

## **L** a thérapie génique du cancer : désir mythique ou réalité thérapeutique de demain ?

Ces dernières années, de nombreuses publications fondées sur des modèles expérimentaux, essentiellement murins, ont démontré la possibilité d'éliminer des tumeurs transplantables ou d'en prévenir la récurrence par transfert de gènes, préfigurant ainsi la possibilité de traitement chez l'homme. Mais la difficulté de confirmer ces observations par des essais cliniques, parfois hâtivement réalisés, nous a fait passer de l'espoir proche de voir cette thérapie innovante appliquée au traitement de malades atteints de cancers à un certain scepticisme devant la difficulté d'obtenir des résultats objectifs.

Trois approches principales, fondées sur une meilleure compréhension des mécanismes cellulaires ou moléculaires de l'oncogenèse, représentent la base des applications potentielles en cancérologie.

- L'immunothérapie, ou immunomodulation, par laquelle on tente de rendre une cellule tumorale sensible à l'effet d'effecteurs cytotoxiques ou à d'autres cellules immunocompétentes qui seraient aussi capables, secondairement, de prévenir récurrences et métastases [1, 2].

- L'utilisation de gènes de sensibilité à des médicaments spontanément non toxiques, capables, après transformation par une enzyme spécifique, de développer une toxicité restreinte aux cellules exprimant la protéine codée par le transgène [3]. Parmi ces gènes, désignés par certains « gènes suicides » (ce qui est un abus de langage car la cellule est « empoisonnée » plus qu'elle ne se suicide), le plus connu est celui de la thymidine kinase du virus *Herpes simplex* (HSV-*tk*) qui peut métaboliser

des dérivés de l'aciclovir (ganciclovir) en composés triphosphatés capables d'inhiber la prolifération cellulaire [4].

- L'utilisation d'anti-oncogènes [5] comme le gène codant pour p53, le gène associé au rétinoblastome (*RB*) ou *p21* dont les produits protéiques normaux seraient capables de compenser les effets oncogéniques secondaires à leur inactivation par délétions ou mutations ponctuelles. On peut associer à cette approche l'utilisation d'oligonucléotides ou de constructions antisens capables d'inhiber l'activité d'un oncogène (*K-RAS* muté, par exemple) ou d'un gène de fusion (*BCR-ABL*, par exemple).

Outre ces approches destinées à cibler les cellules tumorales, d'autres cherchent à modifier le comportement des cellules normales possiblement impliquées dans les réponses cellulaires antitumorales. Ainsi, historiquement, les premiers essais de thérapie génique ont cherché à « armer » des lymphocytes dans le but de les rendre plus agressifs et spécifiques vis-à-vis des tumeurs [2, 6]. Le gène transféré *ex vivo* était celui codant pour l'IL2, capable d'activer lymphocytes et cellules NK (*natural killers*). Dans certains cas, on a même tenté de modifier génétiquement les lymphocytes (ou cellules NK) isolés de la tumeur du malade (TIL, *tumor infiltrating lymphocytes*), activés et amplifiés *ex vivo* après intégration du gène d'intérêt, et secondairement réinjectés au malade. Malgré la complexité de cette approche, plusieurs essais cliniques ont été tentés avec des lymphocytes activés ayant intégré et exprimant le gène codant pour l'IL2 ou le TNF $\alpha$  [7], mais les résultats

thérapeutiques ont été plutôt décevants.

La manipulation génétique des cellules du tissu hématopoïétique, et principalement les progéniteurs, a été effectuée avec deux objectifs principaux.

1. Le premier est le marquage de cellules hématopoïétiques permettant de suivre la reconstitution après greffe de moelle ou, plus récemment, de cellules souches du sang périphérique [8-10]. Cela a permis de démontrer que l'intégration du transgène pouvait être retrouvée dans les cellules du greffon plusieurs mois après la greffe et, dans certains cas de neuroblastomes ou de leucémies, que des cellules du greffon pouvaient participer à la rechute [8].

2. Le deuxième objectif est de rendre ces cellules plus résistantes à l'effet cytotoxique des médicaments chimiothérapeutiques et de leur donner ainsi un avantage sélectif par rapport aux cellules tumorales : cela peut être obtenu par transfert de gènes de résistance à ces médicaments, dont la dénomination commune est *alkylating resistance gene* (AK) [11] et dont le gène le plus utilisé est le gène *MDR* (*multidrug resistance*) [12, 13] ou le gène AK.

On perçoit, mais cela n'est pas propre à la thérapie génique du cancer, le nombre de difficultés à surmonter : par exemple, le ciblage spécifique des cellules à modifier, la nécessité de mettre au point des systèmes de transfert, vecteurs viraux ou synthétiques et, enfin, la difficulté de maintenir l'expression à long terme et de contrôler l'expression du gène dans les cellules ou tissus manipulés. De nombreuses publications récentes et de nombreuses réunions montrent

que ces problèmes sont abordés progressivement et les résultats expérimentaux obtenus *in vitro* et *in vivo* chez l'animal commencent à préciser les mécanismes par lesquels ils sont obtenus.

### Des protocoles cliniques en cours

Malgré ces difficultés, plus de 600 malades ont reçu à ce jour des cellules génétiquement manipulées. Dans la majorité des cas, il s'agit de cellules tumorales autologues exprimant des gènes de cytokines ou d'antigènes susceptibles d'activer une réponse cellulaire antitumorale, de gènes marqueurs ou de gènes de résistance à des produits de chimiothérapie. Dans d'autres cas, ces mêmes gènes, ou d'autres tels que les gènes suicides, les anti-oncogènes ou les préparations antisens spécifiques d'un oncogène activé (K-RAS), ont été administrés directement *in vivo* dans des tumeurs. Dans d'autres cas, enfin, les cellules hématopoïétiques ont été utilisées en tant que cellules génétiquement manipulées par insertion du gène *MDR-1* ou en vue de les rendre résistantes à la chimiothérapie. Le taux de réponse clinique reste faible puisque une démonstration de l'efficacité n'a pu être démontrée que dans quelques cas, et le plus souvent de façon temporaire.

### Pourquoi une rencontre sur la thérapie génique des cancers ?

C'est pourquoi, on pouvait se demander si la 4<sup>e</sup> Conférence internationale « *Cancer Gene Therapy* » organisée par R. Sobol et I. Royston à San Diego (CA, USA) pouvait apporter de nouvelles informations alors que tant de réunions, concernant la thérapie génique, ont été organisées ces derniers temps. Cependant, il était intéressant de voir la réaction des équipes de recherches académiques ou industrielles devant le pessimisme à la fois clinique et scientifique de ce que l'on a peut-être appelé trop tôt la thérapie génique du cancer. Ce congrès a répondu en partie à ces questions de façon positive et, pour la majorité des présentations,

de manière honnête sans optimisme délirant. Une part importante a été faite à la recherche fondamentale et technologique et aux étapes précliniques, incluant des modèles expérimentaux *in vitro* et *in vivo* chez l'animal. Les bonnes questions ont été posées, comme la rationalité des approches, la pertinence des modèles animaux ou des tests *in vitro*, le ciblage des cellules tumorales en relation avec les vecteurs, l'expression du transgène dans les tissus ou cellules ciblées et la nature des gènes à remplacer ou à inhiber.

### Vaccination antitumorale et thérapie génique

Le programme a débuté de façon classique avec, en première session, les approches d'immunothérapie utilisant essentiellement le transfert de gènes codant pour des cytokines (IL2, IL7, GM-CSF, IL4 ou IL12) dans des cellules tumorales autologues, modifiées *ex vivo* et réinjectées en vue de développer une réponse immune antitumorale. Les résultats cliniques sont d'autant plus décevants que ces équipes démontrent le plus souvent la possibilité d'engendrer *in vitro* des effecteurs cytotoxiques relativement spécifiques (Gansbacher, New York; Economou, Los Angeles, CA; Simons, Baltimore, MD; Zitvogel, Pittsburgh, PA, USA; Parmiani, Milan, Italie). Les équipes de Vical (San Diego, CA, USA) ont exposé la possibilité de produire des complexes plasmides-lipofectine en vue de transférer dans des cellules tumorales un gène codant pour l'IL2 ou l'association HLA-7/antigène d'activation B7 (Fatzaneh, Londres, GB). Cependant, un essai thérapeutique pratiqué chez 15 malades à l'université d'Arizona (Hersh) n'a pas permis de démontrer un effet important, bien qu'une réponse de type CTL ait été démontrée *in vitro*. Le groupe du *Wistar Institute* a tenté de faire exprimer l'antigène CO17 qui correspond à une molécule d'adhérence fortement exprimée dans les cancers du côlon en vue d'induire une réponse antitumorale, et un essai clinique est en préparation dans le

groupe de J. Wilson (Philadelphie, PA, USA).

On peut d'ailleurs se demander, de manière plus générale, si la possibilité de développer une réponse immunitaire spécifique de tumeur existe réellement chez l'homme en situation autologue, mais cela n'est qu'une réflexion personnelle qui n'est certainement pas partagée par les équipes embarquées dans cette direction. En revanche, l'immunisation intracellulaire, concept suggéré par D. Baltimore en 1988 [15], commence à avoir une certaine réalité. L'équipe de l'université d'Alabama, qui a mis en place un programme ambitieux de thérapie génique, a montré l'intérêt d'une construction *single chain antibody* exprimant une chaîne spécifique de *Erb-B2* [16] et introduit par un vecteur adénoviral dans différentes tumeurs ovariennes transplantées chez des souris *nude*. En effet, la surexpression de ce récepteur a été détectée dans des formes graves de cancer du sein.

### Anti-oncogènes : l'approche rationnelle

Les sessions consacrées à l'utilisation du transfert d'anti-oncogènes, d'inhibiteurs d'oncogènes ou de leurs produits, furent, d'un point de vue scientifique, les plus intéressantes. L'effet du transfert, essentiellement par des vecteurs adénoviraux, de la forme normale de *p53*, ou *RB* dans des lignées ou des tumeurs présentant des mutations ou délétions, a été particulièrement étudié par les équipes de Houston (TX, USA) (Roth et Benedict), de Canji à San Diego (CA, USA) (Smith), et de Duarte (Scanon, City of Hope, CA, USA). Ces équipes ont, par exemple, démontré que le transfert du gène *p53* ou *RB* inhibe spécifiquement la prolifération des lignées ou des tumeurs présentant des mutations inactivant *p53* ou *Rb*. La transduction et l'expression d'une forme normale de *p53* peuvent aussi inhiber la prolifération de lignées humaines dérivées de cancer du col associé à HPV (*human papilloma virus*) [17]. Une des protéines oncogéniques du virus, E6, est en effet capable de se lier à *p53*, et

d'être ainsi inactivée par le produit de cet anti-oncogène dont l'expression induira une apoptose des cellules tumorales, comme cela a été observé *ex vivo* et après transplantation chez des souris immunodéficientes.

Les groupes de Canji (San Diego, CA, USA) ont montré qu'une forme tronquée de Rb (p56) avait une activité de contrôle du cycle cellulaire des cellules tumorales identique, sinon supérieure, à la forme complète, notamment dans un modèle d'hépatocarcinome de rat. H.J. Xu (M.D. Anderson, Houston, TX, USA) a présenté le même type de résultats, en utilisant la partie N-terminale modifiée du gène *RB*. *H-Nuc* (*CDC27*) est un gène potentiellement suppresseur des tumeurs du sein, localisé en 17q 21-22, c'est-à-dire proche du gène *BRCA1* de susceptibilité au cancer du sein (*m/s n° 11, vol. 10, p. 1172*). Cette protéine est aussi capable de se lier à la forme phosphorylée de Rb et de participer ainsi à la régulation du cycle cellulaire. L'injection intratumorale chez des souris *nude* de vecteurs adénoviraux contenant le gène *H-Nuc* sous le contrôle du promoteur-*enhancer* du cytomégalo-virus (CMV) induit une diminution significative de la taille des tumeurs. Dans le même domaine, le transfert du gène *WAF/CIP1* (p21) par un vecteur adénoviral a été testé par l'équipe de J. Roth (Houston) dans une série de lignées de cancer du poumon non à petites cellules, porteuses de délétions ou mutations de p53 et les résultats ont été comparés à ceux obtenus sur des lignées synthétisant une p53 normale. En effet, p21<sup>WAF/CIP1</sup> induit par p53 est un puissant inhibiteur des kinases dépendantes des cyclines [19]. L'effet inhibiteur de prolifération de ce gène suppresseur de tumeur est surtout démontré dans les lignées sans p53 ou possédant une p53 mutée, mais est aussi observé dans des lignées tumorales sans mutations. Ces résultats sont aussi confirmés par le groupe de W. Park (Séoul, Corée-du-Sud) en utilisant des lignées de cancer de l'ovaire. Les produits d'autres anti-onco-

gènes potentiels comme *gelsolin* [18] et la protéine p16 seraient capables, eux aussi, d'exercer le même effet inhibiteur sur la prolifération, dans ce dernier cas en augmentant l'adhérence des cellules tumorales et en diminuant ainsi leur pouvoir métastatique.

L'utilisation de préparations d'antisens contre les formes mutées de *K-RAS* [20] ou de ribozymes spécifiques d'une séquence oncogénique (*BCR-ABL*, *K-RAS*) est efficace à condition que le gène codant pour le nucléotide antisens soit introduit par un vecteur rétro- ou adénoviral. Dans ces conditions, des inhibitions spécifiques sont observées sur des lignées ou des tumeurs exprimant le génome de HPV-18, synthétisant des versions mutées de *K-Ras* ou surexprimant *TGF $\alpha$*  (*tumor growth factor*).

#### **Efficacité du transfert de gènes**

Les vecteurs utilisés sont soit des vecteurs rétroviraux, soit des vecteurs adénoviraux dans lesquels le gène d'intérêt est généralement placé sous le contrôle du promoteur-*enhancer* dérivé du CMV. Les vecteurs adénoviraux semblent avoir une efficacité de transfert supérieure dans les cellules tumorales, surtout *in vivo*, bien observée dans des modèles animaux comme les hépato-carcinomes du rat (Maneval, Canji). En revanche, les vecteurs rétroviraux restent très efficaces pour la transduction des lignées tumorales *ex vivo*. La destruction des cellules tumorales résulte, avant tout, d'un mécanisme apoptotique, comme le démontre l'utilisation de la méthode TUNEL dont le principe est le marquage *in situ* des extrémités libres d'ADN par addition d'UTP-biotine à l'aide de *terminal-transferase*.

#### **Gènes de résistances ou de sensibilité aux agents chimiothérapiques**

L'intérêt potentiel des gènes de résistances à certains agents utilisés en chimiothérapie (*MDR*), des gènes de sensibilité à certains médicaments comme le ganciclovir (*HSV-tk*), la 5-fluoro-cytosine (5-FC), métabolisée

par la cytosine désaminase en 5-fluoro-uracile (5-FU) (toxique), la 6-thioxanthine, métabolisée en composé monophosphate toxique par l'enzyme xanthine-guanine phosphoribosyl transférase (XGPRT), a été longuement rapporté et discuté par plusieurs groupes. L'intérêt, par exemple, du gène *MDR* serait peut-être plus de permettre une sélection *in vivo* des cellules exprimant *MDR* que de véritablement conférer une résistance aux chimiothérapies. Ce gène peut aussi être utilisé comme gène marqueur puisqu'il code pour une protéine de surface qui peut être reconnue par des anticorps, ce qui permet une sélection positive des cellules transduites. (M. Gottesman, Bethesda, MD, USA). La crainte d'introduire un gène de résistance dans des cellules tumorales pourrait être abrogée par l'inclusion, dans la construction rétrovirale, d'un gène conservant la sensibilité spécifique à un médicament, comme le ganciclovir (gène *HSV-tk*).

Malgré quelques résultats *in vivo* impressionnants chez l'animal et l'homme, le gène suicide *HSV-tk* a fait l'objet de longues discussions concernant notamment la réalité de l'effet *bystander* [21], souvent difficile à mettre en évidence dans des tumeurs *in vivo*. Ces gènes peuvent aussi entraîner une sensibilité accrue à la radiothérapie et plusieurs communications ont montré cet effet *in vivo* dans des modèles animaux.

#### **Transfert de gènes dans les cellules du tissu hématopoïétique**

La discussion sur le transfert de gène dans les cellules hématopoïétiques a permis de remettre les pendules à l'heure, personne ne prétendant être capable de transduire facilement des progéniteurs très primitifs capables de régénérer l'ensemble des lignées hématopoïétiques ou des cellules différenciées comme les lymphocytes. Lorsque ces équipes utilisent des techniques pouvant être comparées entre elles, il existe un consensus autour du vecteur rétroviral, à ce jour le plus performant pour ce type de tissu, et de l'importance d'un stroma lorsqu'il s'agit

d'infecter *in vitro* des progéniteurs primitifs (Deisseiroth et Anderson, Houston). Notre équipe (Mannoni, Marseille) a clairement démontré qu'il est possible de transduire par coculture des progéniteurs relativement primitifs identifiés par l'expression des antigènes CD34 Thy1 + (*voir mini-synthèse, p. 60 de ce numéro*), mais avec une efficacité qui reste à améliorer. Des résultats à peu près identiques pourraient être obtenus en utilisant des lignées d'encapsidation produisant, de façon transitoire [22], des quantités élevées de vecteurs rétroviraux. L'utilisation de vecteurs pseudotypes, c'est-à-dire exprimant une enveloppe différente du virus Moloney (VSV, *vesicular stomatitis virus* [23], par exemple) ne semble pas entraîner de résultats exceptionnels (Kerr, Systémix, Palo Alto, CA, USA). L'intégration rétrovirale du gène *HSV-tk* dans des lymphocytes humains en vue de contrôler des réactions du greffon contre l'hôte chez des patients recevant des cellules souches allogéniques et des lymphocytes du même donneur a longuement été discuté par Bordignon (Milan, Italie) [24, 25].

### Les outils du transfert de gènes : virus ou produits de synthèse ?

Une session animée par Curiel (University of Alabama) et Benedict (Houston) a fait le point sur les avancées de la «vectorologie» et du ciblage potentiel *in vivo*. Le groupe de Curiel a rapporté des résultats très intéressants sur la possibilité de modifier le tropisme des adénovirus en jouant sur des facteurs pouvant modifier les interactions enveloppe-ligand du virus, et sur celle de dissocier la liaison du virus de ses capacités de délivrer l'information génétique après lyse de l'endosome [26].

Trois stratégies sont proposées : (1) modification génétique de l'enveloppe, en réalisant des gènes de fusion avec le gène de la protéine de fibre ; (2) modification immunologique, à l'aide d'anticorps anti-protéine de fibre ; (3) modification chimique, avec biotinylation de la membrane des adénovirus et reconnaissance par un système streptavi-

dine afin de suivre la liaison et le routage intracellulaire.

Le développement de nouvelles lignées d'encapsidation pour les adénovirus et des nouveaux vecteurs délétés dans les régions E3 ou E4 a été abordé. Ces délétions aboutissent à des vecteurs moins immunogéniques et moins cytopathiques pour les cellules normales que les vecteurs de première génération, uniquement délétés dans la région E1. Le groupe de Curiel a également construit un vecteur fondé sur le virus de la vaccine et exprimant l'antigène carcino-embryonnaire (CEA) souvent surexprimé dans des cancers épithéliaux.

Les vecteurs rétroviraux sont toujours les plus performants pour infecter et intégrer le transgène dans l'ADN génomique de cellules en division. L'intérêt de doubles séquences IRES (*internal ribosomal entry sites*), insérées entre plusieurs gènes dans des vecteurs rétroviraux, est de permettre la synthèse de messagers polycistroniques, c'est-à-dire la traduction en plusieurs protéines [27]. Des vecteurs capables de diriger l'accumulation de transcrits tricistroniques, traduits en molécules B7 ou IL2, MDR et HSV-tk, ont ainsi été développés. Malgré la présence des séquences IRES, la transcription du gène situé en 5' est généralement supérieure à celle du gène situé en 3'. Il apparaît, en revanche, toujours aussi difficile de combiner l'expression coordonnée de gènes sous le contrôle à la fois du LTR rétroviral et d'un promoteur interne, même lorsqu'ils sont disposés en sens inverse. Le problème des promoteurs inductibles ou spécifiques de tissus a été discuté mais reste encore mal maîtrisé. De même, des modifications de l'enveloppe sont envisagées en vue de rendre les vecteurs rétroviraux plus résistants à la lyse par le complément humain.

L'équipe de French Anderson (Los Angeles) a décidé d'étudier la structure tri-dimensionnelle de l'enveloppe des rétrovirus afin d'augmenter l'efficacité par mutagenèse et de permettre éventuellement le ciblage. De très belles images de synthèse de cette protéine de l'enveloppe (hélice

amphipathique) ont été montrées, associées à la détermination des fonctions potentielles des différentes régions, notamment à l'identification des séquences responsables de la liaison des rétrovirus à leurs récepteurs. L'association de polycations semble augmenter, dans certains cas, l'efficacité de l'infection par des vecteurs rétroviraux. Ainsi la lipofectine (DOPE-DOSPA) pourrait augmenter l'infection par les rétrovirus. Symétriquement, les adénovirus augmentent considérablement l'efficacité de la transfection d'ADN à l'aide de ces lipides cationiques. L'équipe de *Cell Genesis* (Finer, Foster city, CA, USA) aborde ce problème par l'utilisation de la lignée d'encapsidation *Puzycat* dérivée de cellules 293 et permettant l'obtention de titres viraux élevés ( $10^7$  à  $10^8$  particules viraux par ml).

Enfin, des communications ont abordé les problèmes, non résolus, de l'utilisation de vecteurs dérivés d'AAV (*adeno-associated virus*) (AIS, *Applied immunoScience*, Santa Clara, CA, USA) ou d'«amplicons» dérivés d'*Herpes simplex* [28].

### Conclusion

En conclusion est apparu, dans ce congrès, un certain retour vers les aspects scientifiques, les modèles pré-cliniques et une rigueur plus importante dans la proposition de nouveaux essais thérapeutiques. De ce point de vue, malgré la difficulté de la démonstration d'une efficacité réelle de la thérapie génique appliquée au cancer, l'innocuité de cette approche est confirmée. De plus, les mécanismes de certaines réponses objectives ont maintenant été précisés.

L'utilisation de vecteurs adénoviraux dans le cadre de tumeurs se développe puisqu'une expression transitoire mais élevée peut être intéressante dans le cas des cellules tumorales qu'il s'agit de faire disparaître. L'apoptose est retenue comme le facteur prédominant de l'élimination *in vivo* des tumeurs expérimentales.

Un point positif est aussi que ce qui était présenté n'était pas déjà publié du moins *in toto*.

Ce congrès, organisé dans l'hôtel *Del Coronado* où a été tourné le film culte

Certains l'aiment chaud avec l'omniprésence de la regrettée Marilyn Monroe, était aussi particulier en ce que la majorité des communications étaient présentées sous forme de posters, permettant ainsi de nombreuses discussions et la connaissance des recettes exactes de transfert de gènes ou de la structure des vecteurs. De nouvelles collaborations incluant l'échange de techniques et de matériel ont ainsi pu être amorcées.

Un autre point très agréable a été l'absence de discussions concernant les aspects réglementaires, confirmant ainsi la capacité des États-Unis de surmonter ces problèmes sans diminuer pour autant la créativité des équipes de recherche, qu'elles soient académiques ou industrielles. Enfin, l'absence de confusion entre thérapie génique et thérapie cellulaire a aussi été un facteur de clarification dont devrait bien s'inspirer le législateur français.

On peut regretter la faible participation française et, à l'inverse, être admiratif devant la montée en puissance des équipes japonaises et asiatiques. Le prochain congrès est prévu à San Diego en novembre 1996, les suivants étant organisés alternativement en Europe, au Japon et à San Diego ■

#### Remerciements

Je remercie C. Bagnis et P. Dubreuil pour la lecture et l'apport de leurs commentaires très appréciés dans l'écriture de cette *mini-synthèse*.

Les résumés de ce congrès sont publiés dans la revue *Cancer Gene Therapy* dont la diffusion et la qualité sont en constante amélioration.

#### Patrice Mannoni

Médecin des centres régionaux de lutte contre le cancer, Directeur du centre de thérapie génique. Institut Paoli-Calmettes, BP 156, 13273 Marseille Cedex 09, France.

#### TIRÉS À PART

P. Mannoni.

#### RÉFÉRENCES

- Pardoll D. New strategies for active immunotherapy with genetically engineered tumor cells. *Curr Opin Immunol* 1992; 4: 619-23.
- Rosenberg SA. Immunotherapy and gene therapy of cancer. *Cancer Res* 1991; 51: 5074s-9s.
- Harris JD, Guttierrez AA, Hurst HC, Sikora K, Lemoine NR. Gene therapy for cancer using tumour-specific prodrug activation. *Gene Ther* 1994; 1: 170-5.
- Culver KW, Blaese M. Gene therapy for cancer. *Trends Genet* 1994; 10: 174-8.
- Weinberg RA. Tumor suppressor genes. *Science* 1991; 254: 1138-46.
- Anderson WF. Human gene therapy. *Science* 1992; 256: 808-13.
- Rosenberg SA, et al. TNF/TIL human gene therapy clinical protocol. *Hum Gene Ther* 1990; 1: 443-62.
- Desseiroth AD, Zu Z, Claxton D, Hanania EG, Fu S, Ellerson D, et al. (23 auteurs). Genetic marking shows that Ph<sup>+</sup> cells present in autologous transplants of chronic myelogenous leukemia (CML) contribute to relapse after autologous bone marrow in CML. *Blood* 1994; 83: 3068-76.
- Brenner MK, Rill DR, Holladay MS, Heslop HE, Moen RC, Buschle M, Krance RA, Santana VM, Anderson WF, Ihle JN. Gene marking to determine whether autologous marrow infusion restores long-term haemopoiesis in cancer patients. *Lancet* 1993; 342: 1134-7.
- Dunbar CE, Cottler M, Fox JA, Shaughnessy O, Doren A, Carter C, Berenson R, Brown S, Moen RC, Greenblatt J, Stewart FM, Leitman SF, Wilson WH, Cowan K, Young NS, Nienhuis AW. Retrovirally marked CD34-enriched peripheral blood and bone marrow cells contribute to long-term engraftment after autologous transplantation. *Blood* 1995; 85: 3048-57.
- Gottesman MM, Germann UA, Aksentijevich I, Sugimoto Y, Cardarelli CO. Gene transfer of drug resistance genes. In: Huber BE, Lazo JS, eds. *Gene therapy for neoplastic diseases*. New York: Annals of the New York Academy of Sciences, 1994: 126-39.
- Hanania EG, Hegewisch Becker S, Korbling M, Hester J, Durett A, Andreeff M, Mechetner E, Holzmayer T, Roninson IB, Giles RE, Berenson R, Heimfeld S, Desseiroth AB. Chemotherapy resistance to taxol in clonogenic progenitor cells following transduction of CD34 selected marrow and peripheral blood cells with a retrovirus that contains the MDR-1 chemotherapy resistance gene. *Gene Ther* 1995; 2: 285-94.
- Lepage P, Gros P. La glycoprotéine P: de la résistance croisée aux médicaments au transport des lipides biliaires. *médecine/sciences* 1995; 11: 357-66.
- Bertolini F, De Monte L, Corsini C, Lazzari L, Lauri E, Soligo D, Ward M, Bank A, Malavasi F. Retrovirus-mediated transfer of the multidrug resistance gene into human haemopoietic progenitor cells. *Br J Haematol* 1994; 88: 318-24.
- Baltimore D. Gene therapy: intracellular immunization. *Nature* 1988; 335: 395-6.
- Deshane J, Loechel F, Conry RM, Siegal GP, King CR, Curiel DT. Intracellular single-chain antibody directed against erbB2 down-regulates cell surface erbB2 and exhibits a selective anti-proliferative effect in erbB2 overexpressing cancer cell lines. *Gene Ther* 1994; 1: 332-7.
- Shillitoe EJ, Kamath P. Papillomaviruses as targets for cancer gene therapy. *Cancer Gene Ther* 1994; 1: 193-204.
- Tanaka M, Mullauer L, Ogiso Y, Fujita H, Mriya S, Furuuchi K, Harabayashi T, Shinoara N, Koyanagi T, Kuzumaki N. Gelsolin: a candidate for suppressor of human bladder cancer. *Cancer Res* 1995; 55: 3228-33.
- Darbon J, Fesquet D, Cavadore J. De nouveaux régulateurs du cycle cellulaire: les protéines modulatrices des complexes Cdk-cyclines. *médecine/sciences* 1995; 11: 349-56.
- Bos JL. Ras genes in human cancer. *Cancer Res* 1989; 49: 4682-93.
- LiBi W, Parysek LM, Warnick R, Stambrook P. *In vitro* evidence that metabolic cooperation is responsible for the bystander effect observed with HSV tk retroviral gene therapy. *Hum Gene Ther* 1993; 4: 725-31.
- Finer MH, Dull DJ, Qin L, Farson D, Roberts MR. kat: a high-efficiency retroviral transduction system for human T lymphocytes. *Blood* 1994; 83: 43-50.
- Burns JC, Friedmann T, Driever W, Burrascano M, Yee JK. Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and non-mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 8033-7.
- Mavilio F, Ferrari G, Rossini S, Nobili N, Casorati G, Traversari C, Bordignon C. Peripheral blood lymphocytes as target cells of retroviral vector-mediated gene transfer. *Blood* 1994; 83: 1988-97.
- Tiberghien P, Reynolds CW, Keller J, Spence S, Deschaseaux M, Certoux JM, Contassot E, Murphy WJ, Lyons R, Chiang Y, Hervé P, Longo DL, Ruscetti FW. Ganciclovir treatment of Herpes Simplex thymidine kinase-transduced primary T lymphocytes: an approach for specific *in vivo* donor T-cell depletion after bone marrow transplantation. *Blood* 1994; 84: 1333-41.
- Kawahara N, Dozy AM, Kan YW. Tissue-specific targeting of retroviral vectors through ligand-receptor interactions. *Science* 1995; 266: 1373-6.
- Ghattas IR, Sanes JR, Majors JE. The encephalomyocarditis virus internal ribosome entry site allows efficient coexpression of two genes from a recombinant provirus in cultured cells and embryo. *Mol Cell Biol* 1991; 11: 5848-59.
- Epstein A. Les vecteurs herpétiques pour le transfert de gènes. *médecine/sciences* 1992; 8: 902-11.