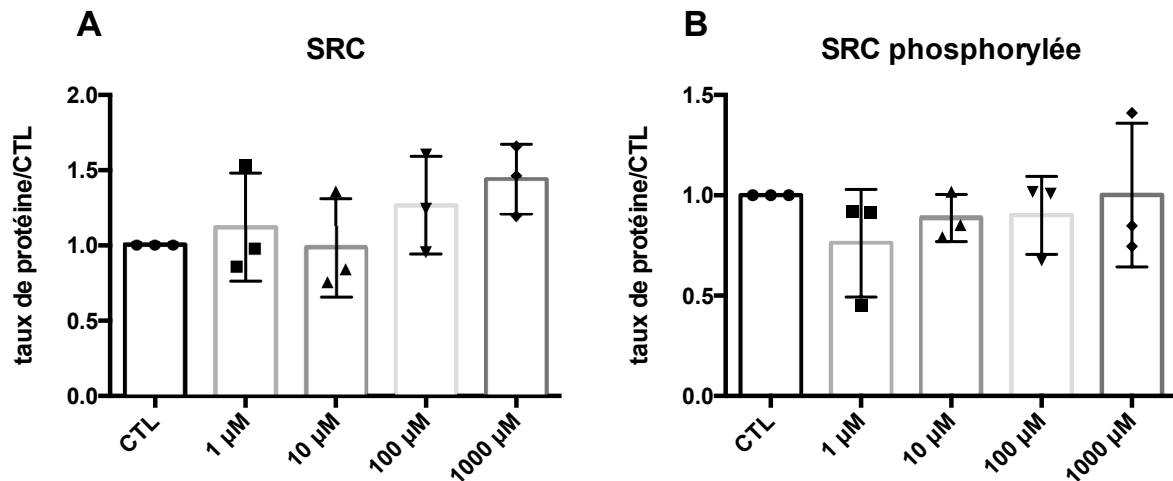


Figure 26 Analyse de l'expression de la protéine SRC (A) et sa phosphorylation (B) dans les cellules MDA-MB-231 exposées à des doses croissantes de lidocaïne. Des cellules MDA-MB231 ont été traitées par des doses croissantes de lidocaïne. L'expression de SRC et son niveau de phosphorylation ont été analysés par Western Blot, HSP90 est utilisé comme contrôle de charge. La quantification relative est faite par rapport à la condition contrôle CTL. Le graphique montre la moyenne de 3 expériences indépendantes et les barres d'erreur l'écart-type.

Voie des MAP kinases (ERK1/2) et des caspases

Les protéines ERK1/2 sont des kinases de la famille des MAP kinases qui sont des protéines jouant un rôle dans la division, la croissance et la prolifération cellulaires. sur les cellules d'hépatocarcinome (322), la lidocaïne augmentait la phosphorylation d'ERK1/2 aboutissant à une augmentation de la caspase 3 (323). Or, la voie des caspases était régulée à la baisse dans le RNAseq avec pour la caspase 3 un $\text{Log}_2 \text{FC} = -0,183249519$, $p = 0,013057851$. Nous avons donc voulu voir comment était modulée l'expression protéique de ces protéines par western blot. Concernant ERK1/2, l'expression de la protéine totale et phosphorylée ne semble pas modifiée par la lidocaïne, figure 27.

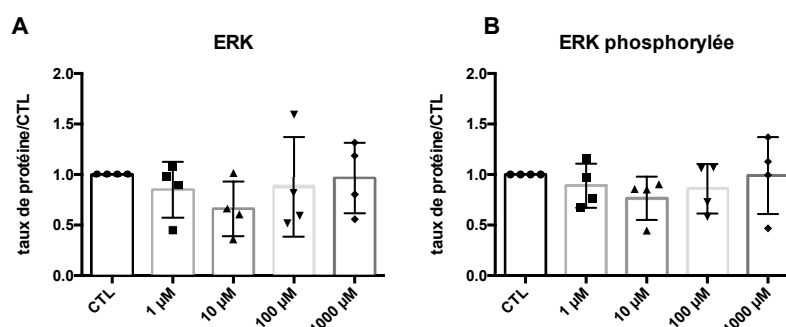


Figure 27 Analyse de l'expression de ERK1/2 dans les cellules MDA-MB-231 exposées à des doses croissantes de lidocaïne. Des cellules MDA-MB231 ont été traitées par des doses croissantes de lidocaïne. L'expression ERK (A) et son niveau de phosphorylation (B) ont été analysés par Western Blot, HSP90 est utilisé comme contrôle de charge. La quantification relative est faite par rapport à la condition contrôle CTL. Le graphique montre la moyenne de 4 expériences indépendantes et les barres d'erreur l'écart-type.

En revanche, même si cela n'est pas statistiquement significatif, l'expression des caspases semblent augmentées sous lidocaïne, confirmant nos résultats positifs en FACS avec des doses plus fortes de lidocaïne (figure 28).

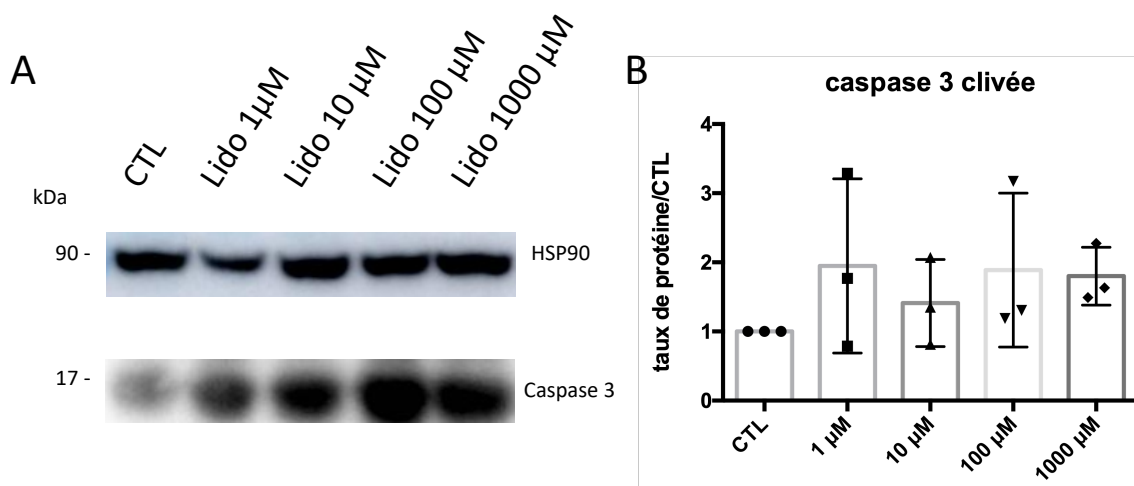


Figure 28 Analyse de l'expression de caspase 3 clivée dans les cellules MDA-MB-231 exposées à des doses croissantes de lidocaïne. Des cellules MDA-MB231 ont été traitées par des doses croissantes de lidocaïne. L'expression de la caspase-3 a été analysée par Western Blot, HSP90 est utilisé comme contrôle de charge (A). La quantification relative est faite par rapport à la condition contrôle CTL (B). Le graphique montre la moyenne de 3 expériences indépendantes et les barres d'erreur l'écart-type.

Ainsi nos analyses d'expression protéique n'ont pu mettre en évidence de manière sûre de modifications importantes dans les voies de signalisation cellulaires. Toutefois, les tendances mises en évidence vont plutôt dans le sens de la littérature et de nos analyses transcriptomiques et métabolomiques : la voie Akt/mTOR semble inhibée, FAK semble activée, il existe une augmentation des caspases 3 clivées sous lidocaïne. Toutefois ces résultats nécessitent d'être confirmés par des méthodes quantitatives ou en sensibilisant notre western blot par l'utilisation d'inhibiteurs ou activateurs des kinases.

Lipidomique

L'analyse de notre RNAseq et du profil métabolomique de nos cellules exposées à la lidocaïne montre une perturbation des lipides membranaires.

Dans la littérature, il ressort que la lidocaïne peut interagir différemment avec les lipides membranaires (324) en fonction de leur nature (325). L'action des anesthésiques locaux passent les radeaux lipidiques (326,327) et la lidocaïne peut briser ces radeaux (328).

Flotilline

Nous avons voulu voir dans un premier temps si la flotilline, un composant majeur des radeaux lipidiques et pouvant agir dans différents mécanismes d'oncogénèse (329), était perturbé par la lidocaïne, d'autant plus que les données de la littérature vont dans ce sens dans un modèle cellulaire équin (330).

L'expression du gène FLOT1 n'était pas modifiée dans notre RNAseq (Log2 FC (lidoVsCTL) = -0,067329137 et $p=0,349125923$) et l'analyse par WB montre une légère augmentation du taux de la protéine après exposition des cellules MDA-MB-231 à la lidocaïne.

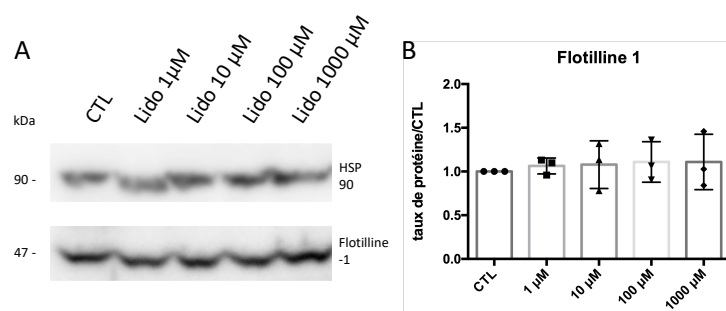


Figure 29 Analyse de l'expression de la Flotilline-1 dans les cellules MDA-MB-231 exposées à des doses croissantes de lidocaïne. Des cellules MDA-MB231 ont été traitées par des doses croissantes de lidocaïne. L'expression de la flotilline-1 a été analysée par Western Blot, HSP90 est utilisé comme contrôle de charge (A). La quantification relative est faite par rapport à la condition contrôle CTL (B). Le graphique montre la moyenne de 3 expériences indépendantes et les barres d'erreur l'écart-type.

Cholestérol et sphingomyéline

Le métabolisme du cholestérol et des sphingolipides étant perturbé par la lidocaïne d'après l'analyse du RNAseq qui montre une augmentation de l'ensemble de gènes impliqué dans ces processus et d'après l'empreinte métabolomique avec une baisse de la choline et de la phosphorycholine, nous avons voulu quantifier le cholestérol et la sphingomyéline à la membrane.

Pour ce faire, nous avons marqué des cellules exposées ou non à des doses croissantes de lidocaïne pendant 24 heures à un marqueur du cholestérol membranaire : la D4 couplée au fluorochrome GFP et un marqueur de la sphingomyéline membranaire : la lysénine, également couplée à la GFP. Il existe un switch entre le taux de cholestérol et de

sphingomyéline qui est dose-dépendant de la lidocaïne : plus les doses de lidocaïne augmentent, plus la sphingomyéline est présente, au détriment du cholestérol.

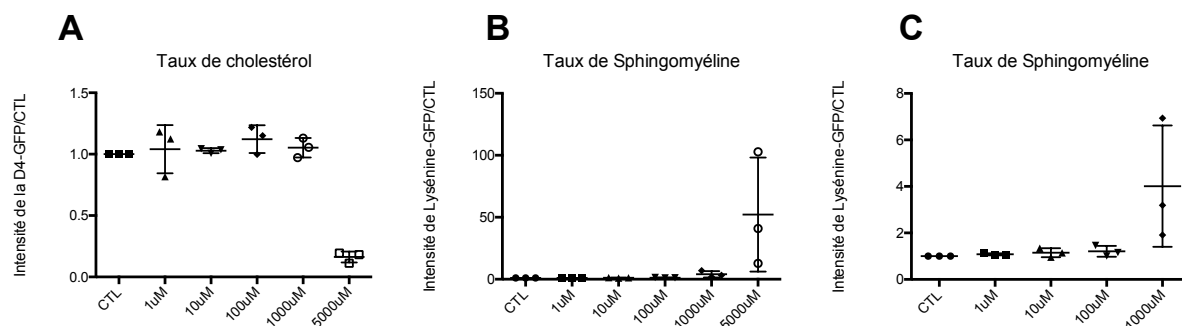


Figure 30 Changement de la composition lipidique des membranes de cellules MDA-MB-231 exposées à la lidocaïne. L'intensité du signal GFP couplé au marqueur de cholestérol D4 (A) ou de sphingomyéline lyséline (B) a été mesurée par fax et rapportée à la condition contrôle. Un graphique sans la concentration de 5mM est également représenté pour apprécier la variation de sphingomyéline aux concentrations plus faibles (C), expérience réalisée indépendamment 3 fois, représentée en moyenne $\pm$ écart-type.

Nous avons donc pu mettre en évidence une modification des lipides à la membrane de nos cellules MDA-MB-231 exposées ou non à la lidocaïne. Ces données préliminaires sont intéressantes et méritent d'être approfondies par des études de microscopie.

Approche globale : conclusion

Dans cette partie, nous avons montré que la lidocaïne hydrochloride altérait la viabilité des cellules MDA-MB-231 après 24 h d'exposition de manière dose dépendante avec une différence significative à la dose de 10 mM et que cela passerait par un phénomène d'apoptose. L'adhésion aiguë est également altérée à 10mM et la croissance à long terme (test clonogénique et de soft agar) est également inhibée à des doses plus faibles (1mM pour les tests clonogéniques et 0,1mM pour les tests en soft-agar). L'analyse transcriptomique et métabolomique montre que la lidocaïne altère les mécanismes de transcription et de traduction ainsi plusieurs processus liés à la membrane cellulaire : métabolisme des lipides, voies de signalisation, adhésion focale, interaction avec la matrice extracellulaire. L'analyse protéomique a permis de confirmer l'induction d'un signal apoptotique par l'augmentation des caspases 3 clivées, la voie de prolifération Akt/mTOR est inhibée de manière partielle, ainsi que FAK. Le dosage des lipides par FACS a permis de confirmer un changement des taux de lipides membranaires avec une diminution du cholestérol et une augmentation de la sphingomyéline membranaire.

De manière intéressante, l'analyse transcriptomique révèle une augmentation du transcrit du gène codant pour le canal sodique-voltage dépendant, laissant à penser qu'une transcription déclenchée par l'exposition à la lidocaïne.

APPROCHE PAR GENE CANDIDAT

Le canal sodique voltage dépendant est la cible la plus connue de la lidocaïne.

Les canaux sodiques voltage-dépendants ou (VGSCs pour Voltage-gated Na⁺ channels) sont des complexes protéiques membranaires de forme hétéromères. Ils contiennent des sous-unités α qui forment le pore et des sous-unités β de plus petite taille. Les VGSCs sont exprimés dans les cellules excitables comme les neurones et les cellules musculaires où elles génèrent un potentiel d'action. Les VGSCs sont aussi surexprimés dans différents cancers où ils joueraient un rôle dans l'invasion (331–333).

Surexpression des canaux sodiques voltage dépendant dans le cancer du sein

Le canal sodique voltage-dépendant est surexprimé dans différents cancers (333). Dans le cancer du sein, il est essentiellement surexprimé dans les cancers métastatiques et dans la lignée triple négative MDA-MB-231 à fort potentiel invasif (334,335). La sous-unité Na_v1.5 α (encodée par le *SCN5A*) joue ainsi un rôle dans la croissance et la migration cellulaire.

Des études in vitro et in vivo ont montré que la tétrodontoxine (TTX) (336) et la phénytoïne (337,336,338), deux bloqueurs pharmacologiques des canaux sodiques pouvaient altérer la croissance et l'invasion des cellules MDA-MB-231. Plus récemment, une étude a montré que les canaux sodiques avec sous-unité Na_v1.5 pouvaient être inhibés par la lidocaïne (339,340).

De manière intéressante, l'analyse différentielle de l'expression des gènes par RNAseq a révélé une surexpression du gène *SCN5A* après exposition à la lidocaïne, renforçant l'idée que le canal sodique voltage-dépendant est la cible de la lidocaïne dans l'inhibition de la croissance des cellules MDA-MB-231.

Nous avons donc voulu savoir par approche par gène candidat si la perte du canal sodique voltage-dépendant modifiait les effets de la lidocaïne sur la croissance cellulaire.

Génération de clones de MDA-MB-231 ne surexprimant plus le canal sodique voltage-dépendant

Pour réprimer l'expression du canal sodique, nous avons utilisé la technique de petits ARN en épingle à cheveux (shRNA pour short hairpin RNA) qui sont des ARN adoptant une structure en tige et boucle pouvant être utilisé pour réduire l'expression d'un gène cible via phénomène d'interférence par ARN.

Pour cela, nous avons généré des shARNs dirigés contre le transcrit *SCN5A*. Ceux-ci ont été préparés à l'aide d'oligos commandés auprès de Sigma et incorporés au vecteur pLKO.1-puro. La séquence des oligos est la même que décrite par Nelson et al (335). Le shARN contrôle (shCTL) est caractérisé pour ne cibler aucun transcrit et a été préparé à partir d'un oligo

« scramble » incorporé dans le vecteur pLKO.1-puro. Les séquences des oligos est donnée dans le tableau 11 en annexe. La partie décrivant le matériel et la méthode employés se trouvent en annexe.

Expression de canal sodique voltage dépendant

L'expression protéique du canal sodique voltage dépendant a été contrôlée par western blot. Ainsi dans la lignée MDA-MB-231 shSCN5A1, l'expression protéique du canal sodique était réduite de 90,57% par rapport à la lignée shCTL (moyenne de 3 expériences) tandis que la réduction dans la lignée MDA-MB-231 shSCN5A2 n'était réduite que de 61,57% (ANOVA : $F(2,6) = 24,80$; $p = 0,0013$). Toutefois, on note chez le clone shSCNA1 que si le canal sodique voltage-dépendant est totalement invalidé sur la 1^{ère} expérience, son expression apparaît lors de la 2^{nde} expérience (4%) et augmente à la 3^{ème} expérience (24%) laissant à penser que cette lignée n'est pas stable.

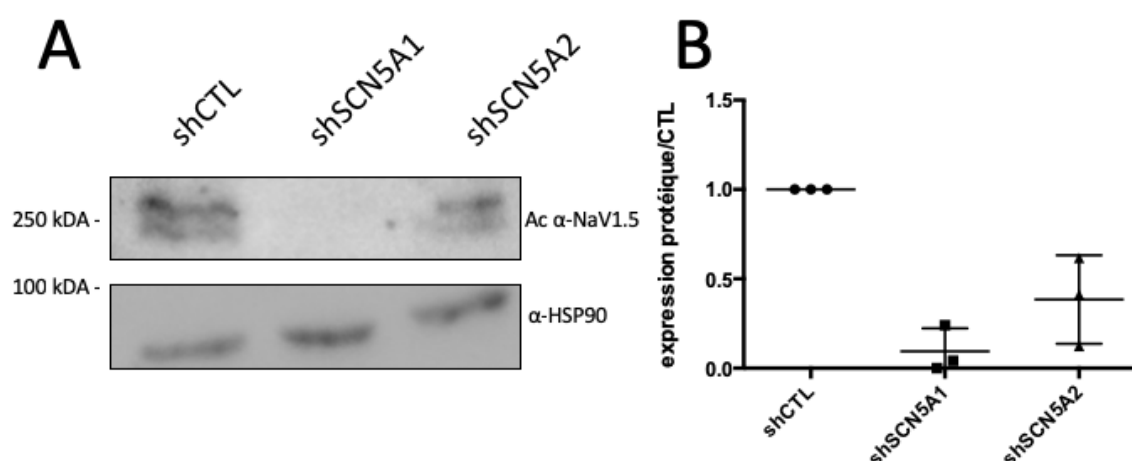


Figure 31 Expression protéique du canal sodique voltage-dépendant après transfection lentivale. Western blot de Nav1.5 dans les cellules MDA-MB-231 shCTL, shSCN5A1 et shSCN5A2 (A) et niveau d'expression protéique par rapport à la lignée shCTL (B).

Croissance cellulaire

Dans un premier temps, nous avons comparé la croissance des cellules exprimant ou non le canal sodique voltage-dépendant par test de MTT.

Ainsi, la croissance de la lignée MDA-MB-231 shSCN5A est diminuée de manière significative par rapport à la lignée MDA-MB-231 shCTL à J3 de l'ordre de 27,82% (ANOVA : $F(2,6)$

=7,097 ; $p=0,0262$, et test de Dunnett : $p<0,05$) et de manière non significative à J4 (-13,68%, ANOVA F (2,6) =3,653 ; $p=0,0917$). En revanche, on ne note pas de différence avec la lignée MDA-MB-231 shSCN5A2.

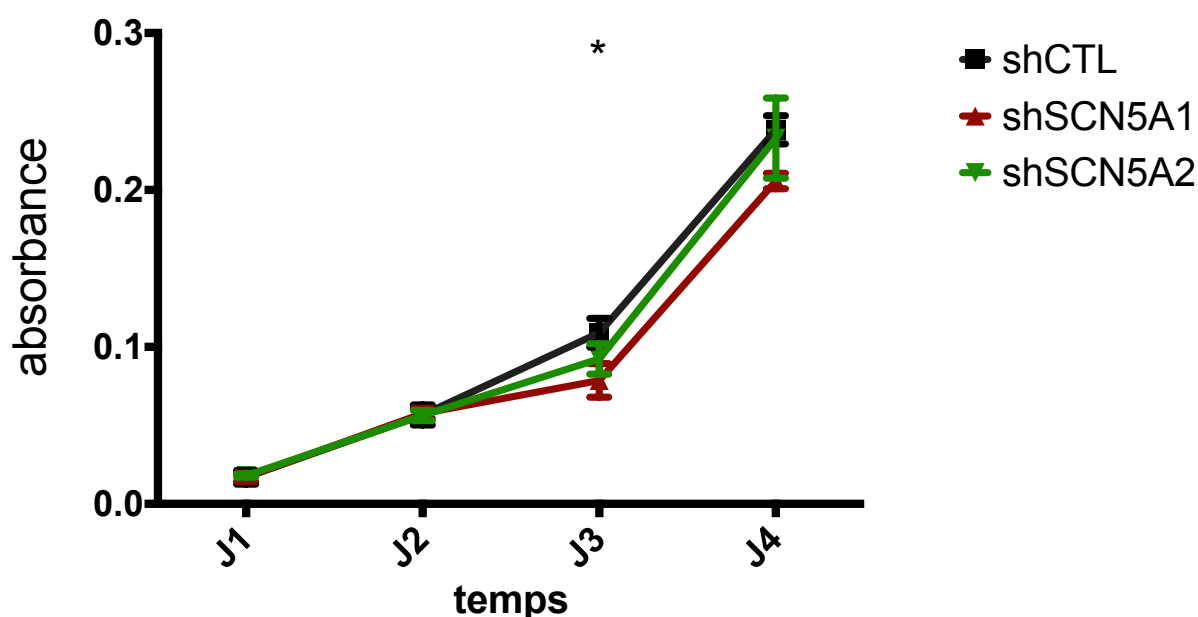


Figure 32 Croissance cellulaire des lignées MDA-MB-231 shCTL, shSCN5A1 et shSCN5A2 pendant 4 jours. La croissance cellulaire est mesurée par test de MTT. A J3, la croissance est significativement diminuée pour la lignée shSCN5A1 par rapport à la lignée contrôle ((ANOVA : F (2,6) =7,097 ; $p=0,0262$, suivie d'un test de Dunnett * : $p<0,05$), $n=3$, chaque condition est réalisée en triplicata.

Viabilité des cellules

Les cellules ont ensuite été exposées à des doses croissantes de lidocaïne ou à la condition contrôle (solvant eau) pendant 24 et 48h à l'issue desquelles un test de viabilité au MTT, décrit précédemment est réalisé (251).

Lorsque les cellules sont exposées pendant 24h à des doses croissantes de lidocaïne ou au contrôle, les cellules MDA-MB-231 shCTL semblent plus sensibles que les cellules MDA-MB-231 shSCN5A1 et shSCN5A2. En effet, le test d'ANOVA montre une différence significative entre les différentes conditions (F (7,24) =11,46 ; $p<0,0001$) et la diminution au test de Dunnett entre la condition contrôle et la concentration de 10 mM significative (-29,05% ; $p<0,05$) alors que le test d'ANOVA n'est pas statistiquement significatif pour les cellules shSCNA51 ((F (7,24) =2,176 ; $p=0,0737$) et shSCNA52 ((F(7,24)=2,266 ; $p=0,0639$). Toutefois lorsqu'on compare la variation à la concentration de 10 mM par rapport à la condition contrôle (-29,05% pour le shCTL, -21,37% pour le shSCN5A1 et -17,39% pour le shSCN5A2), il n'y a pas de différence significative au test d'ANOVA (F (2,9) =0,7844 ; $p=0,4853$).

A 48h, les 3 lignées sont sensibles de manière identique à la lidocaïne. Les tests d'ANOVA sont respectivement de $F(7,24)=10,2$; $F(7,24)=21,98$ et $F(7,24)=20,59$, soit $p<0,0001$ pour chaque lignée. Les tests de Dunnett retrouvent des diminutions significatives de la viabilité à partir de la dose de 6mM pour chaque lignée.

La viabilité des cellules MDA-MB-231 shSCN5A1 et shSCN5A2 exposées à la lidocaïne pendant 24 et 48h est la même que celles des cellules MDA-MB-231 shCTL.

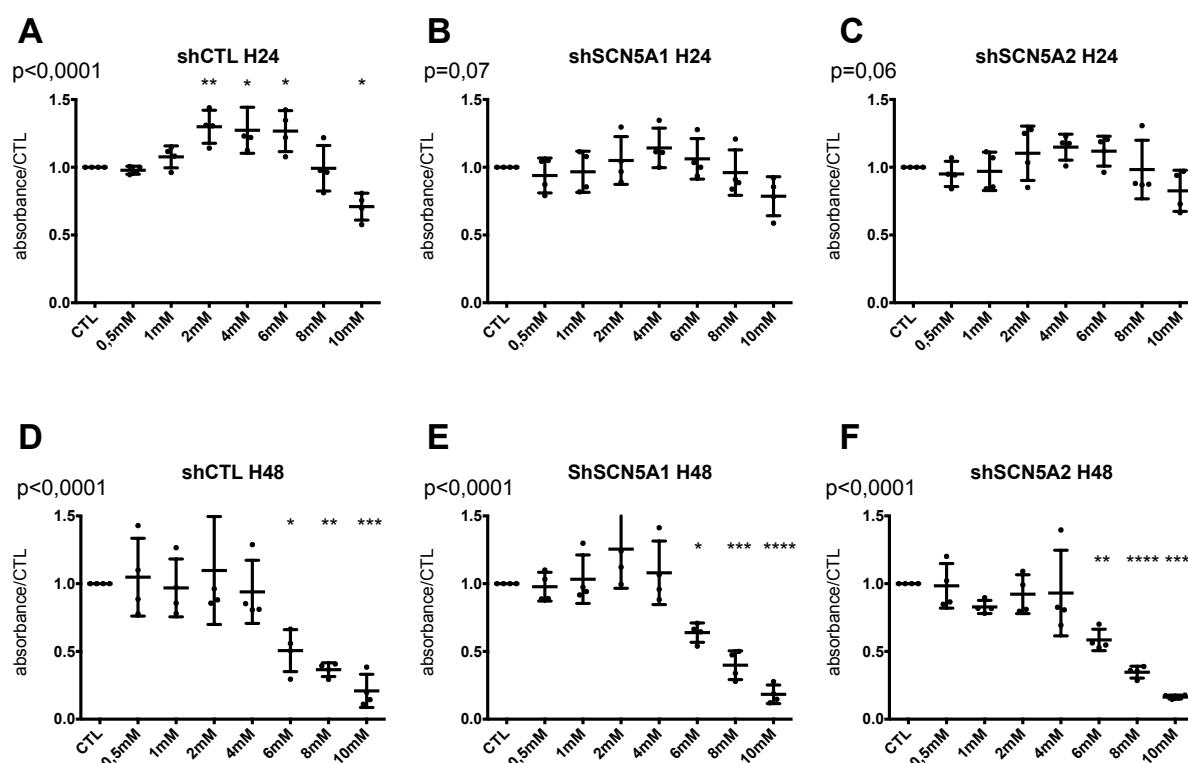


Figure 33 Viabilité des cellules MDA-MB-231 selon l'expression du canal sodique voltage-dépendant. Variabilité de l'absorbance à des concentrations croissantes de lidocaïne par rapport à la condition contrôle des cellules MDA-MB-231 shCTL (A et D), shSCN5A1 (B et E) et shSCN5A2 (C et F) à 24h (A, B et C) et 48h (D, E et F), $n=4$, chaque point est la moyenne d'un triplicata.

Test de clonogénicité

Des tests de clonogénicité en boîte de pétri ont été réalisés. Les colonies se touchant parfois, leur décompte par macro sous Fiji a été suivi d'une lecture de l'absorbance MTT après dissolution au DMSO au spectrophotomètre.

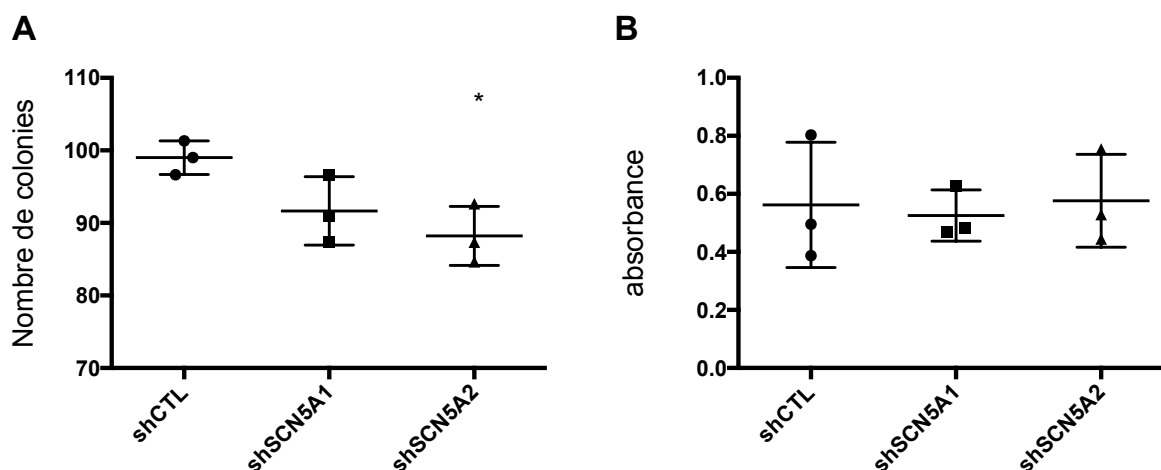


Figure 34 Test de clonogénicité des cellules MDA-MB-23 selon l'expression du canal sodique voltage-dépendant. Le nombre de colonies des lignées shCTL, shSCN5A1 et shSCN5A2 sont quantifiées par compte direct (A) (ANOVA : $F(2,6) = 6,177$; $p = 0,0349$, suivie d'un test de Dunnett * : $p < 0,05$) et par test au MTT (B) (ANOVA : $F(2,6) = 0,07723$; $p = 0,9266$).

Ainsi, si le nombre de colonies semblait diminuer au décompte automatisé par la macro de Fiji, la lecture de l'absorbance du MTT montre que la perte du canal sodique voltage-dépendant ne n'altère pas la formation de colonies des cellules.

Le test de clonogénicité a ensuite été réalisé avec exposition à des doses croissantes de lidocaïne ou au contrôle pour les 3 lignées cellulaires. Comme cela a été fait pour comparer les 3 lignées, le décompte et l'absorbance du MTT ont été réalisés. Afin de voir si la perte du canal sodique voltage-dépendant rendait les cellules insensibles à la lidocaïne, ils ont été rapportés à la condition contrôle pour chaque lignée.

Le nombre de colonies avec la lignée shCTL a diminué avec la lidocaïne (ANOVA : $F(5,12) = 41,2$; $p < 0,0001$), l'analyse statistique par test de Dunnett a montré une différence significative entre l'exposition au milieu contrôle et la lidocaïne à 10 mM ($p < 0,0001$). Par test de MTT, l'analyse statistique est toujours significative (ANOVA : $F(5,12) = 87,95$; $p < 0,0001$), en revanche, la diminution de l'absorbance par rapport à la condition contrôle est statistiquement significative dès la concentration de 1mM, avec diminution de 27,64% ($p < 0,01$).

Le nombre de colonies avec les lignées shSCN5A1 et shSCN5A2 a diminué avec la lidocaïne (ANOVA : $F(5,12) = 97,19$; $p < 0,0001$ et $F(5,12) = 49,84$; $p < 0,0001$ respectivement), l'analyse statistique par test de Dunnett a montré une différence significative entre l'exposition au milieu contrôle et la lidocaïne à 10 mM pour les deux lignées ($p < 0,0001$). Par test de MTT, l'analyse statistique est toujours significative (ANOVA : $F(5,12) = 166,2$; $p < 0,0001$). La diminution de l'absorbance par rapport à la condition contrôle est statistiquement significative dès la concentration de 1mM, avec diminution de l'ordre de 42,92% et 42,37% ($p < 0,0001$).

Nous avons ainsi montré que la perte du canal sodique-voltage dépendant ne rend pas les cellules triple-négatives résistantes à la lidocaïne pour la formation de colonies.

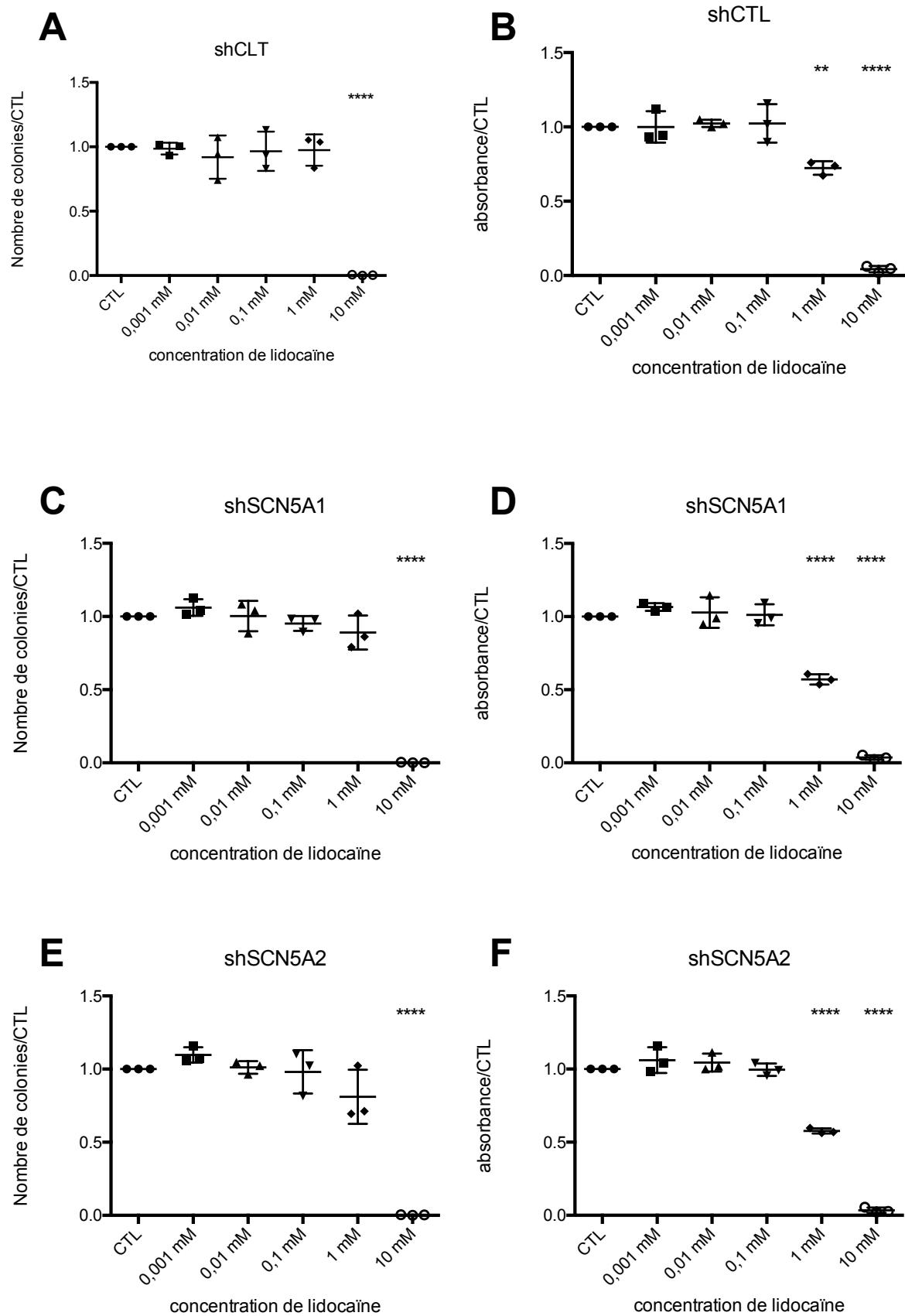


Figure 35 Sensibilité à lidocaïne des cellules MDA-MB-231 en test de clonogénicité en fonction de l'expression du canal sodique voltage-dépendant. Test de clonogénicité des lignées MDA-MB-231 shCTL, shSCN5A1 et shSCN5A2 exposées à des

*doses croissantes de lidocaïne par rapport à la condition contrôle. La variation a été mesurée par décompte automatisé des colonies (A, C et E) puis par test de MTT (B, D, F). Les tests d'ANOVA, retrouvant tous une différence significative ($p < 0,0001$) ont été suivis d'un test de Dunnett où **: $p < 0,01$ et ****: $p < 0,0001$.*

Colonies en soft agar

Des tests de croissance en milieu en soft agar ont été réalisés comme pour la lignée parentale (251). Dans un premier temps nous avons comparé le nombre de colonies, la taille moyenne des colonies, le périmètre moyen et l'index de circularité de 3 lignées générées. Ces 4 caractéristiques étaient similaires pour les 3 lignées générées.

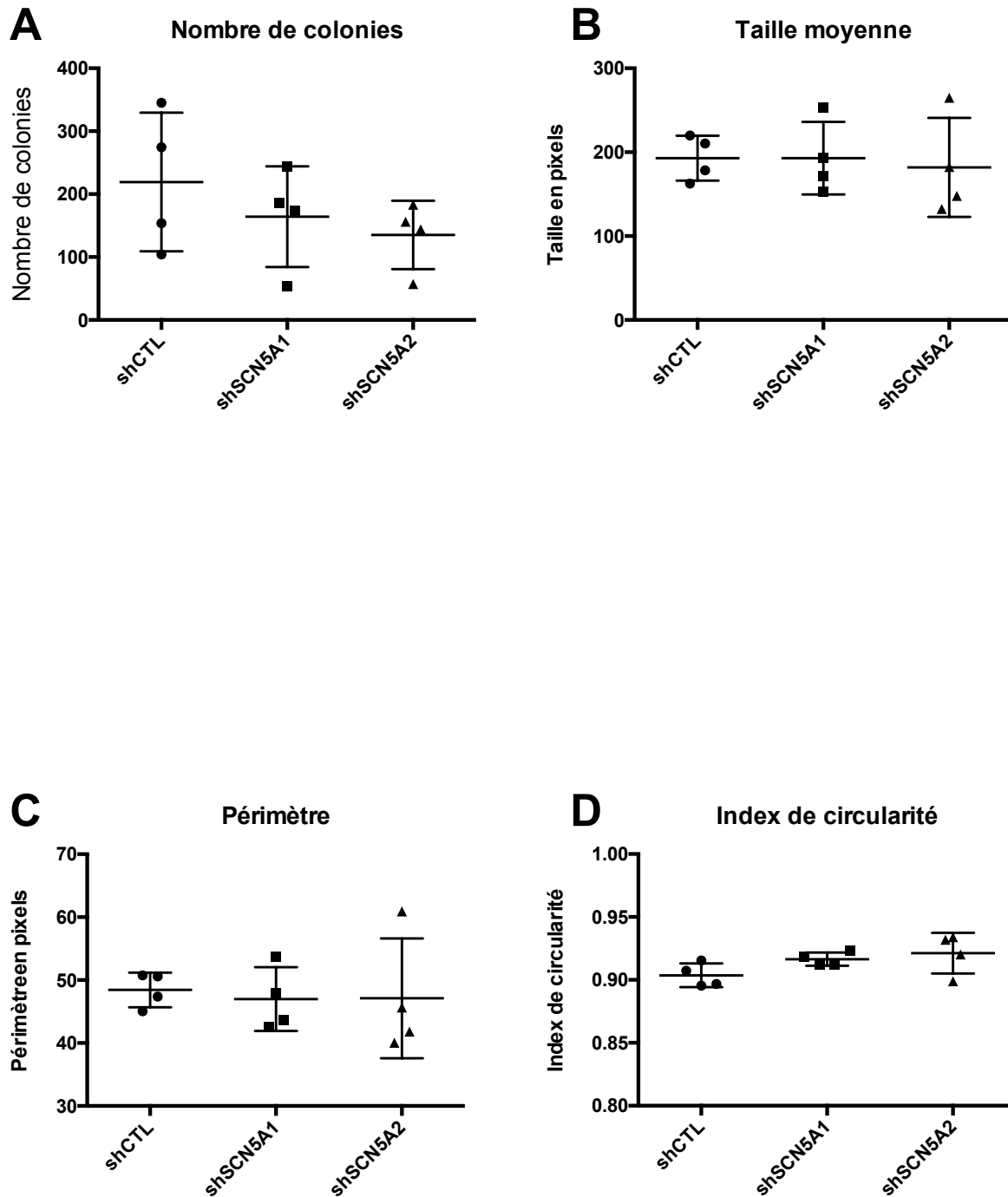


Figure 36 Croissance indépendante de l'ancrage des cellules MDA-MB-231 en fonction de l'expression du canal sodique voltage-dépendant. Comparaison du nombre (A), de la taille (B), du périmètre (C) et de l'index de circularité (D) des colonies générées en soft agar pour les cellules MDA-MB-231 shCTL, shSCN5A1 et shSCN5A2.

Nous avons ensuite réalisé des cultures en soft agar avec incorporation de la lidocaïne dans le milieu.

Le nombre de colonies était diminué sous lidocaïne, pour la lignée shCTL (ANOVA : F (4,15) =83,48 ; $p < 0,0001$), la lignée shSCN5A1 (ANOVA : F (4,15) =11,19 ; $p = 0,0002$) et shSCNA52

(ANOVA : $F(4,15) = 8,028$; $p = 0,0011$). Les tests de Dunnett montraient une différence significative à partir de 0,1mM pour la lignée shCTL (-25,81%) et shSCNA5A1 (-48,55%) et à partir de 1mM pour la lignée shSCNA5A2 (-98,20%), la dispersion étant grande à la concentration de 0,1mM pour cette lignée (-36,6% $\pm$ 19,9%).

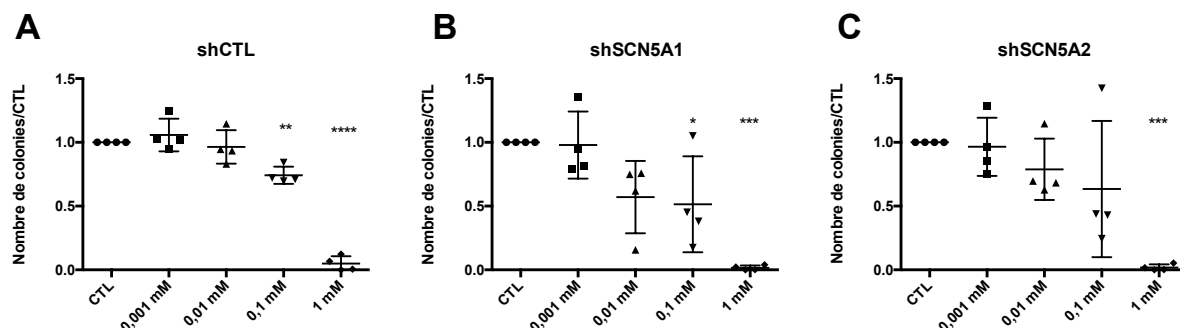


Figure 37 Sensibilité à lidocaïne des cellules MDA-MB-231 en test de soft agar en fonction de l'expression du canal sodique voltage-dépendant en termes de nombre de colonies. Variabilité du nombre de colonies des lignées cellulaires MDA-MB-231 shCTL (A), shSCNA5A1 (B) et shSCNA5A2 (C) exposées à des doses croissantes de lidocaïne par rapport à la condition contrôle.

La lidocaïne diminue également la taille des colonies pour les 3 lignées : shCTL (ANOVA : $F(4,15) = 24,76$; $p < 0,0001$), pour la lignée shSCNA5A1 (ANOVA : $F(4,15) = 8,093$; $p = 0,0011$) et shSCNA2 (ANOVA : $F(4,15) = 7,476$; $p = 0,0016$) avec une différence significative au test de Dunnett à la concentration de 1mM.

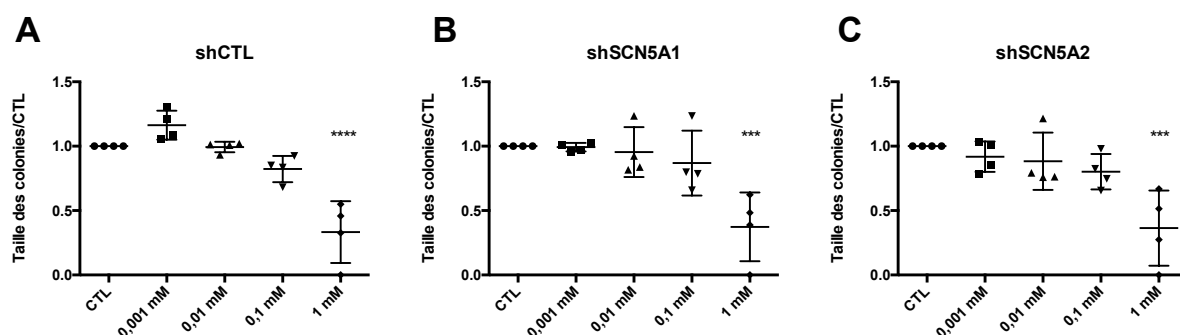


Figure 38 Sensibilité à lidocaïne des cellules MDA-MB-231 en test de soft agar en fonction de l'expression du canal sodique voltage-dépendant en termes de taille de colonies. Variabilité de la taille des colonies des lignées cellulaires MDA-MB-231 shCTL (A), shSCNA5A1 (B) et shSCNA5A2 (C) soumises à des concentrations croissantes de lidocaïne par rapport à la condition contrôle.

Le périmètre des colonies est également diminué de façon dose-dépendante, en revanche le test d'ANOVA n'est significatif que pour la lignée shCTL (ANOVA : $F(4,15) = 7,360$; $p = 0,0017$), versus pour la lignée shSCNA5A1 (ANOVA : $F(4,15) = 1,857$; $p = 0,1706$) et shSCNA2 (ANOVA : $F(4,15) = 1,639$; $p = 0,2162$). Ceci est dû à la grande dispersion des résultats. Il existe une différence significative au test de Dunnett à la concentration de 1mM pour la lignée contrôle.

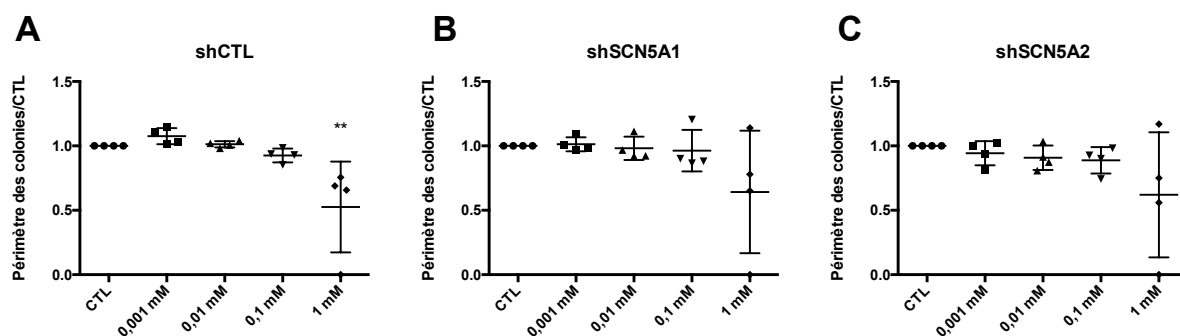


Figure 39 Sensibilité à lidocaïne des cellules MDA-MB-231 en test de soft agar en fonction de l'expression du canal sodique voltage-dépendant en termes de périmètre des colonies. Variabilité du périmètre des colonies des lignées cellulaires MDA-MB-231 shCTL (A), shSCN5A1 (B) et shSCN5A2 (C) soumises à des concentrations croissantes de lidocaïne par rapport à la condition contrôle.

L'index de circularité des colonies est également altéré de façon dose-dépendante, les tests d'ANOVA montrent des différences significatives pour la lignée shCTL (ANOVA : $F(4,15) = 24,76$; $p < 0,0001$), pour la lignée shSCN5A1 (ANOVA : $F(4,15) = 8,093$; $p = 0,0011$) et shSCN5A2 (ANOVA : $F(4,15) = 7,476$; $p = 0,0016$). Ceci est dû à la grande dispersion des résultats. Il existe une différence significative au test de Dunnett à la concentration de 1mM pour la lignée contrôle.

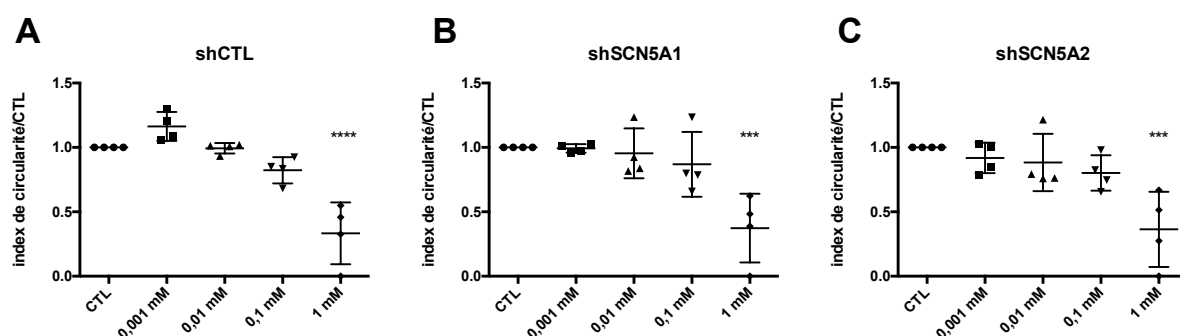


Figure 40 Sensibilité à lidocaïne des cellules MDA-MB-231 en test de soft agar en fonction de l'expression du canal sodique voltage-dépendant en termes d'index de circularité. Variabilité de la circularité des colonies des lignées cellulaires MDA-MB-231 shCTL (A), shSCN5A1 (B) et shSCN5A2 (C) soumises à des concentrations croissantes de lidocaïne par rapport à la condition contrôle.

Approche par gène candidat : conclusion

Par nos tests de viabilité en MTT et de clonogénicité en milieu 2D et 3D en soft agar, nous n'avons pas trouvé de différences entre les lignées shCTL, shSCN5A1 et shSCN5A2 exposées à des doses croissantes de lidocaïne même si la croissance des cellules semble diminuer lorsque le canal sodique voltage dépendant n'est plus exprimé. Le canal sodique voltage-dépendant n'est pas la cible de la lidocaïne dans les processus de viabilité, croissance dépendante ou non

à l'ancrage. Ces résultats sont toutefois à tempérer par le fait que l'on a retrouvé une réexpression minime du canal sodique voltage-dépendant dans nos cellules MDA-MB-231. Nos tests de clonogénicité en 2D et 3D se faisant sur plusieurs jours et l'analyse du RNAseq montrant une augmentation du transcrit du gène SCN5A après exposition à la lidocaïne, il n'est pas exclu que le canal soit ré-exprimé dans nos clones.

Il serait intéressant d'étudier le lien entre la lidocaïne et les canaux sodiques voltage dépendants dans la migration et l'invasion des cellules cancéreuses. En effet, une étude a récemment montré une diminution de la migration des cellules MDA-MB-231 traitées par de faibles doses de lidocaïne (162).

Discussion et perspectives

Nous avons montré que la lidocaïne possédait des propriétés antitumorales *in vitro* et *in vivo*, les mécanismes pouvant expliquer ces résultats sont multiples.

Notre étude a tout d'abord montré que la lidocaïne avait un effet inhibiteur direct sur deux mécanismes cancéreux : la prolifération et la migration cellulaires. Nous avons choisi de comparer 3 lignées cellulaires mammaires malignes à une lignée bénigne. Ces lignées présentent différentes caractéristiques des cancers du sein (ER+ ou ER-, HER2+) qui déterminent des sous-types dont le pronostic est différent. Les résultats semblent montrer que la lidocaïne a un effet inhibiteur quel que soit les caractéristiques de ces lignées. Nous avons montré que, *in vitro*, la migration cellulaire de deux de ces lignées malignes notamment une lignée à fort potentiel invasif, les cellules MDA-MB-231, était inhibée par rapport à la lignée contrôle. D'autres études ont trouvé des résultats comparables. En effet, nos résultats concernant la prolifération cellulaire sont superposables à ceux de Chang *et al.* qui avaient comparé les effets de la lidocaïne entre des cellules MCF-10A et MCF-7 (323), de Jiang *et al.* qui avaient également étudié la viabilité des cellules MDA-MB-231 à 24h à des doses de lidocaïne au-dessus de 1mM (289) et ont été confirmés par une études postérieure de Li *et al.* sur cellules MDA-MB-231 et MCF-7 (341). Toutes ces études ont montré qu'il fallait des concentrations >1mM de lidocaïne pour altérer la viabilité des cellules tumorales. Pour rappel, Piegeler *et al.* retrouvaient également un effet inhibiteur de la lidocaïne sur la prolifération et la migration de cellules de cancer du poumon (156), mais à des concentrations plus faibles de l'ordre de 0,1mM pour la prolifération et 0,001mM pour la migration. Un effet sur la viabilité à ces concentrations sur les lignées de cellules de cancer du sein n'était obtenu qu'en synergie avec le cisplatine (309,342). En ce qui concerne la migration des cellules, la concentration utilisée dans notre étude était de 0,1mM comme dans l'étude postérieure de d'Agostino *et al.* étudiant la migration des cellules MDA-MB-231 par test de blessure (*Wound Healing Assay*) et en temps réel par test chimiotactique (162). En revanche, à cette même concentration, Li *et al.* ne retrouvait pas d'effet inhibiteur de la lidocaïne sur la migration de cellules MDA-MB-231 et MCF-7 par tests de blessure (341), toutefois la formule de lidocaïne utilisée dans cet article n'était pas précisée.

Étant donné que la lignée MDA-MB-231, triple-négative, était la plus sensible à la lidocaïne, nous nous sommes focalisés sur cette lignée pour l'étude *in vivo* puis mécanistique. Les concentrations minimales à laquelle nous observions une inhibition de la migration ou de la croissance indépendante de l'ancrage étaient de 0,1mM *in vitro*. Appliquées en clinique, elles correspondraient à des doses toxiques systémiques chez les patientes. En effet, les cas de cardiotoxicité ont été observés pour des concentrations plasmatiques de 21 µg/mL (228) soit

environ 0,089mM (Lidocaïne PM=234,33). Par ailleurs, les concentrations plasmatiques rencontrées en clinique en cas d'utilisation de lidocaïne IV sont de l'ordre de 1,4 à 6 µg/mL, soit maximum 0,0256 mM. En revanche, la concentration de 0,1mM peut tout à fait être atteinte en cas d'instillation directe au niveau du site opératoire. En effet, l'injection directe de lidocaïne à la concentration de 15mg/mL peut être comparable à une exposition expérimentale de 64 mM. Il était donc important d'avoir un modèle préclinique démontrant l'effet antitumoral de la lidocaïne pour une preuve de concept. La lidocaïne ayant donc également montré un effet dans notre modèle murin, il fallait mettre en évidence les mécanismes d'action de la lidocaïne. Nous avons choisi une concentration de lidocaïne suffisante pour avoir des effets sur la croissance à long terme et indépendante de l'ancrage mais à un temps ne compromettant pas la viabilité. A notre connaissance, cette étude est la première qui étudie à la fois la modulation du transcriptome et du métabolome par la lidocaïne. Disposer de données transcriptomiques était une étape importante car plusieurs études ont montré une déméthylation de l'ADN dans les cellules de cancer du sein par la lidocaïne (309,343,344). Nos résultats ne sont pas similaires aux quelques données présentes dans la littérature. Mais nos données transcriptomiques vont dans le même sens que celles de métabolomique, à savoir un effet sur les membranes lipidiques et sur la voie Akt/mTOR. Les analyses par Western Blot confirment l'effet inhibiteur sur la voie Akt/mTOR et également une augmentation de l'apoptose par l'activation de la voie des caspases. De même, l'analyse par FACS montre bien une modification de la composition lipidique des membranes cellulaires par la lidocaïne et cette voie mérite d'être explorée de manière plus approfondie.

Nos données de métabolomique confortent l'idée que la lidocaïne ait un effet sur le métabolisme cellulaire. Jose *et al.* avaient ainsi montré que l'effet antiprolifératif des AL (ropivacaïne et lévobupivacaïne) était corrélé au profil métabolique des cellules cancéreuses, celles ayant un métabolisme mitochondrial moins élevé et utilisant préférentiellement la glycolyse pour la production d'ATP étant plus sensibles. Cette équipe suggérait que cette action passait par l'inhibition de la phosphorylation oxydative par blocage de la chaîne respiratoire et déplétion du contenu mitochondrial (157). Dans nos expériences de viabilité mesurant l'activité mitochondriale (complexe II pour le MTT et complexe V pour le Cell Titer Glo), nous mettons en évidence de manière indirecte un découplage mitochondrial des cellules MDA-MB-231 par la lidocaïne. Enfin la mise en évidence de la modulation de différents métabolites dans les cellules exposées à la lidocaïne confirme la perturbation du métabolisme des cellules cancéreuses par cet AL.

Nous n'avons pas pu confirmer de façon formelle une dérégulation de l'expression protéique des gènes dont la transcription était modulée par la lidocaïne mais la diffusion dans GEO des données de notre RNA-seq permettra à d'autres chercheurs d'explorer les différentes voies modulées par la lidocaïne car à notre connaissance ce travail transcriptomique est le premier impliquant lidocaïne et cellules cancéreuses du sein. Les explorations lipidomiques que nous avons pu réaliser ont montré une modification de la composition lipidiques de la membrane cellulaire de la lignée MDA-MB-231. Ce travail sera à poursuivre étant donné les données de la littérature concernant les interactions des radeaux lipidiques avec les anesthésiques locaux et l'implication des radeaux lipidiques dans les processus tumoraux (345,346).

La principale cible pharmacologique de la lidocaïne est le canal sodique-voltage dépendant. Étant impliqué dans les processus pro tumoraux et étant surexprimé dans les cellules MDA-MB-231 (334,338,347), il était important de voir si ce canal était bien la cible de la lidocaïne dans l'inhibition de la viabilité et croissance, d'autant plus que des travaux récents ont confirmé qu'il était possible de bloquer les variants aNaV1.5 et nNaV1.5 (présents dans les cellules cancéreuses) de ce canal par la lidocaïne ou la lévobupivacaïne (339). Le *silencing* de ce canal n'a pas entraîné une perte de sensibilité des cellules à la lidocaïne démontrant ainsi que ce canal n'est pas impliqué dans les effets antiprolifératifs de la lidocaïne. Il serait en revanche intéressant d'étudier les effets de la lidocaïne sur ce canal dans l'inhibition de la migration. En effet, dans deux revues de la littérature, Brackenbury et Mao *et al.* rappelaient que les cellules cancéreuses à fort potentiel migratoire et invasif surexprimaient un variant embryonnaire ou néonatal de la sous-unité α des canaux sodiques voltage-dépendants et que le blocage de ces canaux par un inhibiteur comme la tétrodontoxine diminuait les propriétés métastatiques de certains cancers, notamment mammaires (334,347–349). Yoon *et al.* avaient quant à eux mis en évidence un effet inhibiteur de la lidocaïne sur la mobilité cellulaire de cellules MCF-10A et MDA-MB-436 (350). Ce phénomène serait lié à l'inhibition des protrusions membranaires à tubuline appelés microtentacules et l'altération du cytosquelette par les AL. D'Agostino *et al.* ont aussi confirmé l'inhibition de la migration des cellules MDA-MB-231 par la lidocaïne par interférence avec le récepteur aux chimiokines CXCR4 et ainsi perturbation du remodelage de l'actine (162). Ainsi l'hypothèse d'une implication du canal sodique voltage-dépendant reste une voie d'exploration intéressante dans les processus de migration et d'invasion.

Ces résultats expérimentaux et la revue de la littérature qui les a précédé (161) nous font envisager un intérêt antitumoral de la lidocaïne en période périopératoire pour chirurgie

carcinologique du sein que ça soit en intraveineux ou en infiltration du site opératoire. C'est pourquoi les résultats des études prospectives randomisées référencées dans le tableau 1 sont très attendus. Mais les données actuelles de la recherche fondamentale et clinique autour des effets potentiels de l'anesthésie dans la progression tumorale vont dans le sens d'un renforcement du rôle de l'anesthésiste-réanimateur dans la période périopératoire. En France, l'arrêté du 16 février 2018 modifiant l'arrêté du 29 juin 1992 concernant les disciplines médicales du Conseil national des universités a étendu l'anesthésiologie-réanimation à la « médecine périopératoire ». Le développement de cette recherche ouvre la voie vers une surspécialité en onco-anesthésie avec pour objectif principal l'amélioration de la survie dans récurrence après chirurgie carcinologique. Si les effets directs des anesthésiques locaux restent à prouver en clinique, leur utilisation en période périopératoire participe à la réhabilitation améliorée après chirurgie. Appliquée à l'oncologie, cette amélioration des pratiques participe à l'introduction rapide de la chimiothérapie après exérèse tumorale. Ce concept appelé RIOT pour Return to intended oncologic treatment (351,352) semble être l'avenir de la prise en charge périopératoire des patients atteints d'une tumeur solide.

Annexes

Matériels et méthodes

Culture cellulaire

Les lignées cellulaires

Il existe de nombreuses lignées cellulaires du cancer du sein. Nous avons choisi 3 lignées reflétant largement les caractéristiques des cellules cancéreuses *in vivo* (MCF-7, MDA-MB-231, SKBr3) (353) et une lignée issue de tissu mammaire non-tumoral (MCF-10A).

Les lignées MCF-7, MDA-MB-231, SKBr3 et MCF-10A ont été fournies par le service de culture cellulaire de l'Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC) à Illkirch-Graffenstaden, France.

La lignée MCF-10A (Michigan Cancer Foundation) est issue de cellules épithéliales immortalisées, non-transformées, dérivées de tissus mammaires fibrokystiques humains (354).

La lignée MCF-7 (Michigan Cancer Foundation) provient de l'effusion pleurale d'un adénocarcinome mammaire humain chez une patiente de 69 ans qui avait subi une mastectomie totale. Elle est caractérisée par la présence de récepteurs aux estrogènes (cellule ER +) (355).

La lignée SKBr3 (Sloan-Kettering HER2 3+ Breast Cancer), isolée en 1970, est également issue de l'effusion pleurale d'un adénocarcinome mammaire humain d'une patiente de 43 ans (356), elle est caractérisée par la surexpression de Her-2/neu et a un locus ERBB2 amplifié. La surexpression de Her-2/neu *in vivo* est associée à une régulation négative d'ER et une cassure des jonctions intercellulaires.

La lignée MDA-MB-231 (M.D. Anderson - metastatic breast) est également issue de l'effusion pleurale d'un adénocarcinome mammaire humain d'une patiente de 51 ans (357), elle est caractérisée par l'absence de récepteurs aux estrogènes (cellule ER-).

Milieux de culture cellulaire

Les cellules sont cultivées dans un milieu de culture qui leur est propre, généralement de type DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's medium*) contenant des ions, des acides aminés notamment de la L-glutamine, des vitamines, ainsi que du glucose, et du NaHCO₃ nécessaires à leur prolifération ou de type RPMI (*Roswell Park Memorial Institute medium*) contenant une grande quantité de phosphate. Du sérum de veau fœtal (SVF) fournit les facteurs de croissance et les cytokines indispensables à la prolifération des cellules. Le pH est contrôlé par le tampon bicarbonate ($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{CO}_3 \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{CO}_3^-$) avec le maintien du taux de CO₂ de l'atmosphère de culture à 5%. Du rouge de phénol est incorporé dans le milieu DMEM et sert d'indicateur de pH : rouge à pH physiologique (pH 7,4), il devient jaune en cas d'acidose

et rose violacé en cas d'alcalose. L'osmolarité du DMEM est comprise entre 271 et 287 mOsm/kg.

Chaque lignée cellulaire a un milieu de culture qui lui est propre, en présence :

- de DMEM, de 10% de SVF et de 40 µg/ml de gentamycine pour les cellules MCF-7
- de RPMI, de 10% de SVF, d'insuline et de 40 µg/ml de gentamycine pour les cellules MDA-MB-231
- de DMEM contenant 1g/L de glucose, 10% de SVF et de 40 µg/ml de gentamycine pour les cellules SKBr3
- de DMEM/HAM-F12 (3 :1), 10% FCS 407, 20 µg/mL d'adénine, 5 µg/mL de transferrine, 1,5 ng/mL de triiodothyronine, d'insuline et de gentamycine pour les cellules MCF)10A.

PBS : Phosphate-Buffered Saline

Le milieu PBS sans calcium Ca^{2+} , ni magnésium Mg^{2+} (Cambrex, USA) est une solution saline qui permet de laver les cellules de leur milieu de culture afin d'éliminer le reste de SVF capable d'inhiber la trypsine. Il est composé de sels inorganiques : 0,2 g/L de KCl, 0,2 g/L de KH_2PO_4 , 8g/L de NaCl, 2,16 g/L de $(\text{NaHPO}_4 + 7 \text{H}_2\text{O})$.

Le pH de cette solution est compris entre 7,2 et 7,6 et son osmolarité entre 257 et 302 mOsm/kg.

Trypsine

Cette solution au 1:250 (Cambrex, USA) permet de mettre en suspension les cellules adhérentes, par protéolyse des protéines d'adhésion cellulaire à la matrice extracellulaire. Sa composition est : 0,5g/L de Trypsine d'origine animale, 1µg/L de Glucose, 0,4 g/L de KCl, 8g/L de NaCl, 0,58g/L de NaHCO_3 .

Supports utilisés en culture cellulaire

Les cellules sontensemencées dans des flacons stériles de culture de 250 mL (T75), dont la surface, en polystyrène, est traitée physiquement pour permettre l'adhésion cellulaire. Ces flacons possèdent un bouchon qui est légèrement desserré afin d'assurer les échanges gazeux.

Protocoles utilisés en culture cellulaire

Les cellules sont cultivées dans un incubateur à 37°C, sous atmosphère à 5% de CO_2 , dans des flacons stériles de culture cellulaire contenant 15 mL de leur milieu de culture.

a) Entretien et passage des cellules

Afin d'assurer le renouvellement des nutriments apportés aux cellules et maintenir leur activité de croissance, on effectue un « passage » de celles-ci lorsqu'elles sont confluentes.

La trypsination consiste à dissocier les cellules les unes des autres et à les décoller de leur support de culture, à l'aide d'une enzyme, la trypsine. Cette protéase va rompre les adhérences entre les cellules et leur support mettant ainsi les cellules en suspension. Le SVF inhibant l'activité enzymatique de la trypsine, il faut avant trypsination aspirer le milieu de culture du flacon et rincer la boîte avec du PBS ou du milieu de culture frais sans SVF. 10mL de trypsine-EDTA sont ensuite versés dans le flacon de culture et permettent de recouvrir tout le tapis cellulaire. Le temps d'attente, dans un incubateur à 37°C, pour que toutes les cellules soient mises en suspension varie en fonction de la lignée cellulaire. Les cellules sont ensuite transvasées dans une solution de culture normale contenant du SVF, la dilution finale varie en fonction de la vitesse de croissance de chaque lignée cellulaire.

b) Cryogénisation et décryogénisation des cellules en culture

Les lignées cellulaires sont stockées sous forme cryogénisées : les cellules sont trypsinées puis récupérées dans du milieu de culture normal et comptées. Le surnageant est éliminé par centrifugation (5 min à 700 x g) et remplacé par le milieu de cryopréservation (10% de diméthyl sulfoxyde (DMSO), 30% de SVF et 60% de milieu de culture normal). Les suspensions cellulaires sont ensuite aliquotées dans des cryotubes. Leur congélation est lente (d'abord au congélateur -80°C puis dans l'azote liquide à -196°C) afin d'éviter la formation de cristaux.

La décryogénisation des cellules doit être rapide : le cryotube à décongeler est placé dans un bain-marie chauffé à 37°C. La suspension cellulaire est ensuite transférée dans un flacon contenant du milieu de culture.

c) Comptage des cellules

Le comptage est réalisé au microscope, à l'aide d'un hématimètre (lame de comptage) : la cellule de Neubauer (Poly Labo Paul Block & Cie, France) dont le quadrillage permet d'évaluer la concentration cellulaire.

$\text{AIRE} = 1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} = 1 \text{ mm}^2$ et $\text{Volume} = 1 \text{ mm}^2 \times 0,1 \text{ mm} = 0,1 \text{ mm}^3 = 1 \times 10^{-4} \text{ mL}$

Ainsi : concentration cellulaire = nombre de cellules comptées x 10 000

Évaluation de la viabilité et prolifération cellulaire

Test colorimétrique au MTT

Le test colorimétrique au MTT est une technique quantitative qui a été élaboré par Mosmann en 1983 (258). Il permet d'évaluer la viabilité et la prolifération cellulaires. Il est basé sur la

transformation par les cellules du sel de tétrazolium MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium) en cristaux bleus de formazan par la succinate déshydrogénase au sein de leurs mitochondries. Après la solubilisation des cristaux par DMSO, la coloration ainsi formée est mesurée en spectrophotométrie à une longueur d'onde de 595 nm. On observe ainsi le possible effet sur la viabilité et la prolifération des cellules exposées ou non à un anesthésique local.

Les cellules de la lignée MDA-MB)231 sontensemencées en plaques 96 puits à la densité de 1500 cellules par puits dans leur milieu de culture approprié. La lidocaïne (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO) est incorporée au milieu de culture approprié avec SVF au bout de 24 heures aux concentrations finales croissantes. Une condition contrôle avec le même volume de solvant seul.

Pour chaque condition étudiée, du MTT (5mg/mL) (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO) est ajouté dans chaque puits pour une concentration finale de 0,05 mg/mL au bout du temps d'exposition voulu. Après 1h d'incubation à 37°C en atmosphère humide, le milieu est aspiré et les cristaux de formazan sont dissous dans du DMSO et transvasés dans une plaque 96 puits MICROTEST. L'absorbance est mesurée à 550 nm, par un lecteur de plaques ELx808 Absorbance Microplate Reader (BioTek instruments) avec le logiciel Gen5 Data Analysis Software 1. 06. Chaque condition est réalisée en triplicata et la manipulation est reproduite 3 fois de manière indépendante.

Test de viabilité Cell Titer Glo ®

Le test Cell Titer-Glo® (Promega, Madison, WI, USA) est un réactif permettant de déterminer la viabilité cellulaire grâce à la quantification de l'ATP cellulaire témoin de l'activité métabolique (358). La lyse des cellules permet de libérer l'ATP qui est ensuite exploité pour une réaction luciférine/luciférase. Le signal luminescent généré est corrélé à la viabilité cellulaire.

Les cellules de la lignée MDA-MB-231 sontensemencées en plaques 96 puits opaques à la lumière à la densité de 1500 cellules par puits dans leur milieu de culture approprié. La lidocaïne (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO) est incorporée au milieu de culture approprié avec SVF au bout de 24 heures aux concentrations finales croissantes pour un volume final de 100 µl. Une condition contrôle avec le même volume de solvant seul. Un puits avec du milieu seul est également prévu pour le faire le blanc. Une fois le temps d'exposition atteint, le réactif Cell Titer-Glo est ajouté au puits au volume de 100 µL afin de lyser les cellules. La plaque est mise sur l'agitateur pendant 2 min puis incubée à température ambiante pendant 10 min à l'issue

desquelles la luminescence est lue. Chaque condition est réalisée en triplicata et la manipulation est reproduite 3 fois de manière indépendante.

Test de viabilité au cristal violet

Le test de cytotoxicité des cellules au cristal violet (CV) est l'une des méthodes couramment utilisées pour détecter la viabilité cellulaire ou la cytotoxicité des médicaments.

Le cristal violet est un colorant triarylméthane qui peut se lier à des molécules de type ribose telles que l'ADN dans les noyaux. Normalement, les cellules adhérentes mortes se détacheront des plaques de culture cellulaire et seront retirées de la population des cellules viables pendant les étapes de lavage. La coloration CV peut être utilisée pour quantifier l'ADN total de la population restante et ainsi déterminer la viabilité cellulaire. La coloration CV est directement proportionnelle à la biomasse cellulaire et peut être mesurée à 570 nm.

Les cellules de la lignée MDA-MB-231 sontensemencées en plaques 96 puits avec 1500 cellules par puits dans leur milieu de culture approprié. La lidocaïne (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO) est incorporée au milieu de culture approprié avec SVF au bout de 24 heures aux concentrations finales croissantes pour un volume pour un volume final de 100 μ L. Une condition contrôle avec le même volume de solvant seul.

Une fois le temps d'exposition atteint, le milieu est aspiré et le puits est lavé 2 fois au PBS. Les cellules qui ont adhéré sont ensuite fixées à l'éthanol absolu pendant 10 minutes et colorées au cristal violet à 0,1%. Après un nouveau lavage à l'eau puis séchage pendant 24h, on ajoute 100 μ L SDS 1% (dodécylsulfate de sodium) pour dissoudre le cristal violet et on met à agiter pendant 20 minutes. L'absorbance est mesurée à 570 nm par un lecteur de plaques avec le logiciel Gen5 Data Analysis Software 1.06. Chaque condition est réalisée en triplicata et la manipulation est reproduite 3 fois de manière indépendante.

Test de clonogénicité

Le test de clonogénicité mesure la capacité des cellules à proliférer et à former des clones, après forte dilution dans du milieu de culture. Ce test a été employé sur des cellules exposées la lidocaïne ou à l'excipient seul. Seules les cellules ayant survécu au traitement gardent la capacité à former des clones en culture.

Après avoir poussé dans des T75, les cellules sont décollées, comptées et réensemencées dans des boîtes 6 puits à la concentration de 200 cellules dans 2 mL de milieu complet et de lidocaïne à doses croissante (de 0,001mM à 10 mM) ou au contrôle. Les boîtes de culture sont incubées pendant 7 jours afin de permettre le développement des clones. Les colonies sont ensuite exposées au MTT pendant 30 minutes, les boîtes sont photographiées pour compter les colonies

à l'aide d'une macro Fiji puis le MTT est dissous au DMSO et l'intensité lue au spectrophotomètre dans des plaques 96 puits. Le test est réalisé de manière indépendante 3 fois, chaque condition est réalisée en triple.

Test de soft agar

Le test de soft agar est un test clonogénique qui mesure la capacité de croissance indépendante de l'ancrage, c'est-à-dire la propriété des cellules tumorales à pousser dans un milieu semi-solide et donc sans adhérer à une surface. Nous avons modifié le protocole décrit dans la littérature (285) afin d'incorporer de la lidocaïne dans le milieu.

La lidocaïne est incorporée à du milieu de culture cellulaire avec SVF + de l'UltraPure Low Melting Point Agarose à une concentration finale de 0.6%. 800µl de ce mélange est coulé dans une boîte de Pétri 35mm et est laissé à température ambiante pour se solidifier. Un mélange de 5000 cellules dans du milieu de culture + de l'UltraPure Low Melting Point Agarose à une concentration finale de 0.3% +/- lidocaïne est ensuite coulé dans la boîte qui est mise à incuber pendant 19 jours à l'issue desquels du MTT à la concentration finale de 1mg/mL colore les colonies qui sont ensuite photographiées et comptée par le logiciel Fiji.

Test d'adhésion cellulaire

Pour le test d'adhésion cellulaire, 30000 cellules dans 200 µL de milieu + lidocaïne sont incorporés dans un puits sur plaque 96 puits et on met à incuber à 37°C pendant 1h30. Le milieu est ensuite aspiré et le puits est lavé 2 fois au PBS. Les cellules qui ont adhéré sont ensuite fixées à l'éthanol absolu pendant 10 minutes et colorées au cristal violet à 0,1%. Après un nouveau lavage à l'eau puis séchage pendant 24h, on ajoute 100 µL SDS 1% (dodécylsulfate de sodium) pour dissoudre le cristal violet et on met à agiter pendant 20 minutes. L'absorbance est mesurée à 600 nm par un lecteur de plaques avec le logiciel Gen5 Data Analysis Software 1.06. Chaque condition est réalisée en triplicata et la manipulation est reproduite 3 fois de manière indépendante.

Évaluation du profil métabolomique par analyse RMN HRMAS

Préparation des échantillons

Les cellules MDA-MB-231 sontensemencées dans des flacons stériles de culture de 750 mL, dont la surface de 175 cm², en polystyrène, est traitée physiquement pour permettre l'adhésion cellulaire pour amplification. Lorsque les cellules arrivaient à confluence, elles étaient décollées de la flasque de culture par exposition à la trypsine diluée puis comptées par compteur automatisé de cellules haute performance Countess II FL pour être réensemencées dans de

nouveaux flacons stériles de 175 cm² (10⁷ cellules dans 20 mL de milieu) et remises dans l'incubateur pendant 24h.

A J+1, le milieu est aspiré et changé pour du milieu avec lidocaïne, pour une concentration finale de 0,5mM ou l'équivalent en volume d'eau comme contrôle (n=4 dans le groupe contrôle et n=5 dans le groupe lidocaïne). Cette concentration a été choisie car elle ne semble pas compromettre la viabilité des cellules d'après les tests de MTT, CV et Cell Titer Glo. Après 4h d'incubation à 37°C en atmosphère humide, le milieu est aspiré, la flasque est lavée au PBS puis les cellules sont décollées par exposition à 5 mL de trypsine diluée pendant 3 min d'incubation à 37°C en atmosphère humide. La réaction est ensuite stoppée par ajout de 5 mL de milieu avec sérum et la solution est aspirée pour être centrifugée pendant 5 minutes à la vitesse de 1200 tours par minute. Le surnageant est ensuite aspiré et jeté. Le culot cellulaire est ensuite homogénéisé et 20µL de ce culot sont prélevés et transférés dans un insert. Cet insert est déposé dans un tube d'archivage pour centrifugation manuelle rapide afin de chasser les bulles d'air puis le tube est déposé dans de l'azote liquide pour congélation rapide et stocké dans un congélateur à -80°C avant transfert sur carboglace au plateau technique de RMN où il est stocké dans un congélateur à -20°C après ajout de 5µL de D₂O pour analyse en RMN.

Équipement et conditions expérimentales

Dans le cadre de ce travail de recherche, l'analyse métabolomique par RMN HRMAS a été réalisée à l'aide d'un spectromètre Bruker Avance III à 500 MHz. Ce spectromètre est installé depuis 2008 dans le service d'anatomie pathologique de l'Hôpital Universitaire de Hautepierre à Strasbourg. Cet équipement est fourni avec une sonde de 4 mm à triple résonance (¹³C, ¹H, ³¹P) avec un canal deutérium (²H) utilisé comme signal de verrouillage «lock» nécessaire pour compenser la dérive du champ magnétique principal. Le spectromètre est équipé d'une unité de refroidissement (Bruker Cooling Unit ; BCU) nécessaire pour limiter la dégradation de l'échantillon biologique lors de l'analyse. De plus, un flux d'air asséché permet de maintenir la température de l'échantillon constante. Lors de l'enregistrement du signal RMN, la vitesse de rotation de l'échantillon est fixée à 3502 Hz de manière à maintenir les bandes de rotation en dehors de la fenêtre spectrale RMN.

Séquences d'impulsions utilisées

Séquences RMN 1D

Les séquences RMN les plus utilisées en vue d'une analyse systématique et quantitative des métabolites sont les séquences d'acquisition 1D ¹H dites « one-pulse ». Les spectres obtenus reflètent la composition des métabolites et leur abondance relative dans l'échantillon. La forte

teneur en eau, caractéristique des systèmes biologiques, représente une source de difficulté dans l'étude du métabolome par techniques RMN. En effet, alors que les métabolites sont en concentrations micro-molaires, l'eau dans les tissus est présente à une concentration supérieure à 10 moles par litre. Réduire le signal de l'eau est donc équivalent à une augmentation de la sensibilité de détection des métabolites. Dans les expériences RMN HRMAS, la technique de pré saturation est utilisée pour l'élimination du signal de l'eau. La plus simple des techniques de pré saturation est la suppression. Cette séquence permet d'obtenir une saturation efficace de la résonance de l'eau.

La séquence d'impulsion CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill) a été appliquée à l'ensemble de nos échantillons. Cette séquence permet une acquisition sélective des métabolites de faible poids moléculaire dotés d'une forte mobilité générant des signaux fins. La séquence CPMG est largement utilisée en RMN HRMAS pour établir les profils métaboliques tissulaires. Toutefois, elle a l'inconvénient de ne pas être strictement quantitative. Le délai τ entre les impulsions à 180° a été synchronisé avec la rotation de l'échantillon et fixé à $285 \mu\text{s}$ ($\tau = 1 / \omega = 1 / 3502 = 285 \mu\text{s}$) afin d'éviter les pertes de signal dues à des inhomogénéités du champ de radio fréquence B1 (359,360). Il est ainsi possible d'utiliser ce délai inter-impulsion et de le faire varier en fonction des signaux larges à éliminer, la séquence CPMG devient alors un outil intéressant comme filtre macromoléculaire. Plus le délai est long et plus le filtre est puissant pour éliminer les signaux des molécules les plus grosses. Le nombre d'impulsions à 180° est fixé à 328 donnant à la séquence d'impulsions CPMG une durée totale (TE, Time Écho) de 93 ms. Cette valeur de τ choisie ainsi que le nombre des boucles (328), convient aux types d'échantillons analysés dans ce mémoire. Pour chaque expérience CPMG, les paramètres suivants ont été utilisés : largeur de balayage, 14,2 ppm; nombre de points: 32k; délai de relaxation: 2 s; temps d'acquisition: 2,3 s. Un total de 1024 FID (free induction decay) est acquis correspondant à un temps d'acquisition pour chaque spectre de 1h 16 min. Les déplacements chimiques des spectres sont référencés par rapport à celui du lactate dont le déplacement chimique est à 1,33 ppm.

Séquence RMN 2D

Les acquisitions RMN à deux dimensions (361) ont été utilisées pour faciliter l'attribution de signaux de métabolites difficilement identifiés sur les spectres 1D, dans la plupart des cas en raison des phénomènes de recouvrement. Les séquences d'impulsions 2D utilisées en HRMAS sont les mêmes que celles réalisées en RMN du liquide. Dans le cadre de ce mémoire, on a utilisé une séquence 2D de corrélations hétéronucléaires (^1H - ^{13}C) HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) développée au début des années 1980. La séquence HSQC ^1H -

^{13}C permet la détection des corrélations entre ^{13}C et ^1H par l'utilisation du mécanisme de transfert par simple ou multi quanta. Cette séquence d'impulsions utilise des gradients pulsés afin de sélectionner les cohérences et d'améliorer la sensibilité de la technique. On obtient donc un spectre bidimensionnel dont les axes correspondent aux signaux RMN du proton et du ^{13}C . Chaque tache représentée dans la cartographie 2D HSQC correspond au couplage scalaire entre ^{13}C et ^1H . L'attribution des métabolites sur la cartographie 2D est faite à partir des valeurs de déplacement chimique (ppm) publiées dans la littérature (362,363). Dans notre protocole, les spectres hétéronucléaires HSQC ont été réalisés pour un temps total d'acquisition de 15 h 22 min avec les caractéristiques suivantes: durée d'acquisition: 0,073s (^1H) / 0,006s (^{13}C); 136 scans; fenêtre spectrale: 7002 Hz (^1H) / 20833 Hz (^{13}C) et durée de relaxation: 1,5 s.

Prétraitement des spectres

Avant d'effectuer l'identification des métabolites et leur quantification il est nécessaire de procéder à un traitement préalable des spectres 1D. Les différentes étapes comportent :

- le prétraitement : incluant une correction de phase, une correction de la ligne de base et une correction du décalage de la fréquence par rapport au signal du groupement méthyle du lactate (1,33 ppm)
- la normalisation : dans le cadre de cette thèse, la normalisation des spectres a été effectuée en ramenant la masse de l'échantillon pesé à une masse de référence fixée à 1kg
- la calibration : elle est effectuée par rapport à une référence externe. Nous avons utilisé une solution avec une concentration connue de lactate (19,3 nmol) qui a été analysée dans les mêmes conditions utilisées pour l'analyse des échantillons biologiques. Le logiciel MatLab R2010 (MathWorks®, France) a été employé dans les étapes de normalisation et calibration des spectres.

Analyse du réseau

L'Algorithme ADEMA (Algorithm to Determine Expected Metabolite Level Alteration Using Mutual Informations) a été utilisé pour l'évaluation quantitative des métabolites (364). Cette méthode permet l'analyse des variations d'un groupe de métabolites dans le groupe de cellules exposées à la lidocaïne versus le groupe contrôle, au lieu d'analyser les métabolites un à un en les intégrant de la topologie du réseau métabolique qui a été construit d'après l'Encyclopédie des gènes et génomes de Kyoto (365) et les travaux de Salway (366).

Extraction d'ARN

1 million de cellules MDA-MB-231 sontensemencées dans des boîtes de Pétri p100. Après 24h, elles sont traitées par lidocaïne à la concentration de 1mM ou par le solvant eau dans du

milieu de culture approprié + SVF. Après 24h d'exposition, l'ARN est extrait par kit RNA isolation NucleoSpin® de Macherey-Nagel selon le protocole du fabricant. L'ARN est ensuite dosé par Nanodrop et conservé sous forme d'aliquot de 1500 µg/20 µL à -80°C avant d'être confié à la plateforme Biopuce et séquençage de l'IGBMC.

Western blot

Extraction protéique

200000 cellules MDA-MB-231 sont ensemencées dans des boîtes 6 puits la veille puis elles sont exposées à des doses croissantes de lidocaïne ou au contrôle. 24 h après, les cellules sont lavées 2 fois avec du TBS et grattées dans du bleu SDSX5 (75 µL) puis lysées par sonication (2 x 15 minutes à 25% d'amplitude). L'échantillon est dénaturé par chauffage à 95°C pendant 3 min puis déposé sur un gel SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis).

Migration en gel SDS-PAGE

15 µL d'échantillon sont déposés sur gel de polyacrylamide SDS-PAGE se composant de deux parties : un *gel de concentration* (4,8 % acrylamide / bisacrylamide 40/1 ; 0,375 M Tris.HCl pH 6.8 ; 0,1 % SDS ; 0,005 % APS ; TEMED) permettant de concentrer l'échantillon protéique, et un *gel de séparation* des protéines (10% acrylamide/ bisacrylamide 40/1 ; 0,375 M Tris.HCl pH 8.8 ; 0,1 % SDS ; 0,005 % APS ; TEMED). Après dépôt, l'électrophorèse s'effectue dans un tampon Tris/SDS/Glycine (0,02 M Tris.Base ; 0,2 M glycine ; 0,1% SDS) durant 1,5 heure à 100V.

Immunoblot

Après électrophorèse, les protéines séparées dans le gel SDS sont électrotransférées (80minutes à 100V) sur une membrane de nitrocellulose (Schleicher et Schuell) dans du tampon de transfert (0,02 M Tris.Base ; 0,1 M glycine ; 20% éthanol). L'efficacité de transfert est vérifiée par une coloration de l'ensemble des protéines présentes sur la membrane au Rouge Ponceau (0.1% de Ponceau S dans 5% acide acétique) (Sigma Chimie). La saturation des sites libres de la membrane est réalisée par une incubation d'une heure à température ambiante dans une solution de TBS-Tween 0,1% contenant 5% de BSA. La membrane est mise en présence de l'anticorps primaire dans du TBS-Tween 0,1% à + 4°C sous agitation pendant une nuit. Après 2 lavages de 10 min dans du TBS-Tween 0,1%, la membrane est mise en présence de l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase pendant 1h à température ambiante. Les complexes

anticorps/protéine sont visualisés par un système de chimioluminescence par ECL® (Amersham Pharmacia Biotech). Le contrôle de charge est réalisé par exposition à l'anticorps anti-HSP90.

Liste d'anticorps

Les anticorps anti-Phospho-Src (Tyr527), Src, caspase 3 clivée, ERK et phospho-ERK (Thr202/Tyr204), AKT, phospho-AKT, mTOR et phospho-mTOR, Phospho-FAK et HSP90 proviennent de Cell Signaling, Danvers, MA, USA. L'anticorps anti-flotilline provient de chez Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA

Les anticorps secondaires proviennent de Jackson ImmunoResearch (West Grove PA, USA).

Cytométrie de flux

FITC annexine V

300000 cellules sontensemencées dans des flasques T25 la veille puis exposées à des doses croissantes de lidocaïne ou au contrôle eau pendant 24h. Elles sont ensuite décollées à la trypsine, lavée 2 fois au PBS froid et resuspendues dans la solution tampon fournie dans le kit FITC Annexin V de BD Pharmingen™. 100 µL de la solution est ensuite transféré dans un tube à essai de 5 mL auquel 5µL de FITC Annexine V et 5 µL d'iodure propidium (IP) sont ajoutés. Après vortex, le tube est incubé 15 min à température ambiante. 400 µL de la solution tampon est ensuite ajoutée et les cellules sont analysées par cytométrie de flux.

Dosage du cholestérol et de la sphingomyéline membranaires par FACS

300000 cellules sontensemencées dans des flasques T75 la veille puis exposées à des doses croissantes de lidocaïne ou au contrôle eau pendant 24h. Elles sont ensuite décollées à la trypsine et resuspendue dans le PBS pour être centrifugées 5min à 1000 rpm. Le surnageant est ensuite jeté et les cellules sont resuspendues dans 550 µL de PBS. 250uL de cette solution sont incubées avec 250 µL de PBS + BSA 1% + D4-GFP à 1 :100 ou Lysénine-GFP à 1 :100) à 37°C dans l'obscurité pendant 30 minutes. Les cellules sont ensuite fixées par l'ajout de PFA 4% pendant 10 minutes puis centrifugées p5 minutes à 1500 rpm, le surnageant est jeté et les cellules sont resuspendues dans 500 µL de PBS et analysées par cytométrie de flux.

Génération de clones de MDA-MB-231 ne surexprimant plus le canal sodique voltage-dépendant

Cellules HEK293T

Les cellules HEK293T sont des cellules transformées de rein foetal humain(367). Elles sont adhérentes avec une morphologie épithéliale d'origine rénale et expriment l'antigène SV40 T.

Elles sont cultivées dans du milieu DMEM supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal (FBS), 2 mM de glutamine, 0,01 mM de tampon HEPES et 100 µg/mL de pénicilline/streptomycine. Le changement de milieu sera fait tous les 2-3 jours. Elles sont utilisées pour la production de lentivirus.

Production lentivirale

Les cellules HEK293T sontensemencées la veille de façon à obtenir une confluence de 90% le jour de la transfection. Pour chaque Pétri de 100 mm, les mélanges d'ADN appropriés sont préparés : 1,24 µg de vecteurs de production lentiviraux plp1, 0,63 µg de plp2 et 0,63 µg de plp3 et 2,52 µg du vecteur d'expression contenant la construction avec le shRNA adéquat auquel 50,4 µL de milieu OptiMEM (Invitrogen, Burlington, Canada) sans FBS est ajouté. Cette préparation est ensuite mélangée à 176,4 µL de milieu OptiMEM (Invitrogen, Burlington, Canada) sans FBS et 15 µL d'Xtrem gene9 (Roche, Mannheim, Allemagne) et incubée à température ambiante pendant 20 minutes.

Les shARNs dirigés contre le transcrit SCN5A ont été préparés à l'aide d'oligos commandés auprès de Sigma et incorporés au vecteur pLKO.1-puro. Le shARN contrôle (shCTL) est caractérisé pour ne cibler aucun transcrit et a été préparé à partir d'un oligo « scramble » incorporé dans le vecteur pLKO.1-puro. Les séquences des oligos est donnée dans le tableau 11.

NOM DE L'OLIGO	SEQUENCE (5'-3')
1180/LVSHSCN5A-1F	CCGGGCTGGACTTTAGTGTGATTATCTCGAGATAATCACACTAAAGTCCAGCTTTTT G
1181/LVSHSCN5A-1R	AATTCAAAAAGCTGGACTTTAGTGTGATTATCTCGAGATAATCACACTAAAGTCCA GC
1182/LVSHSCN5A-2F	CCGGGCCATCATCGTGTTCATCTTTCTCGAGAAAGATGAACACGATGATGGCTTTT TG
1183/LVSHSCN5A-2R	AATTCAAAAAGCCATCATCGTGTTCATCTTTCTCGAGAAAGATGAACACGATGATG GC
SHSCR#1	CCGGCAACAAGATGAAGAGACCAACTCGAGTTGGTGCTCTTCATCTTGTGTTTT TG

Tableau 11 Séquences des nucléotides incorporés au vecteur pLKO.1-puro pour interférence d'ARN.

Les préparations d'ADN/agent de transfection sont ensuite ajoutées goutte à goutte aux boîtes de Pétri de 100 mm et incubées durant 48 heures. Le milieu de culture, contenant les virus en suspension, est recueilli 2 jours plus tard à l'aide d'une seringue de 10 mL, puis filtré avec un filtre 0,45 µm. Les virus sont conservés dans des aliquots de 1mL à -80°C.

Infection lentivirale

Les cellules MDA-MB-231 sontensemencées la veille dans des T25 à une confluence de 70-75% afin d'obtenir des cellules en phase exponentielle de croissance le jour de l'infection. Le lendemain, les virus sont décongelés rapidement à 37°C et sont incorporé dans 3 mL de milieu de culture et du polybrène (Sigma Aldrich,) pour obtenir une concentration finale de 8 µg/mL. Le milieu des cellules à infecter est alors retiré et la solution de virus est ajoutée sur la paroi du puits. Une incubation d'une heure à 37°C est alors menée avant de rajouter une solution de milieu de culture adéquat supplémenté de polybrène à 4 µg/mL. Les cellules sont trypsinisées 48 heures après l'infection et repiquées dans des T75. La sélection est amorcée avec la puromycine à une concentration finale de 0,5 µg/mL. Cette sélection se fait de 7 à 10 jours pour atteindre au moins 60-70% de confluence avant l'extraction des protéines.

Analyses statistiques

Les données des tests sont exprimées en ratio par rapport au groupe contrôle ± écart-type.

La comparaison des valeurs d'intérêt utilisait un test d'ANOVA suivi d'un test *post-hoc* de Dunnett par rapport à la condition contrôle.

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism® 6.0 (La Jolla, Californie, USA).

Rapport d'analyse du RNAseq

	Project Report	S18164
---	----------------	--------

Project: S18164

This report presents an overview of quality controls performed on samples from S18164 project. For each sample, a detailed report is also given in a separate pdf file (**sample_report_*.pdf**).

Contents

1. General information about the project	1
2. Number of sequenced reads	1
3. Base quality	1
4. Available sequence files	2
5. Files for GEO submission	2

1. General information about the project

Application: RNA-seq

Library preparation: Library prep for Stranded mRNA-seq/standard quantity. With this protocol, reads originate from the first cDNA strand. There are therefore in the reverse strand compared to the transcribed one

Sequencing type: Single-Read

Read length: 50

2. Number of sequenced reads

Table 1 provides the number of sequenced reads per sample. Our platform provides a minimum of $250 \times L$ million reads for a whole project, where L is the number lanes. For this project $L = 1.0$, hence our platform provides a minimum of 250 million of reads for your project. These reads correspond to all sequenced reads without reads corresponding to adapter dimers (see sample reports for more information).

Table 1: Number of sequenced reads for each sample. The “Total reads” column represents the number of reads for a sample without reads corresponding to adapter dimers. Values for which a quality threshold has been set up by the platform are colored. The last “Total reads” cell is colored in green if the number of total reads is equal or above 250 million, otherwise it is colored in red.

Sample ID	Sample name	Total reads	Sample ID	Sample name	Total reads
TGCX2.S1	CTL.2	38,753,678	TGCX3.S1	CTL.3	50,424,827
TGCX4.S1	CTL.4	48,216,975	TGCX6.S1	LIDO.2	58,413,587
TGCX7.S1	LIDO.3	42,377,204	TGCX8.S1	LIDO.4	46,526,838
Total reads 284M					

3. Base quality

Table 2 shows the percentage of read positions with a base quality score over 30¹. Our platform guaranteed at least 85% of the bases with a quality score higher than 30.

¹Base quality score = $-10 \log_{10} P_e$ where P_e is the error probability in base calling, e.g. a quality score of 30 corresponds to an error probability of 1‰.

	Project Report	S18164
--	----------------	--------

Table 2: Percentage of read positions with a base quality score over 30. *Values for which a quality threshold has been set up by our platform are colored. If the base qualities are above 30 for 85% of the read positions, then corresponding cell is colored in green, otherwise it is colored in red.*

Sample ID	Sample name	% of bases above Q30	Sample ID	Sample name	% of bases above Q30
TGCX2_S1	CTL_2	96.89	TGCX3_S1	CTL_3	96.92
TGCX4_S1	CTL_4	96.88	TGCX6_S1	LIDO_2	96.81
TGCX7_S1	LIDO_3	96.89	TGCX8_S1	LIDO_4	96.94

4. Available sequence files

One fastq file is available per sample. The encoding of quality values is Sanger / Illumina 1.9 format. The total size and the size of each file is given in Table 3.

Table 3: Size of the project's files in megabyte (Mb), except if otherwise specified.

File	Size (Mb)	File	Size (Mb)
TGCX2_S1.fastq.gz	1,215	TGCX3_S1.fastq.gz	1,570
TGCX4_S1.fastq.gz	1,507	TGCX6_S1.fastq.gz	1,820
TGCX7_S1.fastq.gz	1,328	TGCX8_S1.fastq.gz	1,448
Total size 8.68Gb			

You can use MD5 strings to check the integrity of your files after the download. They are provided in the file `md5.txt`. To get more information about MD5 usage, please go to our dedicated wiki section: <http://genomeast.igbmc.fr/wiki/doku.php?id=help:md5>.

5. Files for GEO submission

We provide a pre-filled form of the GEO (Gene Expression Omnibus) database submission spreadsheet (`GEOSubmissionForm*.xls`). To submit your data to GEO you should follow the instructions described in the following webpage : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/info/seq.html>.

Analysis of S18164 RNA sequencing data

Celine Keime

1 Data analysed in this report

Table 1 gives the total number of sequenced reads in each sample (50 bp reads).

Table 1: **Number of sequenced reads in each sample.**

Sample ID	Sample name	Number of reads
TGCX2	CTL_2	38,753,678
TGCX3	CTL_3	50,424,827
TGCX4	CTL_4	48,216,975
TGCX6	LIDO_2	58,413,587
TGCX7	LIDO_3	42,377,204
TGCX8	LIDO_4	46,526,838

Table 2 lists all samples analysed in this report, together with their associated experimental conditions.

Table 2: **Samples analysed in this report and their experimental conditions.**

Sample ID	Sample name	Condition
TGCX2	CTL_2	CTL
TGCX3	CTL_3	CTL
TGCX4	CTL_4	CTL
TGCX6	LIDO_2	Lidocaine1mM
TGCX7	LIDO_3	Lidocaine1mM
TGCX8	LIDO_4	Lidocaine1mM

2 Preprocessing

Reads were preprocessed in order to remove adapter and low-quality sequences (Phred quality score below 20). After this preprocessing, reads shorter than 40 bases were discarded for further analysis. These preprocessing steps were performed using cutadapt [1] version 1.10. Reads were mapped to rRNA sequences using bowtie [2] version 2.2.8, and reads mapping to rRNA sequences were removed for further analysis. Reads were mapped to spike sequences using bowtie [2] version 2.2.8, and reads mapping to spike sequences were removed for further analysis.

Table 3 on the following page provides the proportion of remaining reads after each preprocessing step.

Table 4 on the next page provides the number of different¹ and unique¹ reads in each sample after the preprocessing step.

¹For a given sample, the set of unique reads contains reads found only once in this sample and the set of different reads contains all distinct reads, whatever their occurrence number. For instance, for the following set of reads {A, B, C, C, D, E, F, F, F, G}, the set of unique reads is {A, B, D, E, G} and the set of different reads is {A, B, C, D, E, F, G}.

Table 3: **Summary of preprocessing results.** “Filtered out” column provides the number of reads shorter than 40 bases discarded after adapter and low-quality sequences (Phred quality score below 20) removal. “rRNA” column provides the number of reads mapping to rRNA sequences. “Spike” column provides the number of reads mapping to spike-in sequences. “Remaining” columns provides the number of reads after all preprocessing steps. All percentages were calculated relative to the total number of sequenced reads in each sample.

Sample ID	Sample name	Filtered out	%	rRNA	%	Spike	%	Remaining	%
TGCX2	CTL_2	39,649	0.10	718,638	1.85	114,524	0.30	37,880,867	97.75
TGCX3	CTL_3	58,791	0.12	670,811	1.33	126,204	0.25	49,569,021	98.30
TGCX4	CTL_4	54,403	0.11	695,472	1.44	133,655	0.28	47,333,445	98.17
TGCX6	LIDO_2	67,342	0.12	821,217	1.41	230,682	0.39	57,294,346	98.08
TGCX7	LIDO_3	53,486	0.13	539,541	1.27	95,269	0.22	41,688,908	98.38
TGCX8	LIDO_4	52,738	0.11	758,131	1.63	112,527	0.24	45,603,442	98.02

Table 4: **Number of different and unique reads in each sample.** : “Input” column provides the number of reads after preprocessing. All percentages were calculated relative to this number of reads.

Sample ID	Sample name	Input	Different	%	Unique	%
TGCX2	CTL_2	37,880,867	13,572,501	35.83	8,725,952	23.04
TGCX3	CTL_3	49,569,021	16,627,902	33.55	10,580,721	21.34
TGCX4	CTL_4	47,333,445	16,906,933	35.72	10,985,555	23.21
TGCX6	LIDO_2	57,294,346	16,480,573	28.77	9,184,126	16.03
TGCX7	LIDO_3	41,688,908	15,302,414	36.71	10,019,179	24.03
TGCX8	LIDO_4	45,603,442	16,380,574	35.92	10,614,413	23.27

3 Mapping

Reads were mapped onto the hg38 assembly of *Homo sapiens* genome using STAR [3] version 2.5.3a. Table 5 provides a summary of mapping results.

Table 5: **Summary of mapping results.** “Unmapped” column represents the number of reads not mapped onto the genome. “Multi-mapped” column represents reads mapped at several locations on the genome and “Uniquely mapped” column reads that were mapped only once on the genome. All percentages were calculated relative to the number of input reads (i.e. reads kept after preprocessing).

Sample ID	Sample name	Unmapped	%	Multi-mapped	%	Uniquely mapped	%
TGCX2	CTL_2	248,013	0.65	5,255,009	13.87	32,377,845	85.47
TGCX3	CTL_3	330,014	0.67	6,514,834	13.14	42,724,173	86.19
TGCX4	CTL_4	370,335	0.78	6,018,602	12.72	40,944,508	86.50
TGCX6	LIDO_2	400,114	0.70	7,188,450	12.55	49,705,782	86.76
TGCX7	LIDO_3	293,184	0.70	5,137,801	12.32	36,257,923	86.97
TGCX8	LIDO_4	334,486	0.73	5,672,706	12.44	39,596,250	86.83

Figure 1 on the next page represents read coverage over genes in all samples (coverage was computed for each gene percentile using geneBodyCoverage from RSeQC [4] version 2.6.4).

4 Quantification

Gene expression quantification was performed from uniquely aligned reads using htseq-count [5] version 0.6.1p1, with annotations from Ensembl version 91 and “union” mode². Table 6 on page 4 provides a summary of quantification results. Only non-ambiguously assigned reads have been retained for further analyses.

²<http://htseq.readthedocs.io/en/master/count.html>

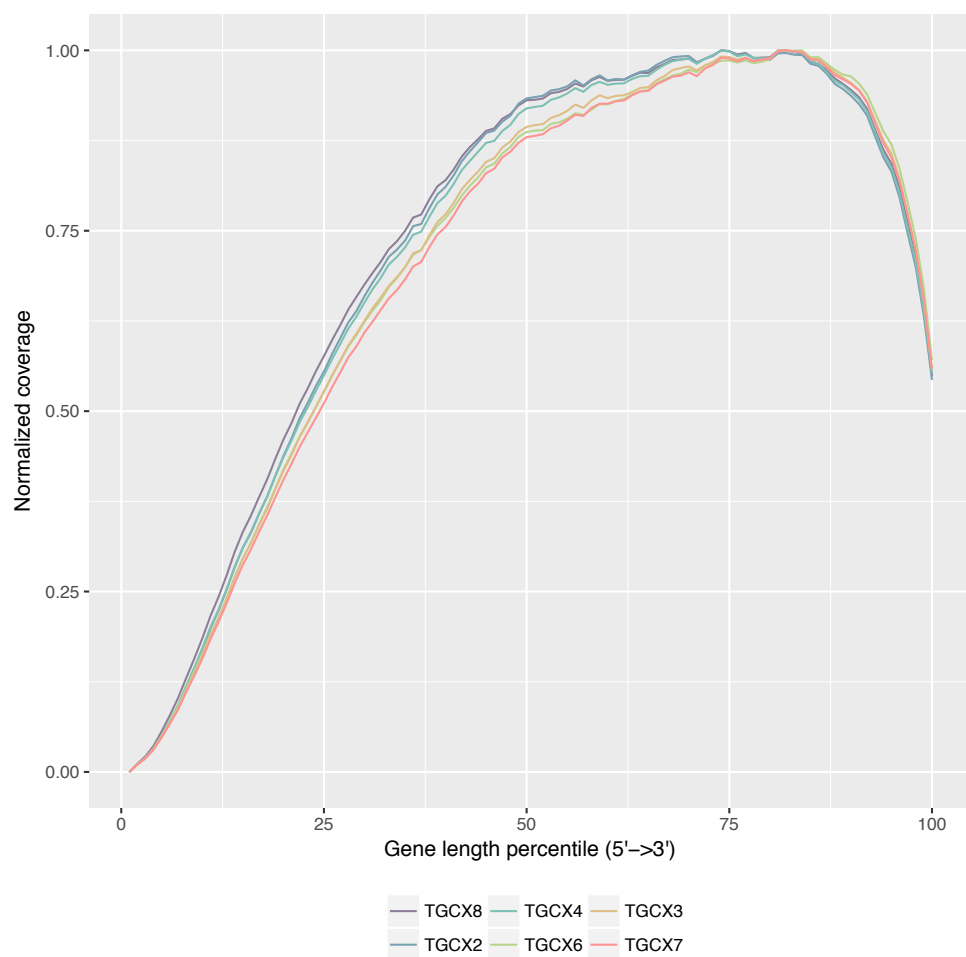


Figure 1: **Read coverage over genes in all samples.** This plot represents the normalized coverage (y-axis) at all percentiles of gene length (x-axis). Genes with mRNA length below 100bp were skipped from this analysis. In the legend, samples are ordered according to their Pearson's skewness coefficient (samples with more skewness are displayed at the beginning of the legend).

Table 6: **Summary of quantification results.** “Unassigned” column represents the number of reads aligned to a genomic region corresponding to no annotated gene. “Ambiguously assigned” column represents the number of reads aligned to a genomic region corresponding to more than one annotated gene and “Assigned” column to one annotated gene. All percentages were calculated relative to all uniquely mapped reads.

Sample ID	Sample name	Unassigned	%	Ambiguously assigned	%	Assigned	%
TGCX2	CTL.2	1,815,477	5.61	827,271	2.56	29,735,097	91.84
TGCX3	CTL.3	2,725,130	6.38	1,060,233	2.48	38,938,810	91.14
TGCX4	CTL.4	2,879,976	7.03	991,966	2.42	37,072,566	90.54
TGCX6	LIDO.2	3,235,685	6.51	1,207,119	2.43	45,262,978	91.06
TGCX7	LIDO.3	2,467,163	6.80	866,606	2.39	32,924,154	90.81
TGCX8	LIDO.4	2,539,099	6.41	974,369	2.46	36,082,782	91.13

5 Data exploration

Figure 2 on the next page provides an heatmap of sample-to-sample distances. The Simple Error Ratio Estimate (SERE) [6] coefficient that quantifies global RNA-seq sample differences has been used. A SERE coefficient of 0 indicates data duplication, a score of 1 corresponds to faithful replication (samples differ exactly as would be expected due to Poisson variation). If RNA-Seq samples are truly different, this coefficient is greater than 1 (overdispersion), and the more the coefficient is high, the more the samples are different.

Figure 3 on page 6 represents the first principal components of a Principal Component Analysis, showing the main sources of variance in the data.

6 Differential gene expression analysis

Comparison between treated and control samples was performed using the Wald test for differential expression proposed by Love et al. [7] and implemented in the Bioconductor package DESeq2 version 1.16.1.

Genes with high Cook’s distance were filtered out. Cook’s distance is a measure of how much a single sample is influencing the fitted coefficients for a gene, and a large value of Cook’s distance is intended to indicate an outlier count. These genes have no p-value in the resulting file.

Independent filtering based on the mean of normalized counts was performed in order to filter out those genes that have no or little chance of showing significance evidence of differential expression (without looking at their statistic). Indeed, genes with very low counts in all samples are not likely to be significantly differentially expressed. This independent filtering results in increased detection power. P-values were adjusted for multiple testing using the Benjamini and Hochberg method [8]. Genes filtered out in the independent filtering step have no adjusted p-value in the resulting file.

Figure 4 on page 7 represents the results of this comparison and Table 7 provides the number of significantly differentially expressed genes.

Table 7: **Number of significantly differentially expressed genes.** These genes were selected using the thresholds: adjusted p-value lower than 0.05 and absolute value of log2 Fold-Change greater than 0.5.

Name of the comparison (A vs B)	Number of over-expressed genes (A>B)	Number of under-expressed genes (A<B)	Number of significantly differentially expressed genes
Lidocaine1mM vs CTL	94	17	111

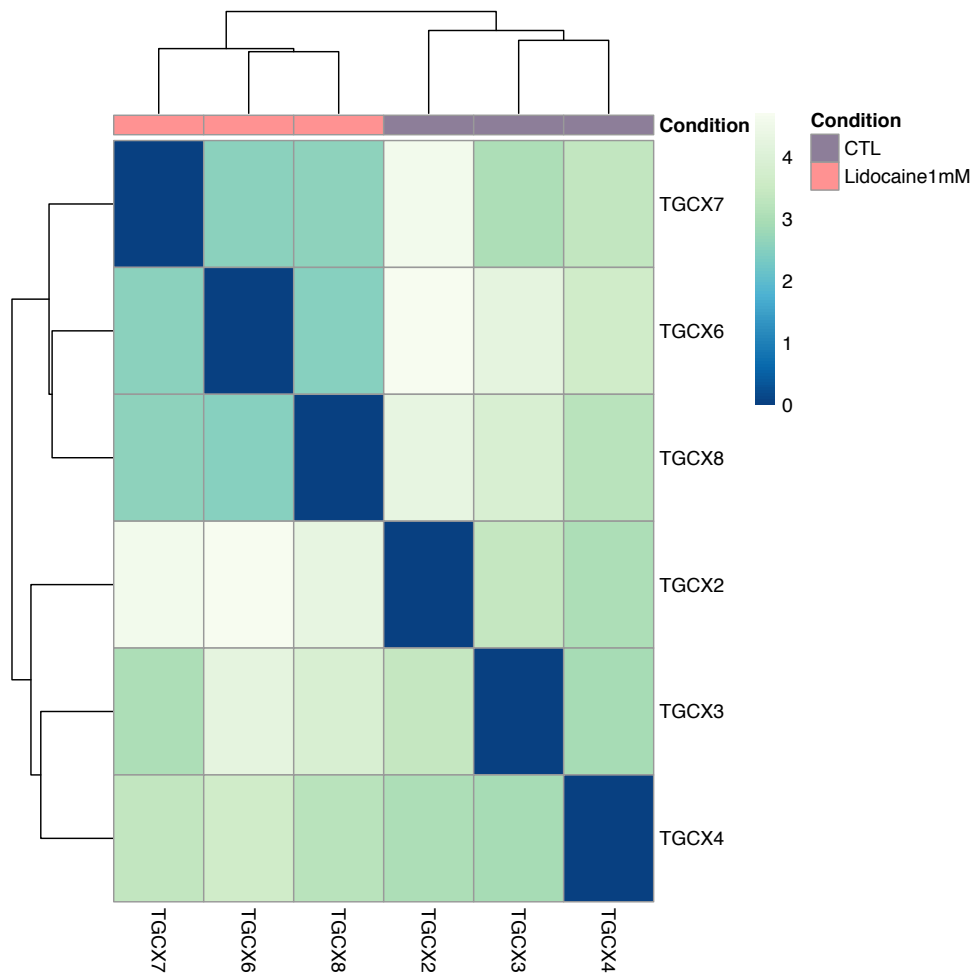


Figure 2: **Heatmap of sample-to-sample distances.** Sample-to-sample distances correspond to SERE [6] coefficient. Hierarchical clustering was performed using the Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean (UPGMA) algorithm.

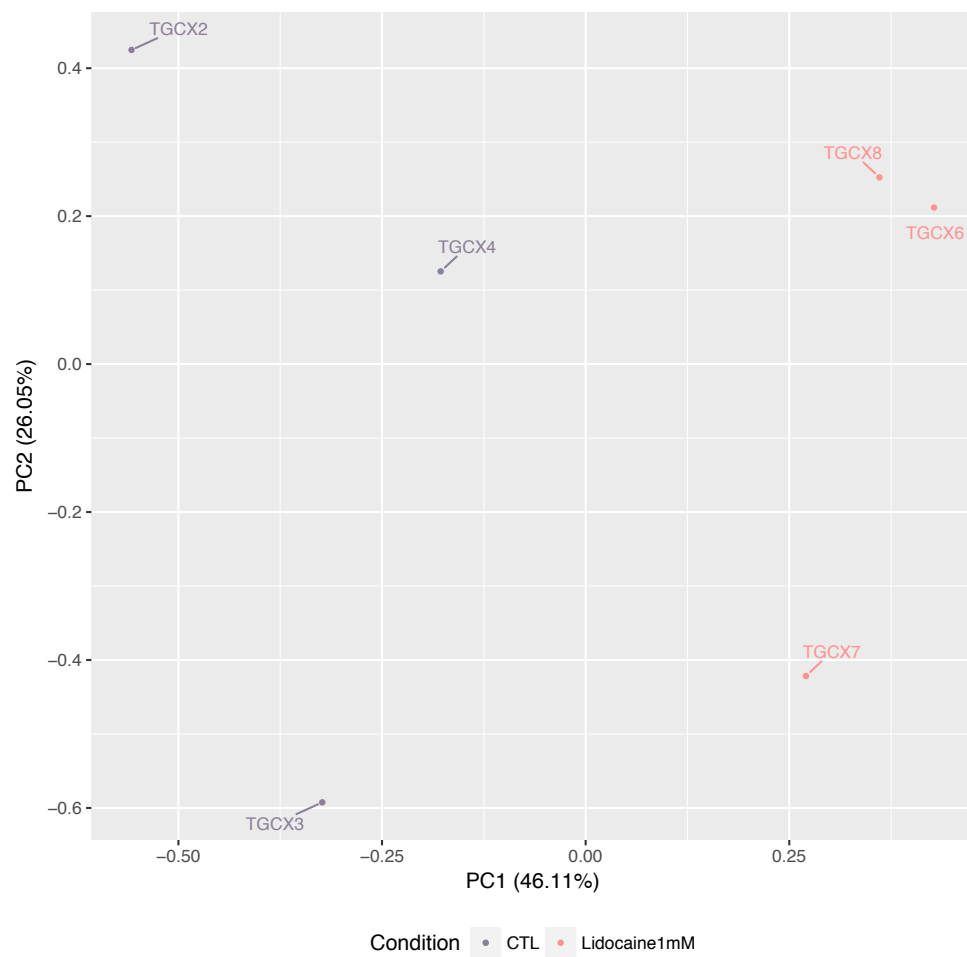


Figure 3: **Principal component analysis.** PC_i axis represents the principal component *i* and the number into brackets indicates the percentage of explained variance associated with this axis. Principal Component Analysis was computed on regularized logarithm transformed data calculated with the method proposed in [7].

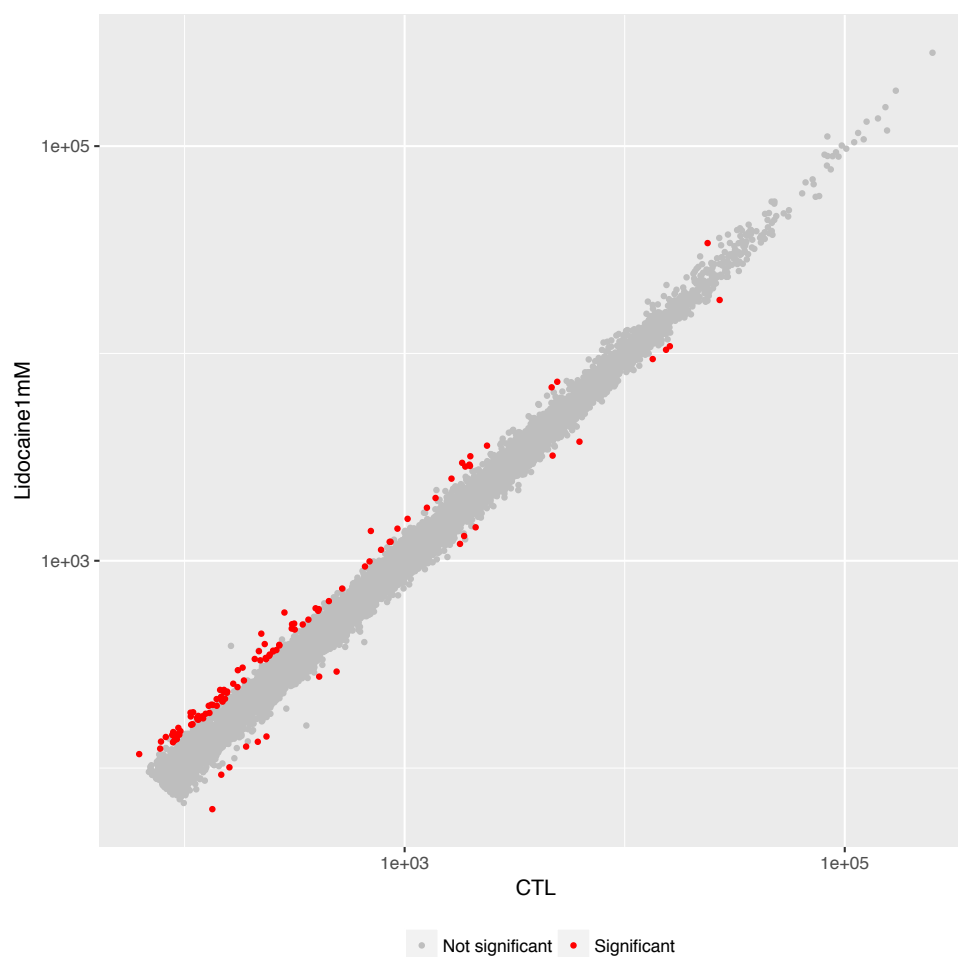


Figure 4: **Lidocaine1mM vs CTL comparison.** Scatter-plot comparing the mean normalized counts for each condition. A pseudocount of 1 was added to all values in order to represent genes that are not expressed in one condition. Significant genes were selected using the following thresholds: adjusted p-value lower than 0.05 and absolute value of log2 Fold-Change greater than 0.5.

7 Files delivered

7.1 Alignment files

For each sample, an alignment file in BAM format and the corresponding index (BAI format) are available. The BAM files can be opened using a genome browser, for example Integrative Genomics Viewer ³.

7.2 Result file

A TSV (tab-separated values) file provides raw read counts and normalized read counts for each gene together with gene annotations and the p-value, adjusted p-value and log2 fold-change for each performed comparison. This file contains only genes with at least one read count in one sample. It can be opened with a spreadsheet software like Excel or Calc. The “,” character is used as decimal separator in numeric columns. This file contains the following columns:

Ensembl Gene ID Ensembl identifier of the gene, corresponding to Ensembl release 91.

Raw read counts Number of reads that have been assigned to the gene.

Normalized read counts Number of reads that have been assigned to the gene, normalized to make these counts comparable between samples.

Normalized read counts divided by median of transcripts length in kb Number of reads that have been assigned to the gene, normalized between samples and divided by transcript length in kb (calculated as the median of the length of all transcripts corresponding to this gene). These expression estimates can be compared across genes and samples.

Median of transcripts length Median of the length of all transcripts corresponding to this gene (in bp).

Gene name Common gene name.

Description Description of the gene.

Chromosome name Name of the chromosome where the gene is located.

Start gene position Start coordinate of the gene.

End gene position End coordinate of the gene.

Gene biotype Biotype of the gene as defined in Ensembl⁴.

GO:biological process Biological process Gene Ontology terms associated with this gene. A biological process term describes a series of events accomplished by one or more organized assemblies of molecular functions.

GO:molecular function Molecular function Gene Ontology terms associated with this gene. A molecular function term describes activities that occur at the molecular level.

GO:cellular component Cellular component Gene Ontology terms associated with this gene. A cellular component term describes a location, relative to cellular compartments and structures, occupied by a macromolecular machine when it carries out a molecular function.

log2 FC Log2 of the expression fold change estimated, reflecting differential expression between the two compared conditions.

p-value P-value of the statistical test.

Adjusted p-value P-value of the statistical test, adjusted for multiple testing.

³IGV is freely available on <http://software.broadinstitute.org/software/igv>

⁴<https://www.ensembl.org/Help/Faq?id=468>

8 Version information

8.1 Version of used tools

Table 8 provides the tools used in GenomEast RNA-seq pipeline version 1.1.2 (used to perform the analyses described in the report) and their corresponding version.

Table 8: **Tools used for the analyses presented in this report.**

Tool	Release	Description
bowtie2	2.2.8	To align reads onto a set of reference sequences.
cutadapt	1.10	To trim low quality bases and adapter sequences from the reads and to remove too-short reads after trimming.
FastQC	0.11.5	To perform quality controls on the reads.
HTSeq	0.6.1p1	To compute the number of reads in annotated transcribed regions.
R	3.3.2	To perform statistical analysis, graphics and to generate this report.
RSeqQC	2.6.4	To perform quality controls on the alignments.
samtools	1.3.1	To manipulate SAM/BAM files.
STAR	2.5.3a	To perform spliced alignment of reads onto a reference genome.

8.2 Version of used R packages

```
## R version 3.3.2 (2016-10-31)
## Platform: x86_64-pc-linux-gnu (64-bit)
## Running under: Scientific Linux release 6.7 (Carbon)
##
## locale:
##  [1] LC_CTYPE=fr_FR.UTF-8      LC_NUMERIC=C
##  [3] LC_TIME=fr_FR.UTF-8      LC_COLLATE=fr_FR.UTF-8
##  [5] LC_MONETARY=fr_FR.UTF-8  LC_MESSAGES=fr_FR.UTF-8
##  [7] LC_PAPER=fr_FR.UTF-8     LC_NAME=C
##  [9] LC_ADDRESS=C             LC_TELEPHONE=C
## [11] LC_MEASUREMENT=fr_FR.UTF-8 LC_IDENTIFICATION=C
##
## attached base packages:
## [1] parallel stats4 methods grid stats graphics grDevices
## [8] utils datasets base
##
## other attached packages:
## [1] DESeq2_1.16.1 SummarizedExperiment_1.4.0
## [3] Biobase_2.34.0 GenomicRanges_1.26.4
## [5] GenomeInfoDb_1.10.3 IRanges_2.8.2
## [7] S4Vectors_0.12.2 BiocGenerics_0.22.0
## [9] ggrepel_0.6.5 ggfortify_0.4.1
## [11] pheatmap_1.0.8 reshape2_1.4.2
## [13] VennDiagram_1.6.18 futile.logger_1.4.1
## [15] knitr_1.12.3 xtable_1.8-2
## [17] cowplot_0.8.0 ggplot2_2.2.1
##
## loaded via a namespace (and not attached):
## [1] locfit_1.5-9.1 Rcpp_0.12.13 lattice_0.20-34
```

## [4] tidy_0.6.1	assertthat_0.1	digest_0.6.12
## [7] R6_2.2.0	plyr_1.8.4	futile.options_1.0.0
## [10] backports_1.0.5	acepack_1.4.1	RSQlite_1.1-2
## [13] evaluate_0.10	zlibbioc_1.20.0	lazyeval_0.2.0
## [16] annotate_1.50.0	data.table_1.10.4	rpart_4.1-10
## [19] Matrix_1.2-7.1	checkmate_1.8.2	labeling_0.3
## [22] splines_3.3.2	BiocParallel_1.6.6	geneplotter_1.50.0
## [25] stringr_1.2.0	foreign_0.8-67	htmlwidgets_0.5
## [28] RCurl_1.95-4.8	munsell_0.4.3	base64enc_0.1-3
## [31] htmltools_0.3	nnet_7.3-12	tibble_1.2
## [34] gridExtra_2.2.1	htmlTable_1.9	Hmisc_4.0-3
## [37] XML_3.98-1.6	dplyr_0.5.0	bitops_1.0-6
## [40] gtable_0.2.0	DBI_0.6-1	magrittr_1.5
## [43] formatR_1.4	scales_0.4.1	stringi_1.1.2
## [46] XVector_0.14.1	genefilter_1.58.1	latticeExtra_0.6-28
## [49] Formula_1.2-1	lambda.r_1.1.7	RColorBrewer_1.1-2
## [52] tools_3.3.2	survival_2.40-1	AnnotationDbi_1.38.0
## [55] colorspace_1.3-2	cluster_2.0.6	memoise_1.1.0

References

- [1] M. Martin, "Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads," *EMB-net.journal*, vol. 17, no. 1, pp. 10–12, 2011.
- [2] B. Langmead and S. Salzberg, "Fast gapped-read alignment with Bowtie 2," *Nat Methods*, vol. 9, no. 4, pp. 357–359, 2012.
- [3] A. Dobin, C. Davis, F. Schlesinger, J. Drenkow, C. Zaleski, S. Jha, P. Batut, M. Chaisson, and T. Gingeras, "STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner," *Bioinformatics*, vol. 29, no. 1, pp. 15–21, 2013.
- [4] L. Wang, S. Wang, and W. Li, "RSeQC: quality control of RNA-seq experiments," *Bioinformatics*, vol. 28, no. 16, pp. 2184–5, 2012.
- [5] S. Anders, P. Pyl, and W. Huber, "HTSeq-a python framework to work with high-throughput sequencing data," *Bioinformatics*, vol. 31, no. 2, pp. 166–169, 2015.
- [6] S. Schulze, R. Kanwar, M. Glzenleuchter, T. Therneau, and A. Beutler, "SERE: Single-parameter quality control and sample comparison for RNA-Seq," *BMC Genomics*, vol. 13, p. 524, 2012.
- [7] M. Love, W. Huber, and S. Anders, "Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2," *Genome Biol*, vol. 15, no. 12, p. 550, 2014.
- [8] Y. Benjamini and Y. Hochberg, "Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing," *J R Statist Soc B*, vol. 57, no. 1, pp. 289–300, 1995.

Références bibliographiques

1. Exadaktylos AK, Buggy DJ, Moriarty DC, Mascha E, Sessler DI. Can anesthetic technique for primary breast cancer surgery affect recurrence or metastasis? *Anesthesiology*. oct 2006;105(4):660-4.
2. Sigston EAW, Williams BRG. An Emergence Framework of Carcinogenesis. *Front Oncol*. 2017;7:198.
3. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell*. 7 janv 2000;100(1):57-70.
4. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 4 mars 2011;144(5):646-74.
5. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thürlimann B, Senn H-J, et al. Strategies for subtypes-dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. août 2011;22(8):1736-47.
6. Hilsenbeck SG, Ravdin PM, de Moor CA, Chamness GC, Osborne CK, Clark GM. Time-dependence of hazard ratios for prognostic factors in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 1 nov 1998;52(1):227-37.
7. Baum M, Demicheli R, Hrushesky W, Retsky M. Does surgery unfavourably perturb the “natural history” of early breast cancer by accelerating the appearance of distant metastases? *Eur J Cancer*. 1 mars 2005;41(4):508-15.
8. Demicheli R, Miceli R, Moliterni A, Zambetti M, Hrushesky WJM, Retsky MW, et al. Breast cancer recurrence dynamics following adjuvant CMF is consistent with tumor dormancy and mastectomy-driven acceleration of the metastatic process. *Ann Oncol*. 1 sept 2005;16(9):1449-57.
9. Jatoi I, Tsimelzon A, Weiss H, Clark GM, Hilsenbeck SG. Hazard rates of recurrence following diagnosis of primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 1 janv 2005;89(2):173-8.
10. Retsky MW, Demicheli R, Hrushesky WJM, Baum M, Gukas ID. Dormancy and surgery-driven escape from dormancy help explain some clinical features of breast cancer. *APMIS*. juillet 2008;116(7-8):730-41.
11. Shen T, Gao C, Zhang K, Siegal GP, Wei S. Prognostic outcomes in advanced breast cancer: the metastasis-free interval is important. *Hum Pathol*. 2017;70:70-6.
12. Lobbezoo DJA, van Kampen RJW, Voogd AC, Dercksen MW, van den Berkmortel F, Smilde TJ, et al. Prognosis of metastatic breast cancer: are there differences between patients with de novo and recurrent metastatic breast cancer? *Br J Cancer*. 28 avr 2015;112(9):1445-51.
13. Freeman J, Connolly C, Buggy D. Mechanisms of Metastasis of Solid Organ Tumors in the Perioperative Period. *Int Anesthesiol Clin*. 2016;54(4):29-47.
14. Paget S. THE DISTRIBUTION OF SECONDARY GROWTHS IN CANCER OF THE BREAST. *The Lancet*. 23 mars 1889;133(3421):571-3.
15. Ribatti D, Mangialardi G, Vacca A. Stephen Paget and the « seed and soil » theory of metastatic dissemination. *Clin Exp Med*. déc 2006;6(4):145-9.
16. Scott J, Kuhn P, Anderson ARA. Unifying metastasis--integrating intravasation, circulation and end-organ colonization. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(7):445-6.
17. Scott JG, Fletcher AG, Maini PK, Anderson ARA, Gerlee P. A filter-flow perspective of haematogenous metastasis offers a non-genetic paradigm for personalised cancer therapy. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. nov 2014;50(17):3068-75.
18. Azevedo AS, Follain G, Patthabhiraman S, Harlepp S, Goetz JG. Metastasis of circulating tumor cells: favorable soil or suitable biomechanics, or both? *Cell Adhes Migr*. 2015;9(5):345-56.
19. Akhtar M, Haider A, Rashid S, Al-Nabet ADMH. Paget's « Seed and Soil » Theory of Cancer Metastasis: An Idea Whose Time has Come. *Adv Anat Pathol*. janv 2019;26(1):69-74.

20. Sowder ME, Johnson RW. Bone as a Preferential Site for Metastasis. *JBMR Plus*. mars 2019;3(3):e10126.
21. Karaman S, Detmar M. Mechanisms of lymphatic metastasis. *J Clin Invest*. mars 2014;124(3):922-8.
22. Chen S-H, Zhang B-Y, Zhou B, Zhu C-Z, Sun L-Q, Feng Y-J. Perineural invasion of cancer: a complex crosstalk between cells and molecules in the perineural niche. *Am J Cancer Res*. 2019;9(1):1-21.
23. Benish M, Ben-Eliyahu S. Surgery as a Double-Edged Sword: A Clinically Feasible Approach to Overcome the Metastasis-Promoting Effects of Surgery by Blunting Stress and Prostaglandin Responses. *Cancers*. 24 nov 2010;2(4):1929-51.
24. Coffey JC, Wang JH, Smith MJF, Bouchier-Hayes D, Cotter TG, Redmond HP. Excisional surgery for cancer cure: therapy at a cost. *Lancet Oncol*. déc 2003;4(12):760-8.
25. Meric F, Mirza NQ, Vlastos G, Buchholz TA, Kuerer HM, Babiera GV, et al. Positive surgical margins and ipsilateral breast tumor recurrence predict disease-specific survival after breast-conserving therapy. *Cancer*. 15 févr 2003;97(4):926-33.
26. Rudloff U, Brogi E, Reiner AS, Goldberg JI, Brockway JP, Wynveen CA, et al. The influence of margin width and volume of disease near margin on benefit of radiation therapy for women with DCIS treated with breast-conserving therapy. *Ann Surg*. avr 2010;251(4):583-91.
27. Houssami N, Macaskill P, Marinovich ML, Morrow M. The association of surgical margins and local recurrence in women with early-stage invasive breast cancer treated with breast-conserving therapy: a meta-analysis. *Ann Surg Oncol*. mars 2014;21(3):717-30.
28. Tachtsidis A, McInnes LM, Jacobsen N, Thompson EW, Saunders CM. Minimal residual disease in breast cancer: an overview of circulating and disseminated tumour cells. *Clin Exp Metastasis*. 1 août 2016;33(6):521-50.
29. Choy A, McCulloch P. Induction of tumour cell shedding into effluent venous blood breast cancer surgery. *Br J Cancer*. janv 1996;73(1):79-82.
30. McCulloch P, Choy A, Martin L. Association between tumour angiogenesis and tumour cell shedding into effluent venous blood during breast cancer surgery. *Lancet*. 18 nov 1995;346(8986):1334-5.
31. Biggers B, Knox S, Grant M, Kuhn J, Nemunaitis J, Fisher T, et al. Circulating tumor cells in patients undergoing surgery for primary breast cancer: preliminary results of a pilot study. *Ann Surg Oncol*. avr 2009;16(4):969-71.
32. Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med*. 2004;351(8):781-91.
33. Lianidou ES, Markou A. Circulating Tumor Cells in Breast Cancer: Detection Systems, Molecular Characterization, and Future Challenges. *Clin Chem*. 1 sept 2011;57(9):1242-55.
34. Nakamura K, Smyth MJ. Targeting cancer-related inflammation in the era of immunotherapy. *Immunol Cell Biol*. 2017;95(4):325-32.
35. Neeman E, Zmora O, Ben-Eliyahu S. A New Approach to Reducing Postsurgical Cancer Recurrence: Perioperative Targeting of Catecholamines and Prostaglandins. *Clin Cancer Res*. 15 sept 2012;18(18):4895-902.
36. Traynor C, Hall GM. Endocrine and metabolic changes during surgery: anaesthetic implications. *Br J Anaesth*. févr 1981;53(2):153-60.
37. Buvanendran A, Kroin JS, Berger RA, Hallab NJ, Saha C, Negrescu C, et al. Upregulation of prostaglandin E2 and interleukins in the central nervous system and peripheral tissue during and after surgery in humans. *Anesthesiology*. mars 2006;104(3):403-10.

38. Lala PK, Nandi P, Majumder M. Roles of prostaglandins in tumor-associated lymphangiogenesis with special reference to breast cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2018;37(2-3):369-84.
39. Antonio N, Bønnelykke-Behrndtz ML, Ward LC, Collin J, Christensen IJ, Steiniche T, et al. The wound inflammatory response exacerbates growth of pre-neoplastic cells and progression to cancer. *EMBO J.* 2 sept 2015;34(17):2219-36.
40. Wculek SK, Malanchi I. Neutrophils fan cancer's flames. *EMBO J.* 2 sept 2015;34(17):2211-2.
41. Kim T-H, Gill NK, Nyberg KD, Nguyen AV, Hohlbauch SV, Geisse NA, et al. Cancer cells become less deformable and more invasive with activation of β -adrenergic signaling. *J Cell Sci.* 15 2016;129(24):4563-75.
42. Landmann R. Beta-adrenergic receptors in human leukocyte subpopulations. *Eur J Clin Invest.* oct 1992;22 Suppl 1:30-6.
43. Uotila P. The role of cyclic AMP and oxygen intermediates in the inhibition of cellular immunity in cancer. *Cancer Immunol Immunother CII.* sept 1996;43(1):1-9.
44. Benish M, Bartal I, Goldfarb Y, Levi B, Avraham R, Raz A, et al. Perioperative Use of β -blockers and COX-2 Inhibitors May Improve Immune Competence and Reduce the Risk of Tumor Metastasis. *Ann Surg Oncol [Internet].* juill 2008 [cité 6 avr 2019];15(7). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3872002/>
45. Glasner A, Avraham R, Rosenne E, Benish M, Zmora O, Shemer S, et al. Improving survival rates in two models of spontaneous postoperative metastasis in mice by combined administration of a beta-adrenergic antagonist and a cyclooxygenase-2 inhibitor. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1 mars 2010;184(5):2449-57.
46. Krasnova Y, Putz EM, Smyth MJ, Souza-Fonseca-Guimaraes F. Bench to bedside: NK cells and control of metastasis. *Clin Immunol Orlando Fla.* 2017;177:50-9.
47. Mamessier E, Sylvain A, Thibult M-L, Houvenaeghel G, Jacquemier J, Castellano R, et al. Human breast cancer cells enhance self tolerance by promoting evasion from NK cell antitumor immunity. *J Clin Invest.* sept 2011;121(9):3609-22.
48. Ramirez MF, Ai D, Bauer M, Vauthey J-N, Gottumukkala V, Kee S, et al. Innate immune function after breast, lung, and colorectal cancer surgery. *J Surg Res.* mars 2015;194(1):185-93.
49. McCulloch PG, MacIntyre A. Effects of surgery on the generation of lymphokine-activated killer cells in patients with breast cancer. *Br J Surg.* août 1993;80(8):1005-7.
50. Market M, Baxter KE, Angka L, Kennedy MA, Auer RC. The Potential for Cancer Immunotherapy in Targeting Surgery-Induced Natural Killer Cell Dysfunction. *Cancers.* 20 déc 2018;11(1).
51. Tai L-H, Zhang J, Scott KJ, Souza CT de, Alkayyal AA, Ananth AA, et al. Perioperative Influenza Vaccination Reduces Postoperative Metastatic Disease by Reversing Surgery-Induced Dysfunction in Natural Killer Cells. *Clin Cancer Res.* 15 sept 2013;19(18):5104-15.
52. Curigliano G, Petit JY, Bertolini F, Colleoni M, Peruzzotti G, de Braud F, et al. Systemic effects of surgery: quantitative analysis of circulating basic fibroblast growth factor (bFGF), Vascular endothelial growth factor (VEGF) and transforming growth factor beta (TGF-beta) in patients with breast cancer who underwent limited or extended surgery. *Breast Cancer Res Treat.* sept 2005;93(1):35-40.
53. Hormbrey E, Han C, Roberts A, McGrouther DA, Harris AL. The relationship of human wound vascular endothelial growth factor (VEGF) after breast cancer surgery to circulating VEGF and angiogenesis. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 1 oct 2003;9(12):4332-9.

54. Abramovitch R, Marikovsky M, Meir G, Neeman M. Stimulation of tumour growth by wound-derived growth factors. *Br J Cancer*. mars 1999;79(9-10):1392-8.
55. Georgiou GK, Igglezou M, Sainis I, Vareli K, Batsis H, Briasoulis E, et al. Impact of breast cancer surgery on angiogenesis circulating biomarkers: a prospective longitudinal study. *World J Surg Oncol*. 27 août 2013;11:213.
56. O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, et al. Angiostatin: A novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a lewis lung carcinoma. *Cell*. 21 oct 1994;79(2):315-28.
57. Singer CF, Hudelist G, Fuchs E-M, Köstler W, Fink-Retter A, Gschwantler-Kaulich D, et al. Incomplete surgical resection of ductal carcinomas in situ results in activation of ERBB2 in residual breast cancer cells. *Endocr Relat Cancer*. mars 2009;16(1):73-83.
58. Dillekås H, Demicheli R, Ardoino I, Jensen SAH, Biganzoli E, Straume O. The recurrence pattern following delayed breast reconstruction after mastectomy for breast cancer suggests a systemic effect of surgery on occult dormant micrometastases. *Breast Cancer Res Treat*. 2016;158:169-78.
59. Redig AJ, McAllister SS. Breast cancer as a systemic disease: a view of metastasis. *J Intern Med*. août 2013;274(2):113-26.
60. Fried IA. The influence of the anaesthetic on survival rates of breast cancer patients after surgery. *Int J Cancer J Int Cancer*. 15 août 1977;20(2):213-8.
61. Wada H, Seki S, Takahashi T, Kawarabayashi N, Higuchi H, Habu Y, et al. Combined spinal and general anesthesia attenuates liver metastasis by preserving Th1/Th2 cytokine balance. *Anesthesiology*. 2007;106(3):499-506.
62. Bar-Yosef S, Melamed R, Page GG, Shakhar G, Shakhar K, Ben-Eliyahu S. Attenuation of the tumor-promoting effect of surgery by spinal blockade in rats. *Anesthesiology*. juin 2001;94(6):1066-73.
63. Deegan CA, Murray D, Doran P, Ecimovic P, Moriarty DC, Buggy DJ. Effect of anaesthetic technique on oestrogen receptor-negative breast cancer cell function in vitro. *Br J Anaesth*. 1 nov 2009;103(5):685-90.
64. Buggy DJ, Sessler DI. Retrospective but Not Rigorous: *Anesthesiology*. juill 2009;111(1):203-4.
65. Buggy DJ, Borgeat A, Cata J, Doherty DG, Doornebal CW, Forget P, et al. Consensus statement from the BJA Workshop on Cancer and Anaesthesia. *Br J Anaesth*. janv 2015;114(1):2-3.
66. Howell SJ, Pandit JJ, Rowbotham DJ. National Institute of Academic Anaesthesia research priority setting exercise. *Br J Anaesth*. 1 janv 2012;108(1):42-52.
67. Boney O, Bell M, Bell N, Conquest A, Cumbers M, Drake S, et al. Identifying research priorities in anaesthesia and perioperative care: final report of the joint National Institute of Academic Anaesthesia/James Lind Alliance Research Priority Setting Partnership. *BMJ Open*. 1 déc 2015;5(12):e010006.
68. Biki BMD, Mascha EPhD, Moriarty DCMD, Fitzpatrick JMMD, Sessler DIMD, Buggy DJMD. Anesthetic Technique for Radical Prostatectomy Surgery Affects Cancer Recurrence: A Retrospective Analysis. [Miscellaneous Article]. *Anesthesiol* August 2008. 2008;109(2):180-7.
69. Christopherson R, James KE, Tableman M, Marshall P, Johnson FE. Long-term survival after colon cancer surgery: a variation associated with choice of anesthesia. *Anesth Analg*. juill 2008;107(1):325-32.

70. Ismail H, Ho KM, Narayan K, Kondalsamy-Chennakesavan S. Effect of neuraxial anaesthesia on tumour progression in cervical cancer patients treated with brachytherapy: a retrospective cohort study. *Br J Anaesth.* 1 août 2010;105(2):145-9.
71. Sessler DI, Ben-Eliyahu S, Mascha EJ, Parat M-O, Buggy DJ. Can regional analgesia reduce the risk of recurrence after breast cancer?: Methodology of a multicenter randomized trial. *Contemp Clin Trials.* juillet 2008;29(4):517-26.
72. Jaura AI, Flood G, Gallagher HC, Buggy DJ. Differential effects of serum from patients administered distinct anaesthetic techniques on apoptosis in breast cancer cells in vitro: a pilot study. *Br J Anaesth.* juill 2014;113 Suppl 1:i63-67.
73. Kvolik S, Glavas-Obrovac L, Bares V, Karner I. Effects of inhalation anesthetics halothane, sevoflurane, and isoflurane on human cell lines. *Life Sci.* 23 sept 2005;77(19):2369-83.
74. Li Q, Zhang L, Han Y, Jiang Z, Wang Q. Propofol reduces MMPs expression by inhibiting NF- κ B activity in human MDA-MB-231 cells. *Biomed Pharmacother Bioméd Pharmacothérapie.* févr 2012;66(1):52-6.
75. Afsharimani B, Baran J, Watanabe S, Lindner D, Cabot PJ, Parat M-O. Morphine and breast tumor metastasis: the role of matrix-degrading enzymes. *Clin Exp Metastasis.* 1 févr 2014;31(2):149-58.
76. Katzav S, Shapiro J, Segal S, Feldman M. General anesthesia during excision of a mouse tumor accelerates postsurgical growth of metastases by suppression of natural killer cell activity. *Isr J Med Sci.* mai 1986;22(5):339-45.
77. Waxler B, Zhang X, Wezeman FH. Anesthetic agents modify tissue proteinase inhibitor content and tumor behavior. *J Lab Clin Med.* janv 1994;123(1):53-8.
78. Valcheva R, Stephanova E, Jordanova A, Pankov R, Altankov G, Lalchev Z. Effect of halothane on lung carcinoma cells A 549. *Chem Biol Interact.* 25 oct 2003;146(2):191-200.
79. Page GG, Ben-Eliyahu S. Increased surgery-induced metastasis and suppressed natural killer cell activity during proestrus/estrus in rats. *Breast Cancer Res Treat.* sept 1997;45(2):159-67.
80. Melamed R, Bar-Yosef S, Shakhar G, Shakhar K, Ben-Eliyahu S. Suppression of natural killer cell activity and promotion of tumor metastasis by ketamine, thiopental, and halothane, but not by propofol: mediating mechanisms and prophylactic measures. *Anesth Analg.* nov 2003;97(5):1331-9.
81. Huitink JM, Heimerikxs M, Nieuwland M, Loer SA, Brugman W, Velds A, et al. Volatile Anesthetics Modulate Gene Expression in Breast and Brain Tumor Cells. *Anesth Analg* Dec 2010. 2010;111(6):1411-5.
82. Mitsuhashi H, Shimizu R, Yokoyama MM. Suppressive effects of volatile anesthetics on cytokine release in human peripheral blood mononuclear cells. *Int J Immunopharmacol.* juin 1995;17(6):529-34.
83. Zhang Y, Dong Y, Wu X, Lu Y, Xu Z, Knapp A, et al. The Mitochondrial Pathway of Anesthetic Isoflurane-induced Apoptosis. *J Biol Chem.* 5 févr 2010;285(6):4025-37.
84. de Rossi LW, Brueckmann M, Rex S, Barderschneider M, Buhre W, Rossaint R. Xenon and isoflurane differentially modulate lipopolysaccharide-induced activation of the nuclear transcription factor KB and production of tumor necrosis factor- α and interleukin-6 in monocytes. *Anesth Analg.* avr 2004;98(4):1007-12, table of contents.
85. Ke JJ, Zhan J, Feng XB, Wu Y, Rao Y, Wang YL. A comparison of the effect of total intravenous anaesthesia with propofol and remifentanyl and inhalational anaesthesia with isoflurane on the release of pro- and

anti-inflammatory cytokines in patients undergoing open cholecystectomy. *Anaesth Intensive Care*. janv 2008;36(1):74-8.

86. Müller-Edenborn B, Roth-Z'graggen B, Bartnicka K, Borgeat A, Hoos A, Borsig L, et al. Volatile anesthetics reduce invasion of colorectal cancer cells through down-regulation of matrix metalloproteinase-9. *Anesthesiology*. août 2012;117(2):293-301.

87. Ecimovic P, McHugh B, Murray D, Doran P, Buggy DJ. Effects of sevoflurane on breast cancer cell function in vitro. *Anticancer Res*. oct 2013;33(10):4255-60.

88. Marana E, Russo A, Colicci S, Polidori L, Bevilacqua F, Viviani D, et al. Desflurane versus sevoflurane: a comparison on stress response. *Minerva Anesthesiol*. janv 2013;79(1):7-14.

89. Meyhoff CS, Jorgensen LN, Wetterslev J, Christensen KB, Rasmussen LS, PROXI Trial Group. Increased long-term mortality after a high perioperative inspiratory oxygen fraction during abdominal surgery: follow-up of a randomized clinical trial. *Anesth Analg*. oct 2012;115(4):849-54.

90. Xie H, Simon MC. Oxygen availability and metabolic reprogramming in cancer. *J Biol Chem*. 13 2017;292(41):16825-32.

91. Abels J, Kroes AC, Ermens AA, van Kapel J, Schoester M, Spijkers LJ, et al. Anti-leukemic potential of methyl-cobalamin inactivation by nitrous oxide. *Am J Hematol*. juin 1990;34(2):128-31.

92. Kroes AC, Lindemans J, Hagenbeek A, Abels J. Nitrous oxide reduces growth of experimental rat leukemia. *Leuk Res*. 1984;8(3):441-8.

93. Ermens AA, Schoester M, Spijkers LJ, Lindemans J, Abels J. Toxicity of methotrexate in rats preexposed to nitrous oxide. *Cancer Res*. 15 nov 1989;49(22):6337-41.

94. Crespo ML, Giménez A, Bas T, García C, Puertes IR, Viña JR. Effect of nitrous oxide and propofol on amino acid metabolism in neoplastic patients. *Nutr Cancer*. 1997;27(1):80-3.

95. Weber NC, Kandler J, Schlack W, Grueber Y, Frädorf J, Preckel B. Intermittent pharmacologic pretreatment by xenon, isoflurane, nitrous oxide, and the opioid morphine prevents tumor necrosis factor alpha-induced adhesion molecule expression in human umbilical vein endothelial cells. *Anesthesiology*. févr 2008;108(2):199-207.

96. Fleischmann E, Marschalek C, Schlemitz K, Dalton JE, Gruenberger T, Herbst F, et al. Nitrous oxide may not increase the risk of cancer recurrence after colorectal surgery: a follow-up of a randomized controlled trial. *BMC Anesthesiol*. 2009;9:1.

97. Mammoto T, Mukai M, Mammoto A, Yamanaka Y, Hayashi Y, Mashimo T, et al. Intravenous anesthetic, propofol inhibits invasion of cancer cells. *Cancer Lett*. 28 oct 2002;184(2):165-70.

98. Kushida A, Inada T, Shingu K. Enhancement of antitumor immunity after propofol treatment in mice. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2007;29(3-4):477-86.

99. Hofbauer R, Frass M, Salfinger H, Moser D, Hornykewycz S, Gmeiner B, et al. Propofol reduces the migration of human leukocytes through endothelial cell monolayers. *Crit Care Med*. sept 1999;27(9):1843-7.

100. Siddiqui RA, Zerouga M, Wu M, Castillo A, Harvey K, Zaloga GP, et al. Anticancer properties of propofol-docosahexaenoate and propofol-eicosapentaenoate on breast cancer cells. *Breast Cancer Res BCR*. 2005;7(5):R645-654.

101. Zhang X, Li F, Zheng Y, Wang X, Wang K, Yu Y, et al. Propofol Reduced Mammosphere Formation of Breast Cancer Stem Cells via PD-L1/Nanog In Vitro. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019:9078209.

102. Garib V, Niggemann B, Zänker KS, Brandt L, Kubens BS. Influence of non-volatile anesthetics on the migration behavior of the human breast cancer cell line MDA-MB-468. *Acta Anaesthesiol Scand.* août 2002;46(7):836-44.
103. Tian H-T, Duan X-H, Yang Y-F, Wang Y, Bai Q-L, Zhang X. Effects of propofol or sevoflurane anesthesia on the perioperative inflammatory response, pulmonary function and cognitive function in patients receiving lung cancer resection. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2017;21(23):5515-22.
104. Wigmore TJ, Mohammed K, Jhanji S. Long-term Survival for Patients Undergoing Volatile versus IV Anesthesia for Cancer Surgery: A Retrospective Analysis. *Anesthesiology.* janv 2016;124(1):69-79.
105. Yoo S, Lee H-B, Han W, Noh D-Y, Park S-K, Kim WH, et al. Total Intravenous Anesthesia versus Inhalation Anesthesia for Breast Cancer Surgery: A Retrospective Cohort Study. *Anesthesiology.* janv 2019;130(1):31-40.
106. Yap A, Lopez-Olivo MA, Dubowitz J, Hiller J, Riedel B, Global Onco-Anesthesia Research Collaboration Group. Anesthetic technique and cancer outcomes: a meta-analysis of total intravenous versus volatile anesthesia. *Can J Anaesth J Can Anesth.* mai 2019;66(5):546-61.
107. Absalom A, Pledger D, Kong A. Adrenocortical function in critically ill patients 24 h after a single dose of etomidate. *Anaesthesia.* sept 1999;54(9):861-7.
108. Wagner RL, White PF. Etomidate inhibits adrenocortical function in surgical patients. *Anesthesiology.* déc 1984;61(6):647-51.
109. Bentley MW, Stas JM, Johnson JM, Viet BC, Garrett N. Effects of preincisional ketamine treatment on natural killer cell activity and postoperative pain management after oral maxillofacial surgery. *AANA J.* déc 2005;73(6):427-36.
110. Chang Y, Chen T-L, Sheu J-R, Chen R-M. Suppressive effects of ketamine on macrophage functions. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1 avr 2005;204(1):27-35.
111. Chen T-L, Chang C-C, Lin Y-L, Ueng Y-F, Chen R-M. Signal-transducing mechanisms of ketamine-caused inhibition of interleukin-1 beta gene expression in lipopolysaccharide-stimulated murine macrophage-like Raw 264.7 cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1 oct 2009;240(1):15-25.
112. Kawasaki C, Kawasaki T, Ogata M, Nandate K, Shigematsu A. Ketamine isomers suppress superantigen-induced proinflammatory cytokine production in human whole blood. *Can J Anaesth J Can Anesth.* sept 2001;48(8):819-23.
113. Kawasaki T, Ogata M, Kawasaki C, Ogata J, Inoue Y, Shigematsu A. Ketamine suppresses proinflammatory cytokine production in human whole blood in vitro. *Anesth Analg.* sept 1999;89(3):665-9.
114. He H, Chen J, Xie WP, Cao S, Hu HY, Yang LQ, et al. Ketamine used as an anesthetic in human breast cancer therapy causes an undesirable side effect, upregulating anti-apoptosis protein Bcl-2 expression. *Genet Mol Res GMR.* 2013;12(2):1907-15.
115. Lundy J, Lovett EJ 3rd, Conran P. Pulmonary metastases, a potential biologic consequence of anesthetic-induced immunosuppression by thiopental. *Surgery.* août 1977;82(2):254-6.
116. Lovett EJ 3rd, Alderman J, Munster E, Lundy J. Suppressive effects of thiopental and halothane on specific arms of the immune response. *J Surg Oncol.* 1980;15(4):327-34.
117. Varani J, Lovett EJ 3rd, Lundy J. A model of tumor cell dormancy: effects of anesthesia and surgery. *J Surg Oncol.* 1981;17(1):9-14.

118. Lovett EJ 3rd, Varani J, Lundy J. Suppressor cells and increased primary tumor growth rate induced by thiopental. *J Surg Oncol.* janv 1983;22(1):26-32.
119. Duncan PG, Cullen BF, Ray-Keil L. Thiopental inhibition of tumor immunity. *Anesthesiology.* févr 1977;46(2):97-101.
120. Hofbauer R, Moser D, Salfinger H, Frass M, Kapiotis S. Thiopental inhibits migration of human leukocytes through human endothelial cell monolayers in vitro. *Intensive Care Med.* sept 1998;24(9):973-6.
121. Ben-Eliyahu S, Shakhar G, Rosenne E, Levinson Y, Beilin B. Hypothermia in barbiturate-anesthetized rats suppresses natural killer cell activity and compromises resistance to tumor metastasis: a role for adrenergic mechanisms. *Anesthesiology.* sept 1999;91(3):732-40.
122. Ichiyama T, Nishikawa M, Lipton JM, Matsubara T, Takashi H, Furukawa S. Thiopental inhibits NF-kappaB activation in human glioma cells and experimental brain inflammation. *Brain Res.* 17 août 2001;911(1):56-61.
123. Loop T, Liu Z, Humar M, Hoetzel A, Benzing A, Pahl HL, et al. Thiopental inhibits the activation of nuclear factor kappaB. *Anesthesiology.* mai 2002;96(5):1202-13.
124. Page GG, Blakely WP, Ben-Eliyahu S. Evidence that postoperative pain is a mediator of the tumor-promoting effects of surgery in rats. *Pain.* 1 févr 2001;90(1-2):191-9.
125. Sacerdote P, Franchi S, Panerai AE. Non-analgesic effects of opioids: mechanisms and potential clinical relevance of opioid-induced immunodepression. *Curr Pharm Des.* 2012;18(37):6034-42.
126. El Mouedden M, Meert TF. The impact of the opioids fentanyl and morphine on nociception and bone destruction in a murine model of bone cancer pain. *Pharmacol Biochem Behav.* mai 2007;87(1):30-40.
127. Shavit Y, Ben-Eliyahu S, Zeidel A, Beilin B. Effects of fentanyl on natural killer cell activity and on resistance to tumor metastasis in rats. Dose and timing study. *Neuroimmunomodulation.* 2004;11(4):255-60.
128. Beilin B, Shavit Y, Hart J, Mordashov B, Cohn S, Notti I, et al. Effects of Anesthesia Based on Large Versus Small Doses of Fentanyl on Natural Killer Cell Cytotoxicity in the Perioperative Period. *Anesth Analg* March 1996. 1996;82(3):492-7.
129. Yardeni IZ, Beilin B, Mayburd E, Alcalay Y, Bessler H. Relationship between fentanyl dosage and immune function in the postoperative period. *J Opioid Manag.* févr 2008;4(1):27-33.
130. Cronin AJ, Aucutt-Walter NM, Budinetz T, Bonafide CP, DiVittore NA, Gordin V, et al. Low-dose remifentanyl infusion does not impair natural killer cell function in healthy volunteers. *Br J Anaesth.* déc 2003;91(6):805-9.
131. Heine J, Jaeger K, Weingaertner N, Scheinichen D, Marx G, Piepenbrock S. Effects of different preparations of propofol, diazepam, and etomidate on human neutrophils in vitro. *Acta Anaesthesiol Scand.* févr 2001;45(2):213-20.
132. Hong J-Y, Yang SC, Yi J, Kil HK. Epidural ropivacaine and sufentanil and the perioperative stress response after a radical retropubic prostatectomy. *Acta Anaesthesiol Scand.* mars 2011;55(3):282-9.
133. Moeniralam HS, Endert E, Ackermans MT, Van Lanschot JJ, Sauerwein HP, Romijn JA. The opiate sufentanil alters the inflammatory, endocrine, and metabolic responses to endotoxin in dogs. *Am J Physiol.* sept 1998;275(3 Pt 1):E440-447.
134. Hofbauer R, Moser D, Salfinger H, Frass M, Kapiotis S. Sufentanil inhibits migration of human leukocytes through human endothelial cell monolayers. *Anesth Analg.* nov 1998;87(5):1181-5.

135. Simon RH, Arbo TE. Morphine increases metastatic tumor growth. *Brain Res Bull.* mars 1986;16(3):363-7.
136. Yeager MP, Colacchio TA. Effect of morphine on growth of metastatic colon cancer in vivo. *Arch Surg Chic Ill* 1960. avr 1991;126(4):454-6.
137. Sasamura T, Nakamura S, Iida Y, Fujii H, Murata J, Saiki I, et al. Morphine analgesia suppresses tumor growth and metastasis in a mouse model of cancer pain produced by orthotopic tumor inoculation. *Eur J Pharmacol.* 26 avr 2002;441(3):185-91.
138. Sacerdote P, Bianchi M, Gaspani L, Manfredi B, Maucione A, Terno G, et al. The effects of tramadol and morphine on immune responses and pain after surgery in cancer patients. *Anesth Analg.* juin 2000;90(6):1411-4.
139. Harimaya Y, Koizumi K, Andoh T, Nojima H, Kuraishi Y, Saiki I. Potential ability of morphine to inhibit the adhesion, invasion and metastasis of metastatic colon 26-L5 carcinoma cells. *Cancer Lett.* 10 déc 2002;187(1-2):121-7.
140. Tegeder I, Grösch S, Schmidt A, Häussler A, Schmidt H, Niederberger E, et al. G protein-independent G1 cell cycle block and apoptosis with morphine in adenocarcinoma cells: involvement of p53 phosphorylation. *Cancer Res.* 15 avr 2003;63(8):1846-52.
141. Hatsukari I, Hitosugi N, Matsumoto I, Nagasaka H, Sakagami H. Induction of early apoptosis marker by morphine in human lung and breast carcinoma cell lines. *Anticancer Res.* juin 2003;23(3B):2413-7.
142. Hatsukari I, Hitosugi N, Ohno R, Hashimoto K, Nakamura S, Satoh K, et al. Induction of apoptosis by morphine in human tumor cell lines in vitro. *Anticancer Res.* avr 2007;27(2):857-64.
143. Cheng W-F, Chen L-K, Chen C-A, Chang M-C, Hsiao P-N, Su Y-N, et al. Chimeric DNA Vaccine Reverses Morphine-Induced Immunosuppression and Tumorigenesis. *Mol Ther.* janv 2006;13(1):203-10.
144. Gaspani L, Bianchi M, Limioli E, Panerai AE, Sacerdote P. The analgesic drug tramadol prevents the effect of surgery on natural killer cell activity and metastatic colonization in rats. *J Neuroimmunol.* août 2002;129(1-2):18-24.
145. Frauenknecht J, Kirkham KR, Jacot-Guillarmod A, Albrecht E. Analgesic impact of intra-operative opioids vs. opioid-free anaesthesia: a systematic review and meta-analysis. *Anaesthesia.* mai 2019;74(5):651-62.
146. Lavand'homme P. Opioid-free anaesthesia: Pro: damned if you don't use opioids during surgery. *Eur J Anaesthesiol.* avr 2019;36(4):247-9.
147. Lirk P, Rathmell JP. Opioid-free anaesthesia: Con: it is too early to adopt opioid-free anaesthesia today. *Eur J Anaesthesiol.* avr 2019;36(4):250-4.
148. Veyckemans F. Opioid-free anaesthesia: Still a debate? *Eur J Anaesthesiol.* avr 2019;36(4):245-6.
149. Lavon H, Matzner P, Benbenishty A, Sorski L, Rossene E, Haldar R, et al. Dexmedetomidine promotes metastasis in rodent models of breast, lung, and colon cancers. *Br J Anaesth.* janv 2018;120(1):188-96.
150. Freeman J, Buggy DJ. Modelling the effects of perioperative interventions on cancer outcome: lessons from dexmedetomidine. *Br J Anaesth.* 2018;120(1):15-7.
151. Forget P, Berlière M, Poncelet A, De Kock M. Effect of clonidine on oncological outcomes after breast and lung cancer surgery. *Br J Anaesth.* 2018;121(1):103-4.
152. Amann A, Rieder J, Fleischer M, Niedermüller P, Hoffmann G, Amberger A, et al. The influence of atracurium, cisatracurium, and mivacurium on the proliferation of two human cell lines in vitro. *Anesth Analg.* sept 2001;93(3):690-6.

153. Rieder J, Lirk P, Bodrogi F, Sawires M, Gruber G, Hoffmann G. Cisatracurium, but not mivacurium, induces apoptosis in human umbilical vein endothelial cells in vitro. *Eur J Anaesthesiol.* janv 2005;22(1):16-9.
154. Russo P, Catassi A, Cesario A, Servent D. Development of novel therapeutic strategies for lung cancer: targeting the cholinergic system. *Curr Med Chem.* 2006;13(29):3493-512.
155. Di Padova M, Barbieri R, Fanciulli M, Arcuri E, Floridi A. Effect of local anesthetic ropivacaine on the energy metabolism of Ehrlich ascites tumor cells. *Oncol Res.* 1998;10(10):491-8.
156. Piegeler T, Votta-Velis EG, Liu G, Place AT, Schwartz DE, Beck-Schimmer B, et al. Antimetastatic Potential of Amide-linked Local Anesthetics. *Anesthesiology.* sept 2012;117(3):548-59.
157. Jose C, Bellance N, Chatelain EH, Benard G, Nouette-Gaulain K, Rossignol R. Antiproliferative activity of levobupivacaine and aminoimidazole carboxamide ribonucleotide on human cancer cells of variable bioenergetic profile. *Mitochondrion.* janv 2012;12(1):100-9.
158. Lucchinetti E, Awad AE, Rahman M, Feng J, Lou P-H, Zhang L, et al. Antiproliferative effects of local anesthetics on mesenchymal stem cells: potential implications for tumor spreading and wound healing. *Anesthesiology.* avr 2012;116(4):841-56.
159. Villar-Garea A, Fraga MF, Espada J, Esteller M. Procaine is a DNA-demethylating agent with growth-inhibitory effects in human cancer cells. *Cancer Res.* 15 août 2003;63(16):4984-9.
160. Mariggiò MA, Cafaggi S, Ottone M, Parodi B, Vannozzi MO, Mandys V, et al. Inhibition of cell growth, induction of apoptosis and mechanism of action of the novel platinum compound cis-diaminechloro-[2-(diethylamino) ethyl 4-amino-benzoate, N(4)]-chloride platinum (II) monohydrochloride monohydrate. *Invest New Drugs.* janv 2004;22(1):3-16.
161. Chamaraux-Tran T-N, Piegeler T. The Amide Local Anesthetic Lidocaine in Cancer Surgery—Potential Antimetastatic Effects and Preservation of Immune Cell Function? A Narrative Review. *Front Med [Internet].* 2017 [cité 7 avr 2019];4. Disponible sur: <http://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmed.2017.00235/full>
162. D'Agostino G, Saporito A, Cecchinato V, Silvestri Y, Borgeat A, Anselmi L, et al. Lidocaine inhibits cytoskeletal remodelling and human breast cancer cell migration. *Br J Anaesth.* 1 oct 2018;121(4):962-8.
163. Freeman J, Crowley PD, Foley AG, Gallagher HC, Iwasaki M, Ma D, et al. Effect of Perioperative Lidocaine and Cisplatin on Metastasis in a Murine Model of Breast Cancer Surgery. *Anticancer Res.* oct 2018;38(10):5599-606.
164. Johnson MZ, Crowley PD, Foley AG, Xue C, Connolly C, Gallagher HC, et al. Effect of perioperative lidocaine on metastasis after sevoflurane or ketamine-xylazine anaesthesia for breast tumour resection in a murine model. *Br J Anaesth.* juill 2018;121(1):76-85.
165. Forget P, De Kock M. L'anesthésie, l'analgésie et la modulation sympathique augmentent-elles l'incidence des récidives néoplasiques après chirurgie ? Une revue de la littérature centrée sur la modulation de l'activité des lymphocytes natural killer. *Ann Fr Anesth Réanimation.* sept 2009;28(9):751-68.
166. Tavaré AN, Perry NJS, Benzonana LL, Takata M, Ma D. Cancer recurrence after surgery: direct and indirect effects of anesthetic agents. *Int J Cancer J Int Cancer.* 15 mars 2012;130(6):1237-50.
167. Kurosawa S. Anesthesia in patients with cancer disorders. *Curr Opin Anaesthesiol.* juin 2012;25(3):376-84.
168. Grigoras A, Lee P, Sattar F, Shorten G. Perioperative intravenous lidocaine decreases the incidence of persistent pain after breast surgery. *Clin J Pain.* sept 2012;28(7):567-72.

169. Butterworth JF 4th, Strichartz GR. Molecular mechanisms of local anesthesia: a review. *Anesthesiology*. avr 1990;72(4):711-34.
170. Wood M. Plasma drug binding: implications for anesthesiologists. *Anesth Analg*. juill 1986;65(7):786-804.
171. Mather DLE, Cousins MJ. Local Anaesthetics and their Current Clinical Use. *Drugs*. 1 sept 1979;18(3):185-205.
172. Pagès H, de la Gastine B, Quedru-Aboane J, Guillemin M-G, Lelong-Boulouard V, Guillois B. Intoxication néonatale à la lidocaïne après analgésie par bloc des nerfs honteux : à propos de trois observations. *J Gynécologie Obstétrique Biol Reprod*. juin 2008;37(4):415-8.
173. Courtney KR. Mechanism of frequency-dependent inhibition of sodium currents in frog myelinated nerve by the lidocaine derivative GEA. *J Pharmacol Exp Ther*. nov 1975;195(2):225-36.
174. Hollmann MW, Durieux ME. Local anesthetics and the inflammatory response: a new therapeutic indication? *Anesthesiology*. sept 2000;93(3):858-75.
175. Blumenthal S, Borgeat A, Pasch T, Reyes L, Booy C, Lambert M, et al. Ropivacaine decreases inflammation in experimental endotoxin-induced lung injury. *Anesthesiology*. mai 2006;104(5):961-9.
176. Beloeil H, Ababneh Z, Chung R, Zurakowski D, Mulkern RV, Berde CB. Effects of bupivacaine and tetrodotoxin on carrageenan-induced hind paw inflammation in rats (Part 1): hyperalgesia, edema, and systemic cytokines. *Anesthesiology*. juill 2006;105(1):128-38.
177. Leduc C, Gentili ME, Estèbe J-P, Le Corre P, Moulinoux J-P, Ecoffey C. The effect of local anesthetics and amitriptyline on peroxidation in vivo in an inflammatory rat model: preliminary reports. *Anesth Analg*. oct 2002;95(4):992-6, table of contents.
178. Hollmann MW, Gross A, Jelacin N, Durieux ME. Local anesthetic effects on priming and activation of human neutrophils. *Anesthesiology*. juill 2001;95(1):113-22.
179. Svensson CI, Marsala M, Westerlund A, Calcutt NA, Campana WM, Freshwater JD, et al. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase in spinal microglia is a critical link in inflammation-induced spinal pain processing. *J Neurochem*. sept 2003;86(6):1534-44.
180. Tan Z, Dohi S, Ohguchi K, Nakashima S, Nozawa Y. Local anesthetics inhibit muscarinic receptor-mediated activation of extracellular signal-regulated kinases in rat pheochromocytoma PC12 cells. *Anesthesiology*. oct 1999;91(4):1014-24.
181. Yanagidate F, Strichartz GR. Bupivacaine inhibits activation of neuronal spinal extracellular receptor-activated kinase through selective effects on ionotropic receptors. *Anesthesiology*. avr 2006;104(4):805-14.
182. Dadure C, Motais F, Ricard C, Raux O, Troncin R, Capdevila X. Continuous peripheral nerve blocks at home for treatment of recurrent complex regional pain syndrome I in children. *Anesthesiology*. févr 2005;102(2):387-91.
183. Hahnenkamp K, Durieux ME, Hahnenkamp A, Schauerte SK, Hoenemann CW, Vegh V, et al. Local anaesthetics inhibit signalling of human NMDA receptors recombinantly expressed in *Xenopus laevis* oocytes: role of protein kinase C. *Br J Anaesth*. janv 2006;96(1):77-87.
184. Sugimoto M, Uchida I, Mashimo T. Local anaesthetics have different mechanisms and sites of action at the recombinant N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors. *Br J Pharmacol*. mars 2003;138(5):876-82.

185. Sztark F, Ouhabi R, Dabadie P, Mazat JP. Effects of the local anesthetic bupivacaine on mitochondrial energy metabolism: change from uncoupling to decoupling depending on the respiration state. *Biochem Mol Biol Int.* déc 1997;43(5):997-1003.
186. Nouette-Gaulain KMD, Sirvent PPhD, Canal-Raffin MPharmD, Morau DMD, Malgat MPhD, Molimard MMD, et al. Effects of Intermittent Femoral Nerve Injections of Bupivacaine, Levobupivacaine, and Ropivacaine on Mitochondrial Energy Metabolism and Intracellular Calcium Homeostasis in Rat Psoas Muscle. [Miscellaneous Article]. *Anesthesiol* May 2007. 2007;106(5):1026-34.
187. Werdehausen RMD, Braun SMD, Essmann FPhD, Schulze-Osthoff KPhD, Walczak HPhD, Lipfert PMD, et al. Lidocaine Induces Apoptosis via the Mitochondrial Pathway Independently of Death Receptor Signaling. [Miscellaneous Article]. *Anesthesiol* July 2007. 2007;107(1):136-43.
188. Bouaziz H, Aubrun F, Belbachir AA, Cuvillon P, Eisenberg E, Jochum D, et al. Échographie en anesthésie locorégionale. *Ann Fr Anesth Réanimation.* sept 2011;30(9):e33-5.
189. Colin C. Les blocs périphériques des membres chez l'adulte. *Ann Fr Anesth Réanimation.* juin 2003;22(6):567-81.
190. Les blocs périmédullaires chez l'adulte. *Ann Fr Anesth Réanimation.* juill 2007;26(7-8):720-52.
191. Di Gregorio G, Neal JM, Rosenquist RW, Weinberg GL. Clinical Presentation of Local Anesthetic Systemic Toxicity: A Review of Published Cases, 1979 to 2009. [Miscellaneous Article]. *Reg Anesth Pain Med* MarchApril 2010. 2010;35(2):181-7.
192. Dillane D, Finucane BT. Local anesthetic systemic toxicity. *Can J Anaesth J Can Anesth.* avr 2010;57(4):368-80.
193. Weinberg GL. Lipid Emulsion Infusion: Resuscitation for Local Anesthetic and Other Drug Overdose. *Anesthesiology.* juill 2012;117(1):180-7.
194. Weinberg GL, VadeBoncouer T, Ramaraju GA, Garcia-Amaro MF, Cwik MJ. Pretreatment or resuscitation with a lipid infusion shifts the dose-response to bupivacaine-induced asystole in rats. *Anesthesiology.* avr 1998;88(4):1071-5.
195. Weinberg G, Ripper R, Feinstein DL, Hoffman W. Lipid emulsion infusion rescues dogs from bupivacaine-induced cardiac toxicity. *Reg Anesth Pain Med.* juin 2003;28(3):198-202.
196. Weinberg GL, Ripper R, Murphy P, Edelman LB, Hoffman W, Strichartz G, et al. Lipid infusion accelerates removal of bupivacaine and recovery from bupivacaine toxicity in the isolated rat heart. *Reg Anesth Pain Med.* août 2006;31(4):296-303.
197. Schönfeld P, Sztark F, Slimani M, Dabadie P, Mazat JP. Is bupivacaine a decoupler, a protonophore or a proton-leak-inducer? *FEBS Lett.* 15 juin 1992;304(2-3):273-6.
198. Silveira L, Hirabara SM, Alberici LC, Lambertucci RH, Peres CM, Takahashi HK, et al. Effect of lipid infusion on metabolism and force of rat skeletal muscles during intense contractions. *Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol.* 2007;20(1-4):213-26.
199. Coat M, Pennec J-P, Guillouet M, Arvieux C-C, Gueret G. Les effets hémodynamiques des solutions lipidiques dans la toxicité systémique aux anesthésiques locaux peuvent être expliqués par une activation directe des canaux calciques potentiel-dépendants. *Ann Fr Anesth Réanimation.* sept 2010;29(9):661.
200. Mazoit J-X, Le Guen R, Beloeil H, Benhamou D. Binding of long-lasting local anesthetics to lipid emulsions. *Anesthesiology.* févr 2009;110(2):380-6.

201. BREMER G, EKMANNER S. Xylocaine; a new local anaesthetic. *Br Dent J*. 17 déc 1948;85(12):278-81.
202. Rosen MR, Hoffman BF. Mechanisms of action of antiarrhythmic drugs. *Circ Res*. janv 1973;32(1):1-8.
203. Choquet O, Zetlaoui PJ. Techniques d'anesthésie locorégionale du membre inférieur. [Httpwwwem-Premiumcomdata/traiteman36-30022](http://www.em-premium.com/data/traiteman36-30022) [Internet]. [cité 18 févr 2014]; Disponible sur: <http://www.em-premium.com/article/27773>
204. Zetlaoui P-J, Choquet O. Techniques d'anesthésie locorégionale du membre supérieur. *EMC - Anesth-Réanimation*. janv 2013;10(1):1-28.
205. Viel E, Gentili M, Ripart J, Eledjam J-J. Rachianesthésie chez l'adulte (obstétrique et pédiatrie exclues). *EMC - Anesth-Réanimation*. janv 2010;7(2):1-17.
206. Verzilli D, Viel E, Chanques G, Beaussier M, Delay J-M, Jaber S, et al. Anesthésie et analgésie péridurales (obstétrique exclue). *EMC - Anesth-Réanimation*. janv 2009;6(4):1-24.
207. Lev R, Rosen P. Prophylactic lidocaine use preintubation: A review. *J Emerg Med*. juillet 1994;12(4):499-506.
208. Marret E, Rolin M, Beaussier M, Bonnet F. Meta-analysis of intravenous lidocaine and postoperative recovery after abdominal surgery. *Br J Surg*. 2008;95(11):1331–1338.
209. Picard P, Tramèr MR. Prevention of pain on injection with propofol: a quantitative systematic review. *Anesth Analg*. avr 2000;90(4):963-9.
210. Attal N, Gaudé V, Brasseur L, Dupuy M, Guirimand F, Parker F, et al. Intravenous lidocaine in central pain: a double-blind, placebo-controlled, psychophysical study. *Neurology*. 8 févr 2000;54(3):564-74.
211. Tremont-Lukats IW, Challapalli V, McNicol EDRp, Lau J, Carr DB. Systemic Administration of Local Anesthetics to Relieve Neuropathic Pain: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Anesth Analg* Dec 2005. 2005;101(6):1738-49.
212. Wood JN, Boorman JP, Okuse K, Baker MD. Voltage-gated sodium channels and pain pathways. *J Neurobiol*. oct 2004;61(1):55-71.
213. Kalso E. Sodium channel blockers in neuropathic pain. *Curr Pharm Des*. 2005;11(23):3005-11.
214. Osawa Y, Oda A, Iida H, Tanahashi S, Dohi S. The effects of class Ic antiarrhythmics on tetrodotoxin-resistant Na⁺ currents in rat sensory neurons. *Anesth Analg*. août 2004;99(2):464-71, table of contents.
215. Hollmann MW, Ritter CH, Henle P, de Klaver M, Kamatchi GL, Durieux ME. Inhibition of m3 muscarinic acetylcholine receptors by local anaesthetics. *Br J Pharmacol*. mai 2001;133(1):207-16.
216. Biella G, Sotgiu ML. Central effects of systemic lidocaine mediated by glycine spinal receptors: an iontophoretic study in the rat spinal cord. *Brain Res*. 19 févr 1993;603(2):201-6.
217. Cohen SP, Mao J. Is the analgesic effect of systemic lidocaine mediated through opioid receptors? *Acta Anaesthesiol Scand*. août 2003;47(7):910-1.
218. Nagy I, Woolf CJ. Lignocaine selectively reduces C fibre-evoked neuronal activity in rat spinal cord in vitro by decreasing N-methyl-D-aspartate and neurokinin receptor-mediated post-synaptic depolarizations; implications for the development of novel centrally acting analgesics. *Pain*. janv 1996;64(1):59-70.
219. Rooney BA, Crown ED, Hulsebosch CE, McAdoo DJ. Preemptive analgesia with lidocaine prevents Failed Back Surgery Syndrome. *Exp Neurol*. avr 2007;204(2):589-96.

220. Lin S-C, Yeh J-H, Chen C-L, Chou S-H, Tsai Y-J. Effects of local lidocaine treatment before and after median nerve injury on mechanical hypersensitivity and microglia activation in rat cuneate nucleus. *Eur J Pain Lond Engl.* avr 2011;15(4):359-67.
221. Fernandes Fraceto L, Spisni A, Schreier S, de Paula E. Differential effects of uncharged aminoamide local anesthetics on phospholipid bilayers, as monitored by ¹H-NMR measurements. *Biophys Chem.* 1 mai 2005;115(1):11-8.
222. Kitagawa N, Oda M, Totoki T. Possible mechanism of irreversible nerve injury caused by local anesthetics: detergent properties of local anesthetics and membrane disruption. *Anesthesiology.* avr 2004;100(4):962-7.
223. Aydin ON, Eyigor M, Aydin N. Antimicrobial activity of ropivacaine and other local anaesthetics. *Eur J Anaesthesiol.* oct 2001;18(10):687-94.
224. Chandan SS, Faoagali J, Wainwright CE. Sensitivity of respiratory bacteria to lignocaine. *Pathology (Phila).* août 2005;37(4):305-7.
225. de Klaver MJM, Buckingham M-G, Rich GF. Lidocaine attenuates cytokine-induced cell injury in endothelial and vascular smooth muscle cells. *Anesth Analg.* août 2003;97(2):465-70, table of contents.
226. Cassuto J, Sinclair R, Bonderovic M. Anti-inflammatory properties of local anesthetics and their present and potential clinical implications. *Acta Anaesthesiol Scand.* mars 2006;50(3):265-82.
227. Waller ES. Pharmacokinetic principles of lidocaine dosing in relation to disease state. *J Clin Pharmacol.* avr 1981;21(4):181-94.
228. Beaussier M, Delbos A, Maurice-Szamburski A, Ecoffey C, Mercadal L. Perioperative Use of Intravenous Lidocaine. *Drugs.* août 2018;78(12):1229-46.
229. Rowland M, Thomson PD, Guichard A, Melmon KL. Disposition kinetics of lidocaine in normal subjects. *Ann N Y Acad Sci.* 6 juill 1971;179:383-98.
230. Thomson PD, Melmon KL, Richardson JA, Cohn K, Steinbrunn W, Cudihee R, et al. Lidocaine pharmacokinetics in advanced heart failure, liver disease, and renal failure in humans. *Ann Intern Med.* avr 1973;78(4):499-508.
231. Saadawy IM, Kaki AM, Abd El Latif AA, Abd-Elmaksoud AM, Tolba OM. Lidocaine vs. magnesium: effect on analgesia after a laparoscopic cholecystectomy. *Acta Anaesthesiol Scand.* mai 2010;54(5):549-56.
232. De Oliveira GS Jr, Duncan K, Fitzgerald P, Nader A, Gould RW, McCarthy RJ. Systemic lidocaine to improve quality of recovery after laparoscopic bariatric surgery: a randomized double-blinded placebo-controlled trial. *Obes Surg.* févr 2014;24(2):212-8.
233. Terkawi AS, Sharma S, Durieux ME, Thammishetti S, Brenin D, Tiouririne M. Perioperative lidocaine infusion reduces the incidence of post-mastectomy chronic pain: a double-blind, placebo-controlled randomized trial. *Pain Physician.* avr 2015;18(2):E139-146.
234. Khan JS, Hodgson N, Choi S, Reid S, Paul JE, Hong NJL, et al. Perioperative Pregabalin and Intraoperative Lidocaine Infusion to Reduce Persistent Neuropathic Pain After Breast Cancer Surgery: A Multicenter, Factorial, Randomized, Controlled Pilot Trial. *J Pain Off J Am Pain Soc.* 5 mars 2019;
235. Callesen T, Bech K, Kehlet H. One-thousand consecutive inguinal hernia repairs under unmonitored local anesthesia. *Anesth Analg.* 2001;93(6):1373-6.

236. Marret E, Vigneau A, Salengro A, Noirot A, Bonnet F. Efficacité des techniques d'analgésie locorégionale après chirurgie du sein : une méta-analyse. *Ann Fr Anesth Réanimation*. sept 2006;25(9):947-54.
237. Vigneau A, Salengro A, Berger J, Rouzier R, Barranger E, Marret E, et al. A double blind randomized trial of wound infiltration with ropivacaine after breast cancer surgery with axillary nodes dissection. *BMC Anesthesiol*. 24 nov 2011;11:23.
238. Tasmuth T, Kataja M, Blomqvist C, von Smitten K, Kalso E. Treatment-related factors predisposing to chronic pain in patients with breast cancer--a multivariate approach. *Acta Oncol Stockh Swed*. 1997;36(6):625-30.
239. Schell SR. Patient outcomes after axillary lymph node dissection for breast cancer: use of postoperative continuous local anesthesia infusion. *J Surg Res*. juill 2006;134(1):124-32.
240. Sidiropoulou T, Buonomo O, Fabbi E, Silvi MB, Kostopanagiotou G, Sabato AF, et al. A Prospective Comparison of Continuous Wound Infiltration with Ropivacaine Versus Single-Injection Paravertebral Block After Modified Radical Mastectomy. *Anesth Analg*. 1 mars 2008;106(3):997-1001.
241. Rosaeg OPMB, Bell MMD, Cicutti NJ, Dennehy KCMB, Lui ACPMD, Krepski B. Pre-Incision Infiltration With Lidocaine Reduces Pain and Opioid Consumption After Reduction Mammoplasty. *Reg Anesth Pain Med* NovemberDecember 1998. 1998;23(6):575-9.
242. Jonnavithula N, Khandeliah H, Durga P, Ramachandran G. Role of wound instillation with bupivacaine through surgical drains for postoperative analgesia in modified radical mastectomy. *Indian J Anaesth*. janv 2015;59(1):15-20.
243. Khpal M, Miller JRC, Petrovic Z, Hassanally D. Local anesthetic delivery via surgical drain provides improved pain control versus direct skin infiltration following axillary node dissection for breast cancer. *Breast Cancer Tokyo Jpn*. 26 oct 2017;
244. Boughey JC, Goravanchi F, Parris RN, Kee SS, Kowalski AM, Frenzel JC, et al. Prospective randomized trial of paravertebral block for patients undergoing breast cancer surgery. *Am J Surg*. nov 2009;198(5):720-5.
245. Moller JF, Nikolajsen L, Rodt SA, Ronning H, Carlsson PS. Thoracic paravertebral block for breast cancer surgery: a randomized double-blind study. *Anesth Analg*. déc 2007;105(6):1848-51, table of contents.
246. Kairaluoma PM, Bachmann MS, Rosenberg PH, Pere PJ. Preincisional paravertebral block reduces the prevalence of chronic pain after breast surgery. *Anesth Analg*. sept 2006;103(3):703-8.
247. Blanco R. The « pecs block »: a novel technique for providing analgesia after breast surgery. *Anaesthesia*. sept 2011;66(9):847-8.
248. Blanco R, Fajardo M, Parras Maldonado T. Ultrasound description of Pecs II (modified Pecs I): a novel approach to breast surgery. *Rev Esp Anesthesiol Reanim*. nov 2012;59(9):470-5.
249. Wahba SS, Kamal SM. Thoracic paravertebral block versus pectoral nerve block for analgesia after breast surgery. *Egypt J Anaesth*. avr 2014;30(2):129-35.
250. Blanco R, Parras T, McDonnell JG, Prats-Galino A. Serratus plane block: a novel ultrasound-guided thoracic wall nerve block. *Anaesthesia*. 2013;68(11):1107-13.
251. Chamaraux-Tran T-N, Mathelin C, Aprahamian M, Joshi GP, Tomasetto C, Diemunsch P, et al. Antitumor Effects of Lidocaine on Human Breast Cancer Cells: An In Vitro and In Vivo Experimental Trial. *Anticancer Res*. 1 janv 2018;38(1):95-105.
252. Tapani E, Taavitsainen M, Lindros K, Vehmas T, Lehtonen E. Toxicity of ethanol in low concentrations. Experimental evaluation in cell culture. *Acta Radiol Stockh Swed* 1987. nov 1996;37(6):923-6.

253. Castañeda F, Kinne RK. Cytotoxicity of millimolar concentrations of ethanol on HepG2 human tumor cell line compared to normal rat hepatocytes in vitro. *J Cancer Res Clin Oncol.* sept 2000;126(9):503-10.
254. Wang Y, Xu M, Ke Z-J, Luo J. Cellular and molecular mechanisms underlying alcohol-induced aggressiveness of breast cancer. *Pharmacol Res.* 2017;115:299-308.
255. Gao S-Y, Li J, Wang L, Sun Q-J, Gong Y-F, Gang J, et al. Ethanol but not aqueous extracts of tubers of *Sauromatum Giganteum*(Engl.) Cusimano and Hett inhibit cancer cell proliferation. *Asian Pac J Cancer Prev APJCP.* 2014;15(24):10613-9.
256. Park SE, Shin WT, Park C, Hong SH, Kim G-Y, Kim SO, et al. Induction of apoptosis in MDA-MB-231 human breast carcinoma cells with an ethanol extract of *Cyperus rotundus* L. by activating caspases. *Oncol Rep.* déc 2014;32(6):2461-70.
257. Chamaraux-Tran T-N, Beloeil H. Solvent Matters! *Anesthesiology.* 2018;128(2):422-3.
258. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* décembre 1983;65(1-2):55-63.
259. Mitchell P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature.* 8 juill 1961;191:144-8.
260. Boyer PD, Kohlbrenner WE, McIntosh DB, Smith LT, O'Neal CC. ATP and ADP modulations of catalysis by F1 and Ca²⁺, Mg²⁺-ATPases. *Ann N Y Acad Sci.* 1982;402:65-83.
261. Abrahams JP, Leslie AGW, Lutter R, Walker JE. Structure at 2.8 Å resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature.* 1994;370(6491):621-8.
262. St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ, Brand MD. Topology of Superoxide Production from Different Sites in the Mitochondrial Electron Transport Chain. *J Biol Chem.* 22 nov 2002;277(47):44784-90.
263. Hansford RG, Hogue BA, Mildaziene V. Dependence of H₂O₂ formation by rat heart mitochondria on substrate availability and donor age. *J Bioenerg Biomembr.* févr 1997;29(1):89-95.
264. Charles A -L, Guilbert A -S, Bouitbir J, Goette-Di Marco P, Enache I, Zoll J, et al. Effect of postconditioning on mitochondrial dysfunction in experimental aortic cross-clamping. *Br J Surg.* 1 avr 2011;98(4):511-6.
265. Pipinos II, Sharov VG, Shepard AD, Anagnostopoulos PV, Katsamouris A, Todor A, et al. Abnormal mitochondrial respiration in skeletal muscle in patients with peripheral arterial disease. *J Vasc Surg.* oct 2003;38(4):827-32.
266. Zuo L, Clanton TL. Reactive oxygen species formation in the transition to hypoxia in skeletal muscle. *Am J Physiol - Cell Physiol.* juillet 2005;289(1):C207-16.
267. Bravard A, Bonnard C, Durand A, Chauvin M-A, Favier R, Vidal H, et al. Inhibition of xanthine oxidase reduces hyperglycemia-induced oxidative stress and improves mitochondrial alterations in skeletal muscle of diabetic mice. *Am J Physiol - Endocrinol Metab.* 1 mars 2011;300(3):E581-91.
268. Hoeks J, Hesselink MKC, Schrauwen P. Involvement of UCP3 in mild uncoupling and lipotoxicity. *Exp Gerontol.* Juillet 2006;41(7):658-62.
269. Yuzefovych LV, Solodushko VA, Wilson GL, Rachek LI. Protection from Palmitate-Induced Mitochondrial DNA Damage Prevents from Mitochondrial Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunction, Apoptosis, and Impaired Insulin Signaling in Rat L6 Skeletal Muscle Cells. *Endocrinology* [Internet]. 29 nov 2011 [cité 20 déc 2011]; Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22128025>

270. Cerqueira FM, Laurindo FRM, Kowaltowski AJ. Mild Mitochondrial Uncoupling and Calorie Restriction Increase Fasting eNOS, Akt and Mitochondrial Biogenesis. *PLoS ONE*. 31 mars 2011;6(3):e18433.
271. Korshunov SS, Skulachev VP, Starkov AA. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett*. 13 oct 1997;416(1):15-8.
272. Mailloux RJ, Harper M-E. Uncoupling proteins and the control of mitochondrial reactive oxygen species production. *Free Radic Biol Med*. 15 sept 2011;51(6):1106-15.
273. Nicholls DG. The Influence of Respiration and ATP Hydrolysis on the Proton-Electrochemical Gradient across the Inner Membrane of Rat-Liver Mitochondria as Determined by Ion Distribution. *Eur J Biochem*. 1 déc 1974;50(1):305-15.
274. Brand MD. The proton leak across the mitochondrial inner membrane. *Biochim Biophys Acta*. 25 juill 1990;1018(2-3):128-33.
275. Fontaine EM, Moussa M, Devin A, Garcia J, Ghisolfi J, Rigoulet M, et al. Effect of polyunsaturated fatty acids deficiency on oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta*. 30 sept 1996;1276(3):181-7.
276. Nicholls DG, Bernson VS, Heaton GM. The identification of the component in the inner membrane of brown adipose tissue mitochondria responsible for regulating energy dissipation. *Experientia Suppl*. 1978;32:89-93.
277. Mzilikazi N, Jastroch M, Meyer CW, Klingenspor M. The molecular and biochemical basis of nonshivering thermogenesis in an African endemic mammal, *Elephantulus myurus*. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol*. 1 nov 2007;293(5):R2120-7.
278. Esteves TC, Brand MD. The reactions catalysed by the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. *Biochim Biophys Acta BBA - Bioenerg*. Août 2005;1709(1):35-44.
279. Papa S, Guerrieri F, Simone S, Lorusso M. Action of local anaesthetics on passive and energy-linked ion translocation in the inner mitochondrial membrane. *J Bioenerg*. déc 1972;3(6):553-68.
280. Garlid KD, Nakashima RA. Studies on the mechanism of uncoupling by amine local anesthetics. Evidence for mitochondrial proton transport mediated by lipophilic ion pairs. *J Biol Chem*. 10 juill 1983;258(13):7974-80.
281. Dabadie P, Bendriss P, Erny P, Mazat J-P. Uncoupling effects of local anesthetics on rat liver mitochondria. *FEBS Lett*. décembre 1987;226(1):77-82.
282. Floridi A, Padova MD, Barbieri R, Arcuri E. Effect of local anesthetic ropivacaine on isolated rat liver mitochondria. *Biochem Pharmacol*. 15 sept 1999;58(6):1009-16.
283. Sun X, Garlid KD. On the mechanism by which bupivacaine conducts protons across the membranes of mitochondria and liposomes. *J Biol Chem*. 25 sept 1992;267(27):19147-54.
284. van Dam K, Shinohara Y, Unami A, Yoshida K, Terada H. Slipping pumps or proton leaks in oxidative phosphorylation: The local anesthetic bupivacaine causes slip in cytochrome c oxidase of mitochondria. *FEBS Lett*. décembre 1990;277(1-2):131-3.
285. Borowicz S, Van Scoyk M, Avasarala S, Karuppusamy Rathinam MK, Tauler J, Bikkavilli RK, et al. The Soft Agar Colony Formation Assay. *J Vis Exp JoVE* [Internet]. 27 oct 2014 [cité 5 avr 2019];(92). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4353381/>

286. Huang DW, Sherman BT, Tan Q, Collins JR, Alvord WG, Roayaei J, et al. The DAVID Gene Functional Classification Tool: a novel biological module-centric algorithm to functionally analyze large gene lists. *Genome Biol.* 2007;8(9):R183.
287. Herwig R, Hardt C, Lienhard M, Kamburov A. Analyzing and interpreting genome data at the network level with ConsensusPathDB. *Nat Protoc.* 8 sept 2016;11(10):1889-907.
288. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 25 oct 2005;102(43):15545-50.
289. Jiang Y, Gou H, Zhu J, Tian S, Yu L. Lidocaine inhibits the invasion and migration of TRPV6-expressing cancer cells by TRPV6 downregulation. *Oncol Lett.* août 2016;12(2):1164-70.
290. Chang Y-C, Hsu Y-C, Liu C-L, Huang S-Y, Hu M-C, Cheng S-P. Local Anesthetics Induce Apoptosis in Human Thyroid Cancer Cells through the Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway. *PloS One.* 2014;9(2):e89563.
291. Liu Y, Beyer A, Aebersold R. On the Dependency of Cellular Protein Levels on mRNA Abundance. *Cell.* 21 avr 2016;165(3):535-50.
292. Hausser J, Mayo A, Keren L, Alon U. Central dogma rates and the trade-off between precision and economy in gene expression. *Nat Commun.* 08 2019;10(1):68.
293. Li JJ, Biggin MD. Gene expression. Statistics requantitates the central dogma. *Science.* 6 mars 2015;347(6226):1066-7.
294. Li JJ, Chew G-L, Biggin MD. Quantitating translational control: mRNA abundance-dependent and independent contributions and the mRNA sequences that specify them. *Nucleic Acids Res.* 16 nov 2017;45(20):11821-36.
295. Gedeon T, Bokes P. Delayed protein synthesis reduces the correlation between mRNA and protein fluctuations. *Biophys J.* 8 août 2012;103(3):377-85.
296. Brockmann R, Beyer A, Heinisch JJ, Wilhelm T. Posttranscriptional expression regulation: what determines translation rates? *PLoS Comput Biol.* 23 mars 2007;3(3):e57.
297. Jovanovic M, Rooney MS, Mertins P, Przybylski D, Chevrier N, Satija R, et al. Immunogenetics. Dynamic profiling of the protein life cycle in response to pathogens. *Science.* 6 mars 2015;347(6226):1259038.
298. He R-Z, Luo D-X, Mo Y-Y. Emerging roles of lncRNAs in the post-transcriptional regulation in cancer. *Genes Dis.* 11 févr 2019;6(1):6-15.
299. Wessely F, Bartl M, Guthke R, Li P, Schuster S, Kaleta C. Optimal regulatory strategies for metabolic pathways in *Escherichia coli* depending on protein costs. *Mol Syst Biol.* 19 juill 2011;7:515.
300. Nieß A, Siemann-Herzberg M, Takors R. Protein production in *Escherichia coli* is guided by the trade-off between intracellular substrate availability and energy cost. *Microb Cell Factories.* 17 janv 2019;18(1):8.
301. Cooper S. Rethinking cell-cycle-dependent gene expression in *Schizosaccharomyces pombe*. *Antonie Van Leeuwenhoek.* nov 2017;110(11):1485-91.
302. Boone CHT, Grove RA, Adamcova D, Seravalli J, Adamec J. Oxidative stress, metabolomics profiling, and mechanism of local anesthetic induced cell death in yeast. *Redox Biol.* août 2017;12:139-49.
303. Gac GL, Angenard G, Clément B, Laviolle B, Coulouarn C, Beloeil H. Local Anesthetics Inhibit the Growth of Human Hepatocellular Carcinoma Cells. *Anesth Analg.* 1 nov 2017;125(5):1600-9.

304. Raveh A, Margaliot M, Sontag ED, Tuller T. A model for competition for ribosomes in the cell. *J R Soc Interface.* mars 2016;13(116).
305. Mather WH, Hasty J, Tsimring LS, Williams RJ. Translational cross talk in gene networks. *Biophys J.* 4 juin 2013;104(11):2564-72.
306. Rodnina MV. The ribosome in action: Tuning of translational efficiency and protein folding. *Protein Sci.* 2016;25(8):1390-406.
307. Beigh MA, Showkat M, Bashir B, Bashir A, Hussain M ul, Andrabi KI. Growth inhibition by bupivacaine is associated with inactivation of ribosomal protein S6 kinase 1. *BioMed Res Int.* 2014;2014:831845.
308. Jose C, Bellance N, Chatelain EH, Benard G, Nouette-Gaulain K, Rossignol R. Antiproliferative activity of levobupivacaine and aminoimidazole carboxamide ribonucleotide on human cancer cells of variable bioenergetic profile. *Mitochondrion.* janv 2012;12(1):100-9.
309. Li K, Yang J, Han X. Lidocaine Sensitizes the Cytotoxicity of Cisplatin in Breast Cancer Cells via Up-Regulation of RAR β 2 and RASSF1A Demethylation. *Int J Mol Sci.* 17 déc 2014;15(12):23519-36.
310. Kuo C-Y, Cheng C-T, Hou P, Lin Y-P, Ma H, Chung Y, et al. HIF-1-alpha links mitochondrial perturbation to the dynamic acquisition of breast cancer tumorigenicity. *Oncotarget.* 4 avr 2016;7(23):34052-69.
311. Wang H-W, Wang L-Y, Jiang L, Tian S-M, Zhong T-D, Fang X-M. Amide-linked local anesthetics induce apoptosis in human non-small cell lung cancer. *J Thorac Dis.* oct 2016;8(10):2748-57.
312. Wishart DS, Mandal R, Stanislaus A, Ramirez-Gaona M. Cancer Metabolomics and the Human Metabolome Database. *Metabolites* [Internet]. 2 mars 2016 [cité 25 juin 2017];6(1). Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4812339/>
313. Chae EY, Shin HJ, Kim S, Baek H-M, Yoon D, Kim S, et al. The Role of High-Resolution Magic Angle Spinning 1H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy for Predicting the Invasive Component in Patients with Ductal Carcinoma In Situ Diagnosed on Preoperative Biopsy. *PLoS ONE* [Internet]. 25 août 2016 [cité 25 juin 2017];11(8). Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4999265/>
314. Harayama T, Shindou H, Shimizu T. Biosynthesis of phosphatidylcholine by human lysophosphatidylcholine acyltransferase 1. *J Lipid Res.* 1 sept 2009;50(9):1824-31.
315. Bizzarri M, Dinicola S, Bevilacqua A, Cucina A. Broad Spectrum Anticancer Activity of Myo-Inositol and Inositol Hexakisphosphate. *Int J Endocrinol.* 2016;2016:e5616807.
316. Lampa M, Arlt H, He T, Ospina B, Reeves J, Zhang B, et al. Glutaminase is essential for the growth of triple-negative breast cancer cells with a deregulated glutamine metabolism pathway and its suppression synergizes with mTOR inhibition. *PLOS ONE.* 26 sept 2017;12(9):e0185092.
317. Boggon TJ, Eck MJ. Structure and regulation of Src family kinases. *Oncogene.* 2004;23(48):7918-27.
318. Guarino M. Src signaling in cancer invasion. *J Cell Physiol.* 2010;223(1):14-26.
319. Storr SJ, Thompson N, Pu X, Zhang Y, Martin SG. Calpain in Breast Cancer: Role in Disease Progression and Treatment Response. *Pathobiology.* 2015;82(3-4):133-41.
320. Cortesio CL, Chan KT, Perrin BJ, Burton NO, Zhang S, Zhang Z-Y, et al. Calpain 2 and PTP1B function in a novel pathway with Src to regulate invadopodia dynamics and breast cancer cell invasion. *J Cell Biol.* 10 mars 2008;180(5):957-71.

321. Piegeler T, Votta-Velis EG, Liu G, Place AT, Schwartz DE, Beck-Schimmer B, et al. Antimetastatic potential of amide-linked local anesthetics: inhibition of lung adenocarcinoma cell migration and inflammatory Src signaling independent of sodium channel blockade. *Anesthesiology*. sept 2012;117(3):548-59.
322. Xing W, Chen D-T, Pan J-H, Chen Y-H, Yan Y, Li Q, et al. Lidocaine Induces Apoptosis and Suppresses Tumor Growth in Human Hepatocellular Carcinoma Cells In Vitro and in a Xenograft Model In Vivo. *Anesthesiology*. mai 2017;126(5):868-81.
323. Chang Y-C, Liu C-L, Chen M-J, Hsu Y-W, Chen S-N, Lin C-H, et al. Local anesthetics induce apoptosis in human breast tumor cells. *Anesth Analg*. janv 2014;118(1):116-24.
324. Zapata-Morin PA, Sierra-Valdez FJ, Ruiz-Suárez JC. The interaction of local anesthetics with lipid membranes. *J Mol Graph Model*. 1 sept 2014;53:200-5.
325. Mildner J, Wnętrzak A, Dynarowicz-Latka P. Cholesterol and Cardiolipin Importance in Local Anesthetics-Membrane Interactions: The Langmuir Monolayer Study. *J Membr Biol*. févr 2019;252(1):31-9.
326. Tsuchiya H, Ueno T, Mizogami M, Takakura K. Do local anesthetics interact preferentially with membrane lipid rafts? Comparative interactivities with raft-like membranes. *J Anesth*. août 2010;24(4):639-42.
327. Bandejas C, Serro AP, Luzyanin K, Fernandes A, Saramago B. Anesthetics interacting with lipid rafts. *Eur J Pharm Sci*. 23 janv 2013;48(1):153-65.
328. Koshino I, Takakuwa Y. Disruption of lipid rafts by lidocaine inhibits erythrocyte invasion by *Plasmodium falciparum*. *Exp Parasitol*. déc 2009;123(4):381-3.
329. Liu X-X, Liu W-D, Wang L, Zhu B, Shi X, Peng Z-X, et al. Roles of flotillins in tumors. *J Zhejiang Univ Sci B*. mars 2018;19(3):171-82.
330. Tappenbeck K, Schmidt S, Feige K, Naim HY, Huber K. Lidocaine effect on flotillin-2 distribution in detergent-resistant membranes of equine jejunal smooth muscle in vitro. *Vet J Lond Engl* 1997. mai 2014;200(2):325-7.
331. Brisson L, Driffort V, Benoist L, Poet M, Counillon L, Antelmi E, et al. NaV1.5 Na⁺ channels allosterically regulate the NHE-1 exchanger and promote the activity of breast cancer cell invadopodia. *J Cell Sci*. 1 nov 2013;126(21):4835-42.
332. Besson P, Driffort V, Bon É, Gradek F, Chevalier S, Roger S. How do voltage-gated sodium channels enhance migration and invasiveness in cancer cells? *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr*. oct 2015;1848(10, Part B):2493-501.
333. Roger S, Gillet L, Le Guennec J-Y, Besson P. Voltage-gated sodium channels and cancer: is excitability their primary role? *Front Pharmacol* [Internet]. 29 juill 2015 [cité 27 oct 2016];6. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4518325/>
334. Fraser SP, Diss JKJ, Chioni A-M, Mycielska ME, Pan H, Yamaci RF, et al. Voltage-gated sodium channel expression and potentiation of human breast cancer metastasis. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 1 août 2005;11(15):5381-9.
335. Nelson M, Yang M, Millican-Slater R, Brackenbury WJ. Nav1.5 regulates breast tumor growth and metastatic dissemination in vivo. *Oncotarget*. 20 oct 2015;6(32):32914-29.
336. MOHAMMED FH, KHAJAH MA, YANG M, BRACKENBURY WJ, LUQMANI YA. Blockade of voltage-gated sodium channels inhibits invasion of endocrine-resistant breast cancer cells. *Int J Oncol*. 9 nov 2015;48(1):73-83.

337. Yang M, Kozminski DJ, Wold LA, Modak R, Calhoun JD, Isom LL, et al. Therapeutic potential for phenytoin: targeting Nav1.5 sodium channels to reduce migration and invasion in metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* juill 2012;134(2):603-15.
338. Nelson M, Yang M, Dowle AA, Thomas JR, Brackenbury WJ. The sodium channel-blocking antiepileptic drug phenytoin inhibits breast tumour growth and metastasis. *Mol Cancer* [Internet]. 27 janv 2015 [cité 9 janv 2017];14(1). Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4320839/>
339. Elajnaf T, Baptista-Hon DT, Hales TG. Potent Inactivation-Dependent Inhibition of Adult and Neonatal NaV1.5 Channels by Lidocaine and Levobupivacaine. *Anesth Analg.* sept 2018;127(3):650-60.
340. Wang Y, Mi J, Lu K, Lu Y, Wang K. Comparison of Gating Properties and Use-Dependent Block of Nav1.5 and Nav1.7 Channels by Anti-Arrhythmics Mexiletine and Lidocaine. *PLoS ONE* [Internet]. 11 juin 2015 [cité 11 janv 2017];10(6). Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4465899/>
341. Li R, Xiao C, Liu H, Huang Y, Dilger JP, Lin J. Effects of local anesthetics on breast cancer cell viability and migration. *BMC Cancer.* 19 juin 2018;18(1):666.
342. Gao X, Yang H, Wu M, Shi K, Zhou C, Peng J, et al. Targeting Delivery of Lidocaine and Cisplatin by Nanogel Enhances Chemotherapy and Alleviates Metastasis. *ACS Appl Mater Interfaces.* 1 août 2018;10(30):25228-40.
343. Lirk P, Berger R, Hollmann MW, Fiegl H. Lidocaine time- and dose-dependently demethylates deoxyribonucleic acid in breast cancer cell lines in vitro. *Br J Anaesth.* août 2012;109(2):200-7.
344. Lirk P, Hollmann MW, Fleischer M, Weber NC, Fiegl H. Lidocaine and ropivacaine, but not bupivacaine, demethylate deoxyribonucleic acid in breast cancer cells in vitro. *Br J Anaesth.* juill 2014;113 Suppl 1:i32-38.
345. Guéguinou M, Gambade A, Félix R, Chantôme A, Fourbon Y, Bougnoux P, et al. Lipid rafts, KCa/ClCa/Ca2 + channel complexes and EGFR signaling: Novel targets to reduce tumor development by lipids? *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr.* oct 2015;1848(10, Part B):2603-20.
346. Mollinedo F, Gajate C. Lipid rafts as major platforms for signaling regulation in cancer. *Adv Biol Regul.* janv 2015;57:130-46.
347. Fraser SP, Ozerlat-Gunduz I, Onkal R, Diss JKJ, Latchman DS, Djamgoz MBA. Estrogen and non-genomic upregulation of voltage-gated Na(+) channel activity in MDA-MB-231 human breast cancer cells: role in adhesion. *J Cell Physiol.* août 2010;224(2):527-39.
348. Mao L, Lin S, Lin J. The effects of anesthetics on tumor progression. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol.* 8 mars 2013;5(1):1-10.
349. Brackenbury WJ. Voltage-gated sodium channels and metastatic disease. *Channels Austin Tex.* oct 2012;6(5):352-61.
350. Yoon JR, Whipple RA, Balzer EM, Cho EH, Matrone MA, Peckham M, et al. Local anesthetics inhibit kinesin motility and microtentacle protrusions in human epithelial and breast tumor cells. *Breast Cancer Res Treat.* 1 oct 2011;129(3):691-701.
351. Aloia TA, Zimmitti G, Conrad C, Gottumukalla V, Kopetz S, Vauthey J-N. Return to intended oncologic treatment (RIOT): A novel metric for evaluating the quality of oncosurgical therapy for malignancy: Return to Adjuvant Therapy Post Cancer Surgery. *J Surg Oncol.* août 2014;110(2):107-14.

352. Kim BJ, Caudle AS, Gottumukkala V, Aloia TA. The Impact of Postoperative Complications on a Timely Return to Intended Oncologic Therapy (RIOT): the Role of Enhanced Recovery in the Cancer Journey. *Int Anesthesiol Clin*. 2016;54(4):e33-46.
353. Lacroix M, Leclercq G. Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update. *Breast Cancer Res Treat*. févr 2004;83(3):249-89.
354. Soule HD, Maloney TM, Wolman SR, Peterson WD, Brenz R, McGrath CM, et al. Isolation and Characterization of a Spontaneously Immortalized Human Breast Epithelial Cell Line, MCF-10. *Cancer Res*. 15 sept 1990;50(18):6075-86.
355. Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. nov 1973;51(5):1409-16.
356. Trempe GL. Human breast cancer in culture. *Recent Results Cancer Res Fortschritte Krebsforsch Prog Dans Rech Sur Cancer*. 1976;(57):33-41.
357. Cailleau R, Young R, Olivé M, Reeves WJ Jr. Breast tumor cell lines from pleural effusions. *J Natl Cancer Inst*. sept 1974;53(3):661-74.
358. Crouch SPM, Kozlowski R, Slater KJ, Fletcher J. The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J Immunol Methods*. janv 1993;160(1):81-8.
359. Piotto M, Bourdonneau M, Furrer J, Bianco A, Raya J, Elbayed K. Destruction of Magnetization during TOCSY Experiments Performed under Magic Angle Spinning: Effect of Radial B1 Inhomogeneities. *J Magn Reson*. 1 mars 2001;149(1):114-8.
360. Elbayed K, Dillmann B, Raya J, Piotto M, Engelke F. Field modulation effects induced by sample spinning: application to high-resolution magic angle spinning NMR. *J Magn Reson San Diego Calif* 1997. mai 2005;174(1):2-26.
361. Two-dimensional spectroscopy. Application to nuclear magnetic resonance: *The Journal of Chemical Physics*: Vol 64, No 5 [Internet]. [cité 24 juin 2017]. Disponible sur: <http://aip.scitation.org/doi/abs/10.1063/1.432450>
362. Wishart DS, Tzur D, Knox C, Eisner R, Guo AC, Young N, et al. HMDB: the Human Metabolome Database. *Nucleic Acids Res*. janv 2007;35(Database issue):D521-526.
363. Martínez-Bisbal MC, Martí-Bonmatí L, Piquer J, Revert A, Ferrer P, Llacer JL, et al. ¹H and ¹³C HR-MAS spectroscopy of intact biopsy samples ex vivo and in vivo ¹H MRS study of human high grade gliomas. *NMR Biomed*. juin 2004;17(4):191-205.
364. Battini S, Imperiale A, Taïeb D, Elbayed K, Cicek AE, Sebag F, et al. High-resolution magic angle spinning (1)H nuclear magnetic resonance spectroscopy metabolomics of hyperfunctioning parathyroid glands. *Surgery*. août 2016;160(2):384-94.
365. Kanehisa M, Goto S, Sato Y, Kawashima M, Furumichi M, Tanabe M. Data, information, knowledge and principle: back to metabolism in KEGG. *Nucleic Acids Res*. 1 janv 2014;42(D1):D199-205.
366. Salway JG. *Metabolism at a Glance*. John Wiley & Sons; 2016. 149 p.
367. Aiello L, Guilfoyle R, Huebner K, Weinmann R. Adenovirus 5 DNA sequences present and RNA sequences transcribed in transformed human embryo kidney cells (HEK-Ad-5 or 293). *Virology*. 30 avr 1979;94(2):460-9.

Résumé

Des études cliniques rétrospectives ont suggéré un effet protecteur de l'anesthésie locorégionale contre les récurrences après chirurgie carcinologique, donnant une nouvelle dimension à la prise en charge de la douleur périopératoire. Des études prospectives sont en cours pour conforter ces résultats. Le premier objectif de ce travail était de montrer les effets antitumoraux directs de la lidocaïne, un anesthésique local couramment utilisé en pratique clinique. L'impact de la lidocaïne a été mesuré *in vitro* sur la viabilité, la prolifération et la migration de plusieurs lignées humaines de cellules de cancer du sein, ainsi qu'*in vivo* sur la progression métastatique péritonéale de cellules triple négatives. Le second objectif était de déterminer par quels mécanismes moléculaires la lidocaïne exerçait cette action antitumorale. Des approches globales par analyses transcriptomiques et métabolomiques ont mis en exergue de nouvelles hypothèses mécanistiques, en particulier relatives à des modifications de la composition lipidique des membranes cellulaires. Enfin une approche par gène candidat a suggéré un mode d'action de la lidocaïne indépendant du canal sodique voltage-dépendant.

Retrospective clinical studies have suggested a protective effect of regional anesthesia against recurrences after cancer surgery, bringing the management of perioperative pain to a new level. Prospective studies are underway to support these results. The first objective of this work was to show the direct antitumor effect of lidocaine, a local anesthetic commonly used in clinical practice. The impact of lidocaine was measured *in vitro* on viability, proliferation and migration of several human breast cancer cell lines, as well as *in vivo* on the metastatic peritoneal progression of triple negative cells. The second objective was to determine by which molecular mechanisms lidocaine exerts this antitumor action. Global approaches by transcriptomic and metabolomic analyses have highlighted new mechanistic hypotheses, notably in relation to the lipid composition of cell membrane. Finally, a candidate gene approach suggested that the mode of action of lidocaine is independent of the voltage-gated sodium channel.