

# Étude multi-échelle en microscopies d'un hydrogel glycosylé implanté dans le cerveau du rat

Stéphane Woerly<sup>a,\*</sup>, Isabelle Pignot-Paintrand<sup>a</sup>, Carole Carcenac<sup>b</sup>, Marc Savasta<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales, CNRS, affilié avec l'Université Joseph Fourier et membre de l'Institut de Chimie Moléculaire de Grenoble, BP 53 38041 Grenoble cedex 9

<sup>b</sup> Dynamique des Réseaux Neuronaux du Mouvement, INSERM U836-Université Joseph Fourier BP 53 38041 Grenoble cedex 9

---

**Résumé** – Un hydrogel macroporeux comportant l'oligosaccharide sialyllactose a été implanté dans le cerveau du rat comme matrice de réparation tissulaire. La structure tridimensionnelle de l'hydrogel a été caractérisée en microscopie électronique à balayage et en microscopie confocale à balayage laser après marquage de l'oligosaccharide avec deux sondes fluorescentes. Quatre mois après implantation au niveau du striatum, la matrice polymère a été examinée en microscopie électronique et microscopie confocale pour la caractérisation de la réaction cellulaire à l'interface avec le tissu nerveux et à l'intérieur de la structure de la matrice. L'hydrogel est le siège d'une angiogenèse et d'une colonisation cellulaire qui est régit par la microgéométrie du réseau poreux de l'hydrogel.

---

## 1. Introduction

Les hydrogels, proposés comme outils d'ingénierie tissulaire, constituent des réseaux tridimensionnels de chaînes polymériques réticulées qui gonflent mais ne se dissolvent pas dans l'eau. Dans cette étude, un hydrogel de poly [N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide] (HPMA) a été synthétisé dans le but de servir de matrice *template* pour la réparation du tissu du système nerveux. Les études de porosimétrie et de microscopie électronique montre que la valeur de sa fraction poreuse est de l'ordre de 90% de son volume total avec une surface spécifique de l'ordre de 40 m<sup>2</sup>/g [1]. Dans ce travail, l'hydrogel a été fonctionnalisé avec le sialyllactose, partie oligosaccharidique du ganglioside GM<sub>3</sub>, afin de favoriser les interactions cellulaires *in vivo* et la réparation tissulaire.

## 2. Matériel et méthodes

Cette étude a été réalisée avec le parc instrumental de microscopes suivant :

Microscope optique Zeiss Axioplan2 interfacé avec un système d'analyses d'images analySIS

Microscope confocal à balayage laser (MCBL) Leica TCS SP2 AOBS (Acoustico Optical Beam Splitter, Leica Microsystems) interfacé avec un microscope inversé à fluorescence.

Microscopes électroniques à balayage (MEB) Jeol JSM-6100 opérant à 8kV et en transmission (MET) Philips CM200 opérant à 80kV.

Pour la MEB, les échantillons ont été déshydratés par une série de bains de concentration croissante d'éthanol, puis séchés à l'hexamethyldisilane [2]. Pour la MET, les échantillons ont été inclus dans une résine époxy après fixation et déshydratation, pour permettre la réalisation de coupes ultrafines.

La caractérisation microstructurale du gel a été réalisée en MCBL sur des coupes de 150  $\mu$ m d'épaisseur du polymère. Pour la détection et la distribution du sialyllactose sur le polymère de HPMA, nous avons utilisé un anticorps anti-GM<sub>3</sub> couplé au fluorochrome Alexa 488 (excitation laser 488 Argon/Krypton; émission 497-576 nm) et la lectine *Wheat germ Agglutinin* couplée au rouge texas (excitation laser 543 He/Ne; émission 576-654 nm). Des coupes optiques ont été réalisées par balayage en fluorescence et en contraste différentiel interférentiel (CDI) pour l'observation de la distribution des marqueurs spécifiques au niveau du réseau macromoléculaire du gel.

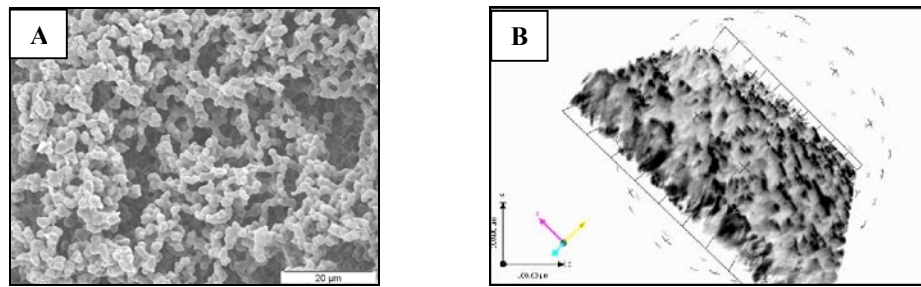
Le gel a été greffé au niveau du striatum du cerveau du rat. Après 4 mois, des coupes de 20  $\mu$ m, incluant l'hydrogel et traitées au crésyl violet, ont été observées en MCBL en mode balayage en fluorescence et en CDI pour caractériser la croissance cellulaire dans le réseau polymère. Les images ont été acquises avec une résolution de 512 x 512 pixels dans le plan xy, et les séries avec un pas delta Z de 0.5  $\mu$ m (*z-stack*) de balayage ont été acquises avec le logiciel Leica CLSM. Des reconstructions 3D ont été réalisées avec le logiciel Volocity 4.

## 3. Résultats

Les images en MEB de l'hydrogel lyophilisé ont permis de résoudre sa structure macroporeuse tridimensionnelle en corrélation avec les reconstructions volumiques 3D du gel hydraté à partir des images acquises en MCBL (mode CDI) (Figure 1A et 1B). Les images révèlent un réseau macro- et mésoporeux ouvert et complexe, formé de microsphères de 3-5  $\mu$ m de diamètre (unité structurale) arrangées en agrégats. La surface de ce réseau délimite un système ouvert de pores dont la valeur moyenne de situe autour de 25  $\mu$ m [1].

---

\* Auteur à contacter : [stephane.woerly@cermav.cnrs.fr](mailto:stephane.woerly@cermav.cnrs.fr) – Tel : 04 76 03 76 18

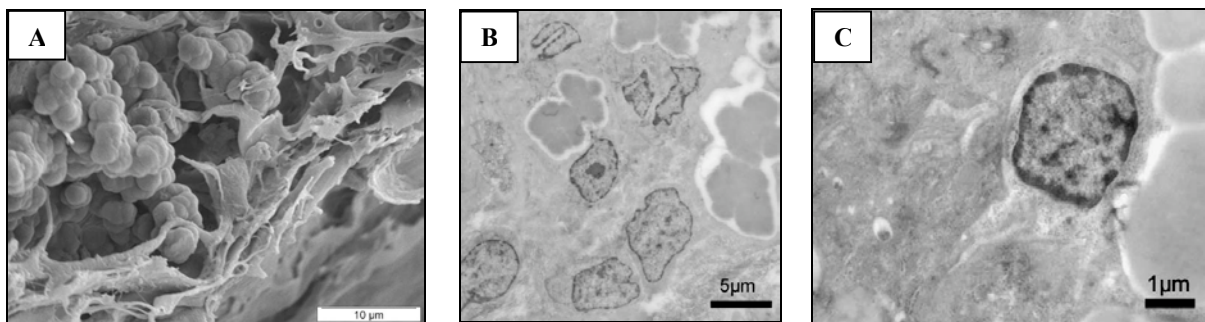


(photographie de D. Dupeyre)

**Figure 1** – Structure de l'hydrogel de HPMA en microscopie électronique à balayage (A) et en microscopie confocale à balayage laser (B)

Après marquage du sialyllactose, les images en MCBL du polymère révèlent un marquage fluorescent discret du réseau polymérique avec, en mode plan xy, une distribution statistique de l'oligosaccharide à la surface des microsphères de HPMA et, en reconstruction 3D (*z-stacks*), sur la paroi des canaux du réseau poreux.

Grâce à l'autofluorescence du polymère (absorption en surface de protéines plasmatiques), des séries d'images superposées en MCBL en mode fluorescence et en CDI de coupes épaisses (20  $\mu\text{m}$ ) de tissu cérébral contenant la greffe du gel de HPMA ont été réalisées. Nous constatons la stabilité du réseau polymérique *in vivo*, et une croissance cellulaire au travers de la structure poreuse de l'hydrogel jusqu'à former, par endroit, un néo-tissu. L'observation en microscopie optique, après coloration au crésyl violet, révèle un gradient cellulaire partant de l'interface du tissu nerveux et pénétrant le réseau polymérique. L'infiltrat cellulaire est principalement composé d'astrocytes réactifs et de cellules mononuclées. La microscopie électronique à balayage et la microscopie optique de coupes semi-fines de 1  $\mu\text{m}$ , colorées au bleu de toluidine, précisent la présence de cellules au sein du gel et la formation de capillaires sanguins de 4-6  $\mu\text{m}$  de diamètre (Figure 2A). En MET, nous observons que l'infiltrat cellulaire est dans une matrice extracellulaire de collagène, constitué de nombreuses cellules dont le cytoplasme épouse la microgéométrie du réseau polymère (Figure 2B). La présence de neurones différenciés au contact du polymère a pu aussi être mise en évidence, corrélée avec des études en immunocytochimie des fibres nerveuses (Figure 2C).



**Figure 2** – Images en MEB (A) de l'hydrogel implanté dans le cerveau du rat révélant une forte infiltration cellulaire dans le réseau poreux. En MET on observe la présence de noyaux cellulaires et une infiltration du cytoplasme dans les pores de l'hydrogel (B) et un neurone différencié au contact du polymère (C).

#### 4. Conclusion

Cette étude multi-échelle en microscopies montre qu'un hydrogel de HPMA ultraporeux forme *in vivo* une continuité structurale 3D, favorisant le remodelage tissulaire dans le cerveau du rat. Ce réseau poreux est envahi par du matériel extracellulaire et des cellules de natures hétérogènes, et est le siège d'une angiogénèse active. La présence de neurones dans la structure du gel provient vraisemblablement de cellules souches différenciées.

#### 5. Références

- [1] S. Woerly et al. *Heterogeneous PHPMA hydrogels for tissue repair and axonal regeneration in the injured spinal cord*. J. Biomat. Sci. Polymer Edn **9** (1998) 681-711.
- [2] S. Woerly et al. *Neural tissue formation within porous hydrogels implanted in brain and spinal cord lesions: ultrastructural, immunohistochemical and diffusion studies*. Tissue Eng. **5** (1999) 467-488.