# Real-time study of CTC-cluster growth and secretions on dedicated microfluidic platform coupled with multiplexed biosensor

# Abstract

Cancer is the proliferation of purposeless cells taking place in any part of the body while the spread of cancer to different part via the circulation is defined as metastasis. In recent years, circulating tumour cells (CTCs) have come to the forefront for their role in metastatic progression. Their detection and analysis can provide valuable information for early cancer diagnosis, screening, and monitoring. The objective of this project is to develop an integrated biosensing-microfluidic setup that can trap and cultivate such rare cells for their biomarker analysis. For biosensing, label-free optical modality has been selected through plasmonic materials (gold, Au) and nano-structuration (nanohole array, NHA). The gold surfaces were functionalized with mixed alkylated/PEGylated monolayer allowing the covalent immobilization of anti-CTC biomarker antibodies. Two covalent immobilization strategies were studied: (i) novel site-specific via enzymatic activation, copper free strain promoted azide-alkyne click chemistry (SPAAC) using dibenzocyclooctyne and (ii) conventional carbodiimide/NHS chemistry via amine coupling for comparative analysis. Surface characterization was performed through XPS analysis, AFM, and Infra-Red spectroscopy. SPRi analysis was used to evaluate biosensing efficiency. Comparative analysis between conventional and copper free click chemistry exhibited SPAAC immobilized target recognition to be ~3 times higher. Thus, optimal coupling chemistry was demonstrated leading to site-specific and oriented antibody immobilization on functionalized gold surfaces. Then, to trap cancer cells, PDMS microfluidic device was fabricated via moulding protocol. Characterization for valve actuation and trap unit functionality was performed first using microbeads and then metastatic breast cancer MCF7 cell line. For analysis of biomarkers secreted directly by cancer cells, ELISA was performed for metastatic ovarian cancer SK-OV-3 cells for Interleukin-6 (IL-6) and fibronectin, where around 5-50 pg/nL for IL-6 and 600-800 pg/nL for fibronectin concentrations were analysed per cell. An integrated setup was developed with a label-free optical NHA biosensor coupled within a pneumatically actuated microfluidic device for directed real-time and multiplexed analysis of such biomarker concentrations. Cancer associated biomarkers i.e., IL-6 and soluble Tumour Necrosis Factor Receptor 2 (TNFR2) were injected into the integrated microsystem for characterization of biosensing efficiency using the optimal surface immobilization approach. We were able to highlight significant difference between specific IL-6 signal interaction vs non-specific TNFR2 signal interaction, however for subsequent lowered concentration (sub ng/mL to pg/mL), this setup is not sensitive enough to detect such small biomarkers. This could be due to inconsistencies showcased for the gold film deposition protocol employed for NHA fabrication, where significant difference between hole size and deposition depth was showcased. The system developed in this work provide an avenue for studying the effects of different chemotherapeutic drugs on cultured CTCs from cancer patient blood samples. The results obtained are expected to further contribute towards the development of precise cancer diagnosis and personalized treatments.

## Keywords:

*Circulating tumour cells (CTCs), Cancer biomarkers, Surface functionalization, Copper-free click chemistry, Antibody immobilization, Plasmonic biosensor, Nanohole arrays (NHA), Extraordinary optical transmission (EOT), Microfluidics, Pneumatic valves, Cell trapping*

# Titre: Étude en temps réel de la croissance et des sécrétions des clusters de CTC sur une plateforme microfluidique dédiée couplée à un biocapteur multiplexé

# Résumé:

Le cancer est dû à une proliferation incontrôlée de cellules dans une partie l’orgnisme, tandis qu’une métastase est la propagation du cancer à différentes parties de l’organisme via la circulation sanguine. Ces dernières années, les cellules tumorales circulantes (CTC) sont devenues incontournables pour leur rôle dans la progression métastatique. Ces cellules proviennent du site tumoral primaire et expriment des biomarqueurs spécifiques de la propagation du cancer. Leur détection et leur analyse peuvent fournir des informations précieuses pour le diagnostic, le dépistage précoce et la surveillance du cancer. L'objectif de ce projet est de développer un microsystème fluidique integrant un biocapteur permettant à la fois de piéger et cultiver ces cellules rares et d’analyser les biomarqueurs sécrétés. Le biocapteur sélectionné est basée sur une détection sans marquage utilisant des matériaux plasmoniques (or, Au) et la nanostructuration (matrice de nanotrous, NHA). Les surfaces d'or ont été fonctionnalisées avec une monocouche mixte alkylée/PEGylée permettant l'immobilisation covalente d'anticorps anti-biomarqueur de CTC. Deux stratégies d'immobilisation covalente ont été étudiées: (i) la chimie click sans cuivre utilisant du dibenzocyclooctyne (SPAAC) et une activation enzymatique site-spécifique, et (ii) la chimie conventionnelle carbodiimide/NHS via le couplage des amines pour l’analyse comparative. La caractérisation de surface a été réalisée par XPS, AFM et spectroscopie infra-rouge. L'analyse SPRi a été utilisée pour évaluer l'efficacité de la biodétection. Il a été démontré que la chimie click SPAAC conduit à une reconnaissance des cibles 3 fois plus élevée qu’avec la chimie conventionnelle. La chimie click SPAAC permet donc l’immobilisation d'anticorps site- spécifique et orientée sur les surfaces d'or fonctionnalisées.Ensuite, pour piéger les cellules cancéreuses, un dispositif microfluidique en PDMS a été fabriqué via un protocole de moulage. La caractérisation de l'actionnement des vannes et de la fonctionnalité de l'unité de piègeage a d'abord été réalisée à l'aide de microbilles, puis de la lignée cellulaire MCF7 du cancer du sein métastatique. Afin de verifier les concentrations de biomarqueurs sécrétés par les CTC, un dosage ELISA de l’Interleukine-6 (IL-6) et de la fibronectine a été réalisé sur les cellules de cancer métastatique ovarien SK-OV-3. Les résultats indiquent 5-50 pg/mL pour IL-6 et 600-800 pg/mL pour la fibronectine. Une configuration intégrée a été développée avec le biocapteur NHA dans le dispositif microfluidique pour la detection en temps reel et l’analyse multiplexe de ces concentrations de biomarqueurs. Des biomarqueurs associés au cancer, à savoir l'interleukine-6 (IL-6) et le récepteur soluble du facteur de nécrose tumorale 2 (TNFR2), ont été injectés dans le microsystème pour caractériser l'efficacité de la biodétection utilisant l'approche d'immobilisation optimale des anticorps anti-IL-6 sur la surface du biocapteur. Nous avons mis en evidence une difference significative entre la detection spécifique de IL-6 et la detection non spécifique de TNFR2. Cependant pour des concentrations de l’ordre du ng/mL ou pg/mL, notre dispositif n’est pas suffisamment sensible probablement à cause de la mauvaise qualité du dépôt d’or sur les NHA. Le système développé dans ce travail offre une voie pour étudier les effets de différents traitements chimiothérapeutiques sur les CTC en culture à partir d'échantillons de sang de patients cancéreux. Les résultats obtenus devraient contribuer au développement d'un diagnostic précis du cancer et de traitements personnalisés.

## Mots clés:

*Cellules tumorales circulantes (CTC), Biomarqueurs du cancer, Fonctionnalisation de surface, Chimie du clic sans cuivre, Immobilisation d'anticorps, Biocapteur plasmonique, Réseaux de nanotrous (NHA), Transmission optique extraordinaire (EOT), Microfluidique, Valves pneumatiques, Piégeage cellulaire*