

Ionophorèse et électroporation

Administration cutanée de médicaments et d'ADN

Véronique Préat, Gaëlle Vandermeulen, Liévin Daugimont et Valentine Wascotte

Résumé La peau est une cible intéressante pour l'administration de médicaments et d'ADN qui cependant reste limitée par la faible perméabilité du *stratum corneum*. L'ionophorèse et l'électroporation ont été largement étudiées afin d'obtenir une administration transdermique. Dans les deux cas, le passage de courant perturbe la perméabilité de la peau et même la perméabilité cellulaire dans le cas précis de l'électroporation. Ces deux techniques permettent d'élargir le spectre des substances administrables de manière transcutanée. Quelques exemples d'applications sont détaillés dans cet article.

Mots-clés **Électroporation, ionophorèse, administration cutanée, ADN, médicaments.**

Abstract **Cutaneous drug and DNA delivery by iontophoresis and electroporation**
The skin is an interesting target for the administration of drugs and DNA but the delivery remains limited by the low permeability of the *stratum corneum*. Iontophoresis and electroporation have been extensively studied in order to overcome the skin barrier. In both cases, the current passage disturbs the permeability of the skin and the cellular permeability in the particular case of electroporation. These two techniques allow widening the spectrum of transcutaneously administrable compounds. Several examples of applications are detailed in this paper.

Keywords **Electroporation, iontophoresis, cutaneous delivery, DNA, drug.**

L'administration cutanée de médicaments et d'ADN

La peau est un site privilégié pour l'administration de médicaments et d'acides nucléiques dans le traitement topique ou systémique de diverses pathologies. En effet, la voie transdermique offre de nombreux avantages : elle est non invasive et facile d'accès, n'est pas influencée par les repas ou l'environnement gastro-intestinal et n'est pas soumise à l'effet de premier passage hépatique.

Cependant, la pénétration à travers la peau est limitée par la faible perméabilité du *stratum corneum*. L'administration transdermique de médicaments est donc restreinte aux molécules présentant une balance hydro/lipophile adéquate, de faible taille, non chargées et actives à faibles doses [1-2].

De nombreuses stratégies ont été développées afin d'étendre le spectre des molécules traversant la barrière de la peau. Parmi celles-ci, des méthodes dites mécaniques (micro-aiguilles...), chimiques (promoteurs d'absorption...) ou physiques (ionophorèse, électroporation, sonoporation...) ont été étudiées, seules ou en combinaisons. En ce qui concerne l'administration d'ADN, l'utilisation de vecteurs viraux a également été testée. Si l'administration d'acides nucléiques dans la peau suscite un intérêt grandissant, elle représente néanmoins un réel challenge. En effet, l'ADN, de par ses propriétés physico-chimiques éloignées des critères définis plus haut, est peu enclin à traverser la barrière cutanée par diffusion passive.

L'ionophorèse

Définition

L'ionophorèse est une technique non invasive qui permet d'augmenter le passage de molécules à travers la peau

grâce à l'application d'un faible courant électrique. Un système ionophorétique se compose de plusieurs éléments : la source de courant électrique, un premier réservoir qui contient le principe actif et une électrode de polarité identique à la molécule à administrer, et un second réservoir dans lequel la contre-électrode est placée, fermant le circuit électrique (*figure 1*). La densité de courant appliquée doit être inférieure à $0,5 \text{ mA/cm}^2$ afin d'éviter une sensation douloureuse.

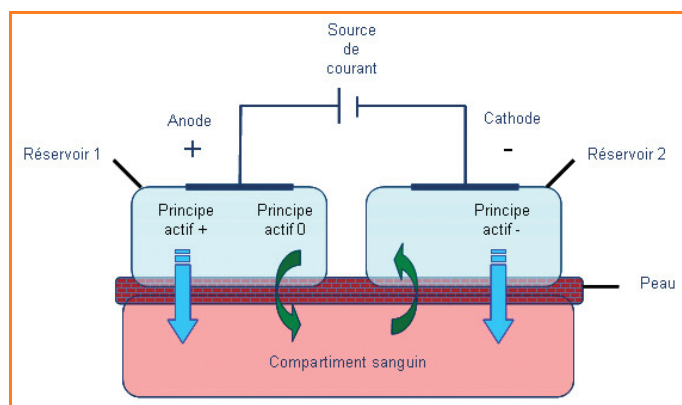


Figure 1 - Schéma de transport des molécules par ionophorèse.

Mécanismes et intérêts de la technique

Deux mécanismes sont impliqués dans ce transport. L'électromigration (en bleu dans la *figure 1*) est le résultat de la répulsion ou l'attraction de charges qui existe entre les molécules et les électrodes de polarités identiques ou opposées. L'électro-osmose (en vert dans la *figure 1*) est la conséquence du flux de solvant qui est créé par la charge négative de la peau à pH physiologique. Les molécules sont

entraînées par ce flux de l'anode vers la cathode. L'électromigration agit sur les molécules chargées ou les ions alors que l'électro-osmose transporte principalement les molécules neutres et les macromolécules (figure 1). Ces mécanismes permettent d'étendre le transport transdermique à des composés hydrophiles de faible et de moyen poids moléculaire (< 5 000 Da).

Le transport par ionophorèse se fait principalement via les appendices de la peau (glandes sudoripares et follicules pilosébacés). Un passage intercellulaire a été également démontré et un passage intracellulaire n'est pas à exclure.

L'utilisation du courant pour promouvoir le passage des molécules est envisagée depuis plusieurs dizaines d'années. De nombreux principes actifs ont d'ailleurs déjà été associés à cette méthode d'administration originale pour l'obtention d'un effet local ou systémique. L'administration par ionophorèse représente néanmoins un challenge car il est souvent difficile d'atteindre des concentrations thérapeutiques.

L'ionophorèse est souvent proposée comme méthode alternative à une technique plus invasive ou pour augmenter la quantité délivrée par rapport à une technique d'administration transdermique existante. Elle produit au plus une faible sensation de picotement.

Le contrôle de la dose peut également être un facteur intéressant à exploiter dans certains cas, étant donné que la quantité délivrée dépend directement du courant appliqué. Dans ce cas, le remplacement de méthodes de diffusion passive est intéressant afin d'obtenir une délivrance à la demande.

Exemples d'applications transdermiques

Analgésie rapide et locale par administration ionophorétique de lidocaïne

L'administration par ionophorèse de la lidocaïne en application topique constitue une alternative intéressante à l'application sous forme de crème (Emla[®], Astra-Zeneca Pharmaceuticals). En effet, une application d'une durée de 30 minutes à 1 heure est nécessaire afin d'obtenir le degré d'anesthésie souhaité contre 7 à 15 minutes pour un effet équivalent par ionophorèse [3-5]. Le LidoSiteTM Topical System, développé par Vysteris, a été approuvé par la FDA en 2004 (figure 2a). Il s'agit d'un système de délivrance de lidocaïne et d'épinéphrine par ionophorèse. L'appareil est de petite taille et facile à utiliser. Il est composé d'un système de délivrance de courant connecté à un patch à usage unique constitué d'un réservoir rond de 5 cm² contenant les principes actifs (anode) et d'un autre, de forme ovale, contenant des électrolytes (cathode) et destiné à fermer le circuit. Le courant administré est de 1,77 mA pendant une période de 10 minutes [4].

Administration à la demande de fentanyl par ionophorèse

Les patchs libérant des antidouleurs de type morphinique reposent sur la diffusion passive de la substance thérapeutique. Cette méthode comporte cependant les inconvénients d'un délai d'action, d'un effet de rémanence et d'une impossibilité d'ajuster la dose à la demande. Dès lors, le traitement de la douleur aiguë est difficilement compatible avec ce genre de techniques d'administration [6]. Ces dernières années ont été marquées par le développement de techniques analgésiques contrôlées par le patient lui-même.

La FDA a récemment approuvé un nouveau produit utilisant le système de délivrance transdermique par

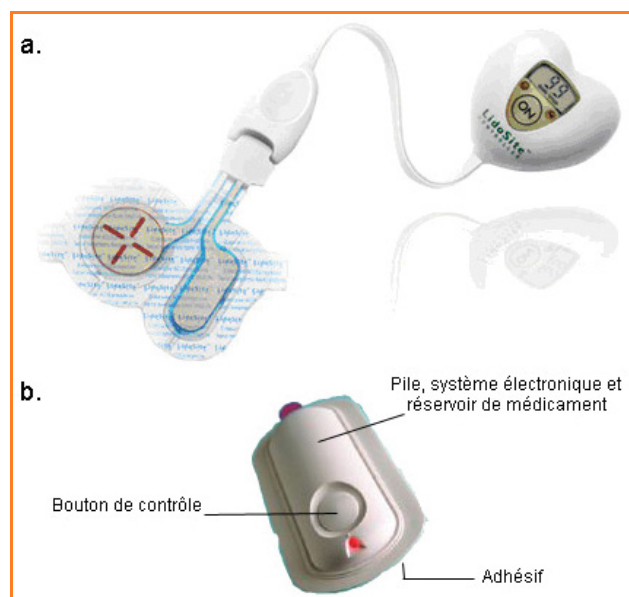


Figure 2 - Dispositifs d'administration topique et transdermique par ionophorèse.

a : Vysteris (www.vyteris.com) ; b : lonsys[®] (www.alza.com/alza/etrans).

ionophorèse développé par E-TRANS[®] pour l'administration de fentanyl (lonsys[®]) (figure 2b). Ce système permet de délivrer à la demande du patient et de manière complètement non invasive, une dose définie de l'analgésique opioïde. Il permet de délivrer plus de 80 doses de 40 µg de fentanyl à travers la peau. Chaque dose est délivrée pendant une période de 10 minutes par un courant de 0,17 mA. Le courant électrique, le plus souvent imperceptible pour le patient, transporte le fentanyl dans le système circulatoire, produisant un effet systémique.

Ce système combine donc les avantages d'une technique complètement non invasive et d'un traitement à la demande : réduction du risque d'infection, diminution de la charge du personnel hospitalier combinée à un traitement efficace et adapté au patient avec suppression de l'effet de rémanence [6].

L'électroporation

Définition

L'électroporation est une méthode physique permettant l'administration de médicaments et de gènes grâce à l'utilisation de champs électriques d'intensités élevées (de l'ordre de 100 à 1 000 V/cm) et de faibles durées (< 1 seconde) créant une perméabilisation des membranes lipidiques. Le système est composé d'un générateur de courant qui alimente les électrodes. Il s'agit le plus souvent de deux électrodes plates entre lesquelles est placé le tissu cible.

Les champs électriques appliqués vont d'une part perturber transitoirement les membranes et augmenter ainsi la perméabilité cellulaire, et d'autre part, promouvoir l'électrophorèse de molécules chargées. Ces deux composantes permettent d'augmenter le passage membranaire de médicaments ou d'ADN dans la peau [7].

De nombreuses études *in vitro* démontrent que l'application des impulsions électriques augmente de plusieurs ordres de grandeur la pénétration percutanée de molécules, même pour des macromolécules hydrophiles. La modification des paramètres électriques et dans une moindre

mesure la formulation du réservoir permettent de contrôler la quantité de médicament délivrée. Les rares études *in vivo* indiquent que le temps de latence est très court.

La possibilité d'administrer de l'ADN par électroporation a été découverte dans les années 80. Neumann et ses collaborateurs ont démontré qu'il était possible de transférer de l'ADN linéaire ou circulaire *in vitro* à des cellules en suspension en utilisant des champs électriques de haut voltage [8]. Quelques années plus tard, cette technique se révélait également efficace *in vivo* [9]. Depuis, l'électroporation d'ADN a été utilisée pour la transfection de nombreux tissus : le muscle squelettique, les tumeurs, la peau, le foie... [10].

Les effets indésirables de l'électroporation sur la peau semblent négligeables. De légères perturbations de la structure des lipides et un érythème transitoire sont observés. Par contre, avec les électrodes actuelles, une contraction musculaire et une brève sensation sont ressenties par le patient [11].

Exemples d'applications cutanées

Administration transdermique de médicaments

Si l'électroporation a initialement été développée pour l'administration transdermique de médicaments, les applications thérapeutiques potentielles sont actuellement limitées. Deux raisons peuvent l'expliquer : les systèmes actuels induisent une sensation et contraction qui freinent leur emploi pour des pathologies bénignes. De plus, le développement de méthodes plus « douces » comme l'iontophorèse ou plus récemment les micro-aiguilles ou microperforations ont fortement réduit l'intérêt de cette méthode pourtant particulièrement efficace *in vitro*.

L'électrochimiothérapie

Différentes approches de traitement du cancer basées sur l'électroporation d'agents cytotoxiques font actuellement l'objet de recherches intensives. Depuis les premières applications, la technique s'est développée pour devenir une approche validée cliniquement pour le traitement de tumeurs cutanées et sous-cutanées [12]. Le principe consiste à injecter localement divers agents chimiothérapeutiques hydrophiles et peu perméants avant d'appliquer l'électroporation pour favoriser leur pénétration cellulaire.

Au-delà de la seule électroperméabilisation des cellules, la capacité de l'électroporation à potentialiser ces agents cytotoxiques provient également de la réduction temporaire du flux sanguin tumoral. Immédiatement après application des impulsions, le médicament se retrouve piégé dans le tissu tumoral pour plusieurs heures, lui laissant plus de temps pour agir.

Deux substances ont été retenues pour l'électrochimiothérapie en clinique : la bléomycine et le cisplatine. L'électroporation des cellules augmente de plusieurs milliers de fois la cytotoxicité de la bléomycine et de près de cent fois celle du cisplatine [13-14].

Des études *in vivo* ont été menées sur différents types de tumeurs animales. L'électrochimiothérapie s'est révélée efficace sur des fibrosarcomes, mélanomes et carcinomes chez la souris et le rat. L'agent chimiothérapeutique peut être injecté soit par voie intraveineuse soit intratumorale, et les impulsions électriques doivent être appliquées dans les minutes suivant l'injection [15].

Dans la plupart des études cliniques menées [16], les tumeurs traitées étaient des mélanomes. Il ressort que la

voie intratumorale donne un pourcentage de réponses complètes plus élevé que la voie intraveineuse. Des résultats similaires ont été obtenus avec d'autres types de tumeurs. Récemment le projet ESOPE, une étude prospective, non randomisée et multicentrique, a évalué la réponse au traitement en fonction du type de tumeur, de l'agent cytotoxique, de la voie d'administration et du type d'électrodes utilisées [17].

Actuellement, l'électrochimiothérapie constitue un traitement de seconde intention des tumeurs cutanées ou sous-cutanées après l'échec complet ou partiel des stratégies de traitement conventionnelles. Il s'agit principalement de métastases cutanées multiples de mélanomes qui, de par leur nombre ou leur localisation, ne peuvent être opérées.

Afin d'accroître le champ d'application de l'électrochimiothérapie, les recherches se poursuivent en vue, par exemple, de la combiner à la radiothérapie, ou de développer des électrodes endoluminales pour le traitement de tumeurs internes.

La vaccination intradermique par électroporation d'ADN

La peau est une cible séduisante pour l'administration d'antigène et l'immunisation [18]. Barrière physique mais également immunologique, elle contient de nombreuses cellules immunitaires et présente par conséquent un grand intérêt dans le cadre de la vaccination. Les cellules transfectées de la peau expriment à court terme l'antigène d'intérêt, ce qui peut mener à une réponse immune cellulaire (TH1) et/ou humorale (Th2) (figure 3).

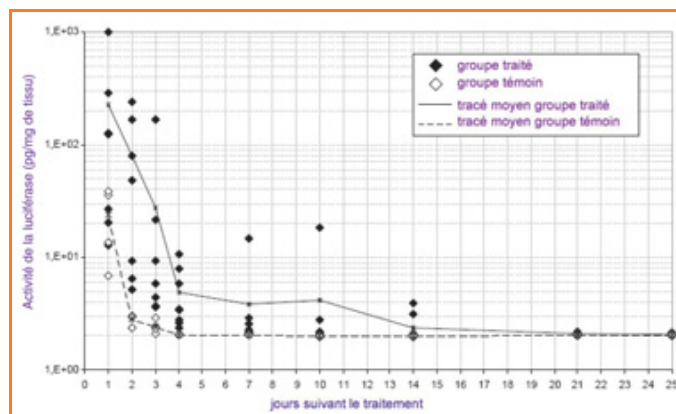


Figure 3 - Cinétique de l'expression de luciférase dans la peau après injection intradermique de 50 µg de pCMVluc avec et sans électrotransfert (700 V/cm, 100 µs ; 200 V/cm, 400 ms) [23].

En 1992, il a été démontré qu'une réponse immune contre l'hormone de croissance humaine pouvait être induite en introduisant dans la peau de souris le gène codant cette protéine [19]. La faisabilité de l'immunisation cutanée par ADN pour la production d'anticorps monoclonaux et pour la vaccination contre différents antigènes (influenza, hépatite B, VIH...) a ensuite été confirmée.

Après injection intradermique de l'ADN plasmidique, l'électroporation accroît de deux ordres de grandeur environ l'expression d'une protéine. De ce fait, elle permet d'obtenir des réponses immunes plus marquées contre la protéine codée.

Alors que l'immunisation par injection de protéine recombinante permet l'obtention d'une réponse orientée Th2, la

Tableau I - Synthèse et comparaison des deux modes d'administration.

	Ionophorèse	Électroporation
Courant électrique	Faible intensité minutes-heures	Impulsions de haut voltage µs-ms
Mécanismes	Électromigration Électro-osmose	Perméabilisation des bicouches lipidiques
Organes cibles potentiels	Principalement la peau	Potentiellement tous les organes
Applications thérapeutiques principales	Administration transdermique et topique de médicaments Monitoring non invasif	Électrochimiothérapie Administration de plasmides

prédominance d'IgG2a après immunisation par électroporation intradermique d'ADN suggère une réponse de type Th1 [20]. La localisation de l'antigène, intracellulaire après électroporation et extracellulaire après injection de la protéine dans le tissu, pourrait expliquer cette différence [21]. De plus, des résultats récents montrent que l'électroporation permet d'obtenir une réponse contre une protéine même faiblement immunogène. Des anticorps anti-luciférase sont mesurés après électrotransfert intradermique d'un plasmide codant cette protéine modèle, mais sont indétectables après injection intradermique seule [22]. Des études cliniques sont actuellement en cours pour le traitement, entre autres, des cancers de la prostate et des mélanomes.

Conclusion

L'application de courants électriques est, et ce depuis plusieurs dizaines d'années, considérée comme un moyen intéressant pour l'administration cutanée de principes actifs. Deux techniques ont été détaillées ici : l'ionophorèse et l'électroporation.

Ces techniques se distinguent tout d'abord par l'intensité des courants appliqués. Dans le cas de l'ionophorèse, on utilise des courants de faibles intensités et très bien tolérés, qui permettent d'augmenter le passage de nombreuses molécules à travers la peau. Plusieurs dispositifs, comme le Lidosite® ou l'onsys®, sont d'ailleurs déjà commercialisés.

L'électroporation repose sur l'application de champs électriques d'intensités élevées mais de courtes durées. Elle permet au médicament d'atteindre le milieu intracellulaire par une perméabilisation transitoire des membranes.

De par ces caractéristiques, ces deux méthodes mènent à des applications totalement distinctes (tableau I).

Références

- [1] Hadgraft J., Guy R.H., *Transdermal drug delivery*, Marcel Dekker, New York, 2003.
- [2] Naik A., Kalia Y.N., Guy R.H., Transdermal drug delivery; overcoming the skin's barrier function, *PSST*, 2000, 3, p. 318.
- [3] Ashburn M., Love G., Gaylord B., Gauthier M., Kessler K., Iontophoretic administration of 2% lidocaine HCl and 1:100,000 epinephrine in man, *The Clinical Journal of Pain*, 1997, 13, p. 1322.
- [4] Subramony J.A., Sharma A., Phipps J.B., Microprocessor controlled transdermal drug delivery, *Int. Journ. of Pharmaceutics*, 2006, 317, p. 1.
- [5] Wallace M.S., Ridgeway B., Jun E., Schulteis G., Rabussay D., Zhang L., Topical delivery of lidocaine in healthy volunteers by electroporation, electroincorporation, or iontophoresis: an evaluation of skin anesthesia, *Regional Anesthesia and Pain Medicine*, 2001, 26, p. 229.
- [6] Power I., Fentanyl HCl iontophoretic transdermal system (ITS): clinical application of iontophoretic technology in the management of acute postoperative pain, *Brit. Journ. of Anaesthesia*, 2007, 98, p. 4.
- [7] Denet A.R., Vanbever R., Prémat V., Skin electroporation for transdermal and topical delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2004, 56, p. 659.
- [8] Neumann E., Schaefer-Ridder M., Wang Y., Hofschneider P.H., Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields, *Eur. Molecular Biology Organization Journ.*, 1982, 1, p. 841.

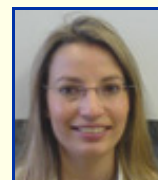
- [9] Titomirov A.V., Sukharev S., Kistanova E., *In vivo* electroporation and stable transformation of skin cells of newborn mice by plasmid DNA, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1991, 1088, p. 131.
- [10] Mir L.M., Moller P.H., Andre F., Gehl J., Electric pulse-mediated gene delivery to various animal tissues, *Advances in Genetics*, 2005, 54, p. 83.
- [11] Jadoul A., Bouwstra J., Prémat V., Effects of iontophoresis and electroporation on the stratum corneum. Review of the biophysical studies, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1999, 35, p. 89.
- [12] Mir L.M., Belehradek M., Domenge C., Orłowski S., Poddevin B., Belehradek J. Jr., Schwaab G., Luboinski B., Paoletti C., Electrochemotherapy, a new antitumor treatment: first clinical trial, *C.R. Acad. Sci., Série III*, 1991, 313, p. 613.
- [13] Sersa G., Cemazar M., Miklavcic D., Antitumor effectiveness of electrochemotherapy with cis-diamminedichloroplatinum(II) in mice, *Cancer Research*, 1995, 55, p. 3450.
- [14] Orłowski S., Belehradek J. Jr., Paoletti C., Mir L.M., Transient electropermeabilization of cells in culture. Increase of the cytotoxicity of anticancer drugs, *Biochem. Pharmacology*, 1988, 37, p. 4727.
- [15] Mir L.M., Bases and rationale of the electrochemotherapy, *Eur. Journ. of Cancer Supplements*, 2006, 4, p. 38.
- [16] Sersa G., Miklavcic D., Cemazar M., Rudolf Z., Pucihar G., Snoj M., Electrochemotherapy in treatment of tumours, *Eur. Journ. of Surgical Oncology*, 2008, 34(2), p. 232.
- [17] Marty M., Sersa G., Garbay JR., Electrochemotherapy – An easy, highly effective and safe treatment of cutaneous and subcutaneous metastases: Results of ESOP (European Standard Operating Procedures of Electrochemotherapy) study, *Eur. Journ. of Cancer Supplements*, 2007, 4, p. 3.
- [18] Babiuk S., Baca-Estrada M., Babiuk L.A., Ewen C., Foldvari M., Cutaneous vaccination: the skin as an immunologically active tissue and the challenge of antigen delivery, *Journ. of Controlled Release*, 2000, 66, p. 199.
- [19] Tang D.C., DeVit M., Johnston S.A., Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response, *Nature*, 1992, 356, p. 152.
- [20] Pedron-Mazoyer S., Plouet J., Hellaudais L., Teissie J., Golzio M., New anti angiogenesis developments through electro-immunization: optimization by in vivo optical imaging of intradermal electro gene transfer, *Biochimica et Biophysica Acta*, 2007, 1770, p. 137.
- [21] Morel P.A., Falkner D., Plowey J., Laregina A.T., Falo L.D., DNA immunisation: altering the cellular localisation of expressed protein and the immunisation route allows manipulation of the immune response, *Vaccine*, 2004, 22, p. 447.
- [22] Vandermeulen G., Staes E., Vanderhaeghen M.L., Bureau M.F., Scherman D., Prémat V., Optimisation of intradermal DNA electrotransfer for immunisation, *Journ. of Controlled Release*, 2007, 124, p. 81.
- [23] Pavselj N., Prémat V., DNA electrotransfer into the skin using a combination of one high- and one low-voltage pulse, *Journ. of Controlled Release*, 2005, 106, p. 407.



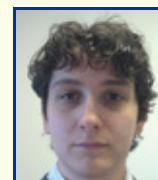
V. Prémat



G. Vandermeulen



V. Wascotte



L. Daugimont

Véronique Prémat (auteur correspondant) est professeur, **Gaëlle Vandermeulen** et **Valentine Wascotte** sont docteurs en sciences pharmaceutiques, et **Liévin Daugimont** est pharmacien doctorant, à l'Université catholique de Louvain, Unité de Pharmacie galénique*.

* Université Catholique de Louvain, Unité de Pharmacie galénique, Avenue Emmanuel Mounier, 73 UCL, 7320, B-1200 Bruxelles (Belgique).
Courriels : veronique.preat@uclouvain.be, lievin.daugimont@uclouvain.be