

DISS. ETH NO. 19493

**Electrochemically-Addressable
Polyelectrolyte Substrates :
a Versatile Platform for Cell Sheet
Engineering**

A dissertation submitted to
ETH ZURICH

for the degree of
Doctor of Sciences

presented by
ORANE GUILLAUME-GENTIL
Eidg. Dipl. Apothekerin, ETH Zurich
born May 19, 1978
citizen of La Sagne, NE, Switzerland

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Janos Vörös, examiner
Prof. Dr. Masayuki Yamato, co-examiner
Dr. Fouzia Boulmedais, co-examiner

2011

Abstract

Surface modification with polyelectrolytes represents one of the most simple and versatile approach to engineer bio-interfaces with desired properties. Polyelectrolytes in aqueous solutions adsorb spontaneously onto oppositely charged surfaces, reversing the surface's net charge. This charge overcompensation allows for the subsequent adsorption of polyelectrolytes with opposite charges, and polyelectrolyte multilayers can thus be assembled simply through the alternate deposition of polycations and polyanions. Polyelectrolyte mono- and multilayers can be deposited on a broad variety of substrates, including non-planar surfaces, and offer a huge versatility in the choice of their components. The intrinsic properties of the polyelectrolytes, physico-chemical properties of the solvent, and the deposition parameters all have a profound influence on the internal structure and properties of polyelectrolyte multilayers, allowing for a tight tuning of their physical, chemical, topographical, and mechanical properties. Moreover, PEMs' stability and mechanical properties can be further modulated by chemical cross-linking, while additional biological properties can be obtained through the incorporation of bioactive compounds in the assembly. Polyelectrolyte coatings represent therefore highly attractive materials for biomedical applications.

Previous research efforts using polyelectrolytes in the biomedical field focused mainly on their promising application for implant coatings, drug/gene delivery, or fundamental cell studies. In this thesis, the potential of polyelectrolyte-modified surfaces was explored for cell sheet engineering. Developed in the early 90's, the cell sheet technology has now emerged as one of the most promising approach for regenerative medicine. The technique consists in the recovery of free-standing cell monolayers in a non-invasive process that preserves the integrity of the critical cell surface proteins. The harvested cell sheets can then either be directly transplanted into host tissues, or first layered to construct 3D tissue-like structures. This approach has now been applied for the regeneration of a variety of tissues within different animal models, and the first clinical trials for human therapies have been initiated. Along the success of cell sheet technology in regenerative medicine, much effort has been directed towards the development of platforms enabling the recovery of intact cell sheets. While the platforms were originally, and are still mostly, based on temperature-responsive substrates, various approaches based on electrochemical, enzymatic, or magnetic triggers have also been proposed. The alternative approaches developed in the frame of this thesis provide unprecedented simplicity and versatility. Through the development of polyelectrolyte bio-interfaces presenting a tight control over their cell adhesive properties and a precisely tunable degradation behavior under electrochemical control, different platforms were designed, allowing not only for the recovery of intact cell sheets, but also for the creation and harvesting of micro-patterned heterotypic cell co-cultures. While these novel platforms

represent attractive alternative substrates for cell sheet engineering, they also hold attractive potentials for controlled drug/gene release, for providing multiple functionalities in parallel, through compartmentalization and/or micro-patterning, and for automation and remote control.

Résumé

Le traitement de surfaces par un revêtement de polyélectrolytes représente l'une des approches les plus simple et polyvalente pour l'élaboration de bio-interfaces aux propriétés désirées. Les polyélectrolytes en solution aqueuse adsorbent spontanément sur des surfaces de charge opposées, inversant le signe de la charge de surface. Cette surcompensation de charge permet l'adsorption ultérieure de polyélectrolytes de charges opposées, et des multicouches de polyélectrolytes peuvent ainsi être assemblées simplement par déposition alternée de polycations et de polyanions. Les mono- et multicouches de polyélectrolytes peuvent être déposées sur un large éventail de substrats, y compris des surfaces non planes, et offrent une grande versatilité dans le choix de leurs composants. Les propriétés intrinsèques des polyélectrolytes, les propriétés physico-chimiques du solvant, ainsi que les paramètres de déposition ont tous une profonde influence sur la formation et la structure interne des multicouches de polyélectrolytes, permettant un réglage minutieux de leurs propriétés physiques, chimiques, topographiques et mécaniques. En outre, la stabilité des multicouches de polyélectrolytes et leurs propriétés mécaniques peuvent aussi être modulées par réticulation chimique, tandis que d'autres propriétés biologiques peuvent être obtenues par l'incorporation de composés bioactifs dans l'assemblage. Les revêtements de polyélectrolyte représentent donc des matériaux très attractifs pour des applications biomédicales.

Les précédents efforts en recherche biomédicale utilisant des polyélectrolytes ont porté principalement sur leurs applications prometteuses pour les revêtements d'implants, le développement de dispositifs d'administration de médicaments ou de gènes, ou sur des études biologiques fondamentales. Dans cette thèse, le potentiel des surfaces modifiées avec des polyélectrolytes est exploré en vue d'application en génie tissulaire, plus précisément pour la technologie des feuilles de cellules. Développée au début des années 90, la technologie des feuilles de cellules apparaît aujourd'hui comme l'une des approches les plus prometteuse en médecine régénératrice. Cette technique consiste à détacher des monocouches de cellules par un processus non-invasif, tout en préservant l'intégrité des protéines essentielles sur la surface des cellules. Les feuilles de cellules ainsi récoltées peuvent ensuite être soit transplantées directement dans les tissus cibles, soit superposées pour créer des structures tridimensionnelles ressemblant aux tissus biologiques. Cette approche a été appliquée pour la régénération de divers tissus dans différents modèles animaux, et les premiers essais cliniques pour les thérapies humaines ont été lancés. Accompagnant la réussite de cette technologie des feuilles de cellules en médecine régénératrice, beaucoup d'efforts ont été orientés vers le développement de plates-formes permettant la récupération de feuilles de cellules intactes. Bien que ces plates-formes furent à l'origine, et sont encore la plupart du temps, basées sur des substrats réagissant à la température, différentes approches fondées sur des déclencheurs électrochimiques,

enzymatiques, ou magnétiques, ont également été proposés. Les approches alternatives développées dans le cadre de cette thèse offrent une simplicité et une polyvalence sans précédent. Grâce au développement de bio-interfaces de polyélectrolyte présentant un contrôle précis sur leurs propriétés adhésives et un comportement de dégradation ajustable sous contrôle électrochimique, différentes plates-formes ont été conçues, permettant non seulement la récupération de feuilles de cellules intactes, mais aussi la création et la récolte de co-cultures cellulaires hétérotypiques. Représentant des alternatives intéressantes pour l'ingénierie de feuilles de cellules, ces nouvelles plates-formes détiennent aussi un potentiel attrayant pour le développement de dispositifs sophistiqués pour délivrer des médicaments ou des gènes de manière contrôlée, pour fournir de multiples fonctionnalités en parallèle, à travers des cloisonnements et/ou des micro-motifs, et pour l'automatisation et le contrôle à distance.