

## Phagocytose des liposomes par les macrophages péritonéaux de souris

### Phagocytosis of Liposomes by Mouse Peritoneal Macrophages

L. MATTENBERGER-KREBER, G. AUDERSET<sup>1</sup>, M. SCHNEIDER, A. LOUIS-BROILLET, M. STROLIN BENEDETTI et A. MALNOË  
Battelle, Centre de Recherche, 7, route de Drize, CH-1227 Carouge-Genève (Suisse), 7 avril 1976.

**Summary.** Uptake of <sup>14</sup>C-cholesterol or <sup>3</sup>H-cholesterol labelled liposomes, stimulation of <sup>14</sup>C-glucose oxidation, as well as ultrastructural and autoradiographical experiments have shown that liposomes are phagocytized by mouse peritoneal macrophages. Further results have shown that degradation of liposomes was not complete 2 h after uptake.

Les liposomes sont des structures lipidiques sphériques formées de doubles couches de phospholipides alternant avec des compartiments aqueux dans lesquels différents agents hydrosolubles peuvent être incorporés<sup>2,3</sup>. Injectés par voie intraveineuse, les liposomes s'accumulent

rapidement dans certains tissus, en particulier dans le foie et la rate<sup>4,5</sup> et cette propriété a incité certains auteurs à proposer l'utilisation des liposomes comme vecteurs d'agents thérapeutiques<sup>2,3</sup>. Toutefois de nombreux aspects concernant le processus de pénétration des lipo-

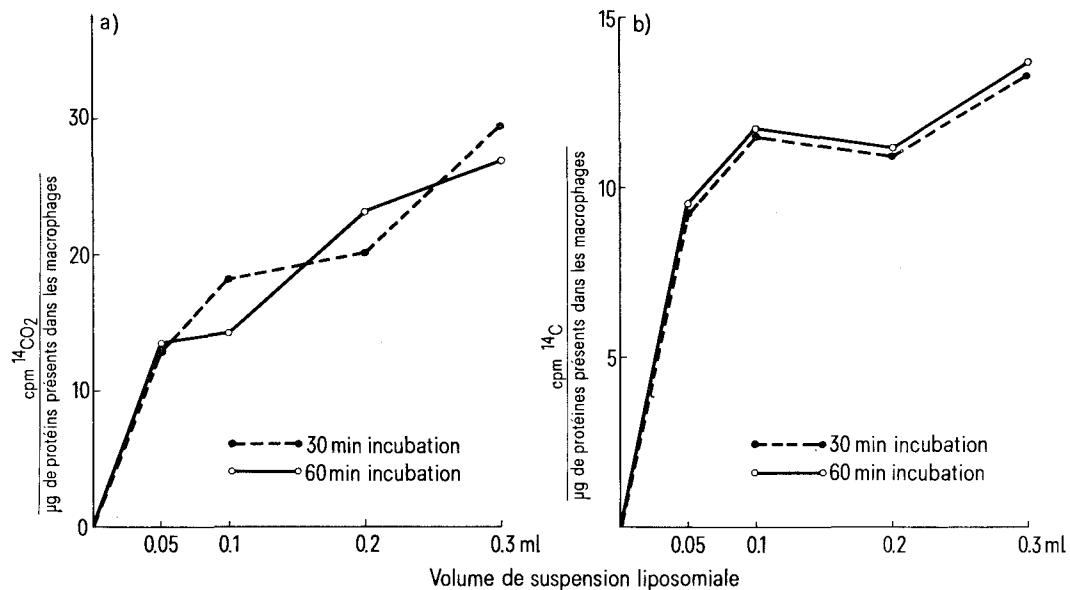


Fig. 1. Phagocytose de liposomes par des cultures de macrophages péritonéaux de souris. *a* Détermination de la phagocytose par la mesure de l'oxydation de glucose-1-<sup>14</sup>C. Le <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> produit par les macrophages témoins a été déduit pour chaque temps d'incubation. *b* Détermination de la phagocytose par la mesure de la radioactivité des liposomes marqués au cholestérol-<sup>14</sup>C incorporés dans les macrophages.

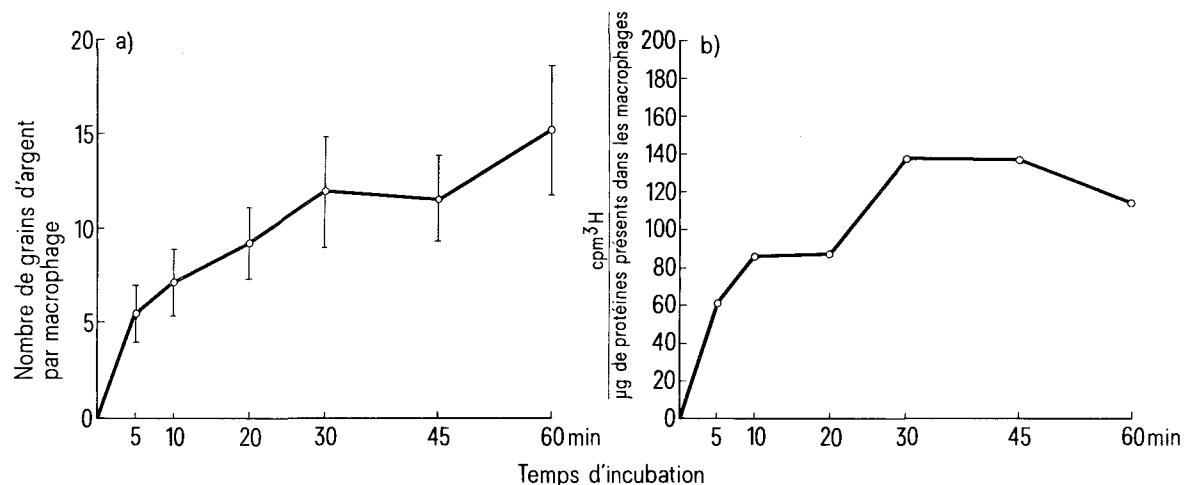


Fig. 2. Phagocytose de liposomes marqués au cholestérol-<sup>3</sup>H par des cultures de macrophages péritonéaux de souris. *a* Détermination de la phagocytose par comptage du nombre de grains d'argent précipité sur un minimum de 30 macrophages. *b* Détermination de la phagocytose par la mesure de la radioactivité des liposomes marqués au cholestérol-<sup>3</sup>H incorporés dans les macrophages. Le volume de suspension liposomiale ajouté à chaque boîte de Pétri est de 100  $\mu\text{l}$ .

somes dans les cellules ainsi que la cinétique de libération des agents incorporés dans le milieu intracellulaire restent encore peu connus.

L'accumulation sélective des liposomes dans certains organes du système réticulo-endothéial nous a conduit à étudier l'action des macrophages sur les structures liposomiales.

**Matériel et méthodes.** Les liposomes sont obtenus en soumettant aux ultrasons durant 30 sec une suspension de 60 mg de phosphatidylcholine dans 3 ml de tampon pH 7,5 (NaCl 150 mM, tris-HCl 10 mM). Les liposomes marqués sont obtenus en ajoutant avant traitement aux ultrasons des traces de cholestérol marqué ( $^{14}\text{C}$ -cholestérol ou  $^3\text{H}$ -cholestérol).

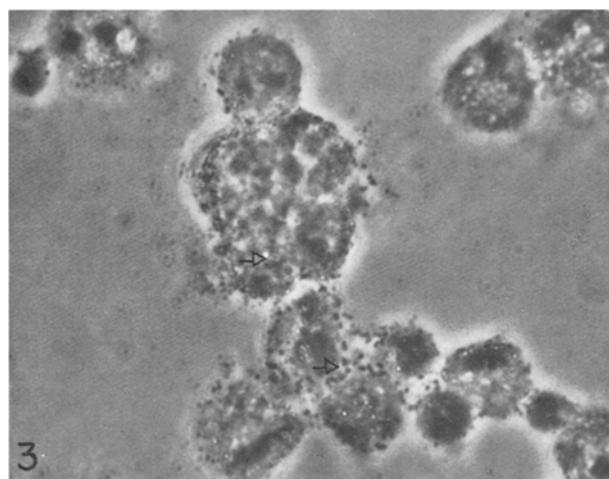


Fig. 3. Microphotographie optique d'une culture de macrophages, incubée durant 60 min avec la suspension liposomiale puis recouverte, après fixation, d'un film autoradiographique  $\times 1175$ . Contraste de phase. De nombreux grains d'argent réduit sont associés à la cellule (flèche).

Les macrophages péritonéaux de souris, préalablement stimulés par une injection de protéose-peptone sont récoltés par lavage péritonéal et mis en culture pendant 48 à 72 h dans des boîtes de Pétri Falcon de 35 mm de diamètre. Le milieu de culture est constitué de Milieu Basal D'Eagle additionné de 20% de serum de veau foetal. — La phagocytose est étudiée selon des méthodes proches de celles décrites par MICHELL et al.<sup>6</sup> — L'autoradiographie est réalisée en recouvrant d'émulsion liquide Ilford L4 durant 14 jours les couches monocellulaires qui ont été exposées à la suspension liposomiale, rincées, fixées à la glutaraldéhyde puis post-fixées au tétr oxyde d'osmium. — La fixation, l'enrobage des cellules ainsi que la préparation des coupes pour la microscopie électronique ont été faits selon les techniques habituelles<sup>7</sup>.

**Résultats.** Les mesures quantitatives de phagocytose indiquent que l'incorporation des liposomes marqués et l'augmentation de production de  $^{14}\text{CO}_2$  sont proportionnelles au nombre de liposomes présents aux couches monocellulaires (figure 1, a et b). La phagocytose intervient très rapidement. Elle est déjà évidente après 10 min d'incubation. Elle paraît avoir atteint son maximum après 30 min, et n'augmente que légèrement entre 30 et 60 min (figure 2, a et b). L'autoradiographie optique (figure 3) confirme l'incorporation des liposomes.

L'étude ultrastructurale montre que les liposomes induisent dans une première phase une prolifération importante des villosités externes des macrophages. Dans un second temps, ces villosités externes fusionnent entre elles déterminant de ce fait de nombreuses vacuoles incluant un nombre plus ou moins important de liposomes. Un diagramme illustratif (figure 4) explique les différents stades observés.

Le phénomène d'incorporation des liposomes par les macrophages est très rapide; déjà après 10 min d'incubation un bon nombre de liposomes sont visibles au niveau des vacuoles périphériques des cellules. Ce nombre s'accentue après 30 min d'incubation. Le diamètre des vésicules incorporées correspond à celui des liposomes dont nous avons calibré les dimensions par coloration négative (0,1–1,3  $\mu\text{m}$ ). A partir de 30 min d'incubation, l'incorporation des liposomes par les macrophages diminue et autour de 60 min, il semblerait que les macrophages soient saturés de liposomes. A ce temps d'incubation, les villosités externes des cellules ont fortement diminué et l'aspect périphérique est comparable à celui des témoins. Le nombre de vacuoles cytoplasmiques est cependant beaucoup plus élevé que chez les macrophages non ex-

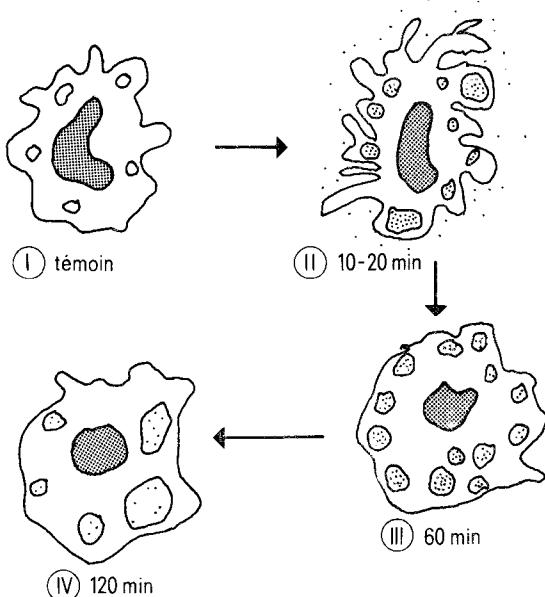


Fig. 4. Diagramme illustrant par étapes successives la réaction des macrophages après incubation avec une suspension liposomiale (pointillé).

<sup>1</sup> Département de Biologie Végétale, Université de Genève (Suisse).

<sup>2</sup> A. D. BANGHAM, Progr. Biophys. Mol. Biol. 18, 29 (1968).

<sup>3</sup> G. SESSA et G. WEISSMAN, J. Lipid. Res. 9, 310 (1968).

<sup>4</sup> G. GREGORIADIS et D. E. NEERUNGPUN, Eur. J. Biochem. 47, 179 (1974).

<sup>5</sup> G. GREGORIADIS et B. E. RYMAN, Biochem. J. 129, 123 (1972).

<sup>6</sup> R. H. MICHELL et al., J. Biol. 40, 216 (1969).

<sup>7</sup> W. E. MAGEE et al., J. Cell Biol. 63, 492 (1974).

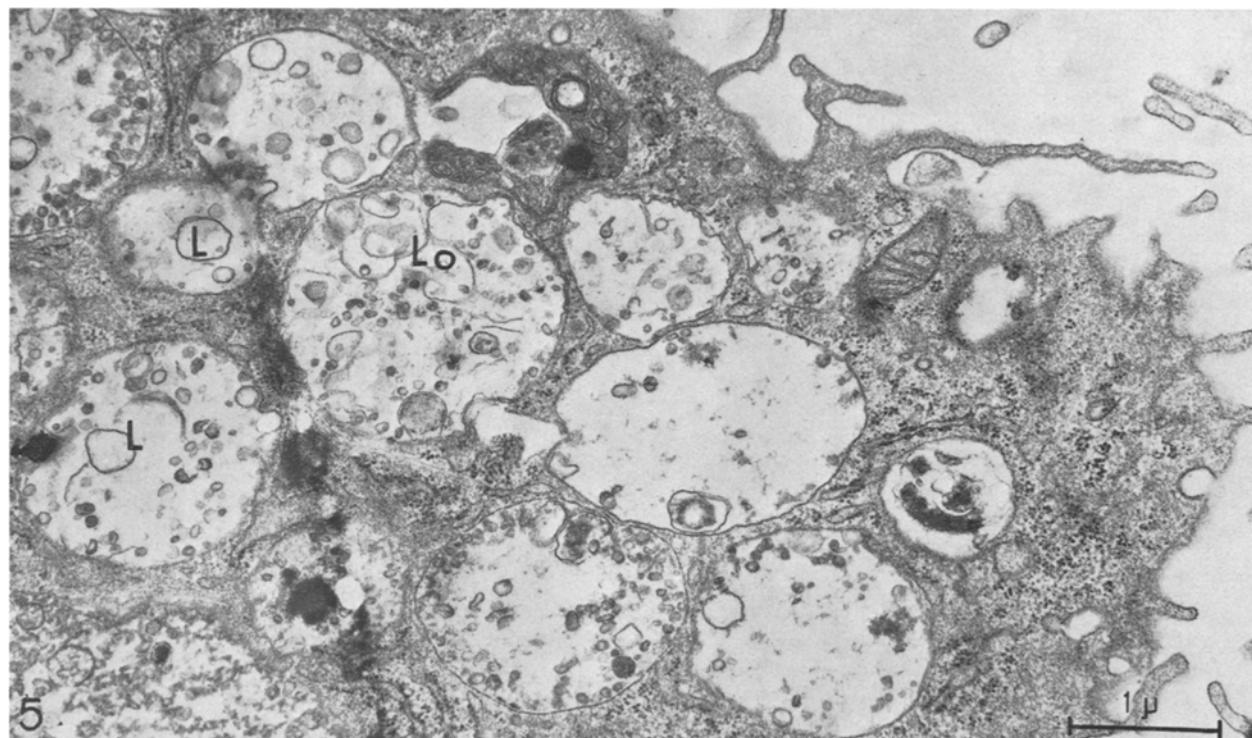


Fig. 5. Macrophage incubé pendant 30 min avec la suspension liposomiale, puis après lavage, incubé durant 60 min avec du milieu frais. Les liposomes intacts (L) dominent, tout en voisinant parfois avec des liposomes ouverts (Lo).  $\times 20\,000$ .

posés aux liposomes. Ces vacuoles sont chargées de débris membranaires, provenant probablement de liposomes dégradés et de liposomes identifiables, encore refermés.

Des liposomes non dégradés sont aussi présents dans les vacuoles des macrophages qui, après avoir été exposés à la suspension liposomiale pendant 10 ou 30 min, ont été rincés et incubés pendant 60 ou 120 min avec du milieu de culture frais (figure 5). Il ressort de cette dernière expérience que 2 h après la phagocytose, les liposomes ne sont pas encore totalement dégradés par les macrophages.

En conclusion, nos résultats démontrent que les liposomes sont phagocytés par les macrophages. Ils sont en accord avec d'autres travaux sur l'endocytose des liposomes<sup>7-10</sup> et confirment nos observations antérieures sur la lenteur de la dégradation des liposomes après leur incorporation cellulaire<sup>11</sup>.

<sup>8</sup> G. GREGORIADIS et R. A. BUCKLAND, *Nature* 244, 170 (1973).

<sup>9</sup> Y. E. RAHMAN et al., *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 146, 1173 (1974).

<sup>10</sup> Y. E. RAHMAN et B. J. WRIGHT, *J. Cell Biol.* 65, 112 (1975).

<sup>11</sup> A. MALNOË et al., *Biochem. Soc. Transact.* 3, 730 (1975).

## Milieux à base de poudre de muscle pour la numération des microorganismes protéolytiques

### Muscle Powder Media for Enumeration of Proteolytic Microorganisms

J. PROTH, A. MOUREY et G. KILBERTUS

Laboratoire de Botanique et de Microbiologie, Université de Nancy I, Case officielle 140, F-54037 Nancy-Cedex (France), 25 juin 1976.

**Summary.** New media, with ox muscle powder as a substrate, are proposed for enumeration of proteolytic microorganisms in meat products.

Les milieux de culture classiques pour la détection et la numération des microorganismes protéolytiques au sein d'une population microbienne sont essentiellement à base de caséine ou de gélatine.

La caséine permet la mise en évidence des microorganismes caséolytiques, susceptibles de dégrader les produits laitiers<sup>1</sup>. L'utilisation de la gélatine est justifiée par le fait que les études taxonomiques des microorganismes nécessitent l'utilisation de substrats bien définis. Dans

les cas de numérations, on doit incorporer ce produit dans des milieux solides en boîtes de Pétri (gélose-gélatine) et la mise en évidence de la gélatinolyse nécessite l'emploi de «révélateurs» qui en précipitant le substrat entraînent en même temps la destruction des colonies de microorganismes. L'emploi de la gélatine ou de la caséine est lié à des cas bien précis et l'hydrolyse de l'une de ces deux substances n'implique pas forcément pour le micro-organisme en cause la possibilité de l'hydrolyse de l'autre<sup>2</sup>.