

Figure 1. Conditions expérimentales pour la création d'hydrogels de collagène I et d'hydrogels composites collagène I / sulfate de chondroïtine (CS).

a) La comparaison des gels obtenus à partir de différentes conditions expérimentales permet de sélectionner les conditions les plus adaptées. **b)** Illustration du protocole final retenu. Pour obtenir des hydrogels homogènes, il faut introduire dans l'ordre $x \mu\text{L}^{**}$ de sulfate de chondroïdine (CS) à 30mg/mL, puis 100 μL de PBS 10x, puis 100 μL de NaOH à 0,1M, puis 900 μL de collagène à 4mg/mL, puis $x \mu\text{L}^{**}$ de EDC à 80mg/mL et enfin $x \mu\text{L}^{**}$ de NHS à 20 mg/mL. Il est nécessaire de travailler à température ambiante et de ne pas utiliser de vortex. ******Les quantités de EDC et NHS à introduire dépendent du ratio massique en Collagène:CS choisi. Le tableau détaillé est présenté dans Matériels et Méthodes. **c)** Image d'un gel de ratio massique 1 : 1 en Collagène : CS et avec réticulants.

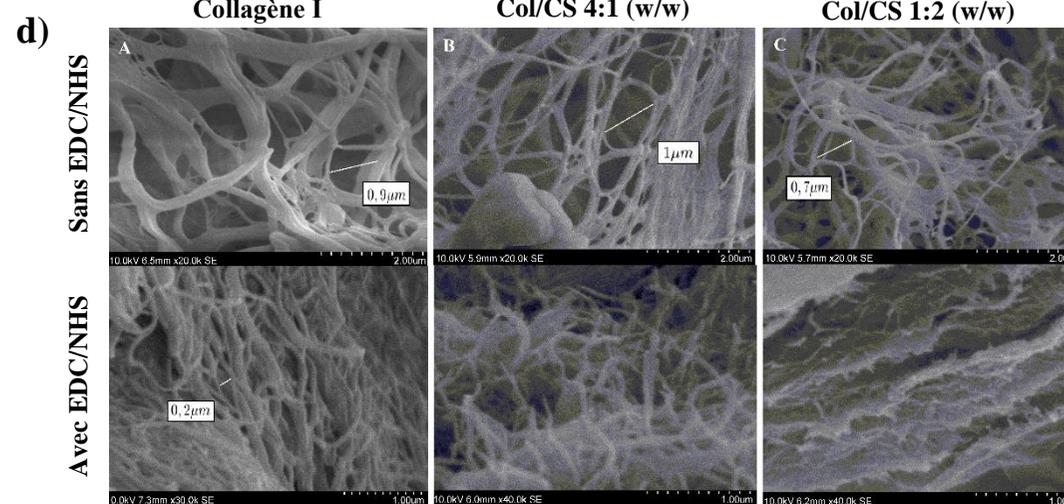
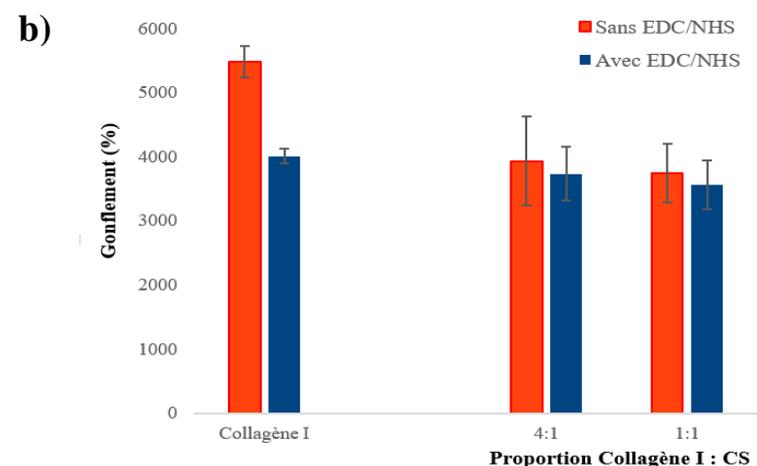
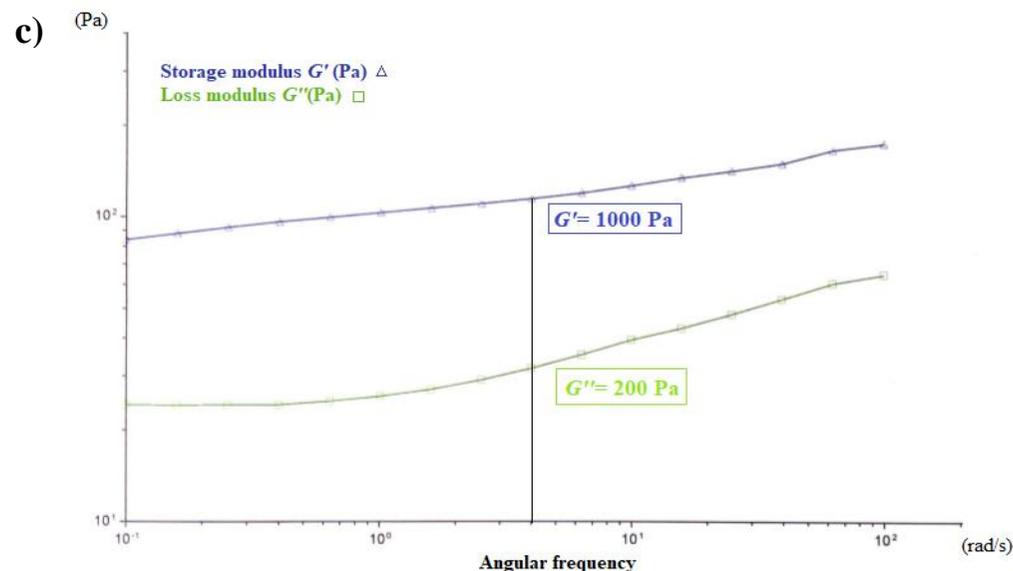
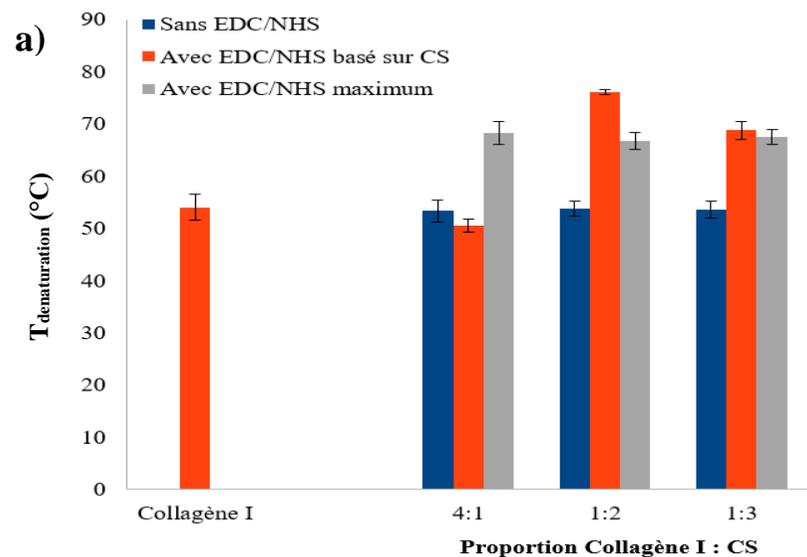


Figure 2. Caractérisation des hydrogels de collagène I et hydrogels composites collagène I /sulfate de chondroïtine (CS). **a)** Température de dénaturation mesurée par la calorimétrie différentielle à balayage (DSC). Des quantités d'EDC/NHS proportionnelles à la quantité de CS (basé sur CS) ou à celle de collagène I+CS (max) ont été comparées. **b)** Gonflement d'hydrogels de collagène I et d'hydrogels composites collagène I/CS, avant et après la réticulation par NHS/EDC. **c)** Mesure du module élastique G' et visqueux G'' d'hydrogel de collagène I reticulé effectuée sur un rhéomètre en mode oscillation. **d)** Images d'hydrogels de collagène I (A) et de collagène I/CS (B - 4: 1 et C - 1:2, w/w) obtenues par microscopie électronique à balayage (MEB). Les échantillons avant et après la réticulation se trouvent respectivement en haut et en bas. Les méthodes de préparation des gels soumis aux analyses et des précisions techniques sur les mesures peuvent être visibles dans *Matériel & Méthodes*.

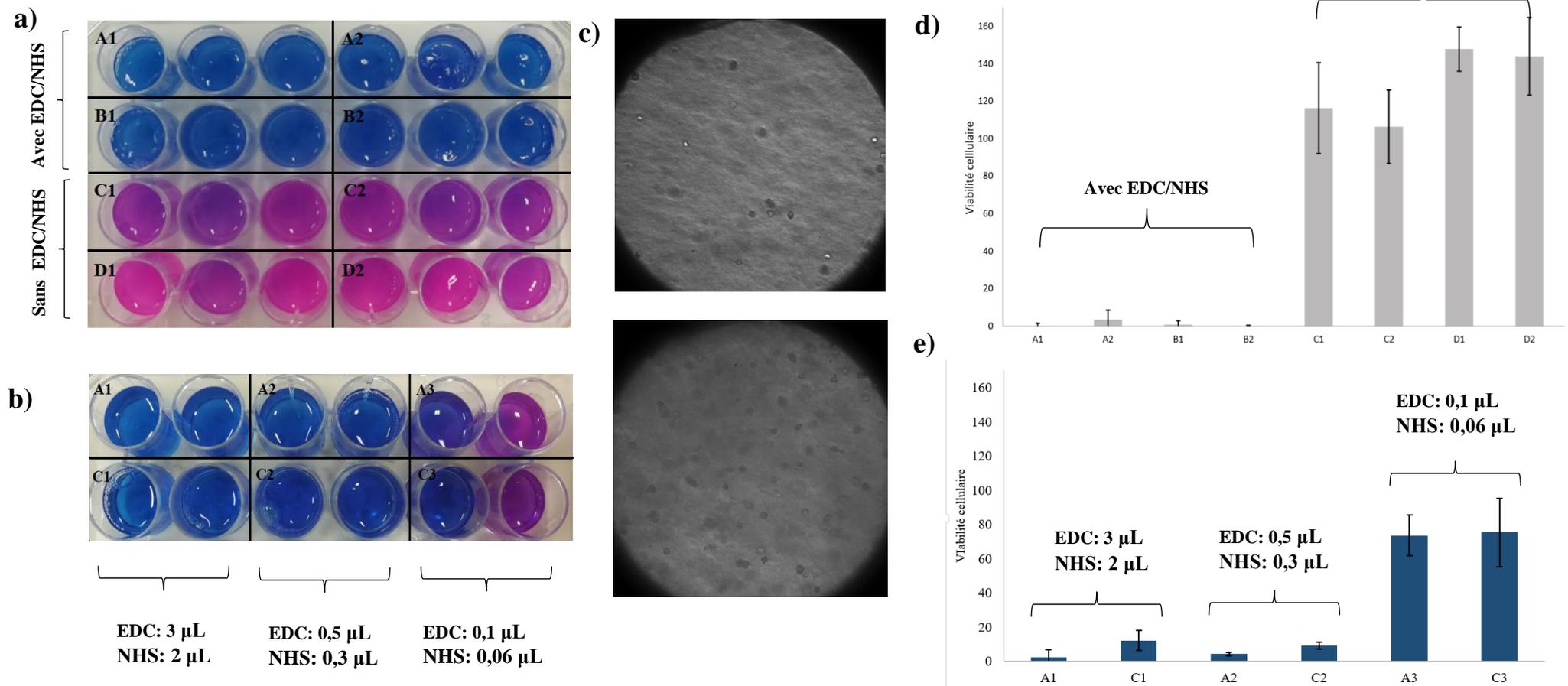


Figure 3. Viabilité des cellules après une semaine en présence d'hydrogels de collagène I / sulfate de chondroïtine (CS). **a)** Plaque avant lecture spectroscopique. 300µL d'une solution à 2 000 000 fibroblastes par mL sont insérés dans des hydrogels de huit compositions différentes, chacun étant réalisé en triplicat: hydrogels de collagène I/CS en ratio 1 :1 w/w (A et C) et hydrogels de collagène I (ligne B et D). Dans les puits notés 1 et 2 les cellules sont ajoutées respectivement avant et après le collagène. Dans les puits A et B, les crosslinkers EDC (15 µL) et NHS (9,5µL) sont ajoutés alors que ce n'est pas le cas pour les puits C et D. Après une semaine, la survie des cellules a été analysée par ajout d'*Alamar blue*. Sa réduction, provoquée par la respiration des cellules, lui donne une couleur rose. Dans les puits A et B, les crosslinkers EDC (15 µL) et NHS (9,5µL) sont ajoutés alors que ce n'est pas le cas pour les puits C et D. **b)** Plaque avant lecture spectroscopique. 300µL d'une solution à 2 000 000 fibroblastes par mL sont insérés dans des hydrogels de collagène I (ligne A) et de collagène I/CS en ratio et 1 :2 w/w (ligne C). Les colonnes 1,2 et 3 contiennent différentes concentrations de crosslinkers EDC (à 80mg/mL) et NHS (à 20 mg/mL), chacun étant réalisé en duplicat. Après une semaine, la survie des cellules a été analysée par ajout d'*Alamar blue*. **c)** L'observation au microscope des cellules insérées dans les hydrogels type B1 (en haut) et D1 (en bas). Pourtant il n'y a pas de différence notable entre les deux observations microscopique. **d) et e)** Résultats du test de viabilité cellulaire à l'*Alamar blue* correspondant respectivement aux plaques a) et b), par mesure de l'absorbance à 570nm et 600nm pour chaque puits. Ces mesures donnent le pourcentage de survie des cellules dans le puits. Afin de déterminer la toxicité d'un produit, le pourcentage de survie d'un échantillon est comparé à celui d'un échantillon témoin (ne contenant pas le produit).