Electrochimiothérapie et électrogènethérapie : du laboratoire à la clinique

Lluis M. Mir

UMR 8121 CNRS – Institut Gustave-Roussy

Université Paris Sud (Paris XI)

Société Française de Radioprotection

« Effets Biologiques et Sanitaires des Rayonnements Non Ionisants »

14 Avril 2004, Bordeaux

Electroperméabilisation des cellules

L'exposition des cellules

à des impulsions électriques courtes et intenses provoque des changements

de la différence de potentiel transmembranaire

Electroperméabilisation des cellules

Il s'agit d'un <u>phénomène à seuil</u>:

Au delà d'une différence de potentiel transmembranaire de 0.2 à 0.4 volts, il y a apparition de structures transitoires de perméabilisation

D. Peter Tieleman,*,† Hari Leontiadou,‡ Alan E. Mark,‡ and Siewert-Jan Marrink*,‡

J. AM. CHEM. SOC. 2003, *125*, 6382−6383

Figure 2. Pore formation in the DOPC simulation with an applied electric field of 0.5 V/nm: (A) structure at ~2.40 ns, no obvious defects; (B) ~3.04 ns, water penetration from both sides and significant deformation of the bilayer; (C−E) ~3.08 to ~3.15 ns, two defects from opposite sides of the bilayer form a single file across the bilayer; (F) ~3.25 ns and (G) ~3.35 ns, further rearrangement of the phospholipids and increasing size of the water column; (H) ~3.55 ns, final size of the defect and nearly complete rearrangement of the phospholipids.

Electroperméabilisation des cellules

- Phénomène général, non thermique, réversible.
- L'électroperméabilisation des cellules permet l'accès des molécules non perméantes à l'intérieur de la cellule, tout en préservant l'intégrité des vésicules intracellulaires

Electrochimiothérapie Antitumorale:

le concept

ELECTROCHIMIOTHERAPIE ANTITUMORALE
Définition

La potentialisation locale de l'activité antitumorale de certains médicaments anticancéreux à l'aide d'impulsions électriques perméabilisantes.

Les impulsions électriques sont appliquées localement au niveau des tumeurs.

Le médicament anticancéreux "bléomycine" est le plus approprié en électrochimiothérapie, mais le "cisplatine" peut aussi être utilisé avec de très bons résultats.

ELECTROCHIMIOTHERAPIE ANTITUMORALE
Mise en oeuvre du concept: du laboratoire à la clinique

Développement du concept par des expériences sur des cellules en culture – optimisation.

Essais précliniques chez la souris – “optimisation”
(8 impulsions électriques de 100 µs et 1300 V/cm à la fréquence de 1 Hertz)

Essais cliniques

Développement d’équipement approprié

Élaboration des procédures opérationnelles standard

ELECTROCHIMIOTHERAPIE ANTITUMORALE

ELECTROCHIMIOTHERAPIE ANTITUMORALE

Le projet CLINIPORATOR

Projet QLK3-1999-00484 de la commission européenne dans le cadre du 5ème PCRD (01/02/00 à 31/07/03)

8 partenaires de 7 pays européens:

- **CO1/coordination - L.M. Mir - CNRS, Villejuif (F)**
- **CR2 - R. Cadossi - IGEA s.r.l., Carpi (I)**
- **CR3 – E. Neuman – Université de Bielefeld (D)**
- **CR4 – J. Teissié – CNRS, Toulouse (F)**
- **CR5 - D. Miklavcic - Université de Ljubljana (SI)**
- **CR6 – B. Person – Université de Lund (SU)**
- **CR7 – V. Préat – Université Catholique de Louvain à Bruxelles (BE)**
- **CR8 - J. Gehl - Hôpital de Herlev à Copenhagen (DK)**

Cliniporator: appareil complet

Electrodes: plaques métalliques parallèles

Electrodes : aiguilles en nid d'abeille

IGEAsrl
Carpi
ITALY

Électroperméabilisation in vivo

- **Dévelo**

  Très é (fibres
  muscu elettiques
  exposé ommages
  histolo

- **Déclen** aire avec
  deux c minutes,
  indépe une non
  physio

J. Gehl, T. Skovsgaard and L.M. Mir. Vascular reactions to in vivo electroporation : Characterization and consequences for drug and gene delivery. Biochim. Biophys. Acta, 1569, 51-58, 2002

Électroperméabilisation in vivo

- Élaboration de modèles numériques de la distribution du champ électrique in vivo et validation expérimentale.
- Modèles de la progression de l'électroperméabilisation des cellules au sein d'un tissu.
- Réponses différentes suivants les tissu étudiés (muscle, foie, tumeurs, …) Seuils de champ électrique déterminés pour le muscle et le foie.
- Mesures du voltage appliqué, du courant délivré, de la variation de conductivité du tissu.
- Contrôle en temps réel du voltage des impulsions électriques et ajustement du voltage (en <10 µs) pour obtenir avec certitude une perméabilisation réversible du muscle squelettique

.

Présent : le projet ESOPE

European Standard Operating Procedures of Electrochemotherapy and Electrogenetherapy

Projet QLK3-2002-02003 de la commission européenne dans le cadre du 5ème PCRD (01/01/03 to 31/12/04)

4 centres anticancéreux:

- CO1/coordination L M Mir - Institut Gustave-Roussy,Villejuif (F)
- CR3 - J. Gehl - Herlev Hospital at Copenhagen (DK)
- CR4 - G. Sersa - Institute of Oncology of Ljubljana (SI)
- CR5 - G. O'Sullivan - Cork Cancer Center (IRL)

2 autres partenaires et 1 sous-traitant:

- CR2 - R. Cadossi - IGEA s.r.l. at Carpi (I)
- CR6 - L.M. Mir - CNRS at Villejuif (F)
- SC1 - D. Miklavcic - University of Ljubljana (SI)

Electrogènethérapie

<u>Reporter gene</u> :
β-galactosidase injected to the *tibialis cranialis* muscle in mice.

<u>Panels A and C</u> :
No electric pulses

<u>Panels B and D</u> :
Plus 8 pulses of 20 ms and 200 V/cm at 1 Hz

Electrogènethérapie

Besoin d'impulsions électriques suffisamment intenses

Cependant la perméabilisation des cellules n'est pas suffisante

Besoin d'impulsions électriques suffisamment longues

Utilisation de combinaisons d'impulsions :

1 HV (haut voltage, courte durée) de 100µs à 800V/cm

(de type électrochimiothérapie mais adaptée au muscle squelettique)

Suivie de 1 ou plusieurs LV (bas (low) voltage, longue durée) de 100 ms à 80 V/cm

(impulsions non perméabilisantes, c'est à dire d'une intensité de champ inférieure au seuil d'électroperméabilisation du muscle squelettique)

Electrogènethérapie

CONCLUSIONS [Cliniporator (QLK3-1999-00484)]

Les impulsions électriques ont deux rôles:

- **L'"électroperméabilisation" des cellules cibles**
- **Le transport électrophorétique de l'ADN "vers ou à travers" la membrane cellulaire**

L'électroperméabilisation des cellules cibles est indispensable, mais l'efficacité de l'électrogènethérapie dépend en fait de la composante électrophorétique

Les combinaisons d'impulsions électriques HV + LV permettent une excellente efficacité de l'électrotransfert de l'ADN et une absence complète de dommages aux tissus

Electrogènethérapie

Alternative réelle aux approches de thérapie génique virale

- Efficacité prouvée (dans le muscle squelettique, augmentation de l'expression de gènes de plus de 1000 par rapport à l'injection d'ADN seule, diminution de la variabilité, expression soutenue, jusqu'à un an)
- Efficacité prouvée avec des gènes thérapeutiques (facteurs antioangiogéniques, érythropoïétine…)
- Sécurité biologique (pas de manipulation de virus)
- Facilité et sécurité de la préparation de l'ADN
- Les rôles des impulsions électriques est décrit
- Le contrôle des conditions électriques peut être réalisé
- Un équipement approprié est disponible

REMERCIEMENTS

Equipe « Vectorologie Physique et Nouvelles Stratégies Antitumorales »
UMR 8121 CNRS - Institut Gustave-Roussy, Villejuif

Saulius Satkauskas
David Cukjati
Danute Batiuskaite
Halima Mekid
Frank André
Sonata Salomskaite
Christel Cournil
Tamsin Wright

Soutiens: CNRS, IGR, AFM, EU Commission

- Cliniporator (QLK3-1999-00484) et Esope (QLK3-2002-02003) Responsables:

  E. Neumann - Bielefeld DE

  D. Miklavcic - Ljubljana SI

  J. Teissié - Toulouse FR

  R. Cadossi - Carpi IT

  J. Gehl - Copenhagen DK

  G. Sersa - Ljubljana SI

  V. Préat - Bruxelles BE

  G. O'Sullivan – Cork IR

- Et leurs collaborateurs: Vilko, Marko, Peter, Charlie, Mojca, Davorka, Antonio, Pier Mauro, Claudio, Enrico, Maja, Zvone, Pol, Ingrid, Jens, Marianne, Marie-Pierre, Muriel, Natasa, Marko, Uwe, Katja, Michel, Julia, Mario, Naïma, Jean-Rémi, Valérie, Hugo, Colum, Chris,