

# R É S U M É

## de la thèse de doctorat

**ÉTUDES CONCERNANT LA DÉTECTION DE CELLULES TUMORALES CIRCULANTES  
DANS LE SANG DE CHIENS ATTEINTS DE CARCINOME MAMMAIRE (*CANIS LUPUS  
FAMILIARIS*)**

**Doctorant: BURINARU Tiberiu Alecu**

**Coordinateur scientifique: Prof. univ. Dr. MILITARU Manuella**

**MOTS-CLÉS: Cellules tumorales circulantes, carcinome mammaire canin,  
dispositif microfluidique, capteur électrochimique, spectroscopie d'impédance  
électrochimique.**

Les tumeurs mammaires canines constituent un problème de santé majeur et sont les tumeurs les plus fréquemment diagnostiquées chez les femelles, 50 à 80 % d'entre elles étant malignes. La recherche dans le domaine de l'oncologie vétérinaire est en pleine expansion et se concentre sur le développement de nouvelles techniques de diagnostic précoce et sur la découverte de nouveaux biomarqueurs qui peuvent être utilisés pour détecter les tumeurs ou pour évaluer le pronostic et l'efficacité du traitement.

Les recherches incluses dans cette étude ont été menées dans le laboratoire de pathologie de la Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université des Sciences Agronomiques et de Médecine Vétérinaire de Bucarest, et comprenaient des investigations antemortem sur des canidés femelles et des études sur des lignées de cellules tumorales. L'examen PCR a également été effectué à la Faculté de Médecine Vétérinaire et l'examen immunofluorescent à l'Institut National de Recherche et de Développement Médical et Militaire "Cantacuzino". Les tests sur les lignées cellulaires ont été effectués à l'Institut National de Recherche et de Développement "Victor Babes" de Bucarest. La conception et la fabrication du dispositif microfluidique ont été réalisées à l'Institut National de Recherche et de Développement en microtechnique - IMT Bucarest.

**Structure de la thèse.** La thèse de doctorat "Études concernant la détection de cellules tumorales circulantes dans le sang de chiens atteints de carcinome mammaire (*canis lupus familiaris*)" est structurée selon les exigences légales en deux parties principales. *Partie I : Étude bibliographique* comprend 34 pages, représentant 27,6% du travail. Cette partie est structurée en quatre chapitres et présente l'anatomie,

l'histologie et la physiologie de la glande mammaire chez le chien, le processus tumoral et les métastases des tumeurs de la glande mammaire, ainsi que la détection et les implications cliniques des cellules tumorales circulantes. *Partie II : Recherche personnelle* est structurée en cinq chapitres et comprend le but et les objectifs de la recherche, le matériel d'étude et les méthodes utilisées pour le diagnostic, pour le développement du système microfluidique et pour son test, l'évaluation de la présence des molécules EpCAM et CRYAB dans le carcinome mammaire, la description du flux technologique pour le développement du dispositif microfluidique, les expériences pour tester le dispositif sur des lignées de cellules tumorales et les expériences pour tester le dispositif sur des échantillons de patientes. Cette partie comprend 89 pages, soit 72,4 % de l'article.

### ***Partie I : Étude bibliographique***

*Le chapitre I - Anatomie, histologie et physiologie de la glande mammaire chez la chienne* fournit des informations sur l'aspect, la morphologie et la physiologie normale de la glande mammaire chez la chienne. Ces informations sont indispensables pour pouvoir observer et distinguer les changements pathologiques qui surviennent avec le développement d'une tumeur à ce niveau.

*Le chapitre II - Processus tumoral mammaire* contient des généralités sur le processus tumoral et décrit les mécanismes de la carcinogenèse. Le chapitre présente la classification des types de tumeurs mammaires et la description histologique des tumeurs mammaires malignes d'origine épithéliale. Des informations sur la fréquence, la stadification et le pronostic des tumeurs mammaires chez le chien sont également présentées.

*Le chapitre III - Métastases des tumeurs de la glande mammaire chez la femme* présente des généralités sur le processus métastatique et la pathogenèse des métastases. Comme cette thèse propose la détection de cellules tumorales circulantes, ce chapitre est particulièrement important pour comprendre comment les cellules tumorales atteignent la circulation sanguine.

*Le chapitre IV - Cellules tumorales circulantes, détection et implications cliniques* fournit des informations sur les caractéristiques générales des cellules tumorales circulantes et des données sur l'état actuel de l'utilisation des cellules tumorales circulantes en médecine vétérinaire. Le chapitre présente les marqueurs utilisés pour la détection des cellules tumorales circulantes chez le chien et les dispositifs et méthodes de détection des CTC en médecine humaine et vétérinaire. La dernière section du chapitre présente les implications cliniques en médecine humaine et vétérinaire.

### ***Partie II : Recherche personnelle***

*Le chapitre V - Matériel général et méthodes utilisées pour la détection des cellules tumorales circulantes* comprend des informations sur les animaux étudiés, les méthodes de diagnostic, les techniques de biologie moléculaire pour la détection des molécules marqueurs de tumeurs à la surface des cellules, les lignées de cellules tumorales utilisées

pour tester la fonctionnalité du dispositif et le processus technologique utilisé pour la fabrication du dispositif microfluidique.

Les recherches menées dans le cadre de cette étude se sont déroulées de 2016 à 2023 sur 12 chiens dont 9 échantillons de tissus tumoraux et 3 échantillons de sang ont été prélevés. Les activités de recherche comprenaient des activités spécifiques pour le diagnostic et la caractérisation des marqueurs tumoraux, des activités pour la microfabrication d'un système microfluidique avec un capteur électrochimique intégré, et des activités pour la détection des cellules tumorales circulantes dans les échantillons de sang des chiens atteints de carcinome mammaire.

Pour démontrer la fonctionnalité des capteurs électrochimiques développés dans cette étude, trois lignées cellulaires tumorales ont été utilisées : la lignée cellulaire d'adénocarcinome du côlon humain SW-403 (n° de catalogue 87071008), HT-29 (n° de catalogue 91072201) et les cellules de cancer du sein MCF-7 (HTB-22-ATCC). Le dispositif a également été testé sur 3 échantillons de sang de patientes atteintes d'un carcinome mammaire.

Les méthodes utilisées pour le diagnostic et les tests de biologie moléculaire consistaient en un examen cytopathologique, un examen histopathologique, un examen par immunofluorescence et un examen par réaction en chaîne de la polymérase.

Les méthodes utilisées pour le développement du système microfluidique et pour la détection des cellules tumorales circulantes étaient les suivantes : microfabrication, microscopie électronique à balayage (MEB), spectroscopie Raman, mesures électrochimiques, croissance de graphène vetical, synthèse de nanoparticules d'or, immobilisation d'anticorps anti-EpCam et obtention de PDMS et encapsulation du capteur électrochimique.

*Chapitre VI - Détection des molécules EpCAM et CRYAB dans le carcinome mammaire canin* la molécule EpCAM et 7 marqueurs d'ARNm tumoraux, à savoir CLDN7, CRYAB, ELF3, SLC1A1, ATP8B1, EGFR et F3, exprimés dans des tumeurs mammaires canines de différents histotypes ont été étudiés. Des échantillons de tissus frais ont été analysés à l'aide de deux techniques différentes afin d'identifier les molécules d'intérêt. Pour détecter EpCAM dans les échantillons de tissus frais, nous avons utilisé des méthodes d'immunofluorescence après avoir congelé le tissu et l'avoir coupé à l'aide d'un cryotome. Pour détecter l'ARNm, nous avons utilisé la détection par PCR en temps réel.

La molécule EpCAM a été détectée dans 5 échantillons de tissus tumoraux frais provenant de la même masse tumorale qui a été utilisée pour le diagnostic par examen histopathologique. Des fragments de tumeur de 2 x 2 cm<sup>2</sup> ont été utilisés et inclus dans le composé Tissue-Tek® O.C.T. et congelés à -80°C. L'examen par immunofluorescence a été réalisé en déplaçant des cryosections de 5 μm de tissu tumoral sur des lames de verre à l'aide du cryotome. Une méthode d'immunofluorescence indirecte a été utilisée

en utilisant des anticorps polyclonaux de lapin anti-EpCAM comme anticorps primaire et des anticorps fluorescents de chèvre anti-lapin comme anticorps secondaires.

Parmi les sept marqueurs que nous avons proposés pour la détection par qPCR, seul CRYAB a été détecté dans les 9 échantillons analysés. Le cycle de quantification moyen (Cq) pour les échantillons dans lesquels le marqueur CRYAB a été détecté était de 11,93. En comparant ce chiffre au Cq moyen de l'actine B, qui était de 20,92, nous pouvons extrapoler qu'il y a eu une augmentation de l'activité du marqueur ARNm CRYAB dans les échantillons de tumeurs. L'ARN a été extrait d'échantillons frais de 15 mg de tissu tumoral selon le protocole de "purification de l'ARN total à partir de tissu animal" à l'aide du kit RNeasy Mini. Cette méthode est utilisée pour enrichir l'ARNm car seules les molécules d'ARN de plus de 200 nucléotides sont piégées dans la membrane de silicium du kit, le reste des molécules d'ARN telles que l'ARNr 5,8, l'ARNr 5S et les ARNt étant plus petits sont sélectivement exclus. Le volume final de l'échantillon était de 50 µl. La détection des marqueurs d'ARNm a été réalisée à l'aide de la méthode de la PCR en temps réel (qPCR).

EpCAM a été détecté dans cinq tissus tumoraux différents provenant de chiens présentant différents types de carcinomes mammaires à l'aide de techniques d'immunofluorescence. CRYAB a également été détecté dans neuf échantillons de tissus différents provenant de chiens atteints de différents types de carcinomes mammaires à l'aide d'un examen PCR en temps réel. Les types de carcinomes mammaires les plus agressifs présentaient des valeurs EpCAM et CRYAB plus élevées. CRYAB peut être utilisé comme marqueur pour le diagnostic des carcinomes mammaires et pour évaluer l'agressivité de la tumeur.

*Le chapitre VII - Fabrication de capteurs électrochimiques* décrit les processus technologiques qui ont permis d'obtenir deux types de capteurs électrochimiques pour la détection de cellules tumorales circulantes. Ces deux capteurs ont été encapsulés individuellement dans un polymère appelé polydiméthylsiloxane (PDMS) pour obtenir des dispositifs en microluximide capables d'analyser des échantillons de sang en flux continu afin d'éviter toute perte ou contamination de l'échantillon.

Les dispositifs sont basés sur une plaquette de silicium de 4 pouces sur laquelle, en transférant optiquement la géométrie des masques sur la plaquette de silicium recouverte d'un substrat photorésistant, une série de 23 capteurs électrochimiques avec des électrodes en or a été réalisée. Ceux-ci ont été améliorés par l'ajout de processus technologiques supplémentaires, en recouvrant les électrodes de travail interdigitées d'une couche de graphène vertical. Le graphène vertical est un matériau nanocarbone 3D de pointe conçu pour améliorer les performances des capteurs. En outre, le graphène vertical a été décoré de nanoparticules d'or (AuNP) conçues pour augmenter la surface du graphène, donc le courant et la sensibilité du capteur, et pour accroître la spécificité de la détection en attachant plus de molécules d'anticorps à la même surface de détection.

Ce type de capteur est un capteur de type "In House" dont la conception et la géométrie sont uniques et qui a été conçu et développé à l'Institut national de recherche et de développement en microtechnique - IMT Bucarest. Le capteur a une taille de 25x10mm<sup>2</sup> et comporte une électrode auxiliaire, une électrode de référence et une électrode de travail interdigitée avec 64 paires interdigitées d'une largeur de 20 μm et d'un espace de 10 μm.

Le développement d'une nouvelle méthode d'encapsulation de capteurs électrochimiques à l'aide de l'impression 3D a également été démontré dans ce chapitre. L'encapsulation du capteur dans du PDMS transforme un simple capteur en un dispositif microfluidique complexe qui permet l'analyse complète d'échantillons sanguins de manière contrôlée en minimisant la perte d'échantillon et la contamination.

*Le chapitre VIII - Biocapteur vertical à base de graphène pour l'évaluation de la signature diélectrique des cellules tumorales* décrit la première étape du test du capteur électrochimique. Étant donné que l'hétérogénéité des cellules tumorales circulantes est élevée et que leur nombre dans un échantillon de sang est inconnu, des échantillons avec des concentrations connues de cellules tumorales provenant de lignées de cellules tumorales standardisées et caractérisées sur le plan morphologique ont été utilisés pour rendre l'étape de test scientifiquement pertinente.

Les propriétés diélectriques des cellules tumorales ont été évaluées à l'aide d'un biocapteur basé sur l'EIS. Le capteur a été testé sur trois lignées cellulaires tumorales différentes : les cellules tumorales du cancer du sein humain (MCF-7), la lignée cellulaire de l'adénocarcinome colorectal SW-403 et la lignée cellulaire de l'adénocarcinome colorectal HT-29. La nouveauté de l'approche consiste à utiliser un biocapteur électrochimique vertical à base de graphène. Nous avons démontré qu'en utilisant le capteur développé, nous pouvions différencier trois types différents de lignées cellulaires tumorales sur la base de la signature diélectrique spécifique de chaque lignée cellulaire.

Le biocapteur a été capable de détecter 100 cellules mL<sup>-1</sup>. Après avoir analysé les données obtenues, nous avons conclu que les cellules de la lignée cellulaire tumorale HT-29 ont une surface membranaire beaucoup plus grande et une réactance capacitive plus faible que les cellules de la lignée cellulaire SW-403. Comme les cellules HT-29 ont une capacité membranaire plus élevée, elles stockent un plus grand nombre de charges électriques, ce qui conduit à une conductivité plus élevée et à une résistance plus faible au transfert de charges. Les microvillosités membranaires contiennent une très forte concentration de résidus lipidiques, en particulier de cholestérol-glycosphingolipides. On peut donc en déduire que les cellules HT-29 ont plus de radeaux lipidiques que les cellules SW-403. Les cellules tumorales SW-403 ont tendance à adhérer et à former de grands amas cellulaires. Ce fait est validé par les mesures EIS réalisées à l'aide du capteur mis au point. Les cellules MCF-7 sont de grandes cellules adhérentes d'une taille de 20 à 25 μm. Les résultats montrent qu'elles ont une résistance au transfert de charge

plus faible et une conductivité et une permittivité plus élevées que les deux autres lignées de cellules tumorales étudiées.

*Le chapitre IX - Détection des cellules tumorales circulantes dans le carcinome mammaire canin* présente la deuxième phase de test du dispositif microfluidique avec des échantillons contenant des concentrations connues de cellules tumorales provenant de la lignée cellulaire de tumeur mammaire MCF-7 utilisée comme modèle pour la détection des cellules tumorales circulantes et avec des échantillons de sang de patients atteints de carcinome mammaire dans lesquels la détection et la capture d'éventuelles cellules tumorales circulantes dans le flux sanguin ont été tentées.

Les tests ont été réalisés avec l'un des capteurs développés au chapitre VII, un capteur EIS encapsulé dans du PDMS. Il s'agit d'un biocapteur à électrodes d'or interdigitées fonctionnalisées avec des anticorps anti-EpCAM capables de capturer et d'analyser les propriétés diélectriques des CTC capturées. Un nouveau marqueur métastatique a également été évalué à l'aide d'anticorps anti-CD36. Le dispositif a été testé en utilisant la lignée de cellules tumorales du cancer du sein MCF-7 comme modèle de cellules tumorales circulantes. Le dispositif a également été testé à l'aide de trois échantillons de sang provenant de chiens atteints de carcinome mammaire. Le sang total a été lysé pour éliminer les globules rouges et les échantillons résultants ont été passés dans le dispositif microfluidique. La liaison des CTC a été évaluée sur la base du changement d'impédance.

Nous avons démontré la sensibilité du dispositif microfluidique en détectant seulement 3 cellules MCF-7 sur la surface de l'électrode. En utilisant le dispositif, nous avons également détecté des CTC dans des échantillons de sang provenant de patients atteints de carcinome mammaire. Les CTC sont quantifiés sur la base de l'augmentation de l'impédance qui est directement proportionnelle au nombre de cellules capturées. Le diagramme de Bode montre les caractéristiques diélectriques des CTC capturées.