

La biotransformation du Tetrazolium en Formazan appliquée à la présélection de nouvelles drogues à visée anticancéreuse

Th. TABKA¹
A. BEN SASSI¹
I. CHERAIEF²
T. HOMRI²
H. CHAABANI¹
B. BEN HASSINE²

Résumé : La biotransformation intracellulaire du XTT en Formazan a été appliquée à l'évaluation de l'activité cytotoxique de drogues à visée anticancéreuse, essentiellement dérivés du trichloro-méthyl-éthanol, sur la leucémie murine L1210 in vitro. La concentration qui inhibe la croissance de 50% des cellules en culture est déterminée pour chaque produit et la cytotoxicité est comparée à celle du Cisplatine (CDDP). Cette technique colorimétrique utilisant un sel de tétrazolium ne présente pas que des avantages et doit être employée avec certaines précautions.

Mots clés : Cytotoxicité, Leucémie L1210, Tetrazolium, Formazan, Trichloro-méthyl-éthanol.

Abstract : Intracellular biotransformation of XTT to Formazan have been applied to evaluate in vitro cytotoxic activity on murine leukemia L1210 cells, of anticancer potential drugs, specially derived from trichloro-methyl-ethanols. The 50% growth inhibiting concentration is determined for each product and The cytotoxicity is compared with Cisplatin (CDDP). The use of micro-culture tetrazolium assay (MTA) has not only advantages but may be used with some restrictions.

Key words : Cytotoxicity, Leukaemia L1210, Tetrazolium, Formazan, Trichloro-méthyl-éthanol.

¹ Laboratoire de Biologie et
Physiologie Humaines,
Faculté de Pharmacie-Monastir.

² Laboratoire de Synthèse
Organique et de Photochimie,
Faculté des Sciences-Monastir.

Introduction

Aujourd'hui, avec quelques dizaines de médicaments à son actif, la chimiothérapie anticancéreuse permet de guérir des malades atteints de certains types de cancers (leucémies, lymphomes, cancers des testicules,...) et contribue, en association avec d'autres thérapies, à augmenter l'espérance de vie des malades ayant un cancer de l'ovaire ou du sein (9). Ces succès ne doivent pas faire oublier que dans de nombreux cas, l'usage de la chimiothérapie anticancéreuse reste inefficace et il n'existe pas à l'heure actuelle de traitement optimal d'un type de cancer, soit du fait d'une efficacité insuffisante, soit du fait d'une toxicité rédhibitoire. Le fait que la biochimie de la cellule cancéreuse est proche de celle d'une cellule normale, se traduit par un index thérapeutique faible et par une forte toxicité aiguë et/ou chronique associée au traitement.

Les problèmes de résistance aux drogues constituent une des principales causes d'échec de la chimiothérapie anti-

cancéreuse. D'une part, un grand nombre de tumeurs sont spontanément réfractaires au traitement par les médicaments actuellement disponibles; il s'agit alors d'une résistance primaire (adénocarcinomes coliques, mélanomes malins) liée aux caractéristiques de la tumeur (cinétique de prolifération, vascularisation, oxygénation). D'autre part, la résistance peut être secondairement acquise à la suite d'une cure de chimiothérapie et est alors due à la sélection de cellules biochimiquement résistantes à l'action d'un ou de plusieurs médicaments anticancéreux.

Les efforts constants, pour perfectionner l'utilisation clinique des drogues déjà disponibles sur le marché, permettent d'améliorer la thérapie anticancéreuse, par optimisation du mode d'administration et par la mise au point d'associations médicamenteuses.

Néanmoins, ce rapide bilan sur la chimiothérapie anticancéreuse démontre l'intérêt de la recherche de nouveaux agents, dans le but de mettre au point des médi-

caments plus actifs et moins toxiques. En effet, des techniques pratiques (automatisables), rapides et fiables sont développées pour l'étude de la chimiosensibilité *in vitro* des cellules tumorales aux drogues anticancéreuses telles que les techniques colorimétriques au tétrazolium. La réduction métabolique d'un sel de tétrazolium, qui est un colorant cellulaire vital soluble en milieu aqueux, en formazan insoluble, a été employée depuis plusieurs années comme moyen de localisation histochemique d'une activité enzymatique (3). Black et Speer (4) ont utilisé cette réduction métabolique pour évaluer l'effet inhibiteur de l'activité déshydrogénase par les drogues sur des tissus cancéreux cultivés *in vitro*. Cette technique a été exploitée pour identifier les colonies de cellules vivantes de mammifères cultivées sur milieu semi-solide d'Agar (14). Elle facilite, *in vitro*, les essais de chimiosensibilité aux drogues des tumeurs solides humaines (1).

En 1983, Mosmann (12) réalise des essais utilisant le tétrazolium qui permettent de mesurer rapidement la croissance des populations cellulaires lymphoïdes et leurs réponses aux lymphokines. D'autres équipes ont décrit des procédures modifiant la technique préconisée par Mosmann afin de mieux l'adapter à la recherche de nouveaux agents anticancéreux (15). En outre, une variante de cette technique est appliquée pour le criblage moléculaire ("screening") antiviral dans le but de sélectionner des drogues actives sur le virus (HIV) responsable du SIDA (16).

Les essais de microculture au tétrazolium : M.T.A. (Microculture Tetrazolium Assay) qui sont réalisés sur des tumeurs (ascitiques et solides) humaines et animales, ont l'avantage de pouvoir être automatisables et rapides.

Matériel et méthodes

Méthodologie

Le sel de tétrazolium (de couleur jaune) a la propriété d'être réduit en formazan (de couleur bleu) par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes (12). Cette enzyme, qui est une flavoprotéine très fortement liée à la membrane interne mitochondriale, joue un rôle important dans le cycle de Krebs. Elle

catalyse la déshydrogénation du succinate en fumarate. Par conséquent, c'est l'activité de cette enzyme qui sera mesurée par réduction du sel de tétrazolium. Par un dosage spectrophotométrique, il est possible de déterminer la toxicité d'une population cellulaire donnée. Dans ces conditions, l'absorbance sera directement corrélée à l'activité des succinates déshydrogénases, elle-même reliée à la toxicité cellulaire.

La première approche consiste à utiliser la réduction métabolique du méthyltétrazolium ou MTT (3-bromo-(4,5-diméthyl-2-thiazolyl)-2,5-diphényl-2H-tétrazolium) en formazan qui cristallise à l'intérieur des cellules. Afin de solubiliser ces cristaux, des solvants organiques comme le diméthylsulfoxyde (DMSO), le diméthylformamide (DMF) ou l'isopropanol sont additionnés au milieu de culture. On procède d'abord par l'élimination du surnageant et on ajoute ensuite le solvant de solubilisation. Finalement, le solvant adéquat est, dans la plupart des cas, le DMSO qui fournit les meilleurs résultats (1,2). Il est à noter que l'utilisation fréquente du DMSO est nuisible à la santé du personnel de laboratoire et cause l'altération de certains équipements et matériel de recherche.

Pour pallier à ces inconvénients, d'autres séries de sels de tétrazolium ont été mis au point dont le XTT: 2,3 bis (2-méthoxy-4-nitro-5-sulfophényl)-5-[(phénylamino)carbonyl]-2H-tétrazolium hydroxyde qui présente l'avantage d'être bioréductible en un dérivé formazan soluble en milieu aqueux. L'inconvénient majeur de ce réactif est qu'il donne, après réduction métabolique, une absorbance plus faible que celle du MTT. Afin d'amplifier et d'optimiser cette réponse, on ajoute, en même temps que le XTT (1 mg/ml), du PMS (phénazine méthosulfate) à une dose comprise entre 0,01 mM (0,15 µg/puits) et 0,025 mM (0,38 µg/puits). Ce dernier sert d'agent de couplage électronique au XTT et fournit une absorbance convenablement mesurable, qui est 3 à 5 fois supérieure à celle obtenue sans addition de PMS (15).

Dans la molécule du XTT, la présence de deux groupes sulfonyles représente la clef de la solubilité aqueuse à la fois de la forme tétrazolium et de la forme formazan. Le XTT possède une seule charge négative au

pH physiologique et la bioréduction de la charge positive du noyau central tétrazolique augmente la charge nette à 2. Par contre, la bioréduction correspondante du MTT conduit à la formation d'un dérivé formazan dont la charge nette est nulle et qui est insoluble en milieu

aqueux (figure 1).

Il a été démontré (15) que le XTT et son dérivé réduit (soluble en milieu aqueux) ne sont pas toxiques pour les cellules tumorales pendant toute la durée de l'expérience.

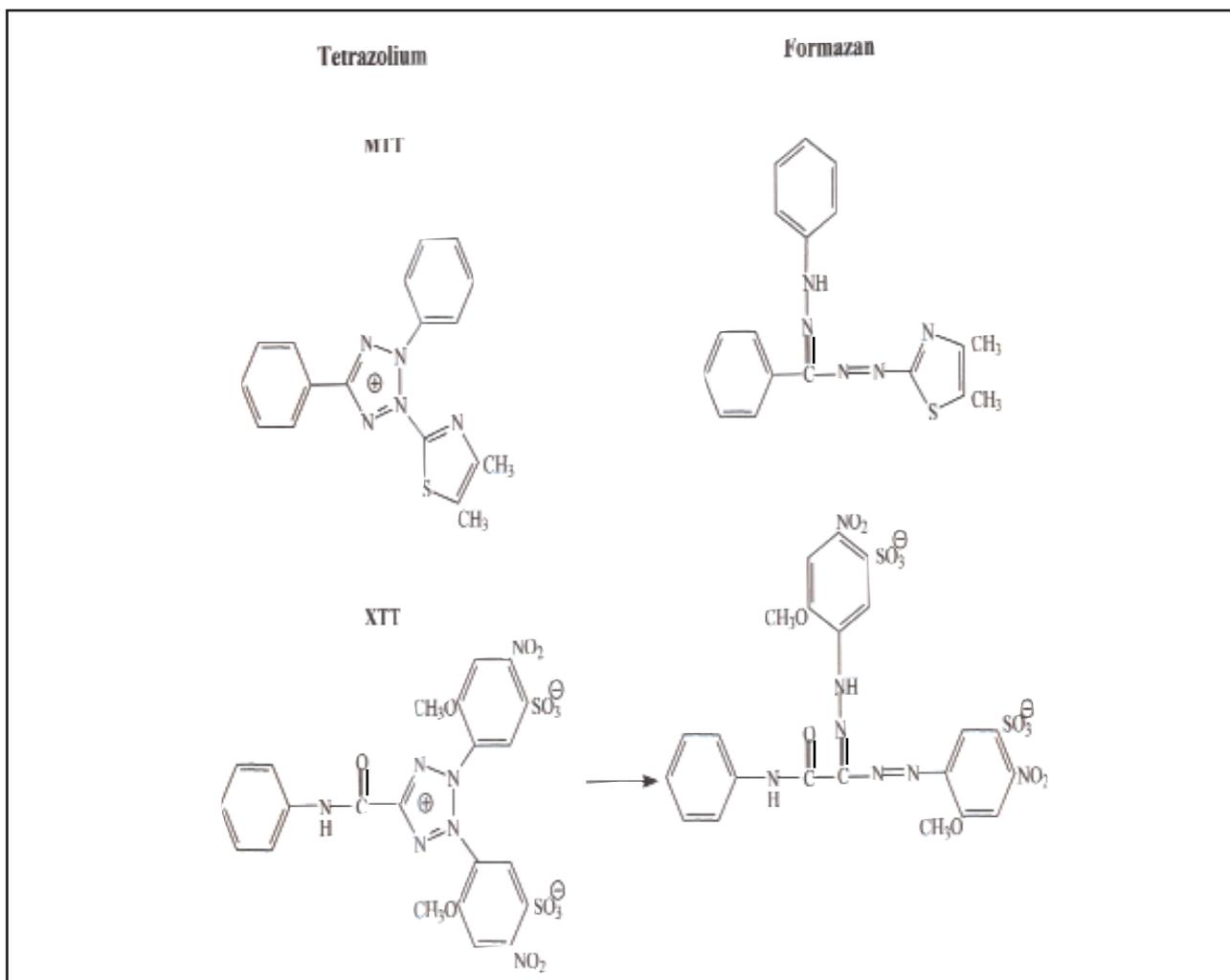


Figure 1 : Structures chimiques de MTT, XTT et des dérivés Formazans correspondants.

Culture cellulaire

La lignée cellulaire utilisée est une leucémie lymphoblastique murine appelée : L1210. C'est une tumeur expérimentale chimioinduite (8) couramment utilisée pour la présélection de nouvelles molécules anticancéreuses in vitro et in vivo. Le milieu de culture employé est du RPMI 1640 supplémenté de 10% de sérum de

veau foetal et de 2 mM de glutamine. La culture cellulaire est réalisée dans un incubateur à CO₂ (5% CO₂, 95% air) sous une atmosphère saturée en eau. Le milieu de culture est changé tous les 2 jours.

La viabilité cellulaire est estimée par la technique d'exclusion au bleu de trypan et la proportion de cellules mortes ne doit pas excéder 5%. Le contrôle du temps de

Après centrifugation pendant 10 minutes à 1500 rpm, le culot cellulaire est repris dans du RPMI 1640. Ensuite les cellules sont réparties dans des microplaques de 96 puits à raison de 20 000 cellules par puits, dans un volume total de 200 μ l. Les cellules sont incubées en présence de la drogue à différentes concentrations pendant 48 heures à 37°C. Par la suite, 50 μ l d'une solution de XTT (1 mg/ml) et de phénazine-méthosulfate PMS (7,65 μ g/ml) préparée dans du RPMI 1640 sont ajoutés dans chaque puits de la microplaque. Les cellules ainsi préparées sont incubées durant 4 heures à 37°C afin de permettre le développement de la coloration.

La viabilité cellulaire est mesurée selon la méthode de Scudiero (15) qui repose sur la capacité des cellules vivantes à réduire le XTT en Formazan. Cette réduction produit un changement de coloration détectable au spectrophotomètre à 450 nm. La densité optique (D.O.) est mesurée par un lecteur de microplaques.

Résultats et discussion

Les résultats sont exprimés en pourcentage de croissance des cellules dans les échantillons traités par rapport aux témoins (tableau I).

Aux faibles concentrations utilisées (0,01 μ g/ml et 0,1 μ g/ml), les dérivés testés ne présentent aucune activité cytotoxique sur la leucémie L1210. Par contre, si l'on considère les résultats obtenus aux concentrations 1 μ g/ml, 10 μ g/ml et 100 μ g/ml, on peut tracer sur une échelle semi-logarithmique, une courbe représentant, pour chaque produit, le pouvoir cytotoxique en fonction de la dose administrée. La droite de régression qui en résulte permet de déterminer, quand cela est possible, la concentration (IC50) qui inhibe la croissance de 50 % des cellules incubées en présence de chaque produit. Ce paramètre (IC50) permet de comparer entre eux et de classer les différents produits en fonction de leur activité cytotoxique.

Le cis-dichloro-diamino-platine (CDDP, cis-Platine®) qui est un médicament anticancéreux est testé à titre de référence et possède une IC50 de 0,77 μ g/ml. Le CDDP est beaucoup plus actif que tous les produits testés au cours de ce travail.

Les dérivés de l'éthanol 13, 14 et 15 qui sont respectivement substitués en position 1 par un groupement furfuryle, phényle et pyridyle, ont été testés sur la leucémie L1210. Les résultats obtenus (tableau I) montrent que le 2,2,2-trichloro-1-phényléthanol (14) est le plus cytotoxique des trois produits avec une IC50 de 12,8 μ g/ml. La suite des essais va essentiellement porter sur ce composé N° 14 et ses dérivés diversement substitués par des groupements tels que : CH₃, OCH₃, Cl, NO₂,... etc.

Parmi les dérivés testés, le 2,2,2-trichloro-1-(2-méthylphényl) éthanol (3) s'est révélé plus cytotoxique (IC50 = 7 μ g/ml) que ses deux homologues méthylés en positions 3 et 4 du cycle benzénique (produits 1 et 2). Sur ce même cycle, le remplacement du groupement méthyle par un atome de chlore (produits 4, 5 et 6) montre que l'activité est plus marquée et surtout lorsque ce dernier est substitué en position méta : le 2,2,2-trichloro-1-(3-chlorophényl) éthanol (5) avec une IC50 de 5,1 μ g/ml. Ce dérivé représente le produit le plus actif de cette série (figure 3).

Les produits 7, 8 et 9 diffèrent par la position du groupement méthoxy sur le cycle benzénique. Parmi ces trois dérivés, le 2,2,2-trichloro-1-(3-méthoxyphényl) éthanol (8) s'est révélé le plus actif sur la L1210 avec une IC50 de 8,2 μ g/ml (figure 4). Ceci pourrait suggérer que la substitution par un groupement méthoxy en position méta sur le cycle benzénique semble favorable au développement de la cytotoxicité.

En ce qui concerne les dérivés nitrés 10, 11 et 12, le composé le plus cytotoxique est le 2,2,2-trichloro-1-(3-nitrophényl) éthanol (11) qui représente une IC50 de 12,7 μ g/ml.

Au vue de ces résultats, il apparaît que la substitution en position 2 et notamment 3 sur le cycle benzénique par CH₃, Cl, OCH₃ et NO₂, est favorable au développement de l'activité cytotoxique, qui est plus importante que celle du composé de base non substitué (14). Par contre, la substitution en position 4 ou para semble la moins favorable au développement de la cytotoxicité.

Les résultats obtenus avec les autres composés (du N° 16 au 22) ne permettent pas d'étudier la relation structure-activité. Néanmoins, le 1-naphtyl éthanol (17) est

Tableau I : Cytotoxicité in vitro de dérivés du trichloro-méthyl-éthanol sur la leucémie L1210.
 (Les résultats sont exprimés en : moyenne \pm écart type de 3 expériences indépendantes)

N° du Produit	% de croissance par rapport au témoin						r
	0,01 μ g/ml	0,1 μ g/ml	1 μ g/ml	10 μ g/ml	100 μ g/ml	IC50	
	Exposition : 48 h						
CDDP	100 \pm 6	93 \pm 10	41 \pm 3	0	0	0,77	- 0,998
1	100 \pm 7	100 \pm 5	100 \pm 6	40 \pm 2	0	8,5	- 0,990
2	100 \pm 5	100 \pm 8	100 \pm 9	40 \pm 2	0	8,5	- 0,990
3	95 \pm 7	98 \pm 1	91 \pm 5	38 \pm 2	0	7	- 0,995
4	91 \pm 8	100 \pm 9	92 \pm 7	40 \pm 2	0	7,4	- 0,997
5	91 \pm 8	92 \pm 9	77 \pm 9	39 \pm 3	0	5,1	- 0,999
6	100 \pm 5	100 \pm 4	88 \pm 5	41 \pm 2	0	6,9	- 0,999
7	94 \pm 9	97 \pm 9	94 \pm 8	95 \pm 5	0	18,8	- 0,860
8	99 \pm 10	100 \pm 3	98 \pm 1	38 \pm 4	1,5 \pm 1	8,2	- 0,990
9	100 \pm 10	100 \pm 10	87 \pm 10	79 \pm 8	5 \pm 2	14,8	- 0,906
10	100 \pm 9	93 \pm 8	89 \pm 8	71 \pm 4	8 \pm 2	14	- 0,952
11	99 \pm 5	98 \pm 8	100 \pm 10	54 \pm 4	10 \pm 1	12,7	- 0,999
12	96 \pm 3	100 \pm 10	100 \pm 10	74 \pm 6	5 \pm 1	15,9	- 0,967
13	100 \pm 10	99 \pm 10	95 \pm 10	77 \pm 7	30 \pm 2	34	- 0,968
14	100 \pm 10	100 \pm 10	91 \pm 8	53 \pm 8	18 \pm 1	12,8	- 0,999
15	100 \pm 10	100 \pm 9	100 \pm 10	100 \pm 10	31 \pm 1	60,3	- 0,866
16	100 \pm 10	95 \pm 10	96 \pm 10	96 \pm 7	33 \pm 7	61,9	- 0,866
17	96 \pm 5	97 \pm 6	94 \pm 4	90 \pm 6	3 \pm 1	18,6	- 0,885
18	100 \pm 5	100 \pm 3	90 \pm 8	87 \pm 5	91 \pm 5	ND	ND
19	100 \pm 7	99 \pm 5	95 \pm 7	53 \pm 2	0	9,6	- 0,998
20	100 \pm 8	98 \pm 10	97 \pm 7	100 \pm 7	100 \pm 7	ND	ND
21	100 \pm 10	100 \pm 9	100 \pm 6	82 \pm 10	27 \pm 1	34,4	- 0,959
22	99 \pm 5	100 \pm 6	100 \pm 5	68 \pm 4	14 \pm 1	17,6	- 0,989

r : coefficient de corrélation

IC50 : concentration qui inhibe la croissance de 50% des cellules en culture

CDDP : cis-dichloro-diamino-platine

ND : non déterminé

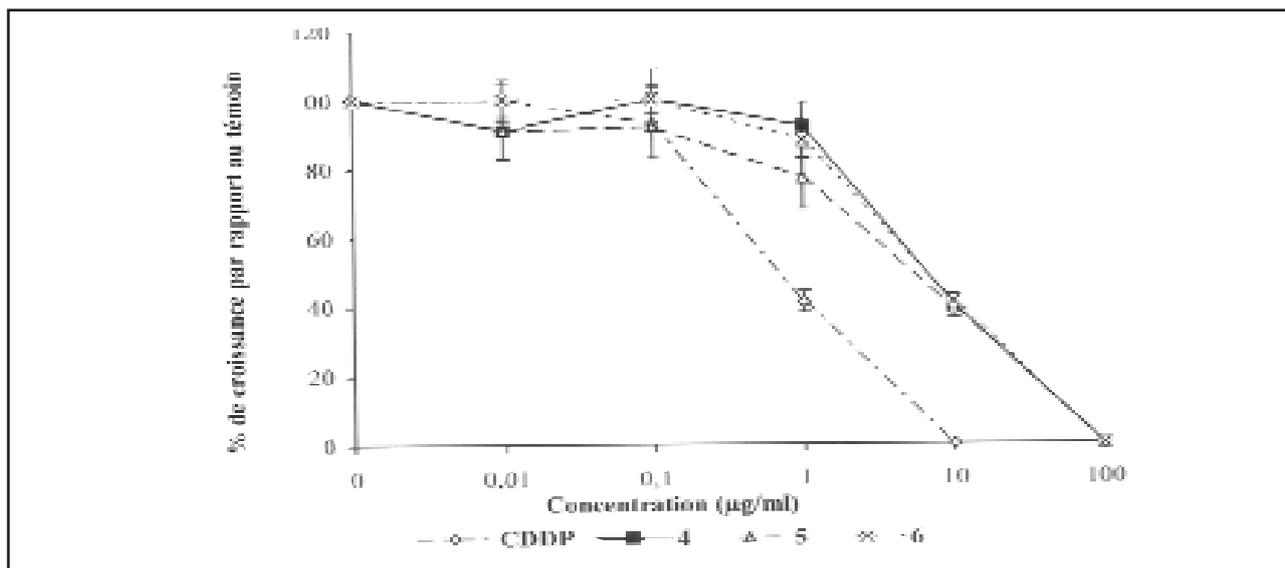


Figure 3 : Activité cytotoxique du CDDP et des dérivés 4, 5 et 6 sur la L 1210 in vitro après une exposition de 48 h.

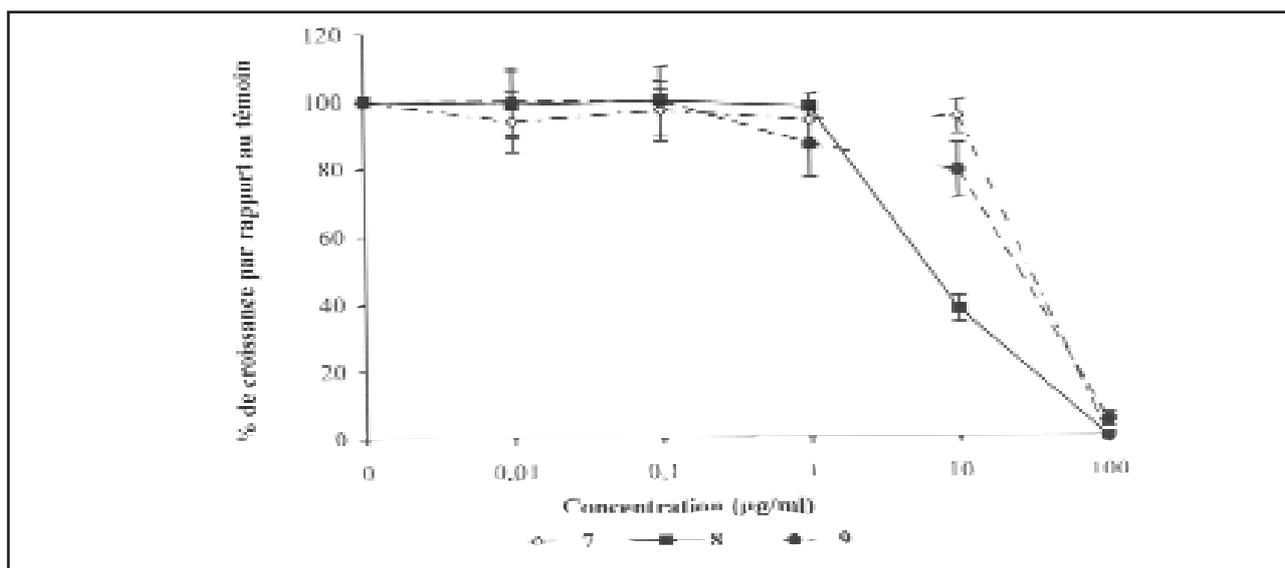


Figure 4 : Activité cytotoxique des dérivés 7, 8 et 9 sur la L1210 in vitro après une exposition de 48 h

plus actif sur la L1210 que le 2-naphtyléthanol (16). Le 2,2,2-trifluoro-1-(9-anthryl) éthanol (19) possède une IC50 de 9,6 µg/ml. Les dérivés 21 et 22 sont faiblement cytotoxiques alors que le pyridyléthanol (20) est totalement inactif aux doses testées.

Toutefois, toutes ces techniques colorimétriques utilisant les dérivés de tétrazolium (MTT et même XTT) ne sont pas irréprochables. Elles sont dépendantes de la

capacité de réduction des cellules vivantes et notamment de l'activité déshydrogénase au niveau des mitochondries. Ces essais dépendent de la corrélation entre la réduction enzymatique du tétrazolium et de certaines caractéristiques telles que le nombre de cellules en culture et les protéines cellulaires.

La capacité de réduction cellulaire doit rester relativement constante tout au long de l'expérience. Cependant,

cette hypothèse peut devenir, à tout moment, non valable par la régulation métabolique complexe intracellulaire. Par conséquent, la régulation enzymatique, le pH, les concentrations ioniques (sodium, calcium, potassium) et les variations du cycle cellulaire peuvent influencer sur la capacité de bioréduction cellulaire du tétrazolium. Mosmann (12) rapporte que des mitogènes stimulateurs des cellules spléniques de souris produisent plus de formazan à partir du MTT que les autres types cellulaires. En outre, Cette technique ne peut pas être appliquée au carcinome humain du côlon HCT-8 qui métabolise anormalement le MTT. Finlay et ses collaborateurs (5) rapportent que les cellules HCT-8 métabolisent très faiblement le MTT et donnent curieusement une absorbance plus importante dans les échantillons traités par les drogues que dans les cultures témoins non traitées. En outre, les tests au MTT utilisant des cellules adhérentes qui s'attachent à la surface des boîtes de culture produisent des cristaux de formazan qui sont difficilement solubilisables (5) : on peut parfois avoir des cristaux de formazan résiduels qui rendent les résultats hasardeux et aléatoires. Ceci peut s'observer lors d'un examen microscopique dans certaines cultures dans lesquelles il se forme alors des cellules "géantes" qui survivent même en présence de doses élevées de drogues anticancéreuses. Ces cellules peuvent contenir des quantités importantes de cristaux dont l'intensité de la coloration avoisine celle des cellules témoins.

Concernant la technique utilisant le XTT, le PMS peut parfois provoquer une précipitation non spécifique et inexplicable du formazan (7). C'est pour cela que Pearse (13) recommande de n'utiliser ces agents intermédiaires de couplage électroniques (PMS ou ménadione) que lorsque l'activité biologique ne peut pas être révélée autrement.

Par ailleurs, la culture clonogénique en milieu semi-solide appliquée à la recherche de nouvelles drogues anticancéreuses (10,11,6) demeure la technique de criblage moléculaire la plus fiable in vitro. Elle permet d'évaluer l'activité cytotoxique des drogues spécifiquement sur les cellules tumorales "souches" ("stem cells") qui sont les seules capables de redonner le cancer, après leur réinjection à l'hôte (animal). Cependant, ces essais clonogé-

niques sont techniquement plus lourds et moins rapides que les essais colorimétriques.

Par conséquent, si l'on prend certaines précautions quant à l'estimation des résultats expérimentaux, on peut soutenir que le test colorimétrique basé sur la réduction métabolique du XTT en formazan constitue une technique très intéressante pour la présélection de nouvelles drogues à visée anticancéreuse.

En résumé, l'activité cytotoxique de tous les dérivés testés sur la leucémie L1210 reste inférieure à celle des médicaments anticancéreux comme le CDDP, mais elle permet d'entrevoir une relation structure-activité. Ces résultats méritent d'être complétés par l'essai d'autres produits de la même famille chimique afin de mieux étudier la relation entre la structure chimique et l'activité biologique et d'aboutir à la sélection de drogues de plus en plus actives.

Références

- 1- Alley M.C., Lieber M.M.
Improved optical detection of colony enlargement and drug cytotoxicity in primary soft agar cultures of human solid tumor cells. *Br. J. Cancer* 1984, 49: 225-223.
- 2- Alley M.C., Scudiero D.A., Monks A., Hursey M.L., Czerwinski M., Fine D.L., Abbott B.J., Mayo J.G., Shoemaker R.H., Boyd M.R.
Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res.* 1988, 48: 589-601.
- 3- Altman F.P.
Tetrazolium salts and Formazans. *Prog. Histochem. Cytochem.* 1977, 9: 1-56.
- 4- Black M.M., Speer F.D.
Effects of cancer chemotherapeutic agents on dehydrogenase of human cancer tissue in vitro. *Am. J. Clin. Pathol.* 1953, 23: 218-227.
- 5- Finlay G.J., Wilson W.R., Bagueley B.C.
Comparison of in vitro activity of cytotoxic drugs towards human carcinoma and leukemia cell lines. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 1986, 22: 655-662.
- 6- Hamburger A.
Use of in vitro tests in predictive cancer chemotherapy. *J. Natl. Cancer. Inst.* 1981, 67: 981-988.

- 7-** Kiernan J.A.
in : Histological and histochemical methods, theory and practice, 1981, Chap. 16. New York Press.
- 8-** Law L.W., Dunn T.B., Boyle P.J., Miller J.H.
Observation on the effect of folic acid antagonist on transplantable lymphoid leukemia in mice. *J. Nat. Cancer Inst.* 1949, 10: 179-792.
- 9-** Marty M., Calvo F., Espie M., Extra J.M., Gisselbrecht C., Lagier G.
Anticancéreux. Pharmacologie clinique, publié par Giroud, Mathé, Meyniel. Expansion Scientifique Française. 1988.
- 10-** Moinet Hedin V., Tabka T., Sichel F., Gauduchon P., Le talaer J. Y., Saturnino C., Letois B., Lancelot J. C., Robba M.
In vitro cytotoxicity of carbazole derivatives. V.9-Halogeno-substituted 5,11-Dimethyl-6H-pyrido [3,2-b]carbazoles. *European journal of medicinal chemistry* 1997, 32: 1.
- 11-** Moinet Hedin V., Tabka T., Poulin L., Godard T., Lechevrel M., Saturnino C., Lancelot J. C., Le talaer J. Y., Gauduchon P.
Biological properties of 5,11-diméthyl-6H-pyrido [3,2-b]carbazoles: a new class of potent antitumour drugs. *Anti-Cancer Drug Design* 2000, 15: 109-118.
- 12-** Mosmann T.
Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 1983, 65: 55-63.
- 13-** Pearse A.G.E.
Principles of oxidoreductases histochemistry. In : *Histochemistry, Theoretical and Applied* 1972, Ed. 3, Chap. 20, Edinburgh : Churchill Livingstone.
- 14-** Schaeffer W.I., Friend K.
Efficient detection of soft-agar grown colonies using a tetrazolium salt. *Cancer lett.* 1976,1: 275- 279.
- 15-** Scudiero D.A., Shoemaker R.H., Paull K.D., Monks A., Tierney S., Nofziger T.H., Currens M.J., Seniff D., Boyd M.R.
Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res.* 1988, 48: 4827-4833.
- 16-** Weislow O.S., Kiser R., Fine D.L., Bader J., Shoemaker R.H., Boyd M.R.
New soluble-formazan assay for HIV-1 cytopathic effects : application to high-flux screening of synthetic and natural products for AIDS-antiviral activity. *J. Natl. Cancer Inst.* 1989, 81: 577-586.