

# Un nouveau traitement antitumoral : l'électrochimiothérapie

Stéphane Orlowski, Lluís M. Mir

L'électrochimiothérapie antitumorale est un traitement anticancéreux associant l'administration d'un médicament cytotoxique utilisé en chimiothérapie antitumorale et l'application locale, au niveau du site tumoral à traiter, d'impulsions électriques potentialisant les effets antitumoraux de ce médicament. Il s'agit d'un nouveau type de traitement local qui se caractérise par une grande efficacité alliée à une excellente tolérance. Les premiers essais cliniques de l'électrochimiothérapie (phases I et II) ont été effectués à l'Institut Gustave-Roussy (Villejuif) [1]. Une publication internationale rassemblant des résultats cliniques obtenus en France, aux États-Unis et en Slovénie vient de montrer l'intérêt potentiel de l'électrochimiothérapie comme nouvelle approche thérapeutique anticancéreuse [2].

## Bases théoriques : l'électroperméabilisation cellulaire *in vivo*

La plupart des médicaments cytotoxiques utilisés en chimiothérapie anticancéreuse exercent leur effet létal sur les cellules par interaction avec des cibles intracellulaires. Les membranes plasmiques des cellules tumorales à détruire représentent donc une barrière, plus ou moins importante, à l'effet thérapeutique de ces molécules. Pour augmenter leur efficacité, il a été essayé d'améliorer l'incorporation cellulaire de ces molécules en les «vectorisant», grâce à l'ajout de groupements chimiques hydrophobes, à l'encapsula-

tion dans des liposomes ou à l'adsorption dans des nanoparticules. Dans tous les cas, des difficultés techniques laissent encore ces méthodes à un stade de développement expérimental. Une autre approche consiste à modifier non pas les molécules actives mais les cellules cibles, par la perméabilisation de leur membrane plasmique. Parmi les nombreuses techniques décrites sur des cellules en culture, seule à l'heure actuelle l'électroperméabilisation est appliquée *in vivo*, permettant de réaliser une «électro-chimiothérapie» des tumeurs à traiter. Les caractéristiques bien particulières des impulsions électriques utilisées distinguent cette application de l'électricité en biologie et en médecine des divers procédés d'électrothérapie essayés avec plus ou moins de succès par le passé comme traitements antalgiques, cicatrisants ou anti-inflammatoires. En outre, l'électrochimiothérapie se caractérise par la bonne connaissance des mécanismes physico-chimiques et biologiques qui sont à la base de cette méthode.

L'électroperméabilisation *in vitro* de cellules en suspension est l'augmentation transitoire de la perméabilité de la membrane plasmique de ces cellules lorsqu'elles sont soumises à un champ électrique bref (quelques centaines de microsecondes ou quelques millisecondes) et intense (de l'ordre de 1000 V/cm), appliqué par deux électrodes en contact avec la suspension de cellules. Cette perméabilisation est due à une destruction localisée de la membrane cellulaire, obtenue pour un champ électrique d'intensité supérieure à

une valeur seuil qui dépend de la taille de la cellule. Cette valeur seuil correspond à un potentiel transmembranaire, induit par le champ électrique externe, nettement supérieur à la valeur en l'absence de champ appliqué [3]. La perméabilisation de la membrane plasmique ainsi obtenue est compatible avec la survie de la cellule car elle laisse intactes les organites intracellulaires; elle est réversible en quelques minutes. Une communication est établie entre l'intérieur de la cellule électroperméabilisée et le milieu extérieur qui peut être mise à profit pour modifier la composition du cytosol [3]. L'application des mêmes types d'impulsions électriques à un assemblage compact de cellules constituant un tissu tumoral produit aussi l'électroperméabilisation de ces cellules, ce qui constitue la base de l'électrochimiothérapie [4].

Une cellule électroperméabilisée en présence d'un médicament cytotoxique est ainsi plus sensible à ce médicament qu'une cellule intacte, et ce d'autant plus que le médicament considéré pénètre difficilement à l'intérieur de la cellule intacte [5]. Ainsi, une molécule qui est rapidement incorporée dans les cellules tumorales par diffusion passive au travers de la membrane plasmique, comme la doxorubicine, ou grâce à un transport facilité, comme le melphalan, présentera pratiquement la même activité cytotoxique avec ou sans électroperméabilisation des cellules. En revanche, la bléomycine est, parmi les médicaments utilisés en chimiothérapie antitumorale, le plus adapté pour tirer parti de l'électro-

perméabilisation des cellules cibles. En effet, cette molécule a la particularité d'avoir à la fois un très fort pouvoir cytotoxique lorsqu'elle est présente dans le cytosol d'une cellule et un très faible passage transmembranaire [6]. Dans ce cas, l'électroperméabilisation des cellules permet un passage direct des molécules de bléomycine dans le cytosol, d'où elles peuvent avoir accès au nucléosol et à la cible cellulaire, l'ADN, pour y induire des coupures létales avec une grande efficacité (quelques centaines de molécules de bléomycine suffisent pour tuer une cellule).

L'application d'impulsions électriques perméabilisantes à un volume tumoral dont les liquides interstitiels contiennent une concentration suffisante de bléomycine conduit ainsi à un puissant effet antitumoral local. Il est important de noter que le traitement électrique est bien supporté localement puisque l'intensité du champ électrique délivré est juste suffisante pour perméabiliser réversiblement les cellules sans provoquer de lésions irréversibles (brûlures, escarres...). Par ailleurs, la bléomycine n'est potentialisée que localement du fait que les impulsions électriques délivrées ne perméabilisent les cellules du volume tumoral traité que dans l'espace limité par les électrodes utilisées (nécessairement restreint à une taille de l'ordre de quelques centimètres du fait de la forte intensité de champ électrique requise). De plus, la bléomycine est administrée à une dose suffisamment faible pour être dénuée d'effets secondaires généraux, et pour permettre de ce fait la répétition du traitement, si nécessaire, sans craindre une toxicité cumulée.

### **Effets thérapeutiques : les résultats précliniques**

Les premières évaluations précliniques du potentiel thérapeutique de l'électrochimiothérapie ont été conduites sur des tumeurs expérimentales sous-cutanées implantées chez la souris. L'efficacité du traitement par électrochimiothérapie a pu être montrée sur différents types histologiques de tumeurs : sarcome, mélanome, et carcinome épider-

moïde d'origine humaine. Aucun effet antitumoral n'est induit ni par l'administration seule de faibles doses de bléomycine injectées par voie systémique, ni par l'application seule des impulsions électriques perméabilisantes au moyen d'électrodes externes recouvrant les tumeurs sous-cutanées. En revanche, l'association de ces deux composantes du traitement conduit à des régressions tumorales massives (jusqu'à 54% de guérisons) [7]. En outre, la comparaison des effets antitumoraux obtenus, soit avec les doses maximales admissibles de bléomycine seule, soit avec des faibles doses de bléomycine associées aux impulsions électriques, conduit à évaluer à environ 10 000 fois le facteur de potentialisation de ce médicament par l'électroperméabilisation des cellules tumorales. Ces résultats ont ensuite été confirmés et étendus par d'autres laboratoires à l'étranger [8, 9]. Des effets thérapeutiques comparables ont pu être observés également sur le rat, en utilisant des impulsions électriques perméabilisantes délivrées par deux aiguilles servant d'électrodes implantées de part et d'autre de la tumeur, pour traiter, soit un hépatocarcinome inoculé par voie sous-cutanée [10], soit un gliome malin implanté de manière stéréotaxique dans le cerveau [11].

Différentes variantes de la technique initiale ont par la suite été décrites, dans le but d'améliorer l'application clinique de l'électrochimiothérapie. L'efficacité serait meilleure lorsque les tumeurs sont traitées au cours de plusieurs séances successives ou lorsque l'application des impulsions électriques est répétée plusieurs fois en changeant la position des électrodes autour du site de la tumeur à traiter, de manière à optimiser le volume tumoral effectivement électroperméabilisé [12-14]. Par ailleurs, on a montré qu'injecter la bléomycine directement dans la tumeur traitée par électrochimiothérapie permettait de diminuer la dose utilisée pour un petit nodule tumoral, ou aussi de traiter plus commodément plusieurs petits nodules séparés [15]. Enfin, on peut également remplacer la bléomycine par le cisplatine, aussi bien pour une administration intra-

veineuse qu'intratumorale [16, 17]. Dans ce cas, la potentialisation du médicament par l'électroperméabilisation des cellules tumorales est moins importante, mais elle est compensée par un plus fort effet antitumoral du médicament seul, ce qui peut permettre d'appliquer les impulsions électriques en supplément à un protocole de chimiothérapie conventionnelle.

### **Les premiers essais cliniques : un traitement local complémentaire des indications classiques**

Chez l'homme, les premiers essais thérapeutiques de l'électrochimiothérapie ont utilisé des électrodes externes posées sur la peau en regard des nodules tumoraux sous-cutanés à traiter (*figure 1*). Le patient est traité en règle générale sous neuroleptanalgesie. L'application des impulsions électriques perméabilisantes sur les nodules est effectuée de façon séquentielle en déplaçant les électrodes sur toutes les zones à traiter pendant une période comprise entre 8 et 28 minutes après la perfusion rapide d'une dose de bléomycine (inférieure à celle qui est normalement administrée au cours d'un protocole de chimiothérapie classique). Chaque site tumoral est électroperméabilisé en quelques secondes, ce qui permet aisément de renouveler l'application des impulsions électriques, soit sur un même nodule tumoral d'une taille supérieure à l'écartement des électrodes, soit sur d'autres nodules voisins à traiter. Les impulsions électriques appliquées sont bien tolérées, aussi bien pendant le traitement (des contractions musculaires localisées, sans conséquences, sont observées pendant le passage du courant électrique) qu'après celui-ci (des traces de brûlures superficielles sont parfois provoquées aux points de contact des électrodes, mais elles disparaissent spontanément en quelques jours) [18]. Quel que soit le nombre d'applications des impulsions électriques, ainsi que le nombre de séances effectuées, on n'a observé aucun effet secondaire général, malgré le mauvais état de santé des

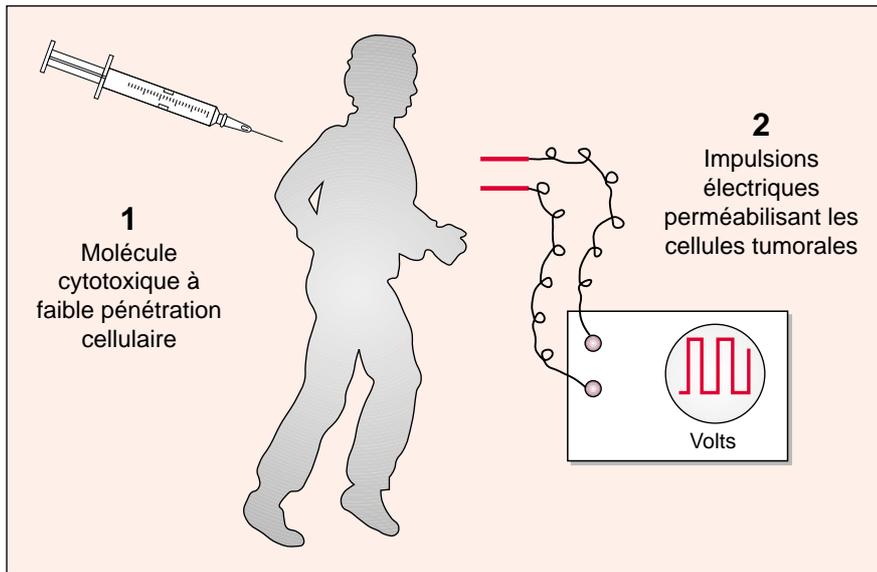


Figure 1. **Principe de l'électrochimiothérapie.** L'électrochimiothérapie est la combinaison d'une molécule anticancéreuse ayant une faible pénétration dans les cellules tumorales à détruire (1) avec des impulsions électriques perméabilisant ces cellules tumorales (2). Le médicament est administré par voie systémique ou intratumorale, à une dose inférieure à celle utilisée en chimiothérapie classique. Les impulsions électriques sont ensuite délivrées par des électrodes externes appliquées en regard d'une tumeur sous-cutanée, ou par des électrodes-aiguilles implantées dans la tumeur. Un générateur de tension alimente les électrodes, séparées de moins d'un centimètre, par des impulsions électriques carrées de forte intensité mais extrêmement brèves.

patients inclus dans les essais, tous en phase terminale de leur maladie [19]. En particulier, le traitement a une efficacité très satisfaisante sur les récurrences loco-régionales de carcinomes épidermoïdes de la sphère ORL résistantes aux traitements classiques: 57 % de régressions locales complètes parmi les nodules traités [18]. Des équipes étrangères ont rapidement confirmé ces résultats encourageants dès leurs premiers patients traités par électrochimiothérapie [20, 21]. Des essais cliniques ultérieurs ont montré que la bléomycine pouvait également être administrée par voie intra-artérielle [19] ou intratumorale [22]. Cette voie intratumorale a également été utilisée pour l'injection de cisplatine [23].

Les essais cliniques réalisés récemment dans cinq centres de lutte contre le cancer de trois pays différents ont permis d'étendre ces premiers résultats à divers types histologiques de nodules tumoraux

sous-cutanés: carcinomes épidermoïdes, mélanomes malins, carcinomes basocellulaires, et adénocarcinomes. Dans un article du *British Journal of Cancer*, les auteurs font état du traitement de 291 tumeurs chez 50 patients [2]. Les taux de réponses cliniques sont très satisfaisants, avec globalement 85 % de réponses objectives et 56 % de régressions locales complètes des nodules traités, réparties respectivement en 43 % pour les carcinomes épidermoïdes (87 traités), 53 % pour les mélanomes malins (142 traités), 75 % pour les carcinomes baso-cellulaires (32 traités), et 100 % pour les adénocarcinomes (30 traités). Le choix entre l'administration par voie intraveineuse ou intratumorale de la bléomycine repose sur des considérations pratiques selon la présentation de la tumeur à traiter, en particulier la taille et nombre des nodules. En outre, les nodules ont pu être efficacement traités indépendamment de

leur localisation (cou, poitrine, face, membre) et des précédents traitements locaux reçus par les patients (chirurgie ou radiothérapie).

Au total, l'électrochimiothérapie apparaît comme un traitement local complémentaire des autres thérapeutiques antitumorales locales. Elle se justifie par la nécessité, maintenant reconnue, de réduire autant que possible la masse de la tumeur primitive pour pouvoir espérer le succès d'une stratégie thérapeutique anticancéreuse prenant en compte la maladie au stade métastatique.

### Nouveaux développements: l'application intratumorale des impulsions électriques

Une adaptation réaliste de l'électrochimiothérapie aux situations cliniques nécessite de pouvoir traiter des tumeurs de grandes tailles, et surtout des tumeurs qui ne sont pas limitées à des localisations sous-cutanées. La plupart des tumeurs solides sont en effet incluses dans des tissus sains, soit de type parenchymateux, soit constituant des parois d'organes creux. L'utilisation d'électrodes planes, initialement destinées à encadrer des nodules tumoraux sous-cutanés saillants, est inadaptée pour le traitement convenable de volumes tumoraux « en profondeur ». Ces électrodes planes sont avantageusement remplacées par des électrodes constituées par des aiguilles multiples parallèles, équidistantes deux-à-deux, et directement implantées dans le tissu tumoral à électroperméabiliser, qui est ainsi divisé en petits volumes élémentaires traités séparément (suivant un concept rappelant la curiethérapie interstitielle). La tolérabilité de l'implantation de telles électrodes-aiguilles a été constatée en clinique sur des patients porteurs de mélanomes malins [22]. L'efficacité de cette nouvelle configuration d'électrodes a été démontrée en clinique vétérinaire pour le traitement de récurrences de fibrosarcomes chez le chat, qui constituaient des placards tumoraux sous-cutanés larges et

épais incompatibles avec l'utilisation d'électrodes externes, avec une augmentation de 0,8 mois à 6,1 mois de la survie moyenne des animaux traités [24]. Ces électrodes à aiguilles multiples ont également montré leur efficacité dans le traitement de tumeurs expérimentales implantées dans le parenchyme hépatique chez le rat, avec 69 % de réponses complètes pour des tumeurs limitées, entourées par les électrodes [25], et chez le lapin, avec 50 % de régressions locales complètes pour des tumeurs de tailles nécessitant plusieurs positionnements successifs des électrodes [26].

### **Perspectives : potentialisation des effets systémiques d'une immunothérapie**

L'importance des effets antitumoraux observés grâce à l'électrochimiothérapie ne peut cependant pas être uniquement attribuée à l'effet cytotoxique direct du médicament incorporé dans les cellules tumorales, car il a été montré qu'une petite fraction des cellules d'un tissu soumis à des impulsions électriques perméabilisantes n'étaient en fait pas perméabilisées et/ou ne recevaient pas assez de bléomycine. Ces cellules, qui échappent donc à l'action du médicament, devraient être responsables d'un échec du traitement, avec régression tumorale seulement partielle suivie d'une reprise rapide de la croissance tumorale. Or on obtient des régressions locales complètes et même des guérisons, ce qui oblige à faire intervenir un mécanisme additionnel pour rendre compte de l'efficacité du traitement: il s'agit de la mobilisation des mécanismes de défense immunitaire de l'organisme hôte de la tumeur. En effet, l'analyse histologique a montré que les sites tumoraux traités par électrochimiothérapie étaient le siège d'une infiltration de cellules de la réponse inflammatoire [26]. Cela est compatible avec l'observation de réponses antitumorales plus intenses chez les souris immunocompétentes que chez les souris immunodéprimées, que l'immunodépression soit constitutive (souris *nude*) [6] ou induite par

injection d'anticorps dirigés contre les lymphocytes T [27]. Ces résultats ont fourni les bases rationnelles pour l'association à l'électrochimiothérapie d'une immunothérapie utilisant l'interleukine-2, connue pour stimuler les défenses immunitaires de l'hôte impliquées dans la destruction de cellules tumorales. Une telle association a donné des résultats précliniques prometteurs puisque elle conduit à la fois à une augmentation sensible des effets antitumoraux locaux au niveau de la tumeur traitée par l'électrochimiothérapie [27], et à des effets antitumoraux systémiques, avec régression de tumeurs constituées à distance de la tumeur traitée [28] et diminution du nombre des métastases observées [26]. L'ensemble de ces observations encourage à tester en clinique humaine l'efficacité de l'électrochimiothérapie sur des tumeurs internes en utilisant des électrodes à aiguilles multiples, et en l'associant à une immunothérapie à base d'interleukine-2.

L'électrochimiothérapie est donc un nouveau traitement antitumoral qui repose sur des bases théoriques biologiques et pharmacologiques bien définies. Ce traitement a montré de grandes potentialités grâce à divers essais précliniques, et il a déjà permis d'obtenir des résultats très prometteurs au cours d'essais cliniques réalisés par différentes équipes en France et dans le monde. Il est nécessaire maintenant de multiplier ces essais cliniques pour préciser sa place parmi les armes thérapeutiques de l'arsenal de la lutte contre le cancer ■

#### **Remerciements**

Nous remercions nos collègues de l'Institut Gustave-Roussy, en particulier le Dr C. Domenge et le Pr B. Luboinski du Département de carcinologie cervicofaciale, et le Dr J. Belehradec, ainsi que tous les co-auteurs de l'article publié dans le *British Journal of Cancer* rapportant les essais cliniques effectués en France, en Slovénie et aux États-Unis.

#### **TIRÉS À PART**

S. Orłowski.

#### **Stéphane Orłowski**

*Section de biophysique des protéines et des Membranes, Département de biologie cellulaire et moléculaire, DSV/CEA, Centre d'études de Saclay, 91191 Gif/Yvette Cedex, France.*

#### **Lluís M. Mir**

*Laboratoire de physicochimie et de pharmacologie des macromolécules biologiques, UMR 1772 Cnrs, Institut Gustave-Roussy, 94805 Villejuif Cedex, France.*

#### **RÉFÉRENCES**

1. Mir LM, Belehradec M, Domenge C, Orłowski S, Poddevin B, Belehradec J Jr, Schwaab G, Luboinski B, Paoletti C. L'électrochimiothérapie, un nouveau traitement antitumoral: premier essai clinique. *CR Acad Sci Paris Ser III* 1991; 313: 613-8.
2. Mir LM, Glass LF, Sersa G, Teissié J, Domenge C, Miklavcic D, Jaroszeski MJ, Orłowski S, Reintgen DS, Rudolf Z, Belehradec M, Gilbert R, Rols MP, Belehradec J Jr, Bachaud JM, DeConti R, Stabuc B, Cemazar M, Coninx P, Heller R. Effective treatment of cutaneous and subcutaneous malignant tumors by electrochemotherapy. *Br J Cancer* 1998; 77: 2336-42.
3. Orłowski S, Mir LM. Cell electropermeabilization: a new tool for biochemical and pharmacological studies. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1154: 51-63.
4. Belehradec J Jr, Orłowski S, Ramirez LH, Pron G, Poddevin B, Mir LM. Electropermeabilization of cells in tissues assessed by the qualitative and quantitative electroloading of bleomycin. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1190: 155-63.
5. Orłowski S, Belehradec J Jr, Paoletti C, Mir LM. Transient electropermeabilization of cells in culture: increase of the cytotoxicity of anticancer drugs. *Biochem Pharmacol* 1988; 37: 4727-33.
6. Poddevin B, Orłowski S, Belehradec J Jr, Mir LM. Very high cytotoxicity of bleomycin introduced into the cytosol of cells in culture. *Biochem Pharmacol* 1991; 42 (suppl): 67-75.
7. Mir LM, Orłowski S, Belehradec J Jr, Paoletti C. Electrochemotherapy: potentiation of antitumor effect of bleomycin by local electric pulses. *Eur J Cancer* 1991; 27: 68-72.
8. Sersa G, Cemazar M, Miklavcic D, Mir LM. Electrochemotherapy: variable antitumor effect on different tumor models. *Bioelectrochem Bioenerg* 1994; 35: 23-7.

RÉFÉRENCES

9. Heller R, Jaroszeski M, Leo-Messina J, Perrit R, Van Voorhis N, Reintgen D, Gilbert R. Treatment of B16 mouse melanoma with the combination of electroporation and chemotherapy. *Bioelectrochem Bioenerg* 1995; 36: 83-7.
10. Okino M, Tomie H, Kanesada H, Marumoto M, Esato K, Suzuki H. Optimal electric conditions in electrical impulse chemotherapy. *Jpn J Cancer Res* 1992; 83: 1095-101.
11. Salford LG, Persson BRR, Brun A, Ceberg CP, Kongstad PC, Mir LM. A new brain tumour therapy combining bleomycin with *in vivo* electroporation. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 194: 938-43.
12. Belehradec J Jr, Orlowski S, Poddevin B, Paoletti C, Mir LM. Electrochemotherapy of spontaneous mammary tumours in mice. *Eur J Cancer* 1991; 27: 73-6.
13. Jaroszeski MJ, Gilbert R, Perrott R, Heller R. Enhanced effects of multiple treatment electrochemotherapy. *Melanoma Res* 1996; 6: 427-33.
14. Sersa G, Cemazar M, Semrov D, Miklavcic D. Changing electrode orientation improves the efficacy of electrochemotherapy of solid tumors in mice. *Bioelectrochem Bioenerg* 1996; 39: 61-6.
15. Heller R, Jaroszeski M, Perrott R, Messina J, Gilbert R. Effective treatment of B16 melanoma by direct delivery of bleomycin using electrochemotherapy. *Melanoma Res* 1997; 7: 10-8.
16. Sersa G, Cemazar M, Miklavcic D. Antitumor effectiveness of electrochemotherapy with cis-diamminedichloroplatinum(II) in mice. *Cancer Res* 1995; 55: 3450-5.
17. Cemazar M, Miklavcic D, Vodovnik L, Jarm T, Zvonimir R, Stabuc B, Cufer T, Sersa G. Improved therapeutic effect of electrochemotherapy with cisplatin by intratumoral drug administration and changing of electrode orientation for electroporation on EAT tumor model in mice. *Radiol Oncol* 1995; 29: 121-7.
18. Belehradec M, Domenge C, Luboinski B, Orlowski S, Belehradec J Jr, Mir LM. Electrochemotherapy, a new antitumor treatment: first clinical phase I-II trial. *Cancer* 1993; 72: 3694-700.
19. Domenge C, Orlowski S, Luboinski B, De Baere T, Schwaab G, Belehradec J Jr, Mir LM. Antitumor electrochemotherapy: new advances in the clinical protocol. *Cancer* 1996; 77: 956-63.
20. Rudolf Z, Stabuc B, Cemazar M, Miklavcic D, Vodovnik L, Sersa G. Electrochemotherapy with bleomycin: the first clinical experience in malignant melanoma patients. *Radiol Oncol* 1995; 29: 229-35.
21. Heller R, Jaroszeski MJ, Glass LF, Messina JL, Rapaport DP, DeConti RC, Fenske NA, Gilbert RA, Mir LM, Reintgen DS. Phase I/II trial for the treatment of cutaneous and subcutaneous tumors using electrochemotherapy. *Cancer* 1996; 77: 964-71.
22. Glass LF, Pepine ML, Fenske NA, Jaroszeski M, Reintgen DS, Heller R. Bleomycin-mediated electrochemotherapy of metastatic melanoma. *Arch Dermatol* 1996; 132: 1353-7.
23. Sersa G, Stabuc B, Cemazar M, Jancar B, Miklavcic D, Rudolf Z. Electrochemotherapy with cisplatin: potentiation of local cisplatin antitumor effectiveness by application of electric pulses in cancer patients. *Eur J Cancer* 1998; 34: 1213-8.
24. Mir LM, Devauchelle P, Quintin-Colonna F, Delisle F, Doliger S, Fradelizi D, Belehradec J Jr, Orlowski S. First clinical trial of cat soft-tissue sarcomas treatment by electrochemotherapy. *Br J Cancer* 1997; 76: 1617-22.
25. Jaroszeski MJ, Gilbert R, Heller R. *In vivo* antitumor effects of electrochemotherapy in a hepatoma model. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1334: 15-8.
26. Ramirez LH, Orlowski S, An DJ, Bindoula G, Dzodic R, Ardouin P, Bognel C, Belehradec J Jr, Munck JN, Mir LM. Electrochemotherapy on liver tumours in rabbits. *Br J Cancer* 1998; 77: 2104-11.
27. Mir LM, Orlowski S, Poddevin B, Belehradec J Jr. Electrochemotherapy tumor treatment is improved by interleukin-2 stimulation of the host's defenses. *Eur Cytokine Netw* 1992; 3: 331-4.
28. Mir LM, Roth C, Orlowski S, Quintin-Colonna F, Fradelizi D, Belehradec J Jr, Kourilsky P. Systemic antitumor effects of electrochemotherapy combined with histoincompatible cells secreting interleukin-2. *J Immunother* 1995; 17: 30-8.

