

# L'ÉLECTROPORATION DANS LE TRAITEMENT DES CANCERS : L'ÉLECTROCHIMIOTHÉRAPIE ANTITUMORALE

## *ELECTROPORATION IN CANCER TREATMENT: THE ANTITUMOR ELECTROCHEMOTHERAPY*

Par Lluis M. MIR

(Communication présentée le 15 octobre 2009)

### RÉSUMÉ

L'électrochimiothérapie (ECT) est une nouvelle approche de traitement antitumoral : elle associe l'application d'impulsions électriques qui augmentent la perméabilité de la membrane cellulaire, à l'administration de médicaments cytotoxiques qui pénètrent difficilement dans les cellules ; leur activité est ainsi potentialisée. Après quelques années de développement du concept, de l'instrumentation et des procédures opérationnelles, l'ECT est en train de se répandre en clinique humaine. Des études en clinique vétérinaire montrent l'efficacité de cette approche dans le traitement de tumeurs solides chez les chats, les chiens et les équidés. De par son efficacité, sa facilité d'application, son absence d'effets secondaires et son coût réduit, l'ECT devrait aussi se répandre dans la pratique clinique vétérinaire. Son concept, ses bases et les résultats obtenus chez les canidés, félidés et équidés sont rapportés dans cette communication.

**Mots-clés :** bléomycine, cisplatine, animaux de compagnie, chevaux, électroporation, électrochimiothérapie.

### SUMMARY

*Electrochemotherapy (ECT) is a novel anticancer therapy, combining the delivery of electric impulses, which increase cell membrane permeability, with that of cytotoxic drugs that normally penetrate poorly into cells, and whose activity is thus potentiated. After several years of development of the concept, instrumentation and operational procedures, ECT is now being used increasingly in human medicine. Veterinary clinical studies have shown the efficacy of this approach in the treatment of solid tumours in cats, dogs and horses. As it is effective, easy to use, has no side effects and is inexpensive, the use of ECT is expected to expand in veterinary clinical practice as well. ECT concept, bases, and outcomes in canidae, felidae and equidae are reported in this communication.*

**Key words:** bleomycin, cisplatin, pets, horses, electroporation, electrochemotherapy.

(1) UMR 8121 CNRS - Institut Gustave-Roussy - 39 Rue C. Desmoulins - F-94805 VILLEJUIF Cedex - FRANCE

## INTRODUCTION

Le contrôle local de la progression des lésions tumorales reste essentiel dans le traitement des lésions cancéreuses. La chirurgie et la radiothérapie sont toujours les armes essentielles de la lutte contre le cancer. Cependant, il existe des situations où ces traitements ne sont pas adaptés ou sont insuffisants. De nouvelles approches efficaces, sélectives et si possible, facilement applicables et de coût réduit, sont souhaitables. L'électrochimiothérapie (ECT) est un nouveau traitement qui remplit ces conditions. Après une longue période d'essais précliniques et cliniques, pendant laquelle les bases de ce traitement ont été explorées de façon exhaustive et une instrumentation adaptée a été développée, l'ECT est en train de se répandre en clinique humaine. L'ECT est une méthode attractive pour le traitement de tumeurs solides superficielles ou profondes. Son intérêt a aussi été montré en clinique vétérinaire par plusieurs groupes en Europe.

## CONCEPT ET BASES DE L'ÉLECTROCHIMIOTHÉRAPIE ANTITUMORALE

### Définition de l'électrochimiothérapie

L'ECT est la potentialisation locale, au moyen d'impulsions électriques perméabilisantes, de l'activité antitumorale de médicaments anticancéreux « non perméants » possédant une cytotoxicité intrinsèque élevée (comme la bléomycine). Des médicaments « peu perméants » comme le cisplatine sont aussi utilisés en ECT. Les impulsions électriques sont délivrées localement au niveau des nodules tumoraux à traiter.

### Pourquoi des impulsions électriques ?

Des impulsions électriques courtes et intenses provoquent une modification de la perméabilité de la membrane des cellules qui y sont exposées. Alors que les fluides biologiques et le milieu intracellulaire sont de bons conducteurs électriques, la membrane cellulaire est un isolant et le champ électrique externe imposé est amplifié à son niveau, conduisant à la déstabilisation réversible de sa structure. L'électroperméabilisation des cellules, fréquemment dénommée électroporation, permet alors de faire rentrer dans la cellule des molécules qui normalement ne peuvent pas diffuser à travers la membrane cellulaire. Ce phénomène a ouvert un nouveau champ thématique, la vectorologie physique qui au lieu d'utiliser des vecteurs chimiques (liposomes, nanoparticules, etc) ou biologiques (adénovirus, rétrovirus, etc.), utilise des perturbations physiques pour manipuler les cellules ou les molécules. La durée des impulsions électriques rectangulaires et l'amplitude du champ électrique qu'elles génèrent sont réglées de façon indépendante, afin d'obtenir une perméabilité réversible des cellules avec une perte minimale de viabilité. En règle générale, des trains de 4 à 8 impulsions de 100 microsecondes, avec une intensité de champ électrique comprise entre 800 et 1300 V/cm sont appliqués aux

cellules et aux tissus animaux. Une fréquence de répétition des impulsions de 1 Hz est souvent utilisée mais l'application d'une fréquence très élevée (5 000 Hz) donne d'excellents résultats et permet un traitement très rapide (huit impulsions en 1,5 ms) et tolérable, les huit impulsions étant alors ressenties comme une seule et ne provoquant qu'une seule contraction musculaire.

L'ECT, comme la plupart des applications biotechnologiques et biomédicales de l'électroperméabilisation (Mir 2004) se caractérise par le fait que les impulsions utilisées conduisent à la perméabilisation réversible des cellules cibles, réversibilité qui préserve leur viabilité. Il faut bien distinguer cet effet perméabilisant des effets thermiques dus au passage de courants électriques, utilisés aussi pour traiter le cancer par hyperthermie modérée ou par ablathermie (avec des sondes émettrices de radiofréquences chauffant les tissus à 90°), et de l'iontophorèse qui consiste à appliquer des courants de faible intensité pendant de longues durées pour faire pénétrer des médicaments à travers la peau.

### Pourquoi la bléomycine et le cisplatine ?

Le concept de l'ECT antitumorale est né en 1987 lors d'expériences réalisées avec des cellules en culture, électroperméabilisées *in vitro* et exposées à différentes molécules antitumorales. Dans l'équipe, Stéphane Orłowski montra que la bléomycine était des milliers à des dizaines de milliers de fois plus cytotoxique sur les cellules exposées aux impulsions électriques que sur des cellules témoins (Orłowski *et al.* 1988). Les premiers essais furent effectués chez des souris porteuses de tumeurs transplantées ou de tumeurs spontanées (Mir *et al.* 1991a; Belehradek *et al.* 1991). Dès la première expérience, des souris furent guéries de la tumeur que nous avons traitée sur leur flanc, alors que ni les impulsions ni la bléomycine n'eurent d'effet antitumoral (Mir *et al.* 1991a). Au vu de ces résultats, nous avons attribué le terme électrochimiothérapie à ce procédé antitumoral (Mir *et al.* 1993).

L'activité de toutes les molécules cytotoxiques n'est pas renforcée par les impulsions électriques. En fait, la plupart des anticancéreux classiques pénètrent déjà très bien dans les cellules et ne bénéficient pas de leur perméabilisation. La bléomycine, qui est hydrophile et qui est une des substances antitumorales de plus grande taille moléculaire, est totalement incapable de traverser la membrane des cellules par diffusion (molécule « non perméante »). Par contre, une fois à l'intérieur de la cellule, elle a une extraordinaire activité cytotoxique : 500 molécules à l'intérieur d'une cellule en cycle comme la cellule tumorale sont suffisantes pour la tuer (Poddevin *et al.* 1991) car elles vont générer un nombre de coupures double-brin de l'ADN supérieur à ce que la cellule peut réparer, laissant ainsi des chromosomes fragmentés qui ne pourront pas être distribués dans de potentielles cellules filles. Il s'agit d'une modalité de mort cellulaire dite « mort mitotique » (Tounekti *et al.* 1993).

Par la suite, G. Sersa et M. Cemazar de l'Institut d'Oncologie de Ljubljana ont montré que l'activité du cisplatine est aussi potentialisée par les impulsions électriques (Sersa *et al.* 2000; Cemazar *et al.* 1999). La potentialisation est moins grande que

pour la bléomycine, car le cisplatine peut entrer, de façon limitée, dans les cellules non perméabilisées mais, contrairement à la bléomycine, le cisplatine est déjà très actif sur de nombreuses tumeurs et sa potentialisation est donc très bénéfique pour le patient.

### Autres bases biologiques de l'efficacité de l'électrochimiothérapie

En dehors des effets de perméabilisation facilitant la pénétration de médicaments cytotoxiques pas ou peu perméants, les mécanismes biologiques suivants soulignent l'intérêt et les avantages de cette nouvelle approche thérapeutique.

#### Modalités de la mort cellulaire

La bléomycine à faible dose, pénétrant sans difficulté dans les cellules électroperméabilisées, provoque la mort mitotique des cellules en cycle comme les cellules tumorales. Les cellules normales, voisines de la tumeur, en phase stationnaire, survivent (Tounekti *et al.* 1993). Ceci explique la nécrose spécifique des tissus tumoraux, même si la bléomycine est donnée par voie intraveineuse et que les applications électriques sont délivrées sur un volume dépassant celui de la tumeur pour bien couvrir celle-ci. L'absence d'effets sur la peau saine est surprenante. De plus, cela ouvre la possibilité d'un réel traitement des tissus avoisinant les tumeurs, au sein desquels des cellules tumorales ont déjà pu migrer.

#### Induction d'une occlusion des vaisseaux

L'application des impulsions électriques aux tissus provoque un arrêt transitoire du flux sanguin dans les zones électrisées. Le mécanisme est fondé en partie sur une réaction dépendant de l'histamine. La durée de l'interruption de flux sanguin dans les tissus sains (une à deux minutes dans le muscle) est insuffisante pour produire une hypoxie ou une autre conséquence nuisible (Gehl *et al.* 2002). Par contre, dans les tumeurs, cette occlusion des vaisseaux dure plusieurs heures. De plus, les cellules endothéliales vasculaires se divisent pour produire constamment de nouveaux vaisseaux dans la tumeur et sont, elles aussi, sensibles à l'ECT. Il s'ensuit une réduction, à très long terme, du flux sanguin dans la tumeur, qui contribue à l'effet de l'ECT (Sersa *et al.* 2008).

Une conséquence pratique très intéressante est l'absence de saignement de la tumeur après le retrait des aiguilles-électrodes, évitant la mise en place de pansements (situation pouvant être délicate en pratique vétérinaire). L'ECT peut même être utilisée pour arrêter les saignements continus que présentent certaines tumeurs. Le bénéfice de qualité de vie pour le patient est tel que l'ECT peut se justifier, même s'il n'est pas possible d'espérer que son effet antitumoral puisse guérir le patient.

#### La réponse immunitaire de l'hôte

Expérimentalement, la stimulation du système immunitaire a permis d'obtenir des effets antitumoraux à distance du nodule traité (Mir *et al.* 1995; Roux *et al.* 2008), une possibilité qui sera

explorée en clinique dans le futur. L'administration d'Interleukine-2 (qui active les lymphocytes-T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>) ou de ligands des Toll-like Receptors (qui activent les cellules dendritiques, présentatrices des antigènes et responsables du recrutement des cellules T) ont augmenté le nombre de guérisons des tumeurs traitées; ces molécules induisent aussi des effets antitumoraux systémiques sur une seconde tumeur transplantée non traitée, imitant en cela une grande métastase, ou sur des métastases viscérales ou pulmonaires.

## MATÉRIEL

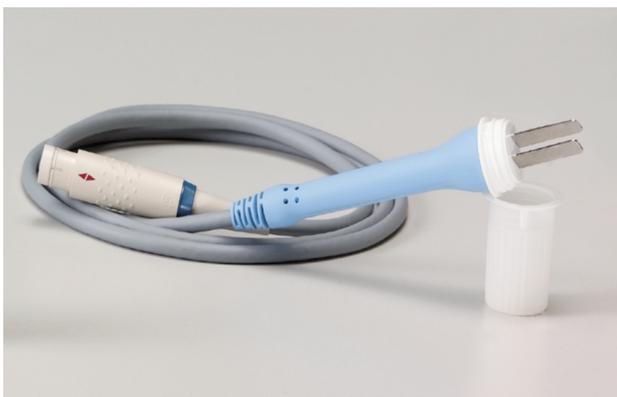
Le développement d'une nouvelle technologie médicale exige qu'un matériel adapté et sûr puisse être mis à disposition des praticiens. Le projet européen Cliniporator (5<sup>e</sup> PCRD de l'Union Européenne) a réuni huit équipes en pointe dans le domaine de l'électroporation et de l'ECT. Ce groupe étudia les caractéristiques de l'électroperméabilisation des cellules dans un certain nombre de tissus de l'organisme, dont les tumeurs, et établit le cahier des charges d'un matériel approprié. Il mit au point le Cliniporator<sup>TM</sup> (**figure 1**) intégrant toutes les connaissances accumulées par la recherche fondamentale et possédant une interface conçue pour le traitement clinique. Cette interface permet au clinicien de visualiser les courbes du courant délivré et éventuellement de recommencer son traitement en cas d'anomalie, par exemple lorsque les aiguilles sont insuffisamment introduites dans la tumeur. Le Cliniporator<sup>TM</sup> comporte plusieurs niveaux de sécurité, il est marqué CE et peut être utilisé après une formation très rapide.

Trois types d'électrodes pour les tumeurs cutanées et sous-cutanées ont été préparées (**figures 2 et 3**). L'électrode constituée de sept aiguilles en hexagone centré (**figure 3**) permet de traiter de grands volumes, soit à peu près un cylindre de 1,6 cm de diamètre et de deux à trois cm de hauteur, en utilisant chaque paire d'aiguilles adjacentes comme une électrode positive et une électrode négative. Malgré le nombre d'impulsions à délivrer, le train d'impulsions ne dure que 492 ms. Le traitement est très rapide et de nombreuses tumeurs ou des tumeurs de grande taille, par des applications successives de



**Figure 1 :** Le Cliniporator<sup>TM</sup> commercialisé par la compagnie IGEA (Carpi, Italie), partenaire des projets européens Cliniporator et Esope.

## COMMUNICATION



**Figure 2 :** Electrodes-plaques en acier inoxydable, utilisées pour le traitement de nodules très superficiels.

l'électrode jusqu'à couvrir l'ensemble du nodule, peuvent être traitées dans une même séance. Actuellement, des électrodes permettant d'atteindre des lésions profondes sont en cours d'essai. Toutes ces électrodes ont été conçues de façon à assurer un champ électrique optimal au sein même de la tumeur, la distribution du champ électrique, établie de façon expérimentale par des modèles numériques, nous avait permis auparavant de valider la technique.

## L'ÉLECTROCHIMIOTHÉRAPIE EN CLINIQUE HUMAINE

### Les premiers essais de la méthode

Les premiers patients au monde ont été traités à l'Institut Gustave-Roussy de façon compassionnelle : la plupart des petits nodules traités de cancers épidermoïdes de la tête et du cou disparurent en quelques jours (Mir *et al.* 1991b; Belehradek *et al.* 1993). La méthode a été reprise dans d'autres centres, avec des résultats de plus en plus intéressants : des nodules plus gros et d'autres cancers (mélanomes, sarcomes, carcinomes du sein, ...) ont été ainsi traités, plus de 80 % des nodules ayant régressé et disparu (Mir *et al.* 1998). Dans le cas des carcinomes basocellulaires, l'ECT pouvait même être considérée comme une méthode curative, en compétition avec la chirurgie car non mutilante. En effet, le traitement sûr d'une tumeur implique toujours des résections larges pour éviter les rechutes à cause de cellules tumorales éloignées de la masse principale. Des carcinomes basocellulaires, localisés sur le nez, les oreilles ou les lèvres, traités en une seule séance, quelquefois en deux, présentèrent 99 % de régression complète sans perte de matière du nez, des oreilles ou des lèvres traités (Glass *et al.* 1997). Les expériences se sont accumulées, avec des moyens disparates (électropulseurs divers et variés provenant de laboratoires proches des équipes cliniques intéressées) et les résultats ont été concordants : tous types de lésions confondus, environ 80 à 85 % des lésions répondent au traitement, avec une majorité de régression complète.



**Figure 3 :** Les électrodes-aiguilles sont utilisées pour le traitement des nodules sous-cutanés ; les électrodes-aiguilles hexagonales (hexagone centré) sont utilisées pour le traitement des nodules de grande taille ou de grande surface.

### Le projet européen ESOPE

Les Procédures Opérationnelles Standard Européennes (E-SOP) de l'Electrochimiothérapie ont été établies dans le cadre d'un autre projet européen dont l'acronyme était **ESOPE**. Non seulement le Cliniporator™ a été validé pour un usage en clinique, mais le traitement de patients dans quatre centres anticancéreux a permis de définir les règles d'anesthésie (locale ou générale) pour éviter des sensations douloureuses au patient, de comparer l'efficacité des différentes formes d'administration du médicament antitumoral (bléomycine par voie intraveineuse ou intratumorale, cisplatine par voie intratumorale exclusivement), de comparer l'efficacité du procédé sur des nodules de mélanome ou d'autres formes histologiques, etc. Les procédures standard opérationnelle (SOP) ont été établies (Mir *et al.* 2006), avec un arbre décisionnel permettant d'orienter de façon optimale le traitement à appliquer (type d'anesthésie, type d'électrodes, etc.). Les résultats obtenus sont conformes à ceux des essais précédents, mais le travail en groupe a permis de démontrer la reproductibilité des résultats dans les quatre centres. Ce travail de fond permet aujourd'hui de proposer la méthode aux autres centres de traitement du cancer, avec un équipement et une méthode d'emploi fiables, efficaces, tenant compte des plus récents développements de cette technologie.

### L'ÉLECTROCHIMIOTHÉRAPIE EN CLINIQUE VÉTÉRINAIRE

De même que le concept a été développé en France, ainsi que le premier essai clinique réalisé chez l'homme, c'est également en France qu'a eu lieu le premier essai vétérinaire, à l'École Vétérinaire d'Alfort, en 1997 (Mir *et al.* 1997). Des chats présentant des récurrences de fibrosarcome ont reçu de la bléomycine par voie intraveineuse, puis les impulsions électriques classiques. Ils ont présenté une stabilisation de la maladie avec une augmentation très significative de leur survie.

Quatre autres groupes européens ont publié des résultats d'ECT : trois (Ljubljana en Slovénie, Rome en Italie et

Kanresborough au Royaume-Uni) ont été obtenus chez des chats et des chiens et un (ENV de Toulouse en France) chez des équidés. Seul le cisplatine a été utilisé chez les équidés, pour traiter essentiellement des sarcoïdes : des régressions complètes de lésions, inférieures à cinq cm de diamètre, ont été obtenues de façon systématique après plusieurs séances d'ECT, sans rechute, six ans après le traitement (Rols *et al.* 2002 ; Cemazar *et al.* 2008). Le cisplatine et la bléomycine ont été utilisés pour traiter des chiens et des chats présentant des adénocarcinomes, des fibrosarcomes, des carcinomes épidermoïdes, des mastocytomes, des hémangiopéricitomes, etc. (**figures 4 à 7**). Une revue récente fait le point détaillé de ces traitements (Cemazar *et al.* 2008). Contrairement à la publication initiale, il est rapporté dans la plupart des rapports suivants que l'administration de la bléomycine ou du cisplatine (Tozon *et al.* 2001), à de faibles

doses, a été réalisée par voie intratumorale. Dans tous les cas, un pourcentage élevé des nodules tumoraux traités ont complètement régressé après une ou quelques séances d'électrochimiothérapie. Au Brésil, des animaux de compagnie ont aussi été traités par ECT avec le même type de résultats (M. Monte Mór Rangel et M. L. Zaidan-Dagli, com. pers.).

Dans une comparaison récente de l'efficacité de la chirurgie et de l'ECT appliquée seulement en une séance, dans le traitement de mastocytomes chez des chiens, les résultats des deux méthodes ont été comparables. La médiane du délai avant rechute après chirurgie a été de 31,5 mois, elle n'était pas encore atteinte pour le groupe ECT au moment de la rédaction de l'article. Les auteurs proposent l'ECT comme alternative à la chirurgie, en particulier lorsque les nodules ne sont pas ou sont difficilement opérables.



**Figure 4 :** Récurrence d'un hémangiopéricitome préalablement traité par chirurgie : aspect du nodule avant son traitement par ECT. (Cliché : Dr Vet. Natasa Tozon, Faculté Vétérinaire de l'Université de Ljubljana, Slovénie).



**Figure 5 :** Aspect du nodule deux semaines après traitement par ECT. L'ECT a consisté en l'injection intralésionnelle de cisplatine à la concentration de 1 mg/cm<sup>3</sup>, suivie une à deux minutes plus tard, par l'application de huit impulsions de 100 microsecondes de durée et de 1300 V/cm d'intensité, délivrées à la fréquence de 1 Hz, par des électrodes-plaques distantes de huit mm. (Cliché : Dr Vet. Natasa Tozon, Faculté Vétérinaire de l'Université de Ljubljana, Slovénie).



**Figure 6 :** Le même chien, cinq ans après l'ECT (détail de la zone traitée, démontrant la disparition du nodule traité) (Cliché : Dr Vet. Natasa Tozon, Faculté Vétérinaire de l'Université de Ljubljana, Slovénie).



**Figure 7 :** Le même chien, cinq ans après l'ECT (vue du chien, montrant le bon état général du patient) (Cliché : Dr Vet. Natasa Tozon, Faculté Vétérinaire de l'Université de Ljubljana, Slovénie).

## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES DE DÉVELOPPEMENT DE L'ÉLECTROCHIMIOTHÉRAPIE EN CLINIQUES HUMAINE ET VÉTÉRINAIRE

L'ECT a été mise au point jusqu'à présent pour le traitement des nodules tumoraux de toutes origines histologiques, cutanés ou sous-cutanés (Marty *et al.* 2006) (**figures 4 à 7**). La possibilité d'appliquer l'ECT à tout nodule provient du caractère physico-chimique du procédé: l'intérieur de toute cellule vivante est isolée du milieu externe par une membrane dont la perméabilité est modifiée par les impulsions électriques imposées par la technique. Toute cellule tumorale pourra être perméabilisée par le traitement. La bléomycine ou le cisplatine pourront ensuite agir directement sur son ADN, quel que soit son génome ou son transcriptome. Dans un premier temps, nous nous sommes volontairement limités au traitement des lésions superficielles, d'accès plus facile permettant la vérification des résultats plus aisée. Des essais sont en cours pour évaluer l'efficacité de l'ECT dans le cas des tumeurs profondes, aussi bien chez l'homme que chez l'animal.

Les avantages de l'ECT (spécificité d'action sur les cellules en division, absence de saignements après le traitement, et donc absence de soins et de pansements, sortie le jour même si nécessaire, ...), son efficacité sur les tumeurs locales et superficielles et l'existence d'un appareillage spécifique, confortent l'intérêt de cette méthode. Ces considérations sont à la base du développement de la méthode: si l'étude ESOPE n'a inclus que 41 patients et 171 cas de nodules évalués (résultats publiés en novembre 2006) (Marty *et al.* 2006), 300 patients ont été traités en Europe en 2007, plus de 600 en 2008 et environ 1500 sont prévus en 2009 dans une dizaine de pays européens. En clinique vétérinaire, l'ECT pourrait suivre une évolution similaire. L'électrochimiothérapie pourrait être appliquée dans les situations où les options de traitement des tumeurs sont restreintes, comme dans le cas des sarcoïdes chez les équidés. L'extension de l'électrochimiothérapie à une autre thérapie basée sur l'électroporation, l'électrotransfert de gènes, constitue un autre développement prometteur: cette approche de thérapie génique devrait éviter le recours à l'utilisation de virus pour le transfert du matériel génétique. L'électrotransfert de gènes a déjà été utilisé chez les petits et grands animaux et les essais cliniques viennent de commencer.

## REMERCIEMENTS

Les Prs P. Devauchelle, F. Quintin-Colonna et F. Delisle de l'Ecole Vétérinaire d'Alfort pour le travail initial en électrochimiothérapie en clinique vétérinaire, le Pr. Y. Tamzali de l'Ecole Vétérinaire de Toulouse pour ses discussions sur les problèmes posés par l'utilisation des cytotoxiques en pratique vétérinaire, le Pr. H. Brugère de l'Ecole Vétérinaire d'Alfort pour son invitation à préparer ce manuscrit

## BIBLIOGRAPHIE

- Belehradec, J., Jr., Orlowski, S., Poddevin, B., Paoletti, C., Mir, L.M. 1991. Electrochemotherapy of spontaneous mammary tumours in mice. *Eur J Cancer* 27 (1): 73-76.
- Belehradec, M., Domenge, C., Luboinski, B., Orlowski, S., Belehradec, J.Jr., Mir, L.M. 1993. Electrochemotherapy, a new antitumor treatment. First clinical phase I-II trial. *Cancer* 72 (12): 3694-3700.
- Cemazar, M., Miklavcic, D., Scancar, J., Dolzan, V., Golouh, R., Sersa, G. 1999. Increased platinum accumulation in SA-1 tumour cells after in vivo electrochemotherapy with cisplatin. *Br J Cancer* 79 (9-10): 1386-1391.
- Cemazar, M., Tamzali, Y., Sersa, G., Tozon, N., Mir, L.M., Miklavcic, D., Lowe, R., Teissie, J. 2008. Electrochemotherapy in veterinary oncology. *J Vet Intern Med.* 22 (4):826-381 (Review).
- Gehl, J., Skovsgaard, T., Mir, L.M. 2002. Vascular reactions to in vivo electroporation: characterization and consequences for drug and gene delivery. *Biochim Biophys Acta* 1569 (1-3): 51-58.
- Glass, L.F., Jaroszeski, M., Gilbert, R., Reintgen, D.S., Heller, R. 1997. Intralesional bleomycin-mediated electrochemotherapy in 20 patients with basal cell carcinoma. *Journal of the American Academy of Dermatology* 37 (4): 596-599.
- Marty, M., Sersa, G., Garbay, J.R., Gehl, J., Collins, C., Snoj, M., Billard, V., Geertsen, P., Larkin, J., Miklavcic, D., et al. 2006. Electrochemotherapy - an easy, highly effective and safe treatment of cutaneous and subcutaneous metastases: results of the ESOPE (European Standard Operating Procedures of Electrochemotherapy) study. *Eur J Cancer Supplements* 4 (11):3-13.
- Mir, L.M., Orlowski, S., Belehradec, J., Jr., Paoletti, C. 1991a. Electrochemotherapy potentiation of antitumour effect of bleomycin by local electric pulses. *Eur J Cancer* 27 (1): 68-72.
- Mir L.M., Belehradec M., Domenge C., Orlowski, S., Poddevin, B., Belehradec, J Jr, Schwaab, G, Luboinski, B, Paoletti, C. 1991b [Electrochemotherapy, a new antitumor treatment: first clinical trial]. *C R Acad Sci III* 313 (13): 613-618.
- Mir, L.M., Roth, C., Orlowski, S., Quintin-Colonna, F., Fradelizi, D., Belehradec J.Jr, Kourilsky, P. 1995. Systemic antitumor effects of electrochemotherapy combined with histoincompatible cells secreting interleukin-2. *J. of Immunother.* 17 (1): 30-38.
- Mir, L.M., Devauchelle, P., Quintin-Colonna, F., Delisle, F., Doliger, S., Fradelizi, D., Belehradec, J Jr, Orlowski, S. 1997. First clinical trial of cat soft-tissue sarcomas treatment by electrochemotherapy. *Br J Cancer* 76 (12): 1617-1622.
- Mir, L.M., Glass, L.F., Sersa, G., Teissie, J., Domenge, C., Miklavcic, D., Jaroszeski, M.J., Orlowski, S., Reintgen, D.S., Rudolf, Z., et al. 1998. Effective treatment of cutaneous and subcutaneous malignant tumours by electrochemotherapy. *Br J Cancer* 77 (12): 2336-2342.