# Université François-Rabelais de Tours

*ÉCOLE DOCTORALE SANTÉ, SCIENCES, TECHNOLOGIES*

**UMR INSERM U930, CNRS ERL 3106, équipe 5**

# THÈSE présentée par :


## Annabel MARUANI épouse RAPHAEL


soutenue le : **18 novembre 2010**

pour obtenir le grade de : Docteur de l'Université François - Rabelais

*Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé*

# APPLICATIONS DE LA SONOPHORÈSE BASSE FRÉQUENCE À L'HUMAIN *IN VIVO*

**THÈSE dirigée par :**

| | |
|---|---|
| **MACHET Laurent** | Professeur, Université de Tours |

**RAPPORTEURS :**

| | |
|---|---|
| **CHOSIDOW Olivier** | Professeur, Université Paris XII |
| **DRENO Brigitte** | Professeur, Université de Nantes |

---

**JURY :**

| | |
|---|---|
| **BOUCAUD Alain** | Ingénieur de Recherche, Transderma Systems |
| **CHOSIDOW Olivier** | Professeur, Université Paris XII |
| **DRENO Brigitte** | Professeur, Université de Nantes |
| **MACHET Laurent** | Professeur, Université de Tours |
| **PATAT Frédéric** | Professeur, Université de Tours |
| **VAILLANT Loïc** | Professeur, Université de Tours |

*Pour Pierre*

*Pour Garance, Camille et Eliott*

# *Remerciements*

*Je remercie le Professeur Laurent MACHET, pour avoir dirigé ce travail de thèse avec une grande disponibilité.*

*Je remercie le Docteur Alain BOUCAUD, pour son aide permanente et son activité d'encadrement dans cette thèse, toujours avec bonne humeur.*

*Je remercie le Professeur Brigitte DRÉNO et le Professeur Olivier CHOSIDOW, d'avoir accepté de juger ce travail, ainsi que la tâche de rédiger le rapport de cette thèse.*

*Je remercie le Professeur Loïc VAILLANT pour ses conseils toujours d'une grande aide.*

*Je remercie le Professeur Frédéric PATAT de m'avoir intégrée dans son équipe de recherche, et d'avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse.*

*Je remercie le Professeur Gérard LORETTE pour son soutien constant.*

*Je remercie Le Docteur Bruno Giraudeau pour son aide méthodologique et statistique.*

***Je remercie :***

*Mes parents, pour leur dévouement ;*

*Nathalie, sœur et guide, qui sait ce qu'elle représente pour moi, et mon petit frère Jérome ;*

*Ma bientôt centenaire grand-mère ;*

*Ma belle-famille ;*

*René Gutman ;*

*Mes amis.*

# Table des matières

**Résumé** …….. 1

**Résumé en anglais** …… 3

**Introduction. La sonophorèse en 2010 : résumé des principaux travaux** ……. 5

**Objectifs du travail de thèse** …….. 20

**Première partie. Tolérance de la sonophorèse basse fréquence chez l'humain *in vivo* : essai randomisé contrôlé en double aveugle** …….. 22

**Deuxième partie. Efficacité de la sonophorèse basse fréquence pour le passage transdermique d'histamine : essai randomisé chez l'humain** …… 40

**Troisième partie. Augmentation de l'efficacité des dermocorticoïdes après sonophorèse basse fréquence : essai randomisé pilote chez l'humain** ….. 47

**Conclusions et perspectives** …… 56

**Bibliographie** …… 59

# Résumé

**Introduction**

La sonophorèse basse fréquence (application sur la peau d'ultrasons (US) de basse fréquence (20-100 kHz) pour en augmenter la perméabilité), a montré son efficacité en tant que promoteur du passage transcutané de molécules. Cet effet est lié à l'élévation thermique induite par les US, et au phénomène de cavitation (création de microbulles gazeuses explosant). Ont ainsi été testées *in vitro* et *in vivo* chez l'animal plusieurs molécules de bas et même de haut poids moléculaire (insuline, héparine). Peu d'études ont été réalisées *in vivo* chez l'homme.

**L'objectif** de ce travail de thèse a été d'amorcer les applications de la sonophorèse à l'homme. Trois essais cliniques randomisés ont été réalisés chez l'homme : le premier avait pour but d'évaluer la tolérance des US à différentes intensités ultrasonores, en comparaison avec un placebo ; le deuxième d'évaluer la pénétration transcutanée de l'histamine après sonophorèse ; le troisième, de comparer l'effet clinique des dermocorticoïdes, largement utilisés en dermatologie, sans et après sonophorèse.

**Méthodes**

Les études ont porté sur des volontaires sains, et se sont déroulées au Centre d'Investigation Clinique du CHRU de Tours. Les US, appliqués sur l'avant-bras (dans les 3 essais) et sur le genou (essai (1)) étaient délivrés en mode pulsé, avec une sonde de 36 kHz, durant 5 minutes, à des intensités ultrasonores variant entre 1,57 à 3,50 W/cm$^2$ pour l'essai (1), entre 1,6 et 2 W/cm$^2$ pour l'essai (2) et à 2,72 W/cm$^2$ pour l'essai (3).

**Résultats**

Dans l'essai (1), 34 sujets ont été inclus. Aucune toxicité (définie par une douleur > 40/100 ou une nécrose) n'a été observée. Les effets secondaires ont été un érythème au site d'application des US, généralement réversible en moins de 24 heures, et des bourdonnements d'oreilles dans 23,5% des cas, modérés et régressifs dès l'arrêt des US.

Dans l'essai (2), 10 sujets ont été inclus. Une papule est apparue chez 9 sujets, après l'application d'histamine, uniquement sur les zones préalablement traitées par sonophorèse, la papule étant un marqueur de la pénétration transcutanée de l'histamine. La taille moyenne des papules était d'autant plus grande que l'intensité ultrasonore était élevée. Il n'y a pas eu de papule quand l'histamine était appliquée sans US.

Dans l’essai (3), 15 volontaires ont été inclus. Le blanchiment cutané induit par les dermocorticoïdes (bétaméthasone 17-valérate, Betnéval® crème), traduisant la vasoconstriction induite par la pénétration du produit, était significativement plus important sur les zones préalablement traitées par sonophorèse ($p<0,05$). Il était d’autant plus important que le dermocorticoïde était appliqué avec une occlusion longue (2 heures > 1 heure).

**Conclusions**

L’essai (1) démontre qu’aux intensités ultrasonores généralement utilisées pour favoriser l’absorption percutanée de molécules, il n’y a pas d’effets toxiques chez l’homme. Ceci est un pré-requis nécessaire avant d’entamer des études cliniques thérapeutiques.

L’essai (2) démontre l'efficacité de la sonophorèse pour augmenter l’absorption percutanée de l'histamine, chez l'homme. Il s’agit d’un modèle pharmacodynamique non invasif, démontrant la réduction de la fonction barrière de la peau induite par les US de basse fréquence.

L’essai (3) montre que l’utilisation combinée des US de basse fréquence et d’une occlusion de 2 heures est un moyen synergique d’augmenter l’efficacité des dermocorticoïdes. Ceci pourrait être utilisé pour traiter des zones réfractaires au traitement local du fait d’une épaisseur cutanée importante (paumes, plantes, cicatrices chéloïdes par exemple).

**Mots-clés : ultrasons ; sonophorèse ; essai clinique ; toxicité ; histamine ; dermocorticoïdes.**

# Résumé en anglais

**Introduction**

Low-frequency ultrasound (US) – from 20 to 100 kHz – applied on skin, called sonophoresis, have been investigated to enhance the transdermal transport of various drugs, with a low- and even a high-weight, like insulin and heparin. Increased transdermal permeability subsequent to US application is attributed to their thermal effects, but mainly to cavitation phenomenon, which consists of the generation of gas bubbles, which oscillate and may implode at the skin surface. Low-frequency sonophoresis has been investigated *in vitro* on excised skin, and *in vivo* in animals and, in only a few studies, in humans.

**Objectives**

We aimed to investigate low-frequency sonophoresis *in vivo* in humans. Three clinical trials have been conducted: the first aimed to assess skin toxicity of sonophoresis at different intensity levels, compared to placebo; the second aimed to investigate, in a randomized study of healthy human subjects, the transdermal penetration of histamine with sonophoresis; and the third aimed to investigate in a simple, blinded, randomized controlled pilot study of healthy subjects the clinical efficiency of sonophoresis in enhancing transdermal penetration of topical steroids, as measured by vasoconstriction scores.

**Methods**

The studies were carried out in the Clinical Investigation Center of the University Hospital of Tours, France. The subjects were healthy volunteers. The working frequency of the device was 36 kHz. Low-frequency US were applied on the forearm (in the 3 trials) and on the knee (trial (1)) in pulsed mode for 5 minutes. US intensities ranged from 1.57 to 3.50 W/cm$^2$ in trial (1), from 1.6 to 2 W/cm$^2$ in trial (2) and the intensity was 2.72 W/cm$^2$ in trial (3).

**Results**

In trial (1), 34 subjects were included. No toxicity, defined as a pain score > 40 on a 0- to 100-mm visual analogue scale or necrosis, was reported. The most frequent adverse events were: erythema, which systematically appeared after US application, but it usually disappeared after 1 day; and tinnitus, which was reported in 23.5% of cases. Its intensity was always moderate, and it always ceased on discontinuation of US.

In trial (2), 10 subjects were included. Papules induced by histamine application were measured, revealing its transdermal penetration. Arm zones without US showed no papules; 9/10 subjects receiving US showed papules. Their mean size increased with intensity of US.

In trial (3), 15 subjects were included. The skin color of the zones which had received topical steroids was measured, increased whiteness reflecting the intensity of vasoconstriction induced by topical steroid (betamethasone 17-valerate, Betnéval® cream). Vasoconstriction was significantly higher with the topical steroid applied after US than without US ($p<0.05$), especially in the zone with 2-h occlusion.

**Conclusions**

Trial (1) provides favourable exploratory results regarding tolerance of low-frequency sonophoresis on human skin *in vivo*. Such data could be useful before the initiation of clinical trials of therapeutic use of low-frequency sonophoresis in humans.

Trial (2) confirms that sonophoresis enhances transdermal penetration of histamine in humans *in vivo*. This is therefore a non-invasive pharmacological model demonstrating the loss of skin barrier function induced by low-frequency US.

Trial (3) demonstrates that the use of low-frequency sonophoresis coupled with 2-h occlusion is a synergistic way to increase the efficiency of topical steroids by enhancing skin permeability. This combination could be used for lesions refractory to treatment because of thick skin, such as for cheloid scars or for topography of palms and soles.

**Keywords: ultrasound; sonophoresis; clinical trial; toxicity; histamine; topical steroids.**

# Introduction

## La sonophorèse en 2010 : résumé des principaux travaux

La peau constitue une voie d'administration de médicaments, dont la cible peut être locale (dermocorticoïdes par exemple), ou systémique (oestradiol ou trinitrine en dispositif transdermique par exemple). Les molécules ainsi utilisées sont cependant peu nombreuses, car l'effet barrière de la peau, notamment de sa couche cornée, limite l'absorption percutanée des molécules, surtout de haut poids moléculaire. Cette voie de passage médicamenteux a un intérêt clinique : elle est moins traumatisante que la voie injectable, surtout quand les injections sont répétées (insuline, héparine de bas poids moléculaire) ; elle est intéressante chez les personnes ayant des troubles de la déglutition ou recevant une polymédication. Elle a aussi un intérêt pharmacologique, en évitant l'effet de premier passage hépatique qui inactive une grande partie du principe actif administré par voie orale [Machet et al., 1997].

Il a été démontré par des études *in vitro* et *in vivo* que la diffusion de médicaments à travers la peau était proportionnelle à la surface d'application, à la concentration du principe actif dans son véhicule et au véhicule lui-même, ainsi qu'au coefficient de perméabilité du principe actif, lié à ses caractéristiques physico-chimiques (lipophilie, polarité, poids moléculaire) [Nino et al., 2010].

Faciliter l'absorption percutanée de molécules afin d'en augmenter l'efficacité locale ou d'obtenir un effet systémique est un objectif souvent nécessaire. De nombreux facteurs intrinsèques et extrinsèques influencent l'absorption percutanée de molécules, tels que l'âge, le site d'application (selon l'épaisseur de la couche cornée), le rythme et la durée d'application du produit ou encore la pression appliquée (massage). Des promoteurs mécaniques, chimiques ou physiques ont été étudiés :

- l'occlusion, qui augmente la température, l'hydratation, le débit sanguin cutané local et l'effet réservoir du produit ;
- les promoteurs chimiques, qui ont des modes d'action variés (kératolytiques, solvants, surfactants) ;
- les promoteurs physiques (ionophorèse, électroporation, ultrasons (US) de haute fréquence et de basse fréquence appliqués sur la peau (sonophorèse)).

La sonophorèse est définie comme l'utilisation des US sur la peau pour en augmenter la perméabilité, dans le but de faciliter la diffusion de molécules. Il s'agit d'une thématique de recherche développée dans notre équipe de recherche (équipe 5, INSERM U930) [Machet et Boucaud, 2002].

**Les mécanismes de la sonophorèse**

Les US sont produits par un transducteur composé d'un cristal piézoélectrique, qui convertit l'énergie électrique en énergie mécanique, sous forme d'ondes acoustiques, et *vice versa.* Les US sont caractérisés par leur fréquence, qui dépend des propriétés du cristal piézoélectrique, et par leur atténuation, inversement proportionnelle à la fréquence. Plus la fréquence des US est élevée, moins ceux-ci pénètrent profondément dans la peau. On différencie ainsi la sonophorèse de haute fréquence, (US de fréquence supérieure à 1 MHz) de la sonophorèse de basse fréquence (20 à 100 kHz).

Les US peuvent être délivrés sur un mode continu ou séquentiel (pulses de type 1 sec on/2 sec off, par exemple).

L'intensité ultrasonore (en Watt/$cm^2$) généralement utilisée, varie entre 0,5 et 3,5 W/$cm^2$, et est nettement plus élevée que celle utilisée pour l'imagerie échographique.

Le mécanisme par lequel l'absorption percutanée est augmentée par la sonophorèse est au moins double : phénomène de cavitation d'une part, effet thermique local d'autre part, l'augmentation de la chaleur locale pouvant elle-même être responsable de cavitation *a minima*. L'élévation de température s'observe à la surface de la peau et dans la peau, et est responsable d'un érythème (vasodilatation), souvent observé après l'application des US. Cet effet thermique est lié à l'atténuation des US lors de leur propagation dans le milieu, l'énergie se transformant alors en chaleur. Il augmente avec l'intensité ultrasonore et le mode continu de délivrance des US. La cavitation est un phénomène hautement énergétique, consistant en la production de microbulles gazeuses dans le milieu de propagation des US, pouvant exploser [Simonin, 1995]. Ce phénomène survient plus facilement, à des énergies ultrasonores moins élevées, avec les US de basse fréquence que de haute fréquence. La conséquence cutanée de la cavitation, qui survient à la surface du *stratum corneum,* est la désorganisation lipidique de la couche cornée, la création de dépressions cornéennes et l'élargissement de l'espace intercellulaire. Le phénomène de cavitation se majore avec des intensités ultrasonores accrues, pouvant alors créer des effets toxiques (nécroses cutanées, voire musculaires *in vivo* chez l'animal) [Boucaud et al., 2001].

**L'état des connaissances sur l'efficacité de la sonophorèse en 2010**

Les premières études de sonophorèse ont été réalisées avec des US de haute fréquence *in vivo* par des équipes américaines avec des corticoïdes [Griffin et Touchstone, 1963], puis avec des substances analgésiques [Novak, 1964]. Elles portaient essentiellement sur des

volontaires sportifs et des militaires. La quantification plus précise de l'augmentation de la diffusion percutanée par les US a été étudiée *in vitro* à partir de 1985 [McElnay et al., 1985].

Les essais sur les US de basse fréquence ont été menés plus récemment (années 90), *in vitro* sur des kératinocytes humains en culture et *in vivo* chez l'animal. La diffusion percutanée de molécules de bas poids moléculaire, puis de haut poids moléculaire, a été démontrée ; la diffusion percutanée de l'insuline (6 kDA), chez le porc et la souris, objectivée par des baisses de la glycémie, a offert des perspectives d'utilisation de cette voie d'administration comme alternative aux injections répétées d'insuline [Tachibana et Tachibana, 1991, Mitragotri et al., 1995, Boucaud et al., 2002].

Une revue systématique des articles publiés jusqu'en 2002 a été réalisée par Machet et Boucaud dans *Int J Pharm*. Les trois tableaux qui suivent sont extraits de cette revue, et récapitulent les différentes études.

Table 1
In vivo studies in animals

| Author, year | $F$ (kHz) | $I$ (W/cm$^2$) | Mode | Duration (min) | Molecule | Animal | Effect |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Griffin and Touchstone, 1963 | 1000 | 1–3 | C | 5 | Cortisol | Swine | Intramuscular concentration ×3 |
| Levy et al., 1989 | 1000 | 1.5 | C | 3 | Dimannitol | Rats | Increased diffusion × 5-20 |
| | 1000 | 3 | P | 5 | | | |
| Bommannan et al., 1992a | 2000 | 0.2 | C | 20 | Salicylic acid | Guinea pigs | Urinary excretion increased at 10 MHz (× 4) and 16 MHz (× 2.5) but not at 2 |
| | 10 000 | | | | | | |
| | 16 000 | | | | | | |
| Tachibana and Tachibana, 1993 | 48 | 0.17 | C | 5 | Lidocaine | Mice | Increased pain threshold |
| Vyas et al., 1995 | 20 000 | 3 | P | 15 | Diclofenac | Rats | Reduction in provoked paw oedema |
| Mitragotri et al., 1995a | 20 | 0.225 | P | 60 | Insuline | Rats | Marked decrease in blood glucose levels |
| Mitragotri et al., 1996 | 20 | 0.125 | P | 300 | Salicylic acid | rats | Flux × 300 |
| Asano et al., 1997 | 1000 | 1–2.5 | P | 10–19 | Indomethacin | rats | Mild increase in blood concentrations |
| | | | C | 10 | | | |
| Mitragotri and Kost, 2000 | 20 | 7 | P | 2 | Mannitol | Rats | × 33 enhancement |
| | | | | | Inulin | | × 20 enhancement |
| | | | | | Glucose | | × 65 enhancement |
| Mitragotri and Kost, 2001 | 20 | 7 | P | 2 | Dalteparin | rats | Anti-Xa activity |
| Boucaud et al., 2002a | 20 | 2.5 | P | 15 | Insulin | rats | Marked decrease in blood glucose levels |

Table 2
In vivo studies in humans

| Author, year | F (kHz) | I (W/cm²) | Mode | Duration (min) | Molecule | Number of patients | Effect |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Griffin et al., 1967 | 1000 | 0–3 | C | 5 | Hydrocortisone | 102 | Reduced pain (68% vs 28%) |
| McElnay et al., 1985 | 870 | 2 | P | 5 | lignocaine | 10 | Non-significant |
| McElnay et al., 1986 | 870 | 2 | P | 5 | Fluocinolone acetonide | 12 | Non-significant |
| Benson et al., 1988 | 750–3000 | 1–1.5 | C<br>P | 5 | Prilocaine<br>Lignocaine | 11 | Significant increase in duration of anaesthesia |
| Benson et al., 1989 | 750–3000 | 1.5 | C | 5 | Benzydamine | 10 | Non-significant |
| Williams, 1990 | 1100 | 0.25 | C | 5 | Anaesthetic drugs | 6 | Non-significant |
| Benson et al., 1991 | 3000 | 1 | C | 5 | Nicotinates | 10 | Non-significant |
| Ciccone et al., 1991 | 1000 | 1.5 | P | 5 | Salicylate | 40 | Non-significant |
| McElnay et al., 1993 | 3000 | 1 | C | 5 | Nicotinate | 10 | Vasodilatation × 1.7 |
| Kost et al., 2000 | 20 | 10 | P | 2 | Glucose | 7 | Increased reverse transport of glucose |

Table 3
In vitro studies of phonophoresis according to frequency across rat, mouse or human skin.

| Author, year | F (kHz) | I (W/cm²) | Mode | Duration (min) | Molecule | Membrane | Effect |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Vyas et al., 1995 | 20 000 | 3 | P | 15 | Diclofénac | Mice skin | × 2–30 enhancement |
| Machet et al., 1996 | 3300 | 3 | C | 10 | Digoxin | Hairless mice skin | Flux × 3 but heating resulted in the same effect |
| Meidan et al., 1998b | 3300<br>1100 | 2.25 | C | 240 | Hydrocortisone | Rat skin | × 2.2 enhancement<br>× 1.8 |
| Meidan et al., 1998a | 1100 | 2 | C | 5 | Sucrose<br>Mannitol<br>Hydrocortisone | Rat skin | × 4.5 enhancement<br>× 4.1<br>× 7.7 |
| Pelucio-Lopes et al., 1993 | 1100 | 1.5 | C | 20 | Azydothymidine | Human skin | Flux × 1 with a cooling coil |
| Hikima et al., 1998 | 1100 | 4.3 | C | 10–30 | Prednisolone | Hairless mouse skin | × 2–5 |
| Machet et al., 1998 | 1100 | 1.5 | C | 20 | Mannitol<br>Oestradiol<br>Hydrocortisone | Hairless mouse skin<br>Human skin | Flux × 1 with a cooling coil<br>Flux × 1 with a cooling coil |
| Brucks et al., 1989 | 1000 | 1 | C | 240 | Ibuprofene | Human epidermis | × 3 enhancement |
| Mitragotri et al., 1995b | 1000 | 2 | C | 300 | 7 molecules | Human epidermis | Flux × 13 estradiol, × 5 testosterone, × 4 cortisol, × 1.5 butanol, × 1.2 caffeine. |
| Johnson et al., 1996 | 1000 | 1.4 | C | 1440 | 4 molecules with chemical enhancer | Human epidermis | Flux x1 à × 75 |
| Mitragotri, 2001 | 1000 | 2 | C | 300 | 5 molecules | Human stratum corneum | × 2– 15 enhancement |
| Ueda et al., 1995 | 150 | 0.111 | C | 60 | 9 molecules | Hairless rat skin | Flux × 2 –15 |
| Ueda et al., 1996 | 150 | 0.111 | C | 60 | Benzonte sodium<br>Deuterium oxyde | Hairless rat skin | × 7 enhancement<br>× 4 enhancement |
| Monti et al., 2001 | 40 | 0.44 | C | 240 | Caffeine<br>Morphine | Hairless mouse skin | × 4 enhancement<br>× 10 enhancement |
| Mitragotri et al., 1996 | 20 | 0.125 | P | 300 | 7 molecules | Human epidermis | Flux × 3 (oestradiol), × 80 (cortisol), × 113 water), × 400 salicylic acid), × 5000 (sucrose) |
| Zhang et al., 1996 | 20 | 0.2 | P | 120 | Vasopressine | Human epidermis | Kp = 1 $10^{-5}$ cm/h with ultrasound<br>Kp = 0 without ultrasound |
| Fang et al., 1999 | 20 | 0.1–0.3 | P<br>C | 240<br>240 | Clobetasol<br>17-propionate | Hairless mice | × 1.9–4 enhancement<br>× 1.5–5.9 enhancement |
| Mitragotri et al., 2000c | 20 | 1.6–14 | P | 90 | Mannitol | Pig skin | × 10 enhancement |
| Mitragotri and Kost, 2001 | 20 | 7 | P | 10 | Low molecular weight Heparin | Pig skin | × 21 enhancement |
| Boucaud et al., 2001a | 20 | 2.5 | P | 60 | Caffeine<br>Fentanyl | Human skin | × 4 enhancement<br>× 34 |
| | 20 | 2.5 | C | 10 | Caffeine<br>Fentanyl | | × 1<br>× 4 |

Les principaux essais publiés depuis 2002, par conséquent non pris en compte dans la revue systématique de Machet et Boucaud, sont décrits dans le paragraphe qui suit.

* *Sonophorèse et vaccination*

En 2005, Tezel et al. ont rapporté l'obtention d'une immunisation contre le tétanos *in vivo* chez la souris, après une vaccination transcutanée utilisant la sonophorèse basse fréquence. L'anatoxine tétanique pure, sans adjuvant, était appliquée sur l'abdomen rasé des souris pendant deux heures. Une partie des souris recevaient les US préalablement, les autres servaient de témoins négatifs. Les US étaient délivrés avec une sonde de 20 kHz, en mode pulsé (cycle de 50%, 5 sec on/5 sec off), à une intensité ultrasonore de 2,4 W/cm$^2$, avec une durée variable. Les concentrations d'anatoxine (100 µg/0,65 ml) étaient 10 à 30 fois supérieures aux concentrations utilisées pour les témoins positifs, vaccinés par voie injectable. Un rappel vaccinal selon la même procédure était réalisé après 5 semaines, et les anticorps étaient dosés à 10 semaines. Les résultats ont montré que les souris ont développé globalement autant d'anticorps que les témoins positifs. Le taux d'anticorps était plus élevé lorsque la durée des US était longue. Les auteurs ont ainsi suggéré que les US pouvaient servir d'adjuvant vaccinal à l'anatoxine tétanique.

* *Sonophorèse et ciclosporine in vitro chez l'animal*

En 2006, Liu *et al.* ont étudié le passage transdermique de la ciclosporine A sur peau de rat *in vitro*, en utilisant des US basse fréquence (20 kHz). La ciclosporine A locale peut en effet avoir des indications potentielles dans plusieurs maladies cutanées auto-immunes. L'étude comparait le passage de la molécule : sans US ; avec plusieurs durées (30 et 60 minutes) et intensités d'US (0,4, 0,8 et 1,2 W/cm$^2$) ; avec l'électroporation seule (durée de 20 minutes, 1 pulse/20 sec) ; avec US (30 minutes, I = 0,8 W/cm$^2$) et électroporation ; avec différents promoteurs chimiques (mentol 10%, laurocapram 5%, sodium lauryl sulfate 0,05%, diméthyl sulfoxyde 5%, N-méthyl pyrrolidine 5%) ; avec ces mêmes promoteurs chimiques associés aux US (30 minutes, I = 0,8 W/cm$^2$). Les US étaient délivrés en mode pulsé (cycle de 50% : 1 sec on, 1 sec off). Les résultats de cette étude ont montré une discrète augmentation du passage transdermique de la ciclosporine A avec les US aux intensités de 0,8 et 1,2 W/cm$^2$, ainsi qu'une discrète augmentation avec les promoteurs chimiques seuls (surtout sodium lauryl sulfate et le laucapram). Les US à 0,4 W/cm$^2$ et l'électroporation n'ont pas modifié ce passage. Le passage transdermique de ciclosporine a été nettement augmenté avec

l'association de promoteurs : US/électroporation et US/promoteurs chimiques. La combinaison la plus efficace était l'association des US avec le sodium lauryl sulfate.

* *Sonophorèse et insuline in vitro et in vivo chez l'animal*

Suite aux travaux de Tachibana (1991), Mitragotri (1995) puis Boucaud (2002), montrant qu'*in vivo*, chez le porcelet, l'application d'US pouvait faire passer 7 unité (UI) d'insuline en 15 minutes, l'équipe de Smith NB a continué à publier régulièrement sur cette thématique.

En 2003, cette équipe a testé un nouveau dispositif ultrasonore, et démontré son efficacité dans le passage de l'insuline *in vitro* sur peau humaine [Smith et al., 2003]. Il s'agit d'un transducteur, formé de 4 rangées constituées d'un disque piézoélectrique entouré par 2 disques métalliques, ayant la forme d'une cymbale, délivrant des US basse fréquence (20 kHz). Ce dispositif a l'avantage d'être maniable (taille < 40 mm, poids < 22 g). Dans les différentes études, il a été utilisé en mode pulsé (pulses de 200 ms, cycle de travail de 20%), avec une intensité $I_{SPTP}$ = 100 mW/cm$^2$.

Smith et al. ont publié un essai de passage transdermique de l'insuline avec ce transducteur, chez une cohorte de rats *in vivo* [Smith et al., 2003]. Quatre groupes de rats ont été testés : groupe (1) avec US sans insuline, groupe (2) sans US avec insuline, groupe (3) avec US et insuline placée dans un réservoir recevant les US sur l'abdomen pendant 60 minutes, et groupe (4) avec la même procédure pendant 20 minutes.

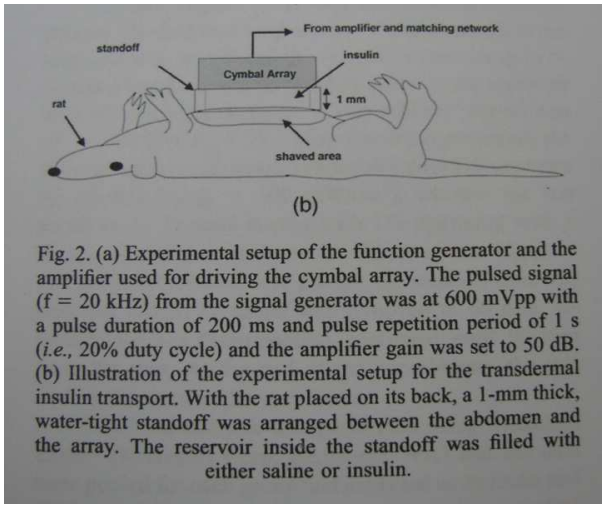



Fig. 2. (a) Experimental setup of the function generator and the amplifier used for driving the cymbal array. The pulsed signal (f = 20 kHz) from the signal generator was at 600 mVpp with a pulse duration of 200 ms and pulse repetition period of 1 s (*i.e.*, 20% duty cycle) and the amplifier gain was set to 50 dB. (b) Illustration of the experimental setup for the transdermal insulin transport. With the rat placed on its back, a 1-mm thick, water-tight standoff was arranged between the abdomen and the array. The reservoir inside the standoff was filled with either saline or insulin.

*Smith NB, et al. Ultrasound Med Biol 2003;29:1205-10.*

Le témoin du passage transdermique de l'insuline était la baisse de la glycémie, mesurée aux temps 30, 60 et 90 minutes. Les résultats ont montré des variations faibles de glycémie pour les deux groupes contrôles (± 40 mg/dl). Des baisses notables de glycémie ont été

observées chez les deux groupes recevant US et insuline : à 30 min (-175,2 ± 63,2 mg/dl pour le groupe (3)) ; à 60 min (-267,5 mg/dl ± 61,9) ; et surtout à 90 min (-296 mg/dl ± 52,8). Il n'y avait pas de différence significative entre les groupes recevant les US pendant 20 minutes et 60 minutes, sur les 90 minutes explorées.

Un essai de même méthodologie a montré qu'il n'y avait pas de différence avec des périodes d'exposition aux US encore plus courtes (5 et 10 minutes) [Lee et al., 2004].

Deux essais utilisant le même dispositif ultrasonore et les mêmes modalités d'application des US et de l'insuline ont été réalisés sur une cohorte de lapins blancs de Nouvelle-Zélande [Lee et al., 2004, Luis et al., 2007]. La glycémie n'a pas baissé dans les deux groupes contrôles, tandis que le groupe recevant les US pendant 60 minutes, dans une chambre contenant de l'insuline, a vu ses glycémies s'effondrer à 90 minutes.

En 2007, la même étude a été réalisée sur une cohorte de 6 porcs de Yorkshire [Park et al., 2007]. Deux groupes étaient constitués : l'un recevant l'insuline sans US (réservoir placé sur une zone axillaire) et l'autre les US et l'insuline pendant 60 minutes. La glycémie était dosée toutes les 15 minutes pendant 90 minutes. La glycémie de base était de 146 mg/dl ± 13. Il a été observé une discrète élévation, non significative, de la glycémie chez les cochons contrôles. Chez ceux traités par insuline et US, la baisse de glycémie, témoignant du passage transdermique de l'insuline, était de -72 mg/dl ± 5 après 60 minutes, et de – 91 mg/dl ± 23 après 90 minutes.

En 2008, la même équipe a publié une étude comparant la baisse de glycémie obtenue, chez le rat, après insuline et US selon la même procédure (60 minutes d'exposition aux US et à l'insuline) à la baisse de glycémie induite par différentes doses d'insuline administrées par voie sous-cutanée (0,15, 0,20 et 0,25 U/kg) [Park et al., 2008]. La glycémie était dosée toutes les 15 minutes pendant 90 minutes. Les résultats ont montré qu'il n'y avait pas d'hypoglycémie induite par les injections de 0,15 et 0,20 U/kg d'insuline. Avec une dose de 0,25 U/kg, une hypoglycémie a été provoquée, plus importante à 90 minutes (-190 mg/dl ± 96). Les hypoglycémies induites par les US étaient encore plus importantes (-262 mg/dl ± 40 à 90 min).

** Sonophorèse et modification de la barrière cutanée in vivo chez l'homme*

En 2009, Gupta et Prausnitz ont quantifié la perméabilité cutanée après sonophorèse, sur une période de 48 heures, avec et sans occlusion, chez le volontaire sain *in vivo* (10 sujets inclus). Les US étaient appliqués avec le prototype SonoPrep® : fréquence de 55 kHz, durée d'application brève, intensité 15 W/cm$^2$. La perméabilité cutanée était estimée par la mesure

de l'impédance électrique de la peau. Cliniquement, aucune modification de la peau traitée par US n'a été observée. La mesure de l'impédance a chuté après le retrait de la sonde ultrasonore (de > 200 kΩ-cm$^2$ à < 10 kΩ-cm$^2$), témoignant d'une augmentation de la perméabilité cutanée. Les mesures horaires de l'impédance électrique ont montré une re-augmentation progressive de l'impédance sur les 48 heures, qui n'était pas revenue à la normale à 48 heures. L'augmentation de l'impédance s'est faite de façon plus lente sur les zones en occlusion. Cette étude a conclu que la perméabilité cutanée augmente après application d'US de basse fréquence, avec un maximum au retrait de la sonde, puis une diminution progressive de la perméabilité cutanée, encore incomplète à 48 heures. Pendant cette durée, le passage transdermique de topiques peut donc être favorisé. De plus, l'occlusion renforçait l'effet des US sur la diminution de la fonction barrière de la peau.

** Sonophorèse et applications thérapeutiques dermatologiques in vivo chez l'homme*

Deux essais publiés ont porté sur la sonophorèse à visée thérapeutique chez le sujet adulte [Santoianni et al., 2004]. Les molécules testées étaient : 1) ciclosporine en solution et méthyprednisolone en crème dans le traitement de la pelade ; 2) émulsion constituée d'acides ascorbique, azélaïque et kojique pour traiter les taches pigmentées (mélasma et lentigo solaire). Des US de basse fréquence (25 kHz) étaient délivrés avant application des produits, pendant 10 minutes, avec une intensité variant entre 50 et 100 mW/cm$^2$, dans les deux essais.

Dans le premier essai, 30 patients atteints de pelade ont été inclus, et répartis en 2 groupes : US + méthylprednisolone (groupe (1)) et US + cyclosporine (groupe (2)). Ces traitements étaient appliqués 3 fois par semaine, pendant une durée de 3 mois. Les résultats ont montré 57% de repousse partielle et 29% de repousse totale dans le groupe (1), et 33% de repousse partielle et 34% de repousse totale dans le groupe (2). Les auteurs ont conclu à une efficacité de ces schémas thérapeutiques, bien que l'essai soit fortement biaisé par l'absence d'évaluation en aveugle et de groupes contrôles.

Dans le deuxième essai, 96 femmes ayant des taches pigmentées ont été incluses (48 avec mélasma et 48 avec lentigo solaire), et réparties en 3 sous-groupes. Les US associés à l'émulsion dépigmentante ont été appliqués 2 fois par semaine pendant 5 semaines dans un sous-groupe, les deux autres servant de contrôles (US et placebo pour l'un, émulsion dépigmentante sans US pour l'autre). Les résultats, estimés par le blanchiment mesuré par colorimétrie, ont montré une meilleure efficacité de l'émulsion+US que dans les groupes contrôles (43% de régression complète du lentigo *versus* 12%).

** Sonophorèse et anesthésie locale in vivo chez l'homme*

Trois essais ont été publiés sur l'efficacité plus rapide de produits anesthésiants locaux appliqués après sonophorèse.

Le premier est un essai randomisé en double aveugle, contrôlé, comparant l'efficacité de la crème anesthésiante EMLA® (lidocaïne et prilocaïne) appliquée après et sans US, chez 42 volontaires sains. Le critère de jugement était la diminution de sensation douloureuse provoquée par une piqûre, sur des zones de l'avant-bras ayant reçu l'un de ces 4 traitements : US (fréquence de 55 kHz, durée d'application de 10 secondes) et EMLA® 1g appliqué pendant 5 minutes ; US et EMLA® 1g appliqué pendant 10 minutes ; US et EMLA® 1g appliqué pendant 15 minutes ; EMLA® 1g sans US pendant 60 minutes. Les résultats ont montré une supériorité de l'EMLA® par rapport au placebo en tous temps, et une équivalence ou une supériorité de la combinaison US/EMLA® (5, 10 et 15 min) par rapport à l'EMLA® appliquée pendant 60 minutes. Les auteurs ont conclu que l'utilisation des US permet de raccourcir le temps de pose de la crème EMLA® [Katz et al, 2004].

Le deuxième essai, randomisé et contrôlé, a porté sur 87 patients hospitalisés. La douleur secondaire à la pose d'un cathéter veineux périphérique a été évaluée par le patient (échelle entre 0 et 10). Le patient était randomisé et recevait, après tirage au sort, la pose d'un cathéter veineux périphérique sans anesthésie locale (« standard care »), ou bien après application d'US (prototype SonoPrep®, fréquence de 53-56 kHz, $I \leq 15$ W/cm$^2$, durée 15 secondes, cycle de 100%), suivis de crème anesthésiante (lidocaïne liposomale 4%) pendant 5 minutes. Les résultats ont montré que les sujets traités par US et anesthésiant local avaient moins de douleur lors de la pose du cathéter que les témoins (80% ayant un score < 3/10 *versus* 37%, $p < 0,001$). Les auteurs ont conclu qu'une anesthésie transdermique brève est efficace après application des US [Becker et al., 2005].

Le troisième essai a décrit les mêmes interventions (US selon les mêmes modalités avec le même prototype, même crème anesthésiante, appliquée pendant 5 minutes), dans une population pédiatrique consultant aux urgences. Les enfants, âgés de 8 à 18 ans, recevaient, après randomisation, ou bien les US puis la crème anesthésiante ou bien les US puis une crème placebo. La douleur lors de la pose du cathéter veineux périphérique a été évaluée, par les enfants et par les parents. Les résultats ont montré une douleur significativement plus basse dans le groupe avec US/crème anesthésiante que dans le groupe US/placebo, évaluée et par les enfants (douleurs moyennes 2,29 vs 3,23 ; $p = 0,023$) et par les parents (douleurs moyennes 2,47 vs 30,39 ; $p = 0,038$) [Skarbek et al., 2006].

**Les données sur la tolérance de la peau exposée aux ultrasons**

Aucune étude spécifique de tolérance des US de basse fréquence, chez l'humain *in vivo*, n'avait été publiée jusqu'à la réalisation de notre essai.

Après application d'US de haute fréquence, des altérations cutanées ont été mises en évidence, en utilisant des intensités ultrasonores de 2 à 3 W/cm$^2$. Ces altérations sont dose-dépendantes, et sont vraisemblablement causées par l'effet thermique des US, et surtout par le phénomène de cavitation qu'ils induisent. Les US de basse fréquence sont plus toxiques, du fait qu'ils génèrent plus de cavitation. Des altérations cutanées ont été décrites à des intensités moindres (0,5 à 7 W/cm$^2$), *in vitro* et *in vivo* chez la souris glabre, et *in vivo* chez le chien. La tolérance était meilleure sur peau humaine *in vitro* que sur peau de souris, probablement du fait d'une couche cornée plus épaisse et d'une moindre pilosité. Histologiquement, les altérations cutanées correspondaient à des phénomènes de nécrose kératinocytaire, d'oedème et de détachement épidermique, de vasodilatation et de dégradation des fibres de collagène dans le derme superficiel, d'infiltrats inflammatoires superficiels et profonds associés à une nécrose pouvant aller jusqu'au muscle. En microscopie électronique ont aussi été visualisés des orifices à la surface cutanée. Il a été montré que la toxicité locale des US augmente avec l'augmentation des intensités ultrasonore, l'allongement du temps d'application des US et avec un mode délivrance continu plutôt que pulsé [Yamashita et al., 1997, Singer et al., 1998, Boucaud et al., 2001].

**Notre implication dans la sonophorèse**

Le service de Dermatologie du CHRU de Tours (Pr L. Vaillant, Pr L. Machet) a établi, à partir de 1990, une collaboration avec l'équipe du LUSSI (Laboratoire UltraSons Signaux, Instrumentation, CNRS FRE 2448, directeur Pr F. Patat), actuellement intégrée à l'équipe 5 (Pr F. Patat), UMR INSERM U930, CNRS ERL 3106 (Pr D. Guilloteau). De nombreux travaux ont été menés sur l'utilisation d'US de haute fréquence initialement, puis de basse fréquence, pour promouvoir l'absorption percutanée de molécules de haut poids moléculaire, notamment l'insuline [Boucaud et al., 2002]. Le passage transcutané par sonophorèse de plusieurs molécules, *in vitro* et *in vivo* chez l'animal, a été démontré. L'étape suivante devait être l'application de la sonophorèse à l'homme *in vivo*.

Mon implication dans la sonophorèse a débuté en 2006, lorsque j'ai effectué le Master 2 « Sciences de la Vie et de la Santé », option « Imagerie Médicale ». Mon stage s'est effectué au LUSSI, en partenariat avec Transderma Systems, France (Dr A. Boucaud), et en collaboration avec l'équipe du Laboratoire de Virologie du CHRU de Tours (Pr A. Goudeau). A la suite des

travaux de Tezel A, et al., en 2005, publiant la vaccination transcutanée, par sonophorèse, de souris par le vaccin anti-tétanique, nous avons mené des essais de vaccination contre l'hépatite B par sonophorèse chez le rat. L'intérêt de cette voie d'administration serait d'une part d'éviter l'effraction cutanée du vaccin injectable, d'autre part d'utiliser les US comme adjuvant, évitant ainsi les effets secondaires des adjuvants classiques.

**Résumé du travail de Master 2 : essai de vaccination contre l'hépatite B par sonophorèse chez le rat**

Cette étude de faisabilité chez le rat Sprague Dawley a eu pour but de déterminer si une immunisation contre l'hépatite B pouvait être obtenue en appliquant sur la peau l'antigène (ag) HBs après sonophorèse basse fréquence (sonde de 30 kHz). Le critère de jugement a été la détection d'anticorps sériques anti-HBs, 3 semaines après la vaccination, puis 2 semaines après le rappel vaccinal (dosage au Laboratoire de Virologie du CHRU de Tours, Pr A. Goudeau). Les vaccins testés étaient l'ag HBs pur, sans adjuvant, non commercialisé, provenant du laboratoire pharmaceutique Interchim (France), et le vaccin Engérix B®, constitué d'ag HBs adjuvé, absorbé sur l'hydroxyde d'alumine (laboratoire Glaxo Smith Kline) : 20 µg d'ag HBs/millilitre de produit et 0,5 mg d'hydroxyde d'alumine/20 µg d'ag HBs.

Douze rats ont servis de témoins positifs (fabrication d'anticorps après injection sous-cutanée d'ag HBs).

Plusieurs protocoles ultrasonores ont été testés :

- cohorte n°1 : 4 rats recevant l'ag HBs pur à la concentration de 20 µg/ml, appliqué pendant 2 heures, sur peau préalablement traitée par US (intensité 2,65 W/cm$^2$, durant 2 minutes) ;

- cohorte n°2 : 4 rats recevant le vaccin Engerix B® à la concentration de 20 µg/ml, appliqué pendant 2 heures, sur peau traitée par US (intensité 2,65 W/cm$^2$, durant 2 minutes) ;

- cohorte n°3 : 4 rats recevant l'ag HBs pur à la concentration de 100 µg/ml, appliqué pendant 2 heures, sur peau traitée par US (intensité moyenne de 1,6 W/cm$^2$, avec un cycle de 40% d'activité (2 sec on/5 sec off), pendant 5 minutes) ;

- cohorte n°4 : 4 rats recevant le vaccin Engerix B® à la concentration de 20 µg/ml, appliqué pendant 2 heures, sur peau traitée par US (intensité moyenne de 1,6 W/cm$^2$, avec un cycle de 40% d'activité (2 sec on/5 sec off), pendant 5 minutes).

Un rappel selon les mêmes modalités a été fait 3 semaines plus tard, en même temps que le premier prélèvement sanguin pour dosage d'anticorps.

Aucune réponse immunitaire contre l'hépatite B n'a été observée chez les rats, ni à 3 semaines, ni à 5 semaines de la vaccination (taux d'anticorps anti-HBs < 5mUI/ml).

Concernant la tolérance, un érythème était constant sur la peau ayant reçu les US, avec souvent des papules purpuriques péri-folliculaires. L'examen histopathologique a trouvé des altérations épidermiques, dermiques et hypodermiques, de types cicatriciel et inflammatoire, avec en particulier des modifications des annexes (hypotrophie des tiges pilaires, fibrose péri-pilaire et inflammation péri-folliculaire).

Deux hypothèses permettent d'expliquer ces résultats négatifs. La première est le fait que l'ag HBs est une protéine faiblement immunogène, suscitant peu d'activation des cellules immunitaires de Langerhans et de production de cytokines par les kératinocytes. De ce fait, on peut imaginer qu'il eût fallu un apport massif d'ag HBs ou l'utilisation d'un adjuvant puissant pour générer une immunisation. La deuxième hypothèse repose sur la taille de l'ag HBs, qui est une macromolécule d'au moins 25 kDA, s'agrégeant [Milich et Leroux-Roels, 2003]. Pour faire pénétrer à travers la couche cornée un agrégat si volumineux, il aurait probablement été nécessaire d'utiliser des énergies ultrasonores plus importantes, conduisant à une toxicité locale nettement accrue.

# Objectifs du travail de thèse

Après les travaux de l'équipe du LUSSI puis UMR INSERM U930, CNRS ERL 3106, équipe 5, *in vitro* sur peaux humaines et *in vivo* chez l'animal, l'objectif de ce travail de thèse a été d'amorcer l'application de la sonophorèse basse fréquence à l'humain *in vivo*.

Trois essais ont été regroupés pour cette thèse :

1. un essai randomisé, contrôlé, en double aveugle, évaluant la tolérance de la sonophorèse chez le volontaire sain, en 2 localisations différentes (avant-bras et genou), selon 3 protocoles d'intensités ultrasonores croissantes. Un essai de tolérance nous a paru un pré-requis indispensable à la réalisation d'études thérapeutiques ultérieures. Il a pu être réalisé grâce à un appel d'offre PHRC régional.

2. un essai randomisé comparant, chez le volontaire sain, l'absorption percutanée d'histamine appliquée après sonophorèse et sans sonophorèse. L'étude a été financée par un plan « Hôpital Promoteur ».

3. un essai randomisé comparant l'absorption de dermocorticoïdes (betaméthasone 17-valérate) chez le volontaire sain, après et sans sonophorèse. L'étude a été financée par un plan « Hôpital Promoteur ».

Ces 3 études ont reçu l'accord du Comité de Protection des Personnes de Tours, et se sont déroulées au Centre d'Investigation Clinique du CHRU de Tours (INSERM CIC 202).

# Première partie

## Tolérance de la sonophorèse basse fréquence chez l'humain *in vivo* : essai randomisé contrôlé en double aveugle

**Étude financée par un appel d'offre PHRC regional.**

**Article Accepté dans Skin Research and Technology (IF=1,3).**

***Maruani A, Vierron E, Machet L, Giraudeau B, Halimi JM, Boucaud A. Tolerance of low-frequency ultrasound sonophoresis: a double-blind randomised study on humans. Skin Res Technol 2010.***

## Résumé

**Introduction**
La sonophorèse de basse fréquence a été utilisée *in vitro* et *in vivo* chez l'animal, plus rarement chez l'homme, pour augmenter l'absorption percutanée de molécules. Aucun essai axé sur sa tolérance clinique chez l'homme n'a été publiée.

**Objectifs**
Étudier les effets cutanés et généraux des ultrasons (US) basse fréquence chez l'humain, *in vivo*, dans un essai randomisé contrôlé en double aveugle (sonophorèse *versus* placebo).

**Méthodes**
Les US ont été délivrés en mode pulsé, avec une sonde de 36 kHz, durant 5 minutes, selon un protocole d'augmentation croissante des intensités ultrasonores (de 1,57 à 3,50 W/cm$^2$). Un membre (avant-bras ou genou) recevait les US, l'autre le placebo, selon la randomisation. Le sujet volontaire et le dermatologue étaient en aveugle. Le critère de jugement primaire était la toxicité (douleur > 40 sur une échelle visuelle analogique de 0- à 100-mm, ou nécrose). Les critères secondaires étaient l'apparition d'un érythème (score de sévérité allant de 0 à 3), l'épaisseur cutanée (traduisant l'œdème) mesurée par échographie haute résolution, la capacitance (mesurée par cornéométrie, qui permet d'évaluer l'état de perméabilité de la peau) et la température cutanée. Les effets indésirables étaient recensés.

**Résultats**
Trente-quatre volontaires sains ont été inclus. Il n'y a pas eu de toxicité : aucune douleur > 40 (38 a été la maximale), et aucune nécrose, ni avec la sonophorèse ni avec le placebo. Un érythème a été observé systématiquement après l'application des US, mais après 24 heures, il persistait dans 3 cas (groupe "genou"). Il n'y avait pas d'augmentation notable de l'épaisseur cutanée ni de la température cutanée dans les groupes US et placebo. La capacitance augmentait après l'application des US et du placebo, sans différence significative. L'effet indésirable le plus fréquent était la survenue d'acouphènes durant l'application des US (23,5%), plus fréquents dans le groupe "avant-bras", sans hypoacousie associée. Ils étaient modérés et toujours régressifs dès l'arrêt des US.

**Conclusion**
Cette étude montre qu'aux intensités ultrasonores généralement utilisées pour augmenter l'absorption percutanée de molécules, il n'y a pas d'effets toxiques chez l'homme. Ceci est un pré-requis nécessaire avant d'entamer des études cliniques thérapeutiques.

# **Title:** Tolerance of low-frequency ultrasound sonophoresis: a double-blind randomised study on humans

Authors

Annabel Maruani[1], Emilie Vierron[2], Laurent Machet[1], Bruno Giraudeau[2], Jean-Michel Halimi[2], Alain Boucaud[3]

[1]Université François Rabelais Tours; INSERM, U930 Tours; CHRU de Tours, Service de Dermatologie, France

[2]Université François Rabelais de Tours; INSERM CIC 202; CHRU de Tours, France

[3]Transderma Systems, Tours, France

Corresponding author

Dr Annabel Maruani

Department of Dermatology

Trousseau Hospital, CHRU Tours

Avenue de la République, 37044 Tours Cedex 9

Tel: 00/33 2 47 47 46 25

Fax: 00/33 2 47 47 82 47

E-mail : annabel-maruani@wanadoo.fr

Conflict of interest: Dr Alain Boucaud is a member of Transderma Systems, which supplied the ultrasound device.

Running title: skin tolerance of sonophoresis

Words: 1998; 3 tables; 4 figures; 20 references.

**Abstract**

**Background**

Sonophoresis (low-frequency ultrasound (US)) has been used in animals and in vitro to investigate enhanced percutaneous absorption of drugs. No study focused on its clinical human tolerance has yet been published.

**Methods**

We aimed to assess the bioeffects of low-frequency US in vivo on human skin in a double-blind randomized controlled study. We applied pulse-mode US at 36 kHz for 5 min in a step procedure of increasing dosage, from 1.57 to 3.50 W/cm2, and placebo. The primary outcome was toxic effects of the procedure, defined as a pain score > 40 on a 0- to 100-mm visual analogue scale or necrosis. Erythema (scored from 0 to 3 in severity) was also evaluated. Secondary outcomes were: measurements of skin thickness by high-resolution skin imaging, of skin capacitance and temperature.

**Results**

We included 34 healthy volunteers. We found no pain score higher than 38 and no skin necrosis with either US or placebo. Erythema was systematically observed immediately after US application, but after 1 day, we observed 3 cases in the knee group. The most frequentadverse effect was tinnitus. We observed no marked increase in temperature or cutaneous thickness after US or placebo. Cutaneous capacitance increased immediately after both applications.

**Conclusion**

Such data demonstrating good tolerance of sonophoresis can be useful before the initiation of a clinical trial of therapeutic use of low-frequency sonophoresis in humans.

**Key words:** low frequency ultrasound, sonophoresis, skin tolerance, bioeffects, clinical study.

**Abbreviations:** US: ultrasound; CI: confidence interval; SD: standard deviation

## Introduction

Low-frequency sonophoresis has been investigated to enhance the transdermal transport of various drugs, *in vitro* (1,2) and *in vivo* (3-5). As compared with traditional injection methods, it is non-invasive and may allow transdermal penetration of macromolecules at therapeutic levels (6-11). Increased transdermal permeability subsequent to ultrasound (US) application is mainly attributed to cavitation (12-14). Cavitation consists of the generation of gas bubbles, which oscillate and may implode at the skin surface, provoking disorganization and/or the creation of an aqueous pathway through the stratum corneum. Cavitation is a highly energetic phenomenon that was shown to damage exposed skin and the underlying structures in a study involving a 20-kHz probe, in pulsed and continuous mode, with mean intensities ranging from 0.25 to 7 $W/cm^2$ (15). Human skin samples exposed *ex vivo* to intensities lower than 2.5 $W/cm^2$ showed no changes, whereas erythema and histologically determined deep lesions (dermal and muscle necrosis) were observed *in vivo* in hairless rats at higher intensities. Although a few studies of drugs absorption have been reported *in vivo* in humans, none has focused on clinical tolerance of low-frequency US.

We aimed to investigate, in a double-blind randomized controlled study, the *in vivo* human skin tolerance of low-frequency US at different intensities (primary outcome), and their physical effects on skin (secondary outcomes), including capacitance, temperature, and thickness.

## Materials and Methods

### *Subjects and Setting*

The study was carried out from June 2005 to February 2006, in the Clinical Investigation Center of the University Hospital of Tours, France. Subjects were included if they were 18 years or older, were not pregnant or breastfeeding, did not use topical therapy, and had no dermatological or neurological disease. Each volunteer signed an informed consent form.

The protocol was approved by the ethics committee of University Hospital of Tours, France (registration no. 2005-05), February 22, 2005.

Randomization of application of US and placebo

For each subject, the member, right or left, was randomized to undergo US or placebo. The right member was always the first investigated whatever the treatment. The placebo consisted of applying a transducer composed of an electrical resistance and reproduced the increase in temperature obtained with US. The subject sat on a medical chair. A flanged chamber was placed on the forearm (or knee). The chamber was filled with 10 ml of saline ([NaCl] = 0.9 %), which was used as a coupling device. The transducer (US or placebo) was placed in the chamber 11 mm away from the skin.

Ultrasound device and application

The US equipment (Fig. 1) was developed by Transderma Systems (Tours, France). The working frequency of the device was 36 kHz. The tip of the device included a cylindrical ultrasonic horn (titanium) 1.5 cm in diameter housed in a tube made of Delrin. The device also included a "cavitation chamber," consisting of an O-ring with a 7-$cm^2$ inner surface placed between the skin surface and the ultrasonic horn. It contained 10 ml of saline used as coupling medium. The power unit allowed for choosing various parameters, including intensity, continuous or pulsed mode, and application time. Before each application, the equipment was tuned to ensure that the electrical signal matched the resonance frequency of the US probe.

Low frequency US was applied in pulsed mode, to minimize thermal effects, for 5 min. A commonly used calorimetric method was employed to calculate the power delivered by the sonicator based on the change of temperature in water produced by the acoustic device.

We first performed the US on the anterior side of the forearm and then knees. We increased the US dosage with the following steps, including the forearms of the first 3 patients at step 1,

the forearms of the next 3 subjects at step 2, then forearms of 14 subjects and knees of 14 subjects thereafter, at step 3.

- Step 1: 1 s on/5 s off; $I_1$ = 1.57 W/cm$^2$. If toxic effects occurred, the protocol was to stop the trial; otherwise, the trial continued with step 2.
- Step 2: 2 s on/5 s off; $I_2$ = 2.72 W/cm$^2$. If toxic effects occurred, the protocol was to continue the trial with step 4 and the dosage of step 1; otherwise, the trial would continue with step 3.
- Step 3: 3 s on/5 s off; $I_3$ = 3.50 W/cm$^2$. If toxic effects occurred, the trial would continue with step 4 and the dosage of step 2; otherwise, the trial would continue with step 4 and the dosage of step 3.
- Step 4: The study continued with the maximal tolerated dose; 14 subjects were tested for forearms and 14 for knees or the onset of toxic effects.

Outcome measurement

The primary outcome was toxic effects of US or placebo to the skin, defined as pain ≥ 40 on a 100-mm visual analogue scale (VAS), or the appearance of skin necrosis, which led to discontinuing the study. Skin tolerance was evaluated by presence of erythema at time of the procedure (T0), immediately after (T1), 2 hours after (T2) and 24-hours after application (T3). Secondary outcomes were measured in the same time. They consisted in changes in skin temperature, in cutaneous capacitance, which reflects skin hydration, and in skin thickness (marker of edema) measured by high resolution imaging.

A dermatologist (A.M. or L.M.) scored erythema visually on a scale of 0 to 3 (0, no erythema; 1, almost imperceptible erythema; 2, slight erythema; 3, evident erythema) and measured skin thickness by use of high-resolution, B-mode, real-time ultrasonography (DermCup 2020®, GIP Ultrasons, Tours, France) with a 20-MHz center-frequency transducer (16).

The research engineer (A.B.) performed the randomisation, applied both US and placebo, and asked subjects about pain, self-reported on a visual analogue scale ranging from 0 (no pain) to 100 (maximal pain). Temperature at the skin surface was measured with use of a thermocouple (K-Thermocouple, HANNA Instruments, USA). Cutaneous capacitance was recorded by use of a corneometer (CM. 825, Courage & Khazaka**).**

All measurements were taken at T0, T1, T2, and T3 for US or placebo. All experiments and measurements were carried out at room temperature. Both the dermatologist and research engineer recorded adverse events. The dermatologist and subjects were blinded to the application of US or placebo.

*Statistical methods*

We planned for a maximum sample size of 14 subjects each for the forearm and knee phases of the trial to allow for assessing an upper 95% confidence interval (CI) of 20%, under the hypothesis that no toxic effects occurred. Demographic data and pain and erythema scores are presented as means ± standard deviation (SD) or frequencies. Datafor secondary outcomes are presented as means ± SD for baseline data and mean variation from baseline for further measures. Statistical analyses involved use of SAS (SAS Institute, Cary, NC).

**Results**

A total of 34 healthy volunteers were recruited, 20 for the forearm phase and 14 for the knee phase. Twenty-two women (65%) were included and the mean age was 31 ± 10 years.

*Primary outcome*

No toxic effects of treatment, US or placebo, as measured by pain $\geq$ 40 on a 0- to 100-mm VAS or necrosis, were observed during the study, for neither the forearm nor knee phase; no patient scored higher than 38 on the VAS at any measurement time (Table I). In accordance with the protocol, the first 3 subjects of the forearm group received the lower-intensity

treatment (step 1), the next 3 subjects of the forearm group, the middle-intensity (step 2) and the last 14 of the forearm and knee groups, the higher-intensity treatment (step 3).

At step 1, after US application, 2 of the 3 forearm subjects had an erythema score of 1 (Fig. 2), the third having no erythema. At step 2, 2 of the 3 forearm subjects had an erythema score of 1 and 1 had a score of 2. The erythema disappeared 2 hours after the procedure, except for one subject, with a score of 1. The 6 forearm subjects showed no erythema at 24 hours. Placebo application produced no erythema whatever the step or time (data not shown). At step 3, the forearm group showed no slight (score of 2) nor evident (score of 3) erythema at 24 hours and the knee group only 3 cases (2 with a score of 2 and 1 with a score of 3 (Fig. 3)) (Table II). Erythema after US application was frequently accentuated around hair follicles.

*Adverse events*

At step 1 of US application, no adverse events were observed. At step 2, 1 patient in 3 reported moderate-intensity tinnitus, which disappeared on discontinuation of US. At step 3, 7 of the 28 subjects reported tinnitus – 5 in the forearm group and 2 in the knee group – of slight intensity in 4 cases and moderate intensity in 3. Tinnitus stopped on discontinuation of US. No acoustic alteration, neither during tinnitus nor after the stopping of tinnitus was reported by the patients. Tinnitus was moderate, and no subject asked for stopping US because of it.

At step 1, dermatological events included one case of minor purpura, which disappeared after 2 hours; at step 2, one case of papule, which disappeared after 2 hours; and at step 3, papules in 7 subjects (3 in the forearm group and 4 in the knee group) immediately after US exposure. All papules had disappeared at 24 hours. Most of the papules were centered on hair follicles. None of the skin effects were considered of high intensity, and all disappeared without any medical treatment.

*Secondary outcomes*

We observed no variation in skin thickness among subjects but, rather, a slight increase in skin temperature immediately after US and placebo applications (Fig. 4, Table III). We observed a large increase in cutaneous capacitance in both forearm and knee groups immediately after both procedures but not later.

**Discussion**

We found no significant toxic effects of 5-min application of pulsed US at low frequency (up to 3.50 W/cm$^2$) in forearms and knees of healthy human subjects. Pain during application was moderate and disappeared on discontinuation of US. At the highest frequency of application, 7 of the 14 knee subjects reported pain as compared with 4 of the 14 forearm subjects**.** We observed no instances of skin lesions such as necrosis. Instances of erythema were more common and lasted longer in the knee than forearm group. Erythema is induced by two phenomena: thermal and mechanical effects (especially cavitation). Because the increase in temperature was slight in our study, the mechanical effects were probably responsible for the occurrence and persistence of erythema. The accentuation of erythema around hair follicles emphasizes this phenomenon: gaseous microbubbles entrapped at the root of hair follicles may have induced cavitation (17). Hair follicles are more numerous and more developed on knees than on forearms; cavitation induced by US was thus higher on knees, and generated more erythema and pain.

We observed only a few adverse events, consisting mainly of tinnitus (23.5 % of cases) without acoustic alters, and, rarely, transient papules. Tinnitus ceased on discontinuation of US and its intensity was always slight or moderate. This is the first time that such events have been reported in a study of low-frequency sonophoresis. Tinnitus has been described with high-frequency US, and occurs with bone conduction of US waves in the ear, without associated acoustic alters (18). The proximity of the forearm to the ear may explain our observation of tinnitus with forearm US (19).

We showed no increase in skin thickness, quantifying dermal edema, in our echographic imaging with US or placebo. However, immediately after US application, we found an increase in skin capacitance, linked to water content within the stratum corneum and hence cutaneous permeability (20), which returned to baseline 2 hours later. This observation suggests that topical treatment with US must be applied immediately after US to be optimally absorbed.

In conclusion, our study provides favourable exploratory results regarding tolerance of low-frequency sonophoresis on human skin *in vivo*. Such data can be useful before the initiation of a clinical trial of therapeutic use of low-frequency sonophoresis in humans.

**Acknowledgements**

The authors thank Jean-Marc Grégoire (CIT) for technical assistance and Aurélie Avarguès, Catherine Roussel and Yamina Laine for their support. The study was funded by a “Projet Hospitalier de Recherche Clinique” (PHRC) regional financing.

**References**

1. Machet L, Boucaud A. Phonophoresis: efficiency, mechanisms and skin tolerance. Int J Pharm 2002;243:1-15.
2. Mitragotri S, Blankschtein D, Langer R. Ultrasound-mediated transdermal protein delivery. Science 1995;269:850-3.
3. Becker BM, Helfrich S, Baker E, Lovgren K, Minugh A, Machan JT. Ultrasound with topical anesthetic rapidly decreases pain of intravenous cannulation. Acad Emerg Med 2005;12:289-95.
4. Katz NP, Shapiro DE, Herrmann TE, Kost J, Custer LM. Rapid onset of cutaneous anesthesia with EMLA cream after pretreatment with a new ultrasound-emitting device. Anesth Analg 2004;98:371-6.

5. SantoianniP, Nino M, Calabro G. Intradermal drug delivery by low frequency sonophoresis (25 KHz). Dermatol Online J 2004;10:24.

6. Boucaud A, Garrigue MA, Machet L, Vaillant L, Patat F. Effect of sonication parameters on transdermal delivery of insulin to hairless rats. J Control Release 2002;81:113-9.

7. Byl NN. The use of ultrasound as an enhancer for transcutaneous drug delivery: phonophoresis. Phys Ther 1995;75:539-53.

8. Liu H, Li S, Pan W, Wang Y, Han F, Yao H. Investigation into the potential of low-frequency ultrasound facilitated topical delivery of Cyclosporin A. Int J Pharm 2006;326:32-8.

9. Mitragotri S, Blankschtein D, Langer R. Transdermal drug delivery using low-frequency sonophoresis. Pharm Res. 1996;13:411-20.

10. Mitragotri S, Kost J. Transdermal delivery of heparin and low-molecular weight heparin using low-frequency ultrasound. Pharm Res. 2001;18:1151-6.

11. Smith NB, Lee S, Shung KK. Ultrasound-mediated transdermal in vivo transport of insulin with low-profile cymbal arrays. Ultrasound Med Biol 2003;29:1205-10.

12. Simonin JP. On the mechanisms of in vitro and in vivo phonophoresis. J Control Release 1995;33:125-41.

13. Tang H, Wang CC, Blankschtein D, Langer R. An investigation of the role of cavitation in low-frequency ultrasound-mediated transdermal drug transport. Pharm Res 2002;19:1160-9.

14. Tezel A, Sens A, Mitragotri S. Investigations of the role of cavitation in low-frequency sonophoresis using acoustic spectroscopy. J Pharm Sci. 2002;91:444-53.

15. Boucaud A, Montharu J, Machet L, Arbeille B, Machet MC, Patat F, Vaillant L. Clinical, histologic, and electron microscopy study of skin exposed to low-frequency ultrasound. Anat Rec 2001;264:114-9.

16. Machet L, Ossant F, Bleuzen A, Grégoire JM, Machet MC, Vaillant L. High-resolution ultrasonography: utility in diagnosis, treatment, and monitoring dermatologic diseases. J Radiol 2006;87:1946-61.

17. Machet L, Boucaud A. Transdermal transport by phonophoresis. In: Bronaugh RL, Maibach HI eds.Percutaneous Absorption: Drug, Cosmetics, Mechanisms, Methology Boca Raton: Taylor and Francis Group, 2005:739-58.

18. Lenhardt ML, Richards DG, Madsen AG, Goldstein BA, Shulman A, Guinta R. Measurement of bone conduction levels for high frequencies. Int Tinnitus J 2002;8:9-12.

19. Cai Z, Richards DG, Lenhardt ML, Madsen AG. Response of human skull to bone-conducted sound in the audiometric-ultrasonic range. Int Tinnitus J 2002;8:3-8.

20. Blichmann CW, Serup J. Assessment of skin moisture. Measurement of electrical conductance, capacitance and transepidermal water loss. Acta Derm Venereol 1988;68:284-90.

**Tables**

**Table 1.** Frequency of pain (measured on a 0- to 100-mm visual analogue scale) immediately after (T1), 2 hours after (T2) and 24 hours after (T3) ultrasound (US) and placebo applications for the three treatment dosages and forearm and knee groups separately

1a. Forearm procedure

| **Pain** (mm) | | T1 | | T2 | | T3 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| N (%) | | US | Placebo | US | Placebo | US | Placebo |
| 1.57 W/cm$^2$ | (n = 3) | | | | | | |
| | 0 | 1 (33) | 2 (67) | 3 (100) | 3 (100) | 3 (100) | 3 (100) |
| | ]0 ; 40[ | 2 (67) | 1 (33) | - | - | - | - |
| | ≥ 40 | - | - | - | - | - | - |
| 2.72 W/cm$^2$ | (n = 3) | | | | | | |
| | 0 | - | 3 (100) | 3 (100) | 3 (100) | 3 (100) | 3 (100) |
| | ]0 ; 40[ | 3 (100) | - | - | - | - | - |
| | ≥ 40 | - | - | - | - | - | - |
| 3.50 W/cm$^2$ | (n = 14) | | | | | | |
| | 0 | 10 (71) | 14 (100) | 14 (100) | 14 (100) | 14 (100) | 14 (100) |
| | ]0 ; 40[ | 4 (29) | - | - | - | - | - |
| | ≥ 40 | - | - | - | - | - | - |

1b. Knee procedure

| **Pain** (mm) | | T1 | | T2 | | T3 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| N (%) | | US | Placebo | US | Placebo | US | Placebo |
| 3.50 W/cm$^2$ | (n = 14) | | | | | | |
| | 0 | 7 (50) | 14 (100) | 14 (100) | 14 (100) | 14 (100) | 14 (100) |
| | ]0 ; 40[ | 7 (50) | - | - | - | - | - |
| | ≥ 40 | - | - | - | - | - | - |

**Table 2.** Frequency of erythema scores* in forearms and knees immediately after (T1), 2 hours after (T2) and 24 hours (T3) after 3.50 W/cm$^2$ of ultrasound (US) and placebo applications

2a. Forearm procedure (n = 14)

| **Erythema score*** | T1 | | T2 | | T3 | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| N (%) | US | Placebo | US | Placebo | US | Placebo |
| 0 | 1 (7) | 12 (86) | 5 (36) | 14 (100) | 12 (86) | 14 (100) |
| 1 | 5 (36) | 2 (14) | 7 (50) | - | 2 (14) | - |
| 2 | 5 (36) | - | 2 (14) | - | - | - |
| 3 | 3 (21) | - | - | - | - | - |

*0: no erythema; 1: almost imperceptible erythema; 2: slight erythema; 3: evident erythema

2b. Knee procedure (n = 14)

| **Erythema score*** | T1 | | T2 | | T3 | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| N (%) | US | Placebo | US | Placebo | US | Placebo |
| 0 | - | 6 (43) | - | 14 (100) | 4 (29) | 13 (93) |
| 1 | 3 (21) | 6 (43) | 7 (50) | - | 7 (50) | 1 (7) |
| 2 | 5 (36) | 2 (14) | 4 (29) | - | 2 (14) | - |
| 3 | 6 (43) | - | 3 (21) | - | 1 (7) | - |

*0: no erythema; 1: almost imperceptible erythema; 2: slight erythema; 3: evident erythema

**Table 3.** Skin temperature, capacitance and thickness after application of 3.50 W/cm$^2$ of ultrasound (US) or placebo to forearms and knees. Data are means ± SD* at baseline (T0) and means variation ± SD* between T0 and T1 (immediately after), T2 (2 hours after) or T3 (24 hours after the application)

Forearm procedure

| N = 14 | T0 | | $\Delta_{T1-T0}$ | | $\Delta_{T2-T0}$ | | $\Delta_{T3-T0}$ | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | US† | Placebo | US† | Placebo | US† | Placebo | US† | Placebo |
| Temperature (°C) | 32.1±1.2 | 32.3±1.1 | 0.1±1.5 | 1.1±1.5 | 0.8±1.1 | 0.2±1.2 | 0.4±1.5 | 0.1±1.3 |
| Capacitance (UA) | 58.4±10.2 | 57.6±11.0 | 42.4±11.9 | 35.1±7.6 | -1.8±6.6 | -2.8±6.7 | 0.3±6.3 | 0.1±5.3 |
| Thickness (mm) | 1.2±0.2 | 1.1±0.2 | 0.0±0.1 | 0.0±0.1 | 0.0±0.1 | 0.0±0.1 | 0.0±0.1 | 0.0±0.1 |

*SD: standard deviation. †US: ultrasound

Knee procedure

| | T0 | | $\Delta_{T1-T0}$ | | $\Delta_{T2-T0}$ | | $\Delta_{T3-T0}$ | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | US† | Placebo | US† | Placebo | US† | Placebo | US† | Placebo |
| Temperature (°C) | 29.6±1.6 | 29.7±1.8 | 1.9±1.9 | 2.7±2.6 | -0.3±2.5 | -0.3±2.3 | -1.2±1.9 | -1.1±2.0 |
| Capacitance (UA) | 54.9±14.9 | 55.3±15.0 | 32.0±10.7 | 37.5±17.1 | -0.9±6.5 | -0.6±6.4 | -1.9±9.1 | 0.2±7.6 |
| Thickness (mm) | 1.5±0.2 | 1.5±0.2 | 0.0±0.1 | -0.1±0.1 | 0.0±0.2 | 0.0±0.1 | 0.0±0.2 | -0.1±0.1 |

*SD: standard deviation. †US: ultrasound

**Figure legends**

**Fig. 1**. Figure of low-frequency ultrasound device

**Fig. 2**. Erythema with a score of 1 (almost imperceptible) induced by low-frequency ultrasound

**Fig. 3**. Erythema with a score of 3 (evident) induced by low-frequency ultrasound

**Fig. 4**. High-resolution ultrasound skin imaging of skin thickness (papule)

**Figure 1**

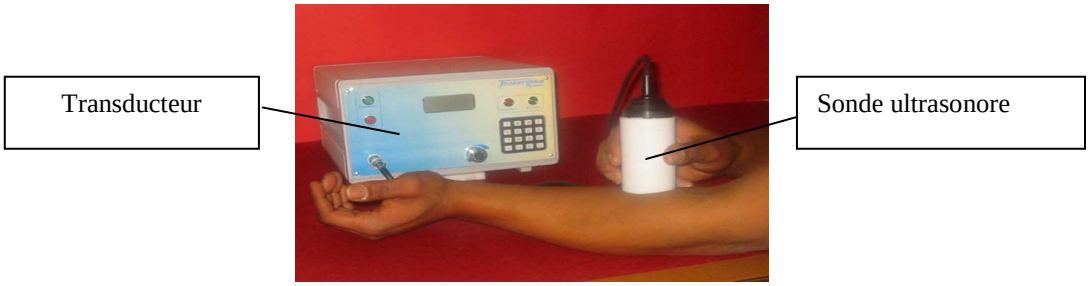


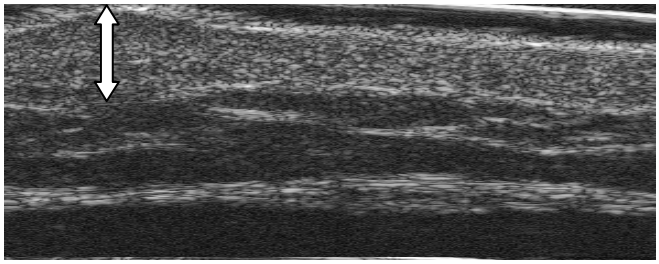

**Figure 2**



**Figure 3**



**Figure 4**



# Deuxième partie

## Efficacité de la sonophorèse basse fréquence pour le passage transdermique d’histamine : essai randomisé chez l’humain

**Étude financée par un appel d'offre Hôpital Promoteur.**

**Article paru dans International Journal of Pharmaceutics (IF=3).**

***Maruani A, Vierron E, Machet L, Giraudeau B, Boucaud A. Efficiency of low-frequency ultrasound sonophoresis in skin penetration of histamine: A randomized study in humans. Int J Pharm 2010;385:37-41.***

## Résumé


**Introduction**
L'histamine, appliquée sur la peau après effraction cutanée par prick test, génère une papule urticarienne, alors qu'elle ne produit aucune réaction sans effraction. Elle est utilisée pour cet effet comme témoin positif pour les tests allergologiques.

**Objectifs**
Évaluer si l'application d'histamine sur une peau traitée par sonophorèse basse fréquence (chez des sujets sains) pouvait produire une papule urticarienne, témoignant de façon non invasive *in vivo* de la réduction de la fonction barrière de la peau, induite par les ultrasons (US).

**Méthodes**
Étude contrôlée randomisée en double aveugle. Un nombre de 10 sujets sains était prévu. Ils ont reçu sur leur avant-bras droit, où 3 zones ont été dessinées : une dose $US_1$ (2 s on/5 s off, $I_1$ = 2,72 W/cm$^2$), une dose $US_2$ (3 s on/5 s off, $I_2$ = 3,50 W/cm$^2$) ou pas d'US, selon la zone. Le traitement de chaque zone était randomisé. Les US étaient appliqués sur un mode pulsé à 36 kHz, pendant 5 minutes, par l'ingénieur de recherche. Après application des US, une goutte d'histamine était déposée sur chaque zone. Le dermatologue mesurait, en aveugle par rapport au traitement US, la papule, qui était le marqueur de l'absorption percutanée de l'histamine. Les effets indésirables étaient relevés.

**Résultats**
Une papule est apparue après application d'histamine chez 9/10 patients, avec $US_1$ et $US_2$. Les mesures médianes (en mm²) étaient : 39,3 [12,6-121,0] pour $US_1$, 62,8 [16,5-141,4] pour $US_2$. Aucune papule n'est apparue quand l'histamine était appliquée sans US. Les papules étaient en moyenne plus grandes avec les intensités élevées d'US, mais cette différence n'était pas significative (p = 0,527). Aucune toxicité n'a été observée.

**Conclusion.** Cette étude contrôlée randomisée démontre l'efficacité de la sonophorèse dans l'augmentation de l'absorption percutanée de l'histamine, chez l'homme. Il s'agit d'un modèle pharmacodynamique non invasif, démontrant la réduction de la fonction barrière de la peau induite par les US de basse fréquence. Ces résultats suggèrent que la sonophorèse pourrait être utilisée comme alternative au prick test.

International Journal of Pharmaceutics 385 (2010) 37–41

Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Pharmaceutics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijpharm

# Efficiency of low-frequency ultrasound sonophoresis in skin penetration of histamine: A randomized study in humans

Annabel Maruani[a,b,c,*], Emilie Vierron[a,d,e], Laurent Machet[a,b,c], Bruno Giraudeau[a,d,e], Alain Boucaud[f]

[a] Université François Rabelais Tours, France
[b] INSERM, U930 Tours, France
[c] CHRU de Tours, Service de Dermatologie, France
[d] INSERM, CIC 202, France
[e] CHRU de Tours, France
[f] Transderma Systems, Tours, France

ARTICLE INFO

*Article history:*
Received 24 May 2009
Received in revised form 6 October 2009
Accepted 8 October 2009
Available online 27 October 2009

*Keywords:*
Low-frequency ultrasound
Sonophoresis
Clinical study
Histamine
Allergy

ABSTRACT

Low-frequency ultrasound (US) applied to skin (sonophoresis) has been investigated to enhance the transdermal transport of various drugs. Histamine is usually used in allergy investigations. We aimed to investigate, in a randomized study, the transdermal penetration of histamine with sonophoresis. Ten subjects were included. Their right forearm was divided into three zones, which were randomly assigned a treatment: no US, $US_1$ ($I_1 = 2.72\ W/cm^2$), $US_2$ ($I_2 = 3.50\ W/cm^2$). The primary outcome was area of induced papule, which revealed histamine penetration. Secondary outcomes were echographic measurement of papule (skin thickness) and pruritus. Measurements were taken immediately after US application and after 30 min, 2 h and 24 h. Arm zones without US application showed no papules induced by histamine; 9/10 subjects receiving US showed papules. Their mean size increased with increased intensity of US but not significantly. The skin thickness increased with US. Pruritus occurred in 7/10 cases after US and histamine. The adverse events were skin erythema, pain and tinnitus. Though this study included a few number of patients, it confirms that sonophoresis enhances skin penetration of histamine. This technology could be used at therapeutic levels: histamine could be used with sonophoresis as a positive control in allergy testing instead of prick tests, which involve skin disruption with a lancet.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Histamine is a low-molecular-weight molecule (almost 110 Da) largely synthesized by basophile granulocytes and involved in several immune/inflammatory functions in addition to its dominant role in type I hypersensitivity reactions (Akdis et al., 2008). Its chemical structure is $C_5H_9N_3$ (2-(4-imidazolyl)ethylamine). It is synthesized by histidine decarboxylase, starting from the amino acid histidine. In medical practice, histamine is used in allergy testing to investigate drug hypersensitivity: histamine prick tests are used as positive controls (Liccardi et al., 2008; Malling, 1984). Prick tests involve skin disruption with a lancet before deposition of the drug. Test results are considered positive if an itchy papule appears a few minutes after the deposition of the molecule.

Low-frequency sonophoresis has been investigated to enhance the transdermal transport of various drugs of low and even high molecular weight (such as insulin, 6 kDa) (Boucaud et al., 2002; Smith et al., 2003). Most investigations have been performed *in vitro* in excised skin and *in vivo* in animals (Byl, 1995; Liu et al., 2006; Mitragotri et al., 1995; Mitragotri and Kost, 2001). In humans, sonophoresis has been shown to be safe under defined parameters of ultrasound (US) delivery (Maruani et al., submitted for publication). As compared with injections, sonophoresis is noninvasive, because it does not disrupt the skin.

We aimed to investigate, in a randomized study of healthy human subjects, the transdermal penetration of histamine with sonophoresis.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Participants and setting

The study was carried out from July to December 2006, in the Clinical Investigation Center of the University Hospital of Tours, France. The subjects were healthy volunteers who were 18 years or older, were not pregnant or breastfeeding, did not use topical therapy, and had neither dermatological nor neurological disease.

* Corresponding author at: Service de Dermatologie, CHRU de Tours, Avenue de la République, 37044 Tours Cedex 9, France. Tel.: +33 2 47 36 62 56; fax: +33 2 47 36 62 56.
*E-mail address:* annabel-maruani@wanadoo.fr (A. Maruani).

0378-5173/$ – see front matter © 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.ijpharm.2009.10.024

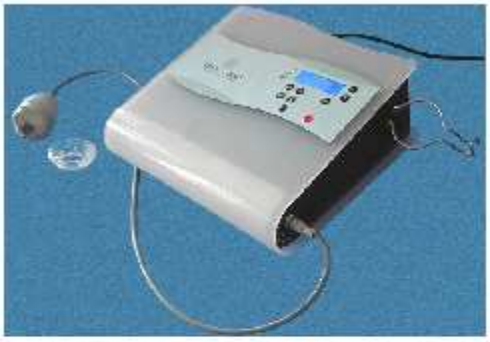


Fig. 1. Photo of the low-frequency ultrasound device.

Each volunteer gave their signed informed consent to be in the study. Before inclusion, each subject received a prick test with histamine on the left forearm as a positive control and a prick test with glycero-saline phenol as a negative control. To be included in further steps of the study, the subjects had to be correctly reactive to prick tests: a positive reaction for the histamine prick test was the development of a papule ≥2 mm in both diameters (if no papule with negative control) or a papule at least twice as large in both diameters than the papule induced by the negative control prick test.

The protocol was approved by the Ethics Committee of the University Hospital of Tours, France (registration 2006-15).

### 2.2. Ultrasound device

The US equipment (Fig. 1) was developed by Transderma Systems (Tours, France). The working frequency of the device was 36 kHz. The tip of the device included a cylindrical ultrasonic horn (titanium) 1.8 cm in diameter housed in a tube made of Delrin. The device also included a "cavitation chamber" consisting of an O-ring with a 7-$cm^2$ inner surface placed between the skin surface and the ultrasonic horn and containing 10 ml of saline ([NaCl] = 0.9%) as a coupling medium. During the experiments, the tip of the ultrasonic horn was always positioned at 5 mm from the skin. The power unit of the device allowed for choosing various parameters, including intensity, continuous or pulsed mode, and application time. Before each application, the equipment was tuned to ensure that the electrical signal matched the resonance frequency of the US probe. Low-frequency US was applied in pulsed mode to minimize thermal effects for 5 min. US intensity was determined by a calorimetric method commonly used for measurement of low-frequency US intensity (Weimann and Wu, 2002). Two schemes of US were investigated: 2 s on/5 s off, intensity ($I$) $I_1$ = 2.72 W/$cm^2$ ($US_1$); and 3 s on/5 s off, $I_2$ = 3.50 W/$cm^2$ ($US_2$).

### 2.3. Protocol and blinding

The subject sat on a medical chair. The research engineer "(AB)" defined three zones on the anterior side of the right forearm (Fig. 2) and randomized the zones for treatment according to a computer-generated randomization sequence: one zone received no US, one received $US_1$ and the last zone received $US_2$. If toxic effects appeared (pain > 40 on a 0–100-mm visual analogue scale [VAS], or necrosis), the engineer discontinued US delivery. The dermatologist "(AM)" blinded to the application of US, received the subject in another room and applied one drop of histamine on each zone of the forearm immediately after US. After 30 min, 2 h and 24 h, arms were measured for induced papules, and secondary outcomes were observed.

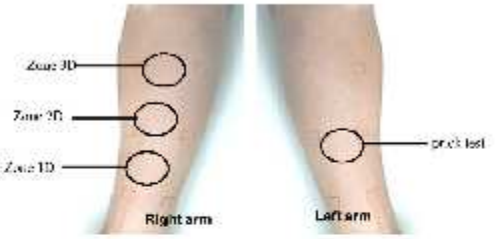



Fig. 2. Definition of three zones on the anterior side of the right forearm.

### 2.4. Outcome measurement

The primary outcome was penetration of histamine, as assessed by the size of the induced papule; the area was calculated according to the two diameters measured by the dermatologist.

Secondary outcomes consisted of the following:

- echographic measurement of the induced papule by the dermatologist: skin thickness was measured by high-resolution, B-mode, real-time US (DermCup 2020®, GIP Ultrasons, Tours, France) with use of a 20-MHz center-frequency transducer (Machet et al., 2006);
- pruritus induced by skin application of histamine, self-reported by the subject to the dermatologist and self-evaluated according to a scale of 1 = low intensity of itching; 2 = moderate intensity; 3 = high intensity; and 4 = very high intensity;
- adverse effects, which were systematically recorded by the research engineer and by the dermatologist: subjects were especially asked about pain, self-reported on a VAS ranging from 0 (no pain) to 100 (maximal pain).

All these measurements were taken immediately after US application and after 30 min, 2 h and 24 h.

### 2.5. Statistical methods

We planned to include 10 subjects in this pilot study. Demographic data and measurement of papule area are presented as mean ± standard deviation or frequencies, or median [interquartile range]. Data for secondary outcomes are presented as mean ± standard deviation for baseline data and mean variation from baseline for further measures. A Wilcoxon signed rank test for paired data was used to compare the two US intensities for papule area. Statistical analyses involved the use of SAS (SAS Institute, Cary, NC). $P < 0.05$ was considered statistically significant.

## 3. Results

Ten healthy subjects were included (8 females; age range 19–51 years); an itchy papule developed after the histamine prick test in all subjects, and no subject showed a reaction to the negative prick control.

### 3.1. Primary outcome

Arm zones without US showed no papules induced by histamine. In 9 of 10 patients, arm zones with US, whether $US_1$ or $US_2$, showed

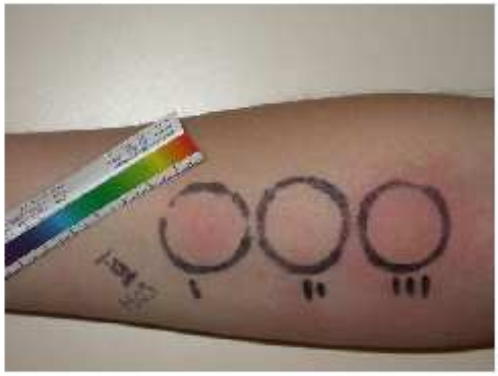


**Fig. 3.** Papules observed 30 min after the deposition of histamine on skin: one zone showed a large papule (zone III, after $US_2$), one a moderate papule (zone I, after $US_1$) and one no papule (zone II, no US previously applied).

**Table 1**
Area of papule induced by the deposition of histamine: measurements obtained 30 min after the application or not ultrasound in 10 patients.

| | Number of subjects showing a papule | Area of the papule ($mm^2$), median [interquartile range] |
|---|---|---|
| No US | 0 | – |
| $US_1$ | 9 | 39.3 [12.6–121.0] |
| $US_2$ | 9 | 62.8 [16.5–141.4] |

US: ultrasound; $US_1$: ultrasound with intensity = 2.72 W/$cm^2$; $US_2$: ultrasound with intensity = 3.50 W/$cm^2$.

a papule (Fig. 3). After 30 min, the area of papule, the primary outcome of the study, was significantly greater with than that without US (Table 1). The mean size of papules was greater with higher intensity of US ($US_2 > US_1$) but not significantly ($P = 0.789$). The papules had partially disappeared after 2 h (4 papules persisted with $US_2$ and 3 with $US_1$), and only 3 patients showed a small papule after 24 h.

### 3.2. Secondary outcomes

Measures of skin thickness of papules induced by histamine was measured by echography (Fig. 4) and reflected dermal edema subsequent to histamine absorption, are in Table 2. The results confirm clinical measures: dermal edema increased with US application, and no edema occurred after deposition of histamine without US. The size of the edema was high after 30 min and decreased at 2 h, and no edema persisted at 24 h. With high doses of US ($US_2$), the median values of edema were higher than those with $US_1$.

No pruritus was reported after histamine application without US. After $US_1$, pruritus was reported for 7 of 10 cases (score = 1 in 5 cases, score = 2 in 2 cases); after $US_2$, pruritus was reported in 7 cases (score = 1 in 3 cases, score = 2 in 2 cases, score = 3 in 2 cases). No pruritus persisted at 2 h or 24 h.

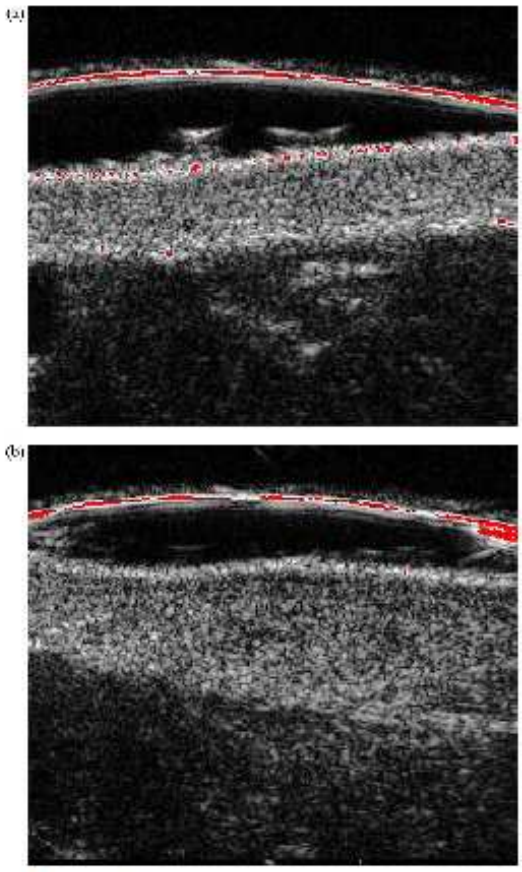


**Fig. 4.** High-resolution US imaging of skin thickness showing an increase of dermal edema (papule) after 30-min histamine application on skin that previously received low-frequency US. (a) Before US and histamine; (b) 30 min after histamine application.

No toxic effects were observed. The adverse events reported during or after US application were skin erythema on the site of US application in 9 cases with $US_1$ and $US_2$ and were persistent at 24 h in 4 cases; purpura on the site of US application (1 case with $US_2$, which disappeared at 24 h), punctiform excoriation (1 case, regressive after 48 h); tinnitus during US application, without

**Table 2**
Measurement of dermal edema with ultrasound imaging.

| | Dermal edema (mm), median [IQR] | | | |
|---|---|---|---|---|
| | T0 | T1/2 | T2 | T24 |
| No US (n = 10) | 1.00 [0.90–1.00] | 1.00 [0.90–1.00] | 1.00 [0.90–1.10] | 0.95 [0.90–1.00] |
| $US_1$ (n = 10) | 1.05 [0.90–1.10] | 1.30 [1.10–1.60] | 1.15 [0.90–1.50] | 1.05 [1.00–1.40] |
| $US_2$ (n = 10) | 0.95 [0.90–1.10] | 1.60 [1.00–1.90] | 1.40 [1.00–1.50] | 1.05 [0.90–1.30] |

US: ultrasound; $US_1$ = 2.72 W/$cm^2$; $US_2$ = 3.50 W/$cm^2$. IQR: interquartile range. T0: before application of US and histamine; T1/2: 30 min after the application of histamine (with or without previous US); T2: after 2 h; T24: after 24 h.

**Table 3**
Pain induced by histamine prick tests and application of ultrasound.

| | Pain on a 0–100-mm visual analog scale after US application | | | |
|---|---|---|---|---|
| | *N* | Mean ± SD | Median [IQR] | Min–Max |
| Prick test | 4 | 22.5 ± 17.6 | 22.5 [7.5–37.5] | 5.0–40.0 |
| No US | 5 | 0.0 ± 0.0 | 0.0 [0.0–0.0] | 0.0–0.0 |
| $US_1$ | 10 | 21.0 ± 32.1 | 10.0 [0.0–20.0] | 0.0–90.0 |
| $US_2$ | 10 | 28.7 ± 30.6 | 10.0 [7.0–50.0] | 0.0–80.0 |

US: ultrasound; $US_1$ = 2.72 W/cm$^2$; $US_2$ = 3.50 W/cm$^2$. IQR: interquartile range; SD: standard deviation.

acoustic alteration (4 cases, which disappeared as soon as US was discontinued); and pain (Table 3).

## 4. Discussion

This simple, blinded, randomized clinical study demonstrates transdermal penetration of histamine by sonophoresis, although the number of subjects were small; the penetration was revealed clinically by itchy skin papules and echographically by increased skin thickness. Skin not receiving US showed no papules. Altogether, papules were increased with increased intensity of low-frequency US. Indeed, the higher the US intensity, the more efficient the transdermal penetration, but toxic effects increase in the same way (Boucaud et al., 2001; Machet and Boucaud, 2002). With very high US intensity, superficial necrosis (dermis) and deep necrosis (fascias and muscles) have been described in animals (Singer et al., 1998). In the present study, the $US_1$ intensity was sufficient to induce papules, which were well tolerated, because they provoked almost the same pain as prick tests, which are commonly used.

Increased transdermal permeability with US application is linked in part to the thermal effects of US and is mainly attributed to cavitation (Simonin, 1995; Tezel et al., 2002). Cavitation consists of the generation of gas bubbles, which oscillate and may implode at the skin surface, thus provoking disorganization and/or creation of an aqueous pathway through the stratum corneum.

Adverse events linked to US application were increased with increased intensity of US ($US_2 > US_1$), as we expected. Erythema and purpura are directly linked to thermal and cavitation effects on skin but were quickly regressive in all cases. Tinnitus has been described during application of high- and low-frequency US (Lenhardt et al., 2002). In a study of sonophoresis tolerance in humans, tinnitus was reported in 23.5% of cases (Maruani et al., submitted for publication); it was of moderate intensity, always resolved after withdrawal of US delivery, and showed no acoustic alteration. Tinnitus occurs with bone conduction of US waves in the ear (Cai et al., 2002).

In our study, pain, which may be induced by sonophoresis, was not constant and showed large variations among subjects. One possible explanation for these variations could be the varied densities of hair follicles among subjects. With application of low-frequency US, gaseous microbubbles entrapped at the root of hair follicles may induce cavitation and pain. Pain occurred with application of US only and disappeared with discontinuation of US. The assessment of pain induced by prick tests has never been investigated, although prick tests are commonly used in allergy investigations. In this study, the variation in pain was large (5–40 on a 0–100-mm VAS), with mean 22.5; pain seemed to be slightly increased during $US_1$ (21/100) but was slightly less than during $US_2$ (28.7/100).

The results of this study on 10 subjects confirm that sonophoresis enhances transdermal penetration of histamine as revealed by papule measurement. Only a few studies have reported on the *in vivo* penetration of drugs in humans, and in the future, this technology could be used at therapeutic levels (Becker et al., 2005; Katz et al., 2004; Santoianni et al., 2004). For instance, histamine could be used with sonophoresis as a positive control in allergy tests instead of histamine prick tests, which involve skin disruption with a lancet.

## Conflict of interest

Dr. Alain Boucaud is a member of Transderma Systems, which supplied the ultrasound device.

## Acknowledgements

The authors thank Jean-Marc Grégoire for technical assistance and Aurélie Avarguès and Catherine Roussel for their support. The study was funded by a "Projet Hôpital Promoteur" (HP) financing.

## References

Akdis, C.A., Jutel, M., Akdis, M., 2008. Regulatory effects of histamine and histamine receptor expression in human allergic immune responses. Chem. Immunol. Allergy 94, 67–82.
Becker, B.M., Helfrich, S., Baker, E., Lovgren, K., Mimugh, A., Machan, J.T., 2005. Ultrasound with topical anesthetic rapidly decreases pain of intravenous cannulation. Acad. Emerg. Med. 12, 289–295.
Boucaud, A., Garrigue, M.A., Machet, L., Vaillant, L., Patat, F., 2002. Effect of sonication parameters on transdermal delivery of insulin to hairless rats. J. Control. Release 81, 113–119.
Boucaud, A., Montharu, J., Machet, L., Arbeille, B., Machet, M.C., Patat, F., Vaillant, L., 2001. Clinical, histologic, and electron microscopy study of skin exposed to low-frequency ultrasound. Anat. Rec. 264, 114–119.
Byl, N.N., 1995. The use of ultrasound as an enhancer for transcutaneous drug delivery: phonophoresis. Phys. Ther. 75, 539–553.
Cai, Z., Richards, D.G., Lenhardt, M.L., Madsen, A.G., 2002. Response of human skull to bone-conducted sound in the audiometric-ultrasonic range. Int. Tinnitus J. 8, 3–8.
Katz, N.P., Shapiro, D.E., Herrmann, T.E., Kost, J., Custer, L.M., 2004. Rapid onset of cutaneous anesthesia with EMLA cream after pretreatment with a new ultrasound-emitting device. Anesth. Analg. 98, 371–376.
Lenhardt, M.L., Richards, D.G., Madsen, A.G., Goldstein, B.A., Shulman, A., Guinta, R., 2002. Measurement of bone conduction levels for high frequencies. Int. Tinnitus J. 8, 9–12.
Liccardi, G., Passalacqua, G., Falagiani, P., Russo, M., D'Amato, G., 2008. The effect of multiple allergens on histamine release in vivo assessed by skin prick test. Allergy 63, 1559–1560.
Liu, H., Li, S., Pan, W., Wang, Y., Han, F., Yao, H., 2006. Investigation into the potential of low-frequency ultrasound facilitated topical delivery of cyclosporin A. Int. J. Pharm. 326, 32–38.
Machet, L., Boucaud, A., 2002. Phonophoresis: efficiency, mechanisms and skin tolerance. Int. J. Pharm. 243, 1–15.
Machet, L., Ossant, F., Bleuzen, A., Grégoire, J.M., Machet, M.C., Vaillant, L., 2006. High-resolution ultrasonography: utility in diagnosis, treatment, and monitoring dermatologic diseases. J. Radiol. 87, 1946–1961.
Malling, H.J., 1984. Skin prick testing and the use of histamine references. Allergy 39, 596–601.
Maruani, A., Vierron, E., Machet, L., Giraudeau, B., Halimi, J.M., Boucaud, A., submitted for publication. Tolerance of low-frequency ultrasound sonophoresis, and efficacy on skin penetration of histamine: a double-blind randomised study on humans.
Mitragotri, S., Blankschtein, D., Langer, R., 1995. Ultrasound-mediated transdermal protein delivery. Science 269, 850–853.
Mitragotri, S., Kost, J., 2001. Transdermal delivery of heparin and low-molecular weight heparin using low-frequency ultrasound. Pharm. Res. 18, 1151–1156.
Santoianni, P., Nino, M., Calabro, G., 2004. Intradermal drug delivery by low frequency sonophoresis (25 kHz). Dermatol. Online J. 10, 24.
Simonin, J.P., 1995. On the mechanisms of in vitro and in vivo phonophoresis. J. Control. Release 33, 125–141.

Singer, A.J., Homan, C.S., Church, A.L., McClain, S.A., 1998. Low-frequency sonophoresis: pathologic and thermal effects in dogs. Acad. Emerg. Med. 5, 35–40.
Smith, N.B., Lee, S., Shung, K.K., 2003. Ultrasound-mediated transdermal in vivo transport of insulin with low-profile cymbal arrays. Ultrasound Med. Biol. 29, 1205–1210.
Tezel, A., Sens, A., Mitragotri, S., 2002. Investigations of the role of cavitation in low-frequency sonophoresis using acoustic spectroscopy. J. Pharm. Sci. 91, 444–453.
Weimann, L.J., Wu, J., 2002. Transdermal delivery of poly-l-lysine by sonomacroporation. Ultrasound Med. Biol. 28, 1173–1180.

# Troisième partie

## Augmentation de l’efficacité des dermocorticoïdes après sonophorèse basse fréquence : essai randomisé pilote chez l’humain

**Étude financée par un appel d'offre Hôpital Promoteur.**

**Article paru dans International Journal of Pharmaceutics (IF=3).**

***Maruani A, Boucaud A, Perrodeau E, Gendre D, Giraudeau B, Machet L. Low-frequency ultrasound sonophoresis to increase the efficiency of topical steroids: A randomized pilot in skin penetration of histamine: A pilot randomized study of humans. Int J Pharm 2010;395:84-90.***

## Résumé

**Introduction**

Les dermocorticoïdes ont un potentiel vasoconstrictif lié à leur activité anti-inflammatoire. Les ultrasons (US) de basse fréquence appliqués sur la peau (sonophorèse) ont prouvé leur efficacité dans l'augmentation de l'absorption percutanée de différentes molécules.

**Objectifs**

Évaluer, dans une étude pilote, contrôlée et randomisée, en simple aveugle, l'efficacité de la sonophorèse dans l'augmentation de la vasoconstriction induite par la pénétration transcutanée des dermocorticoïdes chez le volontaire sain.

**Méthodes**

Trois zones circulaires étaient dessinées sur chaque avant-bras des volontaires sains inclus : les zones 1 recevaient le dermocorticoïde (crème de betamethasone 17-valerate, Betnéval®) en occlusion d'1 heure, les zones 2 le dermocorticoïde en occlusion de 2 heures, et les zones 3, sans occlusion (massage seul). Un avant-bras recevait les US, l'autre non, le côté étant randomisé. Les US étaient délivrés avec une sonde de 36 kHz, en mode pulsé (2 s on/5 s off), pendant 5 min, avec une intensité de 2,72 W/cm$^2$. Le critère de jugement principal était la différence de blancheur (vasoconstriction induite par la pénétration du dermocorticoïde) entre les deux avant-bras, mesurée par un chromamètre, et par un score clinique de 0 (blanc) à 10 (rouge) évalué par le dermatologue, qui était en aveugle du traitement par sonophorèse.

**Résultats**

Quinze sujets ont été inclus. La vasoconstriction était significativement plus importante avec le dermocorticoïde appliqué après sonophorèse que sans sonophorèse, surtout sur la zone 2. La vasoconstriction était supérieure aux temps 1, 2, 3, 4, et 6 heures (avec un score chromamétrique de 63.4 *versus* 65.2, p=0.017 à 4 heures), et avait totalement régressé à 24 heures. Une occlusion de 2 heures était plus efficace sur la vasoconstriction qu'une occlusion d'une heure et que l'application par massage seul, ceci avec ou sans sonophorèse.

**Conclusion**

L'utilisation combinée des US basse fréquence couplés à une occlusion de 2 heures est un moyen synergique d'augmenter l'efficacité des dermocorticoïdes. Ceci pourrait être utilisé pour traiter des zones réfractaires au traitement local du fait d'une épaisseur cutanée importante (paumes, plantes, cicatrices chéloïdes par exemple).

Author's personal copy

International Journal of Pharmaceutics 395 (2010) 84–90

Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Pharmaceutics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijpharm

# Low-frequency ultrasound sonophoresis to increase the efficiency of topical steroids: A pilot randomized study of humans

Annabel Maruani[a,b,*], Alain Boucaud[c], Elodie Perrodeau[d], David Gendre[d], Bruno Giraudeau[a,d], Laurent Machet[a,b]

[a] Université François Rabelais Tours, France
[b] INSERM, U930 Tours, CHRU de Tours, Service de Dermatologie, France
[c] Transderma Systems, Tours, France
[d] INSERM, CIC 202, CHRU Tours, France

ARTICLE INFO

*Article history:*
Received 31 January 2010
Received in revised form 3 May 2010
Accepted 8 May 2010
Available online 22 May 2010

*Keywords:*
Low-frequency ultrasound
Sonophoresis
Clinical study
Topical steroids

ABSTRACT

Topical steroids are efficient in vasoconstriction potential, which is linked to their anti-inflammatory activity. Low-frequency ultrasound (US) applied on the skin (sonophoresis) may enhance the transdermal transport of various steroids. We aimed to assess, in a simple, blinded, randomized controlled pilot study, the clinical efficiency of sonophoresis in increasing vasoconstriction by enhancing the transdermal penetration of topical steroids in human skin.

The study took place in the Clinical Investigation Center of the University Hospital of Tours and involved healthy volunteers. Three circular zones were delimited on each of the subjects' forearms: zone 1 (right and left) received topical steroids with 1-h occlusion, zone 2 with 2-h occlusion, and zone 3 with massage. Forearms were randomized to first undergo US, using a 36 kHz probe, delivered in a pulsed mode (2 s on/5 s off), during 5 min, with a US intensity of 2.72 W/cm$^2$, or no US. We used betamethasone 17-valerate in cream form as the topical steroid. The primary outcome was difference between forearms in skin color (increased whiteness reflecting the intensity of vasoconstriction) measured by 2 scores: values obtained with a chromameter (the higher the value, the whiter the skin) and a clinical visual score. The measurements were taken by a dermatologist by blinded assessment.

Fifteen subjects were included. Vasoconstriction was significantly higher with the topical steroid applied after US, especially in zone 2, than without US. Vasoconstriction was increased at 1, 2, 3, 4, and 6 h (e.g., chromameter score 63.4 *versus* 65.2, $p = 0.017$ at 4 h) and disappeared at 24 h. Moreover, 2-h occlusion gave higher vasoconstriction scores than did 1-h occlusion or massage alone, whether US was applied or not.

The use of low-frequency US coupled with 2-h occlusion is a synergistic way to increase the efficiency of topical steroids by enhancing skin permeability.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

The anti-inflammatory activity of topical steroids is linked to their vasoconstriction potential, according to which they are classified into 4 classes of activity (Mc Kenzie and Stoughton, 1962; Täuber, 1994). The vasoconstriction effect of steroids depends on the molecules' effects and their ability to penetrate skin. Thus, use of topical steroids with transdermal enhancers increases the vasoconstriction. Low-frequency ultrasound (US) applied to the skin, called sonophoresis, has been investigated for enhancing the transdermal transport of various drugs with a low and even high weight, such as insulin (Byl, 1995; Liu et al., 2006; Mitragotri and Kost, 2001; Smith et al., 2003). US has been investigated *in vitro* on excised skin, *in vivo* in animals and in only a few studies in humans (Becker et al., 2005; Katz et al., 2004; Santoianni et al., 2004). Sonophoresis is a noninvasive method and is well tolerated with use of defined parameters of US delivery (duration of delivery, intensity, pulsed/continuous mode) (Machet and Boucaud, 2002). The most common adverse effects are moderate erythema, pain and tinnitus, which are all reversible (Maruani et al., 2010). Increased transdermal permeability after US is attributed to thermal effects but mainly to cavitation phenomenon—the generation of gas bubbles, which oscillate and may implode at the skin surface, thus provoking disorganization and/or the creation of an aqueous pathway through

* Corresponding author at: Service de Dermatologie, CHRU de Tours, Avenue de la République, 37044 Tours Cedex 9, France. Tel.: +33 2 47 36 62 56; fax: +33 2 47 36 62 56.
*E-mail address:* annabel-maruani@wanadoo.fr (A. Maruani).

0378-5173/$ – see front matter © 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.ijpharm.2010.05.010

Author's personal copy



the stratum corneum (Simonin, 1995; Tang et al., 2002; Tezel et al., 2002).

We aimed to investigate in a simple, blinded, randomized controlled pilot study of healthy subjects the clinical efficiency of sonophoresis in enhancing transdermal penetration of topical steroids in human skin, as measured by vasoconstriction scores.

## 2. Patients and methods

### 2.1. Setting and participants

The study was carried out from May to July 2008 in the Clinical Investigation Center of the University Hospital of Tours, France. Healthy volunteers were included if they were ≥ 18 years old, were not pregnant or breastfeeding, did not use topical therapy, and had neither dermatological nor neurological disease. Each volunteer signed an informed consent form.

### 2.2. Randomization of US and blinding

A randomization sequence was computer generated. For each subject, the scientific engineer (A.B.) randomized each subject's forearm, right or left, to undergo US or not. The dermatologist, who assessed primary and secondary outcomes, was blinded to the US treatment.

### 2.3. Interventions

#### 2.3.1. Ultrasound device

The US device (Transderma Systems, Tours, France) was a Langevin-type transducer commonly used in sonophoresis studies. Its working frequency was 36 kHz. The tip of the device included a cylindrical ultrasonic horn (titanium), 1.8 cm in diameter, housed in a tube made of Delrin. The device also includes a chamber where cavitation occurs, called a "cavitation chamber," consisting of an O-ring with a 7-$cm^2$ inner surface placed between the skin surface and the ultrasonic horn. It contained 10 ml of saline ([NaCl] 9%) used as a coupling medium. The tip vibration was parallel to the axis of the acoustic system. During the experiments, the tip of the ultrasonic horn was always positioned 5 mm from the skin. The power unit of the device allowed for adjusting various parameters, including intensity, continuous or pulsed mode, and application time. Before each application, the equipment was calibrated to ensure that the electrical signal matched the resonance frequency of the US probe. US intensity was determined by a calorimetric method, which is usually used to measure low-frequency US intensity (Weimann and Wu, 2002; Zderic et al., 2002).

#### 2.3.2. Topical steroid

We used a topical steroid with class 2 activity, betamethasone 17-valerate, in cream form (Betneval®, GlaxoSmithKline). A quantity of 0.2 ml corresponding to about 0.2 g (i.e., 0.1 mg of active principle) was used for application.

### 2.4. Protocol

Each subject sat in a medical chair. For each forearm, the research engineer (in room 1) delimited 3 circular zones (zones 1, 2 and 3 each on the right and left forearms) 12 mm in diameter (Fig. 1). Each forearm was randomized to receive treatment without US on the 3 zones or US delivered in a pulsed mode (2 s on/5 s off) during 5 min, with a US intensity of 2.72 W/$cm^2$. If toxicity occurred (major pain, necrosis), US was immediately discontinued. Immediately after US application, the engineer applied betamethasone 17-valerate on zones 1 and 2 (right and left forearm) with occlusion (i.e., retained on the skin by use of a polyurethanne dressing, Tegaderm® (3 M Santé, France). For zone 1 (right and left forearm), the dressing was taken off after 1 h and for zone 2, after 2 h. For zone 3, betamethasone 17-valerate was massaged on the skin for 30 s. The dermatologist (A.M.) (in room 2) took all measurements (see Section 2.5) before the application of betamethasone 17-valerate, at 30 min (zone 3 only), 1 h (zones 1 and 3), then 2, 3, 4, 6 and 24 h (all zones).



Fig. 1. Definition of 6 zones on the anterior part of forearms (R, right; L, left) before low-frequency ultrasound and treatment with topical steroid betamethasone 17-valerate.

### 2.5. Outcomes

#### 2.5.1. Primary outcome

The main objective was to evaluate skin penetration of betamethasone 17-valerate after low-frequency US. We assessed the difference in skin color (increased whitening reflecting the intensity of vasoconstriction) between the forearm with US and betamethasone 17-valerate and the forearm with betamethasone 17-valerate alone. Color was evaluated by use of a chromameter and clinical vasoconstriction evaluation at 30 min and 1, 2, 3, 4, 6 and 24 h. Forearm color was assessed before the application of betamethasone 17-valerate – immediately after US – to take into account the variation in skin color specifically linked to US.

A chromameter (CR300, Minolta, Japan) is used to objectively assess change in skin color (Van den Kerckhove et al., 2001); the probe of the chromameter is placed in contact with the cutaneous zones. The chromameter provides 2 parameters reflecting the whiteness and the redness (linked to pigmentation and vascularisation) of the zone. We analyzed whiteness in this study because it reflects vasoconstriction; the higher the value (given with arbitrary units), the whiter the zone; the lower the value, the redder the zone.

The dermatologist clinically evaluated skin color using a visual scale from 0 to 10, 0 corresponding to maximal whiteness (maximal vasoconstriction) and 10 maximal redness (maximal pigmentation and vasodilatation); 5 represents normal skin (measured before the application of US/betamethasone 17-valerate).

#### 2.5.2. Secondary outcome

The secondary outcome was whether application of betamethasone 17-valerate with 1- or 2-h occlusion after low-frequency US was more efficient than usual treatment (application of topical cream by massage alone). This outcome was assessed by the kinetics of cutaneous whitening (vasoconstriction) in terms of delay and duration of action as measured by chromametric and visual vasoconstriction scores.

Adverse events were systematically evaluated by the research engineer and dermatologist. Pain was self-reported by the subject on a visual analog scale, from 0 (no pain) to 100 (maximal pain). Pain > 40/100 was considered important and led to the discontinuation of US.

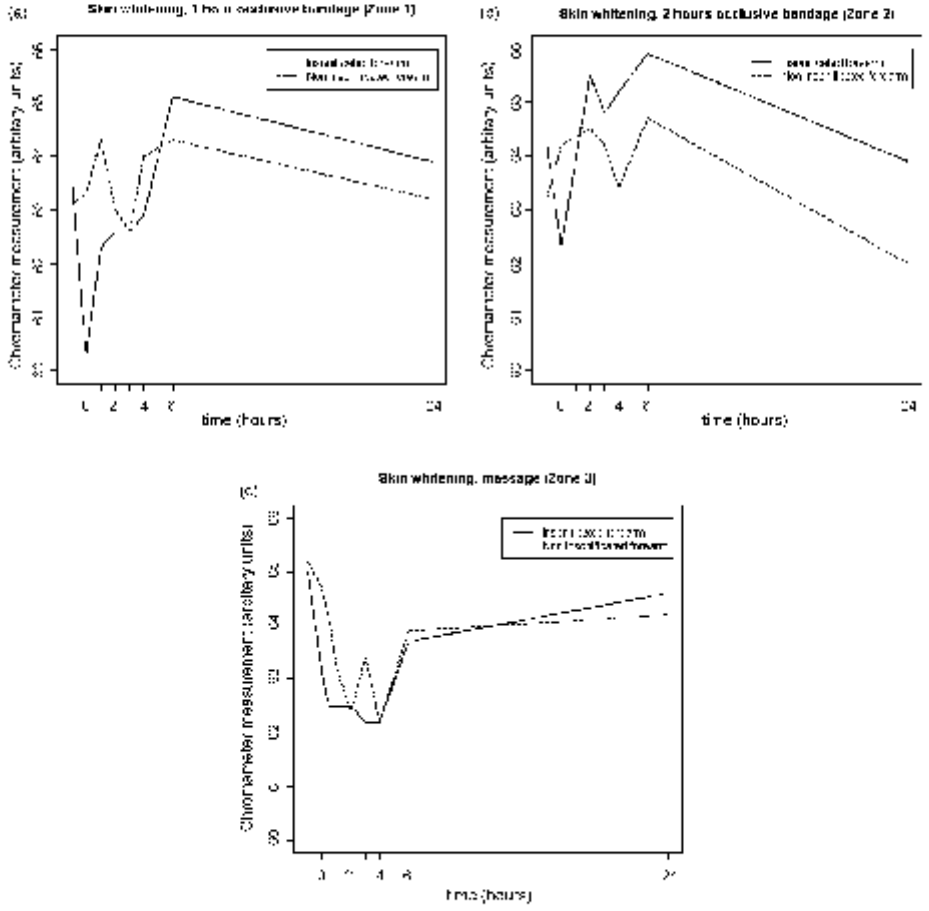
Author's personal copy



**Table 1a**
Whitening of zones of forearms assessed by a chromameter.

| | | T0 | T1 | T2 | T3 | T4 | T6 | T24 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Zone 1 | IF | 63.5 [60.1; 65.9] | 62.3 [59.9; 67.0] | 62.6 [60.3; 67.7] | 62.6 [60.2; 67.0] | 62.9 [60.5; 66.9] | 65.1 [60.4; 67.0] | 63.9 [59.6; 67.6] |
| | NIF | 63.1 [60.4; 67.7] | 64.3 [61.7; 67.1] | 63.0 [60.5; 67.9] | 62.6 [60.9; 67.5] | 64.0 [60.9; 68.0] | 64.3 [60.9; 67.5] | 63.2 [60.5; 68.5] |
| | *p* | 0.198 | **0.026** | 1 | 0.776 | 0.397 | 0.187 | 0.599 |
| Zone 2 | IF | 64.2 [60.1; 67.8] | – | 65.5 [62.1; 69.7] | 64.8 [61.5; 68.9] | 65.2 [61.4; 68.4] | 65.9 [61.4; 68.3] | 63.9 [60.6; 68.4] |
| | NIF | 63.2 [60.7; 67.2] | – | 64.5 [61.2; 68.7] | 64.2 [59.4; 67.4] | 63.4 [60.8; 67.4] | 64.7 [60.3; 67.7] | 62.0 [60.6; 68.5] |
| | *p* | 0.330 | – | 0.083 | **0.031** | **0.017** | 0.112 | 0.167 |
| Zone 3 | IF | 65.0 [61.1; 68.1] | 62.5 [59.1; 68.5] | 62.5 [58.9; 67.8] | 62.2 [60.0; 68.3] | 62.2 [60.1; 68.0] | 63.7 [59.1; 66.4] | 64.6 [59.7; 68.9] |
| | NIF | 65.2 [60.7; 67.2] | 63.2 [59.6; 67.9] | 62.4 [60.1; 67.3] | 63.4 [60.3; 67.8] | 62.2 [59.8; 67.2] | 63.9 [60.6; 66.8] | 64.2 [61.0; 68.1] |
| | *p* | 0.181 | 0.950 | 0.776 | 0.362 | 0.328 | 0.798 | 0.706 |

Data are medians [interquartile range].




**Graph 1.** Median skin whitening measured by chromameter (arbitrary values which reflect whiteness: the higher the value, the whiter the skin) at each time for each zone.

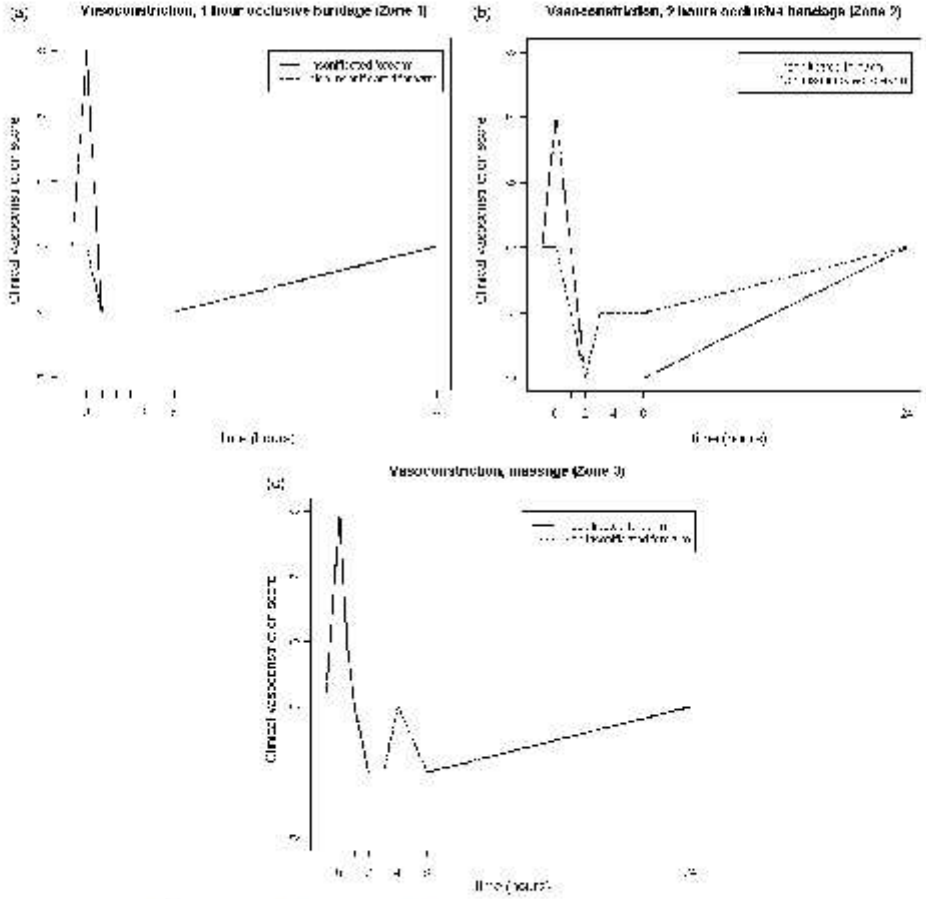
Author's personal copy



**Table 1b**
Whitening of zones of forearms assessed by clinical vasoconstriction score from 0 (maximal vasoconstriction) to 10 (maximal vasodilatation).

| | | T0 | T1 | T2 | T3 | T4 | T6 | T24 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Zone 1 | IF | 5.0 [5.0; 5.0] | 4.0 [4.0; 5.8] | 4.0 [3.0; 4.0] | 4.0 [3.2; 4.0] | 4.0 [3.0; 5.0] | 4.0 [3.0; 4.8] | 5.0 [4.0; 5.0] |
| | NIF | 5.0 [5.0; 5.0] | 4.0 [4.0; 4.0] | 4.0 [4.0; 4.0] | 4.0 [4.0; 4.8] | 4.0 [4.0; 5.0] | 4.0 [3.2; 4.8] | 5.0 [4.0; 5.0] |
| | p | – | 0.105 | 0.665 | 0.588 | 0.890 | 0.766 | 0.572 |
| Zone 2 | IF | 5.0 [5.0; 5.0] | – | 3.0 [2.0; 3.0] | 3.0 [2.0; 3.0] | 3.0 [3.0; 4.0] | 3.0 [2.2; 4.0] | 5.0 [4.0; 5.0] |
| | NIF | 5.0 [5.0; 5.0] | – | 3.0 [3.0; 4.0] | 4.0 [4.0; 4.0] | 4.0 [4.0; 4.0] | 4.0 [3.0; 4.0] | 5.0 [4.2; 5.0] |
| | p | – | – | **0.015** | **0.007** | **0.008** | **0.006** | 0.345 |
| Zone 3 | IF | 5.0 [5.0; 5.0] | 5.0 [4.0; 6.0] | 4.0 [4.0; 5.0] | 4.0 [3.2; 4.0] | 4.0 [4.0; 4.1] | 4.0 [4.0; 4.8] | 5.0 [4.0; 5.0] |
| | NIF | 5.0 [5.0; 5.0] | 5.0 [4.0; 5.0] | 4.0 [4.0; 5.0] | 4.0 [4.0; 4.8] | 5.0 [4.0; 5.0] | 4.0 [4.0; 4.8] | 5.0 [5.0; 5.0] |
| | p | – | 0.008 | 1 | **0.008** | **0.015** | 0.773 | 0.766 |

Zone 1: topical steroid with 1-h occlusion; zone 2: topical steroid with 2-h occlusion; zone 3: topical steroid applied by massage alone.
T0: before treatment; T1: 1 h after treatment; T2: 2 h after treatment; T3: 3 h after treatment; T4: 4 h after treatment; T6: 6 h after treatment; T24: 24 h after treatment.
IF: forearm treated with ultrasound; NIF: forearm not treated with ultrasound.




**Graph 2.** Median skin whitening measured with clinical vasoconstriction score at each time for each zone.

Author's personal copy



### 2.6. Statistical analysis

We arbitrarily planned to include 15 subjects in this pilot study. Quantitative data are presented as medians [interquartile range] and qualitative data as frequencies. Statistical analysis involved use of R Project for Statistical Computing v2.8.1. A Wilcoxon signed rank for paired data (significance = 5%) was used to compare skin whiteness on both forearms (US and no US), the primary outcome, and to compare the variation in skin whiteness in all zones (by massage and 1- and 2-h occlusion) on each forearm and at each time, the secondary outcome. A descriptive analysis was performed for tolerance data.

### 2.7. Ethical approval

The protocol was approved by the ethics committee of the University Hospital of Tours, France (registration no. 2005-05).

## 3. Results

We enrolled 15 healthy subjects in the study (12 females; median age 24 years (range 19–60 years).

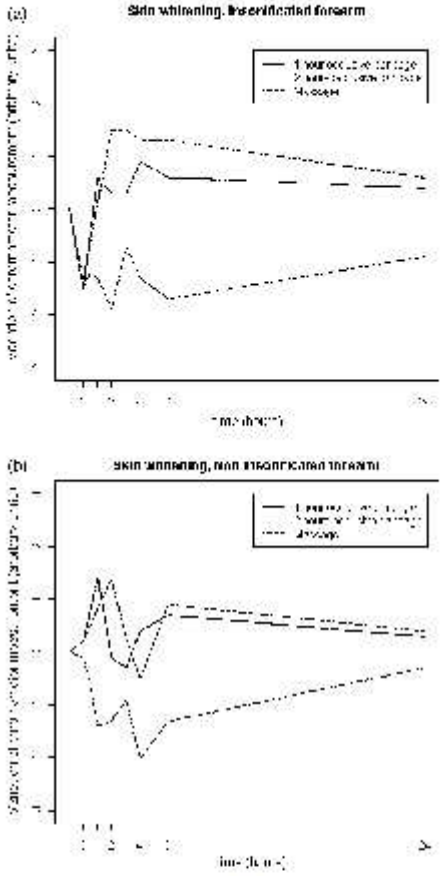
### 3.1. Primary outcome

Results of whitening of 3 zones, with and without US, investigated with use of a chromameter are in Table 1a. Graph 1a–c shows the chromameter measurements at time 0 and at 1, 2, 3, 4, 6 and 24 h. Immediately after US, whiteness decreased, subsequent to erythema induced by US, then whiteness increased slowly as the erythema disappeared and vasoconstriction occurred. The assessment of whitening of the 3 zones by clinical vasoconstriction score is in Table 1b and Graph 2a–c.

For zone 2 (topical steroid with 2-h occlusion), whitening (vasoconstriction) was greater on the forearm with US and topical steroid treatment than on the forearm with topical steroid alone, especially at T3 (chromameter score 64.2 *versus* 64.8, $p = 0.032$) and T4 (63.4 *versus* 65.2, $p = 0.017$) (Fig. 2).

### 3.2. Secondary outcome

Whitening (vasoconstriction) with application of the topical steroid assessed by chromameter, with and without US, comparing the 3 different zones, is in Table 2a and Graph 3a and b. Clinical vasoconstriction scores are in Table 2b. In forearms with US, whitening was significantly greater in zone 2 (2-h occlusion) than in zones 1




**Graph 3.** Variation of skin whitening measured by chromameter (arbitrary units: the higher the value, the whiter the zone) compared to the measurement before insonification.

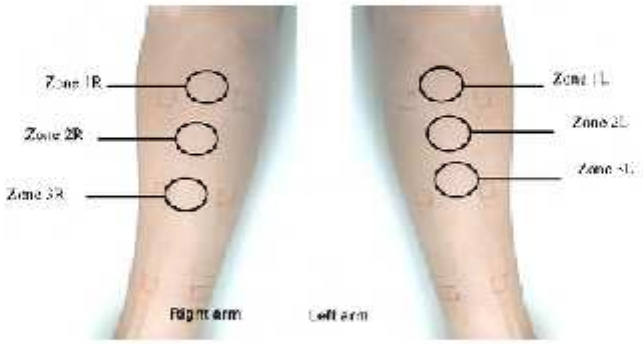



**Fig. 2.** Vasoconstriction (whitening) 4 h after the application of topical steroid, betamethasone 17-valerate, on a forearm that had undergone low-frequency ultrasound (sonophoresis).

Author's personal copy



**Table 2a**
Comparison of the variation of whitening measured with chromameter on the three zones.

| | Difference in comparison with 1st measurement (median) | | | p-Value | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Zone 1 | Zone 2 | Zone 3 | Z1 *versus* Z2 | Z1 *versus* Z3 | Z2 *versus* Z3 |
| Insonificated forearm | | | | | | |
| T1 | 0.6 | – | −1.3 | – | **0.001** | – |
| T2 | 0.3 | 1.5 | −1.9 | **0.001** | **0.002** | **<0.001** |
| T3 | 0.3 | 1.5 | −0.7 | 0.233 | **0.011** | **0.001** |
| T4 | 0.9 | 1.3 | −1.3 | 0.334 | **0.011** | **0.001** |
| T6 | 0.6 | 1.3 | −1.7 | 0.320 | **0.001** | **<0.001** |
| T24 | 0.4 | 0.6 | −0.9 | 0.887 | 0.121 | 0.083 |
| Non-insonificated forearm | | | | | | |
| T1 | 0.6 | – | −1.3 | – | **0.001** | – |
| T2 | −0.1 | 1.4 | −1.9 | **0.003** | **0.031** | **<0.001** |
| T3 | −0.3 | 0.3 | −0.7 | 0.397 | **0.035** | **0.018** |
| T4 | 0.4 | 0.5 | −1.3 | 0.513 | **0.005** | **0.002** |
| T6 | 0.7 | 0.9 | −1.7 | 0.570 | **0.008** | **0.020** |
| T24 | 0.3 | 0.4 | −0.9 | 0.733 | 0.245 | 0.842 |

**Table 2b**
Comparison of the variation of whitening assessed with clinical vasoconstriction score on the three zones.

| | Difference in comparison with 1st measurement (median) | | | p-Value | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Zone 1 | Zone 2 | Zone 3 | Z1 *versus* Z2 | Z1 *versus* Z3 | Z2 *versus* Z3 |
| Insonificated forearm | | | | | | |
| T1 | −1 | – | 0 | – | 0.210 | – |
| T2 | −1 | −2 | −1 | **<0.001** | 0.208 | **0.001** |
| T3 | −1 | −2 | −1 | **0.003** | 0.305 | **0.009** |
| T4 | −1 | −2 | −1 | **0.002** | 0.299 | **0.002** |
| T6 | −1 | −2 | −1 | **0.006** | 0.178 | **0.005** |
| T24 | 0 | 0 | 0 | 0.850 | 0.530 | 0.233 |
| Non-insonificated forearm | | | | | | |
| T1 | −1 | – | 0 | – | 0.052 | – |
| T2 | −1 | −2 | −1 | **0.002** | **0.037** | **0.002** |
| T3 | −1 | −1 | −1 | 0.110 | 0.407 | **0.031** |
| T4 | −1 | −1 | 0 | 0.073 | 0.240 | **0.008** |
| T6 | −1 | −1 | −1 | 0.424 | 0.224 | 0.111 |
| T24 | 0 | 0 | 0 | 0.203 | 0.120 | 1 |

Zone 1: topical steroid with 1-h occlusion; zone 2: topical steroid with 2-h occlusion; zone 3: topical steroid applied with massage.
T1: 1 h after treatment; T2: 2 h after treatment; T3: 3 h after treatment; T4: 4 h after treatment; T6: 6 h after treatment; T24: 24 h after treatment.

and 3 at all times (from 1 to 6 h), as assessed by both chromametric and clinical scores, with no significant difference in whitening between zones 1 and 3. In the forearms without US, whitening was significantly greater in only zone 2 than in zones 1 and 3, at 2 h only.

Zones of forearms showed no difference in whitening at 24 h, whether they underwent US or not.

### 3.3. Adverse events

During US delivery, subjects self-reported pain of moderate intensity (≤40 on a 100-point visual analog scale) for 38 of 45 zones and major pain (>40) for 7 zones, which led to the discontinuation of US. In all cases, pain stopped as soon as US was discontinued.

The dermatologist noted slight punctiform purpura on the site undergoing US in 3 cases: in 2 cases, purpura regressed at 24 h. One case of contact dermatitis occurred after occlusion, which resolved after 24 h.

## 4. Discussion

We aimed to assess, in a simple, blinded, randomized controlled pilot study, the clinical efficiency of sonophoresis in increasing vasoconstriction by enhancing the transdermal penetration of a topical steroid in human skin. Low-frequency US was efficient in enhancing the cutaneous penetration of the topical steroid *in vivo* on human skin. Indeed, whitening obtained with betamethasone 17-valerate treatment after US was greater than that without US in most cases, particularly when the topical steroid was applied under a bandage (occlusion as opposed to massage), especially with long-lasting occlusion (2 *versus* 1 h). The efficiency was greater in terms of intensity of whitening, as measured by chromametric and visual scores, and duration of whitening. Indeed, significant results were observed up to 6 h after US. However, US did not enhance the rapidity of whitening, probably because of the vasodilatation immediately induced by low-frequency US (Maruani et al., 2010).

The explanation of increased transdermal permeability due to low-frequency US is linked in part to the thermal effects of US and mainly attributed to cavitation (Simonin, 1995; Tang et al., 2002; Tezel et al., 2002). Cavitation increases with high-intensity low-frequency US, thus leading to a parallel increase in transdermal permeability. However, toxicity also increases: with high intensity or long duration, sonophoresis can induce necrosis of skin, fascia and muscles (Machet and Boucaud, 2002; Singer et al., 1998; Yamashita et al., 1997). The intensity we used was previously demonstrated to be well tolerated (Maruani et al., 2010). With US, we observed pain, erythema and slight punctiform purpura, which all rapidly resolved. Tinnitus is a commonly described side effect of high- and low-frequency US (Maruani et al., submitted for publication), but we did not observe tinnitus in our study.

Our secondary outcome was whether whitening with topical steroid applied with 1- and 2-h occlusion was more efficient than that applied by massage as measured by delay and duration of activity. Independent of US, topical steroid applied with 2-h occlusion induced more efficient vasoconstriction than did 1-h occlusion and

Author's personal copy



massage alone. The difference was still significant 6 h after US. The effect of occlusion as a known enhancer of skin absorption of drugs is linked to several mechanisms: an increase in stratum corneum hydration, an increase in skin temperature on the occluded site (and thus, a higher rate of vasodilatation), and a longer duration of the contact of the drug with the skin (Cevc et al., 2008).

Our pilot study suggests that the use of 2 different enhancers of skin permeability to topical steroids (low-frequency US and occlusion) is a synergistic way to increase the efficiency of topical steroids, considering both the intensity and duration of vasoconstriction. Indeed low-frequency US with 2-h occlusion induced greater vasoconstriction than did occlusion without US. The tolerance of the skin to this treatment was acceptable. Thus, the use of topical steroids with both sonophoresis and occlusion could be of interest for localized dermatologic lesions, which require treatment with high-intensity anti-inflammatory molecules. For instance, this combination could be used for lesions refractory to treatment because of thick skin, such as for cheloid scars or for topography of palms and soles.

## Conflict of interest

Dr. Alain Boucaud is a member of Transderma Systems, which supplied the ultrasound device.

## Acknowledgements

The authors thank Jean-Marc Grégoire (UMR INSERM U930, CRNRS ERL 3106, Tours) for technical assistance and Aurélie Avarguès (CIC 202, CHRU de Tours) for support. The study was funded by a "Projet Hôpital Promoteur", CHRU de Tours (HP) financing.

## References

Becker, B.M., Helfrich, S., Baker, E., Lovgren, K., Minugh, A., Machan, J.T., 2005. Ultrasound with topical anesthetic rapidly decreases pain of intravenous cannulation. Acad. Emerg. Med. 12, 289–295.

Byl, N.N., 1995. The use of ultrasound as an enhancer for transcutaneous drug delivery: phonophoresis. Phys. Ther. 75, 539–553.

Cevc, G., Margareanu, S., Rother, M., Vierl, U., 2008. Occlusion effect on transcutaneous NSAID delivery from conventional and carrier-based formulations. Int. J. Pharm. 359, 190–197.

Katz, N.P., Shapiro, D.E., Herrmann, T.E., Kost, J., Custer, L.M., 2004. Rapid onset of cutaneous anesthesia with EMLA cream after pretreatment with a new ultrasound-emitting device. Anesth. Analg. 98, 371–376.

Liu, H., Li, S., Pan, W., Wang, Y., Han, F., Yao, H., 2006. Investigation into the potential of low-frequency ultrasound facilitated topical delivery of cyclosporin A. Int. J. Pharm. 326, 32–38.

Machet, L., Boucaud, A., 2002. Phonophoresis: efficiency, mechanisms and skin tolerance. Int. J. Pharm. 243, 1–15.

Maruani, A., Vierron, E., Machet, L., Giraudeau, B., Halimi, J.M., Boucaud, A. Tolerance of low-frequency ultrasound sonophoresis: a double-blind randomised study on humans. Skin Res. Technol., submitted for publication.

Maruani, A., Vierron, E., Machet, L., Giraudeau, B., Boucaud, A., 2010. Efficiency of low-frequency ultrasound sonophoresis in skin penetration of histamine: a randomized study in humans. Int. J. Pharm. 385, 37–41.

McKenzie, A.W., Stoughton, R.B., 1962. Method for comparing percutaneous absorption of steroids. Arch. Dermatol. 86, 608–616.

Mitragotri, S., Kost, J., 2001. Transdermal delivery of heparin and low-molecular weight heparin using low-frequency ultrasound. Pharm. Res. 18, 1151–1156.

Santoianni, P., Nino, M., Calabro, G., 2004. Intradermal drug delivery by low frequency sonophoresis (25 KHz). Dermatol. Online J. 10, 24.

Simonin, J.P., 1995. On the mechanisms of in vitro and in vivo phonophoresis. J. Control Rel. 33, 125–141.

Singer, A.J., Homan, C.S., Church, A.L., McClain, S.A., 1998. Low-frequency sonophoresis: pathologic and thermal effects in dogs. Acad. Emerg. Med. 5, 35–40.

Smith, N.B., Lee, S., Shung, K.K., 2003. Ultrasound-mediated transdermal in vivo transport of insulin with low-profile cymbal arrays. Ultrasound Med. Biol. 29, 1205–1210.

Tang, H., Wang, C.C., Blankschtein, D., Langer, R., 2002. An investigation of the role of cavitation in low-frequency ultrasound-mediated transdermal drug transport. Pharm. Res. 19, 1160–1169.

Täuber, U., 1994. Dermocorticosteroids. Structure, activity, pharmacokinetics. Eur. J. Dermatol. 4, 419–429.

Tezel, A., Sens, A., Mitragotri, S., 2002. Investigations of the role of cavitation in low-frequency sonophoresis using acoustic spectroscopy. J. Pharm. Sci. 91, 444–453.

Van den Kerckhove, E., Staes, F., Flour, M., Stappaerts, K., Boeckx, W., 2001. Reproducibility of repeated measurements on healthy skin with Minolta Chromameter CR-300. Skin Res. Technol. 7, 56–59.

Weimann, L.J., Wu, J., 2002. Transdermal delivery of poly-l-lysine by sonomacroporation. Ultrasound Med. Biol. 28, 1173–1180.

Yamashita, N., Tachibana, K., Ogawa, K., Tsujita, N., Tomita, A., 1997. Scanning electron microscopic evaluation of the skin surface after ultrasound exposure. Anat. Record 247, 455–461.

Zderic, V., Vaezy, S., Martin, R.W., Clark, J., 2002. Ocular drug delivery using 20-kHz ultrasound. Ultrasound Med. Biol. 28, 823–829.

# Conclusions et perspectives

Les trois essais de sonophorèse chez l'homme sain, qui ont constitué ce travail de thèse au sein de l'équipe 5 de l'UMR INSERM U930, CNRS ERL 3106, ont montré que la sonophorèse pouvait être utilisée efficacement à des doses non toxiques. Nous avions choisi pour ces études des petites molécules, ayant une activité pharmacodynamique quantifiable, ceci nous permettant d'éviter de recourir à des dosages *in vivo*. Dans des conditions où une augmentation de la perméabilité cutanée a été démontrée *in vivo* chez l'homme, nous avons montré que les effets secondaires cutanés étaient très modérés. La douleur était souvent minime ou modérée, l'érythème était fréquent mais rapidement régressif. Enfin certains sujets percevaient des bourdonnements d'oreilles, bruits transmis à l'oreille interne par voie osseuse, pendant la durée de l'insonification.

Après cet essai de tolérance sur l'homme sain, qui vient après nos essais *in vivo* chez l'animal (thèse de sciences d'Alain Boucaud), l'étape suivante est l'utilisation de la sonophorèse en thérapeutique. Pour cela, la population (adulte plutôt que pédiatrique), les molécules et les pathologies doivent être ciblées. Les travaux sur l'insuline (obtention de baisse des glycémies chez le rat et le porc, suite à l'application cutanée d'insuline avec US basse fréquence) étaient initialement très prometteurs, mais nous avons abandonné à l'heure actuelle l'idée de développer un « stylo à ultrasons » pour délivrer de l'insuline aux diabétiques pour plusieurs raisons (brevets déjà déposés, techniques concurrentes). Des applications cosmétologiques (traitement des ridules et des taches pigmentées notamment) sont en cours de développement actuellement par la société Transderma Systems.

Nos projets à court et moyen termes sont les suivants :

- <u>cicatrices hypertrophiques ou chéloïdes</u>, qui posent souvent des problèmes thérapeutiques. Sur ces cicatrices, l'effet destructeur des US pourrait être utile : à forte puissance, ils peuvent entraîner une désorganisation épidermique, mais aussi des phénomènes de remodelage dermique. L'association à un passage transdermique accru des dermocorticoïdes pourrait être efficace. Un projet a été élaboré et une demande de financement faite, pour un essai pilote randomisé comparant l'efficacité des dermocorticoïdes en occlusion après sonophorèse *versus* dermocorticoïdes en occlusion après placebo.
- <u>Kératoses actiniques</u> : Les effets conjoints de toxicité locale et d'augmentation de la perméabilité cutanée des US peuvent être intéressants, en association à des topiques déjà commercialisés (imiquimod, 5-fluoro-uracile, diclofénac),

dans le traitement des kératoses actiniques multiples, lésions cutanées pré-carcinomateuses posant souvent des problèmes thérapeutiques.

- Les verrues plantaires réfractaires aux traitements usuels peuvent être une cible thérapeutique intéressante, en association à des produits topiques destructeurs, comme la vaseline salicylée, ou immunomodulateurs, comme l'imiquimod, par exemple.
- Les plaies chroniques pourraient constituer une indication de la sonophorèse, les US basse fréquence pouvant potentiellement aider à la détersion des plaies et, par exemple, favoriser l'apport de facteurs de croissance, pour une cicatrisation plus rapide.

# Bibliographie

Akdis CA, Jutel M, Akdis M. Regulatory effects of histamine and histamine receptor expression in human allergic immune responses. Chem Immunol Allergy 2008;94:67-82.

Babiuk S, Baca-estrada M, Babiuk LA, Ewen C, Foldvari M. Cutaneous vaccination: the skin as an immunologically active tissue and the challenge of antigen delivery. J Control Release 2000;66:199-214.

Boucaud A, Garrigue MA, Machet L, Vaillant L, Patat F. Effect of sonication parameters on transdermal delivery of insulin to hairless rats. J Control Release 2002;81:113-9.

Boucaud A, Machet L, Arbeille B, Machet MC, Sournac M, Mavon A, Patat F, Vaillant L. In vitro study of low-frequency ultrasound-enhanced transdermal transport of fentanyl and caffeine across human and hairless rat skin. Int J Pharm 2001;228:69-77.

Boucaud A, Montharu J, Machet M, Arbeille B, Machet MC, Patat F, Vaillant L. Clinical, histologic, and electron microscopy study of skin exposed to low-frequency ultrasound. Anat Rec 2001;264:114-9.

Becker BM, Helfrich S, Baker E, Lovgren K, Minugh A, Machan JT. Ultrasound with topical anesthetic rapidly decreases pain of intravenous cannulation. Acad Emerg Med 2005;12:289-95.

Blichmann CW, Serup J. Assessment of skin moisture. Measurement of electrical conductance, capacitance and transepidermal water loss. Acta Derm Venereol 1988;68:284-90.

Byl NN. The use of ultrasound as an enhancer for transcutaneous drug delivery: phonophoresis. Phys Ther 1995; 75:539-53.

Cai Z, Richards DG, Lenhardt ML, Madsen AG. Response of human skull to bone-conducted sound in the audiometric-ultrasonic range. Int Tinnitus J 2002;8:3-8.

Cevc G, Mazgareanu S, Rother M, Vierl U. Occlusion effect on transcutaneous NSAID delivery from conventional and carrier-based formulations. Int J Pharm 2008;359:190-7.

Griffin JE, Touchstone JC. Ultrasonic movement of cortisol into pig tissue. I-Movement into skeletal muscle. Am J Phys Med 1963;42:77-85.

Gupta J, Prausnitz MR. Recovery of skin barrier properties after sonication in human subjects. Ultrasound Med Biol 2003;35:1405-8.

Katz NP, Shapiro DE, Herrmann TE, Kost J, Custer LM. Rapid onset of cutaneous anesthesia with EMLA cream after pretreatment with a new ultrasound-emitting device. Anesth Analg 2004;98:371-6.

Lee S, Newnham RE, Smith NB. Short ultrasound exposure times for noninvasive insulin delivery in rats using the lightweight cymbal array. Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control 2004;51:176-80.

Lee S, Snyder B, Newnham RE, Smith NB. Noninvasive ultrasonic transdermal insulin delivery in rabbits using the light-weight cymbal array. Diabetes Technol Ther 2004;6:808-15.

Lenhardt ML, Richards DG, Madsen AG, Goldstein BA, Shulman A, Guinta R. Measurement of bone conduction levels for high frequencies. Int Tinnitus J 2002;8:9-12.

Liccardi G, Passalacqua G, Falagiani P, Russo M, D'Amato G. The effect of multiple allergens on histamine release in vivo assessed by skin prick test. Allergy 2008;63:1559-60.

Liu H, Li S, Pan W, Wang Y, Han F, Yao H. Investigation into the potential of low-frequency ultrasound facilitated topical delivery of Cyclosporin A. Int J Pharm 2006;326:32-8.

Luis J, Park EJ, Meyer RJ, Smith NB. Rectangular cymbal arrays for improved ultrasonic transdermal insulin delivery. J Acoust Soc Am 2007;122:2022-30.

Machet L, Baïcan A, Pelucio-Lopes C, Patat F, Vaillant L. L'absorption percutanée : traitements topiques et systémiques. Ann Dermatol Venereol 1997 ;124 :490-6.

Machet L, Boucaud A. Phonophoresis : efficiency, mechanisms and skin tolerance. Int J Pharm 2002, 243:1-15.

Machet L, Boucaud A. Transdermal transport by phonophoresis. In: Bronaugh RL, Maibach HI eds. Percutaneous Absorption: Drug, Cosmetics, Mechanisms, Methology Boca Raton: Taylor and Francis Group, 2005:739-58.

Machet L, Ossant F, Bleuzen A, Grégoire JM, Machet MC, Vaillant L. High-resolution ultrasonography: utility in diagnosis, treatment, and monitoring dermatologic diseases. J Radiol 2006;87:1946-61.

Machet L, Pinton J, Patat F, Arbeille B, Pourcelot L, Vaillant L. In vitro phonophoresis of digoxin across hairless mice and human skin: thermal effect of ultrasound. Int J Pharm 1996;133:39-45.

Malling HJ. Skin prick testing and the use of histamine references. Allergy 1984;39:596-601.

Mc Kenzie AW, Stoughton RB. Method for comparing percutaneous absorption of steroids. Arch Dermatol 1962;86:608-16.

Milich DR, Leroux-Roels GG. Immunogenetics of the response to HbsAg vaccination. Autoimm Rev 2003;2:248-57.

Mitragotri S, Blankschtein D, Langer R. Ultrasound-mediated transdermal protein delivery. Science 1995;269:850-3.

Mitragotri S, Blankschtein D, Langer R. Transdermal drug delivery using low-frequency sonophoresis. Pharm Res 1996;13:411-20.

Mitragotri S, Kost J. Transdermal delivery of heparin and low-molecular weight heparin using low-frequency ultrasound. Pharm Res 2001;18:1151-6.

Nino M, Calabro G, Santoianni P. Topical delivery of active principles: the field of dermatological research. Dermatol Online J 2010;16:4.

Novak J. Experimental transmission of lidocaïne through intact skin by ultrasound. Arch Phys Med 1964;45:231-2.

Park EJ, Dodds J, Smith NB. Dose comparison of ultrasonic transdermal insulin delivery to subcutaneous insulin injection. Int J Nanomedicine 2008;3:335-41.

Park EJ, Werner J, Smith NB. Ultrasound mediated transdermal insulin delivery in pigs using a lightweight transducer. Pharm Res 2007;24:1396-401.

Rao R, Nanda S. Sonophoresis: recent advancements and future trends. J Pharm Pharmacol 2009;61:689-705.

Santoianni P, Nino M, Calabro G. Intradermal drug delivery by low frequency sonophoresis (25 KHz). Dermatol Online J 2004;10:24.

Simonin JP. On the mechanisms of in vitro and in vivo phonophoresis. J Control Release 1995;33:125-41.

Singer AJ, Homan CS, Church AL, McClain SA. Low-frequency sonophoresis: pathologic and thermal effects in dogs. Acad Emerg Med 1998;5:35-40.

Skarbek-Borowska S, Becker BM, Lovgren K, Bates A, Minugh PA. Brief focal ultrasound with topical anesthetic decreases the pain of intravenous placement in children. Pediatr Emerg Care 2006;22:339-45.

Smith NB. Perspectives on transdermal ultrasound mediated drug delivery. Int J Nanomedicine 2007;2:585-94.

Smith NB, Lee S, Maione E, Roy RB, McElligott S, Shung KK. Ultrasound-mediated transdermal transport of insulin in vitro through human skin using novel transducer designs. Ultrasound Med Biol 2003;29:311-7.

Smith NB, Lee S, Shung KK. Ultrasound-mediated transdermal in vivo transport of insulin with low-profile cymbal arrays. Ultrasound Med Biol 2003;29:1205-10.

Tachibana K, Tachibana S. Transdermal delivery of insulin by ultrasonic vibration. J Pharm Pharmacol 1991;43:270-1.

Tang H, Wang CC, Blankschtein D, Langer R. An investigation of the role of cavitation in low-frequency ultrasound-mediated transdermal drug transport. Pharm Res 2002;19:1160-9.

Täuber U. Dermocorticosteroids. Structure, activity, pharmacokinetics. Eur J Dermatol 1994;4:419-29.

Tezel A, Paliwal S, Shen Z, Mitragotri S. Low-frequency ultrasound as a transcutaneous immunization adjuvant. Vaccine 2005;23:3800-7.

Tezel A, Sens A, Mitragotri S. Investigations of the role of cavitation in low-frequency sonophoresis using acoustic spectroscopy. J Pharm Sci 2002;91:444-53.

Van den Kerckhove E, Staes F, Flour M, Stappaerts K, Boeckx W. Reproducibility of repeated measurements on healthy skin with Minolta Chromameter CR-300. Skin Res Technol 2001;7:56-9.

Weimann LJ, Wu J. Transdermal delivery of poly-l-lysine by sonomacroporation. Ultrasound Med Biol 2002;28:1173-80.

Yamashita N, Tachibana K, Ogawa K, Tsujita N, Tomita A. Scanning electron microscopic evaluation of the skin surface after ultrasound exposure. Anat Record 1997;247:455-61.

Zderic V, Vaezy S, Martin RW, Clark J. Ocular drug delivery using 20-kHz ultrasound. Ultrasound Med Biol 2002;28:823-9.

**Annabel MARUANI**

# Applications de la sonophorèse basse fréquence à l'humain *in vivo*


## Résumé

**Introduction.** Les ultrasons (US) basse fréquence appliqués sur la peau pour en augmenter la perméabilité (sonophorèse) peuvent promouvoir le passage transcutané de molécules *in vitro* et *in vivo* chez l'animal. L'objectif de ce travail a été d'appliquer la sonophorèse à l'homme *in vivo*.

**Méthodes.** Trois essais cliniques randomisés ont été menés chez le volontaire sain : l'essai (1) évaluant la tolérance des US à différentes intensités *versus* placebo ; l'essai (2) évaluant la pénétration transcutanée de l'histamine après sonophorèse ; l'essai (3) comparant l'effet vasoconstricteur d'un dermocorticoïde sans et après sonophorèse. Les US étaient délivrés en mode pulsé, avec une sonde de 36 kHz, durant 5 minutes, à des intensités de 1,57 à 3,50 $W/cm^2$.

**Résultats.** Dans l'essai (1), aucune toxicité (douleur > 40/100 ou nécrose) n'a été observée chez les 34 sujets inclus. Les effets secondaires étaient un érythème, et des acouphènes régressifs dès l'arrêt des US. Dans l'essai (2), l'histamine a induit une papule chez 9/10 sujets, uniquement sur les zones préalablement traitées par US. Dans l'essai (3), sur les 15 sujets, la vasoconstriction induite par le dermocorticoïde était significativement plus importante sur les zones traitées par US, surtout avec une occlusion longue (2h).

**Conclusions.** Ces essais démontrent qu'avec des intensités ultrasonores bien tolérées chez l'homme, la sonophorèse est efficace pour faire pénétrer l'histamine et améliorer l'efficacité des dermocorticoïdes.


Mots-clés : ultrasons ; sonophorèse ; essai clinique ; toxicité ; histamine ; dermocorticoïdes.


## Résumé en anglais

**Introduction.** Low-frequency ultrasound (US) applied on skin, called sonophoresis, have been investigated to enhance the transdermal transport of various drugs *in vitro* and *in vivo* in animals. We aimed to investigate low-frequency sonophoresis *in vivo* in humans.

**Methods.** Three randomized clinical trials have been conducted in healthy subjects: trial (1) aimed to assess skin toxicity of sonophoresis at different intensity levels compared to placebo; trial (2) aimed to investigate the transdermal penetration of histamine with sonophoresis; trial (3) aimed to investigate the clinical efficiency of sonophoresis in enhancing transdermal penetration of topical steroids in human skin. US were applied in pulsed mode for 5 minutes, with a 36 kHz device. US intensities ranged from 1.57 to 3.50 $W/cm^2$.

**Results.** In trial (1), no toxicity, defined as a pain score > 40/100 or necrosis, was reported. The most frequent adverse events were erythema, and tinnitus, which ceased on discontinuation of US. In trial (2), arm zones without US showed no papules, whereas 9/10 subjects receiving US showed papules. In trial (3), including 15 subjects, vasoconstriction was significantly higher with the topical steroid applied after US than without US, especially in the zone with 2-h occlusion.

**Conclusions.** These clinical trials provide favourable exploratory results regarding tolerance of low-frequency sonophoresis on human skin *in vivo*. They confirm that sonophoresis enhances transdermal penetration of histamine and increases the efficiency of topical steroids.


Keywords: ultrasound; sonophoresis; clinical trial; toxicity; histamine; topical steroids.